

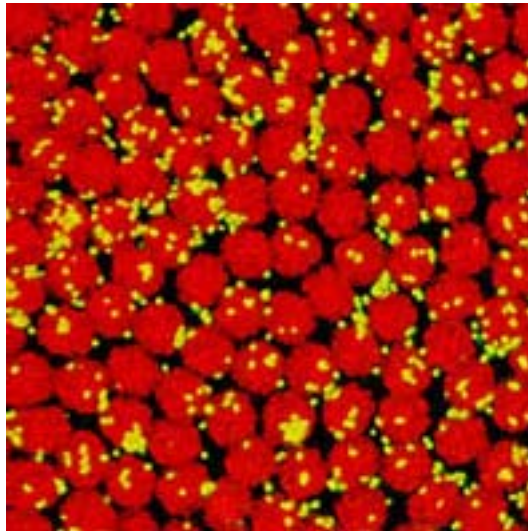
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Βιολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Κυτταροπλασματική Ασυμβατότητα:
Συγκριτική μελέτη στελεχών *Wolbachia*
στη *Drosophila***

Ζωή Βενέτη



Ηράκλειο 2003

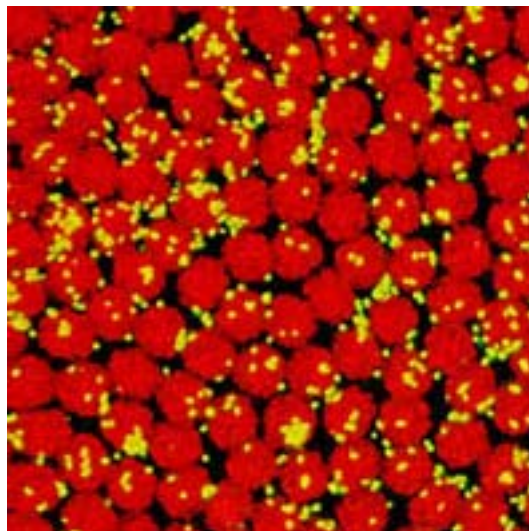
Εξώφυλλο Τα βακτήρια (κίτρινα) γύρω από τους πυρήνες (κόκκινοι) σε ένα αυγό μύγας

University of Crete
Department of Biology

Ph. D THESIS

**Cytoplasmic Incompatibility: a comparative
study of Wolbachia strains in Drosophila**

Zoe Veneti



Heraklion 2003

...στον μπαμπά μου

**Από τις δύο στρατές,
διαλέγω τον ανήφορο.**

Γιατί;

**Χωρίς νοητά επειρήματα,
χωρίς καμμία βεβαιότητα.**

Ασκητική, Νίκος Καζαντζάκης

Επιβλέποντες Καθηγητές

Σαββάκης Χαράλαμπος (Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής)

Μπούρτζης Κώστας (Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σαββάκης Χαράλαμπος (Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής)

Μπούρτζης Κώστας (Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων)

Οικονόμου Αναστάσιος (Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σαββάκης Χαράλαμπος (Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής)

Μπούρτζης Κώστας (Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Ιωαννίνων, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων)

Οικονόμου Αναστάσιος (Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Γαλανόπουλος Βασίλειος (Επίκουρος Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Δελιδάκης Χρήστος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Ζούρος Ελευθέριος (Καθηγητής, Παν/μιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας)

Μαρμάρας Βασίλειος (Καθηγητής, Παν/μιο Πάτρας, Τμήμα Βιολογίας)

Ηράκλειο, Σεπτέμβρης 1990. Υποδοχή πρωτοετών και ο κ. Λούης φορώντας το γνωστό T-shirt με τις ...ψείρες, θα μας αποκαλέσει αποτυχημένους γιατρούς και θα μας προειδοποιήσει ότι οι περισσότεροι θα τα παρατήσουν. Μάλλον από πείσμα θα μείνω, «ψάχνοντας τον εαυτό μου» μέχρι το τρίτο έτος, όταν το μάθημα της εξέλιξης θα με ενθουσιάσει. Διπλωματική και master στο εργαστήριο του κ. Ζούρου λοιπόν, με σαυράκια και μύγες της Μεσογείου, αντίστοιχα. Το '96 θα με βρει ειδικευμένη στη Γενική Βιολογία (!) και με τα πρώτα σκιρτήματα για τη Μοριακή, θα ζητήσω από τον κ. Σαββάκη να κάνω διδακτορικό στο εργαστήριο του. Αυτός θα πει το μεγάλο ναι και μετά από δυο πέτρινα χρόνια θα με συστήσει το καλοκαίρι του '98 στον Κώστα, ο οποίος θα μου γνωρίσει τον κόσμο των insects, sex and parasites. Μετακομίζοντας από το IMBB στην Ιατρική, θα δουλέψω παρέα με τη Νίκη Νιργιαννάκη και το τρίτο πρόγραμμα για τα επόμενα δυο χρόνια. Ο Γεωργάτος και η Νίκη Κουρμούλη θα λύνουν τις πρωτεϊνικές μου απορίες και η 2Γ09 θα γίνει το δεύτερο σπίτι μου. Το ταξίδι στο Chicago, θα με ωριμάσει σαν επιστήμονα (βεβαίως, βεβαίως), μια και για πρώτη φορά συμμετέχω ευχάριστα σε επιστημονικές συζητήσεις πίνοντας μπύρες με τον Tim, την Avis, τον Cort και το Michael. Γυρίζω στο Ηράκλειο σχεδόν ειδική στο confocal, αλλά χωρίς τη Μυρτώ και τη Μαρία τα πράγματα δε θα ήταν εύκολα.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρω ότι οι παραπάνω ανησυχίες χρηματοδοτήθηκαν από το IKY, το IMBB και υπομονετικά από τους γονείς μου. Πατώντας λοιπόν στα πόδια μου θα κάνω αίτηση για postdoc, και θα φύγω για το Λονδίνο τον Ιανουάριο του 2002, χωρίς να έχω γράψει τη διατριβή μου. Το γράψιμο θα αποβεί εξαιρετικά δύσκολο και ίσως να μη τελειωνε ποτέ χωρίς την υποστήριξη του Greg και της Filipa. Χωρίς επίσης τη βοήθεια της Μαίρης Αδαμάκη και της Επταμελούς Επιτροπής δε θα τα διαβάζατε αυτά τώρα.

Ξέχασα να μνημονεύσω κανένα; Ααα ναι, το Γιάννη, την Κατερίνα, τη Βάσω, την Ισαβέλλα, το Gareth, το Γιωργάκη, το Θάνο και το Νίκο που μπαινοβγαίνουν στη ζωή μου και την κάνουν όμορφη, την αδελφή μου, την Ellie και τον Alex, που την κάνουν γλυκιά.

Τώρα αν πάλι ξέχασα κανένα είναι και κείνη η αρρώστια που δε θυμάμαι το όνομά της και είμαι και 35 χρονών παιδάκι μου!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

κεφάλαιο		σελίδα
	Περίληψη/Summary	9
1	Εισαγωγή: βακτήρια, μύγες και αναπαραγωγικές ανωμαλίες	13
2	Εκτίμηση του μεγέθους του γονιδιώματος της <i>Wolbachia</i> με τη χρήση Pulse-Field Gel Electrophoresis	39
3	Μόλυνση <i>in vitro</i> δύο κυτταρικών σειρών από έντομα με το βακτήριο <i>Wolbachia</i>	49
4	Περιγραφή της κατανομής και του πολλαπλασιασμού της <i>Wolbachia</i> κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης της <i>Drosophila</i>	58
5	Κατανομή και πολλαπλασιασμός της <i>Wolbachia</i> κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και εμβρυογένεσης της <i>Drosophila</i>	89
6	<i>Wolbachia</i> και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα: μοντέλα και δεδομένα	107
	Publications	123

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Wolbachia* ανήκει στην α-υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων. Είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο, μητρικά κληρονομούμενο βακτήριο, το οποίο μολύνει αρθρόποδα και νηματώδεις. Προκαλεί μία σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών στους ξενιστές της, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών εμβρύων και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, οι οποίες ευνοούν τη μετάδοση και εξάπλωσή της. Η *Wolbachia* την τελευταία δεκαετία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, λόγω του ρόλου της σε βασικές εξελικτικές διαδικασίες, όπως η συμβίωση και η ειδογένεση. Επιπρόσθετα, η *Wolbachia* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για το γενετικό μετασχηματισμό εντόμων, τα οποία προκαλούν βλάβες στον τομέα της γεωργίας και της υγείας.

Η καλύτερα μελετημένη εμπλοκή της *Wolbachia* στην αναπαραγωγή των εντόμων, είναι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Στην πιο απλή της μορφή έχει ως αποτέλεσμα τη θνησιμότητα των εμβρύων, που προέρχονται από τη διασταύρωση ενός μολυσμένου αρσενικού με ένα μη μολυσμένο θηλυκό. Αρκετοί παράγοντες, γενετικοί και περιβαλλοντικοί, έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα, οι οποίοι επηρεάζουν τα επίπεδα της ασυμβατότητας (τον αριθμό των αυγών που δεν εκκολάπτονται). Παρόλα αυτά ο μοριακός μηχανισμός της παραμένει άγνωστος. Η *Wolbachia* κατά γενική παραδοχή τροποποιεί τα πατρικά χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Αυτή η τροποποίηση μπορεί να εξουδετερωθεί μόνο αν το ίδιο βακτηριακό στέλεχος είναι παρών στο έμβρυο. Σε διαφορετική περίπτωση διακόπτεται η ανάπτυξη του εμβρύου λόγω της μη κανονικής συμπεριφοράς των πατρικών χρωμοσωμάτων στις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις, που ακολουθούν τη γονιμοποίηση.

Μοριακές και βιοχημικές μικροβιολογικές μελέτες, οι οποίες θα βοηθούσαν στην κατανόηση της δράσης του βακτηρίου, είναι δύσκολες λόγω της αδυναμίας του να καλλιεργηθεί σε θρεπτικά μέσα, χωρίς κύτταρα. Για αυτόν το λόγο, η παρούσα διατριβή εστιάστηκε από τη μία στην ανάπτυξη εργαλείων για τον ευκολότερο χειρισμό του βακτηρίου και από την άλλη στη μελέτη της συμπεριφοράς του κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της γαμετικής σειράς της μύγας. Όσον αφορά στον πρώτο τομέα αναπτύχθηκε μία μέθοδος απομόνωσης γενωμικού DNA από *Wolbachia*, απαλλαγμένου σε ικανοποιητικό ποσοστό από DNA ξενιστή, καθώς και μία μέθοδος *in vitro* μόλυνσης κυτταρικών σειρών, με το εν λόγω βακτήριο. Η δεύτερη διάσταση

της διατριβής αυτής αφορά στη συγκριτική κυτταρολογική μελέτη μιας πληθώρας στελεχών, που εκφράζουν διαφορετικά επίπεδα ασυμβατότητας.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός και η κατανομή του βακτηρίου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της γαμετικής σειράς της μύγας, σε διαφορετικούς γενετικούς συνδυασμούς ξενιστή-παρασίτου. Παρατηρήθηκε αξιόλογη ετερογένεια, τόσο ανάμεσα στο ίδιο στέλεχος, όσο και ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη. Από τη σύγκριση της συμπεριφοράς ενός συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα ξενιστή και διαφορετικών στελεχών στον ίδιο ξενιστή, βγαίνουν ενδιαφέροντα συμπεράσματα για τη φύση των παραγόντων, που επηρεάζουν τα επίπεδα της ασυμβατότητας και γενικότερα για την εξέλιξη των σχέσεων ξενιστή-παρασίτου. Έτσι φαίνεται η ικανότητα πρόκλησης ασυμβατότητας να είναι εγγενής ιδιότητα του βακτηρίου, με κάποια στελέχη να την έχουν χάσει. Στα στελέχη που τη διαθέτουν, η ένταση του φαινοτύπου είναι ανάλογη της ποσότητας των βακτηρίων στα σπερματικά κύτταρα, η οποία ελέγχεται από τον ξενιστή.

Από εξελικτική σκοπιά, η συνεξέλιξη ξενιστή-παρασίτου φαίνεται να οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα ασυμβατότητας, υψηλή μητρική μετάδοση και χαμηλό κόστος της μόλυνσης, παράγοντες αλληλένδετοι με την πυκνότητα των βακτηρίων στους ιστούς-στόχους. Χρειάζεται πλήρης κατανόηση του μοριακού μηχανισμού όμως, για να διαλευκανθούν οι βαθύτερες σχέσεις μεταξύ της αναπτυξιακής δυναμικής των μολύνσεων και της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παρασίτου στη ρύθμιση των βακτηριακών αριθμών.

SUMMARY

The α -proteobacterium *Wolbachia pipientis* is a very common cytoplasmic symbiont of insects, crustaceans, mites and filarial nematodes. To enhance its transmission, *Wolbachia* has evolved a large scale of host manipulations: parthenogenesis induction, feminization and male killing. *Wolbachia*'s most common effect is a crossing incompatibility between infected males and uninfected females termed Cytoplasmic Incompatibility (CI). Little is known about the genetics and biochemistry of these symbionts because of their fastidious requirements. Such inherited microorganisms are thought to have been major factors for the evolution of sex determination and speciation. *Wolbachia* isolates are also of interest as vectors for the modification of wild insect populations and biological pest control.

The means by which *Wolbachia* induces CI are currently unknown. However, there is a general consensus that *Wolbachia* somehow modifies sperm during spermatogenesis and this modification has to be rescued by the same bacterial strain in the egg, for normal development to proceed. In any other case, paternal chromosomes behave abnormally after fertilization and the embryo dies due to asynchronous mitoses.

This thesis approached the mechanism of CI by different aspects. Firstly, in preparation for complete genome sequencing project, I estimated the genome sizes of two *Wolbachia* strains using pulse-field gel electrophoresis and developed a method to purify *Wolbachia* chromosomal DNA. Secondly, I demonstrated that *Wolbachia* infections could be simply established, maintained and stored *in vitro* using standard tissue culture techniques. Finally and most importantly, I monitored the bacterium during germ line development of the fly, where *Wolbachia* exerts its action.

Particularly, I described the growth and distribution of *Wolbachia* during spermatogenesis, oogenesis and embryogenesis in several different host/symbiont genetic combinations in *Drosophila* species. Considerable intra- and inter-strain variation in *Wolbachia* density and tissue distribution was observed. To dissect the relative contribution of host and symbiont factors to the expression of CI I compared the properties of a single *Wolbachia* strain in different host genetic backgrounds and different *Wolbachia* strains in the same host background. These experiments demonstrated that the ability to express CI is an intrinsic *Wolbachia* trait and is not determined by host factors. The level of sperm modification in those lines harboring

bacteria capable of modifying sperm however is influenced by host genetic background. Finally, numbers of infected sperm cysts are positively correlated with CI levels.

From an evolutionary point of view, it seems that host-symbiont co-evolution is leading to low CI levels, high maternal transmission and low fitness cost of the infection. These three factors are probably linked through a unique feature: bacterial density. Ultimately, a complete understanding of CI will include unraveling the deeper relationships between developmental dynamics of infection and the interplay of host genetic backgrounds with Wolbachia.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ: βακτήρια, μύγες και αναπαραγωγικές ανωμαλίες

Η διατριβή αυτή εστιάστηκε στη μελέτη του φαινομένου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, που προκαλείται από το βακτήριο *Wolbachia* σε πληθυσμούς *Drosophila*. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα εκφράζεται όταν ένα μολυσμένο αρσενικό διασταυρωθεί με ένα μη μολυσμένο θηλυκό και έχει ως συνέπεια το θάνατο των εμβρύων. Ο θάνατος οφείλεται στο «δηλητήριο» που φέρει το σπέρμα, το οποίο πρέπει να εξουδετερωθεί από το «αντίδοτο» που παρέχουν τα βακτήρια του αυγού, για να προχωρήσει η ανάπτυξη κανονικά.

Η εισαγωγή αυτή είναι χωρισμένη σε τρία μέρη. Πρώτα από όλα περιγράφεται το βακτήριο και σε γενικές γραμμές οι τροποποιήσεις που προκαλεί στο αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών του. Το δεύτερο μέρος εστιάζεται στην περιγραφή του φαινομένου της ασυμβατότητας και των στοιχείων που είναι γνωστά μέχρι σήμερα, τα οποία βοηθούν στη διερεύνηση του μηχανισμού της. Το τελευταίο μέρος κάνει μία γενική επισκόπηση της διατριβής και σκιαγραφεί τα επιμέρους κομμάτια της.

Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ WOLBACHIA

Γενική επισκόπηση

Βακτήρια του γένους *Wolbachia* μολύνουν πληθώρα αρθροπόδων, όπως έντομα, ακάρεα, καρκινοειδή (ανασκόπηση στο O'Neill 1997, Werren 1997, Bourtzis and O'Neill 1998, Bourtzis and Braig 1999, Stouthamer et al. 1999, Stevens et al. 2001, Bourtzis and Miller 2003), αράχνες (Oh et al. 2000) και νηματώδη σκουλήκια (Taylor and Hoerauf 1999). Ανήκουν στην α-υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων (O'Neill et al. 1992). Όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ρικετσιών (Rickettsiaceae) είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και κληρονομούνται από τη μητέρα. Όταν δεν έχουν αναπτύξει αμοιβαία συμβιωτική σχέση με τους ξενιστές τους, όπως με τα σκουλήκια που προκαλούν φιλαριάσεις (Bandi et al. 1999a), ένα είδος παρασιτικών σφηκών (Dedeine et al. 2001) ή ένα είδος κονουπιού (Dobson et al. 2002), προκαλούν μία σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών σε αυτούς, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (ανασκόπηση στο O'Neill 1997, Werren 1997, Bourtzis and O'Neill 1998, Bourtzis and Braig 1999, Stouthamer et al. 1999, Stevens et al. 2001, Bourtzis and Miller 2003). Επιπρόσθετα, έχει περιγραφεί και ένα στέλεχος του βακτηρίου, το

οποίο είναι παθογόνο στη μύγα του ξυδιού και προκαλεί πρόωμο θάνατο (Min and Benzer 1997). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτά έχει αυξηθεί εκθετικά, μια και η *Wolbachia* ίσως είναι το πιο κοινό μολυσματικό παράσιτο στη γη, μεταχειρίζεται τη σεξουαλική ζωή των ξενιστών της για δικό της όφελος, δημιουργεί καινούργια είδη και μπορεί τέλος να χρησιμοποιηθεί ως όπλο για την καταπολέμηση παρασίτων που βλάπτουν τη γεωργία και την υγεία (Knight 2001, Zimmer 2001).

Ιστορική ανασκόπηση

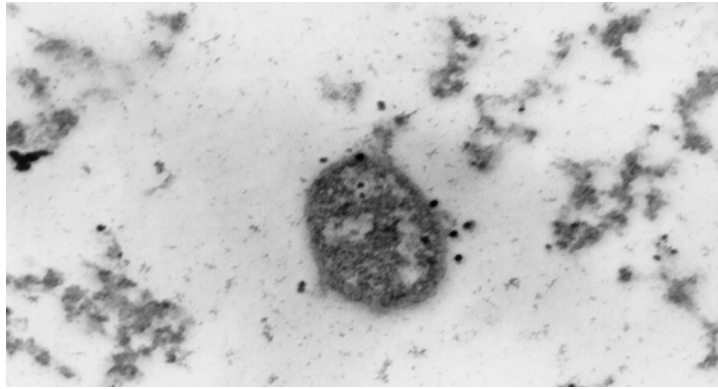
Τα βακτήρια *Wolbachia* πρωτοαναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία το 1924, από τους Hertig και Wolbach (Hertig and Wolbach 1924), ως βακτήρια που μοιάζουν με ρικέτσιες στις ωοθήκες του κουνουπιού *Culex pipiens*. Το είδος ονομάστηκε επίσημα *Wolbachia pipientis* το 1936 (Hertig 1936). Στη δεκαετία του 1950, οι Laven (Laven 1951) και Ghelelovitch (Ghelelovitch 1952) ανακάλυψαν ότι ορισμένες διασταυρώσεις μεταξύ κουνουπιών *Culex pipiens* ήταν ασύμβατες, δηλαδή δεν άφηναν απογόνους. Ο Laven (Laven 1959) παρατήρησε ότι ο παράγοντας ασυμβατότητας κληρονομούνταν κυτταροπλασματικά, δηλαδή μέσω της μητέρας και ονόμασε αυτό το φαινόμενο κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (KA). Οι δύο αυτές ανακαλύψεις δε συνδέθηκαν παρά μόνο τη δεκαετία του 1970, όταν οι Yen και Barr (Yen and Barr 1971) έδειξαν ότι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχετιζόταν με βακτήρια του γένους των ρικετσιών, αφού με παροχή αντιβιοτικών, εξαφανίζονταν τόσο τα βακτήρια, όσο και το φαινόμενο της ασυμβατότητας. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μολυσμένα αρσενικά ήταν ασύμβατα με θηλυκά, στα οποία είχαν χορηγηθεί αντιβιοτικά, ενώ η ανάδρομη διασταύρωση ήταν συμβατή. Τα επόμενα 25 χρόνια το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε πληθώρα εντόμων, όπως σκαθάρια, σφήκες, ακρίδες, κουνούπια, μύγες κλπ., ως μείωση του αριθμού των απογόνων σε συγκεκριμένες διασταυρώσεις (ανασκόπηση στο O'Neill 1997, Werren 1997, Bourtzis and O'Neill 1998, Bourtzis and Braig 1999, Stouthamer et al. 1999, Stevens et al. 2001, Bourtzis and Miller 2003). Η σχέση των βακτηρίων με το φαινόμενο, υπονοούνταν άλλοτε μικροσκοπικά και άλλοτε με αντιβιοτικά ή θερμική θεραπεία. Παρόλα αυτά, η φυλογενετική σχέση των βακτηρίων, τα οποία βρίσκονταν στους αναπαραγωγικούς ιστούς των διαφόρων εντόμων, παρέμενε άγνωστη μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990.

Σε παρόμοιες έρευνες βρέθηκαν αρκετοί μικροοργανισμοί, που κληρονομούνταν μητρικά και επηρέαζαν την αναλογία φύλου των ξενιστών τους, όπως για παράδειγμα, πρωτόζωα που σκότωναν μόνο τα αρσενικά στα κουνούπια ή μετέτρεπαν όλα τα άτομα σε θηλυκά σε κάποια αμφίποδα. Επίσης, σε άλλες περιπτώσεις διαπιστώθηκε επιλεκτική θανάτωση των αρσενικών ατόμων από οργανισμούς όπως τα σπироπλάσματα στις μύγες, κάποια εντεροβακτήρια στις σφήκες και ορισμένες ρικέτσιες στις πασχαλίτσες (ανασκόπηση στο Hurst 1993). Όμως, σχετικά με τη *Wolbachia*, δεν ήταν παρά μόνο δύο ευρήματα: πρώτος ο Legrand και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι κάποια κυτταροπλασματικά βακτήρια ήταν υπεύθυνα για την επαγωγή θηλυκοποίησης σε ισόποδα (ανασκόπηση στο Legrand et al. 1987) και δεύτερος ο Stouthamer έδειξε ότι η παρθενογένεση σε κάποια είδη *Trichogramma* μπορούσε να «θεραπευτεί» με αντιβιοτικά (Stouthamer 1990).

Τέλος, με τη χρήση μοριακών μεθόδων αναγνωρίστηκαν και επίσημα αυτοί οι μικροοργανισμοί. Κλωνοποιώντας γονίδια όπως το 16S rDNA, δείχθηκε ότι τα βακτήρια, τα οποία προκαλούσαν ΚΑ, θηλυκοποίηση, παρθενογένεση (Rousset et al. 1992, O'Neill et al. 1992, Breeuwer et al. 1992) και θανάτωση αρσενικών (Hurst et al. 2000), σχημάτιζαν μία μονοφυλετική ομάδα, τη *Wolbachia*.

Μορφολογική περιγραφή

Ο Hertig το 1936 (Hertig 1936) δίνει μία λεπτομερή περιγραφή των βακτηρίων *Wolbachia*. Έχουν τα γενικά χαρακτηριστικά των ρικετσιών. Είναι διμορφικά, με ραβδοειδή (0.5-1.3 μm σε μήκος) ή κοκκοειδή μορφή (0.25-1.5 μm σε διάμετρο). Μερικές φορές δημιουργούν σύμπλοκα των δύο ή και περισσότερων μαζί. Η *Wolbachia pipientis* βρίσκεται σε κενοτόπιο (vacuole) και περιβάλλεται από τρεις μεμβράνες, η εξωτερική των οποίων είναι δημιούργημα του ξενιστή (Louis and Nigro 1989). Συνήθως είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων των αναπαραγωγικών οργάνων, ωοθηκών και όρχεων (Εικ. 1). Επίσης έχουν παρατηρηθεί σε Μαλπιγγειανά σωληνάκια, μυϊκό και νευρικό ιστό, καθώς και αιμοκύτταρα (Dobson et al. 1999). Ο αριθμός των βακτηρίων ανά ξενιστή ποικίλει μεταξύ εκατοντάδων και εκατομμυρίων (Bourtzis et al. 1996).



Εικόνα 1. Το βακτήριο μέσα σε αυγό Δροσόφιλας (ανοσο-ιστοχημεία χρυσού με αντί-WSP αντίσωμα, φωτογραφία από Βασίλη Γαλανόπουλο).

Κατανομή και φυλογένεση

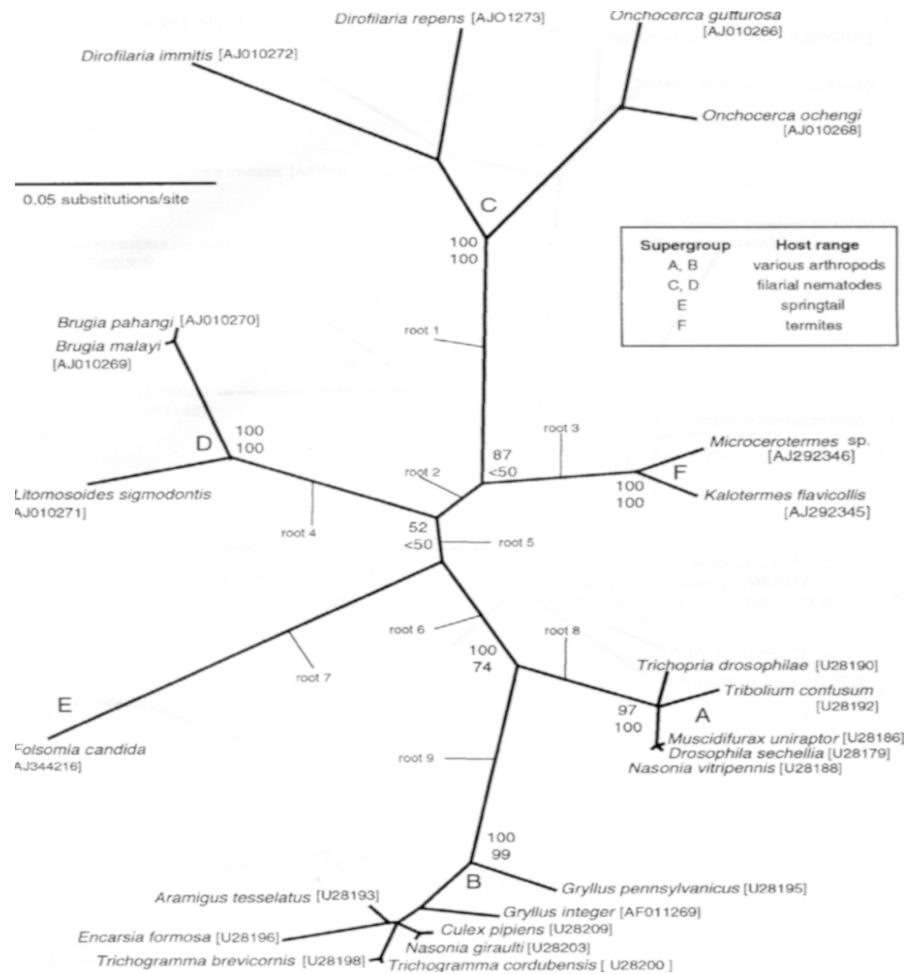
Ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rDNA γονιδίου, έδειξε ότι η *Wolbachia* ανήκει στην α-υποκατηγορία των πρωτεοβακτηρίων και είναι κοντινός συγγενής κάποιων παθογόνων των θηλαστικών που μεταδίδονται μέσω αρthropόδων, όπως είναι τα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Coxiella* και *Rickettsia* (O'Neill et al. 1992). Παρόλη τη συγγένεια της με παθογόνα των θηλαστικών, η *Wolbachia* έχει βρεθεί μέχρι στιγμής μόνο σε αρthropόδα και νηματώδεις. Μολαταύτα, αν κρίνει κανείς από το γεγονός ότι το βακτήριο αυτό μολύνει το 76% των 63 ειδών αρthropόδων, που εξετάστηκαν με την τεχνική της επιμηκυσμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (long PCR) (Jeyaprkash and Hoy 2000), η πιθανότητα της παρουσίας του σε άλλα ασπόνδυλα, σπονδυλωτά και ίσως και σε θηλαστικά, δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Ο κλάδος που περιέχει το βακτήριο *Wolbachia*, είχε χωριστεί αρχικά σε 4 επιμέρους ομάδες (A-D) (O'Neill et al. 1992, Rousset et al. 1992, Breeuwer et al. 1992, Werren et al. 1995, Bandi et al. 1998). Οι ομάδες A και B περιέχουν τα βακτήρια των αρthropόδων, ενώ οι C και D αυτές των νηματωδών. Υπολογίζεται ότι οι ομάδες A και B διαχωρίστηκαν πριν από 60 εκατομμύρια χρόνια, ενώ χώρισαν από τις ομάδες C και D πριν από περίπου 100 εκατομμύρια χρόνια. Λόγω του ότι τα αρthropόδα διαχωρίστηκαν από τους νηματώδεις πριν από 600 εκατομμύρια χρόνια, έχει προταθεί το εξής σενάριο: πριν από 100 εκατομμύρια χρόνια, συνέβη είτε ένα γεγονός οριζόντιας μετάδοσης του βακτηρίου μεταξύ αρthropόδων και νηματωδών, είτε τα φύλα αυτά κληρονόμησαν ανεξάρτητα το βακτήριο από κάποιο τρίτο οργανισμό. Θεωρείται απίθανο ότι η *Wolbachia* τα χρόνια αυτά ήταν αυτόνομο

βακτήριο, μια και η ομάδα των βακτηρίων στα οποία ανήκει, απέκτησε ενδοκυττάριο τρόπο ζωής παλαιότερα.

Τα γονίδια που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα για την εκτίμηση της φυλογένεσης του βακτηρίου είναι κυρίως το 16S rDNA, το *ftsZ* (γονίδιο για την κυτταρική διαίρεση) και το *wsp* (γονίδιο της εξωτερικής μεμβράνης) (van der Meer 1999, Schulenburg et al. 2000, Jeyaprakash and Hoy 2000, Casiraghi et al. 2001, Lo et al. 2002 και πληθώρα άλλων πρόσφατων μελετών). Η φυλογένεση του βακτηρίου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφενός, γιατί δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της φυλογένεσης των βακτηριακών στελεχών και των αρθροπόδων-ξενιστών και αφετέρου, γιατί συγγενικά στελέχη προκαλούν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ξενιστές τους. Συγκεκριμένα στα αρθρόποδα δεν υπάρχει συμφωνία της φυλογένεσης του βακτηρίου και των αναπαραγωγικών φαινοτύπων που αυτό προκαλεί (O'Neill et al. 1992, Rousset et al. 1992, Breeuwer et al. 1992, Werren et al. 1995, Van Meer et al. 1999), γεγονός που υποδηλώνει γεγονότα οριζόντιας μεταφοράς ή την εξέλιξη αυτών σχετικά εύκολα και κατ' επέκταση επαναλαμβανόμενα. Οριζόντια μεταφορά δείχθηκε να συμβαίνει συχνά στο εργαστήριο από μη μολυσμένες σε μολυσμένες προνύμφες σφηκών, οι οποίες μοιράζονταν τον ίδιο ξενιστή (Huijgens et al. 2000). Οριζόντια μεταφορά δείχθηκε να συμβαίνει επίσης με μεταφορά μολυσμένης αιμολέμφου στα ισόποδα (Rigaud et al. 1995, Bouchon et al. 1998). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ένα δεδομένο στέλεχος του βακτηρίου μπορεί να επάγει διαφορετικούς φαινοτύπους αν βρεθεί σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα, για παράδειγμα ένα στέλεχος που προκαλεί θηλυκοποίηση σε ένα είδος λεπιδόπτερου, προκαλεί θανάτωση αρσενικών αν μεταφερθεί σε ένα άλλο (Fujii et al. 2001), όπως και ένα άλλο που προκαλεί ασυμβατότητα στο φυσικό του ξενιστή (Sasaki et al. 2002). Από την άλλη πλευρά η αμοιβαία σχέση που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια αυτά με τους νηματώδεις ξενιστές τους, αντανάκλαται στη συμφωνία της φυλογένεσης τους (Bandi et al. 1998).

Πρόσφατη μελέτη (Lo et al. 2002) επιβεβαιώνει την ύπαρξη δύο καινούργιων ομάδων, της E στο κολέμβολο *Folsomia candida* (Vandekerckhove et al. 1999) και της F σε δύο είδη τερμιτών (Bandi et al. 1997) (Εικ. 2). Συζητά επίσης τα οφέλη που προκύπτουν από την γνώση της φυλογένεσης των βακτηριακών στελεχών για την κατανόηση της εξέλιξής του στον πλανήτη γη.



Εικόνα 2. Φυλογενετικό δέντρο των στελεχών της *Wolbachia*, που υπάρχουν στα αρθρόποδα και στους νηματώδεις (από Lo et al. 2002).

Wolbachia και παρθενογένεση

Η *Wolbachia* προκαλεί παρθενογένεση σε διάφορα είδη υμενοπτέρων (Stouthamer 1997), σε ένα γένος φυτοφάγων ακάρεων (Weeks and Breeuwer 2001) και σε ένα είδος θυσανόπτέρων (Arakaki et al. 2001). Τα είδη αυτά έχουν ένα ιδιαίτερο σύστημα φυλοκαθορισμού (αρρενοτοκία), κατά το οποίο τα αρσενικά προέρχονται από απλοειδή αυγά (μη γονιμοποιημένα), ενώ τα θηλυκά από διπλοειδή (γονιμοποιημένα). Το βακτήριο τροποποιεί την πρώτη μιτωτική διαίρεση στα μη γονιμοποιημένα αυγά, και συγκεκριμένα την ανάφαση (Stouthamer and Kazmer 1994), με αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλοειδούς πυρήνα και την περαιτέρω ανάπτυξη αυτών σε θηλυκά αντί αρσενικά άτομα. Είναι αυτονόητο ότι αυτή η τροποποίηση ευνοεί την κάθετη μετάδοση του βακτηρίου, μια και αυτό μεταδίδεται μόνο από τα θηλυκά, ενώ τα αρσενικά αποτελούν αδιέξοδο για αυτά.

Wolbachia και θηλυκοποίηση

Η *Wolbachia* προκαλεί θηλυκοποίηση σε διάφορα είδη χερσαίων ισοπόδων (καρκινοειδή) (Bouchon et al. 1998) και σε ένα είδος λεπιδοπτερου (Fujii et al. 2001). Τα ισόποδα αναπτύσσονται σε θηλυκά εκτός και αν ο ανδρογενετικός αδένας εκφράσει μία ορμόνη, η οποία επάγει αρσενική διαφοροποίηση. Τα βακτήρια στα είδη αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη του αδένα, με αποτέλεσμα άτομα γενετικά καθορισμένα ως αρσενικά να συμπεριφέρονται ως θηλυκά, ευνοώντας την μετάδοση των βακτηρίων, όπως και παραπάνω.

Wolbachia και θανάτωση αρσενικών

Η *Wolbachia* προκαλεί θανάτωση αρσενικών εμβρύων σε λεπιδόπτερα (Dyson et al. 2002), κολεόπτερα (Majerus et al. 2000) και σε ένα είδος Δροσόφιλας (Hurst et al. 2000). Το βακτήριο στα έντομα αυτά σκοτώνει τα αρσενικά έμβρυα, με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο.

Wolbachia και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα

Η *Wolbachia* προκαλεί σε μια πληθώρα εντόμων κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (KA) (ανασκόπηση στο Charlat et al. 2002, Bourtzis et al 2003), σε μερικά ισόποδα (Moret et al. 2001) και ακάρεα (van Orijnen and Breeuwer 1999). Περιληπτικά, η KA είναι μία μορφή εμβρυϊκής θνησιμότητας σε διασταυρώσεις μεταξύ μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά. Όσον αφορά στο μηχανισμό αυτής λίγα πράγματα είναι γνωστά μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με γενετικές και κυτταρολογικές μελέτες, το βακτήριο τροποποιεί το σπέρμα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και αυτή η τροποποίηση πρέπει να διασωθεί από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος στο αυγό για να συνεχιστεί κανονικά η ανάπτυξη του εμβρύου. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορεί να είναι μονόδρομη, όταν εμπλέκεται ένα βακτηριακό στέλεχος ή αμφίδρομη όταν εμπλέκονται παραπάνω από ένα στελέχη. Για την KA, η οποία αποτελεί και το αντικείμενο της διατριβής αυτής γίνεται εκτενέστερα λόγος παρακάτω.

Wolbachia στους νηματώδεις

Ένας από τους πιο ενδιαφέροντες τομείς έρευνας που σχετίζονται με τη *Wolbachia*, αφορά τη σχέση της με τους νηματώδεις που προκαλούν φιλαριάσεις. Συγκεκριμένα το βακτήριο έχει αναπτύξει αμοιβαία συμβιωτική σχέση με αυτούς, με αποτέλεσμα τη

διακοπή της κανονικής ανάπτυξης των νηματωδών μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών (Hoerauf et al. 1999). Ευρήματα όπως το ότι ασθένειες του ανθρώπου σαν την τύφλωση του ποταμού (river blindness) σχετίζονται με φλεγμονώδη απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού στα βακτήρια και όχι στους νηματώδεις που τα κουβαλούν (Saint Andre et al. 2002), ανοίγουν νέους δρόμους στη θεραπεία ασθενειών.

Wolbachia και ειδογένεση

Μελέτες στο παρελθόν έχουν προσφέρει ενδείξεις για την πιθανή συμβολή της Wolbachia στη δημιουργία νέων ειδών (Bordenstein and Werren 1998, Giordano et al. 1997, Shoemaker et al. 1999). Επιπρόσθετα, στην παρασιτική σφήκα *Nasonia* έχει δειχθεί ότι η αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σχετίζεται με τη δημιουργία νέων ειδών, μια και η χορήγηση αντιβιοτικών σε διαφορετικά είδη μολυσμένων εντόμων, οδηγεί στην παραγωγή βιώσιμων και γόνιμων υβριδίων (Bordenstein et al. 2001). Παρόλη την αυξανόμενη παραγωγή στοιχείων για την εμπλοκή του βακτηρίου σε φαινόμενα ειδογένεσης, η έκταση αυτής παραμένει αμφισβητήσιμη.

Wolbachia και εφαρμογές

Πριν ακόμα την ταυτοποίηση της Wolbachia ως αίτιου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, το βακτήριο είχε χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση κουνουπιών (Laven 1967). Η βασική ιδέα ήταν η απελευθέρωση μολυσμένων αρσενικών, μέθοδος ανάλογη της τεχνικής στείρων εντόμων (SIT: Sterile Insect Technique), που είχε ως αποτέλεσμα ασύμβατες διασταυρώσεις και μείωση των επιπέδων του πληθυσμού. Λόγω της ικανότητας του βακτηρίου να εξαπλώνεται γρήγορα (Turelli and Hoffmann 1991), θα μπορούσε στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί ως φορέας εξάπλωσης επιθυμητών χαρακτηριστικών σε πληθυσμούς εντόμων, σημαντικών στη γεωργία και στην υγεία, είτε έμμεσα (μετασηματισμένα μολυσμένα έντομα), είτε άμεσα (μετασηματισμένα βακτήρια) (Beard et al. 1992, Sinkins et al. 1997, Bourtzis and O'Neill 1998, Ashburner et al. 1998, Curtis and Sinkins 1998, Turelli and Hoffmann 1999, Bourtzis and Braig 1999, Sinkins and O'Neill 2001).

Το γονιδίωμα της Wolbachia

Μοριακές, βιοχημικές, γενετικές και κλασσικές μικροβιολογικές μελέτες είναι δύσκολες στην περίπτωση της Wolbachia λόγω της αδυναμίας της να καλλιεργηθεί

σε θεραπευτικά μέσα. Μολαταύτα, η ανάλυση των γονιδιωμάτων άλλων υποχρεωτικά ενδοκυττάρων βακτηρίων όπως η *Rickettsia* και η *Buchnera* (Andersson et al. 1998, Shigenobu et al. 2000) έχει βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση της βιολογίας των πιο κοντινών συγγενών των μιτοχονδρίων. Είναι αυτονόητο ότι η ανάλυση και σύγκριση διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* θα βοηθήσει σημαντικά όχι μόνο την εξιχνίαση των μηχανισμών των τόσο διαφορετικών φαινοτύπων που το βακτήριο αυτό προκαλεί στους ξενιστές του, αλλά και τη διαλεύκανση της βασικής βιολογίας του φυλοκαθορισμού, της αναπαραγωγικής απομόνωσης, της βακτηριακής παθογένειας και της αμοιβαίας συμβίωσης. Επιπρόσθετα, η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που χρησιμοποιεί το βακτήριο αυτό για να τροποποιεί τα αναπαραγωγικά συστήματα των ξενιστών του, θα μπορούσε να βοηθήσει στον έλεγχο βλαβερών εντόμων στη γεωργία και στην υγεία και τέλος στην καταπολέμηση ασθενειών όπως η φιλαρίαση.

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΗΤΑ

Περιγραφή

Η *Wolbachia* αναγνωρίστηκε ως η αιτία που προκαλούσε ΚΑ σε κουνούπια το 1971 από τους Yen και Barr (Yen and Barr 1971). Η ΚΑ περιγράφεται ως η εμβρυϊκή θνησιμότητα, που προκύπτει από τη διασταύρωση μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά (μονόδρομη) ή με θηλυκά μολυσμένα με διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος (αμφίδρομη) (Εικ. 3). Συνεπώς τα μολυσμένα θηλυκά έχουν επιλεκτικό πλεονέκτημα, μια και μπορούν να διασταυρώνονται με όλα τα αρσενικά του πληθυσμού (μη μολυσμένα και μολυσμένα) και κατ' επέκταση βοηθούν το βακτήριο να εξαπλώνεται. Η ΚΑ είναι ευρέως εξαπλωμένη στα αρθρόποδα και μέχρι στιγμής έχει παρατηρηθεί σε έντομα, ακάρεα και ισόποδα. Συγκεκριμένα στα έντομα εκτός από τα δίπτερα έχει περιγραφεί σε κολεόπτερα (Wade and Stevens 1985), υμενόπτερα (Reed and Werren 1995), ομόπτερα (Hoshizaki and Shimada 1995), ισόπτερα (Bandi et al. 1997), λεπιδόπτερα (Brower 1976), ορθόπτερα (Kamoda et al. 2000) και ίσως αποτελεί τον πιο κοινό φαινότυπο που επάγεται από τη *Wolbachia*. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα στελέχη της *Wolbachia* που επάγουν ΚΑ δεν αποτελούν μονοφυλετική ομάδα, σε σχέση με τα στελέχη που επάγουν διαφορετικούς

φαινοτύπους (Werren et al. 1995, Zhou et al. 1998), οπότε μπορεί η επαγωγή της να αποτελεί αρχέγονη ιδιότητα του βακτηρίου.

	W1 +	W2 +	⊗ +
W1 ↗	W1	+	+
W2 ↗	+	W2	+
⊗ ↗	W1	W2	⊗

Εικόνα 3. Μονόδρομη και αμφίδρομη ασυμβατότητα. Αρσενικά μολυσμένα με το στέλεχος W1 ή με το στέλεχος W2 δεν παράγουν απογόνους, εκτός εάν διασταυρώνονται με θηλυκά μολυσμένα με το ίδιο βακτηριακό στέλεχος (Από Charlat et al., 2002).

Μηχανισμοί

Το μοντέλο που παρέχει ένα γενικό πλαίσιο για τη διερεύνηση της ΚΑ είναι αυτό της τροποποίησης/διάσωσης (mod/resc: modification, rescue), το οποίο υποθέτει δύο βακτηριακές λειτουργίες: i) τη λειτουργία mod, το «δηλητήριο», το οποίο εκφράζεται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και ii) τη λειτουργία resc, το «αντίδοτο», το οποίο εκφράζεται στο αυγό. Δηλαδή αν το σπέρμα έχει επηρεαστεί από το «δηλητήριο» ενός βακτηριακού στελέχους, το αντίστοιχο βακτηριακό «αντίδοτο» πρέπει να εκφραστεί στο αυγό, για να προχωρήσει κανονικά η ανάπτυξη. Παρόλο, που ο μοριακός μηχανισμός παραμένει άγνωστος, οι λειτουργίες αυτές έχουν αρχίσει να χαρακτηρίζονται από διάφορες ιδιότητες (Werren et al. 1995).

Αναλυτικότερα, η ένταση της ΚΑ ποικίλει και πιο συγκεκριμένα το ποσοστό των αυγών που δεν εκκολάπτονται από μία ασύμβατη διασταύρωση κυμαίνεται από 0-100% (επίπεδα ΚΑ). Κατ' επέκταση το μόριο ή τα μόρια, που εμπλέκονται σε αυτή ποικίλουν είτε ποσοτικά είτε ποιοτικά. Σε μερικές περιπτώσεις οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται σε ιδιότητες του βακτηρίου (Giordano et al. 1995, Hoffmann et al. 1996). Από την άλλη πλευρά οι Boyle et al. (1993) και Poinsot et al. (1998) έδειξαν τη σημαντική συμβολή του ξενιστή στη ρύθμιση των επιπέδων, με πειράματα

διαμόλυνσης στελεχών *Wolbachia* από *D. simulans* (υψηλά επίπεδα) σε *D. melanogaster* (χαμηλά επίπεδα) και το αντίθετο.

Η τροποποίηση και η διάσωση αλληλεπιδρούν με ειδικό τρόπο, όπως φαίνεται από την ύπαρξη της αμφίδρομης ασυμβατότητας. Δηλαδή, κάθε στέλεχος *Wolbachia* είναι απολύτως συμβατό μόνο με τον εαυτό του. Αρσενικά μολυσμένα με δύο στελέχη είναι συμβατά μόνο με θηλυκά διπλά μολυσμένα με τα αντίστοιχα στελέχη (Perrot-Minnot et al. 1996, Rousset and Solignac 1995, Sinkins et al. 1995). Επίσης, η τροποποίηση και η διάσωση είναι πιθανώς διαφορετικές λειτουργίες. Θεωρητικά, τέσσερις διαφορετικοί τύποι *Wolbachia* μπορούν να υπάρχουν: $\text{mod}^+/\text{resc}^+$, $\text{mod}^-/\text{resc}^-$, $\text{mod}^+/\text{resc}^-$ και $\text{mod}^-/\text{resc}^+$. Τα περισσότερα στελέχη που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα ανήκουν στην πρώτη κατηγορία, μπορούν δηλαδή να τροποποιούν το σπέρμα και να διασώζουν την τροποποίηση. Ένα στέλεχος $\text{mod}^-/\text{resc}^-$ έχει περιγραφεί στη *Drosophila simulans* (Hoffmann et al. 1996) μέχρι σήμερα, καθώς και δύο στελέχη που δεν επάγουν ασυμβατότητα (mod^-), αλλά διασώζουν την ασυμβατότητα που επάγουν συγγενικά τους στελέχη (resc^+) (Bourtzis et al. 1998, Mercot and Poinsot 1998). Στελέχη τέλος που επάγουν, αλλά δεν διασώζουν ($\text{mod}^+/\text{resc}^-$), δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Θεωρητικά μοντέλα υποστηρίζουν πως τα στελέχη αυτά είναι δύσκολο να διατηρηθούν σε ένα πληθυσμό, μια και είναι «αυτοκτονικά», αν και κάποιες θεωρητικές μελέτες υποστηρίζουν την πιθανή ύπαρξη τους κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις (Charlat et al. 2001).

Πολλές μελέτες είχαν εστιαστεί στο παρελθόν στη συσχέτιση της βακτηριακής πυκνότητας και των επιπέδων ασυμβατότητας, με περίπλοκα αποτελέσματα. Σύμφωνα με το «μοντέλο δόσης» (dosage model) (Breeuwer and Weigen 1993), τα επίπεδα ασυμβατότητας είναι ανάλογα με τον αριθμό των βακτηρίων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών. Αναλυτικότερα στη συγκεκριμένη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι αρσενικά με υψηλούς αριθμούς βακτηρίων ήταν ασύμβατα με θηλυκά, μολυσμένα με λιγότερα βακτήρια. Στη *Drosophila simulans* έχει δειχθεί επίσης ότι ηλικιωμένα αρσενικά προκαλούν χαμηλότερη ΚΑ (Hoffmann et al. 1986) και έχουν λιγότερα βακτήρια στους όρχεις τους (Binnington and Hoffmann 1989). Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι τα ηλικιωμένα αρσενικά έχουν λιγότερες μολυσμένες σπερματοκύστες (Bressac and Rousset 1993) στους όρχεις τους. Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης στα πειράματα διαμόλυνσης (transinfection). Συγκεκριμένα, όταν το βακτηριακό στέλεχος της *D. melanogaster* μεταφέρθηκε στη *D. simulans*, τα επίπεδα ΚΑ αυξήθηκαν δραματικά, όπως και αριθμός των μολυσμένων

σπερματοκύστεων (Poinsot et al. 1998). Επίσης, όταν η *Wolbachia* μεταφέρθηκε από το φυσικό ξενιστή της *D. simulans* στη *D. melanogaster*, παρατηρήθηκε πτώση τόσο στα επίπεδα ΚΑ, όσο και στον αριθμό των βακτηρίων στα αυγά (Boyle et al. 1993). Εντούτοις, ασυμφωνία παρατηρήθηκε σε μερικές περιπτώσεις (Bourtzis et al. 1996, Bourtzis et al. 1998, Giordano et al. 1995), όπου δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ βακτηριακής πυκνότητας και ΚΑ.

Κυτταρολογικές μελέτες έδειξαν ότι η γονιμοποίηση λαμβάνει χώρα κανονικά στις ασύμβατες διασταυρώσεις (Kose and Karr 1995). Επιπρόσθετα, το ώριμο σπέρμα δε φέρει βακτήρια, μια και αυτά απομακρύνονται μαζί με άλλα κυτταροπλασματικά συστατικά, κατά το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσής του. Στη *Drosophila*, γίνεται σύντηξη των προπυρήνων, αλλά τα πατρικά χρωμοσώματα καθυστερούν να συμπυκνωθούν, ενώ τα μητρικά αρχίζουν τη μίτωση (Callaini et al. 1996, Callaini et al. 1997, Lassy and Karr 1996). Η ανάπτυξη σταματά στις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις και τα έμβρυα πεθαίνουν. Στη σφήκα *Nasonia* επίσης τα πατρικά χρωμοσώματα δεν συμπυκνώνονται σωστά και χάνονται (Reed and Werren 1995), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανευπλοειδών και απλοειδών ατόμων. Στα απλοδιπλειοδή είδη, όπως η *Nasonia*, τα απλοειδή αυγά αναπτύσσονται ως αρσενικά. Μολαταύτα, κάποια από τα απλοειδή αυγά πεθαίνουν, αν η απλοειδία δεν ολοκληρωθεί σωστά. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η ΚΑ κάποιες φορές στα απλοδιπλειοδή είδη μπορεί να οδηγήσει σε αναλογία φύλου στην F1 γενιά, υπέρ των αρσενικών (Breeuwer 1997, Vala et al. 2000, Vavre et al. 2000). Εξαιρετική πρόσφατη κυτταρολογική μελέτη στη συγκεκριμένη σφήκα, έδειξε ότι η ΚΑ είναι αποτέλεσμα της καθυστερημένης αποδιάταξης του πυρηνικού φακέλου του πατρικού προπυρήνα, υπονοώντας αλληλεπίδραση του βακτηρίου με πρωτεΐνες του ξενιστή που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (Tram and Sullivan 2002).

Κυτταρολογικές μελέτες στη *Drosophila* έδειξαν επίσης ότι η *Wolbachia* συγκεντρώνεται στους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος και συνεντοπίζεται με τους αστρικούς μικροσωληνίσκους (Callaini et al. 1994, Kose and Karr 1995, Lassy and Karr 1996, O'Neill and Karr 1990). Στη *Nasonia* τα βακτήρια συγκεντρώνονται στον οπίσθιο πόλο του αυγού (Breeuwer and Werren 1990). Η συγκέντρωση αυτή παρατηρείται επίσης στη *D. melanogaster* (Hadfield and Axton 1999), στο *Trichogramma* (Stouthamer et al. 1993) και στην *Aphytis* (Zchori-Fein et al. 1998), ενώ στη *Drosophila simulans* παρατηρήθηκε ομοιόμορφη κατανομή γύρω από το φλοιό του αυγού (Boyle et al. 1993, Callaini et

al. 1994, Kose and Karr 1995, O'Neill and Karr 1990). Λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της διαίρεσης των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ξενιστών της. Όσον αφορά στην εμβρυογένεση της *Drosophila* τα βακτήρια δε φαίνεται να πολλαπλασιάζονται στα πρώιμα στάδια αυτής (Lassy and Karr 1996). Επιπρόσθετα, η βακτηριακή κατανομή σε ιστούς πέρα από τους γενετικούς δεν έχει εξεταστεί με λεπτομέρεια. Εξαιρεση αποτελεί το λεγόμενο *porcorn* στέλεχος το οποίο πολλαπλασιάζεται στον εγκέφαλο της μύγας ανεξέλεγκτα και τη σκοτώνει στη μέση ηλικία περίπου της ζωής της (Min and Benzer 1997).

Τέλος, διάφοροι άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τα επίπεδα της ΚΑ, όπως το θερμικό σοκ (heat shock) (Clancy and Hoffmann 1998, Snook et al. 2000), το περιβάλλον που μεγαλώνουν οι προνύμφες (Clancy and Hoffmann 1998), καθώς και η συζευκτική προϋστορία του αρσενικού (Karr et al. 1998).

Εξελικτική δυναμική

Γιατί η *Wolbachia* έχει επιλεγεί εξελικτικά να προκαλεί ΚΑ; Θεωρητικά (Caspari and Watson 1959, Turelli 1994) και εμπειρικά (Turelli and Hoffmann 1991) δεδομένα έχουν δείξει ότι λόγω της δράσης της ΚΑ το βακτήριο μπορεί να εξαπλωθεί ραγδαία σε ένα πληθυσμό. Ο βασικός λόγος είναι ότι τα μολυσμένα αυγά είναι συμβατά με σπέρμα που προέρχεται από όλα τα αρσενικά του πληθυσμού (μολυσμένα και μη μολυσμένα), αλλά τα μη μολυσμένα είναι ασύμβατα με το σπέρμα των μολυσμένων αρσενικών. Ως αποτέλεσμα, η παρουσία του μη μολυσμένου κυτταρότυπου μειώνεται μέσα στον πληθυσμό, όσο αυξάνεται η συχνότητα γονιμοποίησης μη μολυσμένων αυγών από σπέρμα που προέρχεται από μολυσμένα αρσενικά.

Η δυναμική του φαινομένου είναι ενδιαφέρουσα και εξαιρετικά πολύπλοκη λόγω της αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων. Τρεις από αυτούς φαίνεται να είναι οι πιο σημαντικοί: α) η επιβίωση και η γονιμότητα των μολυσμένων θηλυκών σε σχέση με τα μη μολυσμένα (fitness cost) β) το ποσοστό των μολυσμένων αυγών που παράγουν τα μολυσμένα θηλυκά (transmission efficiency) και γ) το επίπεδο της ΚΑ στις ασύμβατες διασταυρώσεις (level of CI). Πιο συγκεκριμένα αν αυτοί οι παράγοντες δεν επηρεάζουν ο ένας τον άλλο, η συνεξέλιξη παρασίτου-ξενιστή αναμένεται να οδηγήσει σε χαμηλά επίπεδα ΚΑ, χαμηλό κόστος αρμοστικότητας και υψηλή μητρική μετάδοση (Turelli 1994). Η ίδια μελέτη πρότεινε ότι πιθανά οι παράγοντες αυτοί να συνδέονται με τη βακτηριακή πυκνότητα. Θεωρητικά τα επίπεδα ΚΑ και η μητρική μετάδοση ευνοούν αύξηση του αριθμού των βακτηρίων,

ενώ το κόστος αρμοστικότητας μάλλον ευνοεί χαμηλότερους αριθμούς. Η ΚΑ φαίνεται να είναι συνδεδεμένη με το βακτηριακό φορτίο στην αρσενική γαμετική σειρά, η μετάδοση με τη θηλυκή, ενώ το κόστος πιθανώς επηρεάζεται από το συνολικό αριθμό βακτηρίων ανεξάρτητα από την κατανομή αυτών σε συγκεκριμένους ιστούς.

Ονοματολογία στελεχών

Ο Zhou et al. (1998) πρότεινε ότι σε ένα καινούργιο στέλεχος *Wolbachia* θα πρέπει να δίνεται ένα μοναδικό όνομα εάν έχει αναλυθεί η αλληλουχία του *wsp* γονιδίου του και αυτή διαφέρει από τις ήδη υπάρχουσες στις βάσεις δεδομένων. Τα ονόματα αυτά τότε θα πρέπει να ακολουθούν την σύντηξη που προτάθηκε από τους (Rousset and de Stordeur 1994), σύμφωνα με την οποία κάθε στέλεχος ονομάζεται *wHost*. Εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα αποτελούν στελέχη, που ενώ έχουν την ίδια αλληλουχία *wsp* ονομάζονται διαφορετικά, γιατί προκαλούν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ξενιστές τους. Για παράδειγμα τα στελέχη *wNo* και *wMa* τα οποία μολύνουν φυσικούς πληθυσμούς *Drosophila simulans*, οι οποίοι συνελήφθησαν στην πρωτεύουσα της Νέας Καληδονίας Noumea και στη Μαδαγασκάρη αντίστοιχα (Mercot et al. 1995, Rousset and Solignac 1995), ονομάζονται διαφορετικά παρόλο που έχουν την ίδια αλληλουχία *wsp*, γιατί προκαλούν διαφορετικά επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας στον ξενιστή τους.

Η ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΑΥΤΗ

Η διατριβή αυτή είχε ως στόχο τη διερεύνηση του φαινομένου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μέσω της συγκριτικής μελέτης στελεχών *Wolbachia* σε πληθυσμούς *Drosophila*. Μια και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κλασσικές μικροβιολογικές μελέτες ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθούν λόγω της αδυναμίας της *Wolbachia* να καλλιεργηθεί σε θρεπτικά μέσα, η προσέγγιση ήταν έμμεση. Αναλυτικότερα, ιδιαίτερη προσπάθεια καταβλήθηκε στην ανάπτυξη μεθόδων για τον ευκολότερο χειρισμό του βακτηρίου, όπως αυτές για την απομόνωση βακτηριακού DNA και την επιμόλυνση κυτταρικών σειρών. Τέλος, η συγκριτική κυτταρολογική μελέτη πολυμορφικών βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα επέτρεψε την ανίχνευση και μελέτη της συμπεριφοράς του

βακτηρίου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της γαμετικής σειράς της μύγας, προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες για τη δράση του βακτηρίου και τη φύση των παραγόντων που καθορίζουν τα επίπεδα της ΚΑ.

Στο δεύτερο κεφάλαιο της διατριβής, γίνεται λόγος για την εργασία προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδιώματος της *Wolbachia*, η οποία έχει ως στόχο την κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό των γονιδίων, που εμπλέκονται στις αναπαραγωγικές ανωμαλίες που προκαλεί το βακτήριο στους ξενιστές του. Οι πληροφορίες που θα συλλεχθούν μετά την ολοκλήρωση της εργασίας θα χρησιμοποιηθούν για εφαρμοσμένους σκοπούς και θα διαλευκάνουν τις αλληλεπιδράσεις παρασίτων-ξενιστών, καθώς και την εξέλιξη της ενδοκυττάριας συμβίωσης (Bandi et al. 1999b, Oehler and Bourtzis 2002). Η παρούσα διατριβή συνέβαλε στο έργο αυτό, αναπτύσσοντας μία μέθοδο απομόνωσης γενωμικού DNA από *Wolbachia*, απαλλαγμένου, σε ικανοποιητικό ποσοστό, από μιτοχονδριακό και χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή. Στα πιλοτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πρώιμα έμβρυα *Drosophila simulans* Riverside μολυσμένα με το στέλεχος *Wolbachia* wRi και *D. melanogaster* yw^{67C23} μολυσμένα με το βακτηριακό στέλεχος wMel. Έλαβε χώρα μία πρώτη εκτίμηση του μεγέθους του γονιδιώματος των στελεχών αυτών στις 1.5 και 1.3 Μεγαβάσεις αντίστοιχα, με τη χρήση ηλεκτροφόρησης παλμικού πεδίου (Pulse Field Gel Electrophoresis). Διαπιστώθηκε επίσης, η απουσία εξωχρωμοσωμικών παραγόντων π.χ. πλασμιδίων και η κυκλική φύση του χρωμοσώματος.

Στο τρίτο κεφάλαιο, περιγράφεται η ανάπτυξη μίας μεθόδου επιμόλυνσης κυτταρικών σειρών με *Wolbachia*, η οποία επιτρέπει την *in vitro* καλλιέργεια του βακτηρίου χρησιμοποιώντας κλασσικές τεχνικές. Μελέτη στο παρελθόν είχε δείξει ότι η *Wolbachia* μπορεί να διατηρηθεί σε *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων από το κουνούπι *Aedes albopictus* (O'Neill et al. 1997). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε εξ' αρχής από μολυσμένα εμβρυϊκά κύτταρα, ενώ η παρούσα μελέτη επιμολύνει ήδη υπάρχουσες κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα μολύνθηκαν επιτυχώς οι κυτταρικές σειρές S2 και SF9, που προέρχονται από *Drosophila melanogaster* και ένα είδος λεπιδοπτερόν (*Spodoptera frugiperda*) αντίστοιχα, με το στέλεχος *Wolbachia* wRi. Η μελέτη των επιπέδων μόλυνσης έγινε χρησιμοποιώντας την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερισμού, την κατά Southern υβριδοποίηση και μικροσκοπία φθορισμού. Από τις παραπάνω τεχνικές διαπιστώθηκε ποικιλομορφία στα επίπεδα μόλυνσης των κυττάρων. Οι επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές

διατηρήθηκαν στο εργαστήριο για αρκετές γενιές και καταψύχθηκαν για περαιτέρω χρήση. Οι σειρές αυτές θα μπορούσαν να απλοποιήσουν την ανάλυση έκφρασης γονιδίων και βιοχημικών μονοπατιών της *Wolbachia*. Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην μελλοντική ανάπτυξη ενός συστήματος μετασχηματισμού του βακτηρίου.

Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφεται η συμπεριφορά του βακτηρίου κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης της μύγας, λόγω της στενής σχέσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας με τα μολυσμένα αρσενικά. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συσχέτιση της βακτηριακής κατανομής και πυκνότητας στους όρχεις διαφόρων ειδών *Drosophila* με τα διαφορετικά επίπεδα ασυμβατότητας που αυτά εκφράζουν. Παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλομορφία, ποσοτική και ποιοτική, τόσο στους όρχεις ενός στελέχους, όσο και στους όρχεις διαφορετικών στελεχών. Υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων της ασυμβατότητας και του αριθμού των μολυσμένων σπερματοκυττάρων, μόνο όταν η μόλυνση προέρχεται από στέλεχος που έχει την ικανότητα να την επάγει. Από τη σύγκριση φυσικά μολυσμένων και διαμολυσμένων στο εργαστήριο στελεχών βγαίνει το συμπέρασμα ότι η ικανότητα πρόκλησης ασυμβατότητας είναι ιδιότητα του βακτηρίου, ενώ ο ξενιστής παίζει ρόλο στη ρύθμιση του βακτηριακού φορτίου των όρχεων. Τέλος, τα αποτελέσματα αυτά συζητούνται κάτω από το πρίσμα των μοντέλων τροποποίησης-διάσωσης και βακτηριακής δόσης.

Η μελέτη συνεχίστηκε με την παρακολούθηση της *Wolbachia* σε πρώιμα έμβρυα, στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος, όπου σχηματίζονται τα πολικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν τους προγόνους της γαμετικής σειράς της μύγας. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής περιγράφονται στο κεφάλαιο 5 και συνοψίζονται στα εξής: τα βακτήρια, είτε κατανέμονται ομοιόμορφα στο φλοιό, είτε εντοπίζονται στον έναν από τους δύο πόλους του αυγού. Ο εντοπισμός αυτός καθορίζεται κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, όταν αρχίζει να σχηματίζεται το ωοκύτταρο και παραμένει ο ίδιος μέχρι τα όψιμα στάδια της εμβρυογένεσης, μετά τη γαστριδίωση. Εντύπωση προκαλεί η ομοιότητα της κατανομής των βακτηρίων με την κατανομή των μητρικών mRNAs, που καθορίζουν τον προσθιοπίσθιο άξονα του αυγού στη μύγα. Από τη σύγκριση τέλος της κατανομής των φυσικά μολυσμένων με τα διαμολυσμένα στο εργαστήριο έντομα, βγαίνει το συμπέρασμα ότι βακτηριακοί παράγοντες καθορίζουν τον εντοπισμό, ενώ ο ξενιστής παίζει ρόλο στη ρύθμιση των τελικών αριθμών του βακτηρίου στο αυγό. Υπάρχει σημαντική θετική συσχέτιση του

βακτηριακού φορτίου στον οπίσθιο πόλο του αυγού και στους όρχεις, παρόλο που ορισμένοι ξενιστές φαίνεται να έχουν αναπτύξει ένα είδος καταστολής.

Στο κεφάλαιο 6, τα δεδομένα της διατριβής αυτής συζητούνται κάτω από το πρίσμα των θεωρητικών μοντέλων που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα για το μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας και για την συν-εξέλιξη των διαφόρων τύπων *Wolbachia* και των ξενιστών τους. Τέλος, γίνεται μία ανακεφαλαίωση των σημαντικότερων ευρημάτων της διατριβής και των νέων δρόμων που ανοίγονται στη μελέτη των μηχανισμών που η *Wolbachia* έχει εφεύρει για να εξασφαλίζει την μετάδοσή της στην επόμενη γενιά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-40.
- Ashburner, M., M.A. Hoy and J.J. Peloquin. 1998. Prospects for the genetic transformation of arthropods. *Insect Molecular Biology* 7: 201-213.
- Arakaki, N., T. Miyoshi, and H. Noda. 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Frankliniopsis vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 1011-6.
- Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 2407-13.
- Bandi, C., M. Sironi, C.A. Nalepa, S. Corona and L. Sacchi. 1997. Phylogenetically distant intracellular symbionts in termites. *Parassitologia* 39: 71-75.
- Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco, and L. Sacchi. 1999a. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int J Parasitol* 29: 357-64.
- Bandi, C., B. Slatko, and S. L. O'Neill. 1999b. *Wolbachia* genomes and the many faces of symbiosis. *Parasitol Today* 15: 428-9.

- Beard, C. B., S.L. O'Neill, R.B. Tesh, F.F. Richards and S. Aksoy. 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today* 9: 179-183.
- Binnington, K. C. and A. A. Hoffmann. 1989. Wolbachia-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 344-352.
- Bordenstein, S. R., F. P. O'Hara, and J. H. Werren. 2001. Wolbachia-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409: 707-10.
- Bordenstein, S. R. and J. H. Werren. 1998. Effects of A and B Wolbachia and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in *Nasonia*. *Genetics* 148: 1833-1844.
- Bouchon, D., T. Rigaud, and P. Juchault. 1998. Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc R Soc Lond B 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: 852-853.
- K. Bourtzis and S.L. O'Neill (1998). Wolbachia infections and their influence on arthropod reproduction. *Bioscience* 48: 287-293.
- K. Bourtzis and H.R. Braig (1999). The many faces of *Wolbachia*. In: D. Raoult, P. Brouqui, eds. *Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 199-219.
- K. Bourtzis and T. Miller eds. (2003). *Insect Symbiosis*. CRC Press, Florida, USA, pp. 347 .
- Boyle, L., S. L. O'Neill, H. M. Robertson, and T. L. Karr. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of Wolbachia in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Breeuwer, J. A. J., and J.H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346: 558-560.
- Breeuwer, J. A. J., R. Stouthamer, S.M. Barns, D.A. Pelletier, W.G. Weisburg and J.H. Werren. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms

- in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 1: 25-36.
- Breeuwer, J. A. J., and J.H. Werren. 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 135: 565-574.
- Breeuwer, J. A. J. 1997. Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity* 78: 41-47.
- Bressac, C. and F. Rousset. 1993. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: Dapi-staining analysis of the Wolbachia symbionts in sperm cysts. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 226-230.
- Brower, J. H. 1976. Cytoplasmic incompatibility: Occurrence in a stored-product pest *Ephestia cautella*. *Annals of the Entomological Society of America* 69: 1011-1015.
- Callaini, G., R. Dallai and M.G. Riparbelli. 1994. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *Journal of Cell Science* 107: 673-682.
- Callaini, G., M.G. Riparbelli, R. Giordano and R. Dallai. 1996. Mitotic defects associated with cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 55-64.
- Callaini, G., R. Dallai and M.G. Riparbelli. 1997. Wolbachia-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of Cell Science* 110: 271-280.
- Casiraghi, M., T. J. Anderson, C. Bandi, C. Bazzocchi, and C. Genchi. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology* 122 Pt 1: 93-103.
- Caspari, E. and G. S. Watson. 1959. On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. *Evolution* 13: 568-570.
- Charlat, S., C. Calmet, and H. Mercot. 2001. On the mod resc model and the evolution of Wolbachia compatibility types. *Genetics* 159: 1415-22.
- Charlat, S., K. Bourtzis, and H. Mercot. 2002. Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. In *Symbiosis: mechanisms and model systems* (Seckbach, J. ed). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp621-644.

- Clancy, D. J., and A.A. Hoffmann. 1998. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in Wolbachia-infected *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 13-24.
- Curtis, C. F., and S.P. Sinkins. 1998. Wolbachia as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology* 116: S111-S115.
- Dedeine, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M. E. Hochberg, and M. Bouletreau. 2001. Removing symbiotic Wolbachia bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6247-52.
- Dobson, S., 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 Biochemistry Molecular Biology* 29: 153-160.
- Dobson, S. L., E. J. Marsland, and W. Rattanadechakul. 2002. Mutualistic Wolbachia Infection in *Aedes albopictus*. Accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160: 1087-94.
- Dyson, E. A., M. K. Kamath, and G. 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.
- Fujii, Y., D. Kageyama, S. Hoshizaki, H. Ishikawa, and T. Sasaki. 2001. Transfection of Wolbachia in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 855-9.
- Ghelelovitch, S. 1952. Sur la determinisme genetique de la sterilité dans le croisement entre differentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C. R. Acad. Sci. Paris* 24: 2386-88.
- Giordano, R., J.J. Jackson and H.M. Robertson. 1997. The role of Wolbachia bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 11439-11444.
- Giordano, R., S.L. O'Neill and H.M. Robertson. 1995. Wolbachia infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140: 1307-1317.
- Hadfield, S. J. a. J. M. Axton. 1999. Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria. *Nature* 402: 482.

- Hertig, M. 1936. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis*(Gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486.
- Hertig, M., and S. B. Wolbach. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* 44.
- Hoerauf, A., K. Nissen-Pahle, C. Schmetz, K. Henkle-Duhrsen, M. L. Blaxter, D. W. Buttner, M. Y. Gallin, K. M. Al-Qaoud, R. Lucius, and B. Fleischer. 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., D. Clancy and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring Wolbachia infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76: 1-8.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons. 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* 40: 692-701.
- Hoshizaki, S., and T. Shimada. 1995. PCR-based detection of Wolbachia, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of Wolbachia spread recently? *Insect Molecular Biology* 4: 237-243.
- Huigens, M. E., R. F. Luck, R. H. Klaassen, M. F. Maas, M. J. Timmermans, and R. Stouthamer. 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* 405: 178-9.
- Hurst, G. D., A. P. Johnson, J. H. Schulenburg, and Y. Fuyama. 2000. Male-killing Wolbachia in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* 156: 699-709.
- Hurst, L. D. 1993. The incidences, mechanisms and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.* 68: 121-98.
- Jeyaprakash, 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.
- Kamoda, S., S. Masui, H. Ishikawa and T. Sasaki. 2000. Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility in the cricket *Teleogryllus taiwanemma*. *The Journal of Experimental Biology* 203: 2503-2509.

- Karr, T. L., W. Yang and M.E. Feder. 1998. Overcoming cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 265: 391-395.
- Knight, J. 2001. Meet the Herod bug. *Nature* 412: 12-4.
- Lassy, C. W. and T. L. Karr. 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development* 57: 47-58.
- Laven, H. 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5.
- Laven, H. 1959. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 24.
- Laven, H. 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* 216: 383-384.
- Legrand, J. J., E. Legrand-Hamelin, and P. Juchault. 1987. Sex determination in Crustacea. *Biol. Rev.* 62: 439-70.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 39-44.
- Majerus, M. E. N., J.H. Graf von der Schulenburg and I.A. Zakharov. 2000. Multiple causes of male-killing in a single sample of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) from Moscow. *Heredity* 84: 605-609.
- Mercot, H., and D. Poinot. 1998. ... and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* 391: 853.
- Mercot, 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 U S A* 94: 10792-6.
- Moret, Y., P. Juchault, and T. Rigaud. 2001. Wolbachia endosymbiont responsible for cytoplasmic incompatibility in a terrestrial crustacean: effects in natural and foreign hosts. *Heredity* 86: 325-32.

- Oh, H. W., M. G. Kim, S. W. Shin, K. S. Bae, Y. J. Ahn, and H. Y. Park. 2000. Ultrastructural and molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a spider, *Nephila clavata*. *Insect Mol Biol* 9: 539-43.
- 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 U S A* 89: 2699-702.
- O'Neill, S. L., M. M. Pettigrew, S. P. Sinkins, H. R. Braig, T. G. Andreadis, and R. B. Tesh. 1997. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol* 6: 33-9.
- O'Neill, S. L. and T. L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- 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: 961-972.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-37.
- Poinsot, D. and H. Mercot. 1999. *Wolbachia* can rescue from cytoplasmic incompatibility while being unable to induce it. In: E. Wagner et al., ed. *From Symbiosis to Eukaryotism - Endocytobiology VII*. Universities of Geneva and Freiburg im Breisgau.
- Reed, K. M. a. J. H. Werren. 1995. Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): A comparative study of early embryonic events. *Molecular Reproduction and Development* 40: 408-418.
- Rigaud, T. and P. Juchault. 1995. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *Journal of Evolutionary Biology* 8: 249-255.
- Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault and M. Solignac. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 250: 91-98.

- Rousset, F., and E. de Stordeur. 1994. Properties of *Drosophila simulans* strains experimentally infected by different clones of the bacterium Wolbachia. *Heredity* 72: 325-31.
- Rousset, F., and M. Solignac. 1995. Evolution of single and double Wolbachia symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6389-93.
- Sasaki, T. and H. Ishikawa. 2000. Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Heredity* 85: 130-135.
- Saint Andre, A., N. M. Blackwell, L. R. Hall, A. Hoerauf, N. W. Brattig, L. Volkmann, M. J. Taylor, L. Ford, A. G. Hise, J. H. Lass, E. Diaconu, and E. Pearlman. 2002. The role of endosymbiotic Wolbachia bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science* 295: 1892-5.
- Schulenburg, J. H., G. D. Hurst, T. M. Huigens, M. M. van Meer, F. M. Jiggins, and M. E. Majerus. 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of Wolbachia *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Mol Biol Evol* 17: 584-600.
- 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: 81-6.
- Shoemaker, D. D., V. Katju and J. Jaenike. 1999. Wolbachia and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution* 53: 1157-1164.
- Sinkins, S. P., H.R. Braig and S.L. O'Neill. 1995. Wolbachia superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 261: 325-330.
- Sinkins, S. P., C.F. Curtis and S.L. O'Neill. 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. Pages 155-175 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford.
- Snook, R. R., S. Y. Cleland, M. F. Wolfner, and T. L. Karr. 2000. Offsetting effects of Wolbachia infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. *Genetics* 155: 167-78.

- Stevens, L., L. Giordano, and R. Fialho. 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32: 519-545.
- Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. Pages 102-124 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influential passengers*. 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.
- Stouthamer, R., J.A.J. Breeuwer, R.F. Luck and J.H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361: 66-68.
- Stouthamer, R., R.F. Luck and W.D. Hamilton. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 2424-2427.
- Stouthamer, R. and D. J. Kazmer. 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73: 317-327.
- Taylor, M. J., and A. Hoerauf. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today* 15: 437-42.
- Tram, U., and W. Sullivan. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*- induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124-6.
- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* 48: 1500-1513.
- Turelli, M., and A.A. Hoffmann. 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353: 440-442.
- Turelli, M., and A.A. Hoffmann. 1999. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Molecular Biology* 8: 243-255.
- Vala, F., J.A.J. Breeuwer and M.W. Sabelis. 2000. *Wolbachia*-induced 'hybrid breakdown' in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Proceedings of Royal Society of London Biological Series* 267: 1931-1937.

- Van Meer, M. M., J. Witteveldt, and R. Stouthamer. 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol* 8: 399-408.
- van Opijnen, T., and J. A. Breeuwer. 1999. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two-spotted spider mite. *Exp Appl Acarol* 23: 871-81.
- 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, J. Varaldi, P. Fouillet and M. Bouletreau. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* 54: 191-200.
- Wade, M. J., and L. Stevens. 1985. Microorganism mediated reproductive isolation in flour beetles (Genus *Tribolium*). *Science* 277: 527-528.
- Weeks, A. R., and J. A. Breeuwer. 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 2245-51.
- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42: 587-609.
- Werren, J. H., W. Zhang, and L. R. Guo. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 261: 55-63.
- Yen, J. H., and A. R. Barr. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pippins*. *Nature* 232: 657-658.
- Zchori-Fein, E., R.T. Roush and D. Rosen. 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Current Microbiology* 36: 1-8.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-15.
- Zimmer, C. 2001. *Wolbachia*. A tale of sex and survival. *Science* 292: 1093-5.

2 Εκτίμηση του μεγέθους του γονιδιώματος της *Wolbachia* με τη χρήση Pulse-Field Gel Electrophoresis

Η *Wolbachia* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παράσιτο, το οποίο δεν μπορεί να καλλιεργηθεί έξω από τον ξενιστή της. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την απομόνωση καθαρών βακτηρίων σε επαρκή ποσότητα για βιοχημικά πειράματα. Στη συγκεκριμένη εργασία απομονώθηκε γενωμικό DNA από *Wolbachia*, απαλλαγμένο σε ικανοποιητικό βαθμό, από μιτοχονδριακό και χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή. Στα πιλοτικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πρώιμα έμβρυα *Drosophila simulans* Riverside μολυσμένα με το στέλεχος *Wolbachia* wRi και *D. melanogaster* yw^{67C23} μολυσμένα με το βακτηριακό στέλεχος wMel. Έλαβε χώρα μία πρώτη εκτίμηση του μεγέθους του γονιδιώματος των συγκεκριμένων στελεχών στις 1.6 και 1.3 Mb αντίστοιχα, με τη χρήση ηλεκτροφόρησης παλμικού πεδίου (Pulse Field Gel Electrophoresis). Διαπιστώθηκε επίσης, η απουσία εξωχρωμοσωμικών παραγόντων π.χ. πλασμιδίων και η κυκλική φύση του χρωμοσώματος των βακτηρίων αυτών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Wolbachia* είναι μία ομάδα βακτηρίων, τα οποία επάγουν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ασπόνδυλους ξενιστές τους: από το φαινότυπο porceorn που σκοτώνει τις μύγες (Min and Benzer 1997), μέχρι την ευεργετική επίδραση στους νηματώδεις, που προκαλούν φιλαριάσεις (Bandi et al. 1999a) και από την παρθενογένεση στις σφήκες, μέχρι τη θηλυκοποίηση των αρσενικών στα καρκινοειδή (Stouthamer et al. 1999). Μελετώντας και συγκρίνοντας τα γονιδιώματα αυτών των βακτηρίων, καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων και των ξενιστών τους, θα μπορούσε κανείς να διαλευκάνει όχι μόνο το πώς η *Wolbachia* επάγει αυτούς τους τόσο διαφορετικούς φαινοτύπους, αλλά και τη βασική βιολογία των συστημάτων φυλοκαθορισμού, της αναπαραγωγικής απομόνωσης, της παθογένειας των βακτηρίων και της συμβίωσης γενικότερα. Επίσης η ανάλυση των γονιδιωμάτων θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον έλεγχο βλαβερών εντόμων και φορέων ασθενειών (Bandi et al. 1999b).

Το έτος 1999, άρχισαν να γίνονται οι πρώτες δημόσιες συζητήσεις για την αλληλούχιση του γονιδιώματος της *Wolbachia*, οι οποίες τελικά σχηματοποιήθηκαν και παρουσιάστηκαν το καλοκαίρι του 2000 στην Κρήτη, στο πρώτο διεθνές

συνέδριο για αυτά τα βακτήρια, ως δύο εργασίες: η πρώτη είχε ως στόχο την αλληλούχιση δύο στελεχών του βακτηρίου με ξενιστές τη *D. melanogaster* και το νηματώδη *Brugia malayi* αντίστοιχα, ενώ η δεύτερη την αλληλούχιση τριών στελεχών που ευθύνονται για την επαγωγή κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας στη *D. simulans*, παρθενογένεσης στο υμενόπτερο *Muscidifurax uniraptor* και θηλυκοποίησης στο ισόποδο *Armadillidium vulgare*, αντίστοιχα (Oehler and Bourtzis 2000).

Το εργαστήριο στο οποίο εκπονήθηκε η συγκεκριμένη διατριβή εργάζονταν προς αυτήν την κατεύθυνση από το 1998, προσπαθώντας να αναπτύξει μία μέθοδο απομόνωσης καθαρού DNA από *Wolbachia*, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή βιβλιοθηκών για τη δεύτερη (ευρωπαϊκή) εργασία αλληλούχισης του γονιδιώματος του βακτηρίου. Η αδυναμία του βακτηρίου να καλλιεργηθεί σε θρεπτικά μέσα δυσκόλεψε αισθητά τη συγκεκριμένη προσπάθεια, η οποία κατέληξε στην ανάπτυξη μίας μεθόδου καθαρισμού χρωμοσωμικού DNA από *Wolbachia* σε ικανοποιητική ποσότητα ώστε να κατασκευαστεί μία πιλοτική βιβλιοθήκη και στον καθορισμό του μεγέθους του γονιδιώματος δύο βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιώντας Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στελέχη *Wolbachia*. Στην προσπάθεια καθαρισμού χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Wolbachia wRi* της *Drosophila simulans* Riverside (DSR) και *wMel* της *Drosophila melanogaster* yw^{67C23}. Στελέχη *Drosophila simulans* Riverside, στα οποία εφαρμόστηκε αγωγή με τετρακυκλίνη (DSRT) για την απομάκρυνση της βακτηριακής μόλυνσης, χρησιμοποιήθηκαν για αρνητικό έλεγχο.

Καθαρισμός *Wolbachia* από *Drosophila*. Μύγες σε μεγάλα κλουβιά (0.5X0.5 m) αφήνονταν να γεννήσουν τα αυγά τους σε τρυβλία petri, τα οποία περιείχαν χυμό μήλου, άγαρ, αντιμυκητιακό Nipogen και μαγιά. Ακολουθούσαν συλλογές 2 ωρών και τα αυγά τοποθετούνταν σε επωαστήρα 12⁰C για να σταματήσει η ανάπτυξή τους, πριν την κυτταροποίηση. Τυπικά 1-2 ml εμβρύων συλλέγονταν τη φορά, αποχοριοποιούνταν με διάλυμα 50% χλωρίνης και ομογενοποιούνταν με γυάλινο ομογενοποιητή σε ισοτονικό διάλυμα PBS. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρούνταν 2 φορές στις 1200 rpm για 12 min στους 4⁰C για να απομακρυνθούν οι πυρήνες της

Drosophila. Στο υπερκείμενο τοποθετούνταν ίσος όγκος διαλύματος 25% σουκρόζης σε PBS και στη συνέχεια φυγοκεντρώνταν στις 12K rpm για 30 min στους 4°C χωρίς φρένο. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιούνταν σε 0.4 ml διαλύματος ομογενοποίησης και φορτώνονταν σε 10 ml συνεχούς διαβάθμισης συγκέντρωσης ρενογραφίνης (28%-45%). Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 25K rpm στους 4°C για μία ώρα. Η πλειοψηφία των βακτηρίων συγκεντρώνονταν στην περιοχή 28% με 32%, τα οποία στη συνέχεια συλλέγονταν και κατακρημνίζονταν με προσθήκη 10 ml διαλύματος PBS και φυγοκέντρωση στις 12K rpm για 30 min στους 4°C.

Προετοιμασία μεγαλομοριακού βακτηριακού DNA. Το παραπάνω ίζημα ξεπλένονταν με 1.5 ml NaCl/Tris (pH 7.2)/EDTA και φυγοκεντρώνταν στις 12K rpm για 10 min. Στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιούνταν στον ελάχιστο όγκο του ίδιου διαλύματος, αναμειγνύονταν με ίσο όγκο 2% Incert αγαρόζης (FMC BioProducts) και το εναιώρημα τοποθετούνταν στο ειδικό εξάρτημα (Bio-Rad) για την κατασκευή των κύβων αγαρόζης. Οι κύβοι απομακρύνονταν από το ειδικό εξάρτημα και τοποθετούνταν σε διάλυμα για λύση των βακτηριακών κυττάρων για 12 ώρες στους 37°C. Ακολουθούσε επώαση στους 50°C με διάλυμα πρωτεΐνάσης K για 1-2 ημέρες. Οι κύβοι φυλάσσονταν τέλος στους 4°C σε 50 mM EDTA για περαιτέρω χρήση.

Πέψη γενωμικού DNA *Wolbachia* με ένζυμα περιορισμού. Οι κύβοι εξισορροπούνταν με διάλυμα TE (pH 8.0) το οποίο περιείχε 1mM PMSF για την απενεργοποίηση τυχόν υπολειμμάτων πρωτεΐνάσης K (3X30min) και στη συνέχεια αφήνονταν όλη νύχτα στους 4°C με TE. Ακολουθούσε επώαση με το κατάλληλο διάλυμα για κάθε ένζυμο περιορισμού για 30min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προσθήκη του ενζύμου (50 units) για 4-5 ώρες στους 37°C, το οποίο προστίθονταν σε δύο δόσεις. Δοκιμάστηκε πληθώρα ενζύμων που κόβουν αλληλουχίες πλούσιες σε GC, όπως τα *I-CeuI* (TAACTATAACGGTCCTAA[^]GGTAGCGA), *FseI* (GGCCGG[^]CC) και το *AseI* (GG[^]CGCGCC).

PFGE (Pulse-field Gel Electrophoresis). Για την απομάκρυνση υπολειμμάτων πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA ξενιστή ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των κύβων αγαρόζης σε μηχανήμα CHEF-DR III (Bio-Rad), στα 200 V (6 V/cm), στους 14°C. Ο παλμός του ηλεκτρικού πεδίου ήταν 60-90 δευτερόλεπτα και η συνολική διάρκεια της ηλεκτροφόρησης 24 ώρες. Τα πηκτώματα ήταν 1% Seakem Gold agarose (FMC BioProducts) σε 0.5X TBE.

Υβριδοποίηση κατά Southern. Για να εκτιμηθεί το ποσοστό καθαρότητας του βακτηριακού DNA, ακολουθούσε υβριδοποίηση των πηκτωμάτων με ανιχνευτές

κομμάτια γονιδίων από *Wolbachia*, μιτοχόνδρια και *Drosophila*. Συγκεκριμένα, ολικό DNA από μολυσμένες με *Wolbachia* μύγες απομονώθηκε με τη μέθοδο Holmes-Bonner και χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για αντιδράσεις Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμερισμού (PCR). Για τον πολλαπλασιασμό κομματιών γονιδίων από *Wolbachia* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 99F (5'-TTGTAG-CCTGCTATGGTATAACT-3') και 994R (5'-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3') (O'Neill et al. 1992), οι οποίοι πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδίου 16S rDNA, 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') και 691R (5'-AAAAATTAACGC-TACTCCA-3') οι οποίοι πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδίου *wsp* (*Wolbachia* surface protein). Οι εκκινητές *cytb1* (5'-ACCAGCTCCAATTAATATTTCA-AGATGATGA-3') και *cytb2* (5'-TACAGTTGCTCCTCAAAATGATATTTGTC-CTCA-3'), οι οποίοι πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδίου cytochrome b και χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο παρουσίας mtDNA. Οι εκκινητές τέλος TH61 και TH62, οι οποίοι πολλαπλασιάζουν τμήμα του γονιδίου *trp49* της *Drosophila* χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο παρουσίας γενωμικού DNA. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν με τις εξής συνθήκες: μία αρχική αποδιάταξη στους 94⁰C για 5 min, 30 κύκλους αποδιάταξης στους 94⁰C, υβριδοποίησης στους 55⁰C για 1 min, επιμήκυνσης στους 72⁰C για 2 min και μία τελική επιμήκυνση στους 72⁰C για 10 min. Οι αντιδράσεις περιείχαν 1.5 mM MgCl₂, dNTPs (200 μM το καθένα) και 0.25 units Taq polymerase (Minotech) και 400 nmol από κάθε εκκινητή. Τα PCR προϊόντα καθαρίζονταν με Gel Extraction Kit (Qiagen) και σημαίνονταν ραδιενεργά με τυπικές μεθόδους.

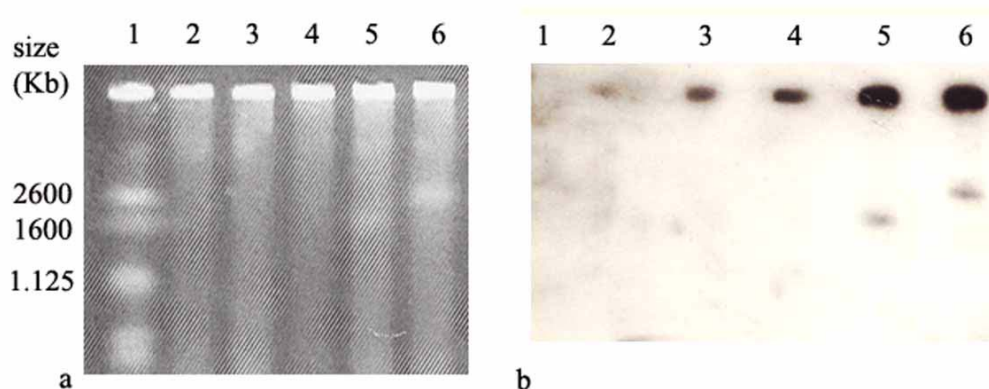
Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθούσε μεταφορά του μεγαλομοριακού DNA σε μεμβράνη υβριδοποίησης με αλκαλική μέθοδο και υβριδοποίηση των μεμβρανών με τους παραπάνω ανιχνευτές ακολουθώντας τυπικές μεθόδους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καθαρισμός *Wolbachia* DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα καθαρότητας-ποσότητας βακτηριακού DNA σε σχέση με τις υπόλοιπες που δοκιμάστηκαν π.χ. διαχωρισμός πυρηνικών-κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων, απομόνωση κυτταροσκελετικών κλασμάτων, κτλ. Η χρήση πρώιμων μη κυτταροποιημένων εμβρύων βελτίωσε κατά πολύ την απόδοση της μεθόδου, μια

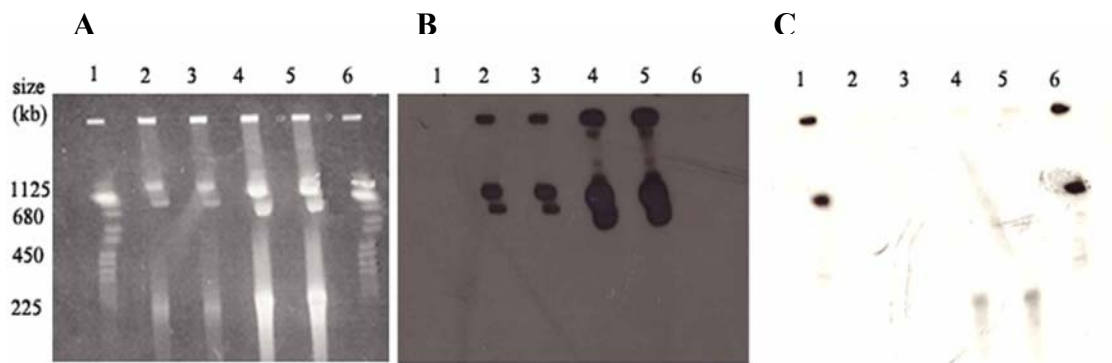
και βήματα που απαιτούνταν για το σπάσιμο των κυττάρων (π.χ sonication) παραλείπονταν, αφήνοντας σχετικά άθικτα βακτήρια και πυρήνες, τα οποία διαχωρίζονταν στη συνέχεια, χωρίς να λαμβάνει χώρα σε μεγάλη έκταση σπάσιμο και μίξη τυχαίων κομματιών DNA, που θα οδηγούσε σε μόλυνση της βιβλιοθήκης με DNA ξενιστή και mtDNA. Επίσης η χρήση ενήλικων μυγών εγκυμονεί πάντα τον κίνδυνο της ύπαρξης και άλλων συμβιωτών π.χ. στο έντερο, που δυσχεραίνουν ακόμη περισσότερο τη συγκεκριμένη εργασία, οπότε τα πρώιμα έμβρυα αποδείχθηκαν η καλύτερη λύση.

Το γενωμικό DNA της *Wolbachia*, κομμένο με το ένζυμο *FseI* ήταν ορατό ως μία ζώνη που έτρεχε στα 1.6 και 1.3 Mb για τα στελέχη *wRi* και *wMel* αντίστοιχα, η οποία ήταν απύσα από τις μη μολυσμένες μύγες, σε PFGE πήκτωμα, βαμμένο με βρωμιούχο εθίδιο (Εικ. 1a). Επιπρόσθετα, η κατά Southern υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας το 16S rDNA γονίδιο του βακτηρίου ως σημασμένο ανιχνευτή επιβεβαίωσε ότι η συγκεκριμένη ζώνη αντιπροσώπευε *Wolbachia* γενωμικό DNA (Εικ. 1b). Αυτή η διαδικασία έδειξε επίσης ότι το περισσότερο βακτηριακό DNA παρέμενε στα πηγαδάκια, υποδεικνύοντας την κυκλική φύση του χρωμοσώματος της *Wolbachia*. Στο πήκτωμα τέλος, δεν έγινε ορατό εξωχρωμοσωμικό DNA, υποδηλώνοντας την απουσία πλασμιδίων.



Εικόνα 1. Πήκτωμα βαμμένο με βρωμιούχο εθίδιο (a) και η αντίστοιχη αυτοραδιογραφία του Southern blot (b), υβριδοποιημένου με κοκτέιλ ανιχνευτών από κομμάτια των γονιδίων 16S rDNA και *wsp* της *Wolbachia*. Διαδρομή 1, μάρτυρας από χρωμοσώματα του μύκητα (Bio-rad), διαδρομή 2, αρνητικό κοντρόλ από DSRT DNA, διαδρομή 3, *D. melanogaster* *yw*^{67C23} κομμένο με το ένζυμο *I-CeuI*, διαδρομή 4, DSR DNA κομμένο με το ένζυμο *I-CeuI*, διαδρομή 5, *D. melanogaster* *yw*^{67C23} DNA κομμένο με το ένζυμο *FseI* και διαδρομή 6, DSR DNA κομμένο με ένζυμο *FseI*.

Η κατά Southern υβριδοποίηση χρησιμοποιώντας το γονίδιο *trp49* της μύγας ως ανιχνευτή έδειξε χαμηλά επίπεδα μόλυνσης με DNA ξενιστή (Εικ. 2C), ενώ υβριδοποίηση με ανιχνευτή το μιτοχονδριακό γονίδιο cytochrome b (Εικ. 2B), έδειξε ότι αυτό έτρεχε σαν δύο ζώνες στα 500kb, λόγω της κυκλικής του δομής, το οποίο απομακρύνονταν με ένα πρώτο τρέξιμο του πηκτώματος, ενώ το βακτηριακό παρέμενε παγιδευμένο στα πηγαδάκια (Εικ. 1).



Εικόνα 2. Πήκτωμα βαμμένο με βρωμιούχο εθίδιο (A) και οι αντίστοιχες αυτοραδιογραφίες των Southern blots, υβριδοποιημένων με το γονίδιο cytochrome b (B) και το γονίδιο *trp49* από Δροσόφιλα (C). Διαδρομή 1 και 6: μάρτυρας με χρωμοσώματα του μύκητα, διαδρομή 2 και 3: DSRT DNA, διαδρομή 4 και 5: DSR DNA.

Πέψη με ένζυμα περιορισμού του γενωμικού DNA της Wolbachia. Η αλληλουχία των κλωνοποιημένων γονιδίων της Wolbachia υπέδειξε ότι το βακτήριο ανήκει στην κατηγορία των βακτηρίων, τα οποία είναι πλούσια σε AT αλληλουχίες (Sun et al. 1999). Για αυτό το λόγο τα ένζυμα περιορισμού που δοκιμάστηκαν αναγνώριζαν GC αλληλουχίες. Δυστυχώς, το μόνο ένζυμο περιορισμού που δούλεψε επιτυχώς ήταν το *FseI*, το οποίο κόβει μία φορά το γονιδίωμα της Wolbachia, κάνοντας το γραμμικό και επιτρέποντας του έτσι να εισέλθει στο πήκτωμα αγαρόζης. Το γονιδίωμα της Wolbachia, δε διαθέτει την αλληλουχία, που αναγνωρίζει το *I-CeuI* (Εικ. 1) (Sun et al. 2001), το οποίο συνήθως κόβει μία φορά τα βακτηριακά γονιδιώματα και τα γραμμοποιεί, εάν είναι κυκλικά.

Δομή του χρωμοσώματος της Wolbachia. Το γεγονός ότι το άκοπο DNA Wolbachia, παρέμενε στα πηγαδάκια και δεν εισέρχονταν στα PFGE πηκτώματα, ενώ το κομμένο με *FseI*, που κόβει μία φορά έδινε μία ζώνη στα 1.6 και 1.3 Mb για το

wRi και το wMel αντίστοιχα (Εικ. 1), πιστοποιούν την κυκλική δομή του χρωμοσώματος της *Wolbachia*.

Κατασκευή γενωμικής βιβλιοθήκης. Κατασκευή πιλοτικής βιβλιοθήκης με *Wolbachia* DNA, που απομονώθηκε με την παραπάνω μέθοδο (πρώιμα έμβρυα, κλίση συγκέντρωσης, PFGE και απομόνωση του παγιδευμένου βακτηριακού DNA από τους κύβους αγαρόζης, έδειξε ότι το 75% των κλώνων είχε ομολογία με DNA από α-πρωτεοβακτήρια, 15% με mtDNA και 10% ήταν άγνωστο. Η συγκεκριμένη βιβλιοθήκη κατασκευάστηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο του εξωτερικού (EBC, University of Uppsala), στο οποίο δόθηκαν οι κύβοι αγαρόζης και χρησιμοποιείται σήμερα για την αλληλούχιση του γονιδιώματος του στελέχους wRi.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον Ιούλιο 1998 μέχρι το Νοέμβριο 1999, οπότε και κατατέθηκε η ερευνητική πρόταση για χρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση της αλληλούχισης τριών γονιδιωμάτων του βακτηρίου (των στελεχών wNo, wUni και wVul), σε συνεργασία με έξι διαφορετικά ευρωπαϊκά εργαστήρια. Η πρόταση έγινε αποδεκτή την άνοιξη του 2000. Οι προσπάθειες για την αλληλούχιση των παραπάνω τριών γονιδιωμάτων συνεχίζονται μέχρι σήμερα χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, προσαρμοσμένες στα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη και στους ξενιστές τους.

Τον καιρό εκείνο οι μελέτες της *Wolbachia* ήταν εστιασμένες στους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους και στη φυλογένεση του βακτηρίου. Η δυσκολία του βακτηρίου να καλλιεργηθεί και να καθαριστεί είχε δυσκολέψει πολύ την πρόοδο μοριακών και βιοχημικών μελετών. Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στη συγκεκριμένη εργασία βασίστηκε σε ανάλογα πρωτόκολλα (Sun et al. 1999) για απομόνωση συγγενικών βακτηρίων με ορισμένες τροποποιήσεις κλειδιά: όπως η χρησιμοποίηση πρώιμων εμβρύων και όχι ενηλίκων, το πρώτο τρέξιμο του PFGE πηκτώματος, ώστε να απομακρύνονται το mtDNA και τυχόν υπολείμματα πυρηνικού DNA από *Drosophila* και στη συνέχεια η απομόνωση σχετικά καθαρού βακτηριακού DNA από τους κύβους αγαρόζης.

Τα βακτηριακά χρωμοσώματα συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο σε PFGE μελέτες. Επίσης, δεν έχουν όλα τα βακτήρια κυκλικά χρωμοσώματα (Ferdows

and Barbour 1989). Κυκλικά μεγάλα κομμάτια DNA δεν εισέρχονται στα PFGE και μένουν στα πηγαδάκια. Κομμάτια που κινούνται χωρίς πέψη με περιοριστικά ένζυμα έχουν πιθανώς προέλθει από σπάσιμο (nicking) κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης. Αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι το περισσότερο Wolbachia DNA παρέμενε στα πηγαδάκια. Επιπλέον η πέψη με το *FseI* ένζυμο είχε ως αποτέλεσμα τη γραμμοποίηση του κυκλικού μορίου και βοήθησε στην εκτίμηση του μεγέθους του Wolbachia DNA στα 1.6 και 1.3 Mb για τα στελέχη wRi και wMel αντίστοιχα.

Μελέτες που χρησιμοποίησαν PFGE ή εργασίες αλληλούχισης ολόκληρων γονιδιωμάτων έδειξαν ένα εύρος από 600.000 βάσεις για μερικά μυκοπλάσματα μέχρι 8 Mb για το βακτήριο *Mesorhizobium loti*. Σε γενικές γραμμές τα βακτήρια που ζουν ελεύθερα έχουν μεγαλύτερα γονιδιώματα από τα ενδοκυττάρια. Όσον αφορά στα απρωτεοβακτήρια, τα γονιδιώματα αυτών που ζουν ελεύθερα κυμαίνονται συνήθως πάνω από 3Mb, ενώ των υποχρεωτικά ενδοκυττάρων κάτω από 2 Mb (Doolittle 2002). Το γονιδίωμα της Wolbachia είναι μέσα στα πλαίσια αυτά. Πιο συγκεκριμένα, 0.95 και 1.1 Mb για τα στελέχη που μολύνουν τους νηματώδεις και 1.4 και 1.6Mb για τα στελέχη της A ομάδας, που μολύνουν τη *Drosophila* (Sun et al. 2001). Η συγκεκριμένη δημοσίευση επιβεβαίωσε τα δεδομένα του κεφαλαίου αυτού της διατριβής, όσον αφορά στη δομή του χρωμοσώματος και στα αντίστοιχα μεγέθη. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι το γονιδίωμα της Wolbachia βρίσκεται κάτω από τις ίδιες εξελικτικές πιέσεις που δρουν και στα υπόλοιπα βακτήρια με παρόμοιο τρόπο ζωής και έχουν ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση των γονιδιωμάτων τους (Andersson et al. 1998, Shigenobu et al. 2000).

Τέλος, όσον αφορά στις εργασίες αλληλούχισης των γονιδιωμάτων της Wolbachia, η πρώτη βρίσκεται στο στάδιο της ολοκλήρωσης και αφορά το γονιδίωμα wMel που μολύνει τη *D. melanogaster*, ενώ η δεύτερη (ευρωπαϊκή) είναι σε εξέλιξη (Κρήτη 2002, δεύτερο διεθνές συνέδριο για Wolbachia). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναμένονται με μεγάλη αγωνία από την επιστημονική κοινότητα, όχι μόνο για την αναγνώριση των υποψήφιων γονιδίων που ευθύνονται για τους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους, αλλά και για τη διαλεύκανση της εξέλιξης του συμβιωτικού τρόπου ζωής γενικότερα.

Ευχαριστώ τη Σμάρω Καμακάρη και τη Μαρία Κοκκινάκη για την μύηση στα μυστικά του PFGE.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, and C. G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-40.
- Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco, and L. Sacchi. 1999a. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts Wolbachia. *Int J Parasitol* 29: 357-64.
- Bandi, C., B. Slatko, and S. L. O'Neill. 1999b. Wolbachia genomes and the many faces of symbiosis. *Parasitol Today* 15: 428-9.
- Doolittle, R. F. 2002. Biodiversity: microbial genomes multiply. *Nature* 416: 697-700.
- Ferdows, M. S., and A. G. Barbour. 1989. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5969-73.
- 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 U S A* 94: 10792-6.
- Oehler, S., and K. Bourtzis. 2000. The First International Wolbachia Conference: A minireview. *Symbiosis* 29: 151 - 161.
- 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 U S A* 89: 2699-702.
- 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: 81-6.
- Stouthamer, R., J. A. Breeuwer, and G. D. Hurst. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71-102.

Sun, L. V., J. M. Foster, G. Tzertzinis, M. Ono, C. Bandi, B. E. Slatko, and S. L. O'Neill. 2001. Determination of Wolbachia genome size by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* 183: 2219-25.

3 Μόλυνση *in vitro* δύο κυτταρικών σειρών από έντομα με το βακτήριο *Wolbachia*

Τα βακτήρια *Wolbachia* μολύνουν συχνά πληθυσμούς εντόμων και προκαλούν μία σειρά από αναπαραγωγικές ανωμαλίες σε αυτούς, όπως παρθενογένεση, θηλυκοποίηση, θανάτωση αρσενικών και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Παρά το αυξανόμενο ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτά τα τελευταία χρόνια, οι μηχανισμοί των ανωμαλιών παραμένουν άγνωστοι. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της αδυναμίας της *Wolbachia* να καλλιεργηθεί σε θρεπτικά μέσα, εκτός των ξενιστών της. Στη μελέτη αυτή επιμολύνθηκαν επιτυχώς δύο κυτταρικές σειρές από έντομα στο εργαστήριο με το βακτηριακό στέλεχος *wRi*. Διαπιστώθηκε ποικιλομορφία στα επίπεδα μόλυνσης των κυττάρων. Οι επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν στο εργαστήριο για αρκετές γενιές και καταψύχθηκαν για περαιτέρω χρήση. Οι σειρές αυτές θα μπορούσαν να απλοποιήσουν την ανάλυση έκφρασης γονιδίων και βιοχημικών μονοπατιών της *Wolbachia*. Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην μελλοντική ανάπτυξη ενός συστήματος μετασχηματισμού του βακτηρίου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανικανότητα της *Wolbachia* να καλλιεργηθεί εκτός των ξενιστών της αποτέλεσε το σοβαρότερο εμπόδιο στη μελέτη της, από την αρχή της περιγραφής της μέχρι σήμερα. Η τεχνική της PCR βέβαια, βοήθησε πολύ στην παράκαμψη των παραδοσιακών μικροβιολογικών τεχνικών, επιτρέποντας το φυλογενετικό χαρακτηρισμό των μολύνσεων από *Wolbachia* (O'Neill et al. 1992, Werren et al. 1995, Zhou et al. 1998) και την αναγνώριση μολύνσεων σε καινούργια είδη (Werren and Windsor 2000). Παρόλα αυτά όμως επιπλέον μελέτες με το συγκεκριμένο βακτήριο απαιτούν ένα σύστημα συντήρησης πληθυσμών του μολυσμένου ξενιστή στο εργαστήριο. Αυτό φυσικά δεν είναι εφικτό για τα περισσότερα εργαστήρια του κόσμου, με αποτέλεσμα η σχετική με το βακτήριο έρευνα να εστιάζεται κυρίως προς τη μελέτη των μολύνσεων σε ξενιστές που μεγαλώνουν εύκολα στο εργαστήριο, με αποκορύφωμα τη *Drosophila*. Επίσης η συγκριτική μελέτη μεταξύ μολύνσεων διαφορετικών ξενιστών (π.χ. μυγών και νηματωδών) εμποδίζεται λόγω της δυσχέρειας συντήρησης των εγκαταστάσεων των διαφορετικών πληθυσμών.

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μία τεχνική που επιτρέπει την *in vitro* καλλιέργεια του βακτηρίου. Αυτή η μελέτη δημιούργησε μία κυτταρική σειρά από έμβρυα κουνουπιού *Aedes albopictus*, που ήταν μολυσμένα από τη φύση τους (O'Neill et al. 1997), δείχνοντας ότι η *Wolbachia* είναι δυνατόν να διατηρείται στο εργαστήριο με κλασσικές τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας. Επίσης, ερευνητές χρησιμοποιούσαν τη λεγόμενη *shell vial* τεχνική για να μολύνουν κύτταρα θηλαστικών με ρικέτσιες, φυγοκεντρώντας μολυσμένο υλικό πάνω σε μία μονοκύτταρη στοιβάδα (Stenos et al. 1992). Συνδυάζοντας τα παραπάνω, θα μπορούσε κανείς να έχει ένα απλό σύστημα για να δημιουργεί καινούργιες *in vitro* μολύνσεις σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες θα διατηρούνται στο εργαστήριο.

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται αναφορά στην εφαρμογή της τεχνικής αυτής και στην επιτυχή επιμόλυνση δύο κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα μολύνθηκαν οι κυτταρικές σειρές S2 και SF9 με το στέλεχος *Wolbachia wRi*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προετοιμασία του δείγματος. Η συλλογή αυγών από *Drosophila simulans* Riverside (DSR) μολυσμένη με το στέλεχος *Wolbachia wRi* και η επεξεργασία τους έγινε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2, χωρίς τη διαβάθμιση συγκέντρωσης. Το ίζημα μετά την φυγοκέντρηση με διάλυμα 25% σουκρόζης συλλέγονταν και επαναδιαλύονταν στον ελάχιστο δυνατό όγκο PBS. Όλα τα παραπάνω γίνονταν σε στείρες συνθήκες.

Διατήρηση κυτταρικών σειρών. Η κυτταρική σειρά Schneider's (S2), προερχόμενη από *Drosophila melanogaster* και η SF9, προερχόμενη από κύτταρα του λεπιδοπτέρου *Spodoptera frugiperda*, διατηρήθηκαν σε Shields and Sang M3 (Sigma #S8398) και Grace 's (Sigma #S9771) θρεπτικά μέσα εντόμων, αντίστοιχα. Η ψύξη των κυττάρων έγινε με τυπικές μεθόδους στο αντίστοιχο θρεπτικό μέσο με προσθήκη 10% DMSO.

Τεχνική shell vial. Οι κυτταρικές σειρές αφήνονταν να μεγαλώσουν σε φλάσκες μέχρι να κορεστούν (confluent). Ακολουθούσε αραιώση 1:3 αυτών και προσθήκη 2ml της αραιωμένης καλλιέργειας σε ειδικά πιάτα με 12 πηγαδάκια. Τα πιάτα αφήνονταν όλη νύχτα και το επόμενο πρωί 1.5ml της καλλιέργειας απομακρύνονταν. Στη συνέχεια το βακτηριακό δείγμα τοποθετούνταν στα υπόλοιπα 0.5ml της καλλιέργειας και φυγοκεντρούνταν στις 2000g για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη

φυγοκέντρωση ακολουθούσε προσθήκη 1.5 ml θρεπτικού μέσου και αντιβιοτικού ευρέου φάσματος (γενταμικίνη). Τα κύτταρα αφήνονταν όλη νύχτα στους 25⁰C. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν στις 1000rpm και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, ακολουθούσε μεταφορά τους σε φρέσκο θρεπτικό μέσο με γενταμικίνη. Η μεταχείριση των κυτταρικών σειρών στη συνέχεια γίνονταν με κανονικές συνθήκες. Τέλος, μετά από δύο περάσματα γίνονταν έλεγχος των κυττάρων για μόλυνση με *Wolbachia*.

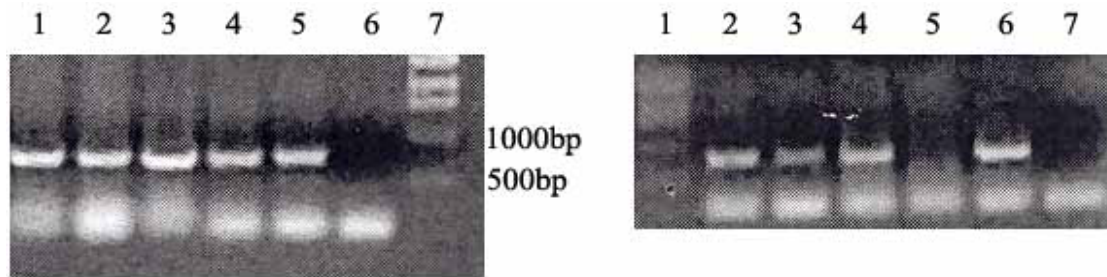
Έλεγχος για παρουσία *Wolbachia*. Τα κύτταρα συλλέγονταν και ομογενοποιούνταν σε 100 µl STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)). Ακολουθούσε προσθήκη πρωτεϊνάσης K σε συγκέντρωση 0.4 mg/ml και επώαση στους 37⁰C για μία ώρα. Μετά τη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στους 95⁰C για 10 min, 1µl του δείγματος αυτού χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο για PCR αντιδράσεις. Ο έλεγχος για παρουσία *Wolbachia* γίνονταν με τους εκκινητές 99F και 994R. Οι εκκινητές *cytb1* και *cytb2* χρησιμοποιούνταν για πιστοποίηση της ποιότητας του DNA, το οποίο εξάγονταν με την παραπάνω μέθοδο. Οι συνθήκες των αντιδράσεων ήταν αυτές που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 2. Πιστοποίηση παρουσίας *Wolbachia* γίνονταν και με κατά Southern υβριδοποίηση, χρησιμοποιώντας τους ανιχνευτές που περιγράφηκαν στο ίδιο κεφάλαιο.

Ανοσοϊστοχημεία. Κύτταρα από κορεσμένες φλάσκες συλλέγονταν και αφού ξεπλένονταν με PBS, τοποθετούνταν σε ειδικές αντικειμενοφόρους με 8 πηγαδάκια στα οποία υπήρχε poly-L λυσίνη. Ακολουθούσε επώαση με 4% παραφορμαλδεύδη για 15 min, ξέπλυμα με PBST (PBS με 0.1% Triton), blocking σε PBST με 1% BSA και επώαση με αντίσωμα που αναγνωρίζει τη WSP πρωτεΐνη (*Wolbachia* Surface Protein) (Dobson et al. 1999) σε αραιώση 1:500 όλη νύχτα στους 4⁰C. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονταν με PBST και επώάζονταν με δευτεροταγές αντίσωμα ροδαμίνης (anti-rabbit IgG, Molecular Probes) σε αραιώση 1:200, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα τέλος ξεπλένονταν με PBS και μετά τη προσθήκη Mowiol (Calbiochem) ήταν έτοιμα για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Οι φωτογραφίες αποκτήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-NT και επεξεργάστηκαν περαιτέρω στο πρόγραμμα Photoshop 6.0 (Adobe, Inc).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις διάφορες προσπάθειες επιμόλυνσης κυτταρικών σειρών επιλέχθηκε ως δότης του μολυσμένου υλικού πρώιμα έμβρυα *D. simulans* μολυσμένα με το στέλεχος wRi, λόγω της ευκολίας απομόνωσης ικανοποιητικής ποσότητας βακτηρίων σχετικά καθαρών. Ως δέκτες δοκιμάστηκαν αρκετές κυτταρικές σειρές που προέρχονταν από διάφορα είδη εντόμων όπως *Ceratitis capitata*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* και *Spodoptera frugiperda*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μόνο οι δύο τελευταίες απέκτησαν σταθερή μόλυνση, ενώ οι δύο πρώτες την έχαναν μετά από τα πρώτα περάσματα. Τα κύτταρα δε, που προέρχονταν από το κουνούπι *Anopheles gambiae* συνήθως δεν επανέρχονταν μετά το σοκ της επιμόλυνσης και λύνονταν. Τα παραπάνω αποτελέσματα ίσως να μην οφείλονται σε τεχνικούς λόγους, μια και τα συγκεκριμένα είδη δεν είναι μολυσμένα με *Wolbachia* στη φύση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε στην αδυναμία του βακτηρίου να πολλαπλασιαστεί στα συγκεκριμένα κύτταρα, είτε γιατί είναι κατά κάποιο τρόπο τοξικό για αυτά.

Ο αρχικός έλεγχος για την επιτυχή επιμόλυνση των κυττάρων γίνονταν με PCR χρησιμοποιώντας τους διαγνωστικούς εκκινητές 99F και 994R (Εικ. 1) μετά το δεύτερο πέρασμα και συνεχίζονταν για 10 περάσματα τουλάχιστον. Επιτυχής θεωρήθηκε η μόλυνση των κυττάρων S2 και SF9, τα οποία συνέχιζαν να δίνουν PCR προϊόν και μετά το πέρας των 10 περασμάτων. Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν στο εργαστήριο για παραπάνω από 20 περάσματα (>4 μήνες). Επίσης κύτταρα από τις σειρές αυτές καταψύχονταν και αποθηκεύονταν κρυογονικά χρησιμοποιώντας τυπικές τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών. Κάποια από αυτά ανέκαμψαν επιτυχώς από τη διαδικασία απόψυξης και διατήρησαν την μόλυνσή τους (Εικ. 1), ενώ κάποια άλλα την έχασαν.



Εικόνα 1. Αριστερό πάνελ: διαδρομές 1-2, S2 κύτταρα μολυσμένα με *Wolbachia* από περάσματα 12-13 αντίστοιχα, διαδρομές 3-4, SF9 κύτταρα, μολυσμένα με *Wolbachia*, περάσματα 3-4 αντίστοιχα, διαδρομές 5-6, θετικό και αρνητικό κοντρόλ για την αντίδραση, διαδρομή 7, μάρτυρας για τα μεγέθη. Δεξιό πάνελ: διαδρομή 1, μάρτυρας για τα μεγέθη, διαδρομή 2 και 4, S2 κύτταρα, τα οποία διατήρησαν τη μόλυνση μετά από πάγωμα-ξεπάγωμα σε διαφορετικά περάσματα, διαδρομή 3, SF9 κύτταρα μετά από πάγωμα-ξεπάγωμα, τα οποία διατήρησαν τη μόλυνση, ενώ στη διαδρομή 5, την έχασαν σε επόμενο πέρασμα, διαδρομή 6-7, θετικό και αρνητικό κοντρόλ για την αντίδραση.

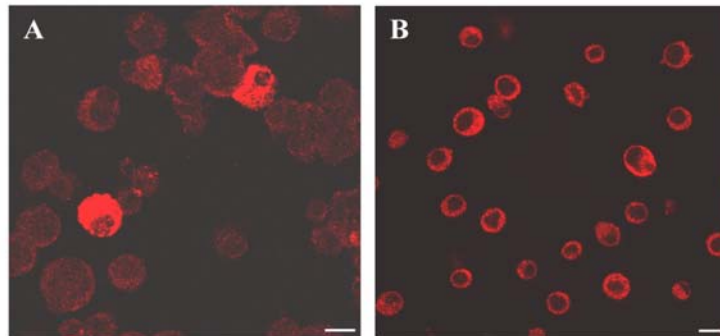
Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός, ότι αρκετή προσπάθεια καταβλήθηκε για την εκτίμηση της ποσότητας του αρχικού υλικού του ξενιστή, που έπρεπε να τοποθετηθεί πάνω στα κύτταρα, για να επέλθει εγκαθίδρυση σταθερής *in vitro* μόλυνσης. Σε γενικές γραμμές, ξεκινώντας από μια ποσότητα 500μl εμβρύων και τελική επαναδιάλυση του ιζήματος σε 500μl PBS διαλύματος, έπρεπε να τοποθετηθούν τουλάχιστον 100μl του υλικού σε κάθε κυτταρική σειρά. Παρατηρήθηκε δε, ότι υπήρχε θετική συσχέτιση του ποσού του μολυσμένου υλικού που τοποθετούνταν πάνω στη μονοστοιβάδα και στην επιτυχή μόλυνση των κυττάρων. Αν εφαρμόζονταν χαμηλή ποσότητα υλικού, συνήθως δεν παρατηρούνταν επιμόλυνση, γεγονός αναμενόμενο αν σκεφτεί κανείς ότι ο αριθμός των κυττάρων-δεκτών παρέμενε σταθερός. Έτσι μειώνοντας τον αρχικό αριθμό των βακτηρίων, μειώνονταν και οι πιθανότητες των κυττάρων να πάρουν μηχανικά ικανοποιητικό αριθμό, ώστε να μολυνθούν και να κρατήσουν τη μόλυνση. Εντούτοις, εφαρμογή αυξημένης ποσότητας υλικού ήταν εξίσου προβληματική, μια και αύξανε τη συχνότητα ανεπιθύμητων μικροβιακών μολύνσεων με «ξένα» βακτήρια και μύκητες, οι οποίες είχαν συχνά ως αποτέλεσμα το χάσιμο των κυτταρικών σειρών. Στην προσπάθεια αποφυγής τέτοιων μολύνσεων, κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του υλικού που

τοποθετούνταν πάνω στα κύτταρα, λαμβάνονταν εξαιρετικά μέτρα αποστείρωσης του χώρου και των μέσων εργασίας.

Στην προσπάθεια να επιβεβαιωθεί η επιμόλυνση των κυτταρικών σειρών με *Wolbachia* και συγκεκριμένα της S2, η οποία ήταν η πιο ευμεταχείριστη, έλαβε χώρα και κατά Southern υβριδοποίηση με το γονίδιο 16S rDNA του βακτηρίου, ως ανιχνευτή (Εικ. 2). Η μόλυνση τέλος των κυττάρων, έγινε ορατή με τη χρήση ενός πολυκλωνικού αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου ονόματι WSP (*Wolbachia* Surface Protein) (Dobson et al. 1999). Όπως φαίνεται στην Εικ. 3, περίπου το 10% των S2 κυττάρων (>20^ο πέρασμα) ήταν μολυσμένο και το 90% των SF9 (<10^ο πέρασμα). Η διαφορά στον αριθμό των μολυσμένων κυττάρων, μπορεί να οφείλεται στη διαφορά του αριθμού των περασμάτων. Τα βακτήρια παρουσιάζονται εντοπισμένα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, πράγμα σύμφωνο με προηγούμενες παρατηρήσεις (O'Neill et al. 1997). Τα βακτήρια τέλος, φαίνονται ανομοιογενώς κατανεμημένα, με κάποια κύτταρα να είναι μολυσμένα με μεγάλο αριθμό από αυτά και άλλα με καθόλου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την πιθανή ανικανότητα των βακτηρίων να εισβάλλουν και να μετακινούνται από κύτταρο σε κύτταρο. Η συγγραφέας υποθέτει ότι όταν συμβαίνει η αρχική είσοδος των βακτηρίων στα κύτταρα με τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης, κάποια κύτταρα τυχαία αποκτούν μερικά βακτήρια. Αν ο αριθμός αυτός είναι μεγάλος (των αρχικά μολυσμένων κυττάρων) και τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται με έναν ρυθμό τουλάχιστον ίσο με αυτόν της διαίρεσης των κυττάρων, τότε η μόλυνση εγκαθιδρύεται. Συνήθως όμως αυτό που συμβαίνει, είναι ότι οι μολύνσεις χάνονται, πιθανώς λόγω του αργού ρυθμού πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και του χαμηλού αριθμού των αρχικά μολυσμένων κυττάρων, τα οποία αραιώνονται με τις επικείμενες κυτταρικές διαιρέσεις.



Εικόνα 2. Δοκιμασία Southern blot. Διαδρομές 1,3,5,7, γενωμικό DNA από S2 μολυσμένα με *Wolbachia* κύτταρα, κομμένο με τα ένζυμα *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI* και *XhoI*, αντίστοιχα. Διαδρομές 2, 4, 6, 8, γενωμικό DNA από S2 μη μολυσμένα κύτταρα, κομμένο με τα αντίστοιχα ένζυμα.



Εικόνα 3. Βαμμένα μολυσμένα κύτταρα με ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας το WSP αντίσωμα. Α. S2 κύτταρα. Β. SF9 κύτταρα. Μπάρα, 10μm.

Η παραπάνω εργασία στηρίχθηκε στην αρχική ιδέα διερεύνησης του φάσματος των κυτταρικών σειρών που προέρχονταν από διαφορετικά είδη εντόμων, που θα μπορούσαν να δεχθούν και να διατηρήσουν ένα συγκεκριμένο στέλεχος του βακτηρίου. Την ίδια περίοδο, εργαστήριο του εξωτερικού δοκίμαζε την εφαρμογή διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου στην ίδια κυτταρική σειρά και συγκεκριμένα στην Aa23T, η οποία προέρχεται από το κουνούπι *Aedes albopictus*. Η συγκεκριμένη μελέτη κατέληξε στο ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα μπορούσαν να κρατήσουν πέντε διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου που προέρχονταν από *Drosophila simulans*, *Culex pipiens* και *Cadra cautella*. Τα αποτελέσματα των δύο αυτών συμπληρωματικών μελετών οδήγησαν σε μία κοινή δημοσίευση (Dobson et al. 2002).

Συμπεράσματα. Προηγούμενες μελέτες, για να δείξουν το εύρος ξενιστών της *Wolbachia*, στηρίζονταν στην τεχνική των κυτταροπλασματικών ενέσεων σε αυγά εντόμων (Braig et al. 1994, Pintureau et al. 2000, Poinsot et al. 1998, Rousset et al. 1999). Εντούτοις, τα πειράματα αυτά είναι χρονοβόρα και τεχνικώς δύσκολα. Χρησιμοποιώντας την απλή shell vial τεχνική δείχθηκε ότι το στέλεχος wRi μπορεί να επιβιώσει σε κύτταρα *Drosophila*, *Spodoptera* και *Aedes*, ενώ έξι διαφορετικά

βακτηριακά στελέχη μπορούν να υποστηριχθούν από τα κύτταρα του κουνουπιού *A. albopictus*. Φαίνεται λοιπόν ότι με τη μέθοδο αυτή, το εύρος ξενιστών τουλάχιστο όσον αφορά στα κύτταρα, είναι αρκετά μεγάλο. Στο μέλλον, οι μολύνσεις των κυτταρικών σειρών θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή στελεχών *Wolbachia* για πειράματα διαμόλυνσης. Για παράδειγμα, διαφορετικές *in vitro* μολύνσεις θα μπορούσαν να μεταφερθούν με μικροενέσεις σε έμβρυα *Drosophila* (ένα ή και παραπάνω στελέχη ταυτόχρονα) και να μελετηθούν τα στελέχη που μπορούν να διατηρηθούν *in vivo* και κατ' επέκταση η δυναμική μόλυνσης και εξάπλωσης τους.

Η τεχνική shell vial που περιγράφηκε στο κεφάλαιο αυτό, παρέχει τη δυνατότητα εγκαθίδρυσης μιας σταθερής μόλυνσης με *Wolbachia* στο εργαστήριο και τη δυνατότητα διατήρησής της με κρυογονικές μεθόδους. Επίσης απλοποιεί και παροτρύνει τη μελέτη του βακτηρίου, σε εργαστήρια που δεν διαθέτουν εξοπλισμό για την ανατροφή εντόμων και κάνει να φαίνεται δυνατή η δημιουργία στο μέλλον ενός κέντρου αποθήκευσης (stock center) βακτηριακών στελεχών. Τέλος, την πιο σημαντική διάσταση αυτής της εργασίας, αποτελεί το γεγονός απλοποίησης μελλοντικών πειραμάτων μελέτης των δομών του βακτηρίου μέσα στο κύτταρο, ανάλυσης προτύπων γονιδιακής έκφρασης, βιοχημικών μονοπατιών, γεγονότων ανασυνδυασμού και γενετικού μετασχηματισμού του βακτηρίου με γονίδια, που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην καταπολέμηση βλαβερών εντόμων στη γεωργία και στην υγεία.

Ευχαριστώ το Γιώργο Βρέντζο για τη διατήρηση των κυτταρικών σειρών και την υπομονή που έδειξε στις «ξένες» μολύνσεις και τη Stephanie Brulant, φοιτήτρια του Universite de Paris VI-VII, που επισκέφθηκε το εργαστήριο μας στα πλαίσια του προγράμματος Έρασμος και βοήθησε στη συγκεκριμένη εργασία το καλοκαίρι του '99.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Braig, H. R., H. Guzman, R. B. Tesh, and S. L. O'Neill. 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature* 367: 453-5.

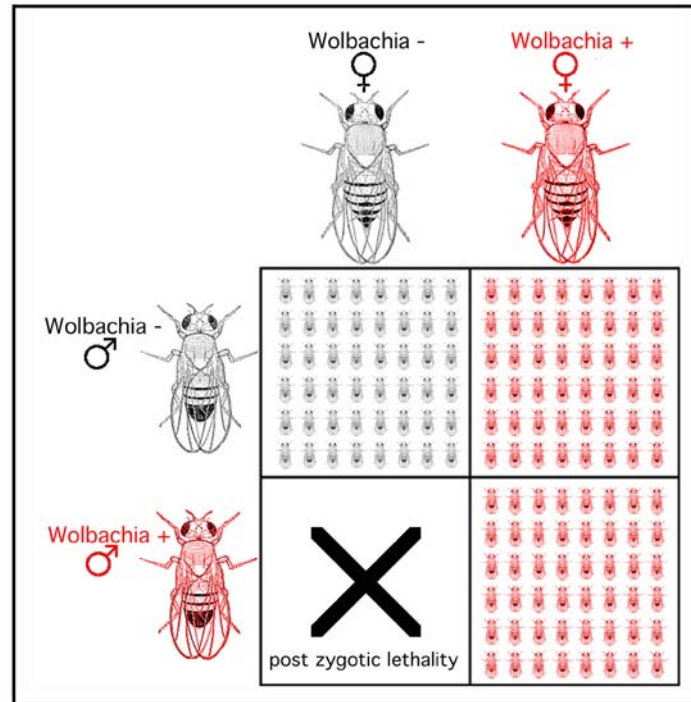
- Dobson, S. L., K. Bourtzis, H. R. Braig, B. F. Jones, W. Zhou, F. Rousset, and S. L. O'Neill. 1999. Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 153-60.
- Dobson, S. L., E. J. Marsland, Z. Veneti, K. Bourtzis, and S. L. O'Neill. 2002. Characterization of Wolbachia host cell range via the *in vitro* establishment of infections. *Appl Environ Microbiol* 68: 656-60.
- 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 U S A* 89: 2699-702.
- O'Neill, S. L., M. M. Pettigrew, S. P. Sinkins, H. R. Braig, T. G. Andreadis, and R. B. Tesh. 1997. *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol* 6: 33-9.
- Pintureau, B., S. Grenier, B. Boleat, F. Lassabliere, A. Heddi, and C. Khatchadourian. 2000. Dynamics of Wolbachia populations in transfected lines of *Trichogramma*. *J Invertebr Pathol* 76: 20-5.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. Wolbachia transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-37.
- Rousset, F., H. R. Braig, and S. L. O'Neill. 1999. A stable triple Wolbachia infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. *Heredity* 82: 620-7.
- Stenos, J., S. Graves, and B. Dwyer. 1992. Quantification of *Rickettsia australis*. *Am J Trop Med Hyg* 47: 141-6.
- Werren, J. H., and D. M. Windsor. 2000. Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267: 1277-85.
- Werren, J. H., W. Zhang, and L. R. Guo. 1995. Evolution and phylogeny of Wolbachia: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 261: 55-63.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-15.

4 Περιγραφή της κατανομής και του πολλαπλασιασμού της Wolbachia κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης της Drosophila

Η μόλυνση της *Drosophila* με *Wolbachia* σχετίζεται συνήθως με κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Αυτού του είδους η ασυμβατότητα εκφράζεται μόνο όταν ένα μολυσμένο αρσενικό διασταυρωθεί με ένα αμόλυντο θηλυκό, υπονοώντας τη εμπλοκή του βακτηρίου στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Στη μελέτη αυτή περιγράφεται η κατανομή και ο αριθμός των βακτηρίων στους όρχεις μιας πληθώρας στελεχών και συγκρίνεται το βακτηριακό φορτίο με τα επίπεδα της ασυμβατότητας. Τα συμπεράσματα που βγαίνουν από αυτή είναι τα εξής: i) η ικανότητα πρόκλησης ασυμβατότητας, είναι εγγενής ιδιότητα του βακτηρίου και δεν εξαρτάται από τον ξενιστή ii) ένα βακτήριο που έχει την ικανότητα να προκαλεί ασυμβατότητα, για να την εκφράσει πρέπει να μολύνει επαρκώς τα σπερματικά κύτταρα iii) υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων της ασυμβατότητας και του ποσοστού των μολυσμένων σπερματοκύστεων και iv) ο ξενιστής παίζει ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων μόλυνσης των όρχεων του, από τα διάφορα στελέχη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πιο κοινός φαινότυπος που σχετίζεται με τη μόλυνση από *Wolbachia* στη *Drosophila*, είναι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, μια μορφή αναπαραγωγικής αποτυχίας, η οποία συμβαίνει μετά την γονιμοποίηση. Η ΚΑ εκφράζεται όταν ένα μολυσμένο αρσενικό διασταυρώνεται με ένα μη μολυσμένο θηλυκό, με αποτέλεσμα το μειωμένο αριθμό αυγών που εκκολάπτονται. Όλες οι υπόλοιπες διασταυρώσεις είναι συμβατές (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Από τους τέσσερις πιθανούς συνδυασμούς διασταυρώσεων μεταξύ μολυσμένων μυγών με Wolbachia (κόκκινες) και μη μολυσμένων (μαύρες), ο ένας (μολυσμένη αρσενική X μη μολυσμένη θηλυκή), έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή ή τη μη βιωσιμότητα των απογόνων. Συνέπεια αυτού, είναι η ραγδαία αύξηση της συχνότητας των μολυσμένων ατόμων, όταν αυτά εισβάλουν σε ένα μη μολυσμένο πληθυσμό.

Η ΚΑ δεν είναι το άμεσο αποτέλεσμα του μολυσμένου σπέρματος από Wolbachia, μια και τα βακτήρια απομακρύνονται από αυτό κατά το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του (Binnington and Hoffmann 1989, Snook et al. 2000), όπως συμβαίνει και με τα περισσότερα από τα κυτταροπλασματικά συστατικά του. Σε μια ασύμβατη διασταύρωση το σπέρμα εισέρχεται επιτυχώς στο αυγό, αλλά τα πατρικά χρωμοσώματα αποτυχαίνουν να αποσυμπυκνωθούν και να συντηγηθούν με τα μητρικά, πριν την πρώτη μιτωτική διαίρεση (Lassy and Karr 1996). Το αποτέλεσμα είναι ασύγχρονες μιτώσεις και διάχυτη χρωματίνη, με τα μητρικά χρωμοσώματα να εισέρχονται στη μίτωση πριν τα πατρικά και το θάνατο του εμβρύου (Callaini et al. 1997, Lassy and Karr 1996, Tram and Sullivan 2002). Σε μία συμβατή διασταύρωση όμως τα βακτήρια που υπάρχουν στο θηλυκό σώζουν την τροποποίηση που φέρει το σπέρμα και η ανάπτυξη προχωρά κανονικά. Οι μοριακοί μηχανισμοί της τροποποίησης και της διάσωσης δεν είναι προς το παρόν γνωστοί.

Στη *D. simulans* μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί πέντε διαφορετικοί τύποι Wolbachia: το στέλεχος wRi, το οποίο απομονώθηκε στο Riverside της California, (Hoffmann 1986) και το wHa το οποίο πρωτοβρέθηκε στη Honolulu της Hawaii, (O'Neill 1990), τα οποία προκαλούν υψηλά επίπεδα ΚΑ, το στέλεχος wNo που βρέθηκε σε μύγες από τη Noumea, της Νέας Καληδονίας (Mercot et al. 1995), το οποίο προκαλεί ενδιάμεσα επίπεδα ασυμβατότητας και τέλος τα στελέχη wMa (ή wKi) από τη Μαδαγασκάρη (και το Κιλμάντζαρο) (Mercot et al. 1995, Charlat et al. 2003) και το wCof (Coffs Harbor, Australia) (Hoffmann et al. 1996), τα οποία δεν προκαλούν ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας. Η κατανομή αυτών των στελεχών και η μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις έχουν αρχίσει να περιγράφονται τα τελευταία χρόνια (James and Ballard 2000).

Στη *D. melanogaster* όλα τα στελέχη που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα έχουν τις ίδια αλληλουχία στα 16s rDNA και *wsp* (Wolbachia surface protein) γονίδια τους, για αυτό και ονομάζονται όλα wMel. Μολαταύτα, αντιμετωπίζονται ως παραπάνω από ένα, διότι προκαλούν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ξενιστές του. Οι φαινότυποι αυτοί ποικίλουν από μη ανιχνεύσιμα μέχρι ενδιάμεσα επίπεδα ασυμβατότητας (Hoffmann et al. 1994, Holden et al. 1993, Solignac et al. 1994) (Bourtzis et al. 1998, Bourtzis et al. 1996, Bourtzis et al. 1994, Reynolds and Hoffmann 2002). Τέλος, το στέλεχος *porcorn* αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση, μια και πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα στο νευρικό σύστημα της μύγας και μειώνει το χρόνο ζωής της στο μισό (Min and Benzer 1997).

Παράγοντες του ξενιστή, φαίνεται να είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνοι για τις μεγάλες διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα ΚΑ ανάμεσα στα διάφορα στελέχη. Όταν το wRi μεταφέρθηκε από τη *D. simulans* στη *D. melanogaster* είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της ΚΑ, που αυτό προκαλούσε στο φυσικό του ξενιστή (Boyle et al. 1993). Αντίστοιχα, όταν το wMel μεταφέρθηκε από τη *D. melanogaster* στη *D. simulans* τα επίπεδα ασυμβατότητας αυξήθηκαν δραματικά (Poinsot et al. 1998). Εξίσου σημαντικός παράγοντας, που παίζει ρόλο στα επίπεδα ασυμβατότητας είναι το ίδιο το βακτηριακό στέλεχος. Για παράδειγμα το στέλεχος wMa δεν προκαλεί ασυμβατότητα ούτε στο φυσικό του ξενιστή *D. mauritiana*, ούτε στη *D. simulans*, στην οποία μεταφέρθηκε με κυτταροπλασματικές ενέσεις (Giordano et al. 1995). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα ασυμβατότητας είναι η ηλικία του αρσενικού (Clancy and Hoffmann 1998, Reynolds and Hoffmann 2002, Snook et al. 2000, Turelli and Hoffmann 1995), το θερμικό σοκ (Clancy and

Hoffmann 1998, Snook et al. 2000), το περιβάλλον των προνυμφών (Clancy and Hoffmann 1998) και η συζευκτική προϊστορία του αρσενικού (Karr et al. 1998).

Οι Breeuwer και Werren (1993) πρότειναν το μοντέλο βακτηριακής δόσης, σύμφωνα με το οποίο, μια διασταύρωση είναι ασύμβατη, όταν το σπέρμα προέρχεται από ένα αρσενικό μολυσμένο με περισσότερα βακτήρια από ότι το θηλυκό. Έκτοτε πολλές μελέτες έδειξαν ότι το βακτηριακό φορτίο σχετίζεται με την έκφραση και την ένταση των φαινοτύπων, που η *Wolbachia* προκαλεί σε διάφορα είδη, όπως στη *Drosophila* (Bourtzis et al. 1996, Boyle et al. 1993, Hurst et al. 2000, McGraw et al. 2002, Poinso et al. 1998), στη *Nasonia* (Breeuwer and Werren 1993), στο κουνούπι (Sinkins et al. 1995), στις ακρίδες (Noda et al. 2001) και στο υμενόπτερο *Muscidifurax uniraptor* (Zchori-Fein et al. 2000). Παρότι οι μελέτες αυτές έδειχναν κατά κύριο λόγο θετική συσχέτιση, πάντα υπήρχαν κάποιες εξαιρέσεις, που αφορούσαν κυρίως τη σύγκριση διαφορετικών βακτηριακών στελεχών και ξενιστών (Bourtzis et al. 1996, Giordano et al. 1995).

Ο Werren (1997) πρότεινε το λεγόμενο μοντέλο τροποποίησης (modification: mod) και διάσωσης (rescue: resc), βάσει του οποίου τα στελέχη *Wolbachia*, που μπορούν να υπάρξουν στη φύση, χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: mod^+resc^+ , mod^-resc^- , mod^-resc^+ , mod^+resc^- . Μέχρι σήμερα, τα στελέχη *wRi* (Hoffmann et al. 1986), *wHa* (O'Neill and Karr 1990) και *wNo* (Mercot et al. 1995), που έχουν βρεθεί στη *D. simulans* θεωρούνται mod^-resc^+ , ενώ το στέλεχος *wCof* θεωρείται mod^-resc^- (Hoffmann et al. 1996). Στη *D. melanogaster*, το στέλεχος *wMelyw* θεωρείται mod^+resc^+ , ενώ το *wMelCS* θεωρείται mod^-resc^+ , διότι σώζει την ασυμβατότητα, που προκαλεί το πρώτο (Bourtzis et al. 1998). Το στέλεχος *wMa*, που μεταφέρθηκε με κυτταροπλασματικές ενέσεις από το φυσικό του ξενιστή *D. mauritiana* στη *D. simulans*, καθώς και το *wKi*, που βρέθηκε σε *D. simulans* μύγες, από το όρος Κιλιμάντζαρο στην Τανζανία, θεωρούνται και τα δυο mod^-resc^+ , μια και δεν επάγουν ασυμβατότητα, αλλά σώζουν την ασυμβατότητα, που επάγει το συγγενικό τους στέλεχος *wNo* (Mercot and Poinso 1998). Οι θεωρίες δυναμικής πληθυσμών εξηγούν τη διατήρηση των mod^+resc^+ στελεχών και κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις τη διατήρηση των mod^-resc^+ στελεχών. Η διατήρηση των mod^-resc^- στελεχών απαιτεί και μια άλλη δράση του βακτηρίου στον ξενιστή, όπως για παράδειγμα αύξηση στη γονιμότητα των μυγών (Hoffmann et al. 1996, Turelli 1994). Τα στελέχη mod^+resc^- θεωρούνται «αυτοκτονικά» και μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί στη φύση.

Οι Binnington και Hoffmann (1989) παρατήρησαν πρώτοι τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η *Wolbachia* απουσιάζει από τους όρχεις ηλικιωμένων αρσενικών, γεγονός που συμφωνεί με το ότι τα επίπεδα της ασυμβατότητας πέφτουν δραματικά με την ηλικία του αρσενικού (Clancy and Hoffmann 1998, Turelli and Hoffmann 1995). Οι Bressac και Rousset (1993) παρατήρησαν επίσης, ότι ο αριθμός των μολυσμένων ώριμων σπερματοκύστεων μειώνονταν με το πέρασμα του χρόνου στα αρσενικά. Η μόλυνση με *Wolbachia* στα αρσενικά του στελέχους *D. simulans* Riverside, εκτός από το κόστος της ασυμβατότητας, σχετίζεται και με την παραγωγή λιγότερου σπέρματος, κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 ημερών της ζωής τους (Snook et al. 2000). Παρόλα αυτά, πολύ λίγα πράγματα είναι γνωστά, για το πώς η *Wolbachia* επηρεάζει την όλη διαδικασία της σπερματογένεσης. Οι προηγούμενες μελέτες ήταν εστιασμένες στις ώριμες επιμηκυσμένες σπερματοκύστες, ανίχνευαν τα βακτήρια με χρωστικές που βάφουν νουκλεϊκά οξέα και δεν έδιναν σημασία στην ανάπτυξη.

Στη συγκεκριμένη διατριβή περιγράφηκε η κατανομή και ο αριθμός των βακτηρίων, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης της μύγας, τόσο κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης των σπερματοκύστεων, όσο και ολόκληρων των όρχεων, από προνύμφες τρίτου σταδίου μέχρι γερασμένα αρσενικά. Επιπλέον, έγινε σύγκριση της κατανομής και του αριθμού των βακτηρίων των όρχεων διαφόρων στελεχών, φυσικά μολυσμένων και διαμολυσμένων στο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία και ειδικό αντίσωμα για τη *Wolbachia*. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν με τα επίπεδα ΚΑ, που τα στελέχη αυτά επάγουν. Συγκρίνοντας τη συμπεριφορά ενός συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους, σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα ξενιστών και τη συμπεριφορά διαφόρων στελεχών, στο ίδιο είδος ξενιστή, βγαίνουν πολύτιμα συμπεράσματα για τη φύση των παραγόντων, που ρυθμίζουν την κατανομή και τον αριθμό των βακτηρίων στους όρχεις του ξενιστή και κατ'επέκταση τα επίπεδα ΚΑ, που αυτά προκαλούν. Τέλος, τα αποτελέσματα συζητούνται κάτω από το πρίσμα των μοντέλων τροποποίησης-διάσωσης και βακτηριακής δόσης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στελέχη μυγών. Τα στελέχη μυγών και βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή, οι πηγές τους, καθώς και τα επίπεδα ΚΑ, υπάρχουν στον πίνακα 1. Οι μύγες μεγάλωναν στους 25⁰C σε θρεπτικό υλικό καλαμποκιού, άγαρ, ζάχαρης και μαγιάς, κάτω από αραιές πληθυσμιακές συνθήκες (50 προνύμφες/φιαλίδιο). Η ονοματολογία είναι βασισμένη στο σύστημα που προτάθηκε από το Zhou et al. (1998).

Εξαγωγή DNA, PCR και αλληλούχιση. Ολικό DNA απομονώθηκε από τις μύγες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (O'Neill et al. 1992). Η παρουσία της *Wolbachia* επιβεβαιώθηκε με PCR αντίδραση χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 94F και 994R. Για τις αντιδράσεις κλωνοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 81F και 691R (Braig et al. 1998), των οποίων τα προϊόντα, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) και τον pGEM-T easy φορέα (Promega). Από κάθε αντίδραση αλληλουχίστηκαν τρεις ανεξάρτητοι κλώνοι, για να αποφευχθούν τυχόν λάθη της πολυμεράσης. Εναλλακτικά, για το κάθε στέλεχος αλληλουχίστηκαν απευθείας τα PCR προϊόντα από τρία άτομα, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές.

Μετρήσεις ΚΑ. Όλες οι δοκιμές έγιναν στους 25⁰C. Για κάθε στέλεχος στήνονταν 30 διασταυρώσεις σε πιατάκια μηλόζουμου με άγαρ. Χρησιμοποιούνταν δύο ημερών παρθένα θηλυκά και μίας ημέρας παρθένα αρσενικά. Τα πιατάκια αντικαθιστούνταν κάθε μέρα. Τα ποσοστά εκκόλαψης μετρούνταν 36 ώρες μετά τη συλλογή των αυγών, για τουλάχιστο 50 αυγά ανά διασταύρωση. Μετά τη συλλογή των αυγών, οι μύγες καταψύχονταν για εξαγωγή DNA και πιστοποίηση της μόλυνσης τους με αντίδραση PCR.

Ανοσοϊστοχημεία όρχεων. Οι όρχεις αφαιρούνταν προσεκτικά από τις μύγες με τα κατάλληλα εργαλεία ανατομίας και μεταφέρονταν με μία σταγόνα TBST (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% Tween, 0.05% NaN₃, pH 7.5) πάνω σε αντικειμενοφόρους, όπου οι ιστοί επεξεργάζονταν περαιτέρω με βελόνες διαμέτρου 1mm, ώστε να εκτίθενται τα διαφόρων σταδίων γαμετικά κύτταρα. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι καλύπτονταν με καλυπτρίδες και βυθίζονταν σε υγρό άζωτο για να παγώσουν. Μετά την προσεκτική απομάκρυνση της καλυπτρίδας με νυστέρι, οι αντικειμενοφόροι βυθίζονταν σε παγωμένη αιθανόλη για 3 λεπτά και στη συνέχεια σε 4% παραφορμαλδεύδη για 12 λεπτά, για να μονιμοποιηθούν. Ακολουθούσαν

ξεπλύματα με TBST, μπλοκάρισμα με 1% BSA και επώαση όλη νύχτα στους 4⁰C με αντί-WSP αντίσωμα (Dobson et al. 1999) σε αραιώση 1:500. Την επόμενη μέρα οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονταν με TBST και επωάζονταν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με FITCH-σημασμένο goat anti-rabbit αντίσωμα (Molecular Probes) και RNAase A (2mg/ml). Ακολουθούσε χρώση των πυρήνων με DAPI (4', 6-διάμινο,-2-φαινυλινδόλη) για 3 λεπτά και Propidium Iodide για 20 λεπτά. Μετά από ένα γρήγορο ξέπλυμα, την τοποθέτηση μιας σταγόνας ProLong antifading mounting medium (Molecular Probes) και το τελικό κλείσιμο με καλυπτρίδα και βερνίκι νυχιών οι αντικειμενοφόροι ήταν έτοιμοι για παρατήρηση.

Συνεστιακή μικροσκοπία. Τα βακτήρια και οι πυρήνες γίνονταν ορατά με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS-NT, με το λέιζερ κρυπτού/αργού (488nm) για την ανίχνευση της *Wolbachia* και αυτό του ηλίου/νέον (543nm) για την ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων. Επικαλυπτόμενες οπτικές τομές γίνονταν κατά μήκος του Z άξονα, ώστε να καλύπτεται όλο το βάθος του ιστού. Οι τομές αυτές προβάλλονταν σε μία τελική εικόνα και ταυτόχρονα φωτογραφίζονταν ο συγκεκριμένος ιστός και με ορατό φως. Η τελική επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Photoshop 6.0 (Adobe).

Μέτρηση του βακτηριακού φορτίου στους όρχεις. Τα ποσοστά των μολυσμένων σπερματοκύστεων υπολογίζονταν μετρώντας τις μολυσμένες ώριμες σπερματοκύστες του κάθε αρσενικού που εξετάζονταν.

Στατιστική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS (version 10).

Πίνακας 1. Ονοματολογία των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη

Host species	Strain	Group	Subgroup	Wolbachia ^a	% CI levels ^b	Reference
<i>D. melanogaster</i>	yw ^{67C23}	A	Mel	wMel	25.1	(BOURTZIS <i>et al.</i> 1996)
<i>D. melanogaster</i>	Canton-S	A	Mel	wMelCS	0	(HOLDEN <i>et al.</i> 1993)
<i>D. melanogaster</i>	popcorn	A	Mel	wMelPop	0	(MIN and BENZER 1997)
<i>D. simulans</i>	NhaTC*	A	Mel	wMel	97.3	(POINSOT <i>et al.</i> 1998)
<i>D. simulans</i>	Coffs Harbour	A	Mel	wCof	0	(HOFFMANN <i>et al.</i> 1996)
<i>D. yakuba</i>	SA3, Africa	A	Mel	wCof	0	Zabalou <i>et al.</i> submitted
<i>D. teissieri</i>	Bloomington # 1015	A	Mel	wCof	0	Zabalou <i>et al.</i> submitted
<i>D. santomea</i>	STO9, Africa	A	Mel	wCof	0	Zabalou <i>et al.</i> submitted
<i>D. simulans</i>	Riverside	A	Ri	wRi	97.6	(HOFFMANN <i>et al.</i> 1986)
<i>D. yakuba</i>	SA3T*	A	Ri	wRi	92.4	Zabalou <i>et al.</i> submitted
<i>D. teissieri</i>	Bloomington #1015T*	A	Ri	wRi	86.0	Zabalou <i>et al.</i> submitted
<i>D. santomea</i>	STO9T*	A	Ri	wRi	94.3	Zabalou <i>et al.</i> submitted
<i>D. simulans</i>	Noumea	B	Pip	wNo	48.7	(MERCOT <i>et al.</i> 1995)
<i>D. simulans</i>	Watsonville*	B	Pip	wMa	0	(GIORDANO <i>et al.</i> 1995)
<i>D. mauritiana</i>	Bloomington # 31	B	Pip	wMa	0	this study
<i>D. simulans</i>	Kilimanjaro	B	Pip	wKi	0	(MERCOT and POINSOT 1998)

a: based on *wsp* gene sequences

b: average CI levels expressed as egg mortality

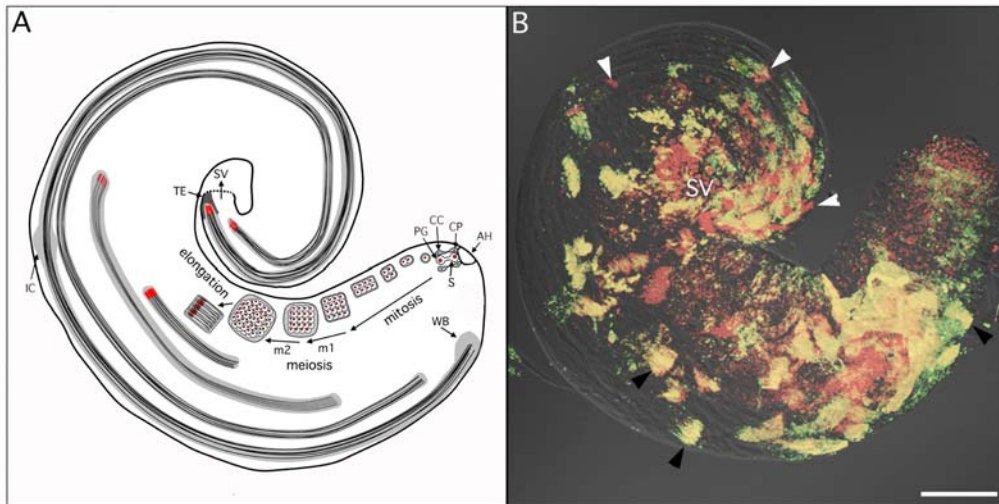
*: transinfected strains

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατανομή της Wolbachia σε ολόκληρους όρχεις. Η κατανομή της Wolbachia κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, δεν είναι προφανής στους ολόκληρους όρχεις της μύγας. Αυτό συμβαίνει, γιατί τα διάφορα στάδια ωρίμανσης των σπερματοκύστεων, είναι πακεταρισμένα σε ένα σωλήνα (Εικ. 2). Αγκυροβολημένα στην άκρη του όρχη (apical hub, AH) βρίσκονται τα βλαστοκύτταρα της γονάδας (gonial stem cells, S), καθώς και οι πρόγονοι των κυστικών κυττάρων (cyst progenitor cells, CC), τα οποία

εκβλαστάνουν (bud off) για να δημιουργήσουν το πρωτογενές κύτταρο της γονάδας (PG, λευκό με κόκκινο πυρήνα), το οποίο περικλείεται από τα δύο κυστικά κύτταρα, σωματικής προέλευσης (CC, γκρι). Στη συνέχεια, το πρωτογενές κύτταρο της γονάδας διαιρείται μιτωτικά τέσσερις φορές, πριν εισέλθει στη μίτωση. Η κυτοκίνηση δεν ολοκληρώνεται, ούτε κατά τη διάρκεια της μίτωσης, ούτε κατά τη διάρκεια της μείωσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία 64 απλοειδών κυττάρων (σπερματίδες), συνδεδεμένων μεταξύ τους. Σε αντίθεση, τα κυστικά κύτταρα δεν διαιρούνται, αλλά επιμηκύνονται και περικλείουν τα γαμετοκύτταρα. Τα γαμετικά κύτταρα μαζί με τα κυστικά αποτελούν μία σπερματοκύστη. Στη συνέχεια, ακολουθεί επιμήκυνση της κύστης κατά μήκος του όρχη, με τους πυρήνες του σπέρματος να βλέπουν προς το χώρο της μετέπειτα αποθήκευσης του σπέρματος (seminal vesicle, SV). Τέλος, λαμβάνει χώρα η αποβολή των περισσότερων κυτταροπλασματικών συστατικών, ανάμεσα τους και τα βακτήρια σε μία «σακούλα απορριμμάτων» (waste bag, WB) στην «ουρά» της κύστης, ενώ το σπέρμα απελευθερώνεται στο χώρο αποθήκευσης (seminal vesicle) (Fuller, 1993).

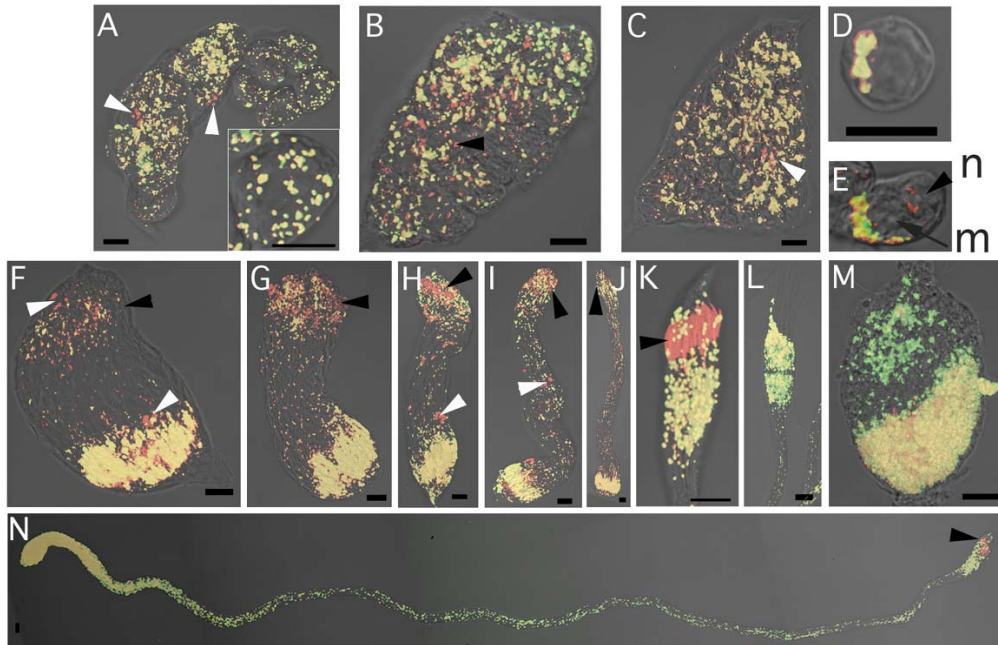
Κοιτώντας λοιπόν ενδεικτικά ολόκληρους όρχεις από το στελέχος DSR (Εικ.2) είναι προφανές, ότι υπάρχει αρκετή ποικιλομορφία στο βακτηριακό φορτίο του. Επίσης, τα βακτήρια είναι διασπαρμένα τόσο στα γαμετικά, όσο και σε κύτταρα σωματικής προέλευσης και είναι δύσκολη η λεπτομερής περιγραφή της συμπεριφοράς του βακτηρίου στα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης. Η μελέτη γίνεται εφικτή, αν ο ιστός πριν την μονιμοποίηση ανοιχτεί, ώστε να απελευθερωθούν οι σπερματοκύστεις όλων των σταδίων και να μπορέσουν να παρατηρηθούν με λεπτομέρεια κάτω από το μικροσκόπιο (Fabrizio et al. 1998).



Εικόνα 2. Σχηματικό διάγραμμα της σπερματογένεσης της Δροσόφιλας (A) και κατανομή της *Wolbachia* (κίτρινο-πράσινο) σε ένα νεαρό DSR αρσενικό άτομο. Το DNA δείχνεται με κόκκινο, ενώ με άσπρα βέλη σημειώνονται ενδεικτικά πυρήνες του σπέρματος από τρεις κύστεις διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Με μαύρα βέλη σημειώνονται βακτήρια, που βρίσκονται στην αντίθετη πλευρά, από αυτή των πυρήνων. Μπάρα, 100μm.

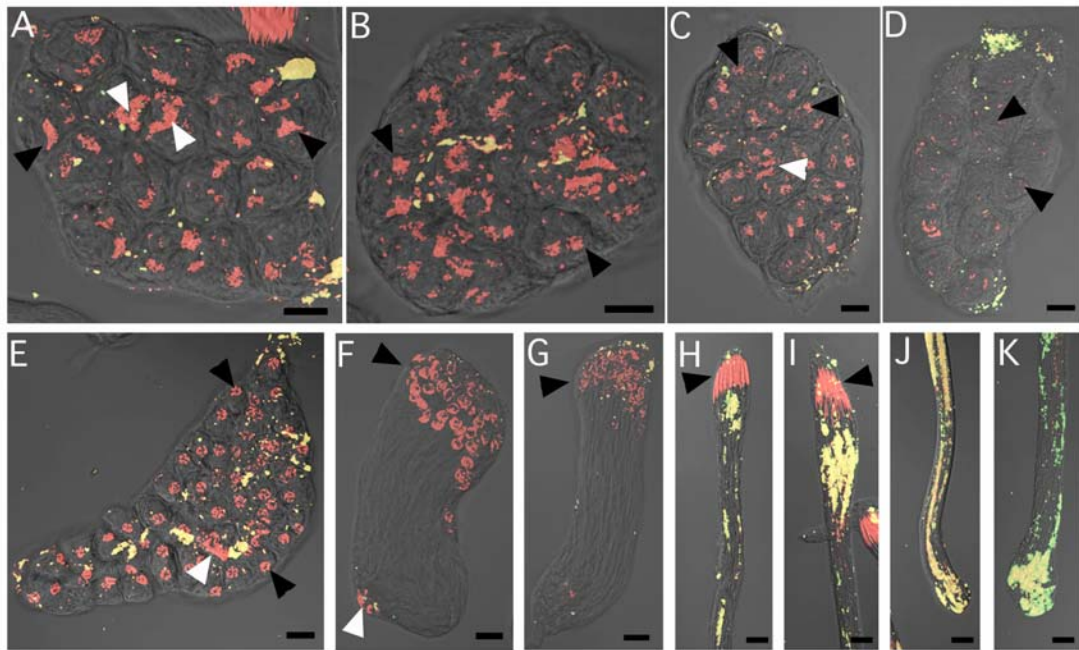
Κατανομή της *Wolbachia* στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των σπερματοκύστεων. Στην Εικόνα 3, παρουσιάζεται η κατανομή των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης του στελέχους DSR, που αποτελεί το στέλεχος αναφοράς. Τα βακτήρια είναι καθαρά ορατά, πριν την έναρξη της μείωσης. Στο στάδιο των 16 κυττάρων ανά κύστη, κάθε κύτταρο έχει κατά μέσο όρο 50 βακτήρια διασπαρμένα στο κυτταρόπλασμα του. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια των δύο μειώσεων, ο συνολικός αριθμός βακτηρίων ανά κύστη δε φαίνεται να αλλάζει σημαντικά, υπονοώντας την απουσία πολλαπλασιασμού της *Wolbachia*, παρόλο που αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων και ο συνολικός όγκος της κύστης. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, αν σκεφτεί κανείς ότι η μείωση λαμβάνει χώρα σχεδόν ακαριαία σε σχέση με το συνολικό χρόνο της σπερματογένεσης (250h) (Fuller, 1993). Μετά την ολοκλήρωση της μείωσης, τα περισσότερα βακτήρια αναδιοργανώνονται και συγκεντρώνονται στην μία πλευρά του κυττάρου, αντίθετη από αυτή του πυρήνα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω χωροταξικών λόγων (πχ. ο πυρήνας και η περιοχή σύντηξης των μιτοχονδρίων Neberken, πιέζουν και δεν αφήνουν χώρο στα βακτήρια), είτε λόγω πιο ενεργητικών διαδικασιών. Η συσσώρευση των βακτηρίων προς τη μία πλευρά γίνεται πιο ορατή στο στάδιο των 64 κυττάρων ανά κύστη, όταν αυτή αρχίζει να επιμηκώνεται. Η κατανομή αυτή παραμένει σε όλη τη διάρκεια της

επιμήκυνσης, με τα πιο πολλά βακτήρια να είναι συγκεντρωμένα προς την αντίθετη πλευρά της κύστης από αυτή των πυρήνων. Τέλος, η συγκεκριμένη πόλωση στην κατανομή του βακτηρίου παρατηρείται και στη σακούλα απορριμμάτων στην οποία καταλήγουν τα περισσότερα κυτταροπλασματικά συστατικά του σπέρματος, πριν αυτό ελευθερωθεί στο χώρο αποθήκευσής του.



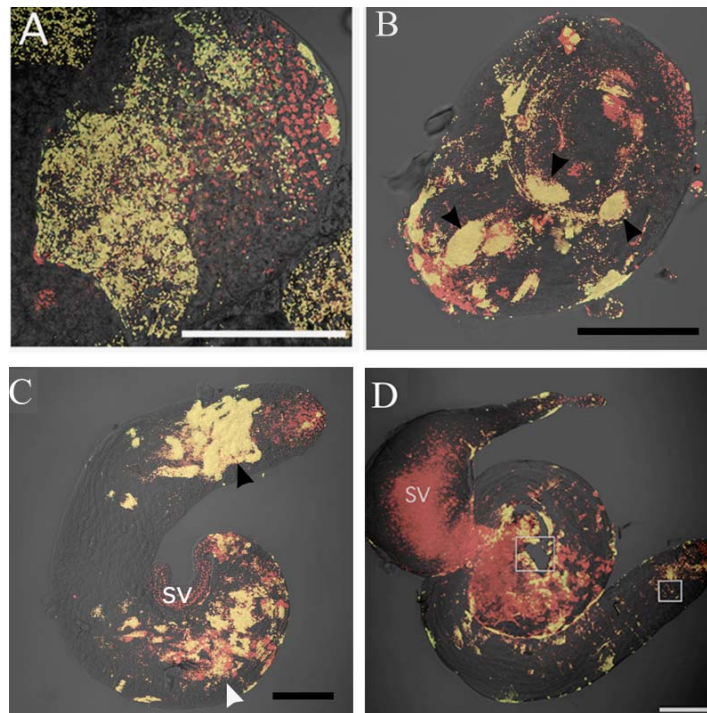
Εικόνα 3. Η κατανομή και ο πολλαπλασιασμός της *Wolbachia* μέσα σε σπερματοκύστες διαφόρων σταδίων του στελέχους DSR. Το DNA δείχνεται με κόκκινο, ενώ τα βακτήρια φαίνονται κιτρινοπράσινα. Με μαύρα βέλη σημειώνονται οι πυρήνες του σπέρματος, ενώ με άσπρα οι πυρήνες των κυστικών κυττάρων. (A) Πριν τη μείωση, στο στάδιο των 16 κυττάρων, (B) στο στάδιο των 32 κυττάρων, (C) στο στάδιο των 64 κυττάρων, μετά την ολοκλήρωση της μείωσης, (D) μία σπερματίδα, όπου φαίνονται τα βακτήρια να συγκεντρώνονται στη μία πλευρά του κυττάρου, (E) μία σπερματίδα, η οποία αρχίζει να επιμηκύνεται, έχοντας ακόμη τα βακτήρια στη μία πλευρά, δίπλα στη μάζα των μιτοχονδρίων (m) και τον πυρήνα (n), (F-L) η επιμήκυνση προχωρά με τα περισσότερα βακτήρια να καταλήγουν στη «σακούλα απορριμμάτων» (M) όταν ξεχωρίζουν οι σπερματίδες (K). Μία ολόκληρη επιμηκυσμένη σπερματίδα δείχνεται στο τέλος (N) με τους πυρήνες του σπέρματος, δεξιά. Μπάρες, 10μm.

Πρέπει να σημειωθεί ότι συγκριτική μελέτη των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων των υπόλοιπων στελεχών ήταν σχεδόν αδύνατη, μια και στα περισσότερα από αυτά δεν υπήρχαν καθόλου μολυσμένα πρώιμα σπερματοκύτταρα ή ήταν μολυσμένα με χαμηλό αριθμό βακτηρίων (Εικ. 4).



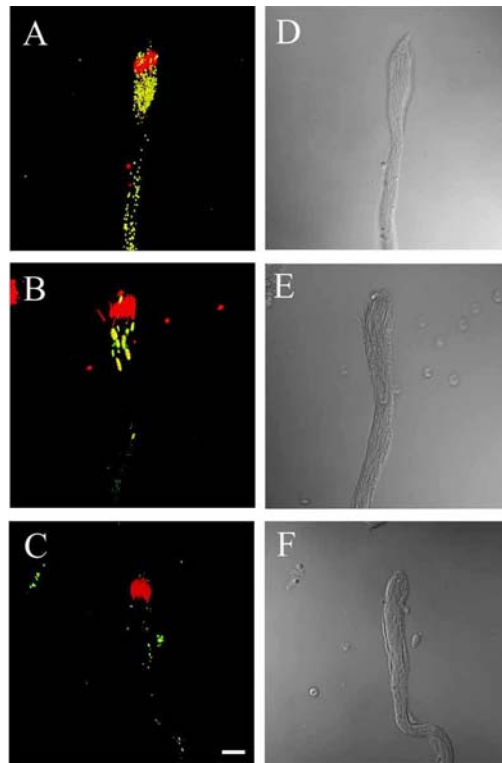
Εικόνα 4. Η κατανομή της *Wolbachia* σε ένα στέλεχος της *D. melanogaster*. Με μαύρα βέλη σημειώνονται οι πυρήνες του σπέρματος και με άσπρα των κυστικών κυττάρων. Πριν τη μείωση, στο στάδιο των 16 κυττάρων, λίγα βακτήρια είναι ορατά (A-D). Τα περισσότερα από αυτά είναι περιορισμένα στα κυστικά κύτταρα ή μεταξύ των σπερματοκυττάρων κατά τη διάρκεια της μείωσης (A-E). Πολύ λίγα βακτήρια είναι παρόντα κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης της κύστης (F-G). Στις ώριμες σπερματίδες, τέλος, συναντά κανείς αρκετή ποικιλομορφία και το χαρακτηριστικό patsy πρότυπο των *D. melanogaster* στελεχών (H-K) κατά μήκος των κύστεων. Μπάρες, 10μm.

Κατανομή της *Wolbachia* κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του όρχη. Στους όρχεις μιας DSR προνύμφης τρίτου σταδίου παρατηρούνται αρκετές πρώιμες σπερματοκύστες και οι περισσότερες από αυτές είναι μολυσμένες (Εικ. 5A). Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της νύμφης καθώς και μετά την εκκόλαψη οι περισσότερες κύστες παραμένουν μολυσμένες (Εικ.5 B,C). Αντίθετα, ένα ηλικιωμένο αρσενικό δεν έχει σχεδόν καθόλου μολυσμένες κύστες, ενώ αυξάνεται η βακτηριακή πυκνότητα στα σωματικά κύτταρα του όρχη (Εικ. 5D). Είναι πιθανό τα βακτήρια αυτά να είναι τα απομεινάρια από τις σακούλες απορριμμάτων, οι οποίες παραλαμβάνονται από τα τελικά επιθηλιακά κύτταρα και αποδομούνται, κάτω από τη μεμβράνη που καλύπτει τον όρχη (Εικ. 5D, τετραγωνάκια).



Εικόνα 5. Κατανομή της *Wolbachia* κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των όρχεων του στελέχους DSR. (A) όρχις από προνύμφη τρίτου σταδίου (B) όρχις από νεαρή νύμφη, (C) όρχις από νύμφη, έτοιμη να εκκολαφθεί και (D) ηλικιωμένο αρσενικό. Μπάρες, 100μm.

Κατανομή της *Wolbachia* στις ώριμες σπερματοκύστες. Στο στέλεχος αναφοράς DSR, οι περισσότερες ώριμες σπερματοκύστες ενός νεαρού αρσενικού είναι μολυσμένες, έχοντας το χαρακτηριστικό πρότυπο με τα περισσότερα βακτήρια στις δύο άκρες της κύστης. Στα στελέχη DSW(Ma) και Noumea οι περισσότερες κύστες έχουν λίγα βακτήρια, διασπαρμένα πιθανώς στα κυστικά κύτταρα και όχι στις σπερματίδες και μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών, παρουσιάζει το χαρακτηριστικό DSR πρότυπο. Τέλος, τα στελέχη της *D. melanogaster* yw^{67C23} και Canton-S παρουσιάζουν επίσης μικρό ποσοστό μολυσμένων κύστεων, με το χαρακτηριστικό ετερογενές και εμβλωματικό (patchy) πρότυπο της *D. melanogaster*, κατά μήκος της κύστης και μέσα στις σπερματίδες (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Πρότυπες σπερματοκύστες από DSR (A,D), *D. melanogaster* CS (B,E) και DSW(Ma) (C,F). Τα βακτήρια (κιτρινοπράσινα) κοντά στους πυρήνες του σπέρματος (κόκκινο). (D, E, F) φωτογραφίες με ορατό φως των (A,B και C) αντίστοιχα. Μπάρα, 10μm.

Ποσοτική ανάλυση της μόλυνσης των όρχεων με *Wolbachia*. Η βακτηριακή ποσότητα στους όρχεις εκφράστηκε, ως ποσοστό μολυσμένων σπερματοκύστεων. Οι κύστες μετρούνταν ως μολυσμένες, όταν είχαν το χαρακτηριστικό πρότυπο των DSR ή των *D. melanogaster* στελεχών, όταν δηλαδή η μόλυνση ανιχνεύονταν μέσα στις σπερματίδες. Οι κύστες μετρούνταν ως μη μολυσμένες, όταν είχαν καθόλου ή πολύ λίγα βακτήρια διασπαρμένα στα σωματικά κύτταρα που τις περικλείουν. Μελετήθηκαν 7 διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, από τρεις υποομάδες των ομάδων A και B. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν διαφορετικά είδη *Drosophila* μολυσμένα με το ίδιο βακτηριακό στέλεχος, καθώς και το ίδιο είδος, στη συγκεκριμένη περίπτωση η *D. simulans*, μολυσμένη με διαφορετικά στελέχη *Wolbachia*. Η ανάλυση αυτού του είδους, επέτρεψε την εξαγωγή συμπερασμάτων, για τη συνεισφορά των παραγόντων του βακτηρίου και του ξενιστή, στο βαθμό μόλυνσης των σπερματοκύστεων και στα διαφορετικά επίπεδα ασυμβατότητας. Τα ποσοστά

μολυσμένων κύστεων δίνονται στον πίνακα 2. Για λόγους ασφαλείας, εκτιμήθηκαν ξανά τα ποσοστά ασυμβατότητας και έγινε μερική αλληλούχιση του *wsp* γονιδίου, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις, που τα αποτελέσματα δεν ήταν τα αναμενόμενα (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 2. Ποσοστά μολυσμένων σπερματοκύστεων των στελεχών, που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη

Host species	Strain	Group	Subgroup	Wolbachia	N (males - cysts)	% Infected Cysts (average \pm s.d.)
<i>D. melanogaster</i>	yw ^{67C23}	A	Mel	wMel	13 - 200	11.5 \pm 10.4
<i>D. melanogaster</i>	Canton-S	A	Mel	wMelCS	12 - 200	10.0 \pm 9.2
<i>D. melanogaster</i>	popcorn	A	Mel	wMelpop	12 - 200	4.0 \pm 6.0
<i>D. simulans</i>	NhaTC*	A	Mel	wMel	20 - 340	72.9 \pm 10.3
<i>D. simulans</i>	Coffs Harbour	A	Mel	wCof	21 - 420	78.3 \pm 16.2
<i>D. yakuba</i>	SA3, Africa	A	Mel	wCof	18 - 310	4.2 \pm 6.2
<i>D. teissieri</i>	Bloomington # 1015	A	Mel	wCof	25 - 480	8.3 \pm 9.3
<i>D. santomea</i>	STO9, Africa	A	Mel	wCof	11 - 200	9.5 \pm 8.3
<i>D. simulans</i>	Riverside	A	Ri	wRi	20 - 380	85.0 \pm 18.3
<i>D. yakuba</i>	SA3T*	A	Ri	wRi	28 - 550	60.4 \pm 28.9
<i>D. teissieri</i>	Bloomington #1015T*	A	Ri	wRi	11 - 200	41.5 \pm 32.7
<i>D. santomea</i>	STO9T*	A	Ri	wRi	12 - 200	70.5 \pm 16.7
<i>D. simulans</i>	Noumea	B	Pip	wNo	19 - 340	27.9 \pm 14.3
<i>D. simulans</i>	Watsonville*	B	Pip	wMa	17 - 340	23.2 \pm 15.5
<i>D. mauritiana</i>	Bloomington # 31	B	Pip	wMa	26 - 480	76.0 \pm 22.1
<i>D. simulans</i>	Kilimanjaro	B	Pip	wKi	28 - 530	19.8 \pm 17.3

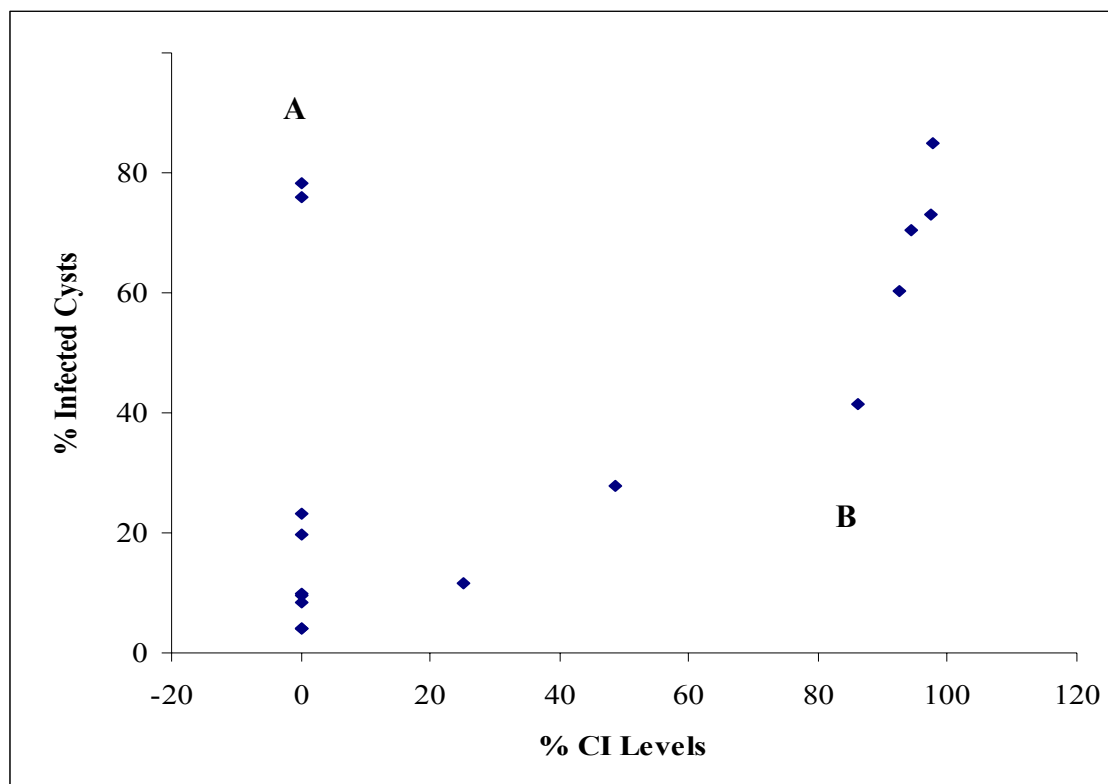
Mel-υποομάδα και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Τα στελέχη *D. melanogaster* yw, CS και porcorn έδειξαν λιγότερο από 10% μολυσμένες κύστεις. Το *D. melanogaster* yw^{67C23} στέλεχος παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα ασυμβατότητας, ενώ τα άλλα δύο παρουσιάζουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (Bourtzis et al. 1996, Bourtzis et al. 1998, Holden et al. 1993, Min and Benzer 1997). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα το wMelyw θεωρούνταν mod⁺ στέλεχος, ενώ το wMelCS και το wMelPop θεωρούνταν mod⁻. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες (McGraw et al. 2001, Weeks et al. 2002, Reynolds and Hoffmann 2002) έδειξαν καθαρά ότι και τα δύο τελευταία στελέχη, μπορούν να θεωρηθούν mod⁺ κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Επιπρόσθετα, η *D. simulans* μολυσμένη με το wMel στέλεχος παρουσιάζει υψηλό αριθμό πολύ μολυσμένων κύστεων και υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας (Poinsot et al. 1998). Από την άλλη πλευρά η *D. simulans* Coffs Harbor, μολυσμένη φυσικά με το στέλεχος wCof, παρουσιάζει υψηλό αριθμό μολυσμένων σπερματοκύστεων, αλλά δεν εκφράζει ασυμβατότητα (Hoffmann et al. 1996, McGraw et al. 2001, παρούσα μελέτη). Τα είδη τέλος *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. santomea* είναι μολυσμένα με ένα στέλεχος Wolbachia, που έχει σχεδόν την ίδια αλληλουχία wsp με το wCof (διαφέρουν κατά μία βάση), δεν παρουσιάζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας και έχουν πολύ λίγα βακτήρια, διάσπαρτα στα σωματικά κύτταρα των σπερματοκύστεων.

Ri-υποομάδα και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Ανάλυση του στελέχους αναφοράς DSR έδειξε ότι οι περισσότερες σπερματοκύστεις του, είναι πολύ μολυσμένες με βακτήρια. Είναι γνωστό ότι στο στέλεχος αυτό παρατηρούνται υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας (Hoffmann et al. 1986). Ενδιαφέρον προκαλεί επίσης, το γεγονός ότι τα μολυσμένα στο εργαστήριο είδη *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. santomea* με το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, έδειξαν υψηλά ποσοστά μόλυνσης των σπερματοκύστεων της τάξης 40-70% και υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας.

Pip-υποομάδα και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Η ανάλυση των στελεχών *D. simulans* Noumea, *D. simulans* Kilimanjaro, καθώς και του δια-μολυσμένου στο εργαστήριο *D. simulans* Watsonville με το βακτηριακό στέλεχος wMa, έδειξε ποσοστά μόλυνσης των σπερματοκύστεων της τάξης 20-30%, ενώ οι υπόλοιπες είχαν λίγα βακτήρια διάσπαρτα στα σωματικά κύτταρα, που τις περικλείουν. Το στέλεχος *D. simulans* Noumea εκφράζει ενδιάμεσα επίπεδα ασυμβατότητας (Mercot et al. 1995), ενώ στα άλλα δύο τα επίπεδα είναι μη ανιχνεύσιμα (Giordano et al. 1995, Bourtzis et al. 1998, Mercot and Poinsot 1998). Από την άλλη πλευρά, η φυσικώς

μολυσμένη *D. mauritiana* έχει παραπάνω από 70% πολύ μολυσμένες κύστεις, αλλά δεν εκφράζει ασυμβατότητα.

Συσχέτιση του βακτηριακού φορτίου των σπερματοκύστεων και των επιπέδων κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Στην εικόνα 7, φαίνεται καθαρά η ύπαρξη δύο ομάδων-σχέσεων, βακτηρίου-ξενιστή. Η μία ομάδα (B) περιέχει όλους τους μολυσμένους ξενιστές με το βακτηριακό στέλεχος *wRi*, τη *D. simulans* μολυσμένη με το *wMel*, τη *D. simulans* Noumea και τη *D. melanogaster* *yw*^{67C23}. Στην ομάδα αυτή παρατηρείται θετική συσχέτιση των επιπέδων ασυμβατότητας και των ποσοστών μόλυνσης των κύστεων. Η άλλη ομάδα (A) περιλαμβάνει τα υπόλοιπα στελέχη, τα οποία δεν εκφράζουν ασυμβατότητα, ανεξάρτητα από το πόσες μολυσμένες κύστεις έχουν. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα αυτή τα περισσότερα στελέχη έχουν χαμηλά ποσοστά μόλυνσης των κύστεων. Εξαιρέση αποτελούν τα μολυσμένα στη φύση στελέχη *D. simulans* Coffs Harbor και *D. Mauritiana*, στα οποία ενώ οι περισσότερες σπερματοκύστεις είναι πολύ μολυσμένες, δεν παρατηρείται ασυμβατότητα.



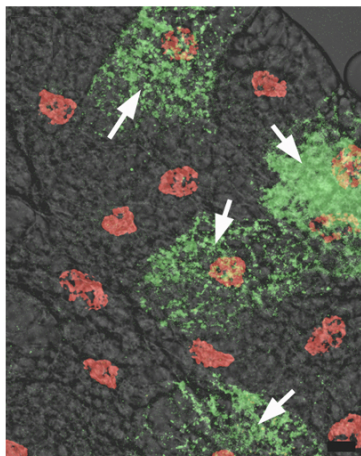
Εικόνα 7. Διάγραμμα στο οποίο δείχνεται η θετική συσχέτιση του ποσοστού των μολυσμένων σπερματοκύστεων και των επιπέδων ΚΑ.

Υπάρχει τελικά συχέτιση του ποσοστού των μολυσμένων σπερματοκύστεων και των επιπέδων ασυμβατότητας που παρατηρείται σε ένα στέλεχος; Η ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson έδειξε θετική συσχέτιση ($r=0.618$, $N=16$, $P=0.011$), η οποία γίνεται ακόμη πιο μεγάλη ($r=0.923$, $N=7$, $P=0.003$), αν η ανάλυση περιοριστεί στην ομάδα των στελεχών που επάγουν ασυμβατότητα.

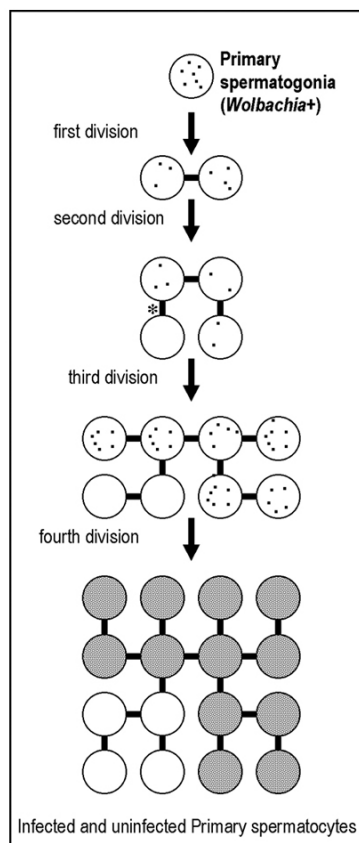
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικά. Η μελέτη της συμπεριφοράς της *Wolbachia* στους αναπαραγωγικούς ιστούς της μύγας, είναι κρίσιμη για την πλήρη κατανόηση του κυτταρικού μηχανισμού της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Μια και το ώριμο σπέρμα είναι απαλλαγμένο από τα βακτήρια και η ασυμβατότητα εκφράζεται στα γονιμοποιημένα αυγά, η *Wolbachia* πιθανόν να επηρεάζει το σπέρμα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη διατριβή έδωσε ιδιαίτερη βαρύτητα στην συγκριτική περιγραφή των μολυσμένων όρχεων των στελεχών, που παρουσιάζουν διάφορα επίπεδα ασυμβατότητας. Επιπλέον ανέπτυξε μία βελτιωμένη τεχνική, για την παρακολούθηση των πρώιμων σταδίων της σπερματογένεσης και χρησιμοποίησε ειδικό αντίσωμα, για να κάνει τα βακτήρια ορατά με συνεστιακή μικροσκοπία.

Αξιοσημείωτη είναι η ετερογένεια που συναντά κανείς στο βακτηριακό φορτίο των όρχεων και ειδικότερα των σπερματοκύστεων, του ίδιου ατόμου, μεταξύ των ατόμων του ίδιου στελέχους και τέλος μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Ένα απλοποιημένο μοντέλο, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την ετερογένεια που παρατηρείται στις σπερματοκύστες, καθώς και σε άλλους ιστούς, όπως τα μαλπιγγειανά σωληνάρια και το λιπαρό σώμα (Εικ. 8) περιγράφεται στην εικόνα 9. Σύμφωνα με αυτό, τα πρωτογενή βλαστικά κύτταρα είναι μολυσμένα με ένα συγκεκριμένο αριθμό βακτηρίων, τα οποία είναι διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση, που τα βακτήρια δεν διαιρούνται με τον ίδιο ρυθμό, με τον οποίο διαιρούνται τα κύτταρα, κάθε κυτταρική διαίρεση θα οδηγεί σε στοχαστικό χάσιμο της μόλυνσης, σε κάποιους κυτταρικούς κλώνους.



Εικόνα 8. Λιπαρό σώμα Δροσόφιλας μολυσμένο με βακτήρια (άσπρα βέλη)



Εικόνα 9. Διάγραμμα το οποίο δίνει μία πιθανή εξήγηση για το στοχαστικό χάσιμο των βακτηρίων σε κάποιους κυτταρικούς κλώνους.

Στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκαν κύστεις μερικώς μολυσμένες, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με αυτά που παρατήρησαν οι Bressac and Rousset (1993), οι οποίοι είχαν προτείνει την ύπαρξη δύο τύπων σπέρματος, του συμβατού (που προέρχεται από τις μη μολυσμένες κύστεις) και του ασύμβατου (που προέρχεται από τις μολυσμένες κύστεις). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν στην συγκεκριμένη παρατήρηση μία νέα διάσταση. Για παράδειγμα, αν σε μία κύστη είναι μολυσμένες οι 16 από τις 64 σπερματίδες, μόνο τα 16 σπέρματα θα προκαλέσουν ασυμβατότητα ή υπάρχει κάποιο κατώφλι στο επίπεδα της *Wolbachia*, πάνω από το οποίο, όλο το σπέρμα μίας κύστης θα είναι ασύμβατο; Χρειάζεται πλήρης κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της ασυμβατότητας, για να απαντηθούν ερωτήσεις σχετικές με τη φύση των παραγόντων που «σφραγίζουν» (imprinting) το σπέρμα, αν έχουν την ικανότητα για παράδειγμα, να διαχέονται ή να μεταφέρονται ενεργητικά μεταξύ των σπερματιδίων ή τέλος, αν το αποτύπωμα (imprint) συμβαίνει πριν τη μείωση και παραμένει μέχρι την ωρίμανση του σπέρματος.

Από την παρατήρηση της απουσίας μολυσμένων κύστεων στα ηλικιωμένα αρσενικά, βγαίνει το συμπέρασμα ότι είναι πιθανό, οι αριθμοί των βακτηρίων στα βλαστικά κύτταρα του όρχη να είναι περιορισμένοι. Οπότε το σπέρμα που ωριμάζει πρώτο, είναι «σφραγισμένο» και προκαλεί ασυμβατότητα, ενώ αυτό που ωριμάζει αργότερα, είναι απαλλαγμένο από τη «σφραγίδα», η οποία έχει εξαντληθεί. Το ποσό του «σφραγισμένου» σπέρματος που θα παράγεται κάθε φορά, θα εξαρτάται από τον αρχικό αριθμό των βακτηρίων στα βλαστικά κύτταρα και το ρυθμό, που αυτά θα στερεούν. Η υπόθεση αυτή είναι σύμφωνη με πρόσφατες παρατηρήσεις στελεχών, στα οποία παρατηρείται ασυμβατότητα μόνο στις διασταυρώσεις, που χρησιμοποιούνται πολύ νεαρά αρσενικά, τα επίπεδα της οποίας πέφτουν δραματικά μετά την επόμενη μέρα (Reynolds and Hoffmann 2002).

Πότε και πού πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια στους όρχεις; Παρατηρώντας την πορεία των βακτηρίων, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης του στελέχους αναφοράς DSR, είναι φανερό ότι αυτά «βαραίνουν» πιο πολύ τις κύστες, από όταν αρχίζει η επιμήκυνσή τους και μετά. Η κατανομή και ο χρόνος, που συμβαίνει ο πολλαπλασιασμός τους είναι αρκετά συνεπής και πιθανώς να κατοπτρίζει τη φύση του μηχανισμού της τροποποίησης του σπέρματος, που προκαλεί ασυμβατότητα. Είναι σημαντικό ότι, τα βακτήρια φαίνονται να πολλαπλασιάζονται, μετά την ολοκλήρωση της μείωσης. Είναι γνωστό, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της μεταγραφής των γονιδίων της σπερματογένεσης, λαμβάνει χώρα προ-μειωτικά (Olivieri, 1965), οπότε η πιθανότητα των βακτηρίων να τροποποιούν το σπέρμα, επηρεάζοντας τη μεταγραφή γονιδίων είναι χαμηλές. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση του αριθμού των βακτηρίων συμπίπτει με το χρονικό διάστημα, που συμβαίνουν δραματικές αλλαγές στη συμπύκνωση των πυρήνων του σπέρματος και στη μεταμόρφωσή τους σε πυκνά πακεταρισμένες δομές, που μοιάζουν με βελόνες. Έχει δειχθεί στο παρελθόν, ότι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα έχει ως αποτέλεσμα, τον ανώμαλο αποχωρισμό των χρωματίδων, κατά τη διάρκεια της ανάφασης της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης του εμβρύου (Lassy and Karr 1996), προτείνοντας την πιθανή εμπλοκή του βακτηρίου, στη συμπύκνωση της χρωματίνης, όταν το σπέρμα ωριμάζει. Μολαταύτα, στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία προφανής αλλαγή στο πακετάρισμα των πυρήνων, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, όπως και σε παλαιότερες μελέτες (Bressac and Rousset 1993, Snook et al. 2000). Είναι πιθανό, τα βακτήρια να επηρεάζουν τη συγκεκριμένη διαδικασία με τρόπο μη ορατό με συνεστιακή μικροσκοπία, σε αντίθεση με τα γεγονότα, που συμβαίνουν στην πρώτη

μιτωτική διαίρεση των εμβρύων, που προέρχονται από μία ασύμβατη διασταύρωση (Lassy and Karr, 1996). Μία άλλη παρατήρηση της συγκεκριμένης μελέτης, που ίσως αποδειχθεί σημαντική στο μέλλον, για την πλήρη κατανόηση του φαινομένου της ασυμβατότητας, είναι η πολωμένη κατανομή των βακτηρίων, σε μία κύστη που αρχίζει να επιμηκύνεται και που παραμένει η ίδια μέχρι την αποβολή των περισσότερων κυτταροπλασματικών συστατικών στη «σακούλα απορριμμάτων». Όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα αυτού του κεφαλαίου, η μεγαλύτερη συγκέντρωση των βακτηρίων παρατηρείται, στην απομακρυσμένη από τους πυρήνες, πλευρά της κύστης. Αν αυτά τα βακτήρια επηρεάζουν τους πυρήνες, το κάνουν πιθανά μέσω ενός παράγοντα, που έχει την ικανότητα να ταξιδεύει σε μία απόσταση 1.8mm (το μήκος μίας επιμηκυσμένης κύστης της *D. melanogaster*). Υπάρχει όμως και μία δεύτερη περιοχή μικρότερης συγκέντρωσης των βακτηρίων, κοντά στους πυρήνες, που ίσως λόγω της θέσης της να επηρεάζει δυσανάλογα το σπέρμα, σε σχέση με τα υπόλοιπα, που βρίσκονται στην άλλη άκρη. Πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι τίποτα δεν αποκλείει το γεγονός, ότι η συγκεκριμένη κατανομή, μπορεί να είναι άσχετη με το φαινόμενο της ασυμβατότητας και το αποτύπωμα να τοποθετείται στο σπέρμα σε κάποιο από τα προηγούμενα στάδια της σπερματογένεσης, πριν τη μείωση ή ακόμα και πριν τη μίτωση.

Τι είναι αυτό που καθορίζει την κατανομή της Wolbachia στις σπερματοκύστες;

Η πλειοψηφία των βακτηρίων, που παρατηρείται στην απομακρυσμένη από τους πυρήνες πλευρά των κύστεων, ίσως να είναι το αποτέλεσμα της παθητικής απόθεσης των βακτηρίων στο σημείο αυτό, από τις μεγάλες πυρηνικές και μιτοχονδριακές μάζες, που καταλαμβάνουν την άλλη πλευρά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι τα βακτήρια συγκεντρώνονται στην τοποθεσία του συντηκώματος (fusome). Το οργανίδιο αυτό, είναι ένα δίκτυο από συνδεδεμένες ενδοκυτταρικές γέφυρες, που δημιουργείται λόγω των ανολοκλήρωτων κυτταρικών διαιρέσεων και αποτελείται από διάφορες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως ακτίνη, μυοσίνη II, ανιλίνη, Pnut, Sep1 και Sep2. Παραμένει δε, για αρκετό χρονικό διάστημα μετά τη μείωση (Hime, 1996). Παρόλο, που περαιτέρω μελέτες απαιτούνται, για να καθοριστεί η σχέση της Wolbachia με το οργανίδιο αυτό, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, δείχνουν τουλάχιστον μία χωροταξική αλληλεπίδραση.

Η Wolbachia σε ένα αναπτυσσόμενο έμβryo σχετίζεται στενά και οργανώνεται από τους μικροσωληνίσκους του ξενιστή (Callaini et al. 1994, Kose and Karr 1995). Επίσης, ο φαινότυπος της ασυμβατότητας σχετίζεται με

αποδιοργανωμένους μικροσωληνίσκους (Callaini et al. 1997, Lassy and Karr 1996). Τα αποτελέσματα αυτά κάνουν πιθανή μία σχέση των βακτηρίων με τους μικροσωληνίσκους, τόσο στη σπερματογένεση όσο και στην ασυμβατότητα. Μια τέτοια αλληλεπίδραση, θα μπορούσε να επηρεάζει τη σωστή λειτουργία του σπέρματος. Στη γονιμοποίηση της μύγας, έχει δειχθεί ότι το σπέρμα μπαίνει στο αυγό, έχοντας μαζί ολόκληρη την ουρά του (αξόνημα), η οποία παραμένει εκεί μέχρι τη εκκόλαση (Karr, 1991, Pitnick, 1998). Το αξόνημα χρειάζεται επίσης, να πάρει μία συγκεκριμένη δομή, για να προχωρήσει η ανάπτυξη σωστά (Alipaz, 2001). Είναι πιθανό ότι τα βακτήρια επηρεάζουν το αξόνημα, όταν αυτό δημιουργείται, μια και βρίσκονται στην ιδανική θέση για κάτι τέτοιο (η αύξησή του αρχίζει από την απομακρυσμένη από τους πυρήνες, πλευρά της κύστης), γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει στη μη σωστή συμπεριφορά του, στις ασύμβατες διασταυρώσεις.

Τι συμβαίνει στα άλλα στελέχη; Αξιοσημείωτες είναι οι διαφορές που παρατηρούνται στην κατανομή και στον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων ανάμεσα στα διάφορα στελέχη. Για παράδειγμα στα φυσικά μολυσμένα στελέχη της *D. melanogaster*, υπάρχουν πολύ λιγότερα βακτήρια, τα οποία παρουσιάζουν μία εμβολωματική (patchy) κατανομή κατά μήκος των σπερματοκύστεων. Το γεγονός αυτό, μπορεί να συσχετιστεί με τα μη ανιχνεύσιμα έως χαμηλά επίπεδα ασυμβατότητας, που αυτά προκαλούν (Bourtzis et al. 1996). Η αρχική και λεπτομερής περιγραφή της κατανομής της Wolbachia στα στελέχη DSR και *D. melanogaster*, πρότεινε αλλά δεν εξέτασε συστηματικά τη σημασία των αλληλεπιδράσεων παρασίτου-ξενιστή στην έκφραση της ασυμβατότητας. Η συγκριτική μελέτη μιας πληθώρας στελεχών, φυσικά και μολυσμένων στο εργαστήριο, στα οποία παρατηρούνται διαφορετικά επίπεδα ασυμβατότητας, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η βασική κυτταρική μονάδα, η οποία σχετίζεται με την ΚΑ είναι η μολυσμένη σπερματοκύστη/σπερματίδα, με ένα βακτηριακό στέλεχος, που έχει την ικανότητα να την επάγει.

Αναλυτικότερα, εξετάστηκαν εκτός από το στέλεχος DSR, μολυσμένα στο εργαστήριο με το ίδιο βακτηριακό στέλεχος wRi, οι ξενιστές *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea* και η *D. simulans* μολυσμένη με το wMel (Poinsot et al. 1998, Zabalou et al. submitted), στους οποίους παρατηρούνται υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας, το στέλεχος *D. simulans* Noumea (Mercot et al. 1995), στο οποίο παρατηρούνται ενδιάμεσα επίπεδα ασυμβατότητας, το στέλεχος *D. melanogaster* yw^{67C23} (Bourtzis et al. 1996), στο οποίο παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα

ασυμβατότητας και τέλος τα στελέχη *D. melanogaster* CS (Bourtzis et al. 1996), popcorn (Min and Benzer 1997), *D. simulans* Coffs Harbor (Hoffmann et al. 1996), *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea* μολυσμένα με wCof-like στελέχη, *D. mauritiana* και η διαμολυσμένη στο εργαστήριο *D. simulans* με το βακτήριο της *D. mauritiana* wMa (Giordano et al. 1995) και η *D. simulans* Kilimanjaro (Mercot and Poinsot 1998), στα οποία δεν παρατηρούνται ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας. Σε αυτά που παρατηρούνται ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας, υπάρχει θετική συσχέτιση αυτών και του αριθμού των πολύ μολυσμένων σπερματοκύστεων. Σε αυτά που δεν παρατηρούνται ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας, τις περισσότερες φορές οι σπερματοκύστες είναι μολυσμένες με λίγα βακτήρια, διάσπαρτα στα σωματικά κύτταρα αυτών, εκτός από δύο περιπτώσεις, όπου ενώ παρατηρούνται υψηλά ποσοστά πολύ μολυσμένων σπερματοκύστεων, δεν υπάρχει αντίστοιχη επαγωγή υψηλών επιπέδων ασυμβατότητας (στην *D. simulans* Coffs Harbor και στην *D. mauritiana*). Από τα δεδομένα αυτά βγαίνει το συμπέρασμα ότι για να επάγεται ΚΑ σε έναν ξενιστή, αυτός θα πρέπει να είναι μολυσμένος με ένα βακτηριακό στέλεχος, που έχει την ικανότητα αφενός να την επάγει (mod^+ γενότυπος) και αφετέρου να μολύνει τους όρχεις και πιο συγκεκριμένα τις σπερματίδες των σπερματοκύστεων.

Μοντέλο βακτηριακής δόσης (dosage model). Οι Breeuwer and Werren (1993) πρότειναν το λεγόμενο μοντέλο βακτηριακής δόσης, σύμφωνα με το οποίο ο αριθμός των βακτηρίων επηρεάζει την ένταση της ασυμβατότητας. Διάφορες μελέτες πρότειναν επίσης, ότι οι διαφορές στην βακτηριακή πυκνότητα είναι καθοριστικές για τα επίπεδα της ΚΑ (Bourtzis et al. 1996, Boyle et al. 1993, Giordano et al. 1995, Poinsot et al. 1998, Rousset and de Stordeur 1993, Solignac et al. 1994). Μολαταύτα, πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές στον αριθμό των βακτηρίων στους όρχεις, μπορεί να μην είναι πρωταρχικά υπεύθυνες, για τις διαφορές στα επίπεδα της ασυμβατότητας. Η βακτηριακή πυκνότητα μπορεί να παίζει ρόλο στην τροποποίηση του σπέρματος, μόνο όταν το βακτήριο έχει mod^+ γενότυπο και μολύνει τις σπερματίδες των σπερματοκύστεων. Η βακτηριακή δόση λοιπόν, είναι σημαντική εφόσον καθορίζει τον αριθμό των μολυσμένων κύστεων. Τα βακτήρια που είναι εγκατεστημένα στα σπερματικά βλαστοκύτταρα, μπορεί να καθορίζουν τον αριθμό των μολυσμένων σπερματοκύστεων, αλλά μπορεί να μην τροποποιούν το σπέρμα σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο. Έτσι, αυτό που φαίνεται να είναι σημαντικό, είναι η βακτηριακή δόση στα γαμετικά κύτταρα της κύστης. Τέτοιες διαφορές παρατηρούμε για παράδειγμα στη *D. simulans* και συγκεκριμένα στα στελέχη DSR και Noumea, οι

οποίες θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις διαφορές στα επίπεδα της ασυμβατότητας. Επίσης, διαφορές στον αριθμό των βακτηρίων μέσα στις μολυσμένες σπερματοκύστες, θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα της ασυμβατότητας σε διαφορετικά είδη, όπως για παράδειγμα μεταξύ της *D. simulans* και της *D. melanogaster*. Το μοντέλο λοιπόν βακτηριακής δόσης με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης εργασίας, μπορεί να επεκταθεί στα εξής σημεία: πρώτον, η βακτηριακή δόση στους όρχεις μίας μύγας, σχετίζεται με τον αριθμό των μολυσμένων σπερματοκύστεων και τα επίπεδα της ΚΑ και δεύτερον ο αριθμός των βακτηρίων μέσα στα γαμετικά κύτταρα, μπορεί να επηρεάζει την ένταση της τροποποίησης και κατ' επέκταση την πιθανότητα τροποποίησης. Οι Breeuwer και Weigen (1993) βρήκαν ότι σπέρμα από αρσενικά, που προέρχονταν από μερικώς θεραπευμένες μητέρες, προκαλούσε ΚΑ στις ασύμβατες διασταυρώσεις, ενώ κανονικά τα πλήρως μολυσμένα αρσενικά, θα προκαλούσαν χάσιμο των πατρικών χρωμοσωμάτων και ανάπτυξη μόνο αρσενικών ατόμων, μια και η μελέτη έγινε στις σφήκες *Nasonia*, στις οποίες υπάρχει απλοδιπλοειδία. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η ΚΑ, μπορεί να μην είναι ένα «όλα ή τίποτα» φαινόμενο και ότι η βακτηριακή δόση των γαμετοκυττάρων, μπορεί να επηρεάζει την ένταση της τροποποίησης.

Τι συμβαίνει με τα στελέχη, που δεν προκαλούν ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας; Τα στελέχη αυτά έχουν mod^+ ή mod^- γενότυπο; Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ηλικία του αρσενικού παίζει σημαντικό ρόλο για την έκφραση ασυμβατότητας (Reynolds and Hoffmann 2002) (Weeks et al. 2002). Για αυτό το λόγο, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν νεαρά αρσενικά. Μολαταύτα, στα στελέχη *D. simulans* Coffs Harbor και *D. mauritiana*, δεν παρατηρείται ασυμβατότητα, γεγονός που συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (Hoffmann et al. 1996, Reynolds and Hoffmann 2002, Giordano et al. 1995, Bourtzis et al. 1998), παρόλο που οι σπερματοκύστες τους είναι αρκετά μολυσμένες. Φαίνεται λοιπόν, ότι τα στελέχη $wCof$ και wMa , δεν έχουν την ικανότητα να προκαλούν ΚΑ (mod^- γενότυπος), ενώ μπορούν να μολύνουν αρκετά τις σπερματοκύστες των ξενιστών τους. Αξιοσημείωτο είναι ότι το στέλεχος wMa εξακολουθούσε να μην προκαλεί ασυμβατότητα και μετά από μεταφορά του στη *D. simulans* Watsonville (Giordano et al. 1995), γεγονός που επαληθεύει την ανικανότητα του βακτηρίου να την προκαλεί. Από την άλλη πλευρά στελέχη όπως το $wMelpro$ και το $wMel$, ενώ θεωρούνταν mod^- στελέχη, όταν μεταφέρθηκαν στη *D. simulans* από το φυσικό τους ξενιστή *D. melanogaster*, εξέφρασαν υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας, λόγω της αυξημένης

μόλυνσης των σπερματοκύστεων των καινούργιων ξενιστών (McGraw et al. 2001, Poinsot et al. 1998, παρούσα μελέτη). Παρομοίως, το στέλεχος *wMelCS*, παρουσίασε ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας, όταν στις διασταυρώσεις ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν νεαρά αρσενικά (Reynolds and Hoffmann 2002). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι και ο ξενιστής παίζει σημαντικό ρόλο στην τελική ρύθμιση των αριθμών του βακτηρίου στις σπερματοκύστες του, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την αδυναμία του *wMa* στελέχους να πολλαπλασιαστεί στους όρχεις της *D. simulans* ή των *wCof*-like βακτηρίων στις *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea*. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι ξενιστές, επιτρέπουν στο στέλεχος *wRi* να πολλαπλασιαστεί στους όρχεις τους, υποθέτοντας ότι το στέλεχος αυτό έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται, ανεξάρτητα από το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή, ή ότι οι ξενιστές αυτοί έχουν αναπτύξει ειδική καταστολή έναντι των συγκεκριμένων βακτηρίων. Συμπερασματικά, για να εκφράσει ένας ξενιστής από *KA*, πρέπει να είναι μολυσμένος με ένα βακτηριακό στέλεχος, που έχει την ικανότητα να την επάγει και να του επιτρέπει να πολλαπλασιάζεται στην αρσενική γαμετική σειρά του.

Πώς ρυθμίζει ο ξενιστής τα βακτηριακά επίπεδα στους όρχεις του και κατ' επέκταση τα επίπεδα της ασυμβατότητας; Εμποδίζει ο ξενιστής ενεργητικά την είσοδο των βακτηρίων στα γαμετικά κύτταρα των όρχεων ή υπάρχει μία αναπτυξιακή συνέχεια χαμηλής μόλυνσης, από την αρχή της δημιουργίας του εμβρύου; Διαφορετικοί ξενιστές ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο τις βακτηριακές μολύνσεις από διαφορετικά στελέχη, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης; Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς και οι δύο συγγενικές της (Clark 2002, 2003) δείχνουν καθαρά ότι υπάρχει ένα διαρκές παιχνίδι μεταξύ του ξενιστή και του βακτηρίου, όσον αφορά στους αριθμούς. Θεωρητικά μοντέλα (Turelli 1994) έχουν δείξει ότι ο ξενιστής αναμένεται να αναπτύξει μηχανισμούς καταστολής των *mod⁺* βακτηρίων στην αρσενική γαμετική σειρά, λόγω του κόστους της ασυμβατότητας, που πληρώνουν τα μολυσμένα αρσενικά. Η εξελικτική πίεση όμως, που ασκείται στα μολυσμένα αρσενικά από τα βακτήρια, που δεν έχουν ή έχουν χάσει την ικανότητα να προκαλούν *KA* (*mod⁻* γενότυπος) είναι διαφορετική, μια και το κόστος της ασυμβατότητας, δεν υπάρχει πια. Οι Snook et al. (2000) παρατήρησαν ότι τα μολυσμένα αρσενικά πάσχουν από παραγωγή λιγότερου σπέρματος, σε σχέση με τα μη μολυσμένα, οπότε η επιλογή αναμένεται να οδηγεί στην μείωση των επιπέδων

όλων των στελεχών, ανεξάρτητα από την ικανότητα τους να προκαλούν ασυμβατότητα.

Ονοματολογία. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η παρούσα μελέτη είναι βασισμένη στο σύστημα ονοματολογίας των στελεχών, που προτάθηκε από τον Zhou et al. (1998) και βασίζεται στο *wsp* γονίδιο της *Wolbachia*. Μελέτες έχουν δείξει όμως, ότι μια τέτοια ταξινόμηση, μπορεί να έχει περιορισμένη βιολογική σημασία, λόγω του υψηλού ρυθμού νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων και του ανασυνδυασμού (Jiggins 2002, Schulenburg et al. 2000, Werren and Bartos 2001) του γονιδίου αυτού. Παρόλα αυτά, όταν ολοκληρωθούν οι εργασίες αλληλούχισης των γονιδιωμάτων των διαφόρων στελεχών *Wolbachia*, η ανάπτυξη νέων μοριακών μαρτύρων, θα βοηθήσει σημαντικά τόσο στο ξεδιάλυμα της φυλογενετικής ιστορίας του βακτηρίου, όσο και στην πρόβλεψη των διαφορετικών φαινοτύπων. Ιδανικά, η πλήρης κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της ΚΑ, θα βοηθήσει σημαντικά στην αποκάλυψη των σχέσεων της αναπτυξιακής δυναμικής της μόλυνσης και του «παιχνιδιού» παρασίτου-ξενιστή στη ρύθμιση των αριθμών.

Ευχαριστώ τη Σοφία Ζαμπάλου και το Γιώργο Μαρκάκη για τη βοήθεια στις μετρήσεις των επιπέδων ασυμβατότητας και στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Binnington, K.C. and A.A. Hoffmann. 1989. *Wolbachia*-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 344-352.
- 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., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis. 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144: 1063-73.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango, and C. Savakis. 1994. A prokaryotic *dnaA* sequence in *Drosophila melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Mol Biol* 3: 131-42.

- Boyle, L., S. L. O'Neill, H. M. Robertson, and T. L. Karr. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Braig, H. R., W. Zhou, S. L. Dobson, and S. L. O'Neill. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 180: 2373-8.
- Breeuwer, J. A., and J. H. Werren. 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 135: 565-74.
- 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.
- Callaini, G., R. Dallai, and M. G. Riparbelli. 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *J Cell Sci* 110: 271-80.
- Callaini, G., M. G. Riparbelli, and R. Dallai. 1994. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *J Cell Sci* 107: 673-82.
- Charlat, S., L. Le Chat, and H. Mercot. 2003. Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in two continental African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* 90: 49-55.
- Clancy, D. J., and A.A. Hoffmann. 1998. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 86: 13-24.
- Dobson, S., 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 Biochemistry Molecular Biology* 29: 153-160.
- Fabrizio, J. J., G. Hime, S. K. Lemmon, and C. Bazinet. 1998. Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125: 1833-43.
- Fuller, M.T. 1993. Spermatogenesis. In: Bate, M.,Arias, A.M. (Eds.) *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 71-147

- Giordano, R., S. L. O'Neill, and H. M. Robertson. 1995. Wolbachia infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140: 1307-17.
- Hime, G.R., Brill, J. A., and Fuller, M.T. 1996. Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J. Cell Sci.* 109: 2779-2788.
- Hoffmann, A. A., D. Clancy, and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring Wolbachia infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76: 1-8.
- Hoffmann, A. A., D. J. Clancy, and E. Merton. 1994. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 136: 993-9.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons. 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* 40: 692-701.
- Holden, P. R., P. Jones, and J. F. Brookfield. 1993. Evidence for a Wolbachia symbiont in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 62: 23-9.
- Hurst, G. D., A. P. Johnson, J. H. Schulenburg, and Y. Fuyama. 2000. Male-killing Wolbachia in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics* 156: 699-709.
- James, A. C., and J. W. Ballard. 2000. Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. *Evolution Int J Org Evolution* 54: 1661-72.
- Jiggins, F. M. 2002. The rate of recombination in wolbachia bacteria. *Mol Biol Evol* 19: 1640-3.
- Karr, T. L., W. Yang, and M. E. Feder. 1998. Overcoming cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 391-5.
- 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.
- 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.

- McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill. 2001. Wolbachia-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 2565-70.
- McGraw, E. A., Merritt, D. J., Droller, J. N. and O'Neill, S. L.. 2002. Wolbachia density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2918-23.
- Mercot, 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.
- Mercot, H., and D. Poinso. 1998. ... and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* 391: 853.
- 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 U S A* 94: 10792-6.
- Noda, H., Y. Koizumi, Q. Zhang, and K. Deng. 2001. Infection density of Wolbachia and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 727-37.
- Olivieri, G., and A. Olivieri. 1965. Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 2: 366-380.
- 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 U S A* 89: 2699-702.
- O'Neill, S. L. and T. L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- Poinso, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. Wolbachia transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-37.
- Reynolds, K. T., and A. A. Hoffmann. 2002. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted Wolbachia. *Genet Res* 80: 79-87.
- Rousset, F., and E. de Stordeur. 1993. Properties of *Drosophila simulans* strains experimentally infected by different clones of the bacterium Wolbachia. *Heredity* 72: 325-331.

- Schulenburg, J. H., G. D. Hurst, T. M. Huigens, M. M. van Meer, F. M. Jiggins, and M. E. Majerus. 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Mol Biol Evol* 17: 584-600.
- Sinkins, S. P., H. R. Braig, and S. L. O'Neill. 1995. *Wolbachia pipientis*: bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus*. *Exp Parasitol* 81: 284-91.
- Snook, R. R., S. Y. Cleland, M. F. Wolfner, and T. L. Karr. 2000. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. *Genetics* 155: 167-78.
- Solignac, M., D. Vautrin, and F. Rousset. 1994. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 317: 461-470.
- Tram, U., and W. Sullivan. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*- induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124-6.
- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* 48: 1500-1513.
- Turelli, M., and A. A. Hoffmann. 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140: 1319-38.
- Weeks, A. R., Reynolds, K. T., and A. A Hoffmann. 2002. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Ecol Evol* 17: 257-262.
- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42: 587-609.
- Werren, J. H., and J. D. Bartos. 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Curr Biol* 11: 431-5.
- Zabalou, S., Charlat, S., Nirgianaki, A., Lachaise, D., Merçot H., and K., Bourtzis. 2003. Natural *Wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the *wRi* modification. Submitted in *Genetics*.

- Zchori-Fein, E., Y. Gottlieb, and M. Coll. 2000. Wolbachia density and host fitness components in *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: pteromalidae). *J Invertebr Pathol* 75: 267-72.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-15.

5 Κατανομή και πολλαπλασιασμός της *Wolbachia* κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και εμβρυογένεσης της *Drosophila*

Τα βακτήρια *Wolbachia* χρησιμοποιούν διάφορες στρατηγικές και χειρίζονται επιδέξια το αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων, για να εξασφαλίζουν τη πολυπλόθητη μετάδοσή τους στην επόμενη γενιά. Επειδή κληρονομούνται μητρικά είχε προταθεί στο παρελθόν, η άμεση στόχευσή τους στα γαμετικά κύτταρα των ξενιστών. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι τα διάφορα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν διαφορετική συγγένεια για τη γαμετική σειρά της μύγας. Πιο συγκεκριμένα, τα βακτήρια είτε κατανέμονται ομοιόμορφα στο φλοιό του αυγού, είτε συγκεντρώνονται στον ένα από τους δύο πόλους. Το πρότυπο κατανομής τους εγκαθιδρύεται, πολύ νωρίς στην ανάπτυξη, όταν αρχίζει να σχηματίζεται το ωοκύτταρο και παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η προσθιοπίσθια κατανομή των βακτηρίων, μοιάζει πολύ με αυτή των μητρικών mRNAs που καθορίζουν τον προσθιοπίσθιο άξονα των αυγών. Συγκρίνοντας την κατανομή και τον αριθμό των βακτηρίων σε διάφορα στελέχη, φυσικά μολυσμένα και μολυσμένα στο εργαστήριο, βγαίνει το συμπέρασμα, ότι η κατανομή των βακτηρίων καθορίζεται από βακτηριακούς παράγοντες, ενώ ο ξενιστής ρυθμίζει τα βακτηριακό φορτίο.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Wolbachia* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο, που βρίσκεται σε αρθρόποδα και νηματώδεις, το οποίο χρησιμοποιεί διάφορες στρατηγικές, για να τροποποιεί το αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών της και να εξασφαλίζει τη μητρική της μετάδοση (Stouthamer et al. 1999). Επειδή η *Wolbachia* κληρονομείται μητρικά, είχε προταθεί στο παρελθόν, ότι αυτό το μικρόβιο έχει αναπτύξει μηχανισμούς, που στοχεύουν ειδικά στα γαμετικά κύτταρα του ξενιστή, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Hadfield and Axton 1999).

Ένας από τους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους που η *Wolbachia* προκαλεί στους ξενιστές της είναι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, μια μορφή εμβρυϊκής θνησιμότητας σε διασταυρώσεις μολυσμένων αρσενικών με μη μολυσμένα θηλυκά. Οι διασταυρώσεις μολυσμένων αρσενικών με μολυσμένα θηλυκά δεν επηρεάζονται, οπότε είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι το σπέρμα των μολυσμένων αρσενικών υποφέρει από μια τροποποίηση (modification), η οποία εξουδετερώνεται από τα βακτήρια που υπάρχουν στο αυγό (rescue). Στη *Drosophila* έχουν βρεθεί μέχρι

στιγμής τρεις τύποι *Wolbachia* που σχετίζονται με ασυμβατότητα: στελέχη που είναι ικανά να τροποποιούν το σπέρμα και να σώζουν την τροποποίηση στα αυγά (mod+resc+), στελέχη που ούτε εκφράζουν ούτε σώζουν την τροποποίηση (mod-rec-) και στελέχη τέλος που δεν τροποποιούν, αλλά διασώζουν την τροποποίηση που επάγουν συγγενικά τους στελέχη (Bourtzis et al. 1998, Mercot and Poinsot 1998). Έμβρυα και από τις τρεις κατηγορίες εξετάστηκαν για να διαπιστωθεί αν οι φαινότυποι αυτοί σχετίζονται με την συμπεριφορά των βακτηρίων στη γαμετική σειρά.

Στο προηγούμενο κεφάλαιο περιγράφηκε η εξαιρετική ποικιλομορφία στο φορτίο και στην κατανομή των βακτηρίων, τόσο ανάμεσα στους όρχεις διαφόρων στελεχών, όσο και στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της ωρίμανσης του σπέρματος ενός αρσενικού. Η ποικιλομορφία αυτή μπορεί να συσχετιστεί με τα διαφορετικά επίπεδα ασυμβατότητας και οφείλεται τόσο σε βακτηριακούς, όσο και σε παράγοντες του ξενιστή. Συγκρίνοντας για παράδειγμα, την ανάπτυξη των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης της *D. simulans*, στην οποία παρατηρούνται υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας με τη *D. melanogaster*, η οποία συνήθως δεν εκφράζει ασυμβατότητα, αποκαλύφθηκε μια σημαντική διαφορά. Στη *D. simulans* ο αριθμός των βακτηρίων είναι σημαντικά υψηλότερος από αυτόν της *D. melanogaster* καθ' όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης θα μπορούσαν να οφείλονται, σε διαφορές που έχουν εγκαθιδρυθεί νωρίτερα στην ανάπτυξη (π.χ. κατά το σχηματισμό των πολικών κυττάρων), στον ενεργητικό αποκλεισμό των βακτηρίων από τους όρχεις, στον διαφορετικό ρυθμό πολλαπλασιασμού των βακτηρίων στους όρχεις των προνυμφών ή τέλος στο συνδυασμό των παραπάνω.

Ακολουθώντας αυτή τη λογική το βακτήριο παρατηρήθηκε από τα πρώιμα στάδια της ωογένεσης μέχρι την όψιμη εμβρυογένεση της Δροσόφιλας. Συγκρίνοντας τη συμπεριφορά του βακτηρίου σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα ξενιστή και τη συμπεριφορά διαφόρων στελεχών του βακτηρίου στο ίδιο είδος ξενιστή, βγαίνει το συμπέρασμα ότι η ενώ η βακτηριακή κατανομή καθορίζεται από παράγοντες του βακτηρίου, οι αριθμοί αυτών περιορίζονται από τον ξενιστή. Από εξελικτική σκοπιά φαίνεται ότι το βακτήριο εξελίσσεται στο να προκαλεί χαμηλότερα επίπεδα ασυμβατότητας, εφόσον έχει εξασφαλίσει τη μετάδοσή του.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στελέχη μυγών και βακτηρίων. Τα στελέχη των βακτηρίων και οι αντίστοιχοι ξενιστές τους αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4. Η ονοματολογία είναι βάσει του Zhou et al. (1998). Τα επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, είναι με βάση προηγούμενες γενετικές μελέτες (βλ. Κεφάλαιο 4).

Ανοσοϊστοχημεία εμβρύων. Έμβρυα από μηδέν έως πέντε ωρών συλλέγονταν από μύγες, οι οποίες αφήνονταν να γεννήσουν τα αυγά τους σε μικρά πιατάκια, που περιείχαν χυμό μήλου και άγαρ (βλ. Κεφάλαιο 2 για λεπτομέρειες). Μετά τη αποχοριοποίηση ακολουθούσε ξέπλυμα των αυγών με Triton wash solution, απομάκρυνση των βιττελινικών μεμβρανών και μονιμοποίηση των εμβρύων με ισχυρή ανάδευση σε γυάλινα δοχεία που περιείχαν ίσο όγκο μεθανόλης και επτανίου. Μετά από συνεχόμενα ξεπλύματα με μεθανόλη, ακολουθούσε επαναενυδάτωση των εμβρύων με TBST και μπλοκάρισμα σε 1% BSA. Στη συνέχεια τα έμβρυα επωάζονταν με αντί-WSP αντίσωμα όλη νύχτα σε 4⁰C. Την άλλη μέρα τα έμβρυα ξεπλένονταν με TBST και επωάζονταν με FITCH-σημασμένο goat anti-rabbit αντίσωμα (Molecular Probes) και RNAase A (2mg/ml) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το ξέπλυμα των εμβρύων ακολουθούσε χρώση των πυρήνων με DAPI (4', 6-διάμινο,-2-φαινυλινδόλη) για 3 λεπτά, γρήγορο ξέπλυμα και προσθήκη Propidium Iodide (Molecular Probes) για 20 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του προπιδίου ακολουθούσε γρήγορο ξέπλυμα, προσθήκη μίας σταγόνας από ProLong antifading mounting medium (Molecular Probes), τοποθέτηση των εμβρύων σε αντικειμενοφόρους και κλείσιμο αυτών με καλυπτρίδες.

Ανοσοϊστοχημεία ωοθηκών. Οι ωοθήκες αφαιρούνταν προσεκτικά από τις μύγες με τα κατάλληλα εργαλεία ανατομίας και μεταφέρονταν με μία σταγόνα TBST πάνω σε αντικειμενοφόρους, όπου οι ιστοί επεξεργάζονταν περαιτέρω με βελόνες διαμέτρου 1mm, ώστε να εκτίθενται τα διάφορα στάδια γαμετικά κύτταρα. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι καλύπτονταν με καλυπτρίδες και βυθίζονταν σε υγρό άζωτο για να παγώσουν. Μετά την προσεκτική απομάκρυνση της καλυπτρίδας με νυστέρι, οι αντικειμενοφόροι βυθίζονταν σε παγωμένη αιθανόλη για 3 λεπτά και στη συνέχεια σε 4% παραφορμαλδεύδη για 12 λεπτά, για να μονιμοποιηθούν. Ακολουθούσαν ξεπλύματα με TBST, μπλοκάρισμα με 1% BSA και επώαση όλη νύχτα στους 4⁰C με αντί-WSP αντίσωμα σε αραιώση 1:500. Την επόμενη μέρα οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονταν με TBST και επωάζονταν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με

FITCH-σημασμένο goat anti-rabbit αντίσωμα (Molecular Probes) και RNAase A (2mg/ml). Ακολουθούσε χρώση των πυρήνων με DAPI (4', 6-διάμινο,-2-φαινυλινδόλη) για 3 λεπτά και Propidium Iodide για 20 λεπτά. Μετά από ένα γρήγορο ξέπλυμα, την τοποθέτηση μιας σταγόνας ProLong antifading mounting medium (Molecular Probes) και το τελικό κλείσιμο με καλυπτρίδα και βερνίκι νυχιών οι αντικειμενοφόροι ήταν έτοιμοι για παρατήρηση.

Συνεστιακή μικροσκοπία. Τα βακτήρια και οι πυρήνες γίνονταν ορατά με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου Leica TCS-NT, με το λέιζερ κρυπτού/αργού (488nm) για την ανίχνευση της *Wolbachia* και αυτό του ηλίου/νέον (543nm) για την ανίχνευση των νουκλεϊνικών οξέων. Επικαλυπτόμενες οπτικές τομές γίνονταν κατά μήκος του Z άξονα, ώστε να καλύπτεται όλο το βάθος του ιστού. Οι τομές αυτές προβάλλονταν σε μία τελική εικόνα. Η τελική επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Photoshop 6.0 (Adobe).

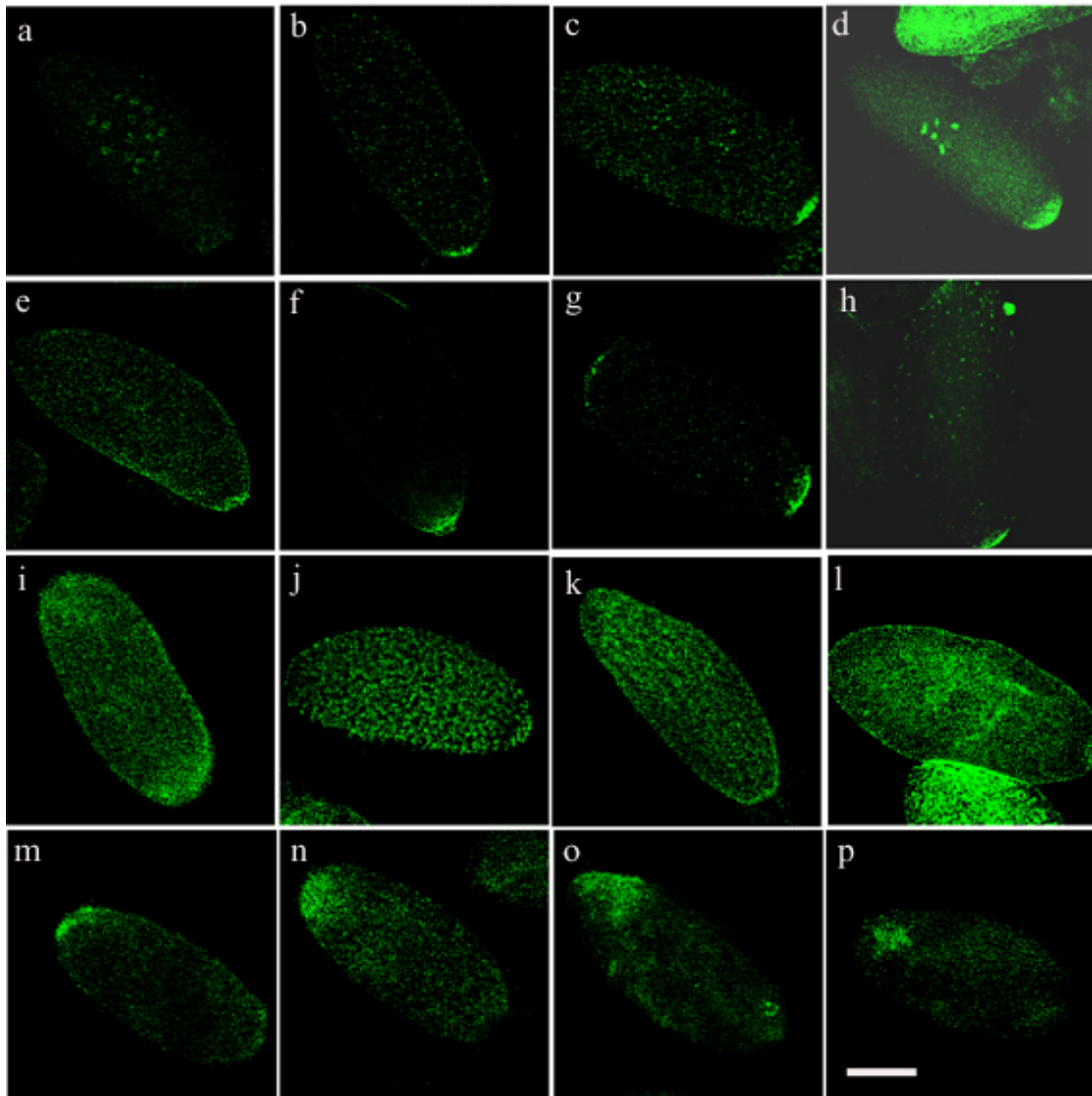
Ποσοτικοποίηση των βακτηρίων. Από κάθε στέλεχος φωτογραφήθηκαν 15 πρώιμα έμβρυα, από το στάδιο των δύο πυρήνων μέχρι το στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος. Για κάθε αυγό έγιναν 20 οπτικές τομές κατά μήκος του Z άξονα πάχους 1 μm . Τα αυγά είχαν πάχος κατά μέσο όρο 20 μm . Στη συνέχεια οι τομές προβλήθηκαν σε μία εικόνα και οι εικόνες αυτές επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Scion Image. Για κάθε αυγό μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων (φθορίζοντα τετραγωνικά pixels), καθώς και οι αριθμοί στο εμπρόσθιο και στο οπίσθιο τμήμα αντίστοιχα. Το συνολικό εμβαδόν των αυγών κυμαίνονταν κατά μέσο όρο γύρω από τα 400.000 τετραγωνικά pixels και μετρούνταν περίπου το 1/10 του συνολικού εμβαδού, στο εμπρόσθιο και στο οπίσθιο τμήμα αντίστοιχα. Αν σκεφτεί κανείς ότι το μέγεθος του pixel είναι 0.5X0.5 μm και η διάμετρος της *Wolbachia* 0.5-1 μm , είναι λογικό να υποθέσει, ότι ο αριθμός των φθορίζόντων pixels, αποτελεί μία πολύ καλή εκτίμηση του αριθμού των βακτηρίων.

Στατιστική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS (version 11). Οι μέσες τιμές των βακτηρίων στον οπίσθιο πόλο των αυγών μετασχηματίστηκαν με την τετραγωνική τους ρίζα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βακτηριακό φορτίο. Ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία έλαβε χώρα για διάφορα στελέχη μολυσμένα με *Wolbachia*, χρησιμοποιώντας το ειδικό για τη *Wolbachia* WSP αντίσωμα (Dobson et al. 1999). Η ανάλυση αυτή αποκάλυψε σημαντικές ποσοτικές διαφορές, τόσο μεταξύ των αυγών του ίδιου στελέχους, όσο και μεταξύ των στελεχών. Επιπρόσθετα, διαπίστωσε την ύπαρξη διαφορών στον αριθμό των βακτηρίων στις διαφορετικές περιοχές του κάθε αυγού. Ένα αντιπροσωπευτικό αυγό από το κάθε στέλεχος, φαίνεται στην εικόνα 1. Οι αριθμοί που εκτιμήθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά για κάθε στέλεχος παρατίθενται στον πίνακα 1.

Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των βακτηρίων στα πολικά κύτταρα και του ποσοστού των μολυσμένων σπερματοκύστεων; Η στατιστική ανάλυση (παλινδρόμηση, regression), έδειξε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των βακτηρίων, που εντοπίζονται στον οπίσθιο πόλο του αυγού και του ποσοστού μολυσμένων σπερματοκύστεων (βλ. Κεφάλαιο 5) ($R^2=0.349$, $F=7.507$, $P=0.016$). Η συσχέτιση απεικονίζεται γραφικά στην εικόνα 2. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι διαφορές, οι οποίες παρατηρούνται στα επίπεδα των βακτηρίων στην αρσενική γαμετική σειρά ξεκινούν από νωρίς στην ανάπτυξη, με κάποιες εξαιρέσεις, οι οποίες συζητούνται παρακάτω, καθώς και στο επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 1. Πυκνότητα και κατανομή της *Wolbachia* στα στελέχη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη. (α) *D. melanogaster* yw^{67C23}, (β) *D. melanogaster* CS, (γ) *D. melanogaster* porcorn, (δ) *D. simulans* διαμολυσμένη με wMel, (ε) *D. simulans* Coffs Harbour, (ς) *D. yakuba* φυσικά μολυσμένη, (ζ) *D. teissieri* φυσικά μολυσμένη, (η) *D. santomea* φυσικά μολυσμένη, (θ) *D. simulans* Riverside, (ι) *D. yakuba* διαμολυσμένη με το στέλεχος wRi, (κ) *D. teissieri* διαμολυσμένη με το στέλεχος wRi, (λ) *D. santomea* διαμολυσμένη με το στέλεχος wRi, (μ) *D. simulans* Noumea, (ν) *D. simulans* Watsonville διαμολυσμένη με το στέλεχος wMa, (ξ) *D. mauritiana* φυσικά μολυσμένη, (ο) *D. simulans* Kilimanjaro. Τα αυγά είναι προσανατολισμένα με τον εμπρόθιο πόλο προς τα αριστερά. Μπάρα, 100μm.

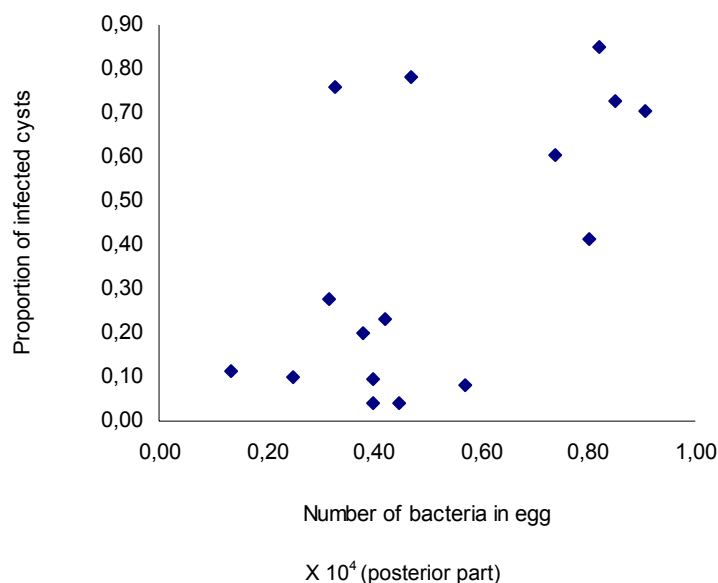
Πίνακας 1. Ποσοτικοποίηση της *Wolbachia* σε αυγά *Drosophila*

Host species	Strain	Wolbachia ^a	Wolbachia numbers in eggs ^b		
			whole	posterior	anterior
<i>D. melanogaster</i>	yw ^{67C23}	wMel	1,65±0,45	0,13±0,07	0,05±0,02
<i>D. melanogaster</i>	Canton-S	wMelCS	2,35±1,25	0,24±0,09	0,09±0,06
<i>D. melanogaster</i>	popcorn	wMelPop	3,75±2,06	0,44±0,25	0,18±0,16
<i>D. simulans</i>	NhaTC*	wMel	4,84±2,38	0,84±0,38	0,20±0,26
<i>D. simulans</i>	Coffs Harbour	wCof	5,84±3,12	0,47±0,25	0,36±0,30
<i>D. yakuba</i>	SA3, Africa	wCof	1,16±1,20	0,40±0,37	0,09±0,11
<i>D. teissieri</i>	Bloomington # 1015	wCof	1,21±0,61	0,57±0,39	0,08±0,08
<i>D. santomea</i>	STO9, Africa	wCof	1,19±0,57	0,40±0,17	0,09±0,06
<i>D. simulans</i>	Riverside	wRi	9,74±4,34	0,82±0,38	0,69±0,41
<i>D. yakuba</i>	SA3T*	wRi	10,36±3,34	0,73±0,36	0,64±0,25
<i>D. teissieri</i>	Bloomington #1015T*	wRi	11,06±4,01	0,80±0,40	0,75±0,42
<i>D. santomea</i>	STO9T*	wRi	10,60±6,45	0,90±0,51	0,85±0,69
<i>D. simulans</i>	Noumea	wNo	4,13±2,20	0,31±0,25	0,92±0,57
<i>D. simulans</i>	Watsonville*	wMa	6,12±2,32	0,42±0,27	1,03±0,62
<i>D. mauritiana</i>	Bloomington # 31	wMa	5,15±3,69	0,32±0,24	1,14±0,84
<i>D. simulans</i>	Kilimanjaro	wKi	3,03±1,13	0,38±0,30	0,69±0,41

^a based on *wsp* gene sequences

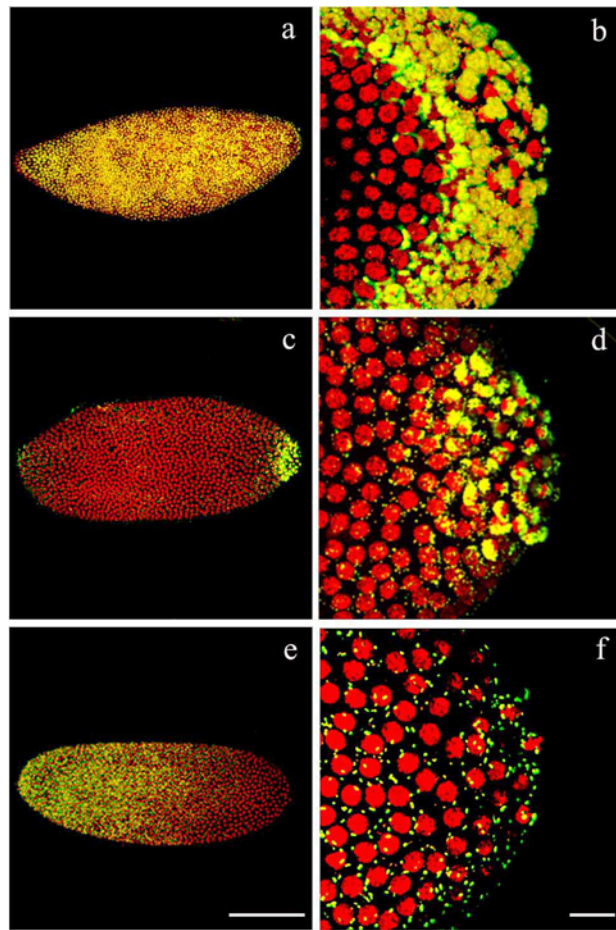
^b bacterial density in 15 early eggs of each strain (mean ± s.d. X 10⁴)

*: transinfected strains

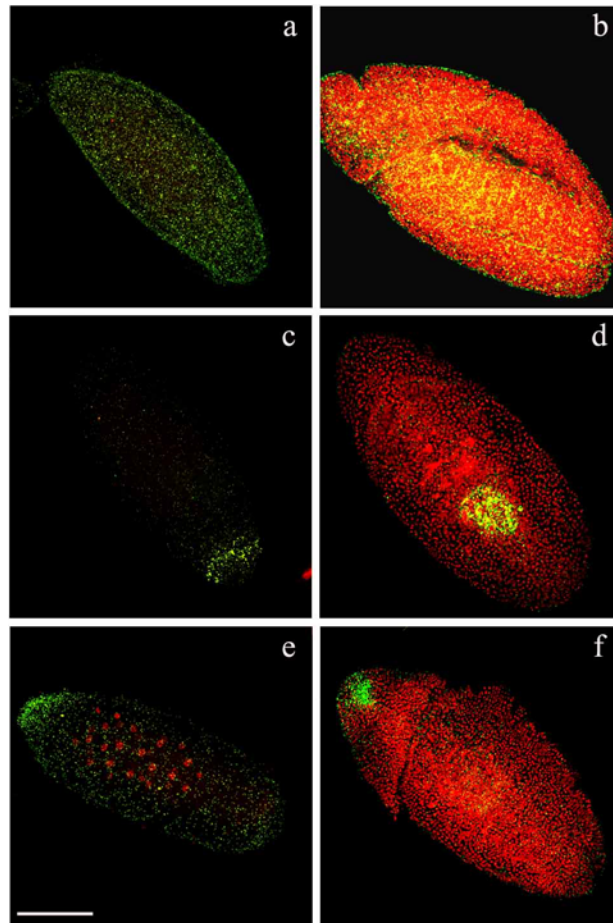


Εικόνα 2. Διάγραμμα, το οποίο δείχνει τη θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των βακτηρίων στον οπίσθιο πόλο του αυγού, όπου εντοπίζονται τα πολικά κύτταρα και του ποσοστού των μολυσμένων σπερματοκύστεων.

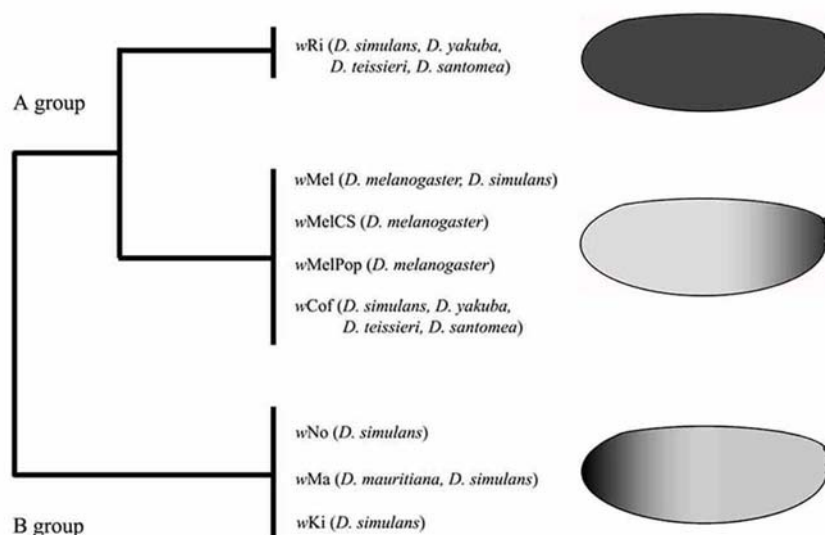
Η κατανομή της *Wolbachia* στην εμβρυογένεση. Από την παρατήρηση με το συνεστιακό μικροσκόπιο και τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι τα *wRi* βακτήρια ήταν ομοιόμορφα εξαπλωμένα στο φλοιό του αυγού, τα *wMel* και τα *wCof* βακτήρια ήταν περισσότερα στον οπίσθιο πόλο του αυγού, όπου σχηματίζονται τα πολικά κύτταρα, τα οποία είναι οι πρόγονοι της κυτταρικής σειράς (Εικ. 3). Τα αυγά τέλος, που ήταν μολυσμένα με τα στελέχη *wNo*, *wMa* και *wKi*, παρουσίασαν μία εντελώς διαφορετική εικόνα έχοντας περισσότερα βακτήρια στον εμπρόσθιο πόλο του αυγού. Αυτή η κατανομή παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, από τα πολύ πρώιμα στάδια μέχρι και μετά τη γαστριδίωση (Εικ. 4), υποθέτοντας την απουσία κίνησης ή της επιλεκτικής κυτταρικής διαίρεσης. Η κατανομή της *Wolbachia* δεν αλλάζει όταν ένα στέλεχος μεταφερθεί με κυτταροπλασματικές ενέσεις σε έναν άλλο ξενιστή, αφήνοντας να εννοηθεί ότι εξαρτάται από βακτηριακούς παράγοντες. Από την άλλη πλευρά η βακτηριακή πυκνότητα εξαρτάται και από τον ξενιστή, μια και για παράδειγμα το *wMel* πολλαπλασιάζεται περισσότερο αν μεταφερθεί στη *D. simulans*, γεγονός που συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (Boyle et al. 1993, McGraw et al. 2002, Poinsot et al. 1998). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην εικόνα 5.



Εικόνα 3. Η κατανομή της *Wolbachia* σε έμβρυα *Drosophila*, στο στάδιο του συγκυτιακού βλαστοδέρματος (μιτωτικοί κύκλοι 10-13). a, *D. simulans* αυγό φυσικά μολυσμένο με *wRi* βακτήρια. b, Μεγεθυμένο το πίσω μέρος του αυγού, όπου σχηματίζονται τα πολικά κύτταρα. c, Βακτήρια του *wCof-like* στελέχους συγκεντρώνονται κυρίως στο πίσω μέρος ενός *D. teissieri* αυγού. d, το πολικό πλάσμα συγκεντρώνει τα περισσότερα βακτήρια σε σχέση με το υπόλοιπο αυγό. e, Σε ένα *D. simulans* αυγό διαμολυσμένο με το *wMa* στέλεχος, τα περισσότερα αυγά είναι συγκεντρωμένα στο εμπρόσθιο τμήμα του αυγού. f, Λίγα βακτήρια είναι διάσπαρτα στο πολικό πλάσμα. Τα βακτήρια φαίνονται κιτρινοπράσινα, ενώ οι πυρήνες του αυγού κόκκινοι. Τα αυγά είναι προσανατολισμένα με το εμπρόσθιο μέρος αριστερά. Μπάρες: a, c, e, 100μm; b, d, f, 20μm.



Εικόνα 4. Η κατανομή της *Wolbachia* είναι συντηρημένη κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης . a, Τα wRi βακτήρια είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε ένα διαμολυσμένο *D. simulans* μη γονιμοποιημένο αυγό. b, το πρότυπο κατανομής παραμένει το ίδιο και μετά τη γαστριδίωση. c, τα wCof-like βακτήρια είναι συγκεντρωμένα στο πολικό πλάσμα σε ένα φυσικά μολυσμένο *D. teissieri* μη γονιμοποιημένο αυγό. d, Βακτήρια του ίδιου στελέχους μεταναστεύουν μαζί με τα πολικά κύτταρα στο εσωτερικό του αυγού, όπου μετέπειτα θα σχηματιστούν οι γονάδες e, Ένα *D. simulans* αυγό μολυσμένο με το στέλεχος wKι σε προβλαστοδερμικό στάδιο (μιτωτικός κύκλος 6), όπου τα βακτήρια είναι περισσότερα στο εμπρόσθιο τμήμα. f, Ένα όψιμο αυγό του ίδιου στελέχους, με αρκετά βακτήρια στο μελλοντικό κεφάλι. Τα αυγά είναι προσανατολισμένα με το εμπρόσθιο τμήμα (μελλοντικό κεφάλι) προς τα αριστερά. Μπάρα, 100μm.



Εικόνα 5. Φυλογένεια του βακτηρίου βασισμένη στις αλληλουχίες του *wsp* γονιδίου και βακτηριακή κατανομή. Παρουσιάζονται τα στελέχη της *Wolbachia* και οι ξενιστές που αναλύθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Τα wRi βακτήρια είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στο φλοιό του αυγού, ενώ τα wMel και wCof βακτήρια είναι συγκεντρωμένα στο οπίσθιο μέρος, όπου εντοπίζονται τα πολικά κύτταρα. Τα βακτήρια, τα οποία ανήκουν στη B ομάδα, συγκεντρώνονται στο εμπρόσθιο τμήμα. Η συμπεριφορά του βακτηρίου δεν αλλάζει, αν μεταφερθεί με κυτταροπλασματικές ενέσεις σε έναν άλλο ξενιστή.

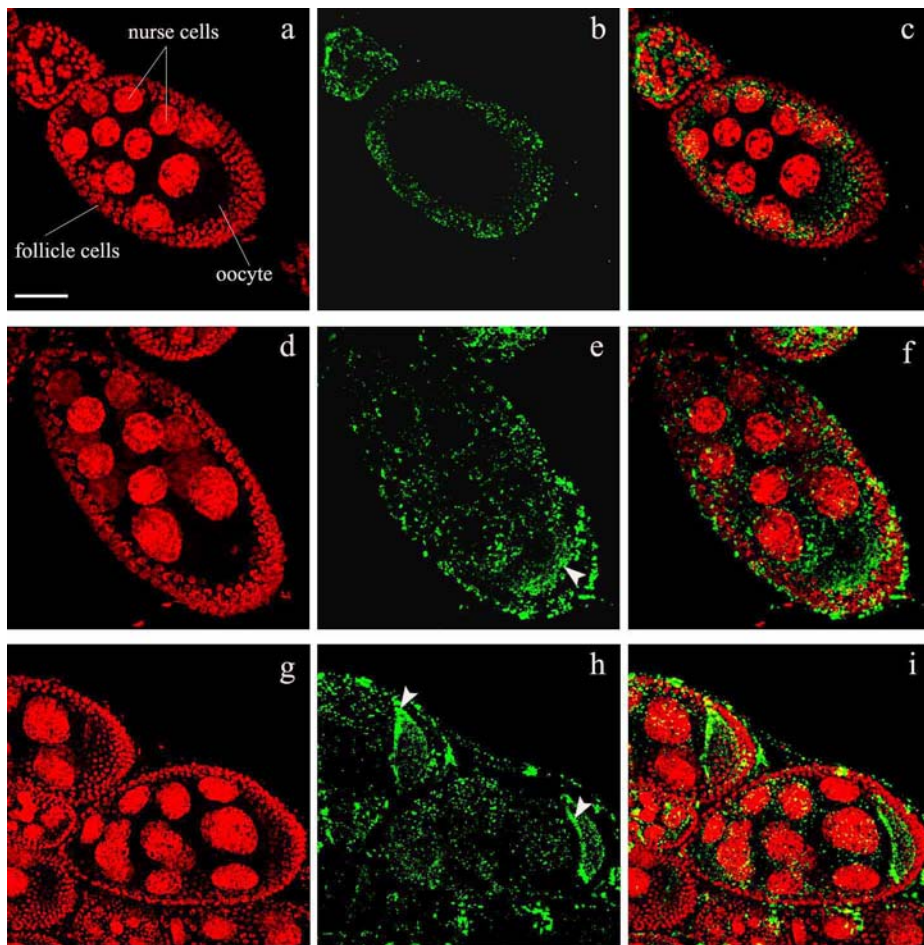
Η φυλογένεση της *Wolbachia* και η κατανομή της. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η συγκέντρωση της *Wolbachia* στα γαμετικά κύτταρα της μύγας, είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία, για τη *D. melanogaster* CS (Hadfield and Axton 1999), τη σφήκα *Nasonia* (Breeuwer and Werren 1990), μερικά είδη *Trichogramma* (Stouthamer 1993) και την *Aphytis* (Zchori-Fein et al. 1998), τα οποία είναι μολυσμένα και με βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στην A ομάδα των βακτηρίων. Η *D. simulans* Riverside επιδεικνύει μία ομοιόμορφη κατανομή στο φλοιό του αυγού, όπως είχαν παρατηρήσει επίσης οι (Boyle et al. 1993, O'Neill and Karr 1990). Επιπρόσθετα, όταν τα wRi βακτήρια μεταφέρθηκαν στη *D. melanogaster* ενώ έπεσαν οι αριθμοί, η κατανομή παρέμεινε η ίδια, υπονοώντας ότι η βακτηριακή πυκνότητα είναι υπό τον έλεγχο του ξενιστή, ενώ η κατανομή καθορίζεται από το βακτηριακό στέλεχος (Boyle et al. 1993). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το κουνούπι *Aedes polynesiensis*, το οποίο είναι μολυσμένο με βακτήρια που ανήκουν στη B ομάδα, παρουσιάζει συγκέντρωση αυτών στην εμπρόσθια πλευρά του αυγού (Wright 1981), δίπλα στη μικροπύλη από όπου εισέρχεται το σπέρμα, όπως και στα υπόλοιπα

στελέχη αυτής της ομάδας που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Η κατάταξη της *Wolbachia* των αρθροπόδων στις ομάδες A και B, είναι βασισμένη στην αλληλουχία του *wsp* γονιδίου. Φαίνεται ότι η αυτή φυλογένεια μπορεί να προβλέψει τη βακτηριακή κατανομή. Θα ήταν άξιο έρευνας εάν αυτή η βακτηριακή κατανομή εξαρτάται από το *wsp* γονίδιο, μια και η συγκεκριμένη φυλογένεια είναι βασισμένη κυρίως σε αυτό.

Χωρικές διαφορές και διάσωση. Η βακτηριακή κατανομή και πυκνότητα στο αυγό θα μπορούσε να σχετίζεται απευθείας με την ικανότητα ενός βακτηρίου να σώζει το φαινότυπο της ασυμβατότητας, μόνο που η συσχέτιση αυτή δεν έχει εξεταστεί συστηματικά ακόμη. Αν σκεφτεί κανείς ότι το σπέρμα εισέρχεται στο αυγό από μία μικροπύλη που βρίσκεται στο εμπρόσθιο μέρος του αυγού, τότε η *Wolbachia* θα μπορούσε να ασκεί τη δράση της διάσωσης της τροποποίησης του σπέρματος στην εγγύς περιοχή. Κατά αυτόν τον τρόπο, χωρικές διαφορές στους αριθμούς των βακτηρίων θα μπορούσαν να παίζουν ρόλο στο μηχανισμό της διάσωσης της ασυμβατότητας.

Η *Wolbachia* κατά τη διάρκεια της ωογένεσης. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα η κατανομή της *Wolbachia* στα αυγά της μύγας να καθορίζεται μητρικά, εξετάστηκαν ωοθήκες από τα μολυσμένα στελέχη, με τη βοήθεια συνεστιακής μικροσκοπίας. Όπως δείχνεται στην εικόνα 6, τα βακτήρια ήταν άφθονα στις ωοθήκες των μυγών, ειδικά των πρώιμων σταδίων (στάδια 4-6). Σε αυτά τα στάδια λεπτομερείς περιγραφές ήταν αδύνατες λόγω του πυκνού πακεταρίσματος των βακτηρίων. Για αυτό το λόγο ακολούθησε εστίαση στα στάδια 8-11, όπου τα βακτήρια ήταν εξαπλωμένα, πιθανά λόγω απουσίας βακτηριακού πολλαπλασιασμού με αντίστοιχη αύξηση του κυτταρικού όγκου. Μετά από αυτά τα στάδια το βακτήριο ήταν αδύνατο να παρακολουθηθεί και πάλι, μια και ο σχηματισμός της βιτελλινικής μεμβράνης, εμπόδιζε την είσοδο του αντισώματος στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα. Τα *wRi* βακτήρια ήταν κατανεμημένα κυρίως σε ένα λεπτό στρώμα, κάτω από τα θυλακοκύτταρα, τα οποία καλύπτουν το αυγό, ενώ απουσίαζαν σχεδόν από τη μέση του, όπου βρίσκονται τα τροφοκύτταρα. Τα *wMel* και τα *wCof* βακτήρια ήταν παρόντα, τόσο γύρω από τα θυλακοκύτταρα, όσο και γύρω από τα τροφοκύτταρα. Επίσης παρατηρήθηκε μία συγκέντρωση αυτών στο πίσω μέρος του σχηματιζόμενου ωοκυττάρου, όπου αρχίζει να σχηματίζεται το πολικό πλάσμα. Τέλος τα βακτήρια *wNo*, *wMa* και *wKi*, ήταν διάσπαρτα και αυτά γύρω από τα τροφοκύτταρα και τα θυλακοκύτταρα, αλλά στο σχηματιζόμενο ωοκύτταρο, συγκεντρώνονταν στην

εμπρόσθια παρυφή. Κατά αυτόν τον τρόπο, η ανάλυση αυτή δείχνει καθαρά ότι η κατανομή της *Wolbachia*, κατά την ανάπτυξη της Δροσόφιλας, καθορίζεται όχι αργότερα από τα στάδια 8-10 της ωογένεσης και παραμένει η ίδια μέχρι τα τελευταία στάδια της εμβρυογένεσης. Όσον αφορά στη βακτηριακή ποσότητα, η *Wolbachia* φαίνεται να πολλαπλασιάζεται αρκετά στα αρχικά στάδια της ωογένεσης, σταματά με το που αρχίζει η βιτελλογένεση και μάλλον ξαναρχίζει με χαμηλό ρυθμό, πριν την εναπόθεση των αυγών.



Εικόνα 6. Η κατανομή της *Wolbachia* εγκαθιδρύεται κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, όταν αρχίζει να σχηματίζεται το ωοκύτταρο (στάδια 8-10). a-c, Τα *w*Ri βακτήρια (πράσινα) συγκεντρώνονται στην κάτω πλευρά των θυλακοκυττάρων but they και όχι γύρω από τα τροφοκύτταρα κατά τη διάρκεια της ωογένεσης της *D. simulans*. d-f, Τα *w*Mel βακτήρια είναι διάσπαρτα τόσο γύρω από τα θυλακοκύτταρα, όσο και από τα τροφοκύτταρα και συγκεντρώνονται στο οπίσθιο τμήμα του αναπτυσσόμενου ωοκυττάρου, κατά τη διάρκεια της ωογένεσης της *D. melanogaster* (βέλος). g-i, Τα *w*No βακτήρια ενώ παρουσιάζουν την ίδια κατανομή όσον αφορά τα θυλακοκύτταρα και τα τροφοκύτταρα, συγκεντρώνονται στο εμπρόσθιο τμήμα του αναπτυσσόμενου ωοκυττάρου (βέλη), κατά τη διάρκεια της ωογένεσης της *D. simulans*. Μπάρα, 30μm.

Wolbachia: εναλλακτικό φορτίο για τον κυτταροσκελετό; Η αναγνώριση των παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την συγκέντρωση των βακτηρίων ομοιόμορφα στο φλοιό, στον εμπρόσθιο ή στον οπίσθιο πόλο του αυγού, θα βοηθούσε σημαντικά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων παρασίτου-ξενιστή. Εντυπωσιακή είναι η ομοιότητα που δείχνει η κατανομή της *Wolbachia* με κάποια μητρικά mRNA της μύγας. Για παράδειγμα, η κατανομή των *wMel* βακτηρίων, μοιάζει με αυτή του *oscar* mRNA, ενώ τα *wNo* βακτήρια συνεντοπίζονται με το *bicoid* mRNA (St Johnston 2001). Τα συγκεκριμένα μετάγραφα βασίζονται για τη μετακίνησή τους σε πρωτεΐνες-κινητήρες, που έχουν σχέση με μικροσωληνίσκους (Saxton 2001). Πρόσφατη μελέτη δε, έδειξε ότι ο ίδιος μηχανισμός είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά των μητρικών RNA στο ωοκύτταρο και την εναπόθεση αυτών στη ακραία (apical) πλευρά του αυγού (Bullock and Ish-Horowitz 2001). Στο παρελθόν έχει δειχθεί καθαρά ότι η *Wolbachia*, σχετίζεται με τους αστρικούς μικροσωληνίσκους (Callaini et al. 1994, Kose and Karr 1995), οι οποίοι μαζί με άλλα κυτταροσκελετικά στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμερισματοποίηση και στον εντοπισμό των μητρικών μεταγράφων του εμβρύου, που αρχίζει να κυτταροποιείται. Τα διαφορετικά στελέχη *Wolbachia*, θα μπορούσαν να προβάλλουν στην επιφάνεια τους διαφορετικές πρωτεΐνες, που έχουν διαφορετική συγγένεια για πρωτεΐνες κινητήρες του κυτταροσκελετού. Μια καλή υποψηφιότητα για τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις, είναι αυτή της WSP (*Wolbachia surface protein*) πρωτεΐνης, η οποία εκτός του ότι βρίσκεται σε αφθονία στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, υπόκειται σε θετική επιλογή στα παράσιτα (Jiggins et al. 2002).

Εξελικτικές προεκτάσεις. Η θεωρία προτείνει (Turelli 1994) ότι τα επίπεδα της ασυμβατότητας (CI levels), η αποτελεσματικότητα της μητρικής μετάδοσης (transmission efficiency) και το κόστος αρμοστικότητας (fitness cost), είναι οι τρεις παράγοντες-κλειδιά που καθορίζουν την εξέλιξη των διαφόρων βακτηριακών τύπων, που σχετίζονται με την ασυμβατότητα και μπορεί να συνδέονται μέσω της βακτηριακής πυκνότητας. Αν αυτοί οι παράγοντες δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, η συνεξέλιξη παρασίτου-ξενιστή αναμένεται να οδηγήσει σε χαμηλά επίπεδα ασυμβατότητας, χαμηλό κόστος αρμοστικότητας και υψηλή μητρική κληρονομηση, συνεπώς σε χαμηλούς αριθμούς στην αρσενική γαμετική σειρά, υψηλούς αριθμούς στη θηλυκή γαμετική σειρά και περιορισμένη ολική πυκνότητα στο σώμα της μύγας.

Οι παρατηρήσεις αυτής της μελέτης είναι σύμφωνες με το συγκεκριμένο μοντέλο, αν υποθέσει κανείς ότι η *D. yakuba*, η *D. teissieri* και η *D. santomea* αποτελούν τις πιο αρχέγονες μολύνσεις, μια και τα βακτήρια αυτά έχουν τους χαμηλότερους συνολικούς αριθμούς, στοχεύουν στη γαμετική σειρά με τα περισσότερα βακτήρια να είναι συγκεντρωμένα στα πολικά κύτταρα, εξασφαλίζοντας έτσι τη μετάδοσή τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενώ ο αριθμός των βακτηρίων στα πολικά κύτταρα είναι αρκετός για να πολλαπλασιαστούν ικανοποιητικά στις ωοθήκες, δεν είναι αρκετός για τους όρχεις (ή υπάρχει καταστολή από τον ξενιστή) και επομένως δεν προκαλούν ΚΑ. Τα βακτήρια *wMel* επίσης παρουσιάζουν τις ίδιες ιδιότητες στο φυσικό τους ξενιστή *D. melanogaster*, ενώ όταν μεταφέρθηκαν στη *D. simulans*, προκάλεσαν ΚΑ, μια και αυξήθηκαν οι συνολικοί αριθμοί και τα βακτήρια πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς και στους όρχεις. Η μόλυνση της *D. simulans* Coffs Harbour με τα βακτήρια *wCof* φαίνεται να αποτελεί μία ιδιαίτερη περίπτωση, μια και από τον αριθμό των βακτηρίων στα πολικά κύτταρα θα περίμενε κανείς να μη μολύνουν ικανοποιητικά τις σπερματοκύστες. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός, ότι τα βακτήρια αυτά έχασαν την ικανότητα να προκαλούν ΚΑ, σε κάποια φάση της εξέλιξής τους, πριν ολοκληρωθούν οι διαδικασίες καταστολής του πολλαπλασιασμού του βακτηρίου από τον ξενιστή και στόχευσης στα πολικά κύτταρα στη συνέχεια από το βακτήριο. Η μόλυνση με *wRi* βακτήρια φαίνεται να είναι πρόσφατη σχετικά, μια και παρουσιάζει υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού, υψηλά επίπεδα ΚΑ και ατελή μητρική κληρονομηση, στη φύση τουλάχιστο (Turelli 1995). Ένα πιθανό σενάριο, θα μπορούσε να είναι το εξής: ένα βακτήριο, που έχει την ικανότητα να επάγει ασυμβατότητα εισβάλλει σε ένα ξενιστή. Ο ξενιστής στη συνέχεια αναπτύσσει μηχανισμούς καταστολής του βακτηριακού πολλαπλασιασμού και τέλος το βακτήριο για να επιβιώσει, στοχεύει στη γαμετική σειρά. Αν σε κάποια στιγμή το βακτήριο χάσει (ή δεν έχει) την ικανότητα να προκαλεί ΚΑ, υπόκειται σε διαφορετικές εξελικτικές πιέσεις και η τύχη του είναι διαφορετική.

Η εκπληκτική διαπίστωση της συγκέντρωσης των βακτηρίων στον εμπρόσθιο πόλο του αυγού, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Η συγκέντρωσή τους στο αναπτυσσόμενο κεφάλι του εμβρύου, υπονοεί την συναρπαστική πιθανότητα εμπλοκής της *Wolbachia* στη συμπεριφορά της μύγας (Sokolowski 2001). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι μικροσωληνίσκοι του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης της Δροσόφιλας σχετίζονται με έναν φαινότυπο, που έχει να κάνει με

τη συμπεριφορά της προνύμφης (Dettman et al. 2001), γεγονός που κάνει αυτή την υπόθεση ελκυστική στο να ελεγχθεί. Απομένει να αποδειχθεί αν αυτά τα βακτήρια είναι ωφέλιμα για τους ξενιστές τους, έχοντας αναπτύξει μια αμοιβαία συμβιωτική σχέση, ή αν αυτές οι μολύνσεις είναι προσωρινές λόγω της ατελούς μετάδοσής τους, της απουσίας ασυμβατότητας και ίσως και κάποιου σχετικού κόστους αρμοστικότητας. Τα πειράματα ανοσοφθορισμού των αυγών έδειξαν σχεδόν τέλεια μητρική κληρονομηση για όλα τα στελέχη, που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη (>99%). Παρόλα αυτά, δεδομένα του εργαστηρίου υποστηρίζουν τη δεύτερη υπόθεση, μια και αυτές οι μολύνσεις χάνονται συχνά από τα stocks των στελεχών και χρειάζεται επιλογή για να κρατηθούν (τα πειράματα ανοσοφθορισμού γίνονταν σε μύγες που προέρχονταν από επιλεγμένες για τη μόλυνση σειρές).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bourtzis, K., S. L. Dobson, H. R. Braig, and S. L. O'Neill. 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature* 391: 852-3.
- Boyle, L., S. L. O'Neill, H. M. Robertson, and T. L. Karr. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Breeuwer, J. A., and J. H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346: 558-60.
- Bullock, S. L., and D. Ish-Horowicz. 2001. Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature* 414: 611-6.
- Callaini, G., M. G. Riparbelli, and R. Dallai. 1994. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo is mediated by astral microtubules. *J Cell Sci* 107: 673-82.
- Dettman, R. W., F. R. Turner, H. D. Hoyle, and E. C. Raff. 2001. Embryonic expression of the divergent *Drosophila* beta3-tubulin isoform is required for larval behavior. *Genetics* 158: 253-63.

- 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.
- Hadfield, S. J., and J. M. Axton. 1999. Germ cells colonized by endosymbiotic bacteria. *Nature* 402: 482.
- Jiggins, F. M., G. D. Hurst, and Z. Yang. 2002. Host-Symbiont Conflicts: Positive Selection on an Outer Membrane Protein of Parasitic but not Mutualistic Rickettsiaceae. *Mol Biol Evol* 19: 1341-9.
- 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.
- McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill. 2002. Wolbachia density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2918-23.
- Mercot, H., and D. Poinso. 1998. ... and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* 391: 853.
- O'Neill, S. L. and T. L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- Poinso, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. Wolbachia transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-37.
- Saxton, W. M. 2001. Microtubules, motors, and mRNA localization mechanisms: watching fluorescent messages move. *Cell* 107: 707-10.
- Sokolowski, M. B. 2001. *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nat Rev Genet* 2: 879-90.
- St Johnston, D. 2001. The beginning of the end. *Embo J* 20: 6169-79.
- Stouthamer, R., J. A. Breeuwer, and G. D. Hurst. 1999. Wolbachia pipientis: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71-102.
- Stouthamer, R., J.A.J. Breeuwer, R.F. Luck and J.H. Werren. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361: 66-68.
- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* 48: 1500-1513.

- Turelli, M., and A.A. Hoffmann. 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: Dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140: 1319-1338.
- Wright, J. D. and A. R. Barr. 1981. *Wolbachia* and the normal and incompatible eggs of *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 409-418.
- Zchori-Fein, E., R. T. Roush, and D. Rosen. 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Curr Microbiol* 36: 1-8.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-15.

6 Wolbachia και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα: μοντέλα και δεδομένα

Στο έκτο και τελευταίο κεφάλαιο της διατριβής αυτής γίνεται μία γενική επισκόπηση του φαινομένου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης εξετάζονται κάτω από το πρίσμα των θεωρητικών μοντέλων, που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν το μηχανισμό αυτής, καθώς και τη συν-εξέλιξη ξενιστή-παρασίτου. Τέλος, συζητούνται ενδιαφέροντα ερωτήματα, που μένουν αναπάντητα και πιθανές κατευθύνσεις για τη λύση τους.

Θεωρητικά. Η *Wolbachia* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο, που τις περισσότερες φορές προκαλεί στα αρθρόποδα ένα είδος αναπαραγωγικής απομόνωσης, την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (ανασκόπηση στα Charlat et al. 2002, Stouthamer et al. 1999). Στην πιο απλή της μορφή είναι η εμβρυϊκή θνησιμότητα, που προκαλείται από τη διασταύρωση ενός μολυσμένου αρσενικού με ένα μη μολυσμένο θηλυκό. Αντίθετα, τα μολυσμένα θηλυκά παράγουν βιώσιμους απογόνους με όποιο αρσενικό και αν διασταυρωθούν. Συνεπώς, οι μολυσμένες θηλυκές μύγες παράγουν κατά μέσο όρο περισσότερους απογόνους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη ραγδαία εξάπλωση του βακτηρίου σε έναν πληθυσμό, μια και αυτό κληρονομείται μητρικά.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η *Wolbachia* προκαλεί κυτταροπλασματική ασυμβατότητα παραμένει ακόμα άγνωστος. Κατά γενική ομολογία, τα βακτήρια με κάποιο τρόπο τροποποιούν το σπέρμα και αν αυτή τροποποίηση δεν εξουδετερωθεί από τα αντίστοιχα βακτήρια του αυγού, το έμβρυο αποβάλλεται. Η αποβολή αυτή συμβαίνει λόγω της μη σωστής συμπεριφοράς των πατρικών χρωμοσωμάτων στην πρώτη μιτωτική διαίρεση μετά τη γονιμοποίηση (Callaini et al. 1997, Lassy and Karr 1996, Tram and Sullivan 2002). Το πιο πιθανό είναι ότι η τροποποίηση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, μια και το ώριμο σπέρμα είναι απαλλαγμένο από τα βακτήρια. Αυτές οι ιδέες σχηματοποιήθηκαν και παρουσιάστηκαν πρώτη φορά από το Werren (1997), ως το μοντέλο τροποποίησης-διάσωσης (modification-rescue), το οποίο περιλαμβάνει δύο λειτουργίες: τη λειτουργία mod που δρα στο σπέρμα και τη λειτουργία resc, η οποία συμβαίνει στο αυγό και αποκαθιστά τη σωστή συμπεριφορά των χρωμοσωμάτων και κατ' επέκταση

την ανάπτυξη του εμβρύου. Με βάση αυτό το μοντέλο και γενετικά δεδομένα τα βακτηριακά στελέχη που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα έχουν καταταχθεί σε τρεις κατηγορίες: $\text{mod}^+\text{resc}^+$, που είναι και τα περισσότερα, $\text{mod}^-\text{resc}^-$ (Giordano et al. 1995, Hoffmann et al. 1996) και $\text{mod}^-\text{resc}^+$ (Bourtzis et al. 1998, Mercot and Poinsot 1998). Τα στελέχη $\text{mod}^+\text{resc}^-$ παρόλο που έχουν προβλεφθεί θεωρητικά, δεν έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα στη φύση (Charlat et al. 2001). Το μοντέλο αυτό είναι χρήσιμο ως σύλληψη για τη μελέτη του φαινομένου, δεν προσφέρει όμως επιπλέον πληροφορίες για το μηχανισμό της ασυμβατότητας. Τρία μοντέλα έχουν περιγραφεί για αυτό το σκοπό μέχρι σήμερα, τα οποία πηγάζουν από εμπειρικά δεδομένα και περιγράφονται στο Poinsot et al. (2003). Το πρώτο από αυτά αναφέρεται ως μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς (lock and key), σύμφωνα με το οποίο τα βακτήρια παράγουν ένα μόριο και «κλειδώνουν» κάποιο συστατικό του πυρήνα του σπέρματος, το οποίο θα πρέπει να «ανοιχθεί» από το αντίστοιχο κλειδί που φέρουν τα βακτήρια στο αυγό (Breeuwer 1990, Werren 1997). Το δεύτερο από αυτά αναφέρεται ως μοντέλο του νεροχύτη (sink model) και σύμφωνα με αυτό η *Wolbachia* απομακρύνει κάποιο συστατικό του σπέρματος καθώς αυτό ωριμάζει, το οποίο του το επιστρέφουν τα βακτήρια που υπάρχουν στο αυγό (Kose and Karr 1995). Τέλος, σύμφωνα με το μοντέλο αργής κίνησης (slow motion) η *Wolbachia* παράγει έναν παράγοντα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την καθυστερημένη είσοδο των πατρικών χρωμοσωμάτων στην πρώτη μιτωτική διαίρεση μετά τη γονιμοποίηση, το μη συγχρονισμό με τα μητρικά και την αποβολή των εμβρύων, σε μία ασύμβατη διασταύρωση. Στην περίπτωση που τα αντίστοιχα βακτήρια υπάρχουν στο αυγό, τα μητρικά χρωμοσώματα είναι εξίσου καθυστερημένα λόγω της δράσης του ίδιου παράγοντα, οπότε συγχρονίζονται με τα πατρικά και η ανάπτυξη προχωρά κανονικά (Callaini et al. 1997, Tram and Sullivan 2002). Βάσει πειραματικών δεδομένων, συμπεριλαμβανομένης και αυτής της διατριβής δεν μπορεί να απορριφθεί κανένα από αυτά. Αναλυτικότερα, τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι στιγμής είναι τα εξής: τα μολυσμένα αυγά είτε με ένα είτε με παραπάνω στελέχη είναι απολύτως συμβατά με το σπέρμα από τα μη μολυσμένα αρσενικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα βακτήρια στο αυγό δε βλάπτουν το «κανονικό» σπέρμα. Η τροποποίηση και η διάσωση συμβαίνουν με ειδικό τρόπο, δηλαδή ένα στέλεχος είναι απολύτως συμβατό μόνο με τον εαυτό του (μερικές εξαιρέσεις συζητούνται παρακάτω). Αυτό είναι κυρίως εμφανές στην περίπτωση της αμφίδρομης (bi-directional) ασυμβατότητας, όπου ένα μολυσμένο αρσενικό με ένα συγκεκριμένο στέλεχος, είναι ασύμβατο με ένα

θηλυκό μολυσμένο με διαφορετικό στέλεχος (O'Neill and Karr 1990). Μολαταύτα, δύο διαφορετικά στελέχη μπορούν να είναι μερικώς συμβατά, όπως για παράδειγμα το *wMel* με το *wRi*. Αναλυτικότερα έχει βρεθεί ότι διαμολυσμένα *D. simulans* θηλυκά με *wMel*, σώζουν μερικώς την ασυμβατότητα μολυσμένων αρσενικών με το στέλεχος *wRi*, ενώ θηλυκά *D. simulans* μολυσμένα με *wRi* σώζουν πλήρως την ασυμβατότητα των μολυσμένων αρσενικών με *wMel* (Poinsot et al. 1998), παρόλο που τα δύο στελέχη απέχουν μεταξύ τους φυλογενετικά (Zhou et al. 1998). Σπέρμα από μολυσμένα αρσενικά με δύο ή τρία στελέχη είναι συμβατά μόνο με θηλυκά που είναι μολυσμένα με τα αντίστοιχα στελέχη. Κατά συνέπεια μολυσμένα θηλυκά με τρία στελέχη για παράδειγμα, είναι συμβατά με όλα τα αρσενικά του πληθυσμού (μολυσμένα με κανένα, ένα, δύο ή και τα τρία στελέχη ταυτόχρονα) (Mercot et al. 1995, Perrot-Minnot et al. 1996, Rousset et al. 1999, Sinkins et al. 1995b). Τέλος, φαίνεται ότι οι λειτουργίες *mod* και *resc* είναι ανεξάρτητες, μια και έχουν περιγραφεί στελέχη *mod⁺resc⁺*, τα οποία παρόλο που δεν επάγουν ασυμβατότητα, σώζουν την ασυμβατότητα, η οποία επάγεται από συγγενικά τους, με βάση το *wsp* γονίδιο, στελέχη (Bourtzis et al. 1998, Mercot and Poinsot 1998). Τα δεδομένα αυτά ωστόσο θα μπορούσαν να εξηγηθούν διαφορετικά (βλ. παρακάτω). Το μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς προβλέπει την ύπαρξη δύο ανεξάρτητων μοριακών μηχανισμών για τις λειτουργίες *mod* και *resc*. Κατ' επέκταση, είναι υπεύθυνα για αυτές διαφορετικά βακτηριακά γονίδια. Αντίθετα, τα μοντέλα του νεροχύτη και της αργής κίνησης υποστηρίζουν ότι ο ίδιος βακτηριακός παράγοντας θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος και για τις δύο λειτουργίες. Ο παράγοντας (-ες) αυτός μπορεί να έχει διαφορετική δομή για κάθε στέλεχος, έχοντας ως αποτέλεσμα την ειδικότητα στην αλληλεπίδραση των λειτουργιών *mod* και *resc* και την αμφίδρομη ασυμβατότητα. Αν όντως τα στελέχη *mod⁺resc⁻* υπάρχουν, τότε το ποιο φειδωλό μοντέλο είναι αυτό του κλειδιού-κλειδαριάς, αφού για τα άλλα δύο πρέπει να γίνει μία επιπλέον παραδοχή, αυτή της φυλο-ειδικής έκφρασης του παράγοντα (*ων*).

Τα τρία μοντέλα, εκτός από την ποιοτική ειδικότητα (διαφορετική δομή του παράγοντα) ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη, υπονοούν και ποσοτικές διαφορές στο μόριο(α) που είναι υπεύθυνο για τις λειτουργίες *mod-resc*. Πράγματι, η έκφραση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, έχει δειχθεί αρκετές φορές στο παρελθόν να επηρεάζεται από τους αριθμούς των βακτηρίων (Binnington 1989, Bourtzis et al. 1996, Boyle et al. 1993, Breeuwer 1993, Bressac 1993, Clark et al. 2002, Giordano et al. 1995, Hoffmann 1986, McGraw et al. 2002, Noda et al. 2001, Poinsot et al. 1998,

Sinkins et al. 1995a, Solignac 1994), έχοντας θετική συσχέτιση. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, υπήρχαν εξαιρέσεις: η *D. simulans* Coffs Harbor στην οποία δεν παρατηρείται ασυμβατότητα, δεν έχει λιγότερα βακτήρια από στελέχη της *D. melanogaster* (Hoffmann et al. 1996), στα οποία κάποιες φορές τα επίπεδα ασυμβατότητας είναι ανιχνεύσιμα. Επίσης, το διαμολυσμένο στέλεχος DSW(Ma), παρόλο που δεν εκφράζει ασυμβατότητα, δεν έχει λιγότερα βακτήρια από άλλα στελέχη στα οποία παρατηρούνται υψηλά επίπεδα (Giordano et al. 1995).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί το γενικότερο πρόβλημα, που υπάρχει στον καθορισμό των στελεχών. Μέχρι σήμερα ένα βακτηριακό στέλεχος θα «βαπτισθεί» με όνομα wHost και θα αντιμετωπίζεται ως διαφορετικό από τα υπόλοιπα, αν έχει διαφορές στην αλληλουχία του 16S rDNA ή του *wsr* γονιδίου ή αν εκφράζει διαφορετικά επίπεδα ασυμβατότητας. Τα επίπεδα ασυμβατότητας όμως εμπλέκουν τον κίνδυνο να είναι διαφορετικά, όχι λόγω του ίδιου του βακτηριακού στελέχους, αλλά του γενετικού υπόβαθρου του ξενιστή (Boyle et al. 1993, Poinsot et al. 1998) ή περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία (Hoffmann 1986), το περιβάλλον που μεγαλώνουν οι προνύμφες (συνθήκες υπερπληθυσμού) (Sinkins et al. 1995b), η ηλικία (Reynolds and Hoffmann 2002) και η προ-συζευκτική ιστορία (Karr et al. 1998) του αρσενικού, τα οποία έχουν δειχθεί να επηρεάζουν τα επίπεδα ασυμβατότητας μέσω του βακτηριακού φορτίου. Επιπλέον τα πειράματα μέτρησης ασυμβατότητας (CI assays) σε κάθε εργαστήριο διαφέρουν και δεν είναι αυστηρά στον έλεγχο περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η ηλικία του αρσενικού και η θερμοκρασία, με αποτέλεσμα πολλές φορές διαφορές στα επίπεδα της ασυμβατότητας να είναι απλά τεχνητά προϊόντα των μεθοδολογιών (Weeks et al. 2002).

Συζήτηση των δεδομένων. Τα στελέχη που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα εξής: από την Α ομάδα, το wMel σε τέσσερα διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα ξενιστή (δύο είδη), το wCof (ή wAu, όπως αναφέρεται σε μερικές μελέτες), τρία wCof-like στελέχη σε τρία διαφορετικά είδη ξενιστή αντίστοιχα, το wRi σε τέσσερα διαφορετικά είδη ξενιστή και τρία βακτηριακά στελέχη από τη Β ομάδα (wNo, wMa, wKi) σε δύο είδη ξενιστή. Πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι τα στελέχη wMel και wCof έχουν την ίδια αλληλουχία 16S rDNA (James and Ballard 2000) και 5 νουκλεοτίδια διαφορά στο *wsr* γονίδιο (Zhou et al. 1998), ενώ το wRi είναι διαφορετικό από αυτά κατά 9,7% (Poinsot et al. 1998). Τα υπόλοιπα 3 στελέχη τα οποία ανήκουν στην ομάδα Β έχουν και τα τρία την ίδια αλληλουχία *wsr*. Η

αλληλουχία του 16S rDNA του *wNo* διαφέρει κατά ένα νουκλεοτίδιο από τα άλλα δύο (James et al. 2002). Με βάση τη λεπτομερή ανάλυση πυκνότητας και κατανομής των βακτηρίων στα γαμετικά κύτταρα των ξενιστών βγαίνουν διάφορα ενδιαφέροντα συμπεράσματα για την ταυτοποίηση των στελεχών και κατ' επέκταση το μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

Όσον αφορά στα *wMel* στελέχη, βάσει προηγούμενων εργασιών το *wMelyw* στέλεχος θεωρούνταν $\text{mod}^+\text{resc}^+$ μια και επάγει χαμηλά επίπεδα ασυμβατότητας (Bourtzis et al. 1996). Το *wMelCS* στέλεχος θεωρούνταν $\text{mod}^-\text{resc}^+$, μια και δεν επάγει ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας, αλλά σώζει την ασυμβατότητα που προκαλεί το *wMelyw* (Bourtzis et al. 1998). Το *wMel porcorn* στέλεχος αποτελεί μία ιδιαίτερη περίπτωση, μια και δεν προκαλεί ασυμβατότητα, αλλά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα στο νευρικό σύστημα της ενήλικης μύγας και τη σκοτώνει στο μισό περίπου του χρόνου ζωής της (Min and Benzer 1997). Παρόλα αυτά, όταν μεταφέρθηκε με κυτταροπλασματικές ενέσεις στη *D. simulans* προκάλεσε υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας (McGraw et al. 2001), όπως και το *wMel* (Poinsot et al. 1998). Επίσης, έχει δειχθεί ότι το στέλεχος *wMelCS* επάγει χαμηλά επίπεδα ασυμβατότητας, όταν τα αρσενικά που διασταυρώνονται είναι πολύ νεαρά (Reynolds and Hoffmann 2002). Στην παρούσα διατριβή, τα τρία αυτά στελέχη στο φυσικό τους ξενιστή *D. melanogaster* παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά όσον αφορά στον αριθμό και στην κατανομή των βακτηρίων στα αυγά και στους όρχεις (οπίσθια κατανομή και χαμηλά επίπεδα μόλυνσης στα αυγά και στους όρχεις). Επιπλέον το *wMel* στέλεχος, το οποίο μεταφέρθηκε με κυτταροπλασματικές ενέσεις στη *D. simulans*, παρουσιάζει την ίδια κατανομή, αλλά οι αριθμοί είναι αισθητά ανεβασμένοι. Βάσει των παραπάνω, όλα τα *wMel* στελέχη, θα μπορούσαν να θεωρηθούν $\text{mod}^+\text{resc}^+$. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην ασυμβατότητα θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διαφορές στον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου, λόγω του γενετικού υπόβαθρου του ξενιστή.

Το *wCof* είναι ένα αρκετά αινιγματικό στέλεχος, μια και δεν ήταν σίγουρο στο παρελθόν για το αν πρόκειται για διαφορετικό στέλεχος από αυτά της *D. melanogaster* (*wMel*). Μέχρι σήμερα θεωρείται $\text{mod}^-\text{resc}^-$ στέλεχος, μια και ούτε προκαλεί, ούτε σώζει την ασυμβατότητα άλλων στελεχών, όπως το *wRi* (James and Ballard 2000). Στην μελέτη αυτή επιβεβαιώνεται η mod^- φύση του βακτηρίου, μια και δεν προκαλεί ασυμβατότητα, ενώ μολύνει σε σχετικά υψηλά επίπεδα αυγά και σπερματοκύστες. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα τρία υπόλοιπα στελέχη, που έχουν

σχεδόν την ίδια *wsp* αλληλουχία με το *wCof* και μολύνουν τις *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea* αντίστοιχα. Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα μόλυνσης, τόσο στα αυγά, όσο και στους όρχεις και δεν προκαλούν ασυμβατότητα. Αναμένεται η μεταφορά τους με κυτταροπλασματικές ενέσεις σε έναν ξενιστή που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό τους για να διαπιστωθεί η *mod* φύση τους. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι τα στελέχη αυτά έχουν την ικανότητα να σώζουν την ασυμβατότητα που προκαλείται από το *wRi* στους αντίστοιχους διαμολυσμένους ξενιστές, είναι δηλαδή *resc*⁺ (Zabalou et al. submitted). Η ισχυρή καταστολή του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων στους όρχεις των ξενιστών και η υψηλή συγκέντρωσή τους στα πολικά κύτταρα υποθέτει τη *mod*⁺ φύση τους, σε αντίθεση με το *wCof* στέλεχος.

Το *wRi* αποτελεί το στέλεχος αναφοράς λόγω των υψηλών επιπέδων κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, που προκαλεί στον ξενιστή του. Το στέλεχος αυτό μεταφέρθηκε στο παρελθόν με κυτταροπλασματικές ενέσεις στη *D. melanogaster*, όπου τα επίπεδα ασυμβατότητας μειώθηκαν αισθητά, ίσως λόγω καταστολής του πολλαπλασιασμού, αλλά αυξήθηκαν σημαντικά στη συνέχεια με επιλογή σε κάθε γενιά (Boyle et al. 1993). Αντίθετα η μεταφορά του στους ξενιστές *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea*, με κυτταροπλασματικές ενέσεις προκάλεσε από την αρχή υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας. Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος μολύνει τους παραπάνω ξενιστές με τα υψηλότερα επίπεδα, τόσο στα αυγά όσο και τους όρχεις. Θα ήταν ενδιαφέρον να αποδειχθεί η σχέση του στελέχους αυτού με τα *wMel* και τα *wCof*-like βακτήρια, αν πρόκειται δηλαδή για το ίδιο ή διαφορετικά στελέχη, όσον αφορά στο γονίδιο(α) που προκαλεί ασυμβατότητα, παρόλο που τα *wsp* γονίδια τους απέχουν μεταξύ τους. Σε αυτήν την περίπτωση οι διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα ασυμβατότητας θα μπορούσαν να οφείλονται στο βακτηριακό φορτίο των όρχεων, το οποίο ελέγχεται μεταξύ άλλων και από τον ξενιστή.

Το ξεδιάλυμα των σχέσεων των στελεχών της Β-ομάδας χρειάζεται αρκετή μελέτη ακόμα. Το στέλεχος *wNo* έχει απομονωθεί στο εργαστήριο (Mercot et al. 1995) από στοχαστικό χάσιμο διπλών μολύνσεων με το *wHa* *D. simulans* μυγών και στη φύση (James et al. 2002). Τα επίπεδα ασυμβατότητας που προκαλεί είναι αρκετά ποικίλα και κυμαίνονται από πολύ χαμηλά (5.5%-15.2%) (James et al. 2002) έως ενδιάμεσα (48,7%) (Mercot 1995). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές του γενετικού υπόβαθρου των ξενιστών ή στο ότι το συγκεκριμένο στέλεχος

προκαλεί ποικίλα επίπεδα ασυμβατότητας. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αρκετή ποικιλομορφία στα επίπεδα μόλυνσης των σπερματοκύστεων. Το *wMa* απομονώθηκε αρχικά από *D. mauritiana* μύγες και στη συνέχεια μεταφέρθηκε με κυτταροπλασματικές ενέσεις σε *D. simulans*. Και στις δύο περιπτώσεις δεν εξέφρασε ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας (Giordano et al. 1995). Από την άλλη πλευρά φυσικά μολυσμένες μύγες *D. simulans* από τη Μαδαγασκάρη μολυσμένες με το στέλεχος *wMa*, προκαλούν από μη ανιχνεύσιμα έως ενδιάμεσα επίπεδα ασυμβατότητας (James and Ballard 2000). Τέλος το στέλεχος *wKi* από *D. simulans* μύγες απομονώθηκε από φυσικούς πληθυσμούς στο όρος Κιλιμάντζαρο και θεωρήθηκε ως $\text{mod}^+\text{resc}^+$, μια και δεν προκαλεί ανιχνεύσιμα επίπεδα ασυμβατότητας αλλά διασώζει την ασυμβατότητα που προκαλεί το στέλεχος *wNo* (Mercot and Poinsot 1998), όπως και το διαμολυσμένο DSW(Ma) (Bourtzis et al. 1998). Το αν τα στελέχη αυτά αποτελούν το ίδιο ή διαφορετικά στελέχη υπήρξε αντικείμενο έντονης συζήτησης στο παρελθόν (Mercot and Poinsot 1998, James and Ballard 2000, James et al. 2002, Charlat et al. 2003, Poinsot et al. 2003). Τα πειραματικά δεδομένα αυτής της διατριβής υποστηρίζουν τη $\text{mod}^+(\text{resc}^-)$ φύση του στελέχους που απομονώθηκε από φυσικούς πληθυσμούς της *D. mauritiana*. Επιπλέον, η διάσωση της ασυμβατότητας των αρσενικών *wNo* από τα διαμολυσμένα DSW(Ma) θηλυκά, μπορεί να οφείλεται στην ετερογένεια των αρσενικών, δηλαδή στη μη επαγωγή ασυμβατότητας. Το στέλεχος *wKi* θα μπορούσε επίσης να ανήκει στην ίδια κατηγορία με τα *wNo* και *wMa* (από τη Μαδαγασκάρη) (James et al. 2002) ($\text{mod}^+\text{resc}^+$) και να είναι ετερογενές ως προς την έκφραση της ασυμβατότητας. Τα παραπάνω θα μπορούσαν να ελεγχθούν με τις κατάλληλες κυτταροπλασματικές μεταφορές των εν λόγω στελεχών σε ξενιστές, που θα επιτρέψουν τον επαρκή πολλαπλασιασμό τους.

Συμπερασματικά, όσον αφορά στο μηχανισμό της ασυμβατότητας, τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής υποστηρίζουν τη $\text{mod}^+\text{resc}^+$ φύση των στελεχών *wMel* και *wRi*. Αποδέχονται ως $\text{mod}^+\text{resc}^-$ το βακτηριακό στέλεχος *D. simulans* Coffs Harbor και ως $\text{mod}^-(\text{resc}^-)$ το στέλεχος *wMa* της *D. mauritiana*. Θεωρούν ετερογενές ως προς την έκφραση της ασυμβατότητας το στέλεχος *wNo*. Αναμένουν με αγωνία τη μεταφορά των *wCof-like* και του *wKi* σε ξενιστές που θα επιτρέψουν τον επαρκή πολλαπλασιασμό τους για την ασφαλή κατάταξή τους σε $\text{mod}^+\text{resc}^+$ ή $\text{mod}^-\text{resc}^+$. Τολμούν δε, να προβλέψουν όσον αφορά στο μηχανισμό της ασυμβατότητας την ουσιαστική ύπαρξη δύο στελεχών ($\text{mod}^+\text{resc}^+$), ενός από την Α ομάδα (*wMel*, *wCof-*

like, wRi) και ενός από τη B ομάδα (wNo , και ίσως wMa , wKi στη *D. simulans*) τα οποία είναι αμφίδρομα ασύμβατα μεταξύ τους (Mercot 1995, Poinsot 1998) και των μεταλλαγών τους ($mod^{-}resc^{-}$), που προκαλούν χάσιμο της λειτουργίας του παράγοντα $mod-resc$ (loss of function mutants), τα στελέχη που μολύνουν τη *D. simulans* Coffs Harbor και τη *D. Mauritiana*, αντίστοιχα. Οι επιμέρους διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα ασυμβατότητας οφείλονται πιθανά σε διαφορές στο βακτηριακό φορτίο, που ρυθμίζονται συν τοις άλλοις από τον ξενιστή.

Πώς όμως συν-εξελίσσονται οι διαφορετικοί τύποι Wolbachia και οι ξενιστές τους; Θεωρητικά και εμπειρικά δεδομένα (Caspari 1959, Fine 1978, Hoffmann 1997, Turelli and Hoffmann 1995) έχουν δείξει ότι η εξάπλωση της Wolbachia καθώς και η παραμονή της μετά την εισβολή σε μη μολυσμένους πληθυσμούς, μπορεί να γίνουν ποιο κατανοητές αν λάβει κανείς υπόψη του, τρεις παράγοντες: i) τα επίπεδα της ασυμβατότητας (το ποσοστό των αυγών, που δεν εκκολάπτονται) (CI levels) ii) τα ποσοστά μητρικής κληρονομής του βακτηρίου (transmission efficiency) και iii) αν υπάρχουν τυχόν θετικές ή αρνητικές επιπτώσεις της μόλυνσης στη γενική φυσική κατάσταση του ξενιστή (fitness effect). Βασικά, υψηλά επίπεδα ασυμβατότητας, υψηλή μητρική μετάδοση και χαμηλό κόστος αρμοστικότητας αναμένεται να οδηγήσουν σε επιτυχή διατήρηση του βακτηρίου σε ένα πληθυσμό. Ο Turelli (1994) προσπάθησε να αναλύσει τις εξελικτικές πιέσεις που δέχονται τόσο ο ξενιστής όσο και το βακτήριο σε σχέση με αυτές τις παραμέτρους. Συμπέρανε ότι οι παράγοντες του ξενιστή και του βακτηρίου, επιλέγονται όταν αυξάνουν τη μητρική μετάδοση του βακτηρίου και μειώνουν το κόστος του ξενιστή. Οι προβλέψεις όσον αφορούν στα επίπεδα της ασυμβατότητας είναι πιο περίπλοκες. Εάν η μόλυνση δεν έχει εγκαθιδρυθεί, αναμένεται να αναπτυχθούν παράγοντες του ξενιστή που μειώνουν τα επίπεδα της ασυμβατότητας, διότι η ασυμβατότητα μειώνει το συνολικό αριθμό των αυγών που εκκολάπτονται. Από την οπτική γωνία του βακτηρίου, τα επίπεδα ασυμβατότητας είναι ουδέτερα. Αυτό ενώ φαίνεται ενστικτωδώς λάθος, έχει λογική αν σκεφτεί κανείς ότι η ασυμβατότητα εκφράζεται από βακτηριακούς παράγοντες μόνο στα αρσενικά. Οπότε οποιαδήποτε αυξομείωση στα επίπεδα είναι ουδέτερη, μια και το βακτήριο μεταδίδεται μόνο από τα θηλυκά (Prout 1994). Έτσι, υποτέθηκε ότι μια μακροχρόνια σχέση μεταξύ της Wolbachia και του ξενιστή της θα οδηγούσε σε μειωμένα επίπεδα ασυμβατότητας, ειδικά αν αυτά συνδέονται με την πυκνότητα των βακτηρίων και έχουν κάποιο φυσιολογικό κόστος (Turelli 1994). Τέτοια στελέχη βρέθηκαν τελικά σε φυσικούς πληθυσμούς (Giordano et al. 1995, Hoffmann et al.

1996), τα οποία δεν εκφράζουν ασυμβατότητα. Θεωρητικά μοντέλα προβλέπουν το χάσιμο τέτοιων μολύνσεων, εάν η μητρική τους μετάδοση δεν είναι τέλεια ή εάν τα βακτήρια δεν βελτιώνουν έστω και λίγο τη φυσική κατάσταση του ξενιστή (Hoffmann et al. 1996). Τέλος, ο Turelli (1994) πρότεινε για πρώτη φορά τη σύνδεση των τριών παραπάνω παραγόντων με τη βακτηριακή πυκνότητα: η επιλογή στα επίπεδα ασυμβατότητας και η αποτελεσματικότητα της μητρικής μετάδοσης ευνοούν την αύξηση των αριθμών, ενώ το φυσικό κόστος μάλλον ευνοεί τη μείωση (εάν φυσικά τα βακτήρια δεν προσφέρουν κάποιο όφελος στους ξενιστές τους, Andersson and Kurland 1999). Είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι τα επίπεδα ασυμβατότητας είναι συνδεδεμένα με την αρσενική γαμετική σειρά, η μητρική μετάδοση με τη θηλυκή και η φυσική κατάσταση με τους συνολικούς αριθμούς (Charlat et al. 2002).

Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής συμφωνούν με τα παραπάνω θεωρητικά μοντέλα. Αναλυτικότερα, θεωρούν ως αρχαιότερη μόλυνση αυτή των *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea*, γιατί τα στελέχη αυτά έχουν το χαμηλότερο αριθμό βακτηρίων, με τα περισσότερα από αυτά συγκεντρωμένα στα πολικά κύτταρα και δεν εκφράζουν ασυμβατότητα, λόγω της απουσίας μολυσμένων σπερματοκύστεων. Επίσης παρουσιάζουν τέλεια μητρική κληρονομηση (Charlat in prep, παρούσα μελέτη), γεγονός που δείχνει ότι ο αριθμός των βακτηρίων που υπάρχουν στα πολικά κύτταρα είναι αρκετός για να μολύνει επαρκώς όλα τα ωοκύτταρα, ενώ στους όρχεις πιθανά να υπάρχει καταστολή του πολλαπλασιασμού από τον ξενιστή. Επίσης αρκετά αρχέγονη παρουσιάζεται και η μόλυνση της *D. melanogaster*. Η μετάδοση της είναι τέλεια στο εργαστήριο (παρούσα μελέτη) και όχι τελείως πιστή στο πεδίο (Hoffmann et al. 1998). Επιπρόσθετα, είναι αποδεδειγμένο ότι τα συγκεκριμένα στελέχη δεν έχουν χάσει την ικανότητα να προκαλούν ασυμβατότητα. Όσον αφορά τη μόλυνση της *D. simulans* Coffs Harbor ίσως είναι η αρχαιότερη της *D. simulans*. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος αυτό μάλλον έχασε την ικανότητα να προκαλεί ασυμβατότητα, πριν ολοκληρωθούν οι διαδικασίες της καταστολής του πολλαπλασιασμού του βακτηρίου από τον ξενιστή και της υψηλής συγκέντρωσης στα πολικά κύτταρα από το βακτήριο. Η μητρική του μετάδοση είναι σχεδόν τέλεια (Hoffmann et al. 1996, παρούσα μελέτη). Η μόλυνση της *D. simulans* Riverside μάλλον είναι η πιο πρόσφατη από όλες, μια και έχει τους υψηλότερους αριθμούς στα αυγά και στις σπερματοκύστες και επάγει τα υψηλότερα επίπεδα ασυμβατότητας. Όσον αφορά στη μητρική της κληρονομηση ενώ στο εργαστήριο είναι σχεδόν τέλεια, στη φύση παρουσιάζεται ατελής (παρούσα μελέτη, Turelli and Hoffmann 1995). Στη

Β ομάδα τα υπάρχοντα δεδομένα είναι πιο πολύπλοκα. Η μόλυνση της *D. mauritiana* πιθανά έχασε την ικανότητα της να προκαλεί ασυμβατότητα, οπότε δεν υπήρχαν εξελικτικές πιέσεις από τον ξενιστή για μείωση των αριθμών στους όρχεις. Από την άλλη πλευρά, τα στελέχη της *D. simulans* Noumea και Kilimanjaro, έχουν περιορισμένο αριθμό μολυσμένων σπερματοκύστεων, γεγονός που υποδεικνύει ότι προκαλούν ασυμβατότητα. Η περιέργη συγκέντρωση των συγκεκριμένων βακτηρίων στον εμπρόσθιο πόλο των αυγών και στο κεφάλι των ανεπτυγμένων εμβρύων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Αν δεν επηρεάζουν θετικά τη συμπεριφορά των μυγών, τα στελέχη αυτά αναμένεται να χαθούν. Στο εργαστήριο φαίνεται να έχουν σχεδόν τέλεια μητρική κληρονομία από επιλεγμένες σειρές όμως (παρούσα μελέτη), ενώ έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ατελής μητρική κληρονομία για το *wNo* (Mercot 1995).

Δεδομένα από μιτοχονδριακό DNA υποστηρίζουν τις παραπάνω υποθέσεις. Πιο συγκεκριμένα, στη *D. melanogaster* μολυσμένοι πληθυσμοί έχουν βρεθεί σε όλα τα μέρη κατανομής του είδους και δεν υπάρχει συσχέτιση της μόλυνσης με κάποιο mtDNA απλότυπο. Τα δεδομένα αυτά υπονοούν ότι η μόλυνση συνέβη μια φορά αρκετά νωρίς στην εξέλιξη του είδους (Solignac et al. 1994). Η ίδια βιβλιογραφική αναφορά θεωρεί πιο πιθανή την ανεξάρτητη μόλυνση της *D. simulans* από το ίδιο βακτήριο. Η μόλυνση των ειδών *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. santomea* είναι πιθανώς εξίσου αρχέγονη και ίσως προέρχεται από ένα μοναδικό γεγονός μόλυνσης που συνέβη πριν το διαχωρισμό των ειδών αυτών από τη *D. melanogaster*. Υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η *wCof* (ή *wAu*) είναι η πιο αρχαία μόλυνση της *D. simulans*, όπως η παρουσία του σε αρχαίους πληθυσμούς από το Καμερούν (Charlat et al. 2003) και τη Μαδαγασκάρη (James and Ballard 2000). Η *wRi* μόλυνση θεωρείται σχετικά πρόσφατη και παρακολούθηθηκε ζωντανά να εξαπλώνεται στη φύση (Turelli et al. 1992, Turelli and Hoffmann 1991). Επίσης σύμφωνα με μιτοχονδριακά δεδομένα, υπήρξε μία πρόσφατη διείσδυση (introgression) κυτταροπλάσματος από τη *D. simulans* στη *D. mauritiana*, η οποία επέτρεψε τη μεταφορά μιτοχονδρίων και *Wolbachia*. Όσον αφορά στους μιτοχονδριακούς απλότυπους της *D. simulans*, οι μολύνσεις *wRi* και *wAu* σχετίζονται με τον απλότυπο *siII*, η *wNo* και *wHa* σχετίζονται με τον απλότυπο *siI* και οι μολύνσεις τέλος *wMa* και *wKi* με τον απλότυπο *siIII* (Charlat et al. 2003, James and Ballard 2000). Η στενή σχέση μεταξύ των μιτοχονδριακών τύπων και των στελεχών *Wolbachia* είναι αναμενόμενη, αν σκεφτεί κανείς ότι και τα δύο κληρονομούνται από το

κυτταρόπλασμα της μητέρας. Παρόλα αυτά μπορεί να υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις λόγω δυνητικής πατρικής διαρροής, οριζόντιας μεταφοράς, μετανάστευσης, ή μόλυνσης των σειρών των μυγών (line contamination) (Turelli and Hoffmann 1995). Εν κατακλείδι, η δυσκολία του καθορισμού των βακτηριακών στελεχών έχει επιπτώσεις ταξινομικές και εξελικτικές. Μελλοντικές μελέτες, όπως η παρούσα, θα μπορούσαν να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για το κατά πόσο οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών στην έκφραση της ασυμβατότητας και στη συχνότητα των μολύνσεων που παρατηρούνται στη φύση, σχετίζονται με διαφορές στη βακτηριακή πυκνότητα.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα δεδομένα της διατριβής αυτής υπογραμμίζουν τη σημασία της πυκνότητας και της κατανομής των βακτηρίων στη γαμετική σειρά του ξενιστή στην έκφραση των φαινοτύπων που σχετίζονται με την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός παράγοντα τροποποίησης-διάσωσης, ο οποίος διαφέρει ποσοτικά και ποιοτικά μεταξύ των στελεχών. Παρέχουν ενδείξεις για την εξάρτηση του πολλαπλασιασμού του βακτηρίου από το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή (ποσοτικές διαφορές). Συγκαταλέγουν ανάμεσα στις χαρακτηριστικές ιδιότητες ενός στελέχους, ανεξάρτητα από τον ξενιστή, την ικανότητα του να προκαλεί ή όχι ασυμβατότητα, (mod-resc)⁺ ή (mod-resc)⁻ και την κατανομή του (εμπρόσθια-οπίσθια-ομοιόμορφη) (ποιοτικές διαφορές). Αποδεικνύουν την ισχυρή θετική συσχέτιση της ποσότητας των βακτηρίων στους όρχεις εκφρασμένη ως ποσοστό πολύ μολυσμένων σπερματοκύστεων, η οποία εγκαθιδρύεται αρκετά νωρίς στην ανάπτυξη με τα επίπεδα ασυμβατότητας. Υποδεικνύουν την ανάπτυξη καταστολής του πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων στελεχών από ορισμένους ξενιστές. Προτείνουν την αναλυτικότερη μελέτη της σχέσης της βακτηριακής ποσότητας στα αυγά και της διάσωσης, καθώς και της μητρικής μετάδοσης. Πιο συγκεκριμένα, ενδιαφέρον θα είχε η σύγκριση του πολλαπλασιασμού του βακτηρίου στους όρχεις και τις ωοθήκες, ο οποίος φαίνεται να εξαρτάται από τον αριθμό των αρχικών βακτηρίων στα πολικά κύτταρα, αλλά με διαφορετικό τρόπο στο καθένα (thresholds). Επίσης, η εξάρτηση της κατανομής των βακτηρίων από το κυτταροσκελετικό σύστημα που μεταφέρει τα μητρικά mRNAs στο αυγό και οι επιπτώσεις των βακτηρίων της ομάδας B στη συμπεριφορά των μυγών αποτελούν δύο αξιοπερίεργες υποθέσεις, που αξίζει να ελεγχθούν, μια και μπορεί να παίζουν βασικό ρόλο στην συν-εξέλιξη ξενιστή-παρασίτου.

Τέλος, το μοντέλο mod-resc, μπορεί να προσέφερε πολλά στη μελέτη του φαινομένου της ασυμβατότητας, αλλά μερικές φορές περιέπλεξε τα δεδομένα, όσον αφορά στη διαλεύκανση του μηχανισμού. Αναμένονται με αγωνία τα αποτελέσματα από την εργασία προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδιώματος της *Wolbachia*, για να έρθει σε αντιπαράθεση το δυσανάλογο σε μέγεθος θεωρητικό οικοδόμημα με τα πειραματικά δεδομένα. Η λύση του γρίφου της ασυμβατότητας, ο οποίος «ταλαιπωρεί» τους επιστήμονες εδώ και μισό αιώνα, είναι μάλλον κοντά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson, S. G., and C. G. Kurland. 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Opin Microbiol* 2: 535-41.
- Binnington, K. C. a. A. A. Hoffmann H. 1989. *Wolbachia*-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 344-352.
- 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., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis. 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144: 1063-73.
- Boyle, L., S. L. O'Neill, H. M. Robertson, and T. L. Karr. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science* 260: 1796-9.
- Breeuwer, J. A. J., and J.H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* 346: 558-560.
- Breeuwer, J. A. J. and J. H. Werren. 1993. Effect of genotype on cytoplasmic incompatibility between two species of *Nasonia*. *Heredity* 70: 428-436.
- Bressac, C. a. F. R. 1993. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: Dapi-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 226-230.
- Callaini, G., R. Dallai, and M. G. Riparbelli. 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes

- from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *J Cell Sci* 110: 271-80.
- Caspari, E. and G. S. Watson. 1959. On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. *Evolution* 13: 568-570.
- Charlat, S., K. Bourtzis, and H. Mercot. 2002. Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. *Symbiosis, Mechanisms and Model Systems, Volume 4, Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*, Seckbach, J., Ed., Kluwer, Dordrecht: 623-644.
- Charlat, S., C. Calmet, and H. Mercot. 2001. On the mod resc model and the evolution of Wolbachia compatibility types. *Genetics* 159: 1415-22.
- Charlat, S., L. Le Chat, and H. Mercot. 2003. Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing Wolbachia in two continental African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* 90: 49-55.
- Charlat, S., Ballard, J.W.O and Mercot H. What maintains non cytoplasmic incompatibility inducing Wolbachia in their hosts: a field study in *Drosophila yakuba*. *In preparation*.
- 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.
- Fine, P. E. M. 1978. On the dynamics of symbiote-dependent cytoplasmic incompatibility in Culicine mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 30: 10-18.
- Giordano, R., S. L. O'Neill, and H. M. Robertson. 1995. Wolbachia infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140: 1307-17.
- Hoffmann, A. A., D. Clancy, and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring Wolbachia infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76: 1-8.
- Hoffmann, A. A., M. Hercus, and H. Dagher. 1998. Population dynamics of the Wolbachia infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148: 221-31.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons. 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* 40: 692-701.

- Hoffmann, A. A. and M. Turelli. 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. Pages 42-80 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influent passengers*. Oxford University Press, Oxford.
- James, A. C., and J. W. Ballard. 2000. Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. *Evolution Int J Org Evolution* 54: 1661-72.
- James, A. C., M. D. Dean, M. E. McMahon, and J. W. Ballard. 2002. Dynamics of double and single *Wolbachia* infections in *Drosophila simulans* from New Caledonia. *Heredity* 88: 182-9.
- Karr, T. L., W. Yang, and M. E. Feder. 1998. Overcoming cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 391-5.
- 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.
- McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill. 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 2565-70.
- McGraw, E. A., Merritt, D. J., Droller, J. N. and O'Neill, S. L.. 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2918-23.
- Mercot, H., B. Llorente, M. Jacques, A. Atlan and C. Montchamp-Moreau. 1995. Variability within the Seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics* 141: 1015-1023.
- Mercot, 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.
- Mercot, H., and D. Poinso. 1998. ... and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* 391: 853.
- 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 U S A* 94: 10792-6.
- Noda, H., Y. Koizumi, Q. Zhang, and K. Deng. 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 727-37.

- O'Neill, S. L. and T. L. Karr. 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* 348: 178-180.
- 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.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-37.
- Poinsot, D., S. Charlat, and H. Mercot. 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts. *Bioessays* 25: 259-65.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis and H. Mercot. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* to *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150: 227-237.
- Prout, T. 1994. Some evolutionary possibilities for a microbe that causes incompatibility in its host. *Evolution* 48: 909-911.
- Reynolds, K. T., and A. A. Hoffmann. 2002. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genet Res* 80: 79-87.
- Rousset, F., H. R. Braig, and S. L. O'Neill. 1999. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. *Heredity* 82: 620-7.
- Sinkins, S. P., H. R. Braig, and S. L. O'Neill. 1995a. *Wolbachia pipientis*: bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus*. *Exp Parasitol* 81: 284-91.
- Sinkins, S. P., Braig, H. R., O'Neill, S. L.. 1995b. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 261: 325-30.
- Solignac, M., D. Vautrin and F. Rousset. 1994. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 317: 461-470.
- Stouthamer, R., J. A. Breeuwer, and G. D. Hurst. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71-102.

- Tram, U., and W. Sullivan. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in Wolbachia- induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124-6.
- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* 48: 1500-1513.
- Turelli, M., A.A. Hoffmann and S.W. McKechnie. 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics* 132: 713-723.
- Turelli, M., and A.A. Hoffmann. 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353: 440-442.
- Turelli, M., and A. A. Hoffmann. 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140: 1319-38.
- Weeks, A. R., K. T. Reynolds, and A. A. Hoffmann. 2002. Wolbachia dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends Ecol Evol* 17: 257-262.
- Werren, J. H. 1997. Biology of Wolbachia. *Annual Review of Entomology* 42: 587-609.
- Zabalou, S., Charlat, S., Nirgianaki, A., Lachaise, D., Merçot H., and K., Bourtzis. 2003. Natural Wolbachia infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification. Submitted in *Genetics*.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neil. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265: 509-15.

PUBLICATIONS FROM THIS WORK

Published

- Dobson, S. L., E. J. Marsland, Z. Veneti, K. Bourtzis, and S. L. O'Neill. 2002. Characterization of Wolbachia host cell range via the in vitro establishment of infections. *Appl Environ Microbiol* 68: 656-60.
- 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.
- Veneti, Z., M. E. Clark, S. Zabalou, C. Savakis, T. L. Karr and K. Bourtzis. 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila*-Wolbachia associations. *Genetics* 164(2):545-52.

In preparation

- Veneti, Z., M. E. Clark, T. L. Karr, C. Savakis and K. Bourtzis. Heads or tails: host-parasite interactions in the *Drosophila*-Wolbachia system.

OTHER PUBLICATIONS

- Banks, G., A. Nirgianaki, J. Bedford, D. Frolich, Z. Veneti, C. Savakis, T. Miller, H. Braig and K. Bourtzis. 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*" *Current Microbiology*, in press
- Liepouris, F., T. G. Deligeorgiev, Z. Veneti, C. Savakis, and H. E. Katerinopoulos. 2002. Near-membrane iminocoumarin-based low affinity fluorescent Ca(2+) indicators. *Cell Calcium* 31: 221-7.