



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας**

**ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία»**

**«ΚΑΤ/ΝΣΗ: Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων  
Οργανισμών»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΤΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΝΕΟΤΗΤΑΣ  
ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *S.nonagrioides***

**Δημήτριος Χ. Κοντογιαννάτος**

**ΑΘΗΝΑ**

**2010**

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κούρτη Άννα**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας**

**ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία»**

**«ΚΑΤ/ΝΣΗ: Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων  
Οργανισμών»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΤΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΝΕΟΤΗΤΑΣ  
ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *S.nonagrioides***

**Δημήτριος Χ. Κοντογιαννάτος**

**ΑΘΗΝΑ**

**2010**

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κούρτη Άννα**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ  
ΤΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΝΕΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *S.nonagrioides*»**

**Δημήτριος Χ. Κοντογιαννάτος**

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κούρτη Άννα**

**Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:**

- 1. Κούρτη Άννα**
- 2. Μηλιώνη Δήμητρα**
- 3. Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ορμόνες νεότητας (JHs) αποτελούν έναν από τους βασικότερους ρυθμιστές του βιολογικού κύκλου των εντόμων. Σε συνεργασία με τα εκδυστεροειδή ρυθμίζουν την μετάβαση των εντόμων στα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια και οργανώνουν τις μεταμορφωτικές τους δραστηριότητες, ενώ σημαντικός είναι ο ρόλος τους και για την αναπαραγωγή τους, αφού σε πολλά είδη οι JHs υποκινούν την βιοσύνθεση της βιτελλογενίνης (Hartfelder, 2000).

Η αποδόμηση των JHs στους ιστούς και την αιμολέμφο είναι ένας σημαντικός τρόπος ελέγχου του τίτλου τους, ενώ οι εστεράσες της ορμόνης νεότητας (juvenile hormone esterases, JHEs) αποτελούν ρυθμιστικά ένζυμα-κλειδιά για την διαδικασία αυτή.

Σε προηγούμενη εργασία (Κοντογιαννάτος, 2008) απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το cDNA του γονιδίου που κωδικοποιεί για μία εστεράση της ορμόνης νεότητας (*SnoJHE*) στο έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). Το γονίδιο του ενζύμου αυτού κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε. Το μέγεθος του μεταγραφήματος στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο ήταν 1.85kb και η προκύπτουσα από το cDNA κλώνο αμινοξική ακολουθία περιείχε όλα τα πέντε λειτουργικά μοτίβα, τα οποία εμφανίζονται στις περισσότερες εστεράσες, πρωτεάσες και λιπάσες.

Ενδείξεις για ύπαρξη περισσότερων του ενός γονιδίων στο γονιδίωμα του εντόμου, μας οδήγησε σε περαιτέρω διερεύνηση για την πιθανή εύρεση επιπροσθέτων JHE cDNA κλώνων. cDNA από λιπώδη ιστό προνυμφών 4<sup>ου</sup> και 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αντιδράσεις πολυμερισμού (PCR) με εξειδικευμένους εκκινητές.

Από τις αντιδράσεις αυτές προέκυψαν 6 προϊόντα μεγέθους 1725bp, 1411bp, 1556bp, 1119bp, 1000bp και 1250bp αντίστοιχα. Το προϊόν των 1725bp (*SnoJHE1*) αλληλουχήθηκε και εμφάνιζε 100% ομολογία με το πρώτο cDNA που χαρακτηρίστηκε (*SnoJHE*), ενώ τα προϊόντα των 1411bp, 1556bp και 1119bp αντιστοιχούσαν σε 3 νέα JHE cDNAs, τα *SnoJHE2*, *SnoJHE3* και *SnoJHE4* αντίστοιχα.

Για να ερευνηθεί εάν τα τέσσερα μεταγραφήματα ήταν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός γονιδίου ή προϊόντα διαφορετικών γονιδίων, εφαρμόστηκε η τεχνική του υβριδισμού κατά Southern. Από τον υβριδισμό καθώς και από γονιδιωματικά δεδομένα εκτιμάται ότι τέσσερα γονίδια κωδικοποιούν για JHEs στο έντομο *S. nonagrioides*.

**Επιστημονική περιοχή της εργασίας:** Μοριακή βιολογία και φυσιολογία.

**Λέξεις κλειδιά:** Εναλλακτικό μάτισμα, εστεράση της ορμόνης νεότητας, μεταμόρφωση, ορμόνη νεότητας.

## **Molecular characterization of the juvenile hormone esterase genes from the corn stalk borer, *Sesamia nonagrioides***

### **ABSTRACT**

Juvenile hormone (JH) plays major roles in control of growth, development, metamorphosis, diapause and reproduction in insects. The regulation of JH titers is thus critical in entire life of the insect. One key event is the clearing of JH that generally precedes the molt from the last larval stage to the pupal stage of holometabolous insects (Campbell et al., 2001). The very low JH titer at this time is generally achieved by the combined effect of reduced JH synthesis and by JH degrading enzymes.

Degradation of JH in tissues and in hemolymph is a major way which hormone titers are regulated, and JH esterase (JHE) has been thought to play key roles in the metabolism of JH, (P.J.Gullan;P.S.Cranston, 2005).

In previous study, we isolated and characterized a juvenile hormone esterase gene (*SnoJHE*) from the moth *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). The size of this transcript in the last instar was 1.85 kb long and the predicted protein contained all five functional domains which are presented in most esterases, proteases and lipases.

Evidence of more than one JHE genes in *Sesamia nonagrioides* led us to further investigate the presence of additional JHE cDNA clones. cDNA prepared from fat body of 4th and 5th instar larvae, was used as template in PCR reactions using specific primers. These reactions resulted in 6 products with size of 1725bp, 1411bp, 1556bp, 1119bp, 900bp and 1250bp respectively. The product of 1725bp (*SnoJHE1*) has been sequenced and corresponded to *SnoJHE*, while the products of 1411bp, 1556bp and 1119bp, corresponded to 3 new JHEs, *SnoJHE2*, *SnoJHE3* and *SnoJHE4* respectively.

To investigate if these three new cDNAs were products of multiple alternative splicing events or products of different genes scattered in the genome of the corn stalk borer we performed southern blot hybridization using as probe an EcoRI digested part of *SnoJHE1* cDNA. Southern blot hybridization revealed that there are more than one JHE genes in *Sesamia nonagrioides* genome. Genomic sequencing results also showed, that there are four JHE genes in *S.nonagrioides* genome. These genes (*JHEgV1*, *JHEgV2*, *JHEg1*, *JHEg2*) seem to be products of several recent evolutionary events.

This is the first report showing that the evolution of species is a developing event that happens even in nowadays. Whoever is the nature and the reasons of this evolution, JHE genes in *S.nonagrioides* constitute an appreciable example of recent evolutionary processes and require further investigation, reminding simultaneously the importance of JHEs in insect growth and physiology.

**Thesis' scientific area:** Molecular biology and physiology.

**Keywords:** Alternative splicing, juvenile hormone, juvenile hormone esterase, intron loss.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Το ενδοκρινικό σύστημα και η λειτουργία των ορμονών των εντόμων.
- 1.1.1 Τα ενδοκρινικά κέντρα παραγωγής των ορμονών των εντόμων.
- 1.1.2 Οι ορμόνες των εντόμων.
- 1.2 Η ανάπτυξη των εντόμων.
- 1.2.1 Αύξηση.
- 1.2.2 Βιολογικός κύκλος και στάδια ανάπτυξης.
- 1.2.3 Εμβρυονική φάση ανάπτυξης.
- 1.2.4 Προνυμφική και νυμφική φάση ανάπτυξης.
- 1.2.5 Μεταμόρφωση.
- 1.2.6 Ενήλικη φάση.
- 1.2.7 Η διαδικασία και ο έλεγχος της έκδυσης.
- 1.3 Η εστεράση της ορμόνης νεότητας (juvenile hormone esterase, JHE).
- 1.4. Ταξινόμηση του εντόμου *S.nonagrioides*.
- 1.5. Σκοπός της παρούσας εργασίας.

#### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1 Τα έντομα και ο χειρισμός τους.
- 2.2 Μοριακές τεχνικές.
- 2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.
- 2.2.2 Phenol/Chloroform treatment.
- 2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων DNA/RNA με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας.
- 2.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό εντόμου με χρήση του φαινολικού αντιδραστηρίου (TRIzol).
- 2.2.5 DNase Treatment.
- 2.2.6 Παρασκευή cDNA από ολικό RNA με την μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφής.
- 2.2.7 Παρασκευή dNTPs mix.
- 2.2.8 Southern Hybridization.
- 2.2.8.1 Μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων σε πλαστική μεμβράνη.
- 2.2.8.2 Υβριδισμός και ανίχνευση με μη ραδιενεργό ιχνηλάτη, (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, ROCHE).
- 2.2.9 Σχεδιασμός/παρασκευή εκκινητών.

- 2.2.10 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).
- 2.2.11 Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης.
- 2.2.12 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA σε πηκτική αгарόζης.
- 2.2.13 Απομόνωση DNA από πηκτική αгарόζης.
- 2.2.14 Αλληλούχηση κλωνοποιημένων ενθέτων και ο pGEM-T Easy vector.
- 2.2.15 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA.
- 2.2.16 Μετασχηματισμός και παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*.
- 2.2.17 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (μέθοδος θερμικού σοκ).
- 2.2.18 Στερεή καλλιέργεια και επιλογή μετασχηματισμένων *E.coli* κυττάρων.
- 2.2.19 Υγρή καλλιέργεια μοναδιαίων αποικιών, μετασχηματισμένων *E.coli*.
- 2.2.20 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων.
- 2.2.21 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων.
- 2.2.22 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E.coli*.
- 2.2.23 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA(QIAGEN).
- 2.2.24 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- 3.1 Η εστεράση της ορμόνης νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides* (*SnoJHE*).
- 3.2 Τα γονίδια της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο *S.nonagrioides*.
  - 3.2.1 Απομόνωση των *SnoJHE -1,-2,-3,-4*.
  - 3.2.2 Απομόνωση και κλωνοποίηση των *SnoJHE-1,-2,-3*.
  - 3.2.3 Απομόνωση και κλωνοποίηση του *SnoJHE4*.
- 3.3 Χαρακτηρισμός των γονιδίων της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides*.
- 3.4 Γονιδιωματική ανάλυση.
  - 3.4.1 Υβριδισμός κατά Southern και ανίχνευση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο γονιδίωμα του εντόμου *S.nonagrioides*.
  - 3.4.2 Απομόνωση των γονιδίων της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides* από γονιδιωματικό DNA.
    - 3.4.2.1 Wf/5'R εκκινητές.
    - 3.4.2.2 3'f/3'R εκκινητές.
    - 3.4.2.3 Mf/MR εκκινητές.
    - 3.4.2.4 *In Silico*.
- 3.5 Ημιποσοτική έκφραση.



#### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**





## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Το ενδοκρινικό σύστημα και η λειτουργία των ορμονών των εντόμων

Ορμόνες καλούνται τα χημικά συστατικά τα οποία παράγονται από το σώμα ενός οργανισμού και μεταφέρονται μέσω των σωματικών του υγρών μακριά από τα σημεία σύνθεσής τους, σε σημεία που επηρεάζουν ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες, ακόμα και όταν βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, (Gullan and Cranston, 2005).

Οι ορμόνες των εντόμων έχουν μελετηθεί λεπτομερώς στα οφέλιμα έντομα, αλλά παρεμφερείς τρόποι παραγωγής και λειτουργίας φαίνεται να ισχύουν για σχεδόν όλα τα έντομα. Οι λειτουργίες και οι σχέσεις αυτών των χημικών αγγελιοφόρων ποικίλουν και είναι αρκετά σύνθετες.

Αρχικά, η συμμετοχή των ορμονών στις διαδικασίες της έκδυσης και της μεταμόρφωσης έγινε αντιληπτή από πολύ απλά πειράματα. Τα πειράματα αυτά περιελάμβαναν την αφαίρεση της επίδρασης του εγκεφάλου (decapitation), την απομόνωση αιμολέμφου από διαφορετικά τμήματα του σώματος (ligation), και την τεχνητή διασύνδεση αιμολέμφου μεταξύ δύο ή περισσότερων εντόμων.

Οι διαδικασίες αυτές επέτρεψαν στους ερευνητές να εντοπίσουν τα κέντρα ελέγχου της ανάπτυξης και των αναπαραγωγικών διαδικασιών, καθώς και να αποδείξουν πως οι ουσίες αυτές απελευθερώνονται και επηρεάζουν σημεία του σώματος των εντόμων μακριά από τα σημεία παραγωγής τους.

Επιπροσθέτως, προσδιορίστηκαν οι κρίσιμες αναπτυξιακές περίοδοι της δράσης αυτών των ρυθμιστικών παραγόντων. Το αιμοβόρο *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) και ποικίλα είδη, όπως οι πεταλούδες και οι μύγες, ήταν τα πρώτα πειραματικά έντομα.

Πιο εκλεπτυσμένες τεχνολογίες στην συνέχεια, επέτρεψαν την μικροχειρουργική αφαίρεση ή μεταμόσχευση ιστών, τη μετάγγιση της αιμολέμφου, την απομόνωση και καθαρισμό των διαφόρων ορμονικών παραγόντων, καθώς και τη σήμανση με ραδιενέργεια των ορμονικών εκχυλισμάτων.

Σήμερα, μοριακές, βιολογικές και προηγμένες αναλυτικές τεχνικές επιτρέπουν την απομόνωση χαρακτηρισμό και διαχείριση των ορμονών σε ευρεία κλίμακα, (Gullan and Cranston, 2005).

### 1.1.1 Τα ενδοκρινικά κέντρα παραγωγής των ορμονών των εντόμων.

Οι ορμόνες του σώματος του εντόμου παράγονται από νευρικά, νευροαδενικά και αδενικά κέντρα (Εικ 1.1.1.1).

#### **Νευροεκκριτικά κύτταρα (Neurosecretory cells)**

Τα νευροεκκριτικά κύτταρα, [Neurosecretory cells (NSC) ή αλλιώς neuroendocrine cells], είναι τροποποιημένοι νευρώνες, που εντοπίζονται στο νευρικό σύστημα, αλλά και στον εγγέφαλο. Αυτά τα κύτταρα παράγουν τις περισσότερες από τις γνωστές ορμόνες των εντόμων, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την παραγωγή των εκδυστεροειδών και των ορμονών νεότητας. Η σύνθεση και η απελευθέρωση των τελευταίων ελέγχεται από νευροορμόνες των NSC.

#### **Corpora cardiaca**

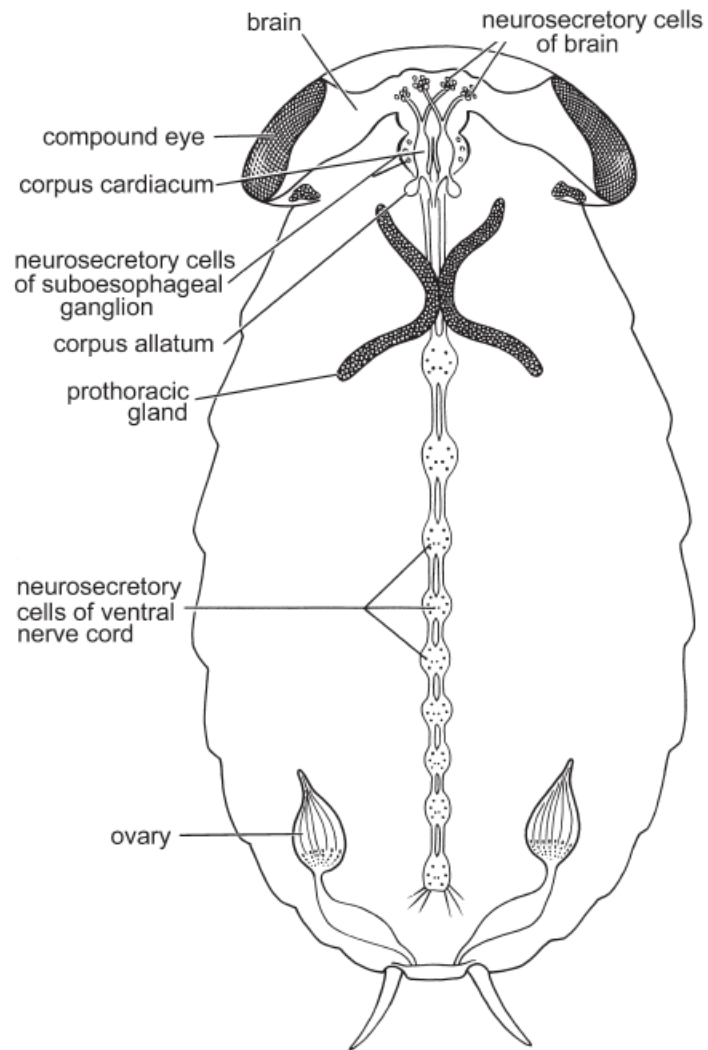
Τα corpora cardiaca είναι ένα ζευγάρι νευροαδενικών συμπλόκων, τα οποία εντοπίζονται στην αορτή, πίσω από τον εγγέφαλο. Εκτός από την παραγωγή εξειδικευμένων ορμονών, το νευροαδενικό αυτό σύμπλοκο αποθηκεύει και απελευθερώνει νευροορμόνες, συμπεριλαμβανομένης και της προθωρακικοτρόπου ορμόνης [prothoracicotropic hormone (PTTH) ή brain hormone ή ecdysiotropin], η οποία παράγεται από τα NSC του εγγκεφάλου. Η PTTH υποκινεί την εκκριτική δραστηριότητα των προθωρακικών αδένων.

#### **Prothoracic glands**

Οι προθωρακικοί αδένες είναι ένα διάχυτο ζευγάρι αδένων, που εντοπίζεται στον θώρακα ή στην πίσω πλευρά του εγγκεφάλου. Στα κυκλόρραφα δίπτερα οι προθωρακικοί αδένες αποτελούν τμήμα του δακτυλιδοειδούς αδένου, ο οποίος περιέχει τα corpora cardiaca και corpora allata. Οι προθωρακικοί αδένες αποτελούν απεκκριτικούς παράγοντες ενός εκδυστεροειδούς, της εκδυσόνης, (ecdysone ή molting hormone), η οποία αφού υδροξυλιωθεί, συμμετέχει στην διαδικασία της έκδυσης.

#### **Corpora allata**

Τα corpora allata είναι ένα μικρό ζεύγος αδενικών σωμάτων, τα οποία προκύπτουν από το επιθήλιο και εντοπίζονται στις δύο πλευρές του πρόσθιου εντέρου (foregut). Σε κάποια έντομα οι αδένες αυτοί συνενώνονται για να σχηματίσουν έναν ενιαίο αδένου. Ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η έκκριση της ορμόνης νεότητας, **juvenile hormone (JH)**, η οποία εμφανίζει ρυθμιστική επίδραση στην μεταμόρφωση και αναπαραγωγή, (Gullan & Cranston, 2005).



**Εικόνα 1.1.1.1.** Τα κυριώτερα ενδοκρινικά κέντρα σε ένα γενικευμένο έντομο.

### 1.1.2 Οι ορμόνες των εντόμων.

Τρεις είναι οι βασικότεροι ορμονικοί τύποι ρύθμισης της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής των εντόμων, τα **εκδυστεροειδή**, οι **ορμόνες νεότητας** και οι **νευροορμόνες** (ή **νευροπεπτίδια**) (Gullan & Cranston, 2005).

**Εκδυστεροειδές** είναι ένας γενικευμένος όρος που αναφέρεται σε οποιοδήποτε στεροειδές, το οποίο ενεργοποιεί την έκδυση. Όλα τα εκδυστεροειδή σχηματίζονται από τις στερόλες, όπως είναι η χοληστερόλη, τις οποίες τα έντομα δεν μπορούν να συνθέσουν *de novo*, αλλά λαμβάνουν από την τροφή τους. Τα εκδυστεροειδή αποτελούν συστατικά των περισσότερων εντόμων και σχηματίζουν μία ευρεία ομάδα φυσικών ενώσεων, εκ των οποίων η εκδυσόνη και η 20-υδροξυεκδυσόνη είναι τα πιο γνωστά μέλη.

Η **εκδυσόνη** (α-ecdysone) απελευθερώνεται από τους προθωρακικούς αδένες στην αιμολέμφο και μετατρέπεται στην πιο χημικά ενεργή μορφή της, την **20-υδροξυεκδυσόνη** (20-hydroxyecdysone). Η 20-υδροξυεκδυσόνη είναι το πιο διαδεδομένο και φυσιολογικά σημαντικό εκδυστεροειδές των εντόμων. Τα εκδυστεροειδή συντίθενται και από τις ωσθήκες των θηλυκών ακμαίων, επάγοντας έτσι την ωρίμανση τους, ή πακετάρονται στα αυγά και μεταβολίζονται αργότερα κατά τον σχηματισμό του εμβρυϊκού εξωσκελετού.

Οι **ορμόνες νεότητας**, (**Juvenile hormones**) ανήκουν σε μία οικογένεια χημικά όμοιων σεοκιτερπενοειδών συστατικών. Ο συμβολισμός JH αφορά ένα μίγμα ορμονών συμπεριλαμβανομένων των JH-I, JH-II, JHIII και JH-0.

Γενικά, οι ορμόνες νεότητας εμφανίζουν δύο κύριους ρόλους στην φυσιολογία των εντόμων: τον έλεγχο της μεταμόρφωσης και την ρύθμιση της αναπαραγωγής.

Τα χαρακτηριστικά των προνυμφών διατηρούνται και η μεταμόρφωση παρεμποδίζεται παρουσία JHs, ενώ η ανάπτυξη του ακμαίου απαιτεί μία έκδυση απουσία JH. Στο θηλυκό ώριμο άτομο η JH ελέγχει την απόθεση της λεκίθου στα αυγά και επηρεάζει την δραστηριότητα των αδένων και την παραγωγή φερομονών, (Gullan & Cranston, 2005).

Οι **νευροορμόνες** (**Neurohormones**) αποτελούν την μεγαλύτερη κλάση ορμονών των εντόμων. Είναι πεπτίδια και καλούνται ως νευροπεπτίδια.

Αυτοί οι πρωτεϊνικοί αγγελιοφόροι είναι οι τελικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης, της ομοιόστασης, του μεταβολισμού και της αναπαραγωγής των εντόμων, ελέγχοντας την έκκριση των JHs και των εκδυστεροειδών, (Gullan & Cranston, 2005).

Έχουν ταυτοποιηθεί 150 νευροπεπτίδια τα περισσότερα των οποίων κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο. Η λειτουργική ποικιλομορφία μεταξύ των πεπτιδίων αυτών ισοδύναμης ή σχετικής βιολογικής δραστηριότητας, είναι αποτέλεσμα της σύνθεσής τους από μεγάλα πρόδρομα μόρια, τα οποία κόβονται και τροποποιούνται, για να σχηματίσουν τα ενεργά πεπτίδια.

Τα νευροπεπτίδια φθάνουν στους ιστούς στόχους μέσω της αιμολέμφου και των νευρικών αξόνων. Επίσης, ελέγχουν άλλους ενδοκρινείς αδένες, όπως τα *corpora allata* και τους προθωρακικούς αδένες.

Σήματα που ενεργοποιούν ή που καταστέλλουν, εμπλέκονται στην ρύθμιση των νευροορμονών. Η δραστηριότητα των ρυθμιστικών νευροπεπτιδίων εξαρτάται από στερεοειδικές, υψηλής συγγένειας περιοχές πρόσδεσης, οι οποίες εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη των διαφόρων κυττάρων.

Οι ορμόνες φθάνουν στους ιστούς-στόχους μέσω μεταφοράς τους από τα σωματικά υγρά ή την αιμολέμφο. Άλλες υδατοδιαλυτές, μεταφέρονται μέσω πρωτεϊνών της αιμολέμφου, όπως είναι οι *ecdysteroid-binding proteins* και οι *JH-binding proteins*.

Αυτές οι πρωτεΐνες πιθανώς να ρυθμίζουν τα ορμονικά επίπεδα, κατευθύνοντας τις ορμόνες στα σημεία-στόχους, ελαττώνοντας την μη εξειδικευμένη πρόσδεση ή προστατεύοντας από την απέκκριση ή την καταστροφή τους (Gullan & Cranston, 2005).



**Πίνακας 1.1.2.1.** Παραδείγματα μερικών σημαντικών φυσιολογικών διαδικασιών των εντόμων οι οποίες ρυθμίζονται από τα νευροπεπτίδια.

Neuropeptide	Action
<b>Growth and development</b>	
Allatostatins and allatotropins	Induce/regulate juvenile hormone (JH) production
Bursicon	Controls cuticular sclerotization
Crustacean cardioactive peptide (CCAP)	Switches on ecdysis behavior
Diapause hormone (DH)	Causes dormancy in silkworm eggs
Pre-ecdysis triggering hormone (PETH)	Stimulates pre-ecdysis behavior
Ecdysis triggering hormone (ETH)	Initiates events at ecdysis
Eclosion hormone (EH)	Controls events at ecdysis
JH esterase inducing factor	Stimulates JH degradative enzyme
Prothoracicotropic hormone (PTTH)	Induces ecdysteroid secretion from prothoracic gland
Puparium tanning factor	Accelerates fly puparium tanning
<b>Reproduction</b>	
Antigonadotropin (e.g. oostatic hormone, OH)	Suppresses oocyte development
Ovarian ecdysteroidogenic hormone (OEH = EDNH)	Stimulates ovarian ecdysteroid production
Ovary maturing peptide (OMP)	Stimulates egg development
Oviposition peptides	Stimulate egg deposition
Prothoracicotropic hormone (PTTH)	Affects egg development
Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN)	Regulates pheromone production
<b>Homeostasis</b>	
Metabolic peptides (= AKH/RPCH family)	
Adipokinetic hormone (AKH)	Releases lipid from fat body
Hyperglycemic hormone	Releases carbohydrate from fat body
Hypoglycemic hormone	Enhances carbohydrate uptake
Protein synthesis factors	Enhance fat body protein synthesis
Diuretic and antidiuretic peptides	
Antidiuretic peptide (ADP)	Suppresses water excretion
Diuretic peptide (DP)	Enhances water excretion
Chloride-transport stimulating hormone	Stimulates Cl <sup>-</sup> absorption (rectum)
Ion-transport peptide (ITP)	Stimulates Cl <sup>-</sup> absorption (ileum)
<b>Myotropic peptides</b>	
Cardiopeptides	Increase heartbeat rate
Kinin family (e.g. leukokinins and myosuppressins)	Regulate gut contraction
Proctolin	Modifies excitation response of some muscles
<b>Chromatotropic peptides</b>	
Melanization and reddish coloration hormone (MRCH)	Induces darkening
Pigment-dispersing hormone (PDH)	Disperses pigment
Corazonin	Darkens pigment

## 1.2 Η ανάπτυξη των εντόμων.

### 1.2.1 Αύξηση.

Η αύξηση στα έντομα είναι ασυνεχής, τουλάχιστον για τα σκληροποιημένα τμήματα της επιδερμίδας του σώματος. Η αύξηση του μεγέθους επιτυγχάνεται με την **έκδυση**, μια περιοδική δημιουργία νέας επιδερμίδας μεγαλύτερης επιφάνειας και αποβολή της παλαιότερης, (Gullan & Cranston, 2005).

Κατά συνέπεια, η αύξηση της διάστασης του σώματος περιορίζεται λίγο πριν την επόμενη (postmolt period), αμέσως μετά την προηγούμενη έκδυση, πρώτου προλάβει να σκληροποιηθεί η επιδερμίδα και κατά συνέπεια να παρεμποδιστεί μηχανικά η αύξηση από τον σκληροποιημένο εξωσκελετό.

Ως εκ τούτου, η σκληροποιημένη κεφαλική κάψα των προνυμφών, κανθάρων ή πεταλουδών, αυξάνει σε μέγεθος κατά τρόπο εκθετικό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.

Μελέτες σχετικά με την ανάπτυξη των εντόμων, αναδεικνύουν δύο συστατικά της αύξησης. Το πρώτο συστατικό, **η αύξηση της έκδυσης**, είναι η αύξηση στο μέγεθος που εμφανίζεται μεταξύ του ενός και του επόμενου προνυμφικού σταδίου. Γενικά, η αύξηση στο μέγεθος μετριέται ως την αύξηση σε μια ενιαία διάσταση (μήκος ή πλάτος), ενός μερικά σκληροποιημένου μέρους του σώματος, παρά ως μια αύξηση του βάρους, η οποία μπορεί να είναι παραπλανητική λόγω της μεταβλητότητας στην εισαγωγή τροφής ή νερού, (Gullan & Cranston, 2005).

Το δεύτερο συστατικό της αύξησης είναι η **περίοδος της έκδυσης** (intermolt period), γνωστή και ως διάρκεια του προνυμφικού σταδίου, η οποία ορίζεται ως ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών εκδύσεων.

Το μέγεθος της αύξησης και της περιόδου της έκδυσης μπορεί να επηρεαστεί από την παροχή της τροφής, τη θερμοκρασία, τη προνυμφική πυκνότητα και τη φυσική ζημία (όπως η απώλεια προσαρτημάτων) και μπορεί να διαφέρει μεταξύ των φύλων ενός είδους.

Στα κολέμπολα, δίπλουρα και απτερυγωτά, η αύξηση είναι **απροσδιόριστη** και τα ζώα συνεχίζουν να παρουσιάζουν εκδύσεις έως ότου πεθάνουν. Δεν υπάρχει προσδιορισμένη έκδυση τερματισμού, αλλά σταματούν να αυξάνονται στο μέγεθος, καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής τους.

Στην πλειονότητα των εντόμων η αύξηση είναι **καθορισμένη**, δεδομένου ότι υπάρχουν διακριτά προνυμφικά στάδια που χαρακτηρίζουν τη διακοπή της αύξησης και των εκδύσεων (Gullan & Cranston, 2005).

Όλα τα έντομα με καθορισμένη αύξηση γίνονται αναπαραγωγικά ώριμα στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης. Το έντομο στο στάδιο αυτό ονομάζεται **ενήλικο** ή **ακμαίο**.

Στις περισσότερες τάξεις, τα έντομα αυτού του σταδίου διαθέτουν φτερά, αν και η δευτεροβάθμια απώλεια των φτερών έχει εμφανιστεί στα ενήλικα διάφορων ομάδων εντόμων, όπως είναι οι ψείρες, οι ψύλλοι, ορισμένες παρασιτικές μύγες και τα ενήλικα θηλυκά της οικογένειας των Coccoidea, (Gullan & Cranston, 2005).

Σε μία μόνο τάξη, στα Ephemeroptera, ένα προ-ενήλικο στάδιο προηγείται του τελικού. Σε αυτό το στάδιο, τα έντομα της τάξης αυτής είναι

ικανά να πετάξουν, σπάνια όμως είναι αναπαραγωγικά ώριμα. Όταν τα θηλυκά αναπαραγωγικά ώριμα ενήλικα ζευγαρώσουν, τότε πεθαίνουν χωρίς να προχωρήσουν στο επόμενο και το στάδιο αυτό αποτελεί το τελικό στάδιο αύξησης.

Σε μερικές τάξεις πτερυγίων, ο συνολικός αριθμός των προνυμφικών σταδίων αύξησης μπορεί να ποικίλει μέσα στο ίδιο είδος, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία ανάπτυξης, η διατροφή και η πυκνότητα των προνυμφών στα υποστρώματα ανάπτυξης.

Σε πολλά άλλα είδη, ο συνολικός αριθμός των προνυμφικών σταδίων καθορίζεται από άλλους παράγοντες, ανεξαρτήτως των περιβαλλοντικών συνθηκών (Gullan & Cranston, 2005).

### 1.2.2 Βιολογικός κύκλος και στάδια ανάπτυξης.

Η αύξηση αποτελεί σημαντικό γεγονός της οντογένεσης ενός ατόμου, της αναπτυξιακής δηλαδή ιστορίας του οργανισμού από το αυγό στο ενήλικο.

Εξίσου σημαντικές, είναι οι αλλαγές στην μορφή, οι οποίες πραγματοποιούνται στο σώμα των εντόμων, καθώς αυτά αυξάνονται και προχωρούν στις διάφορες τους εκδύσεις (Gullan & Cranston, 2005).

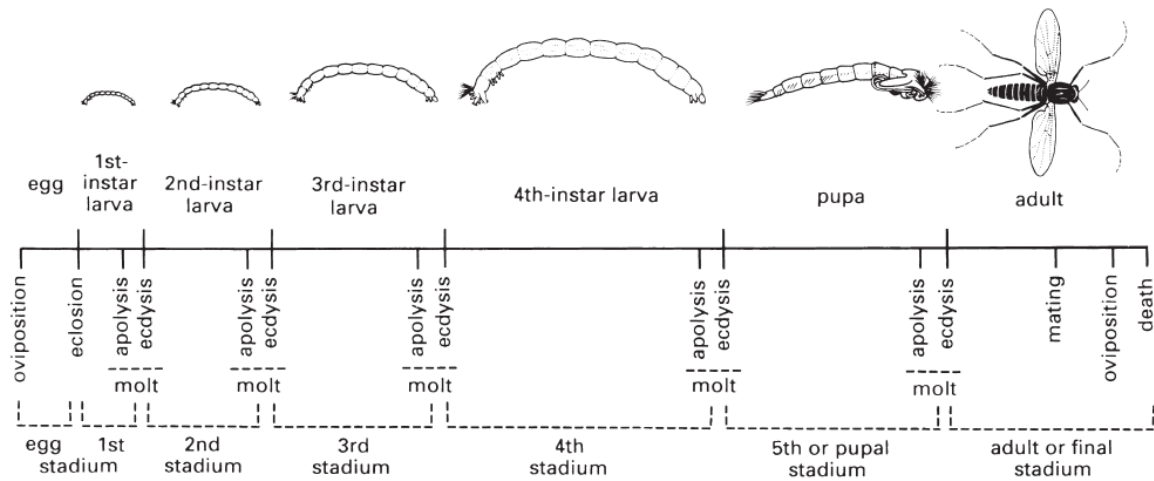
Οι αλλαγές στην μορφή (μορφολογία) κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, έχουν επιπτώσεις τόσο στις εξωτερικές δομές όσο και στα εσωτερικά όργανα, αλλά μόνο οι εξωτερικές αλλαγές είναι εμφανείς σε κάθε έκδυση. Τρεις είναι οι μορφές των αναπτυξιακών και μορφολογικών αλλαγών κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, που σχετίζονται με τον βαθμό της εξωτερικής αλλαγής που λαμβάνει χώρα κατά τις μετεμβρυϊκές φάσεις ανάπτυξης.

Το πρωτόγονο αναπτυξιακό σχέδιο, των **αμετάβολων** εντόμων, περιλαμβάνει μια διαδικασία όπου το νεοσσό εκκολάπτεται και διαθέτει μία μορφή παρόμοια με ένα μικροσκοπικό ενήλικο, που στερείται μόνο τα γεννητικά όργανα (Zygentoma, Archaeognatha).

Αντιθέτως, όλα τα πτερυγωτά έντομα υποβάλλονται σε μια μεταμορφωτική διαδικασία, μεταξύ της ανώριμης φάσης της ανάπτυξης και της πτερωτής ή δευτερευόντως άπτερης φάσης των ενηλίκων. Αυτά τα έντομα μπορούν να υποδιαιρεθούν, σύμφωνα με δύο αναπτυξιακά προγράμματα, στα **ημιμετάβολα** (μερική ή ελλιπή μεταμόρφωση) και στα **ολομετάβολα** (πλήρης μεταμόρφωση) έντομα.

Τα αναπτυσσόμενα φτερά, είναι ορατά στις εξωτερικές θήκες της ραχιαίας επιφάνειας των νυμφών των ημιμετάβολων εντόμων, πλὴν των νεώτερων προνυμφικών τους σταδίων. Ο όρος **εξωπτερυγωτό** αναφέρεται σε αυτή την μορφή της ανάπτυξης των φτερών (Gullan & Cranston, 2005).

Στο παρελθόν, τάξεις εντόμων με ημιμετάβολη και εξωπτερυγωτή ανάπτυξη ομαδοποιήθηκαν στην τάξη «Hemimetabola» (Exopterygota), αλλά αυτή η ομάδα αναγνωρίζεται σαν ένας βαθμός οργάνωσης, παρά σαν μία μονοφυλετική φυλογενετική μονάδα. Αντιθέτως, οι τάξεις των πτερυγωτών που εμφανίζουν ολομετάβολη ανάπτυξη, μοιράζονται τη μοναδική εξελικτική καινοτομία ενός εφησυχάζοντος σταδίου ή αλλιώς ενός **σταδίου νύμφης (pupal)**, στο οποίο συσσωρεύονται όλες εκείνες οι δομικές αλλαγές μεταξύ του προνυμφικού και του ενηλικού σταδίου. Οι τάξεις των εντόμων που μοιράζονται αυτό το μοναδικό, αναπτυξιακό πρόγραμμα ανάπτυξης, αντιπροσωπεύουν ένα κλάδο εντόμων, τα **ενδοπτερυγωτά** (Endopterygota) ή **ολομετάβολα**, (Holometabola) έντομα (Gullan & Cranston, 2005).

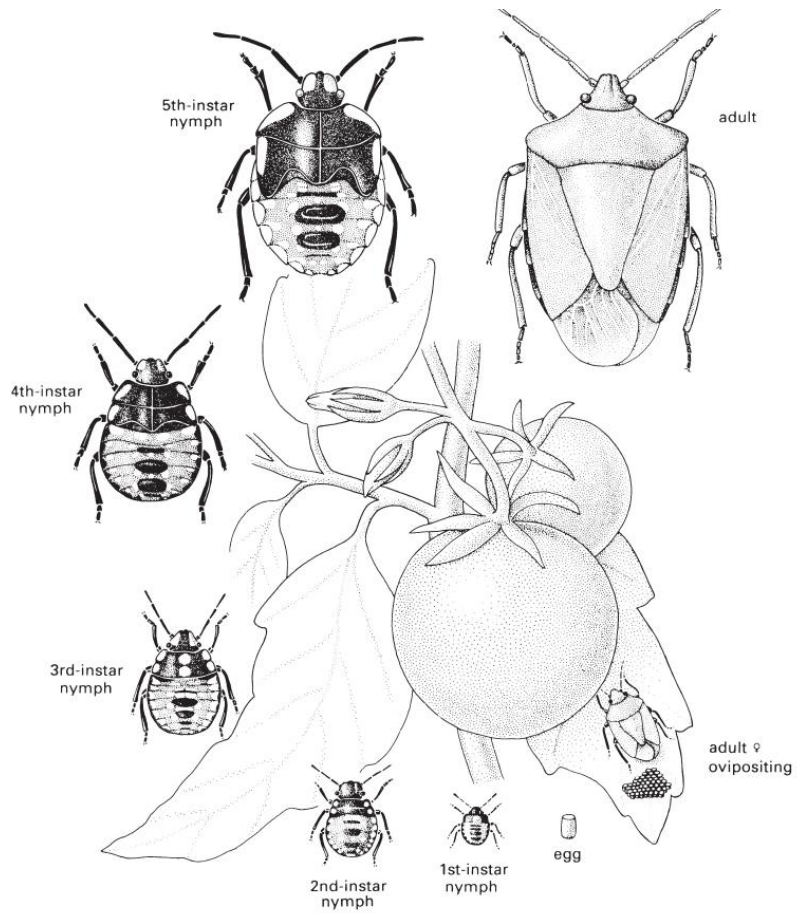


**Εικόνα 1.2.2.1.** Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής της σκνίπας (Diptera: Chironomidae, *Chironomus*).

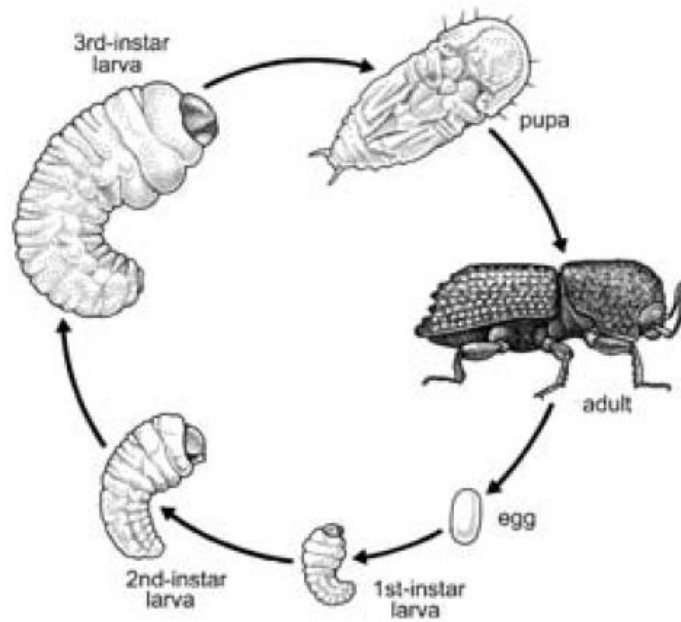
Στα νεώτερα εξελικτικά Holometabola, η έκφραση όλων των ενήλικων χαρακτηριστικών γνωρισμάτων καθυστερείται μέχρι το στάδιο της νύμφης. Εντούτοις στις περισσότερες τάξεις εντόμων, μεμονωμένες δομές συμπεριλαμβανομένων και των φτερών, μπορούν να είναι παρούσες εσωτερικά στις προνύμφες, ως ομάδες αδιαφοροποίητων κυττάρων, γνωστές ως **imaginal δίσκοι (imaginal discs** ή **buds**). Παρά ταύτα, οι imaginal δίσκοι δεν είναι αρκετά εμφανείς μέχρι το στάδιο της νύμφης (Gullan & Cranston, 2005).

Αυτό το είδος της ανάπτυξης των φτερών ονομάζεται **ενδοπτερυγωτία** και αυτό γιατί τα φτερά αναπτύσσονται από τα **πρωτογενή** (primordia), μέσα στις πτυχές του περιβλήματος, (Gullan & Cranston, 2005).

Η εξέλιξη των ολομετάβολων εντόμων επιτρέπει στα προνυμφικά και ενήλικα στάδια του εντόμου, να εξειδικεύονται με βάση τους διαθέσιμους πόρους, συμβάλλοντας έτσι στην επιτυχή διασπορά της ομάδας αυτής.



**Εικόνα 1.2.2.2.** Ο κύκλος ζωής του ημιμετάβολου εντόμου *Nezara viridula*.



**Εικόνα 1.2.2.3.** Ο κύκλος ζωής του ολομετάβολου εντόμου *Ips grandicollis*.

### 1.2.3 Εμβρυονική φάση ανάπτυξης.

Το στάδιο του αυγού αρχίζει αμέσως μετά την ωοαπόθεση. Για πρακτικούς λόγους, η ηλικία ενός αυγού υπολογίζεται από την στιγμή της απόθεσής του, ακόμα και αν προϋπήρχε στο σώμα του θηλυκού.

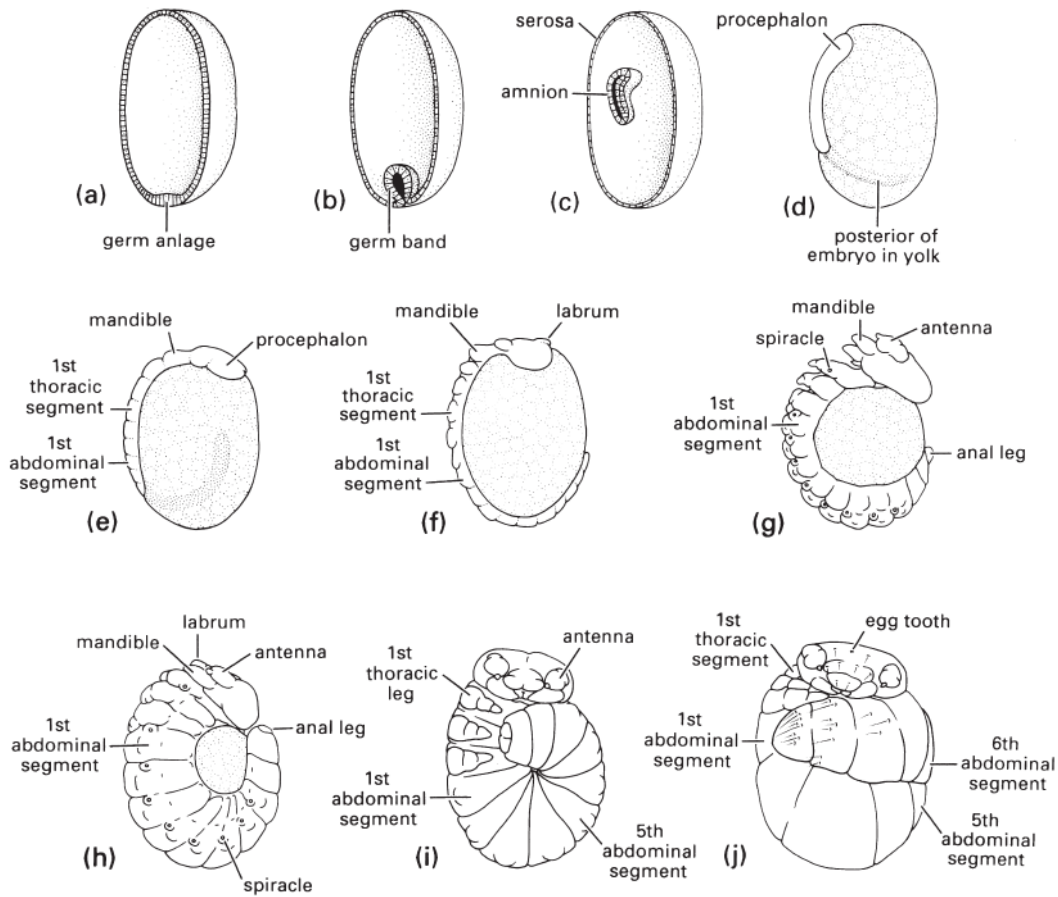
Το εμβρυϊκό στάδιο ξεκινά όταν ενεργοποιείται βιοχημικά η εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η ενεργοποίηση αυτή επακολουθεί της γονιμοποίησης στα σεξουαλικά αναπαραγόμενα έντομα, ενώ στα παρθενογενετικά αναπαραγόμενα είδη φαίνεται πως ελέγχεται από διάφορα ερεθίσματα, όπως είναι η ωοαπόθεση, η εισαγωγή οξυγόνου στο αυγό ή η μηχανική παραμόρφωση.

Μετά από την ενεργοποίηση του αυγού, ο πυρήνας του ζυγωτού υποδιαιρείται μέσω μιτωτικών διαιρέσεων, παράγοντας τους θυγατρικούς πυρήνες, δημιουργώντας έτσι το **συγκύτιο** (Gullan & Cranston, 2005).

Αυτοί οι πυρήνες και το περιβάλλον κυτταρόπλασμά τους, που αποκαλούνται **ενεργίδες** (cleavage energids), μεταναστεύουν στην περιφέρεια του αυγού, όπου η μεμβράνη του κυτοπλάσματος του συγκυτίου αναδιπλώνεται, οδηγώντας στην κυτταροποίηση του επιφανειακού στρώματος, διαμορφώνοντας έτσι, το μονοκυτταρικό **βλαστοδερμα** (Gullan & Cranston, 2005). Αυτή η διακριτή επιφανειακή εγκόλπωση κατά την διάρκεια της προ-εμβρυογένεσης, είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης μεγάλης ποσότητας λεκίθου στο αυγό.

Το βλαστοδερμα, αποτελεί την βάση για την δημιουργία όλων των κυττάρων του λαρβικού σώματος, ενώ το κεντρικό μέρος της λεκίθου του αυγού παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για το αναπτυσσόμενο έμβρυο, τα οποία στην συνέχεια θα καταναλώνονται συνεχώς, μέχρι την στιγμή της εκκόλαψης (eclosion).

Η περιφερειακή διαφοροποίηση του βλαστοδέρματος οδηγεί στην δημιουργία του **γεννητικού δίσκου** (germ anlage ή germ disc). Ο γεννητικός δίσκος αποτελεί το πρώτο σημάδι ανάπτυξης του αναπτυσσόμενου εμβρύου, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του βλαστοδέρματος, μετατρέπεται σε μια λεπτή μεμβράνη, γνωστή ως **serosa** ή αλλιώς ως **εμβρυϊκό κάλυμα** (Gullan & Cranston, 2005).



**Εικόνα 1.2.3.1.** Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του *Panorpodes paradoxa*.(a-c) Σχηματική αναπαράσταση του αυγού, όταν έχει αφαιρεθεί η λέκιθος, προκειμένου να προσδιοριστεί η θέση του εμβρύου. (d-j) Ηλικία από την ωοαπόθεση: (a): 32h; (b): 2 ημέρες; (c): 7 ημέρες; (d): 12 ημέρες; (e): 16 ημέρες; (f): 19 ημέρες; (g): 23 ημέρες; (h): 25 ημέρες; (i): 25-26 ημέρες; (j): πλήρης ανάπτυξη την 32<sup>η</sup> ημέρα.

Στην συνέχεια, ο γεννητικός δίσκος αναπτύσσεται με μία διαδικασία που ονομάζεται **γαστριδίωση** και μεταναστεύει στην λέκιθο του αυγού, σχηματίζοντας έτσι ένα έμβρυο δύο στρώσεων, στο οποίο εντοπίζεται η **αμνιακή κοιλότητα** (Gullan & Cranston, 2005).

Μετά από τη γαστριδίωση, ο γεννητικός δίσκος μετατρέπεται στην **γεννητική ζώνη**, η οποία εξωτερικά χαρακτηρίζεται από την μεταμερική οργάνωση, που ξεκινά από τον σχηματισμό του **πρωτοκεφάλου**. Η γεννητική ζώνη, διαμορφώνει τα ραχιαία τμήματα του μελλοντικού σώματος και επομένως διαφοροποιείται σταδιακά στο κεφάλι, στα μεταμερή και στα προσαρτήματα.

Σε αυτό το στάδιο, το έμβρυο υποβάλλεται σε μία μετακίνηση που αποκαλείται **katatrepsis**, τοποθετώντας το έτσι στην τελική θέση του στο αυγό. Αργότερα, κοντά στο τέλος της εμβρυογένεσης, τα ακραία τμήματα της **γεννητικής ζώνης** αυξάνονται καθ' όλη την λεκιθική μοίρα και συνενώνονται μέσω-ανωπλευρικά, για να σχηματίσουν τα πλευρικά και ραχιαία μέρη του εντόμου, μια διαδικασία που αποκαλείται **ραχιαία περάτωση (dorsal closure)** (Gullan & Cranston, 2005).



Στην *Drosophila*, το πλήρες έμβρυο είναι μεγάλο και μεταμεροποιείται στο στάδιο της κυτταροποίησης (cellularization) και στο στάδιο αυτό αποκαλείται **long-germ έμβryo** (το φαινόμενο αυτό συντηρείται σε όλα τα μελετημένα δίπτερα, τα κολεόπτερα, και τα υμενόπτερα). Αντιθέτως, στα **short-germ** έντομα (φυλογενετικά αρχαιότερα των προηγούμενων), το έμβρυο προέρχεται μια μικρή περιοχή του βλαστοδέρματος και τα ραχιαία τμήματα προστίθενται μετά την κυτταροποίηση, κατά τη διάρκεια της αύξησης.

Στα αναπτυσσόμενα long-germ έμβρυα, η φάση του συγκυτιακού βλαστοδέρματος ακολουθείται από την παρείσφρηση των κυτταρικών μεμβρανών, διαμορφώνοντας έτσι την βλαστομεριδική φάση.

Η λειτουργική εξειδίκευση των κυττάρων και των ιστών εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της τελευταίας περιόδου της εμβρυικής ανάπτυξης, έτσι ώστε μέχρι την στιγμή της εκκόλαψης το έμβρυο να έχει διαμορφωθεί σε ένα μικροσκοπικό πρώτο-έντομο, το οποίο καταλαμβάνει όλο τον χώρο του αυγού.

Στα αμετάβολα και ημιμετάβολα έντομα, αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται και προνυμφικό (Gullan & Cranston, 2005).

#### 1.2.4 Προνυμφική και νυμφική φάση ανάπτυξης.

Από το αυγό, αμέσως μετά την εκκόλαψη μπορεί να προκύψει είτε μία προνύμφη, είτε μία νύμφη. Η εκκόλαψη χαρακτηρίζει συμβατικά την αρχή του πρώτου προνυμφικού σταδίου (Gullan & Cranston, 2005).

Αυτό το στάδιο ολοκληρώνεται κατά την πρώτη έκδυση και το έντομο εισάγεται στο δεύτερο προνυμφικό στάδιο. Μετά από αυτό, ακολουθεί το τρίτο και τα επόμενα προνυμφικά στάδια. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη του ανώριμου εντόμου χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες εκδύσεις, οι οποίες διακόπτονται από περιόδους σίτισης. Τα ημιμετάβολα έντομα υποβάλλονται γενικά σε περισσότερες εκδύσεις μέχρι την ενηλικίωση, σε σχέση με τα ολομετάβολα έντομα.

Όλα τα ανώριμα ολομετάβολα έντομα αποκαλούνται **προνύμφες**. Τα ανώριμα κερσαία έντομα, με ημιμετάβολη ανάπτυξη όπως είναι οι κατσαρίδες (Blattodea), οι ακρίδες (Orthoptera), οι μαντίδες (Mantodea) και τα ημίπτερα αποκαλούνται **νύμφες** (Gullan & Cranston, 2005).

Εντούτοις, τα ανώριμα άτομα των υδρόβιων ημιμετάβολων εντόμων (Odonata, Ephemeroptera, και Plecoptera), τα οποία αποκτούν εξωτερικά φτερά τουλάχιστον στα τελευταία προνυμφικά στάδια, αναφέρονται επίσης ως προνύμφες.

Οι πραγματικές προνύμφες διαφέρουν, ενώ οι νύμφες ομοιάζουν περισσότερο μορφολογικά με τα ενήλικα. Οι διατροφικές και οικολογικές συνήθειες των προνυμφών διαφέρουν από εκείνες των ενηλίκων. Αντίθετα, οι νύμφες έχουν ίδιες διατροφικές συνήθειες και συνυπάρχουν με τα ενήλικα του είδους τους. Ο ανταγωνισμός είναι σπάνιος μεταξύ των προνυμφών και των ενηλίκων, αλλά είναι δυνατό να εμφανιστεί μεταξύ των νυμφών και των ενηλίκων.

Οι τρεις πιο κοινές προνυμφικές μορφές είναι **πολύποδες, ολιγόποδες** και **άποδες** προνύμφες (Gullan & Cranston, 2005). Οι κάμπιες των λεπιδοπτέρων είναι χαρακτηριστικές πολύποδες προνύμφες, με κυλινδρικό σώμα, κοντά θωρακικά πόδια και κοιλιακούς ψευδόποδες (pseudopods).

Τα σύμφυτα υμενόπτερα (sawflies) και τα περισσότερα μεκόπτερα διαθέτουν πολύποδες προνύμφες. Αυτού του είδους οι προνύμφες είναι μάλλον ανενεργές και συνήθως φυτοφάγες. Οι ολιγόποδες προνύμφες στερούνται των κοιλιακών ψευδοποδών, αλλά εμφανίζουν λειτουργικούς θωρακικούς πόδες και συχνά προγοναθικά τμήματα του στόματος. Πολλά είναι δραστήρια αρπακτικά ζώα, ενώ άλλα είναι αργά κινούμενα σαπροφάγα ζώντας στο έδαφος, ενώ άλλα είναι φυτοφάγα.

Αυτός ο προνυμφικός τύπος εμφανίζεται τουλάχιστον σε μερικά μέλη των περισσότερων τάξεων των εντόμων, αλλά όχι στα λεπιδοπτερα, στα μεκόπτερα, τα δίπτερα, τα σιφονάπτερα ή τα στρεψίπτερα (Gullan & Cranston, 2005).

Οι άποδες προνύμφες στερούνται αληθινών ποδιών και είναι συνήθως σκουληκόμορφες ή προνυμφόμορφες, ζώντας στο χώμα, τη λάσπη, την κοπριά, τους αποσυντιθειμένους φυτικούς και ζωϊκούς οργανισμούς ή μέσα στο σώμα των ξενιστών τους ζώντας ως παρασιτοειδή.

Τα σιφονάπτερα, τα ακανθωτά υμενόπτερα, τα νηματόκερα δίπτερα, και πολλά κολεόπτερα, έχουν τυπικές άποδες προνύμφες με καλά ανεπτυγμένο κεφάλι, ενώ στις προνύμφες των ανώτερων διπτέρων, οι στοματικοί γνάθοι, μπορεί να είναι και τα μόνα εμφανή σημάδια της κεφαλικής περιοχής.

Οι άποδες προνύμφες μερικών παρασιτικών σφηκών και μυγών, έχουν εμφανώς μειωμένη σε μέγεθος εξωτερική μορφολογία και είναι αρκετά δύσκολο να προσδιοριστούν σε ποια τάξη ανήκουν. Επιπλέον, οι πρόωρες προνύμφες μερικών παρασιτικών σφηκών μοιάζουν με γυμνό έμβρυο, αλλά μετατρέπονται αργότερα στις χαρακτηριστικές άποδες προνύμφες, στα επόμενα προνυμφικά στάδια (Gullan & Cranston, 2005).

Μια σημαντική αλλαγή σε μορφολογικό επίπεδο της προνυμφικής φάσης, όπως οι διαφορετικοί τύποι στα διάφορα προνυμφικά στάδια, ονομάζεται **προνυμφική ετερομεταμόρφωση** ή **υπερμεταμόρφωση (larval heteromorphosis ή hypermetamorphosis)**.

### 1.2.5 Μεταμόρφωση.

Όλα τα πτερυγωτά έντομα υποβάλλονται σε διάφορους βαθμούς μεταμορφώσεως, από την προνυμφική στην ενήλικη φάση της ιστορίας της ζωής τους. Μερικά εξωπτερυγωτά, όπως οι κατσαρίδες, παρουσιάζουν μόνο μικρές μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της μετά-εμβρυϊκής ανάπτυξής τους, ενώ σε πολλά ενδοπτερυγωτά, το σώμα αναδημιουργείται κατά ένα μεγάλο μέρος του κατά την διάρκεια της **μεταμορφώσεως** (Gullan & Cranston, 2005).

Μόνο στα ολομετάβολα έντομα η μεταμόρφωση περιλαμβάνει το στάδιο του **πουπαρίου** (pupal stadium), κατά την διάρκεια του οποίου οι δομές του σώματος των ακμαιών διαμορφώνονται από τις προνυμφικές δομές, (Gullan & Cranston, 2005).

Οι αλλαγές στη μορφή του σώματος, επέρχονται από τη διαφορική αύξηση των μελών του. Τα όργανα που θα λειτουργήσουν στο ενήλικο, αλλά δεν είχαν αναπτυχθεί στην προνύμφη, αυξάνονται με γρηγορότερους ρυθμούς. Η επιταχυνόμενη αύξηση των φτερών είναι το προφανέστερο παράδειγμα, αλλά τα πόδια, τα γεννητικά όργανα, οι γονάδες και άλλα εσωτερικά όργανα, μπορούν να αυξηθούν στο μέγεθος και την πολυπλοκότητα στο στάδιο αυτό (Gullan & Cranston, 2005).

Η έναρξη της μεταμόρφωσης συνδέεται με την επίτευξη ενός συγκεκριμένου μεγέθους του σώματος του εντόμου, που θεωρείται ικανό για τον προγραμματισμό του εγκέφαλου, για τη μεταμόρφωση, οδηγώντας έτσι στην αλλαγή των επιπέδων των διαφόρων ορμονών. Η μεταμόρφωση στα περισσότερα σκανθάρια, παρουσιάζει ιδιαίτερη ανεξαρτησία από την επιρροή του εγκέφαλου.

Στα περισσότερα έντομα, μία μείωση του ποσοστού της κυκλοφορίας της ορμόνης νεότητας (JH), ως αποτέλεσμα της μείωσης της δραστηριότητας των *corpora allata*, είναι ουσιαστική για την έναρξη της μεταμόρφωσης.

Κατά την μεταμόρφωση αυτό που εμφανίζεται να είναι νύμφη, είναι ένα πλήρως ανεπτυγμένο ενήλικο, μέσα στην επιδερμίδα του πουπαρίου, το οποίο καλείται και ως **εγκλεισμένο ενήλικο** (Gullan & Cranston, 2005).

Τυπικά, ένα προστατευτικό περίβλημα ή ένα κουκούλι περιβάλλει τις νύμφες των περισσότερων ενηλίκων, με εξαίρεση τα ενήλικα ορισμένων κολεοπτέρων, διπτέρων, λεπιδοπτέρων και υμενοπτέρων.

Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι τύποι νυμφών και αυτοί φαίνεται να έχουν προκύψει κατά ανεξάρτητο πρότυπο στις διάφορες τάξεις των εντόμων. Οι περισσότερες νύμφες είναι **exarate**, τα προσαρτήματά τους δηλαδή (πόδια, φτερά, μέρη του στόματος και κεραίες) είναι συνδεδεμένα με τα σώματα των εγκλεισμένων ενηλίκων. Οι υπόλοιπες, που δεν ανήκουν σε αυτόν τον τύπο ονομάζονται **obtect** νύμφες και τα εξαρτήματά τους είναι ακινητοποιημένα και στενά συνδεδεμένα με το σώμα του εγκλεισμένου ενηλίκου, ενώ η επιδερμίδα τους είναι ισχυρά σκληροποιημένη (σχεδόν σε όλα τα Lepidoptera) (Gullan & Cranston, 2005).

Οι exarate νύμφες μπορεί να έχουν ενισχυμένες τις κάτω γνάθους (decticus), ώστε τα εγκλεισμένα ενήλικα να μπορέσουν να τμήσουν το κουκούλι κατά την έξοδό τους, ή μη ενισχυμένες (adecticus) και σ'αυτή την

περίπτωση το ενήλικο, πρώτα διαρηγνύει την επιδερμίδα και χρησιμοποιεί μετέπειτα τις κάτω γνάθους και τα πόδια του για να δραπετεύσει από το κουκούλι (Gullan & Cranston, 2005).

Η διαφυγή από το πουπάριο, διευκολύνεται από ένα μεμβρανώδη σάκο του κεφαλιού του αναδυόμενου ενηλίκου, το **ptilinum**. Τα έντομα της κατηγορίας των obtect νυμφών, μπορούν να στερηθούν ενός πλήρως διαμορφωμένου κουκουλιού, όπως συμβαίνει στα σκαθάρια της οικογενείας των coccinellidae και στα νηματόκερα και ορθόρραφα δίπτερα. Στα κουκούλια των λεπιδοπτέρων, η διαφυγή επιτυγχάνεται μηχανικά από το σώμα του ενηλίκου, είτε με την βοήθεια προβολών του κεφαλιού, είτε από την έκκριση εξειδικευμένων αποδομητικών ουσιών (Gullan & Cranston, 2005).

### 1.2.6 Ενήλικη φάση.

Εκτός από τα είδη της τάξης των Ephemeroptera, τα έντομα σε γενικές γραμμές δεν εμφανίζουν περαιτέρω εκδύσεις, από την στιγμή όπου έχουν φτάσει στο στάδιο του ενήλικου. Το τελευταίο αυτό στάδιο, έχει αναπαραγωγικό ρόλο και συχνά αποτελεί ένα στάδιο διασποράς, ειδικότερα στα έντομα με σχετικά στατικές προνύμφες (Gullan & Cranston, 2005).

Το ακμαίο, μπορεί να είναι αναπαραγωγικά ικανό σχεδόν αμέσως την έξοδο του από το πουπάριο ή μπορεί να μεσολαβήσει μια περίοδος ωρίμανσης, στο χρονικό διάστημα αναμονής για τη μεταφορά του σπέρματος ή για την ωοαπόθεση.

Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα τροφής, εμφανίζονται διάφοροι αναπαραγωγικοί κύκλοι κατά την διάρκεια του σταδίου του ακμαίου. Τα ενήλικα ορισμένων ειδών, όπως εκείνα της τάξης των Ephemeroptera, ζούν για ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα (Gullan & Cranston, 2005).

Αυτά τα έντομα έχουν ατελώς ή καθόλου σχηματισμένα στοματικά μέλη και πετούν για μόνο μερικές ώρες ή κατ' ανώτατο όριο μια ημέρα ή δύο, ζευγαρώνουν και στην συνέχεια πεθαίνουν. Τα περισσότερα ενήλικα, ζουν τουλάχιστον μερικές εβδομάδες, συχνά μερικούς μήνες και μερικές φορές για αρκετά έτη: οι αναπαραγωγικοί τερμίτες και τα μυρμήγκια και οι βασίλισσες των μελισσών, αποτελούν μερικά από τα μακροβιότερα ενήλικα.

Η ενήλικη ζωή ξεκινά από την στιγμή όπου το ακμαίο διαφεύγει του πουπαρίου. Η μεταμόρφωση, εντούτοις, μπορεί να ολοκληρωθεί σε μερικές ώρες, ημέρες ή εβδομάδες πριν και το εγκλεισμένο ενήλικο μπορεί να παραμείνει στο πουπάριο μέχρις ότου εμφανιστούν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες για την έξοδο του από αυτό (Gullan & Cranston, 2005). Οι αλλαγές στη θερμοκρασία ή στο φως, χημικά σήματα και άλλους παράγοντες, μπορούν να συγχρονίσουν την έξοδο των ενήλικων στα περισσότερα είδη.

Ο ορμονικός έλεγχος της εξόδου έχει μελετηθεί εκτενώς στο έντομο *Manduca sexta* (λεπιδόπτερα: Sphingidae (Gullan & Cranston, 2005). Η περιγραφή των γεγονότων που ακολουθούν την έξοδο, έχει βασιστεί κατά ένα μεγάλο βαθμό στο *M. sexta*, αλλά θεωρούνται παρόμοια και στα υπόλοιπα έντομα.

Μερικές ημέρες πριν από την έξοδο, τα επίπεδα των εκδυστεροειδών μειώνονται και ακολουθεί μια σειρά φυσιολογικών και συμπεριφοριστικών γεγονότων, τα οποία προετοιμάζουν το έντομο για την έκδυση, συμπεριλαμβανομένων και της απελευθέρωσης δύο νευροπεπτιδίων.

Η **ορμόνη επαγωγής της έκδυσης, Ecdysis triggering hormone** (ETH), που εκκρίνεται από τους επιτραχειακούς αδένες ή αλλιώς από τα κύτταρα Inka και η **ορμόνη εξόδου (eclosion hormone, EH)** που εκκρίνεται από τα **νευροεκκριτικά κύτταρα (neurosecretory cells)** του εγκεφάλου, δρουν σε συνδυασμό για την πρόκληση προ-εξώδιας συμπεριφοράς (Gullan & Cranston, 2005).

Η ETH απελευθερώνεται πρώτα και οι ETH και EH υποκινούν την έκκριση της μίας από την άλλη, διαμορφώνοντας έτσι ένα θετικό ανατροφοδοτικό βρόγχο. Η EH επάγει επίσης την απελευθέρωση του

**καρδιοενεργού νευροπεπτιδίου των καρκινοειδών (crustacean cardioactive peptide, CCAP).** Το CCAP αναστέλλει την προ-εξώδια συμπεριφορά, παρεμποδίζοντας δηλαδή τις κοιλιακές συσπάσεις και τις κινήσεις των φτερών καθώς και την επιτάχυνση των καρδιακών παλμών (Gullan & Cranston, 2005).

Η ΕΗ διεγείρει την απελευθέρωση περαιτέρω νευροορμονών, όπως είναι η ορμόνη **bursicon** και τα **καρδιοπεπτίδια**. Τα καρδιοπεπτίδια, ενεργοποιούν τις καρδιακές συσπάσεις, διευκολύνοντας έτσι την μετακίνηση της αιμολέμφου στο θώρακα και κατά συνέπεια στα φτερά. Η Bursicon, προκαλεί μια σύντομη αύξηση στην πλαστικότητα της επιδερμίδας, ώστε να επιτραπεί η επέκταση των φτερών, ακολουθούμενη από σκλήρυνση της επιδερμίδας (Gullan & Cranston, 2005).

Το ενήλικο που εξήλθε από το πουπάριο εμφανίζει μαλακή επιδερμίδα, η οποία επιτρέπει την επέκταση της επιφάνειας του σώματος με άμεση κατάποση του αέρα ή με λήψη του από τους τραχειακούς σάκους και με τοπική αύξηση της πίεσης της αιμολέμφου, ύστερα από έντονη μυϊκή δραστηριότητα. Τα φτερά κρεμιούνται με φορά προς τα κάτω, αυξάνοντας έτσι την εκτασιμότητά τους.

Ο χρωματισμός της επιδερμίδας και των επιδερμικών κυττάρων εμφανίζεται αμέσως πριν ή αμέσως μετά της εξόδου από το πουπάριο και η διαδικασία αυτή συμπίπτει ή προηγείται της σκληροποίησης της επιδερμίδας του σώματος, κάτω από την επιρροή της ορμόνης Bursicon.

Μετά από τον σχηματισμό της επιδερμίδας του πουπαρίου, πολλά ολομετάβολα έντομα απεκκρίνουν ένα περιτωματικό ρευστό αποκαλούμενο **μηκόνιο (meconium)**. Το τελευταίο, αντιπροσωπεύει τα μεταβολικά απόβλητα που είχαν συσσωρευτεί κατά τη διάρκεια του σταδίου της νύμφης. Μερικές φορές, το ενήλικο διατηρεί το meconium στο ορθό έντερο, έως ότου ολοκληρωθεί η σκλήρυνση, βοηθώντας κατά συνέπεια την αύξηση του μεγέθους του σώματος.

Η **αναπαραγωγή** αποτελεί την κύρια δραστηριότητα της ενήλικης ζωής και η διάρκεια του σταδίου αυτού, συμπίπτει με τον χρόνο παραγωγής των αυγών. Η γήρανση, σχετίζεται με την λήξη της αναπαραγωγής και ο θάνατος μπορεί να προκαθορίσει την οντογένεση ενός εντόμου.

Τα θηλυκά μπορεί να πεθάνουν μετά την ωοαπόθεση, ενώ τα αρσενικά μπορεί να πεθάνουν αμέσως μετά από το ζευγάρωμα. Η παρουσία μιας μετα-αναπαραγωγικής ζωής είναι απαραίτητη στα μιμητικά έντομα, επιτρέποντας στους θηρευτές να εκπαιδευτούν με την δυσάρεστη γεύση του θηράματός τους (Gullan & Cranston, 2005).

### 1.2.7 Η διαδικασία και ο έλεγχος της έκδυσης.

**Απόλυση** είναι η διαδικασία κατά την οποία η επιδερμίδα που σχηματίστηκε στο προηγούμενο, διαχωρίζεται από την επιδερμίδα που σχηματίζεται στο επόμενο προνυμφικό στάδιο. Ένα προνυμφικό στάδιο περιορίζεται στο χρονικό διάστημα κατά την διάρκεια του οποίου λαμβάνει χώρα η απόλυση (Gullan & Cranston, 2005).

Η απόλυση είναι δύσκολο να προσδιορισθεί στα περισσότερα έντομα, αλλά η γνώση του χρονικού διαστήματος όπου λαμβάνει χώρα, αποτελεί σημαντικό γεγονός και αυτό διότι πολλά έντομα περνούν μια σημαντική περίοδο στην επιδερμίδα του προηγούμενου προνυμφικού σταδίου, αναμένοντας τις ευνοϊκές συνθήκες για την μετάβαση στο επόμενο προνυμφικό στάδιο.

Τα έντομα συχνά επιζούν των δυσμενών συνθηκών, ως διαπαύουσες νύμφες ή διαπαύοντα ενήλικα, αφού το διπλό στρώμα της επιδερμίδας του πουπαρίου, στην πρώτη περίπτωση περιορίζει την απώλεια νερού κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής περιόδου.

Η **μεταμόρφωση** είναι μια σύνθετη διαδικασία, που περιλαμβάνει ορμονικές, συμπεριφοριστικές και επιδερμικές αλλαγές, που καταλήγουν στην αποβολή της παλαιάς επιδερμίδας. Τα επιδερμικά κύτταρα συμμετέχουν ενεργά στην έκδυση και είναι αρμόδια για τη μερική διάσπαση της παλαιάς και τον σχηματισμό της νέας επιδερμίδας (Gullan & Cranston, 2005).

Η έκδυση ξεκινά με την απόσυρση των επιδερμικών κυττάρων από την εσωτερική επιφάνεια της παλαιάς επιδερμίδας, συνήθως με προσθιοπίσθια κατεύθυνση. Αυτός ο διαχωρισμός δεν είναι ολοκληρωτικός, επειδή οι μύες και τα αισθητήρια νεύρα διατηρούν τη σύνδεσή τους με την παλαιά επιδερμίδα.

Η απόλυση σχετίζεται είτε ακολουθείται από μιτωτικές διαιρέσεις των επιδερμικών κυττάρων, που οδηγούν σε αύξηση του όγκου και της επιφάνειας της επιδερμίδας. Το **υποεπιδερμικό διάστημα** που διαμορφώνεται μετά από την απόλυση, γεμίζει με το εκκρινόμενο αλλά ανενεργό **υγρό έκδυσης** (Gullan & Cranston, 2005).

Τα χιτινολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα του υγρού έκδυσης δεν ενεργοποιούνται, έως ότου σχηματιστεί το προστατευτικό εξωτερικό στρώμα της νέας επιδερμίδας. Κατόπιν, το εσωτερικό μέρος του παλαιού εξωσκελετού **ενδοκουτίκλιο** (endocuticle) λύεται, ενώ η νέα επιδερμίδα συνεχίζει να σχηματίζεται ως αδιαφοροποίητο **προκουτίκλιο** (procuticle) (Gullan & Cranston, 2005).

Η έκδυση ξεκινά με τα υπολείμματα της παλαιάς επιδερμίδας να βρίσκονται διάσπαρτα κατά μήκος του ραχιαίου, ως αποτέλεσμα της αύξησης της πίεσης της αιμολέμφου. Τα υπολείμματα αυτά, αποτελούνται από την πρωτεΐνη **indigestible protein**, από λιπίδια και από την χιτίνη του παλαιού **επι-** και **εξω-κουτίκλιου** (Gullan & Cranston, 2005).

Το έντομο που μόλις έχει υποστεί έκδυση, πλέον χωρίς να περιορίζεται από το προηγούμενο δέρμα, επεκτείνει τη νέα του επιδερμίδα με κατάποση αέρα ή νερού ή/και με την αύξηση της πίεσης της αιμολέμφου στα διάφορα μέλη του σώματος, έτσι ώστε να λειασθεί το ζαρωμένο και αναδιπλωμένο



**επικουτίκλιο** (epicuticle) και να τεντωθεί το **προκουτίκλιο** (Gullan & Cranston, 2005).

Αφού ολοκληρωθεί η επέκταση της επιδερμίδας, τμήμα ή ένα μεγάλο μέρος του προκουτικλίου της επιφάνειας του σώματος, υπόκειται χημική σκλήρυνση και σκούρυνση, έτσι ώστε να διαμορφωθεί το εξωκουτίκλιο.

Εντούτοις στις προνύμφες, το μεγαλύτερο μέρος της επιδερμίδας του σώματος παραμένει μεμβρανώδες και το εξωκουτίκλιο περιορίζεται στην κάψα του κεφαλιού. Μετά από την έκδυση, οι περισσότερες πρωτεΐνες και η χιτίνη εκκρίνονται από τα επιδερμικά κύτταρα και προστίθενται έτσι στο εσωτερικό μέρος του προκουτικλίου το ενδοκουτίκλιο, το οποίο μπορεί να συνεχίσει να εναποτίθεται κατά την περίοδο μεταξύ των διαδοχικών εκδύσεων.

Μερικές φορές το ενδοκουτίκλιο είναι μερικώς σκληροποιημένο, ενώ η εξωτερική επιφάνεια της επιδερμίδας, καλύπτεται από εκκρίσεις κηρών. Στο τέλος, το στάδιο λήγει και ξεκινά η απόλυση ξανά (Gullan & Cranston, 2005).

Τα ανωτέρω γεγονότα ρυθμίζονται από τις διάφορες ορμόνες, οι οποίες ενεργούν στα επιδερμικά κύτταρα για να ελέγξουν τις φυσιολογικές αλλαγές της επιδερμίδας, καθώς και από το νευρικό σύστημα έτσι ώστε να συντονισθεί η συμπεριφορά που συνδέεται με τις εκδύσεις. Η ρύθμιση αυτή, έχει μελετηθεί πύο λεπτομερώς στη μεταμόρφωση, όταν οι ενδοκρινολογικές επιρροές είναι αυτό καθ' εαυτό δύσκολο να διαχωριστούν από τις μορφολογικές. Η κλασσική άποψη της ορμονικής ρύθμισης της μεταμόρφωσης παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 1.2.7.1 (Gullan & Cranston, 2005). Τρεις είναι οι σημαντικότεροι τύποι ορμονών που ελέγχουν τη μεταμόρφωση: Τα νευροπεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων της προθωρακικοτρόπου ορμόνης (PTTH), της ETH και της EH, τα εκδυστεροειδή και η ορμόνη νεότητας (juvenile hormone (JH) (Gullan & Cranston, 2005).

Τα νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου εκκρίνουν την PTTH, η οποία μετακινείται κάτω από τον νευρικό άξονα στα *corpora allata*, ένα ζευγάρι νευροαδενικών σωμάτων, τα οποία αποθηκεύουν και απελευθερώνουν την PTTH στην αιμολέμφο. Η PTTH, υποκινεί τη σύνθεση και την έκκριση εκδυστεροειδών από τους προθωρακικούς αδένες (Gullan & Cranston, 2005).

Η απελευθέρωση των εκδυστεροειδών ξεκινά τις φυσιολογικές εκείνες αλλαγές των επιδερμικών κυττάρων, που οδηγούν στην παραγωγή της νέας επιδερμίδας. Τα χαρακτηριστικά της έκδυσης ρυθμίζονται από την JH των *corpora allata*. Η JH εμποδίζει την έκφραση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του ενηλικού έτσι, ώστε ο υψηλός τίτλος της στην αιμολέμφο να σχετίζεται με την έκδυση μεταξύ δύο προνυμφικών σταδίων, ενώ ένας χαμηλός τίτλος με την έκδυση μεταξύ προνύμφης και νύμφης. Η JH απουσιάζει εντελώς στην έκδυση μεταξύ νύμφης και ενηλικού (Gullan & Cranston, 2005).

Οι εκδύσεις ελέγχονται από τις ETH και EH ορμόνες, ενώ η EH φαίνεται να είναι απαραίτητη σε κάθε έκδυση. Αυτό το νευροπεπτίδιο, λειτουργεί μαζί με τα εκδυστεροειδή στο κεντρικό νευρικό σύστημα, για να προκαλέσει όλες εκείνες τις συντονισμένες φυσιολογικές δραστηριότητες, που σχετίζονται με τη διαφυγή του εντόμου από την παλαιά του επιδερμίδα.

Η EH, έχει πάρει το όνομα της από την λέξη έκδυση ή *eclosion*. Πράγματι, η εμπλοκή της EH στην διαδικασία της έκδυσης φαίνεται να είναι

εξελικτικά συντηρημένα, δεδομένου ότι και σε άλλα αρθρόποδα (π.χ. καρκινοειδή) υπάρχουν ομόλογες EHs (Gullan & Cranston, 2005).

Σε πολλά έντομα, ένα άλλο νευροπεπτίδιο, η bursicon, ελέγχει την σκληροποίηση του εξωκουτικλίου και την απόθεση του ενδοκουτικλίου στο μεσοδιάστημα μεταξύ δύο εκδύσεων.

Η σχέση μεταξύ του ορμονικού περιβάλλοντος και των επιδερμικών δραστηριοτήτων που ελέγχουν την έκδυση και την απόθεση της επιδερμίδας σε ένα λεπιδόπτερο, το *Manduca sexta*, παρουσιάζεται στην εικόνα 1.2.7.2 (Gullan & Cranston, 2005).

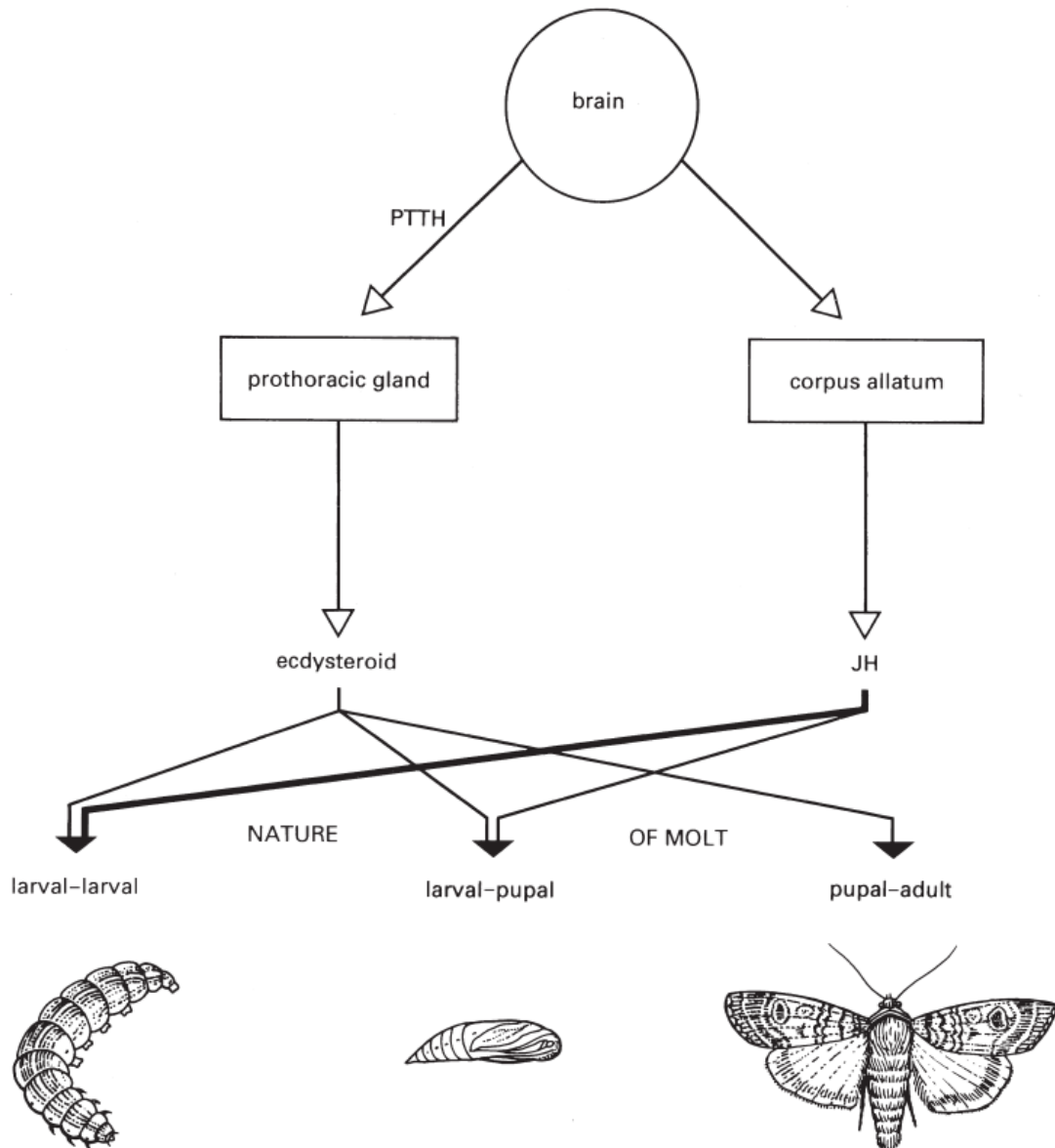
Λεπτομερείς μελέτες στο λεπιδόπτερο αυτό ξεκάθαρα υποδεικνύουν την σχέση μεταξύ των επιπέδων των εκδυστεροειδών και των ορμονών νεότητας, στις αλλαγές της επιδερμίδας που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των δύο τελευταίων προνυμφικών σταδίων και κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, πριν την μετάβαση στο στάδιο της νύμφης.

Κατά τη διάρκεια της έκδυσης, στο τέλος του τέταρτου προνυμφικού σταδίου, η επιδερμίδα αποκρίνεται στο κύμα των εκδυστεροειδών, με διακοπή της σύνθεσης του ενδοκουτικλίου και της μπλε χρωστικής ουσίας ινσεκτικυανίνης (insecticyanin). Ταυτόχρονα συντίθεται νέο επικουτίκλιο, ενώ ένα μεγάλο μέρος της παλαιάς επιδερμίδας αφομοιώνεται από το σώμα. Η επανέναρξη σύνθεσης του ενδοκουτικλίου και της ινσεκτικυανίνης επανεμφανίζεται μετά το πέρας της έκδυσης (Gullan & Cranston, 2005).

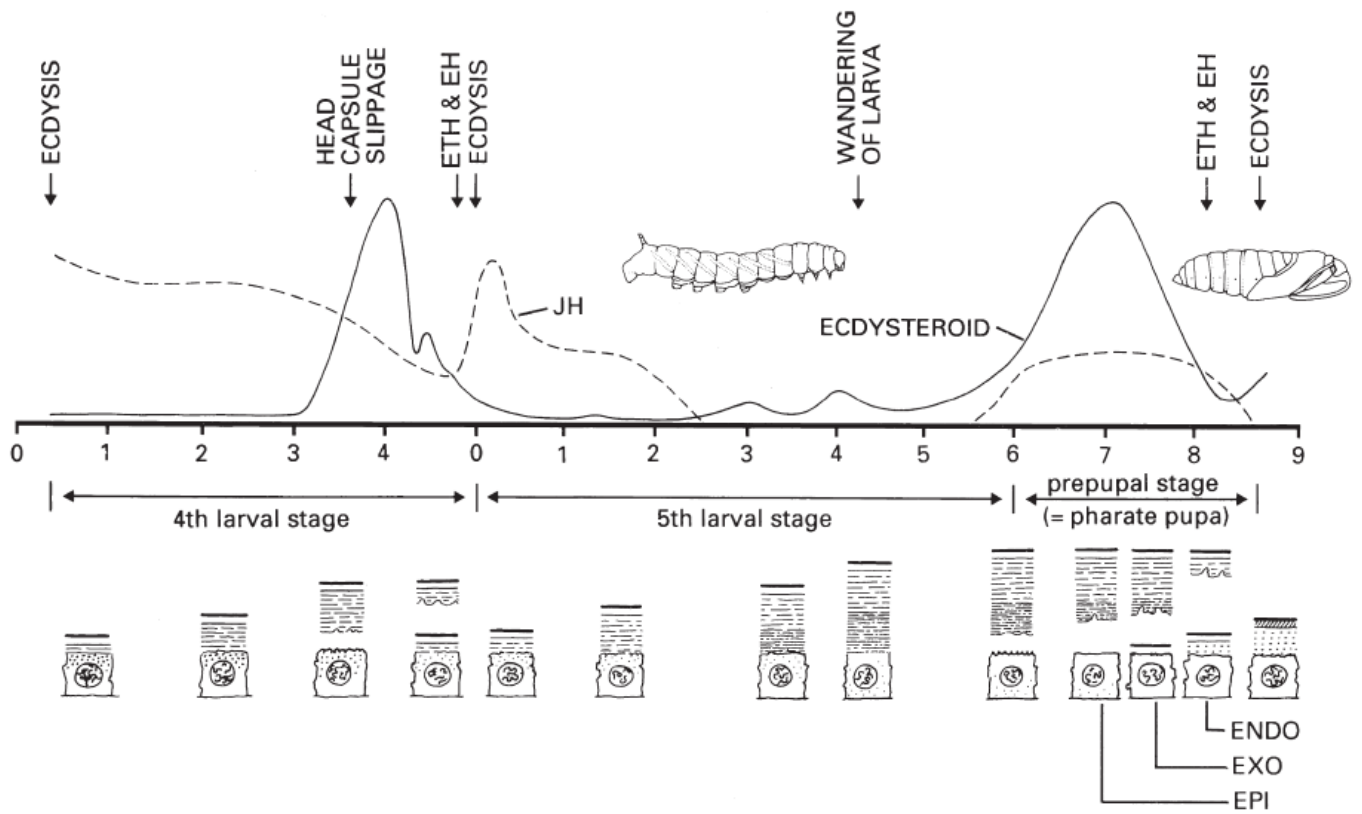
Στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο, η πτώση της JH σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, επιτρέπει την μικρή άνοδο των εκδυστεροειδών σε επίπεδα τέτοια που υποκινούν την επιδερμίδα να παράγει ένα πιο σκληρό εξωσκελετό, ώστε να μειωθεί η κινητικότητα της προνύμφης. Όταν τα εκδυστεροειδή ενεργοποιήσουν την επόμενη έκδυση, τα επιδερμικά κύτταρα παράγουν τον εξωσκελετό της νύμφης, ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης νέων γονιδίων (Gullan & Cranston, 2005).

Η πτώση στα επίπεδα των εκδυστεροειδών, προς το τέλος της κάθε έκδυσης, είναι ουσιαστική και μπορεί να είναι η φυσιολογική εκείνη ώθηση που προκαλεί την έκδυση. Η πτώση αυτή, καθιστά τους ιστούς ευαίσθητους στην δράση της EH και επιτρέπει την απελευθέρωση της EH στην αιμολέμφο.

Η απόλυση στο τέλος του πέμπτου προνυμφικού σταδίου, σηματοδοτεί την έναρξη της περιόδου προετοιμασίας για την μετάβαση στο στάδιο της νύμφης. Διαφοροποιημένο εξωκουτίκλιο και ενδοκουτίκλιο εμφανίζεται σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης (Gullan & Cranston, 2005).



**Εικόνα 1.2.7.1.** Σχηματικό διάγραμμα της κλασικής άποψης του ενδοκρινικού ελέγχου των επιδερμικών διαδικασιών οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την μεταμορφωτική διαδικασία σε ενδοπερυγτώ έντομο. Αυτό το σχήμα απλοποιεί την πολυπλοκότητα της έκκρισης των εκδυστεροειδών και των ορμονών νεότητας και δεν συμπεριλαμβάνει την επιρροή των νευροπεπτιδίων όπως είναι η ΕΗ.



**Εικόνα 1.2.7.2.** Διαγραμματική άποψη της μεταβολικής δραστηριότητας της επιδερμίδας κατά την διάρκεια του τετάρτου, πέμπτου και ρυπαλ σταδίου κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του *M.sexta* σε σχέση με το ορμονικό του περιβάλλον.

### 1.3 Η εστεράση της ορμόνης νεότητας (juvenile hormone esterase, JHE).

Ο έλεγχος του τίτλου των ορμονών νεότητας, στους ιστούς και την αιμολέμφο, απαιτείται για την σωστή μετάβαση του εντόμου στα διάφορα μεταμορφωτικά του στάδια. Ο έλεγχος αυτός, επιτυγχάνεται είτε σε βιοσυνθετικό επίπεδο, είτε μέσω αποδόμησής τους από πλείστα ένζυμα, σημαντικότερα των οποίων είναι οι **εστεράσες της ορμόνης νεότητας (JHEs)**.

Οι **εστεράσες της ορμόνης νεότητας, juvenile hormone esterases (JHE; EC 3.1.1.1)** αποτελούν τα κυριότερα ένζυμα της αιμολέμφου, που αποδομούν τις ορμόνες νεότητας και κατά συνέπεια ρυθμίζουν των τίτλο τους. Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των a/b υδρολασών και είναι υψηλής εκλεκτικότητας ένζυμα, τα οποία διασπούν τις JHs ακόμα και αν αυτές βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Οι JHEs, διαθέτουν ένα συντηρημένο ενεργό κέντρο με γενικό συμβολισμό GxSxG, που ονομάζεται GxSxG μοτίβο, ενώ διαμοιράζονται τον ίδιο καταλυτικό της καταλυτικής τριάδας σερίνης, ιστιδίνης, ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ.

Η συγκέντρωση των ορμονών νεότητας στην αιμολέμφο είναι υψηλή όταν η συγκέντρωση της JHE βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και το αντίθετο. Η JHE συντίθεται στον λιπώδη ιστό και απελευθερώνεται στην αιμολέμφο, ενώ τα επίπεδά της ελέγχονται σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και με αποτοξινωτικούς μηχανισμούς, όπως είναι η αποδόμησή της από τα λυσοσώματα των περικαρδιακών κυττάρων (Shanmugavelu et al., 2000).

Εφαρμογή χημικών αναλόγων των JHs καθώς και αναστολέων των JHEs (TFK,OTFP κλπ), οδηγεί στην δημιουργία γιγαντιαίων προνυμφών, ενώ στα λεπιδόπτερα, στην καθυστέρηση εισόδου στο στάδιο της νύμφης (Abdel et al., 1986).

Σε διαγονιδιακούς μετακοσκώληκες *Bombyx mori*, που υπερεκφράζουν το γονίδιο της *JHE*, καθολικά και από τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια, εμφανίστηκε πρόωρη είσοδος στο στάδιο της νύμφης, 2 προνυμφικά στάδια νωρίτερα σε σχέση με τους αγρίου τύπου μετακοσκώληκες (Anjang et al., 2005).

Στα περισσότερα είδη που έχουν μελετηθεί έως τώρα, έχουν αναφερθεί περισσότερες από μία JHE δραστηριότητες, οι οποίες προσδίδουν ποικιλομορφία στην καταλυτική αποδοτικότητα και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Πέραν του προαναφερθέντος γεγονότος δεν έχει διελευκανθεί ακόμα, εάν τα ένζυμα που προσδίδουν αυτού του είδους την ποικιλομορφία στην ενζυμική δραστηριότητα, αποτελούν προϊόντα διαφορετικών γονιδίων ή προϊόντα διαφορετικής επεξεργασίας από αλληλόμορφους του ίδιου γονιδίου.

Στο λεπιδόπτερο *Trichoplusia ni*, ενώ έχουν χαρακτηριστεί τρία ένζυμα που εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα τύπου JHE, δεν έχει γίνει κατανοητό εάν τα ένζυμα αυτά αποτελούν διαφορετικούς ισόμορφους του ίδιου γονιδίου ή διαφορετικά προϊόντα οικογένειας γονιδίων (Hanzlik et al., 1987). Στο *Aedes aegypti*, έχουν κλωνοποιηθεί τρία cDNAs που διαθέτουν το μοτίβο GQSAG (χαρακτηριστικό όλων των εστερασών των ορμονών νεότητας) και παρ' όλες τις ομοιότητες που παρουσιάζονται στα επίπεδα έκφρασής των γονιδίων αυτών,

κατά τα διάφορα αναπτυξιακά τους στάδια, μόνο ένα από τα τρία κωδικοποιεί για μια λειτουργική JHE (Bai et al., 2007).

Τέλος και στα έντομα *Heliothis virescens* (Hanzlik et al., 1989) και *Drosophila melanogaster* (Campbell et al., 1998), έχουν αναφερθεί στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξη περισσότερων του ενός γονιδίων με JHE δραστηριότητα.

Στον *Gryllus assimillis* έχουν αναφερθεί 4 ισομορφές του μοναδικού κλωνοποιημένου JHE cDNA μεγέθους 1512 bp (Crone et al., 2007). Τα ένζυμα αυτά, χαρακτηρίστηκαν ως ισομορφές και όχι ως προϊόντα οικογένειας γονιδίων, λόγω του ότι οι μοναδικές διαφορές που παρατηρήθηκαν σε αμινοξικό επίπεδο, εντοπίστηκαν σε μερικά από τα αμινοξικά κατάλοιπα του N' άκρου της ώριμης πρωτεΐνης. Στον ίδιο οργανισμό, ύστερα από εφαρμογή πειραμάτων κλασσικής γενετικής, δημιουργήθηκαν δύο σειρές εντόμων (Zera et al., 1995). Η πρώτη σειρά που δημιουργήθηκε, επιλέχθηκε για υψηλή, ενώ η δεύτερη για χαμηλή JHE δραστηριότητα. Από τις σειρές αυτές απομονώθηκαν κλώνοι του γονιδίου, ώστε να διευκρινιστεί εάν οι διαφορές που εντοπίστηκαν στην ενζυμική δραστηριότητα στους ιστούς των εντόμων, ήταν αποτέλεσμα νουκλεοτιδικών διαφορών σε επίπεδο DNA. Από την αλληλούχηση των γονιδίων προέκυψε, ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην καταλυτική αποδοτικότητα της ή των JHE/JHEs, δεν οφείλονταν σε κάποια νουκλεοτιδική ποικιλομορφία των κωδικών περιοχών, όπως θα ήταν λογικά αναμενόμενο. Η μοναδική διαφορά που εντοπίστηκε, ήταν η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού τύπου indel, μεγέθους 19 bp στο δεύτερο ιντρόνιο (του 3' άκρου), στα άτομα μόνο των σειρών εκείνων που επιλέχθηκαν για υψηλή JHE δραστηριότητα. Ο πολυμορφισμός αυτός δεν προκαλούσε κάποια ποικιλομορφία στην αμινοξική ακολουθία και κατά συνέπεια στην καταλυτική αποδοτικότητα της ώριμης πρωτεΐνης, αλλά ενίσχυε τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου, στις σειρές εκείνες που επιλέχθηκαν για υψηλή JHE δραστηριότητα.

#### 1.4. Ταξινόμηση του εντόμου *S.nonagrioides*.

Το είδος *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera-Noctuidae), περιέγραψε για πρώτη φορά ο Lefebvre το 1827, δίνοντάς του το όνομα *Cossus nonagrioides*. Το 1852 ο Guenne κατατάσσει το έντομο στο γένος *Sesamia*. Το 1934, οι Rossi & Turati αναφερόμενοι στο είδος αυτό το κατατάσσουν στο *Sesamia vuteria* Stroll, δίνοντας σε παρένθεση σαν συνώνυμο το nonagrioides, συνωνυμία την οποία διευκρινίζει αργότερα ο Μπαρτζάκης (1970). Για το είδος αυτό υπήρχε σύγχυση όσον αφορά την ταυτότητά του, λόγω των διάφορων συνωνύμων, μερικά από τα οποία αφορούν άλλα είδη του γένους *Sesamia*. Μετά από συνεχείς αλλαγές, το έντομο τοποθετήθηκε εκ νέου στο γένος *Sesamia* από τους Tams & Bowden (1953). Σήμερα γίνεται αποδεκτή η ακόλουθη ταξινομική θέση του εντόμου:

<b>Κλάση</b>	:Insecta
<b>Τάξη</b>	:Lepidoptera
<b>Υπόταξη</b>	:Heteroneura
<b>Οικογένεια</b>	:Noctuidae
<b>Γένος</b>	: <i>Sesamia</i>
<b>Είδος</b>	: <i>Sesamia nonagrioides</i> (Lef.).

Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά του εντόμου γίνεται από τον Σ. Καλογερέα (1930) σε κατάλογο εντόμων, τα οποία συνέλεξε κατά το διάστημα 1924-1927 στη Λάρισα. Ενδεχομένως το είδος να υπήρχε προηγουμένως, αφού ο Rebel (1916) αναφέρει ότι το είδος *S. cretica* βρέθηκε στην Κρήτη από τον συλλέκτη Frivaldskys, που από τον Freyer θεωρήθηκε ότι επρόκειτο για το είδος *S. hesperica* Rbr., συνώνυμο του είδους *S. nonagrioides*.

Οι Rossi & Turati (1934) αναφέρουν την ύπαρξη του γένους και στην Ελλάδα, χωρίς ωστόσο να καταγράφουν συγκεκριμένες περιοχές που απαντά. Το 1939 ο Ισαακίδης σε κατάλογο εντόμων αναφέρει την ύπαρξη άλλου είδους του ίδιου γένους και συγκεκριμένα την *S. cretica*. Αναφορά του *S. cretica* γίνεται επίσης από τον Πελεκάση το 1962, σε αντίστοιχο κατάλογο εντόμων της περιόδου 1932-1962, χωρίς να αναφέρεται η ύπαρξη του *S. nonagrioides*. Ο Σταυράκης το 1967 ανέφερε ότι ο κυριότερος εχθρός του αραβόσιπου είναι το είδος *S. Nonagrioides*, καταγράφοντας ωστόσο και την ύπαρξη του *S. cretica*. Τελευταία στην Ελλάδα δεν έχει αναφερθεί το είδος *S. cretica*. Όλες οι ερευνητικές εργασίες αναφέρονται στο *S. nonagrioides*.

### **1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας.**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και ο μοριακός χαρακτηρισμός γονιδίων που κωδικοποιούν για εστεράσες των ορμονών νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides*.

Λόγω της σημαντικότητας των ενζύμων αυτών για τον σχεδιασμό εντομοκτόνων, αλλά και για την φυσιολογική λειτουργία των εντόμων, η διελεύκανση σε πρώτη φάση της οργάνωσής τους σε επίπεδο γονιδιώματος και μεταγραφώματος, αφ' ενός μόν θα αποτελούσε το πρώτο βήμα για την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους σε μία βιοτεχνολογική προσέγγιση παραγωγής εντομοκτόνων, αφ' ετέρου δέ θα αποτελούσε το απαραίτητο εκείνο πρωταρχικό στάδιο, για την περαιτέρω μελέτη τους σε επίπεδα λειτουργικής γονιδιωματικής και αναπτυξιακής βιολογίας.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Τα έντομα και ο χειρισμός τους.

Η αποικία του εντόμου *Sesamia nonagrioides*, τμήμα της οποίας χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό υλικό, προήλθε από συλλογή φυσικού πληθυσμού στην περιοχή της Κωπαΐδας. Τα έντομα στο εργαστήριο διατηρούνται σε συνθήκες θερμοκρασίας  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , φωτοπεριόδου 16 ώρες φωτόφαση-8 ώρες σκοτόφαση και σχετικής υγρασίας 60-70%. Τα έντομα που πρόκειται να εισέλθουν σε διάπαυση διατηρούνται στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας αλλά σε φωτοπερίοδο βραχείας ημέρας δηλαδή 10 ώρες φωτόφαση και 14 ώρες σκοτόφαση.

Τα τέλεια του εντόμου της εργαστηριακής εκτροφής διατηρούνται σε ξύλινα κλουβιά. Σε κάθε κλουβί τοποθετούνται 15 περίπου ζευγάρια εντόμων και μικρά φυτά καλαμποκιού 20-25 cm. Στον κολεό των φύλλων των τελευταίων, τα θηλυκά άτομα εναποθέτουν τα αυγά τους. Στα ακμαία προσφέρεται νερό με οδοντιατρικά τεμάχια βάμβακος που τοποθετούνται σε μικρά ποτήρια με νερό (3-4/κλουβί). Η συλλογή των αυγών γίνεται καθημερινά από τα φυτά. Τα αυγά τοποθετούνται για επώαση σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm, πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με προπιονικό οξύ 3‰ για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Μετά την εκκόλαψη οι νεαρές προνύμφες τοποθετούνται σε πλαστικά διαφανή κουτιά σε ομάδες 20-30 ατόμων πάνω σε θρεπτικό τεχνητό υπόστρωμα (Tsitsipis, 1984). Μια φορά την εβδομάδα οι προνύμφες μεταφέρονται σε καθαρά κουτιά με νέο τεχνητό υπόστρωμα. Στις συνθήκες αυτές η διάρκεια ζωής των τέλειων είναι 10 περίπου ημέρες, η επώαση των αυγών πραγματοποιείται σε 6-7 ημέρες ενώ η προνυμφική ζωή έχει διάρκεια 30-40 ημέρες. Το ρυπαρό στάδιο στις ίδιες συνθήκες διαρκεί 10 περίπου ημέρες.

## 2.2 Μοριακές τεχνικές.

### 2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.

#### Διαλύματα:

**Extraction buffer:** 0.1M Tris-HCl pH=8.0, 0.05M EDTA pH=8.0, 0.5M NaCl.

Για **200ml EB:** 20 ml 1M Tris-HCl pH=8.0, 20 ml 0.5M EDTA pH=8.0, 100 ml NaCl 1M, 60 ml ddH<sub>2</sub>O.

**8M CH<sub>3</sub>COOK:** 78.52 g CH<sub>3</sub>COOK σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

(Το αλάτι θα πρέπει να διαλυθεί πρώτα στο μικρότερο δυνατό όγκο και μετά να προστεθεί η υπόλοιπη ποσότητα νερού).

#### **0.7M SDS:**

20.2 g SDS σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

(Η διάλυση θα πρέπει να γίνει σε απαγωγό για την αποφυγή πνιγμού).

#### **0.5M EDTA pH=8.00:**

186.1 g disodium EDTA2H<sub>2</sub>O σε 800 ml ddH<sub>2</sub>O.  
pH=8.0 με προσθήκη NaOH pellets (20 g NaOH).

#### Διαδικασία:

- 50 mg ιστού προστίθενται σε erpendorf 1.5 ml και συμπληρώνονται με 300 μl EB, 50 μl 0.7M SDS (20.2% w/v).
- Ομογενοποιούνται με πλαστικό γουδί και επωάζονται στους 65°C για 10 min.
- Προστίθενται 80 μl 8M CH<sub>3</sub>COOK και το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 10.000 rpm για 20 min στους 4°C.
- Το υπερκείμενο προστίθεται σε νέο erpendorf 1.5 ml και συμπληρώνεται με 0.6 όγκους ισοπροπανόλης.
- Το μίγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά φυγοκεντρείται για 5 min στις 13.000 rpm.
- Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 70%v/v αιθανόλη.

- Η αιθανόλη αφαιρείται, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε 30  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O.

\*Εάν οι ίνες του gDNA είναι ορατές στο 5<sup>ο</sup> βήμα, προκειμένου να αυξηθεί η καθαρότητα του μπορεί να αφαιρεθεί με οδοντογλυφίδα ή τιπάκι μικροπιπέτας να τοποθετηθεί σε καινούργιο erpendorf 1.5 ml και αφού στεγνώσει και αφαιρεθούν εντελώς τα υπολείμματα της ισοπροπανόλης να επαναδιαλυθεί σε 30  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.2 Phenol/Chloroform treatment.

Για **400 μl δείγματος**:

- Πρόσθεση 400 μl φαινόλης έντονη ανακίνηση, φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf 1.5 ml και προστίθεται ένας όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο (πχ.για 400 μl δείγματος: 200 μl phenol:200 μl chloroform).
- Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf 1.5 ml, ογκομετρείται και προστίθεται ένας όγκος χλωροφόρμιο.
- Φυγοκέντριση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf 1.5 ml, ογκομετρείται και προστίθεται 1/10 του όγκου του  $\text{CH}_3\text{COONa}$  3M pH=5.2, 2.5 όγκοι 100% v/v αιθανόλη και αν πρόκειται για RNA αφείνεται O/N στους  $-20^\circ\text{C}$  και φυγοκεντρείται την επομένη στις 13.000 rpm για 30 min στους  $4^\circ\text{C}$  ενώ εάν πρόκειται για DNA φυγοκεντρείται άμεσα στις 13.000 rpm για 30 min στους  $4^\circ\text{C}$ .
- Τα ιζήματα αφού αφαιρεθεί η αιθανόλη και αφεθούν να στεγνώσουν επαναδιαλύονται σε 15-30 μl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης εκκυλισμάτων DNA/RNA με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας.

Τα εκκυλίσματα των DNA/RNA που απομονώνονται προσδιορίζονται ποσοτικά με την μέθοδο της φασμοτοσκοπίας υπεριώδους (UV). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA) να απορροφούν σε  $\lambda_{max}=260$  nm, των πρωτεϊνών στα 280 nm ενώ των φαινολικών στα 240 nm. Ποιοτικά κριτήρια της καθαρότητας των απομονωμένων RNAs είναι η αναλογία απορρόφησης μεταξύ νουκλεϊνικών οξέων φαινολικών και πρωτεϊνών. Το κλάσμα δηλαδή  $abs(260nm):abs(280nm)=1.8-2$  και  $abs(260nm):abs(240nm)>1$ .

Σε γενικές γραμμές η διαδικασία μπορεί να περιγραφεί ως εξής :

- 500  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O φωτομετρούνται στα 260 nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται.
- Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 240 και 280 nm και καταγράφονται οι Abs.
- 5  $\mu$ l δείγματος διαλύεται σε 495  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O και τοποθετείται σε κυψελίδα χαλαζία.
- Ακολουθεί φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) στα 260, 240 και 280 nm.
- Από τις τιμές που θα προκύψουν αφαιρούνται οι απορροφήσεις του νερού στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

Παράδειγμα:

(nm)	Blank <sub>abs</sub>	Δείγμα <sub>abs</sub>	Τελικό
260	0	0.371	0.371-0
280	-0.029	0.180	0.180-(-0.029)
240	0.062	0.324	0.324-(0.062)

- Ακολουθεί η εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του δείγματος.
- Η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων στο δείγμα υπολογίζεται από τον τύπο:

$$[RNA](\mu\text{g/ml}) = \text{ABS}_{260\text{nm}} \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

$$[DNA](\mu\text{g/ml}) = \text{ABS}_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

Όπου dilution factor είναι η αναλογία του τελικού όγκου στην κυψελίδα προς τον όγκο του δείγματος που διαλύθηκε για να γίνει η φωτομέτρηση. Η συνήθης πρακτική διάλυσης 5  $\mu$ l δείγματος σε 495  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O δίνει έναν dilution factor της τάξης του 100.

#### **2.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό εντόμου με χρήση του φαινολικού αντιδραστηρίου (TRIzol).**

Το αντιδραστήριο TRIzol®, Invitrogen περιέχει φαινόλη και το χημικό αντιδραστήριο Guanidinium thiocyanate (GITC). Το τελευταίο αποτελεί καυτροπικό παράγοντα ο οποίος αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, βοηθώντας έτσι την λύση των κυττάρων. Η αποδιατακτική των πρωτεϊνών του ικανότητα είναι χρήσιμη για την απομόνωση των RNAs αφού αναστέλλει την δράση των RNAsών (και των DNAsών) καταστρέφοντάς τες. Έτσι ολιγοπληθή και ευάλωτα RNA μόρια όπως είναι τα mRNAs προστατεύονται καλύτερα από την δράση των RNAsών διευκολύνοντας την περαιτέρω χρήση τους.

- Οι ιστοί ζυγίζονται και τοποθετούνται στον πάγο για 5 min.
- Απαραίτητη ποσότητα ιστού και αντιδραστηρίου TRIzol τοποθετούνται σε erpendorf 1.5 ml σε αναλογία 50 mg ιστού:1000 μl TRIzol .
- Ακολουθεί ομογενοποίηση με χρήση πλαστικού γουδιού.
- Στο erpendorf με τον ομογενοποιημένο ιστό προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία 200 μl Χλωροφόρμιο:1000 μl TRIzol.
- Ακολουθεί έντονη ανακίνηση και το erpendorf τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά.
- Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm στους 4°C για 20 min.
- Ακολούθως γίνεται μεταφορά της υδατινής φάσης σε καινούριο erpendorf 1.5 ml και σε αυτό προστίθεται ισοπροπυλική αλκοόλη σε αναλογία 500 μl ισοπροπυλική αλκοόλη:1000 μl TRIzol.
- Το μίγμα τοποθετείται στους -20°C για 60 min.
- Αμέσως μετά το πέρας των 60 min ακολουθεί φυγοκέντριση στις 10.000 rpm για 20 min στους 4°C.
- Το περιεχόμενο του erpendorf απομακρύνεται ενώ στο εναπομείναν ίζημα προστίθενται 800 μl αιθανόλης 100%v/v.
- Ακολουθεί ανάδευση με μηχανήμα Vortex και φυγοκέντριση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4°C .
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης απομακρύνεται η αλκοόλη και το erpendorf αφήνεται να στεγνώσει στον πάγο.

- Τέλος γίνεται επαναδιάλυση των RNAs με προσθήκη 15-30  $\mu$ l δια-  
απεσταγμένου/αποστειρωμένου νερού και αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.5 DNase Treatment.

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα των πειραμάτων όπου θα χρησιμοποιηθούν τα εκχυλισμένα RNAs απαραίτητη είναι η καταστροφή των εναπομεινάντων στο εκχύλισμα υπολλειμάτων DNA με το ένζυμο RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Το ένζυμο αυτό είναι μία DNaseI (ενδονουκλεάση) και διασπά μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA παράγοντας 3'-OH ολιγονουκλεοτίδια. 1 unit της RQ1 RNase-Free DNase καταστρέφει εντελώς 1 μg γενωματικού DNA λ φάγου εντός 10 min στους 37° C σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 40mM Tris HCl, 10mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub> και 10mM CaCl<sub>2</sub>.

#### **Για 25 μg RNA:**

- Σε eppendorf 1.5 ml προστίθενται 5 μl 10X DNase buffer [400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO<sub>4</sub> και 10mM CaCl<sub>2</sub>].
- Προσθήκη 5 μl DNase (1U/μl) (40units).
- 1 μl RNase inhibitor (40U) (1 unit αναστέλλει το 50% της δραστηριότητας 5 ng RNase).
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 50 μl.
- Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 60 min.
- Αύξηση του όγκου στα 400 μl με προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας ddH<sub>2</sub>O (350 μl).
- Phenol/Chloroform treatment.



### **2.2.6 Παρασκευή cDNA από ολικό RNA με την μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφής.**

Το ένζυμο SuperScript™II Reverse Transcriptase είναι μία μεταγραφάση με μειωμένη RNaseH δραστηριότητα και υψηλή θερμική αντοχή. Είναι ένα ένζυμο που έχει απομονωθεί από μετασχηματισμένα με το γονίδιο pol (Moloney Murine Leukemia Virus) κύτταρα *E.coli*. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση cDNA σε υψηλές θερμοκρασίες παρουσιάζοντας υψηλή εξειδίκευση ικανό να συνθέσει cDNA μεγέθους μεγαλύτερο από 12.3kb.

Η διαδικασία παρασκευής των cDNA χωρίζεται σε δύο διακριτά στάδια τα οποία μπορούν να περιγραφούν ως εξής:

#### **Αποδιάταξη RNA:**

##### **Σε PCR tube,**

- Προστίθενται 3  $\mu\text{l}$  (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) από 10 $\mu\text{M}$  OligodT<sub>12-18</sub>
- 1.5  $\mu\text{g}$  ολικό RNA
- 5  $\mu\text{l}$  dNTPs, 10mM
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 12  $\mu\text{l}$
- Το δείγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 min και στην συνέχεια τοποθετείται αμέσως στον πάγο.

#### **Παρασκευή cDNA:**

- Προστίθενται 4  $\mu\text{l}$  από 5x First Stand Buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3 σε θερμοκρασία δωματίου, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) και 2  $\mu\text{l}$  από 0,1M DTT.
- Για την παρεμπόδιση των RNασών προστίθεται 1  $\mu\text{l}$  από το ένζυμο RNase OUT [40 units/ $\mu\text{l}$ , (Cat. No. 10777-019)].
- Τέλος προστίθεται 1  $\mu\text{l}$  (200 units) από το ένζυμο Superscript II RT και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 20  $\mu\text{l}$ .
- Γίνεται επώαση σε συσκευή PCR για 60 min στους 42°C και για 15 min στους 70°C για την παύση της αντίδρασης.
- Το προϊόν της RT για να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε αντιδράσεις PCR πρέπει να διαλυθεί με ddH<sub>2</sub>O σε τελικό όγκο 50  $\mu\text{l}$ .

\*\*Για την αφαίρεση του συμπληρωματικού RNA μπορεί να προστεθεί 1  $\mu\text{l}$  από την *E.Coli* RNaseH (2 units) και στην συνέχεια επώαση στους 37°C για 2 min.

### **2.2.7 Παρασκευή dNTPs mix.**

Μίγμα δεσόξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs mix) σε κατάλληλη συγκέντρωση είναι απαραίτητο τόσο για τις αντιδράσεις PCR όσο και για την ανάστροφη μεταγραφή των mRNAs σε cDNA.

I. Για τις αντιδράσεις PCR η αναγκαία συγκέντρωση των dNTPs σε 50  $\mu$ l όγκο αντίδρασης είναι 0.2mM και γι' αυτό κρατείται dNTPs mix stock συγκέντρωσης 2mM.

Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται ως εξής :

- Από εμπορικό stock συγκέντρωσης 100mM προστίθεται σε eppendorf 1.5 ml, 4  $\mu$ l dATPs, 4  $\mu$ l dCTPs, 4  $\mu$ l dGTPs, 4  $\mu$ l dTTPs και 184  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

II. Για τις αντιδράσεις ανάστροφης μεταγραφής των mRNAs σε κρατείται dNTPs mix stock συγκέντρωσης 10mM.

Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται ως εξής:

- Από εμπορικό stock συγκέντρωσης 100mM προστίθενται σε eppendorf 1.5 ml, 10  $\mu$ l dATPs, 10  $\mu$ l dCTPs, 10  $\mu$ l dGTPs, 10  $\mu$ l dTTPs και 60  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.

## 2.2.8 Southern Hybridization.

### 2.2.8.1 Μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων σε πλαστική μεμβράνη.

#### Απαραίτητα διαλύματα:

**Denaturation solution:** 0.5M NaOH, 1.5M NaCl.

**1600 ml:** 32 g NaOH pellets, 140.256 g NaCl, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 1600 ml.

**1000 ml:** 20 g NaOH pellets, 87.66 g NaCl, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 1000 ml.

**Neutralization solution:** 1M Tris (Trizma®), 1.5M NaCl, pH=7.5.

**1600 ml:** 193.824 g Tris(Trizma®), 140.256 g NaCl, pH=7.5, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 1600 ml.

**1000 ml:** 121.14 g Tris (Trizma®), 87.66 g NaCl, pH=7.5, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 1600 ml.

**20XSSC:** 3M NaCl, 0.3M Sodium Citrate, pH=7.0.

175.3 g NaCl, 88.2 g Sodium Citrate, pH=7.0, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 1000ml.

#### Depurination solution

0.2 N HCl

### **Ανοδική μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων με διαβάθμιση αλατότητας:**

Τα τμήματα του DNA μεταφέρονται από το gel σε ανοδική τριχοειδή ροή ρευστού και εναποτίθενται σε στερεή φάση. Το ποσοστό της μεταφοράς εξαρτάται από το μέγεθος των DNA τμημάτων και την συγκέντρωση της αγαρόζης.

Μικρά τμήματα DNA (<1Kb) μεταφέρονται ποσοτικά από gel 0.7% σε μία ώρα περίπου ενώ μεγαλύτερα τμήματα >15kb χρειάζονται τουλάχιστον 18 ώρες. Η αποδοτικότητα της μεταφοράς μεγάλων τμημάτων DNA προσδιορίζεται από το ποσοστό των μορίων τα οποία διαφεύγουν από το gel πριν αυτό αφυδατωθεί.

Καθώς η έκλυση συνεχίζεται η εξάτμιση δεν λαμβάνει χώρα μόνο από το δοχείο αλλά και από το ίδιο το gel. Το πρόβλημα καθυστέρησης της μεταφοράς των νουκλεϊνικών οξέων από το gel στην στερεή φάση μπορεί να ξεπεραστεί με μερική υδρόλυση με οξύ ή βάση του DNA πριν την μεταφορά. Το DNA στο gel εκτίθεται σε ασθενές οξύ οδηγώντας σε μερική αποπουρινοποίηση ακολουθούμενη από ισχυρή βάση η οποία υδρολύει τον φωσφοδιεστερικό σκελετό στα σημεία που έχει επιτευχθεί η αποπουρινοποίηση.

Τα προκύπτοντα τμήματα (περίπου ίσα με 1kb) μπορούν και μεταφέρονται ταχίστως από το gel με υψηλή αποδοτικότητα. Η αποπουρινοποίηση δεν πρέπει να διαρκέσει περισσότερο από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα αλλιώς τα προκύπτοντα DNA τμήματα θα είναι πολύ μικρά για να προσδεθούν επαρκώς στην στερεή φάση.

### **Διαδικασία:**

#### **Απομόνωση γενωματικού DNA από ολόκληρο έντομο:**

Η επιθυμητή συγκέντρωση που θα φορτωθεί στο gel για την μεταφορά είναι 15 μg. Η διάλυση του DNA θα πρέπει να γίνει στον μικρότερο δυνατό όγκο ώστε να χωρέσει στα πηγάδια φόρτωσης του gel.

#### **Πέψη Γενωματικού DNA:**

Τα 15 μg DNA τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml και προστίθενται 5 μl από το 10X buffer του κάθε ενζύμου περιορισμού, 8 μl RNase, 5 μl BSA εάν απαιτείται, 2.5 μl του ενζύμου περιορισμού και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 48.5 μl. Το μίγμα τοποθετείται στους 37°C O/N. Την επόμενη ημέρα προστίθεται 1.5 μl από το ένζυμο περιορισμού και επωάζεται στους 37°C για 1<sup>1/2</sup> με δύο ώρες επιπλέον.

### **Παρασκευή πηκτής αγαρόζης:**

0.7% gel αγαρόζης παρασκευάζεται ως εξής:

1.4 g αγαρόζης διαλύονται σε 210 ml ddH<sub>2</sub>O (14 ml περισσότερο από το απαιτούμενο για την αποφυγή αύξησης της περιεκτικότητας σε αγαρόζη ύστερα από τον βρασμό) και προστίθενται 4 ml 50X TAE και 10 μl EtBr 5 mg/ml dH<sub>2</sub>O.

Το gel διαμορφώνεται σε κατάλληλο καλούπι και το συνολικό του ύψος θα πρέπει να μην ξεπερνά τα 0.5 cm.

### **Ηλεκτροφόρηση:**

Και τα 50 μl των πέψων φορτώνονται μαζί με 1.5 μl 6X loading dye. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται O/N στα 15-20V ή 10-12 ώρες στα 30V. Προστίθεται και marker.

### **Blotting:**

Η στερέη φάση είναι πλαστική μεμβράνη θετικά φορτισμένη και η μεταφορά γίνεται σε αλκαλικό περιβάλλον.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το gel φωτογραφίζεται κόπτονται με νυστέρι τα περιττά σημεία όπως είναι τα πηγάδια φορτώματος και τα κενά lanes, μετριώνται οι διαστάσεις του και φωτογραφίζεται ξανά με γνώμονα στα πλάγια του ώστε να είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του μεγέθους του. Ο marker μπορεί να μην αφαιρεθεί και να παραμείνει κατά την μεταφορά και τον υβριδισμό.

- Όλη η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA υδρολύεται μερικώς με μεταφορά του gel σε 0.2N HCl για 15 min. Το διάλυμα αποπουρινοποίησης αποχύνεται και προστίθεται κανούργιο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 10 min επιπλέον. Το στάδιο αυτό έχει σκοπό την τμηματοποίηση μεγάλων τμημάτων DNA που είναι δύσκολο να μεταφερθούν. Αν τα τμήματα του DNA που πρόκειται να μεταφερθούν είναι μικρά (0.1-3 kb) το στάδιο αυτό μπορεί να παραλειφθεί (\*σημ: στο στάδιο αυτό εάν η αποπουρινοποίηση έχει ολοκληρωθεί οι χρωστικές του loading dye μεταχρωματίζονται σε κίτρινο-πράσινο χρώμα).
- Το gel ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος αποδιάταξης και το gel επωάζεται για 30 λεπτά. Το διάλυμα αποχύνεται και προστίθεται κανούργιο διάλυμα αποδιάταξης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 30 min επιπλέον.
- Το gel ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα εξουδετέρωσης και το gel επωάζεται σε αυτό για 30 λεπτά. Το διάλυμα αποχύνεται και προστίθεται κανούργιο διάλυμα εξουδετέρωσης και η

διαδικασία επαναλαμβάνεται για 30 min επιπλέον (\*σημ: στο στάδιο αυτό οι χρωστικές του loading dye επανέρχονται στο αρχικό τους χρώμα).

- Πριν το πέρας του δεύτερου ημιώρου ετοιμάζεται η διάταξη της μεταφοράς και προστίθεται στην πηγή τροφοδοσίας 20XSSC ποσότητα ίση με 3-4 φορές τον όγκο του gel.
- Προετοιμάζονται 2 γέφυρες whatman διηθητικού χαρτιού οι οποίες έχουν ίδιο πλάτος με εκείνο του gel αλλά μεγαλύτερο μήκος από αυτό ώστε να μπορούν να έρχονται συνέχεια σε επαφή με το 20XSSC. Οι γέφυρες αφήνονται να διαβραχούν ύστερα από απορρόφηση του 20XSSC από την τροφοδοσία.
- Προετοιμάζονται καρτοπετσέτες εμπορίου συνολικού ύψους 2.5-3 cm και κόβονται σε διαστάσεις όμοιες με εκείνες του gel. Προετοιμάζονται καρτοπετσέτες μεγαλύτερου μήκους και πλάτους από εκείνες του gel, ύψους 5-6 cm.
- Κόβονται 3 whatman και η πλαστική μεμβράνη σε διαστάσεις όμοιες με εκείνες του gel.
- 5 min πριν το πέρας του 2<sup>ου</sup> ημιώρου της επώασης του gel στο διάλυμα εξουδετέρωσης η μεμβράνη και το ένα whatman διαβρέχονται σε 6XSSC.
- Μετά το πέρας του ημιώρου το gel τοποθετείται στις δύο γέφυρες της διάταξης με την πλευρά που φορτώθηκαν τα δείγματα προς τα κάτω.
- Απομακρύνονται οι φυσαλίδες μεταξύ γέφυρας και gel εφαρμόζοντας πίεση με γυάλινη πιπέτα και προστίθεται η πλαστική μεμβράνη. Απομακρύνονται οι φυσαλίδες μεταξύ gel και μεμβράνης εφαρμόζοντας πίεση ξανά με γυάλινη πιπέτα.
- Τοποθετείται το διαβρεγμένο με 6XSSC whatman paper αφαιρείται ο αέρας και στην συνέχεια τοποθετούνται τα δύο άλλα στεγνά whatman papers αφαιρώντας πάλι τον αέρα κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως.
- Οι περιοχές του διηθητικού χαρτιού οι οποίες δεν καλύπτονται από το gel, καλύπτονται με πλαστική μεμβράνη ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα διέλευσης του διαλύματος μεταφοράς μέσω αυτών.
- Τέλος τοποθετούνται οι καρτοπετσέτες του ίδιου μεγέθους με εκείνο του gel και οι καρτοπετσέτες του μεγαλύτερου μεγέθους προσέχοντας να μην έρθουν σε επαφή με το διάλυμα μεταφοράς.
- Στο τέρμα της διάταξης τοποθετείται τζάμι ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση από τις καρτοπετσέτες και τέλος βάρος 400 g.

- Η μεταφορά γίνεται O/N και την επόμενη οι καρτοπετσέτες αντικαθίστανται από καινούργιες και η μεταφορά συνεχίζεται για 2 ώρες επιπλέον.

Μετά την μεταφορά η μεμβράνη τοποθετείται σε στεγνό whatman με την πλευρά που εφαιπτόταν στο gel προς τα επάνω και με ψαλίδι κόπτεται η πάνω αριστερή γωνία της ώστε να αναγνωρίζεται ανά πάσα στιγμή η πλευρά στην οποία έχει ακινητοποιηθεί το DNA.

Στην συνέχεια ξεπλένεται σε 2XSSC τοποθετείται σε στεγνό whatman και αφήνεται να στεγνώσει σε RT για 30min με την πλευρά του DNA προς τα επάνω.

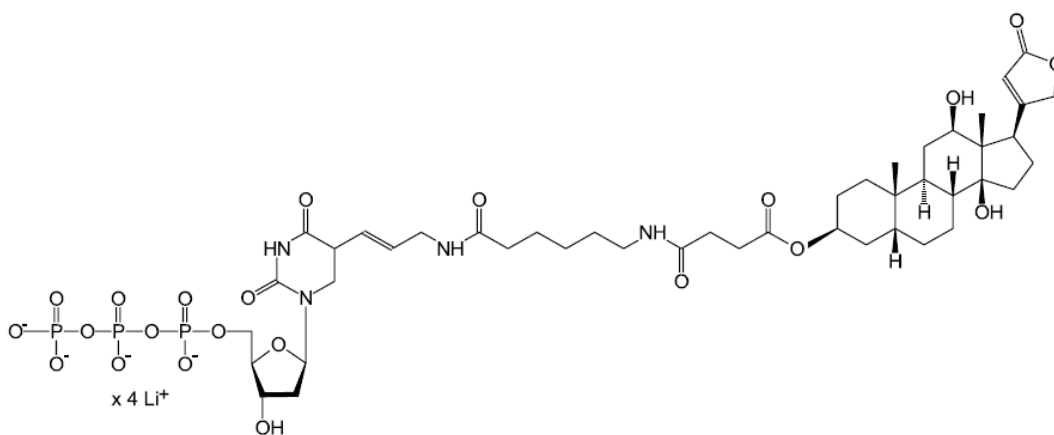
Αμέσως μετά το πέρας των 30min η μεμβράνη τοποθετείται ανάμεσα σε 2 στεγνά διηθητικά χαρτιά whatman, τυλίγεται με αλουμινόχαρτο και τοποθετείται σε φούρνο για 2 ώρες στους 80°C. Μετά το πέρας των 2 ωρών η μεμβράνη τοποθετείται με την πλευρά του DNA να εφάπτεται προς τα κάτω σε τράπεζα UV και ακτινοβολείται για 90 sec.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία ομοιοπολικής σύνδεσης των ακινητοποιημένων DNA μορίων με την μεμβράνη η τελευταία μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για υβριδισμό ή να φυλλαχθεί ανάμεσα σε 2 στεγνά διηθητικά χαρτιά whatman στους 4°C ερμητικά κλεισμένη χωρίς να έρχεται σε επαφή με υγρασία και να χρησιμοποιηθεί αργότερα όποτε αυτό είναι επιθυμητό.

### 2.2.8.2 Υβριδισμός και ανίχνευση με μη ραδιενεργό ικνηλάτη (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, ROCHE).

Η μέθοδος αυτή υβριδισμού, βασίζεται σε μη ραδιενεργή προσέγγιση του υβριδισμού κατά Southern. Οι ικνηλάτες σημαίνονται με τυχαίους εκκινητές (Random primed DNA labeling) με το εμπορικό master mix DIG-High Prime.

Η μέθοδος σήμανσης με τυχαίους εκκινητές βασίζεται στην υβριδοποίηση τυχαίων εξανουκλεοτιδίων με το DNA το οποίο πρόκειται να σημανθεί. (Τα εξανουκλεοτιδία αυτά περιέχουν σε κάθε θέση όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων). Στη συνέχεια, από το 3'-OH άκρο των εκκινητών, συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα παρουσία του ενζύμου Klenow και ενός χημικά σημασμένου με διγοξιγενίνη dUTP (digoxigenin dUTP, alkali-labile).

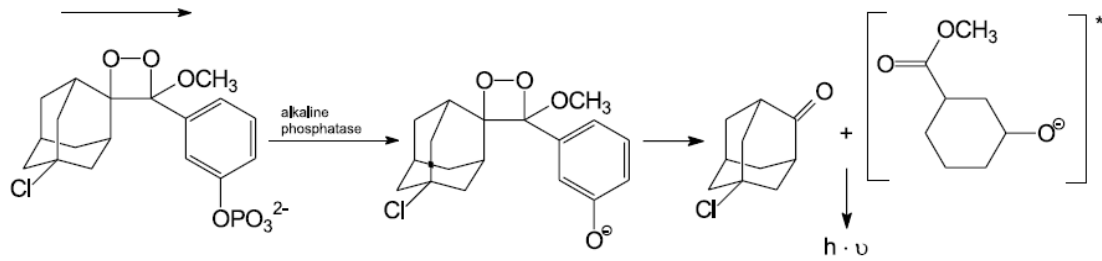


**Εικόνα 2.2.8.2.1.** Το DIG-dUTP, αλκαλικά σημασμένο.

Η μεμβράνη που φέρει το gDNA υβριδίζεται με τον σημασμένο ικνηλάτη είτε με τα διαλύματα υβριδισμού-προϋβριδισμού που προσφέρει το εμπορικό κίτ είτε με την μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Church και Gilbert (Church & Gilbert 1984).

Αφού γίνει ο υβριδισμός οι υβριδισμένοι ικνηλάτες ανοσοανιχνεύονται με αντισώματα (anti-digoxigenin-AP, fab fragments) τα οποία διαθέτουν δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης. Οι ικνηλάτες ορατοποιούνται με το φωτοχημικό υπόστρωμα CSPD ready-to-use. Η ενζυματική αποφωσφορυλίωση του CSPD από την αλκαλική φωσφατάση οδηγεί σε εκπομπή ακτινοβολίας με μέγιστο μήκος κύματος τα 477 nm. Η εκπομπή αυτή καταγράφεται με κατάλληλο X-ray film. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ κυμαίνεται μεταξύ 5-30 min.





**Εικόνα 2.2.8.2.2.** Η αντίδραση μετατροπής του CSPD.

### Παρασκευή του ικνηλάτη:

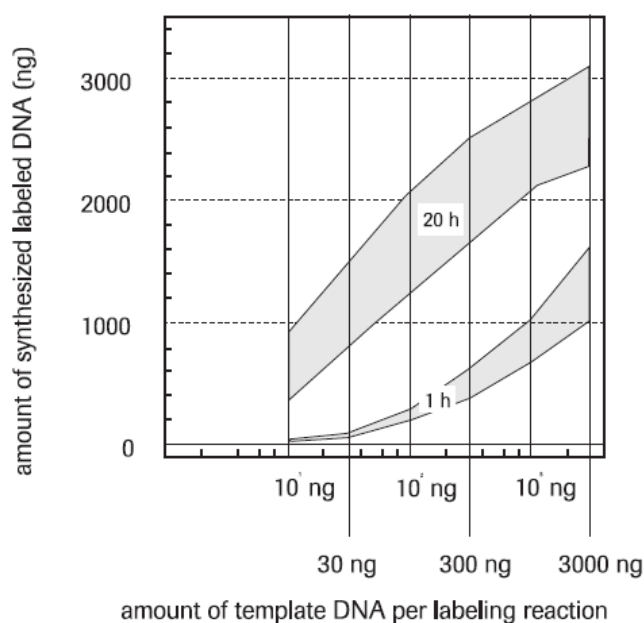
Ο ικνηλάτης σημαίνεται με τυχαίους εκκινητές με το νουκλεοτίδιο Digoxigenin-11-dUTP χρησιμοποιώντας το DIG-High Prime, ένα συμπυκνωμένο 5X μίγμα που περιέχει τυχαία δμερή, dNTPs mix που περιέχει το alkali-labile Digoxigenin-11-dUTP, το ένζυμο Klenow και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης.

Το DNA που θα σημανθεί θα πρέπει να είναι αρκετά καθαρό, να είναι γραμμικό και να έχει μέγεθος μεγαλύτερο των 100bp. DNA ικνηλάτες >5kb θα πρέπει να υποστούν πέψη με ένζυμο 4bp cutter όπως είναι το HaeIII.

Με την διαδικασία που θα περιγραφεί μπορεί να σημανθεί μήτρα συγκέντρωσης 10 ng-3 μg αλλά οι optimum συγκεντρώσεις της σήμανσης θα πρέπει να προσδιοριστούν πειραματικά. Μπορεί να αυξηθεί ο όγκος της αντίδρασης σήμανσης προκειμένου να σημανθούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μήτρας DNA. Εάν πρόκειται να ανιχνευτεί γονίδιο ενός αντιτύπου (single copy gene) σε πολύπλοκα γονιδιώματα απαιτούνται τουλάχιστον 300 ng της μήτρας.

**Πίνακας 2.2.8.2.1.** Ο πίνακας αυτός δείχνει το ποσοστό σήμανσης με το DIG high prime κάτω από βέλτιστες συνθήκες. Σε κανονικές συνθήκες αντίδρασης από 1 µg DNA περίπου 15% των νουκλεοτιδίων ενσωματώνονται σε περίπου 0.8 µg DIG-labeled DNA μέσα σε μία ώρα και περίπου 38% νουκλεοτιδίων σε 2 µg μετά από 20 h.

Template DNA	1 h	20 h
10 ng	45 ng	600 ng
30 ng	130 ng	1050 ng
100 ng	270 ng	1500 ng
300 ng	450 ng	2000 ng
1000 ng	850 ng	2300 ng
3000 ng	1350 ng	2650 ng



**Εικόνα 2.2.8.2.3.** Ποσοστό παραγωγής DIG-labeled DNA από διαφορετικές συγκεντρώσεις μήτρας DNA μετά από 1 και 20 h επώασης της αντίδρασης στους 37°C.

### **Διαδικασία:**

- 300 ng του DNA που πρόκειται να σημειωθεί τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml και συμπληρώνονται με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 16 μl.
- Ανήγεται μια οπή μέτριου μεγέθους με πυρακτωμένη βελόνα σύριγγας στο καπάκι του eppendorf και τοποθετείται σε υδατόλουτρο για 10 min το νερό του οποίου έχει ήδη φθάσει στο σημείο βρασμού.
- Μετά το πέρας των 10 min το DNA έχει αποδιαταχθεί και αμέσως τοποθετείται στον πάγο για 5 min.
- Εάν είναι απαραίτητο το μίγμα ογκομετρείται και εάν έχει ελαττωθεί ο όγκος του από τον βρασμό συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 16 μl.
- Προστίθενται 4 μl από το DIG high prime, και το μίγμα αφήνεται να επωαστεί στους 37°C για 20 hr.
- Για να σταματήσει η αντίδραση της σήμανσης προστίθενται 2 μl 0.2M EDTA, pH 8.0.
- Μετά από 20 hr στο μίγμα από 300 ng μήτρας θα έχουν προκύψει 2000 ng/22 μl σημασμένου ικνηλάτη.
- Ο ικνηλάτης μπορεί να διατηρηθεί στους -20°C, είτε να χρησιμοποιηθεί απ'ευθείας στον υβριδισμό.

## **Υβριδισμός κατά Church και Gilbert.**

### **Buffers:**

#### **1M Na[P]:**

71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 1000 ml.

**Church buffer:** 7%SDS, 0.5M Na[P], 1mM EDTA, 1% w/v BSA.

Το διάλυμα Church το οποίο αποτελεί και τα διαλύματα υβριδισμού και προϋβριδισμού παρασκευάζεται λίγο πριν την διαδικασία του υβριδισμού.

#### **Για 60 ml Church buffer:**

Σε beaker 100 ml προστίθενται 9 ml ddH<sub>2</sub>O, 30 ml από 1M Na[P], 120 μl από 0.5M EDTA pH=8.0, 0.6 g BSA και 21 ml από 20% SDS (προστίθεται τελευταίο προς αποφυγή κατακρίμνησης).

### **Stringency buffers:**

**Low stringency buffer:** 40mM Na[P], 5%SDS, 1mM EDTA.

Σε beaker 500 ml προστίθενται 8 ml Na[P] 1M, 50 ml 20% SDS, 400 μl 1M EDTA pH=8.0, 142 ml ddH<sub>2</sub>O, υπό συνεχή ανάδευση.

**High stringency buffer:** 40mM Na[P], 2%SDS, 1mM EDTA.

Σε beaker 500 ml προστίθενται 8 ml Na[P] 1M, 20 ml 20% SDS, 400 μl 1M EDTA pH=8.0, 172 ml ddH<sub>2</sub>O, υπό συνεχή ανάδευση.

### Διαδικασία:

Η ταπεινώση του σημείου ζέσεως ( $T_m$ ) ενός μορίου dsDNA, είναι γραμμική εξίσωση της συγκέντρωσης του φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδισμού. Για DNA μόρια, των οποίων η περιεκτικότητα σε G+C κυμαίνεται μεταξύ 30-75%, η  $T_m$  ελαττώνεται  $0.63^\circ\text{C}$  για κάθε 1% φορμαμιδίου στο μίγμα υβριδισμού. Κατά συνέπεια, η  $T_m$  ενός υβριδίου μεταξύ του ικνηλάτη και του στόχου του μπορεί να υπολογισθεί από την παρακάτω εξίσωση:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 41(\text{mole fraction}[\text{G}+\text{C}]) - 0.63(\%\text{formamide}) - 500/n$$

Όπου  $n$  είναι το μήκος του DNA σε νουκλεοτίδια.

- Ο υβριδισμός/προϋβριδισμός γίνεται στους  $60^\circ\text{C}$ .
- Το διάλυμα Church προθερμαίνεται σε φούρνο υβριδισμού στους  $60^\circ\text{C}$ , 20 min τουλάχιστον πριν την διαδικασία προϋβριδισμού.
- Η μεμβράνη τοποθετείται σε μπουκάλι υβριδισμού με την πλευρά του DNA να βρίσκεται ελεύθερη προς την ανοικτή πλευρά του δοχείου ώστε να έρχεται σε άμεση επαφή με το διάλυμα υβριδισμού.
- 20 ml προθερμασμένου στους  $60^\circ\text{C}$  Church διαλύματος τοποθετούνται στην μεμβράνη και αφήνεται να προϋβριδιστεί για 20 min στην θερμοκρασία υβριδισμού, ( $60^\circ\text{C}$ ). Το διάλυμα Church αφήνεται και αυτό στον φούρνο υβριδισμού.  
!Από το σημείο αυτό και μετά θα πρέπει η μεμβράνη να διατηρείται πάντα υγρή.
- Μετά το πέρας των 20 min αποχύνεται το διάλυμα προϋβριδισμού και αντικαθίσταται με άλλα 25 ml Church διαλύματος και ο προϋβριδισμός συνεχίζει για 100 min στους  $60^\circ\text{C}$ . Τα υπόλοιπα 15 ml διαλύματος Church που απομείναν θα αποτελέσουν το διάλυμα υβριδισμού και τοποθετούνται και αυτά στον φούρνο.
- 15 min πριν το πέρας του προϋβριδισμού, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα σημασμένου ικνηλάτη, έτσι ώστε στο διάλυμα υβριδισμού (15 ml) να βρίσκεται σε συγκέντρωση 25 ng/ml διαλύματος υβριδισμού (σύνολο 370 ng ικνηλάτη), τοποθετούνται σε erpendorf 1.5 ml και συμπληρώνονται με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 500 μl.
- Μετά από vortex/spin ανιήγονται οπές στο καπάκι του erpendorf που βρίσκεται ο ικνηλάτης και το τελευταίο αποδιατάσσεται σε ddH<sub>2</sub>O που βρίσκεται σε σημείο βρασμού για 10 min.
- Μετά το πέρας των 10 min το μίγμα τοποθετείται στον πάγο για 5 min.

- Μετά το πέρας των 5 min ο ικνηλάτης φυγοκεντρείται άμεσα στις 13.000 rpm επανατοποθετείται στον πάγο και αναμιγνύεται με το προθερμασμένο στους 60°C διάλυμα υβριδισμού.
- Το προθερμασμένο διάλυμα υβριδισμού (15 ml Church buffer) αναμιγνύεται με τον αποδιατεταγμένο ικνηλάτη (αραιωμένο στα 500 μl) με ήπια ανάδευση και αφού αποχυθεί το διάλυμα προϋβριδισμού από το μπουκάλι υβριδισμού τοποθετείται στην μεμβράνη προσέχοντας κατά την είσοδό του το διάλυμα υβριδισμού-ικνηλάτη να μην έρθει σε επαφή άμεσα με την μεμβράνη (αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υψηλό background κατά την εμφάνιση).
- Ο υβριδισμός λαμβάνει χώρα O/N (18-20 hr) στους 60°C.

### **Detection**

Η επόμενη διαδικασία μπορεί να γίνεται σε ανοιχτά trays ή στα μπουκάλια υβριδισμού. Προτιμότερη είναι η δεύτερη περίπτωση και αυτό διότι ενδέχεται κίνδυνος να στεγνώσει η μεμβράνη και να οδηγήσει σε υψηλό background κατά την εμφάνιση.

**High stringency washes:** Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα ώστε να αποδεσμευτούν από την μεμβράνη ικνηλάτες που έχουν προσδεθεί στο DNA τυχαία χωρίς συμπληρωματικότητα, καθώς και ικνηλάτες που δεσμεύτηκαν στις κενές περιοχές της μεμβράνης.

- Προθερμαίνεται το low stringency buffer στους 60°C για 30 min.
- Μετά το πέρας του υβριδισμού αποχύνεται το διάλυμα του υβριδισμού και προστίθεται το προθερμασμένο στους 60°C low stringency buffer. Το low stringency buffer επανατοποθετείται στον φούρνο υβριδισμού στους 60°C για να διατηρηθεί η θερμοκρασία του.
- Η μεμβράνη επώάζεται με το low stringency buffer για 15 min σε RT.
- Μετά το πέρας των 15 min αποχύνεται το low stringency buffer και προστίθεται καινούργιο προθερμασμένο στους 60°C. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία για άλλα 15 min και η επώαση λαμβάνει χώρα σε RT. Στο διάστημα αυτό χαμηλώνεται η θερμοκρασία του φούρνου στους 50°C και προθερμαίνεται το high stringency buffer στους 50°C.
- Μετά το πέρας των 15 min αποχύνεται το low stringency buffer και προστίθεται το high stringency buffer προθερμασμένο στους 50°C. Η μεμβράνη επώάζεται με το high stringency buffer για 15 min σε RT. Στο διάστημα αυτό χαμηλώνεται η θερμοκρασία του φούρνου στους 45°C και προθερμαίνεται το high stringency buffer στους 45°C.

- Μετά το πέρας των 15 min αποχύνεται το high stringency buffer και προστίθεται το high stringency buffer προθερμασμένο στους 45°C. Η μεμβράνη επωάζεται με το high stringency buffer για 15 min σε RT. Στο διάστημα αυτό χαμηλώνεται η θερμοκρασία του φούρνου στους 40°C και προθερμαίνεται το high stringency buffer στους 40°C.
- Μετά το πέρας των 15 min αποχύνεται το high stringency buffer και προστίθεται το high stringency buffer προθερμασμένο στους 40°C. Η μεμβράνη επωάζεται με το high stringency buffer για 15 min σε RT. Στο διάστημα αυξάνεται η θερμοκρασία του φούρνου στους 42°C όπου θα λάβει χώρα η διαδικασία της ανίχνευσης των σημασμένων ικνηλατών.

**Washing Buffer:** 0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl; pH 7.5 (20°C); 0.3% (v/v) Tween 20.

5.805 g Maleic acid, 4.383 g NaCl, 250 ml ddH<sub>2</sub>O, ρύθμιση του pH=7.5 με προσθήκη NaOH pellets/NaOH 10N.  
Συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O στα 500 ml και προσθήκη 1.5 ml Tween20.

**Maleic acid Buffer:** 0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl; pH 7.5 (20°C).

1.161 g Maleic acid, 0.8766 g NaCl, 20 ml ddH<sub>2</sub>O, ρύθμιση του pH=7.5 με προσθήκη NaOH pellets/NaOH 10N.  
Συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O στα 100 ml.

**Detection buffer (Buffer αλκαλικής φωσφατάσης):** 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5 (20°C).

1.2114 g tris (Trizma®), 0.5844 g NaCl, 20 ml ddH<sub>2</sub>O, pH στο 9.5, Συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O στα 100 ml.

**Blocking solution 1X:** 10 ml Blocking Solution 10X (DIG easy, ROCHE) και 90 ml Maleic acid buffer. Πάντα προετοιμάζεται φρέσκο και όταν παρασκευασθεί διατηρείται στον πάγο πριν χρησιμοποιηθεί.

### **Διαδικασία για 100cm<sup>2</sup> μεμβράνης:**

- Μετά το πέρας της διαδικασίας των stringency washes η μεμβράνη ξεπλένεται για 6 min 2 φορές (3+3 min) με 40 ml washing buffer σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αποχύνεται το washing buffer και προστίθενται 85 ml blocking solution (1X) και τοποθετείται στον φούρνο υβριδισμού στους 42°C για 40 min. Τα υπόλοιπα 15 ml του Blocking solution(1X) διατηρούνται στον πάγο.
- 5 min πριν το πέρας των 40 min φυγοκεντρείται το αντίσωμα Anti-Digoxigenin-AP για 3 min στις 10.000 rpm στους 4°C.
- Κατάλληλη ποσότητα αντισώματος αραιώνεται 1:15.000 στο Blocking solution 1X.
- Μετά το πέρας των 40 min αποχύνεται το Blocking solution και προστίθενται 15 ml Antibody solution (1:15.000 Anti-Digoxigenin-AP/ Blocking solution 1X).
- Ακολουθεί επώαση στον φούρνο υβριδισμού για 25 min σε μέτρια υψηλή ταχύτητα στους 42°C.
- Μετά το πέρας των 25 min αποχύνεται το Antibody solution και προστίθενται 40 ml washing buffer ακολουθεί επώαση στον φούρνο υβριδισμού για 20 min σε μέτρια υψηλή ταχύτητα στους 42°C.
- Μετά το πέρας των 20 min αποχύνεται το washing buffer και προστίθενται 40 ml καινούργιο washing buffer και ακολουθεί επώαση στον φούρνο υβριδισμού για 20 min σε μέτρια υψηλή ταχύτητα στους 42°C.
- Στο μεσοδιάστημα προετοιμάζεται η κασέτα εμφάνισης και τοποθετείται σε αυτή διαφάνεια χαρτιού. Η κλειστές πλευρές της διαφάνειας κόπτονται με ψαλίδι. Σε αυτήν θα γίνει η αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης καθώς και η ανίχνευση από το φιλμ, γ'αυτό θα πρέπει να είναι έτσι κομμένη ώστε να ανήγει και να κλείνει γρήγορα ώστε να αποφευχθεί το στέγνωμα της μεμβράνης.
- Μετά το πέρας των 20 min αφαιρείται το washing buffer, και προστίθενται 20 ml από το detection buffer, ακολουθεί επώαση για 5 min σε RT.
- Μετά το πέρας των 5 min η μεμβράνη αφαιρείται από το μπουκάλι υβριδισμού με λαβίδες με προσοχή να μην χαρακωθεί η μεμβράνη ειδικά στο σημείο που βρίσκεται το DNA και τοποθετείται στην κομμένη διαφάνεια με την πλευρά του DNA προς τα πάνω.



- Αμέσως με μικροπιπέτα των 1000 μl προστίθεται στην επιφάνεια της μεμβράνης (DNA πλευρά), 1 ml από το υποστρώμα της αλκαλικής φωσφατάσης **CSPD ready-to-use** (ROCHE) σε διάφορα σημεία της μεμβράνης και αμέσως σφραγίζεται με την δεύτερη πλευρά της κομμένης διαφάνειας. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες αέρα μεταξύ μεμβράνης και διαφάνειας, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται η διασπορά του υποστρώματος σε όλη την επιφάνεια της μεμβράνης. Η περίσσεια του υποστρώματος αφαιρείται με καρτοπετσέτα. Στην συνέχεια, η κασέτα εμφάνισης κλείνει και τοποθετείται στους 37°C για 5 min. Μετά το πέρας των 5 min η κασέτα εμφάνισης αφαιρείται από τους 37°C, ανοίγεται ξανά για να αφαιρεθεί η περίσσεια του υποστρώματος που πιθανώς να διέφυγε της διάταξης μετά το κλείσιμο της κασέτας και ακολουθεί η διαδικασία της ανίχνευσης με X-Ray film.
- Η ανίχνευση γίνεται σε RT και το X-Ray film μπορεί να εκτεθεί για διάστημα 15-25 min στους 15-25°C.

*Σημείωση1:* Η εκπομπή συνεχίζει για τουλάχιστον 48 ώρες. Το σήμα αυξάνεται τις πρώτες ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης ανίχνευσης μέχρι να φθάσει σε ένα plateau όπου η ένταση του σήματος παραμένει σχεδόν σταθερή για τις επόμενες 24-48 ώρες. Μπορούν να γίνουν πολλαπλές εκθέσεις για να επιτευχθεί η επιθυμητή ένταση τους σήματος.

*Σημείωση2:* Η πρόσθεση του υποστρώματος (CSPD), στην μεμβράνη καθώς και το άνοιγμα της κασέτας εμφάνισης για τους διάφορους καθαρισμούς κλπ, θα πρέπει να γίνεται σε χαμηλό ή σε κόκκινο φωτισμό διότι το CSPD είναι φωτοευαίσθητο.

### 2.2.9 Σχεδιασμός/παρασκευή εκκινητών.

Οι εκκινητές σχεδιάζονται με βάση τα εξής χαρακτηριστικά:

- Το μέγεθός τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 17-28bp.
- Η περιεκτικότητα σε G και C πρέπει να αντιστοιχεί στο 50-60% του συνολικού αριθμού των νουκλεοτιδίων του εκκινητή.
- Το 3' άκρο τους θα πρέπει να είναι G ή C ή GC ή CG.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55-80°C.
- Η αυτό-συμπληρωματικότητα των εκκινητών, δηλαδή η δημιουργία δευτεροταγούς δομής θα πρέπει να αποφεύγεται.
- Η ύπαρξη τριών ή περισσότερων καταλοίπων G ή C στα 3' άκρα των εκκινητών μπορεί να προκαλέσει μη επιθυμητό υβριδισμό σε αλληλουχίες υψηλής περιεκτικότητας σε G ή C.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Εντοπίζεται η επιθυμητή προς ενίσχυση ακολουθία.
- Επιλέγονται οι αντίστοιχοι της ακολουθίας εκκινητές.
- Γίνεται αναλύση των επιλεγμένων εκκινητών με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής Primer Select της εταιρείας DNA Star. Το πρόγραμμα αυτό εξετάζει διάφορα σενάρια δημιουργίας διμερών μεταξύ εμπρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών, δευτεροταγούς δομής στον ίδιο τον εκκινητή ενώ υπολογίζει και την θερμοκρασία υβριδισμού των. Έτσι δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να επιλέξει τον θερμοδυναμικά σταθερότερο εκκινητή αποτρέποντας την δημιουργία προβλημάτων κατά τον πολυμερισμό.
- Αφού επιλεγθούν εκκινητές που πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις οι αλληλουχίες τους στέλνονται σε κατάλληλη εταιρεία σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών.
- Η εταιρεία επιστρέφει τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές σε λυοφιλοποιημένη (αφυδατωμένη) μορφή.
- Στο εργαστήριο οι εκκινητές διαλύονται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ddH<sub>2</sub>O σε τελική συγκέντρωση 100μM. Οι ενυδατωμένοι εκκινητές διατηρούνται στους -20°C.

- Για τις διάφορες αντιδράσεις διατηρείται primer stock τελικής συγκέντρωσης 10μM ύστερα από μίξη σε erpendorf 1.5 ml 10 μl από το εμπορικό σκεύασμα του εκκινητή με 90 μl ddH<sub>2</sub>O.

Μια λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων, οι θερμοκρασίες υβριδισμού των καθώς και οι ονομασίες τους παρατίθενται στον πίνακα 2.2.9.1:

**Πίνακας 2.2.9.1.** Οι αλληλουχίες, ονομασία και οι θερμοκρασίες υβριδισμού όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία.

<b>Εκκινητές: 5'→3'</b>	<b>Ονομασία</b>	<b>Αλληλουχία</b>	<b>T<sub>m</sub> °C</b>
Forward	Wf	AACATGTTACTGTTGCGGAAGC	58.4
Forward	3'f	AGGGACGACCTCATGAAATACTG	60.60
Reverse	5'R	GTACCCATTTGAGCAAAGTGATG	59
Reverse	3'R	GACACTAGGATGACGCACTCTTG	62.44
Forward	Mf	CAACGTGTTCCGGATATCTCTC	57.9
Reverse	MR	TCACAAATTGGGTGGCTGCATC	60.3

### 2.2.10 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιείται το ένζυμο DyNAzyme EXT πολυμεράση (FINNZYMES). Το ένζυμο αυτό λειτουργεί ως 5'→3' πολυμεράση και εξωνουκλεάση, ενώ λειτουργεί και ως πολύ ασθενής 3'→5' εξωνουκλεάση. Επίσης είναι ικανό να προσθέτει μη συμπληρωματικό κατάλοιπο αδενίνης στο 3' άκρο του DNA. Η ταχύτητα πολυμερισμού του είναι 1.3-1.5kb/1 min.

Σε γενικές γραμμές οι αντιδράσεις PCR περιλαμβάνουν επανάληψη ίδιων κύκλων σε διάφορους χρόνους που εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των μορίων που πρόκειται να ενισχυθούν. Σε όλες τις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το εξής σχήμα πολυμερισμού:

1 x	Αποδιάταξη του DNA για 2 min στους 94°C
35-37x	Αποδιάταξη στους 94°C για 30" Υβριδισμός στο T <sub>m</sub> των εκκινητών για 30" Επιμήκυνση στους 72°C για 30-200"
1 x	Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10 min
	Παραμονή στους 10°C

Για τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR χρησιμοποιήθηκε ανάλογο σχήμα που εξαρτάται κάθε φορά από το πειραματικό υλικό. Όμως και εδώ σε γενικές γραμμές χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σχήμα πολυμερισμού με την διαφορά ότι ο αριθμός των κύκλων του δευτέρου βήματος ήταν σαφώς μικρότερος και κυμαινόταν μεταξύ 23-29 κύκλων:

1 x	Αποδιάταξη του DNA για 2 min στους 94°C
23-29 x	Αποδιάταξη στους 94°C για 30" Υβριδισμός στο T <sub>m</sub> των εκκινητών για 30" Επιμήκυνση στους 72°C για 30"
1 x	Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min
	Παραμονή στους 10°C

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται τη θερμοκρασία τήξης (T<sub>m</sub>) του εκκινητή. Η τελευταία με την σειρά της εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και υπολογίζεται από τον θεωρητικό τύπο:  $T_m = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times (\text{αριθμός G's και C's στον εκκινητή} - 16.4) / N$  όπου N είναι ο αριθμός βάσεων του εκκινητή. Σε καθημερινή βάση όμως για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας υβριδισμού των διαφόρων αντιδράσεων χρησιμοποιείται κατάλληλο προγράμμα βιοπληροφορικής από την εταιρεία βιοτεχνολογίας MWG ([www.mwg-biotech.com/](http://www.mwg-biotech.com/)).

Οι αντιδράσεις PCR γίνονται σε τελικό όγκο 50  $\mu$ l. Τα συστατικά της αντίδρασης προστίθενται σε eppendorf microcentrifuge PCR tube και η διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

1. 5  $\mu$ l DyNAzyme EXT Buffer (10X), 15mM  $Mg^{2+}$  (τελική συγκέντρωση 1X, 1.5mM  $Mg^{2+}$ ).
2. 5  $\mu$ l από 2mM dNTPs (τελική συγκέντρωση 0,2mM).
3. 1,5  $\mu$ l (10 $\mu$ M) από κάθε εκκινητή (εμπρόσθιο/οπίσθιο) (τελική συγκέντρωση 0,3 $\mu$ M).
4. Μήτρα gDNA ή cDNA, για το DNA η επιθυμητή συγκέντρωση αντιστοιχούσε σε 200 ng gDNA.
5. DyNAzyme EXT πολυμεράση (1unit/ $\mu$ l).
6. ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 50  $\mu$ l.
7. Τα συστατικά αναμιγνύονται με την βοήθεια Vortex και φυγοκεντρούνται για λίγα δευτερόλεπτα στις 13.000 rpm.
8. Αφού ολοκληρωθούν οι αντιδράσεις αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης ή/και τοποθετούνται σε καταψύκτη -20°C.

### **2.2.11 Παρασκευή διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης.**

Για την ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτική αгарόζης είναι αναγκαία η παρασκευή κάποιων επιπρόσθετων βοηθητικών διαλυμάτων. Τα διαλύματα αυτά διακρίνονται στα εξής: Ρυθμιστικό διάλυμα 50X TAE (για την υποβοήθηση της κινητικότητας των νουκλεϊνικών σε ηλεκτρικό πεδίο), το βρωμιούχο αιθίδιο (για την ορατοποίηση των διαχωρισμένων νουκλεϊνικών υπό την επίδραση UV) και το διάλυμα φόρτωσης 10X loading dye. Τα διαλύματα αυτά διατηρούνται υπό μορφή μητρικών, ενώ για την καθημερινή πρακτική χρησιμοποιούνται μίγματα αυτών όπως το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης και το 6X loading dye με 50% w/v σακχαρόζη.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα 50XTAE:**

- Σε ογκομετρικό σωλήνα 1000 ml προστίθενται 24.2 g (w/v) Tris-base, 100 ml 0.5M EDTA pH=8.0, 57 ml CH<sub>3</sub>COOH και ddH<sub>2</sub>O μέχρι την συμπλήρωση όγκου 1000 ml.
- Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο δοχείο αποθήκευσης για περαιτέρω χρήση.

#### **Βρωμιούχο αιθίδιο:**

- Παρασκευάζεται επιθυμητό σε όγκο διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 5 mg EtBr/ml dH<sub>2</sub>O.
- Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης:**

2% v/v 50X TAE, 0.005% v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε τελικό όγκο 1000 ml ddH<sub>2</sub>O.

#### **10x loading dye:**

Σε πλαστικό falcon 10 ml προστίθενται 2.5% w/v μπλέ της βρωμοφαινόλης (BPB), 2.5% w/v κυανούν του ξυλενίου (XC) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του επιθυμητού όγκου. Για 10 ml 10X loading dye προστίθενται 0.25 g Bromophenol blue και 0.25 g Xylene cyanol σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O.

#### **6x loading dye:**

Για την υποβοήθηση της τοποθέτησης των δειγμάτων DNA στις οπές της πηκτικής αгарόζης χρησιμοποιείται 6X loading dye που περιέχει και 50% w/v σακχαρόζη. 5 g Sucrose διαλύονται σε 1 ml 10X loading dye και προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης των 10 ml.

### **2.2.12 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA σε πηκτή αγαρόζης.**

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων.

Τα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατά με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων. Η χρωστική αυτή ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0,8% ως 2% w/v αγαρόζη.

#### **Διαδικασία:**

- Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης x% w/v διαλύονται x gr αγαρόζης σε 100x ml ddH<sub>2</sub>O που περιέχει 50X TAE σε συγκέντρωση 1X.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους διάλυσης της αγαρόζης και ομογενοποίησής της.
- Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,005% v/v.
- Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο καλούπι και σε ειδικές θέσεις που φέρει τοποθετούνται οι ειδικές χτένες διαμόρφωσης των οπών.
- Η πηκτή αφαίνεται να στερεοποιηθεί στο ειδικό καλούπι σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα προς ανάλυση δείγματα αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής (6X loading dye).
- Μετά την πήξη του μίγματος η κτένα απομακρύνεται και το καλούπι πήξης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Η τελευταία πληρώνεται με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (2% v/v 50x TAE, 0.005% v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε ddH<sub>2</sub>O).
- Τα δείγματα (με την χρωστική) τοποθετούνται στις οπές της πηκτής σε όγκους ανάλογους του μεγέθους των οπών.
- Για να αναγνωρίζεται το μέγεθος των αναλυόμενων πολυνουκλεοτιδίων προστίθεται μοριακός δείκτης. Σε όλα τα πειράματα της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης GeneRuler™ DNA Ladder Mix της εταιρείας Fermentas. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσής του προστίθενται 2-3 μl/δείγμα.

- Η συσκευή αφού συνδεθεί με τα κατάλληλα ηλεκτρόδια και αφού ρυθμιστεί η τάση ηλεκτροφόρησης (50-120 V, αναλόγως του μέγεθους της πηκτής και της περιεκτικότητάς της σε αγαρόζη) λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση.



### **2.2.13 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.**

Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την απομόνωση των επιθυμητών DNA κλασμάτων που έχουν αναλυθεί σε πηκτή αγαρόζης.

- Η πηκτή αγαρόζης τοποθετείται σε UV Lamp.
- Ύστερα από την κάλυψη με ειδικό προστατευτικό, η λάμπα ανάβει και εντοπίζεται η επιθυμητή ζώνη.
- Η επιθυμητή ζώνη αφαιρείται με τη βοήθεια κοπιδιού.
- Το αφαιρεμένο τμήμα της πηκτής τοποθετείται σε φιαλίδιο eppendorf 1.5 ml.
- Το τελευταίο τοποθετείται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 15 min.
- Ακολουθεί απομόνωση του DNA με το εμπορικό κίτ της QIAGEN, QIAquick Gel Extraction Kit.

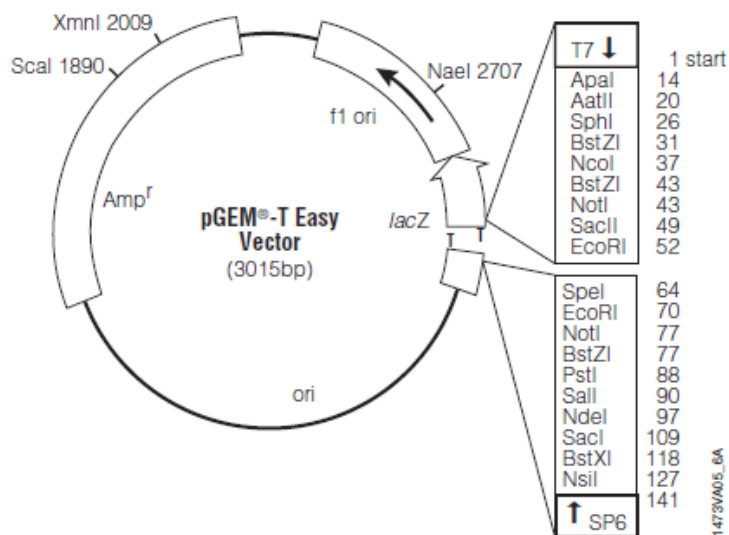
### 2.2.14 Αλληλούχηση κλωνοποιημένων ενθέτων και ο pGEM-T Easy vector.

Για την αλληλούχηση ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας της εταιρείας Promega με την ονομασία pGEM-T Easy Vector. Ο φορέας αυτός είναι μεγέθους της τάξης των 3.015bp. Φέρει το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη ενώ παρέχει την δυνατότητα επιλογής κυανών-λευκών αποικιών αφού διαθέτει το γονίδιο LacZ που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Το χημικό ομόλογο IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside) αποτελεί μεταγραφικό ενισχυτή του LacZ.

Η περιοχή κλωνοποίησης έχει ελεύθερες 3' θυμίνες και είναι τμήμα του LacZ. Εκατέρωθεν της κασέτας κλωνοποίησης βρίσκονται οι προαγωγείς T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης καθώς και αλληλουχίες αναγνώρισης από ένα ευρύ φάσμα ενδονουκλεασών περιορισμού.

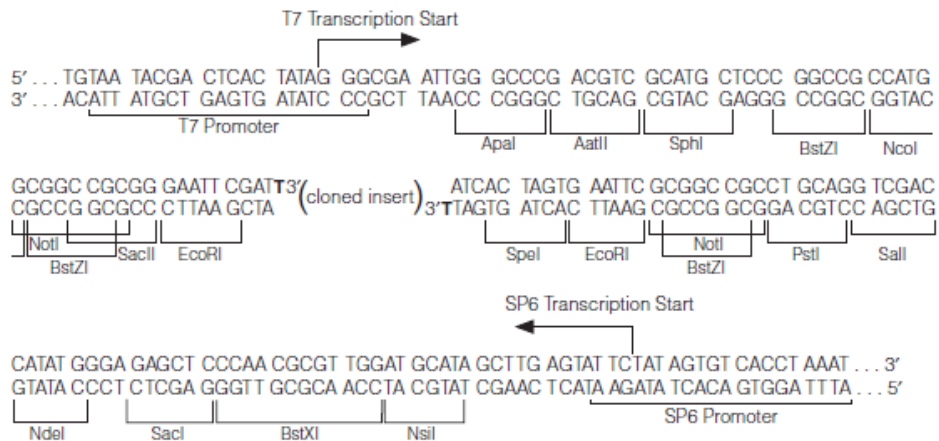
Ο φορέας παρέχεται σε γραμμική μορφή από την εταιρεία παραγωγής του (Promega) και λιγοποιείται με τα PCR προϊόντα μέσω συμπληρωματικότητας A-T. Το κλωνοποιημένο DNA τμήμα εξάγεται με την χρήση ενζύμων περιορισμού.

Η αλληλούχηση των κλωνοποιημένων στον pGEM-T Easy Vector ενθέτων γίνεται από την εταιρεία Macrogen με χρήση T7 και SP6 εκκινητών ή και εκκινητών οι οποίοι υβριδίζουν σε γνωστές περιοχές της αλληλουχίας που πρόκειται να αλληλουχηθεί σε περιπτώσεις όπου το ένθετο είναι μεγαλύτερο από 1.6kb. Για κάθε κατεύθυνση είναι δυνατή η αλληλούχηση 800bp.



**Εικόνα 2.2.14.1.** Η χαρτογράφηση του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy Vector όπως αυτή παρέχεται από την εταιρεία παραγωγής του, Promega.

## pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector



**Εικόνα 2.2.14.2.** Η αλληλουχία της περιοχής κλωνοποίησης του pGEM-T Easy φορέα. Στην πάνω πλευρά βρίσκεται η αλληλουχία πρόσδεσης της T7 RNA πολυμεράσης. Στην κάτω πλευρά βρίσκεται η αλληλουχία πρόσδεσης της SP6 RNA πολυμεράσης.

### 2.2.15 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA.

Η κλωνοποίηση τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T easy Vector βασίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να αναγνωρίζει και να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα.

Ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T easy Vector από το εμπορικό του stock είναι γραμμικός και φέρει κατάλοιπα θυμίνης στα 3' άκρα του. Η αλυσιδωτή ενίσχυση των cDNA και gDNA με το ένζυμο DyNAzyme EXT πολυμεράση έχει ως αποτέλεσμα την πρόσθεση 3' μη συμπληρωματικής αδενίνης στα πολυμερισμένα μόρια. Ο φορέας και τα πολυμερισμένα DNA τμήματα λιγοποιούνται με συμπληρωματικότητα A-T.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης λαμβάνει χώρα στα 10μl.

Από το εμπορικό stock η συγκέντρωση του γραμμικού pGEM-T easy vector είναι 50 ng/μl. Η συγκέντρωση (σε ng) του ενθέτου που πρέπει να προστεθεί στην αντίδραση ώστε αυτή να είναι επιτυχής δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert} \times \text{insert:vector molar ratio}}{\text{kb size of vector}}$$

\*Καταλληλότερη αναλογία μεταξύ ενθέτου και φορέα αντιστοιχεί στην αναλογία 3:1.

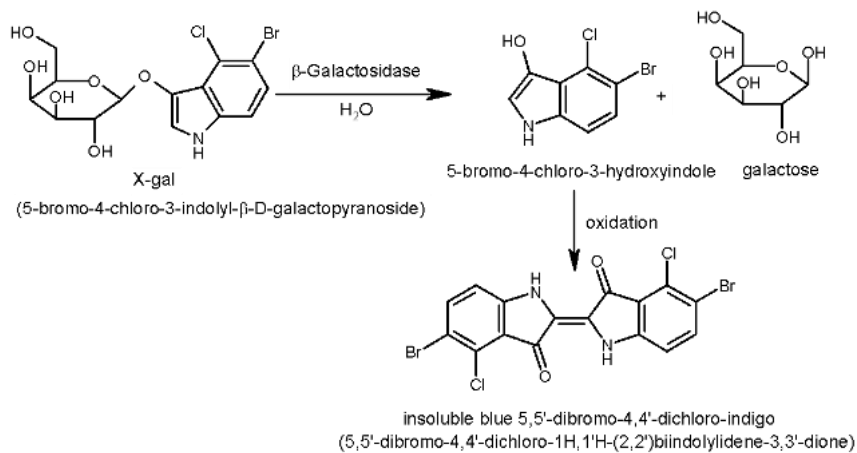
Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Σε φιαλίδιο erpendorf 1,5 ml προστίθενται:

- 25 ng φορέα δηλαδή 0,5 μl από το εμπορικό stock.
- Ανάλογη του τελικού όγκου ρυθμιστικό διαλύμα. 1 μl από 10X Ligation buffer (300mM Tris-HCl (pH 7.8), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT και 10mM ATP) ή 5 μl από το 2X Ligation buffer (60mM Tris-HCl (pH 7.8), 20mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT, 2mM ATP και 10% PEG) σε τελική συγκέντρωση 1X.
- Κατάλληλη ποσότητα του προς κλωνοποίηση DNA τμήματος η συγκέντρωση και η ποσότητα του οποίου υπολογίζεται από τον προηγούμενο μαθηματικό τύπο.
- 1 μl T4 DNA λιγάσης (0,1U/μl, NE Biolabs).
- ddH<sub>2</sub>O (εάν αυτό είναι αναγκαίο) μέχρις ότου να συμπληρωθούν τα 10 μl.
- Το δείγμα ή αφείνεται σε θερμοκρασία δωματίου (16°C) για 1 ώρα (fast reaction) ή καθ'όλη την διάρκεια της νύχτας στους 4°C .

### 2.2.16 Μετασχηματισμός και παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*.

Για την κλωνοποίηση των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιείται το βακτηριακό στέλεχος του *Escherichia coli* με την κωδική ονομασία DH5a. Χαρακτηριστικά του στελέχους αυτού όπως η υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ( $>2 \times 10^6$  μετασχηματισμένα βακτήρια/μg πλασμιδιακού DNA) και η έλλειψη από το χρωμόσωμά τους της D(lacZ)M15 περιοχής (καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης) το καθιστά αναγκαίο εργαλείο για όλες τις πειραματικές διαδικασίες κλωνοποίησης. Ειδικότερα για το τελευταίο χαρακτηριστικό τα DH5a καθίστανται ορατά όταν φέρουν πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (LacZ gene). Όταν τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει X-gal και IPTG χρωματίζονται αναλόγως του αν φέρουν ή όχι το κλωνοποιημένο ένθετο. Όταν φέρουν το ένθετο (θετική αντίδραση) παραμένουν λευκά αφού το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ gene) διακόπτεται και δεν μπορεί να μεταφραστεί σε λειτουργική β-γαλακτοσιδάση. Από την άλλη πλευρά, όταν δεν φέρουν το ένθετο (αρνητική αντίδραση) οι βακτηριακές αποικίες DH5a αποκτούν μία κυανή χροιά αποτέλεσμα της μετάφρασης του γονιδίου (LacZ gene) σε λειτουργική β-γαλακτοσιδάση και της διάσπασης του X-gal (Εικ.2.2.16.1).



**Εικόνα 2.2.16.1.** Η χημική αντίδραση διάσπασης της X-gal σε γαλακτόζη και 5-βρώμο-4-χλώρο-3-υδροξυινδολίο. Δύο μόρια 5-βρώμο-4-χλώρο-3-υδροξυινδολίου συμπυκνώνονται και προσδίδουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα στις αποικίες που κωδικοποιούν λειτουργική β-γαλακτοσιδάση.

## Διαλύματα:

**CaCl<sub>2</sub> 100mM:** 2.205 g CaCl<sub>2</sub> διαλύονται σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

**1M Tris-HCl pH=8.0:** 24.228 g Tris(Trizma®), διαλύονται σε 100 ml ddH<sub>2</sub>O και ρυθμίζεται το pH στο 8.0. Στην συνέχεια προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο τα 200 ml.

**25mM CaCl<sub>2</sub>/10mM Tris-HCl pH=8.0:** 75 ml CaCl<sub>2</sub> 100mM και 3 ml 1M Tris-HCl pH=8.0 αναμιγνύονται και προστίθενται 222 ml ddH<sub>2</sub>O.

**75mM CaCl<sub>2</sub>/10mM Tris-HCl pH=8.0, 15%γλυκερόλη:** 37.5 ml CaCl<sub>2</sub> 100mM και 0.5 ml 1M Tris-HCl pH=8.0 αναμιγνύονται και προστίθενται 12 ml ddH<sub>2</sub>O και 8.93 ml 99% γλυκερόλη. Η ποσότητα της γλυκερόλης που θα προστεθεί υπολογίζεται από τον μαθηματικό τύπο **99%*x*=15%(V<sub>buffer</sub>+*x*)**. Όπου *x* όγκος της γλυκερόλης 99% που θα προστεθεί και V<sub>buffer</sub> ο όγκος του διαλύματος 75mM CaCl<sub>2</sub>/10mM Tris-HCl pH=8.0 στο οποίο θα προστεθεί.

## Διαδικασία:

Μία μέρα πριν αποστειρώνονται τα διαλύματα 25mM CaCl<sub>2</sub>, 75mM CaCl<sub>2</sub>, τα Sorval tubes, οι πιπέτες, τα PCR tubes, τα τίπς που θα χρησιμοποιηθούν και τοποθετούνται στους 4°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών βακτηριακών κυττάρων συνοψίζεται στα εξής:

- Απο το εμπορικό stock μη δεκτικά βακτήρια DH5a επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσονται στους 37°C για 12 ώρες.
- Μετά το πέρας των 12 ωρών επιλέγεται μοναδιαία αποικία η οποία αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C.
- 2 ml από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη 1000 ml που περιέχει 200 ml υγρό LB.
- Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C σε σημείο οπτικής πυκνότητας ίσο με O.D<sub>550</sub>=0.5 (2 hr περίπου από την στιγμή εμβολιασμού). Μετά από την πρώτη ώρα της καλλιέργειας γίνεται μία πρώτη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 550 nm και μετά ακολουθούν και άλλες κάθε μισή ώρα μέχρις ότου επιτευχθεί η επιθυμητή οπτική πυκνότητα. Σαν τυφλό χρησιμοποιείται υγρό LB.
- Μόλις επιτευχθεί η απαραίτητη οπτική πυκνότητα τα κύτταρα τοποθετούνται στο πάγο για 10 min.

- Μετά το πέρας των 10 min, τα κύτταρα μεταφέρονται σε Sorval tubes και κατακρημνίζονται για 5 min στις 4.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C. (Η Sorval θα πρέπει να έχει προψυχθεί στους 8°C για 10 min στις 1.000 rpm).
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης το υπερκείμενο αφαιρείται και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται ταχέως σε 100 ml παγωμένου CaCl<sub>2</sub>, 25mM με ήπια ανάδευση στον πάγο ή με αναρρόφηση του υπερκείμενου των κυττάρων με γυάλινη πιπέτα.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 min στις 4.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης το υπερκείμενο αφαιρείται και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται ταχέως σε 13.3 ml, 75mM παγωμένου CaCl<sub>2</sub> που περιέχει 15%, 99% γλυκερόλη με ήπια ανάδευση στον πάγο ή με αναρρόφηση του υπερκείμενου των κυττάρων με γυάλινη πιπέτα.
- Το μίγμα, αναμιγνύεται και μοιράζεται ανά 200 μl σε PCR tubes.
- Ακολουθεί άμεση κατάψυξη με υγρό άζωτο και διατήρηση των δεκτικών κυττάρων, στους -80°C.

### **2.2.17 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (μέθοδος θερμικού σοκ).**

- 200  $\mu$ l από Glycerol stock δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml.
- Στο τελευταίο προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA.
- Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30 min.
- Στην συνέχεια τα βακτηριακά κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ ύστερα από τοποθέτηση τους στους 42°C για 2 λεπτά.
- Λίγο πριν το πέρας των 2 λεπτών προστίθεται στο μίγμα 1 ml από υγρό θρεπτικό μέσο LB και στην συνέχεια τοποθετείται στους 37°C για 1 ώρα, αναδεύοντας με το χέρι κάθε 15 λεπτά.
- Μετά το πέρας της μίας ώρας το μίγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000rpm.
- Στην συνέχεια αποχύνονται τα 3/5 του υπερκείμενου ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται στα υπόλοιπα 2/5.

### **2.2.18 Στερεή καλλιέργεια και επιλογή μετασχηματισμένων *E.coli* κυττάρων.**

- Στερεοποιημένο με άγαρ θρεπτικό διάλυμα LB/amp σε τρυβλία petri αφήνεται να στεγνώσει στους 37°C.
- Αφού στεγνώσει προστίθενται σε αυτό 30  $\mu$ l X-gal (20 mg/ml) και 6  $\mu$ l IPTG (200 mg/ml) τα οποία στην συνέχεια απλώνονται σε όλη την ακτίνα του μέσου με την βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου .
- Το τρυβλίο αφήνεται να στεγνώσει στους 37°C.
- Αφού στεγνώσει τα μετασχηματισμένα δεκτικά κύτταρα, (τελευταίο στάδιο προηγούμενης παραγράφου), αποχύνονται στο τρυβλίο petri και επιστρώνονται με την βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου.
- Τα τρυβλία επωάζονται για 12-16 ώρες σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C.



### 2.2.19 Υγρή καλλιέργεια μοναδιαίων αποικιών, μετασχηματισμένων *E.coli*.

- Με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα επιλέγεται μοναδιαία αποικία από στερεή καλλιέργεια LB/amp/X-gal/IPTG, μετασχηματισμένων DH5a κυττάρων.
- Σε θρεπτικό διάλυμα με 4ml υγρό LB προστίθενται 4 μl Amp (100 mg/ml) και τοποθετείται η οδοντογλυφίδα.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται σε αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 12 ώρες.

### 2.2.20 Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων.

- **Θρεπτικό μέσο LB:** 0.5% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Πεπτόνη. Για στερεό LB προστίθεται και 1.4 % (w/v) άγαρ.
- **Θρεπτικό μέσο LB/amp:** 0.5% (w/v) Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Πεπτόνη, 0.1 mg/ml Ampicillin. Για στερεό LB/amp προστίθεται και 1.4 % (w/v) άγαρ.
- **IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside):** 200 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O (stock). Φυλάσσεται στους -20°C.
- **X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (BRL):** 20 mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο (DMFO, stock). Αποθηκεύεται στους -20°C.
- **Ampicillin:** 100 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C.

### 2.2.21 Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων.

- 600 μl από υγρή καλλιέργεια *E.coli* μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf.
- Προσθήκη 400 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 99%.
- Το μίγμα αναμειγνύεται και ψύχεται σε υγρό άζωτο.
- Αποθήκευση στους -80°C.

### 2.2.22 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E.coli*.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης:

#### Απαραίτητα διαλύματα:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα P1:** 50mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0 και 100 µg/ml RNάση.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης P2:** 0.2N NaOH, 1% (w/v) SDS.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα P3(3M/5M CH<sub>3</sub>COOK):** 60 ml 5M οξικού καλίου pH 4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11.5 ml οξικού οξέος και 28.5 ml ddH<sub>2</sub>O.
- **RNάση:** Διάλυμα RNάσηςA 10 mg/ml σε 10mM Tris-HCl pH 7.4, 15mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15 min. Διακοπή για 20 min και επανάληψη βρασμού (καταστροφή υπολειμμάτων DNAσών). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

#### Διαδικασία:

- Το P3 τοποθετείται στον πάγο 10 min πριν ξεκινήσει η διαδικασία.
- 1.5 ml υγρής καλλιέργειας μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1 min στις 13.000 rpm.
- Αποχύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 µl διαλύματος P1.
- Ακολουθεί προσθήκη 200 µl από το διάλυμα λύσης P2 και ελαφρά ανακίνηση μέχρις ότου το μίγμα αποκτήσει ομοιογενές χρώμα.
- Ακολουθεί προσθήκη 200 µl διαλύματος P3 και ελαφρά ανακίνηση μέχρις ότου το μίγμα αποκτήσει λευκό χρώμα.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση για 10 min στις 13.000 rpm.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf.

- Προστίθενται δύο όγκοι του υπερκείμενου αιθανόλης 100% v/v.
- Ακολουθεί ανάμιξη και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα διαλύεται σε 30 μl δις απεσταγμένο/αποστειρωμένο νερό.

### **2.2.23 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (QIAGEN).**

Για εφαρμογές που απαιτούν υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA όπως είναι η αλληλούχηση των ενθέτων που φέρουν οι πλασμιδιακοί φορείς χρησιμοποιείται το εμπορικό κίτ απομόνωσης πλασμιδιακού DNA της QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit).

### **2.2.24 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού.**

Οι πέψεις δειγμάτων DNA από ενδονουκλεάσες περιορισμού λαμβάνουν χώρα σε σχετικά μικρούς όγκους, 20-50 μl. Το ρυθμιστικό διάλυμα δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης, το DNA το 80% ενώ το ένζυμο περιορισμού το 10%.

Σε φιαλίδιο erpendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH<sub>2</sub>O, 1/10 του όγκου 10X του κατάλληλου κατά περίπτωση ρυθμιστικού διαλύματος, το DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού.

Ακολουθεί ανάμιξη του δείγματος και επώαση για διάστημα 1-12 ωρών στους 37°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης διαφέρει μεταξύ των ενζύμων περιορισμού. Η πλειονότητα όμως λειτουργεί άριστα στους 37°C.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Η εστεράση της ορμόνης νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides* (*SnoJHE*).

Σε προηγούμενη εργασία (Κοντογιαννάτος, 2008), απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε ένα cDNA που κωδικοποιεί για μία εστεράση της ορμόνης νεότητας (*JHE*) από το νυκτόβιο λεπιδόπτερο *S. nonagrioides*.

Από την εργασία αυτή προέκυψε ότι η νουκλεοτιδική ακολουθία του cDNA αποτελείται από 1838 νουκλεοτίδια, ενώ εντός της ακολουθίας βρίσκεται ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο 1730 bp μεταξύ των θέσεων 20-1750. Η μεθειονίνη που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο έναρξης (ATG) βρίσκεται στις θέσεις 20-22, ενώ η 5'- μη μεταφραζόμενη περιοχή αποτελείται από 19 και η 3'- από 31 νουκλεοτίδια αντίστοιχα.

Το *SnoJHE* δεν διαθέτει το συντηρημένο σινιάλο πολυαδελυνίωσης ATAAA στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή και η αμινοξική του ακολουθία αποτελείται από 576 αμινοξέα ενώ το προβλεφθέν μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό του σημείο είναι 64.240 Da και 7,49 αντίστοιχα. Στο N'-τελικό του άκρο, το *SnoJHE* φέρει ένα πεπτιδίο-οδηγό μεγέθους 19 αμινοξέων (MMRHFYFFICFLTTCYCCG).

Σε αναπτυξιακό επίπεδο, το *SnoJHE* διατηρεί υψηλά επίπεδα μεταγραφής αμέσως μετά την έκδυση του 4<sup>ου</sup> προς το 5<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο και τα επίπεδά του ελαχιστοποιούνται κατά την μετάβαση του στο 6<sup>ο</sup> προνυμφικό στάδιο, ενώ το χημικό ανάλογο (*JHA*) methoprene φαίνεται να επάγει την μεταγραφική του δραστηριότητα. Κατά την διάρκεια της διάπαυσης, το *SnoJHE* καταστέλλεται, ενώ παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση των επιπέδων του την 15<sup>η</sup> ημέρα από την εκκόλαψη (αρχές του τέταρτου προνυμφικού σταδίου) και μια πτώση από την 25<sup>η</sup> ημέρα και μετά.

Το *SnoJHE* ακολουθεί το πρότυπο μεταβολής της συγκέντρωσης των *JHs* στο λίπος του εντόμου, σε συνθήκες διάπαυσης, ενώ τα υψηλά επίπεδα μεταγραφής του στις συνθήκες αυτές, εμφανίζονται νωρίτερα του κύματος των *JHs* όχι την 25<sup>η</sup> αλλά την 15<sup>η</sup> ημέρα από την εκκόλαψη.

Τέλος, το *SnoJHE* εμφανίζει κατά το μεγαλύτερο μέρος του, υψηλού βαθμού ομολογία με την υπεροικογένεια των λιπασών-εστερασών, διατηρώντας όλα τα χαρακτηριστικά των τελευταίων, όπως την συντηρημένη καταλυτική τριάδα και εσοχή πρόσδεσης του υποστρώματος.

Κατά το μεγαλύτερο μέρος του εμφανίζει ένα συντηρημένο τμήμα δευτεροταγούς δομής όμοιο με εκείνο των CO-εστερασών, όπως αυτή της *PnbA* εστεράσης (εστεράση του παρανιτροβενζολίου, *p-nitrobenzyl esterase*).

Το *SnoJHE* εμφανίζει τη μεγαλύτερη ομολογία με το *JHE* του *B. mori* (total score: 169; A.N. [AY489292.1](#)), *Mythimna separata*, (total score:158); A.N. [FJ875998.1](#)) και *Omphisa fuscidentalis*, (total score:140); A.N.[EU523701.1](#)).

Όσον αφορά το ενεργό κέντρο, τα περισσότερα αμινοξικά του κατάλοιπα είναι αρκετά συντηρημένα σε σχέση με εκείνα της μοναδικής κρυσταλωμένης εστεράσης της ορμόνης νεότητας του εντόμου *Manduca sexta* (*MsJHE*). Από τα καταλυτικά αμινοξέα του *SnoJHE*, μόνο δύο δεν είναι συντηρημένα (V478,

C232), ενώ από τα αμινοξικά κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας σερίνης, ιστιδίνης, γλουταμινικό ή ασπαρτικό -χαρακτηριστικό των περισσότερων σερινο-πρωτεασών- μόνο η σερίνη και η ιστιδίνη είναι συντηρημένα, σε σχέση πάντα με την μοναδική επιλυμένη δομή της JHE του εντόμου *Manduca sexta* (MsJHE).

### 3.2 Τα γονίδια της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο *S.nonagrioides*.

Σε μια προσπάθεια να κλωνοποιηθεί ολόκληρο το γονίδιο *SnoJHE*, σχεδιάστηκε ένας εκκινητής 35 bp κατωφερικά του πρώτου ATG (*Wf* εκκινητής) και σε συνδυασμό με τον 3'R χρησιμοποιήθηκε σε PCR με *As* extension, σε cDNA παρασκευασμένο από RNA λιπώδη ιστού προνύμφης 5<sup>ου</sup> σταδίου, ανεπτυγμένη σε συνθήκες LD 16:8, στους 25°C.

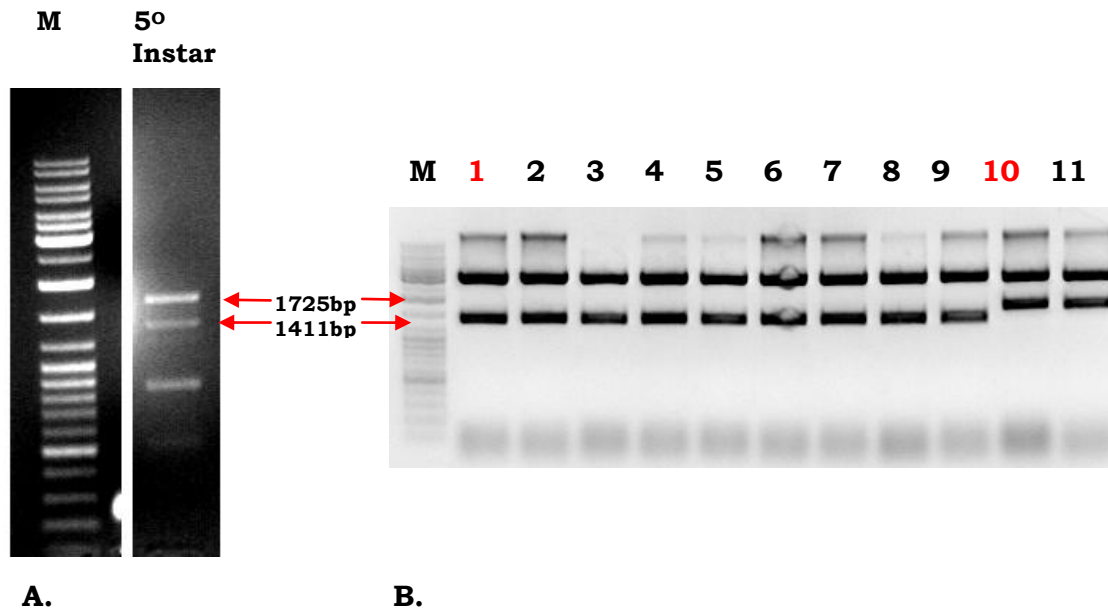
Οι δύο αυτοί εκκινητές υβριδίζουν στην αλληλουχία του *SnoJHE*, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.1. και στην εικόνα 3.4.2.1.



**Εικόνα 3.2.1.** Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου *SnoJHE*. Με τα βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις υβριδισμού των *Wf*/*3'R* εκκινητών, ενώ οι αριθμοί στα σημεία αυτά συμβολίζουν την αρχή τους, με βάση την αρίθμηση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του *SnoJHE*.

Από την αντίδραση αυτή, αναμενόταν ένα προϊόν 1725 bp, (τμήμα 1725 bp του *SnoJHE*), όμως προέκυψαν 5 προϊόντα, τα τρία μεγαλύτερα των οποίων είχαν μέγεθος 1725 bp, 1411 bp και 1300 bp αντίστοιχα (Εικ.3.2.2.).

Τα δύο μεγαλύτερα από τα προϊόντα αυτά (1725 και 1411 bp αντίστοιχα, Εικ. 3.2.2.) απομονώθηκαν και αφού κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM-T easy, αλληλουχήθηκαν.



**Εικόνα 3.2.2. A.** Το αποτέλεσμα PCR με τους Wf/3'R εκκινητές σε cDNA παρασκευασμένο από λίπος προνύμφης 5<sup>ου</sup> σταδίου. **B.** Δοκιμασία πέψης των πλασμιδίων κλωνοποίησης pGEM-T που φέρουν τα γονίδια *SnoJHE-1* και *-2* με το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Οι κλώνοι 1 και 10 που φέρουν τα *SnoJHE-2* και *-1* αντίστοιχα αλληλουκλήθηκαν.

Από την αλληλούχηση προέκυψε πως το προϊόν των 1725 bp αντιστοιχούσε στο πρώτο cDNA που χαρακτηρίστηκε, (*SnoJHE*), το οποίο αργότερα ονομάστηκε *SnoJHE1*. Αντιθέτως, το προϊόν των 1411 bp, ενώ εμφάνιζε απόλυτη ομολογία με το *SnoJHE1* τμήμα του 5' άκρου του, παρουσίασε μία έλλειψη 314 bp. Το προϊόν αυτό, που πιθανώς αντιστοιχούσε σε ένα νέο JHE γονίδιο, ονομάστηκε *SnoJHE2*.

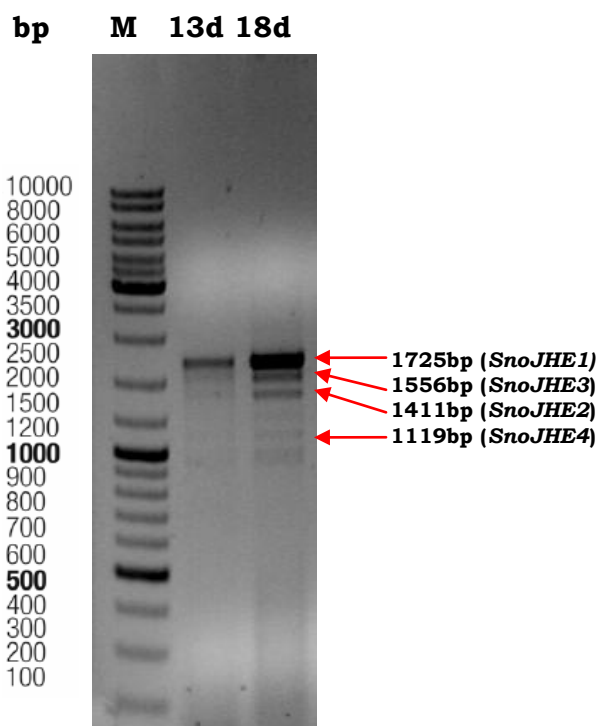
### 3.2.1 Απομόνωση των *SnoJHE* -1,-2,-3,-4.

Προκειμένου να ελεγχθεί αν τα προϊόντα που ελήφθησαν στην προηγούμενη αντίδραση, ήταν ένα γεγονός το οποίο δεν οφειλόταν σε κάποια δευτεροταγή δομή του mRNA, η οποία συντηρήθηκε κατά την παρασκευή του cDNA, πραγματοποιήθηκε PCR σε δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, με τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως (παρ.3.2).

Συγκεκριμένα, οι Wf/3'R εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε PCR με *As extension*, σε cDNA παρασκευασμένο από RNA λιπώδη ιστού μη διαπαύουσων προνυμφών, 13 και 18 ημερών από την στιγμή της εκκόλαψης.

Το pattern των προϊόντων αυτής της αντίδρασης ήταν διαφοροποιημένο από εκείνο που παρατηρήθηκε στην πρώτη (βλ. παρ.3.2; Εικ. 3.2.2.A.), αφού αντί για πέντε προϊόντα προέκυψαν έξι, τα μεγέθη των οποίων κυμαίνονταν μεταξύ 1000-1725 bp.

4 από τα 6 προϊόντα αυτά, τα προϊόντα των 1725 bp, 1411 bp, 1556 bp και 1119 bp απομονώθηκαν, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Η απομόνωση έγινε από την αντίδραση 2 (18d μετά την εκκόλαψη, Εικ.3.2.1.1.).



**Εικόνα 3.2.1.1.** Το αποτέλεσμα της PCR με τους Wf/3'R εκκινητές σε cDNA παρασκευασμένο από λίπος προνύμφης 13<sup>ου</sup> και 18<sup>ου</sup> σταδίου. Τα προϊόντα (τέσσερα γονίδια), τα μεγέθη τους και η αντίστοιχη ονομασία τους υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη.



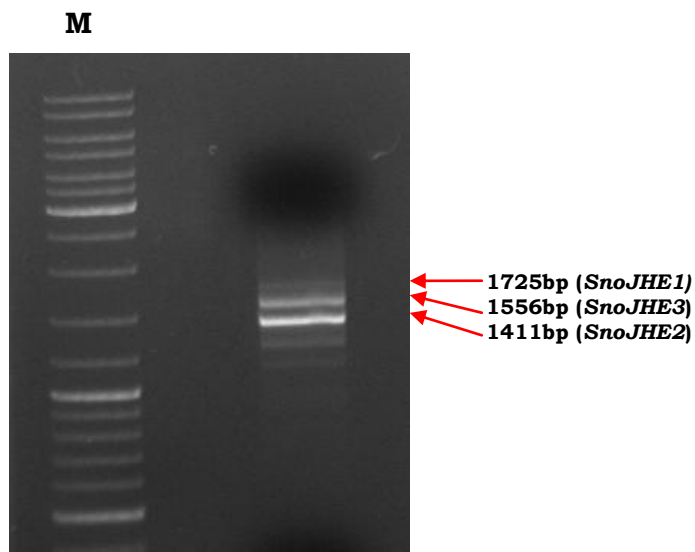
### 3.2.2 Απομόνωση και κλωνοποίηση των *SnoJHE-1-2-3*.

Όλα τα προϊόντα που προαναφέρθηκαν -1725 bp, 1411 bp, 1556 bp και 1119 bp- απομονώθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Παρ' ότι φάνηκε πως τα προϊόντα των 1725 bp και 1411 bp που προέκυψαν από τις δύο καινούργιες αντιδράσεις, αντιστοιχούσαν στα *SnoJHE-1* και -2 (βλ.παρ.3.2.1.), κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν ξανά.

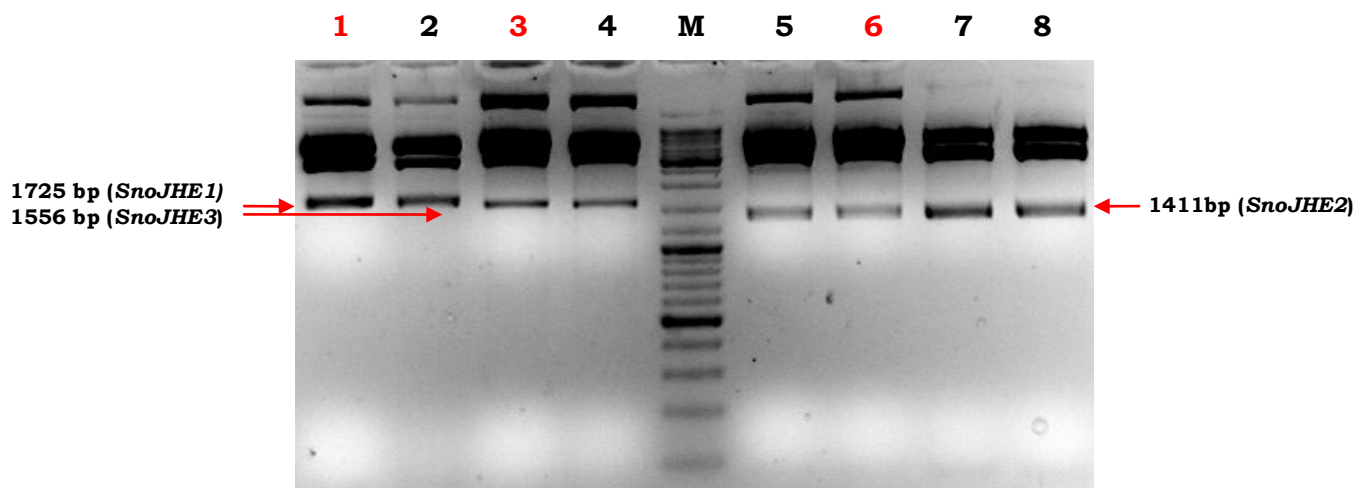
Αυτό έγινε διότι η πρώτη αντίδραση (Εικ. 3.2.2.A.) παρουσίασε ένα διαφορετικό pattern προϊόντων από τις άλλες δύο (Εικ. 3.2.1.1.). Προκειμένου να εξασφαλιστεί πως τα δύο προϊόντα των 1725 bp και 1411 bp που εμφανίστηκαν σε όλες τις αντιδράσεις (Εικ. 3.2.2.A.; Εικ. 3.2.1.1.), αφορούν τα ίδια μεταφραφήματα και κατά συνέπεια και τα υπόλοιπα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών αφορούν τα μέλη της ίδιας οικογενείας γονιδίων, απομονώθηκαν και αλληλουχήθηκαν ξανά. Οι αλληλουχίες που αναφέρονται παρακάτω είναι αποτέλεσμα αυτής της πειραματικής διαδικασίας. (\*σημ1: οι κλωνοποιήσεις που ακολουθούν έγιναν από την ίδια αντίδραση; \*σημ2: τα cDNA των τελευταίων αντιδράσεων παρασκευάστηκαν από διαφορετικά άτομα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων).

Το προϊόν των 1725 bp (*SnoJHE1*) απομονώθηκε από το μητρικό gel, (Εικ.3.2.1.1.), απ' ευθείας. Τα προϊόντα των 1556 και 1411 bp ήταν αδύνατο να απομονωθούν από το πρώτο gel, λόγω της μικρής διαφοράς τους σε μέγεθος και της χαμηλής συγκέντρωσής τους. Γι' αυτό τον λόγο, αποκόπηκε η περιοχή μεταξύ των 1600-1400 bp, (Εικ.3.2.1.1.), απομονώθηκαν τα περιεχόμενά της και 3 μl από αραιώση 1/1000 χρησιμοποιήθηκαν σε PCR αντίδραση με *As extension* με τους *Wf/3'R* εκκινητές.

Η αντίδραση αυτή επαναπολυμέρησε και κατέστησε περισσότερο εμφανή τα προϊόντα των 1556 και 1411 bp (Εικ.3.2.2.1.), τα οποία απομονώθηκαν στην συνέχεια και αφού κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM-T easy αλληλουχήθηκαν (Εικ. 3.2.2.2.).



**Εικόνα 3.2.2.1.** Επαναπολυμερισμός με τους Wf/3'R εκκινητές του εκκυλίσματος από το gel, (Εικ.3.2.1.1.) μεταξύ 1600-1400 bp. Τα προϊόντα, τα μεγέθη τους και η αντίστοιχη ονομασία τους υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη. Τα δύο προϊόντα των 1556 και 1411 bp απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν.

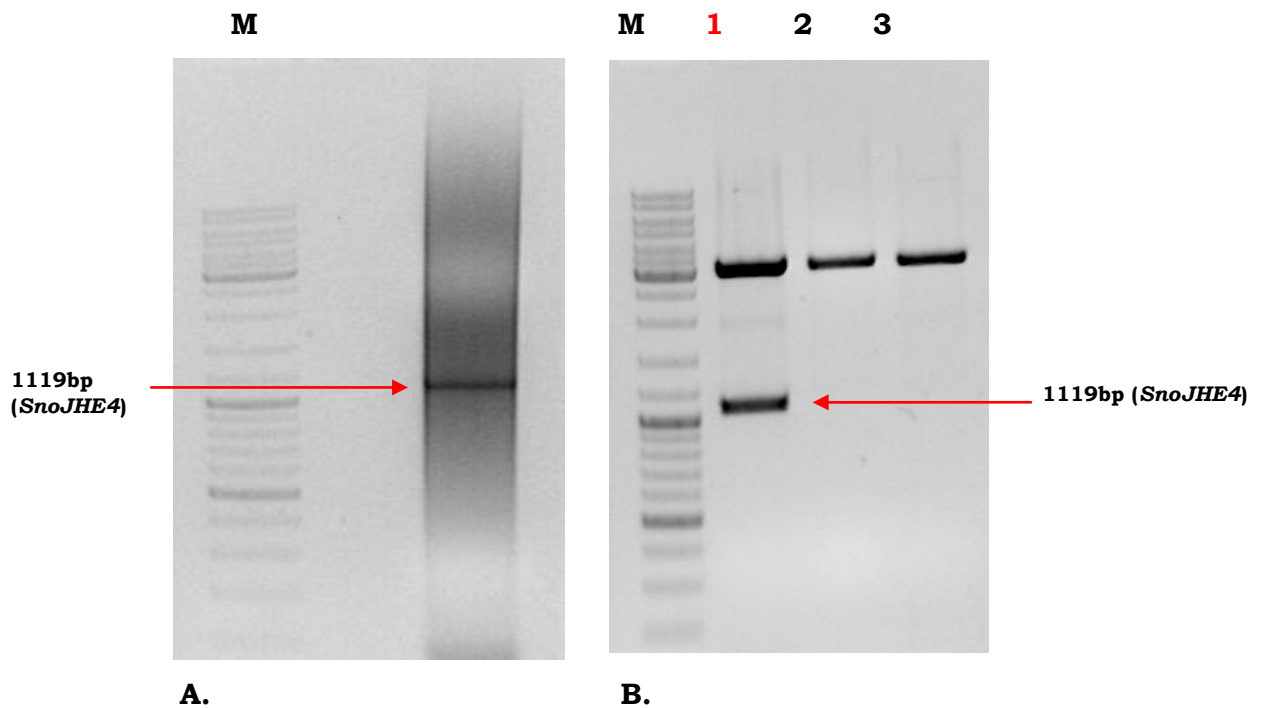


**Εικόνα 3.2.2.2.** Δοκιμασία πέψης των πλασμιδίων κλωνοποίησης pGEM-T που φέρουν τα γονίδια *SnoJHE-1*, -2 και -3 με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Οι κλώνοι 1, 3 και 6 που φέρουν τα *SnoJHE-1*, -3 και -2 αντίστοιχα αλληλουχήθηκαν.

### 3.2.3 Απομόνωση και κλωνοποίηση του *SnoJHE4*.

Το προϊόν των 1119 bp ήταν αδύνατο να απομονωθεί από το αρχικό gel, (Εικ. 3.2.1.1.), λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής του. Γι'αυτό τον λόγο, αποκόπηκε η περιοχή μεταξύ των 1000-1100 bp, (Εικ. 3.2.1.1.), εκκυλίστηκαν τα περιεχόμενά της και 3 μl από αραιώση 1/1000 του εκκυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν σε PCR αντίδραση με *As* extension με τους Wf/3'R εκκινητές.

Η αντίδραση αυτή επαναπολυμέρησε και κατέστησε εμφανές το προϊόν των 1119 bp, το οποίο απομονώθηκε, κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM-T easy και στην συνέχεια αλληλουχήθηκε (Εικ. 3.2.3.1.A;B.).

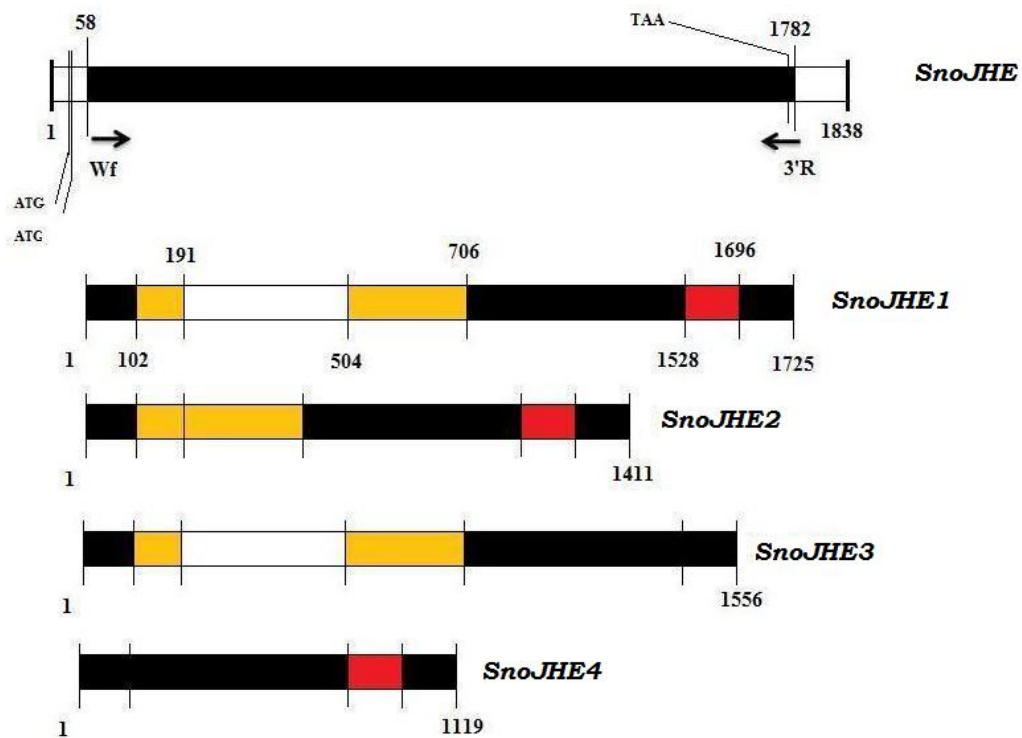


**Εικόνα 3.2.3.1. A.** Επαναπολυμερισμός με τους Wf/3'R εκκινητές του εκκυλίσματος από το gel, (Εικ. 3.2.1.1.) μεταξύ 1000-1100 bp. Το προϊόν των 1119 bp απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε. **B.** Δοκιμασία πέψης των πλασμιδίων κλωνοποίησης pGEM-T που φέρουν το γονίδιο *SnoJHE4* με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Ο κλώνος 1 επιλέχθηκε και αλληλουχήθηκε.

### 3.3 Χαρακτηρισμός των γονιδίων της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides*.

Τα προϊόντα των 1411 bp, 1556 bp και 1119 bp αλληλουχήθηκαν και αντιστοιχούν σε 3 νέα JHE cDNAs, τα *SnoJHE2*, *SnoJHE3* και *SnoJHE4* αντίστοιχα (Εικ.3.3.1.). Τα 3 νέα αυτά cDNAs έχουν 100% ομολογία με το *SnoJHE1* (*SnoJHE*), με την διαφορά ότι εμφανίζουν ελλείψεις σε μερικά σημεία της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας, οι οποίες μοιάζουν με γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος (Εικ. 3.3.1.; Εικ. 3.3.2.).

Για το *SnoJHE2* παρατηρήθηκε μια έλλειψη 314 bp, για το *SnoJHE3* έλλειψη 169 bp και για το *SnoJHE4* έλλειψη 606 bp, σε σύγκριση με την νουκλεοτιδική ακολουθία του *SnoJHE1* (Εικ. 3.3.1.; Εικ. 3.3.2.). Οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες των τεσσάρων γονιδίων στοιχήθηκαν με το πρόγραμμα ClustalX2, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην εικόνα 3.3.2.



**Εικόνα 3.3.1.** Σχηματική απεικόνιση των *SnoJHE* -1, -2, -3 και -4. Με τα βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις υβριδισμού των Wf/3'R εκκινήτων στο *SnoJHE*. Ίδια χρώματα υποδεικνύουν ταυτόσημες περιοχές και στα τέσσερα γονίδια, ενώ οι αριθμοί και οι κάθετες γραμμές στο *SnoJHE1* υποδεικνύουν τις θέσεις που οριοθετούν τις περιοχές αυτές, πάντα με βάση την αλληλουχία του τελευταίου.

**Εικόνα 3.3.2.** Επόμενη σελίδα. Στοιχισή των *ShoJHE -1, -2, -3* και *-4* cDNAs με το πρόγραμμα CLUSTALX. Πανομοιότυπα ή παρόμοια νουκλεοτίδια είναι σκιασμένα με χρώμα μαύρο ή γκρι αντίστοιχα.

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
SnoJHE1 : AACATGTTACTGTTGCGGAAGCCCGACGTTCTCGGGCAATAAGAAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCTGGATTGGTTTGTGGG : 100
SnoJHE2 : AACATGTTACTGTTGCGGAAGCCCGACGTTCTCGGGCAATAAGAAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCTGGATTGGTTTGTGGG : 100
SnoJHE3 : AACATGTTACTGTTGCGGAAGCCCGACGTTCTCGGGCAATAAGAAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCTGGATTGGTTTGTGGG : 100
SnoJHE4 : AACATGTTACTGTTGCGGAAGCCCGACGTTCTCGGGCAATAAGAAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCTGGATTGGTTTGTGGG : 100

*          120          *          140          *          160          *          180          *          200
SnoJHE1 : AGAGTCTGACCCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACCGGAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTTAAAGGAATTACAAC : 200
SnoJHE2 : AGAGTCTGACCCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACCGGAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTTAAAGGAATTACAAC : 190
SnoJHE3 : AGAGTCTGACCCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACCGGAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTTAAAGGAATTACAAC : 200
SnoJHE4 : -----
Agagtcctggaccgagagaaaatgtaagtacgccagcttcaggggaatgccgtacggaagcagccactgagagctacggtttaag

*          220          *          240          *          260          *          280          *          300
SnoJHE1 : CATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCAT : 300
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : CATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCAT : 300
SnoJHE4 : -----

*          320          *          340          *          360          *          380          *          400
SnoJHE1 : GAGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGTCTACGACCAGCGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAAGTGGTCTCCCCATCCTTGGT : 400
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GAGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGTCTACGACCAGCGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAAGTGGTCTCCCCATCCTTGGT : 400
SnoJHE4 : -----

*          420          *          440          *          460          *          480          *          500
SnoJHE1 : TTCATACATGGTGGAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGACCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTCATCACTTTTAACT : 500
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : TTCATACATGGTGGAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGACCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTCATCACTTTTAACT : 500
SnoJHE4 : -----

*          520          *          540          *          560          *          580          *          600
SnoJHE1 : ATACAATCAACGTTTCGGGATATCTCTCCCTGAACTCTACGTCCTGACCTGGTAAACAAGCGGCTTCGGGAGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAG : 600
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : ATACAATCAACGTTTCGGGATATCTCTCCCTGAACTCTACGTCCTGACCTGGTAAACAAGCGGCTTCGGGAGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAG : 600
SnoJHE4 : -----
aatcaacggttccggata ctctccctgaaactctacgtccgtacctggttaacaacgggctt gggagccatcactttgctcaaatgggtacagag

*          620          *          640          *          660          *          680          *          700
SnoJHE1 : GAACGGCGCTGCCTTCGGTGGAGACCTGAAAACGTCACCCCTGGCAGGACAGAGTTGTGGCTCAGTGGCCGCGATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTC : 700
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GAACGGCGCTGCCTTCGGTGGAGACCTGAAAACGTCACCCCTGGCAGGACAGAGTTGTGGCTCAGTGGCCGCGATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTC : 700
SnoJHE4 : -----
gaacggcgctgccttcggtggagacctgaaa cgtcaccctggcaggacagagttgtggctcagt gccgcgcatctagtctcactatctaaagcct t

*          720          *          740          *          760          *          780          *          800
SnoJHE1 : GTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATGATGAGCGGTGTTGGGCAACGGCGTTCCTACACGGCCCTCGCTGCTCACTCAATCTGTGCGGACTATGTTTC : 800
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATGATGAGCGGTGTTGGGCAACGGCGTTCCTACACGGCCCTCGCTGCTCACTCAATCTGTGCGGACTATGTTTC : 800
SnoJHE4 : -----
gtgggactactgaagagagtaaatatgtagagcggtgttgggcaacggcggttctacacggccctcgctgctcactcaatctgtgcgactatgtttc

*          820          *          840          *          860          *          880          *          900
SnoJHE1 : TGGGATACCTAGGCATAAACCCTACTGACCGTGATAAAATCCATGAACAACCTCATACATACACCTCTTGAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACA : 900
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : TGGGATACCTAGGCATAAACCCTACTGACCGTGATAAAATCCATGAACAACCTCATACATACACCTCTTGAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACA : 900
SnoJHE4 : -----
TGGGATACCTAGGCATAAACCCTACTGACCGTGATAAAATCCATGAACAACCTCATACATACACCTCTTGAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACA

*          920          *          940          *          960          *          980          *          1000
SnoJHE1 : GTTAAAGACTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCTGTTGTTGAACCCGAACGTCAGGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTAAACCGG : 1000
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GTTAAAGACTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCTGTTGTTGTTGAACCCGAACGTCAGGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTAAACCGG : 1000
SnoJHE4 : -----
GTTAAAGACTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCTGTTGTTGTTGAACCCGAACGTCAGGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTAAACCGG

*          1020          *          1040          *          1060          *          1080          *          1100
SnoJHE1 : GGCCGGCCGAAAGGACCTTCCTATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGGCAGTTCCTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTTGGGATAATAG : 1100
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GGCCGGCCGAAAGGACCTTCCTATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGGCAGTTCCTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTTGGGATAATAG : 1100
SnoJHE4 : -----
GGCCGGCCGAAAGGACCTTCCTATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGGCAGTTCCTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTTGGGATAATAG

*          1120          *          1140          *          1160          *          1180          *          1200
SnoJHE1 : ACGACAATCTATAGCAATTTACCACCAAACATTAACCTATTCAGTGTCTGAAAGCGAAGCGCTTCGTCGTCAAAGATAACGATTGATAAATTTTCGA : 1200
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : ACGACAATCTATAGCAATTTACCACCAAACATTAACCTATTCAGTGTCTGAAAGCGAAGCGCTTCGTCGTCAAAGATAACGATTGATAAATTTTCGA : 1200
SnoJHE4 : -----
ACGACAATCTATAGCAATTTACCACCAAACATTAACCTATTCAGTGTCTGAAAGCGAAGCGCTTCGTCGTCAAAGATAACGATTGATAAATTTTCGA

*          1220          *          1240          *          1260          *          1280          *          1300
SnoJHE1 : AGGAGGTGCAACAGTGGACAGTTTTATCAAACTGTGACAAATTCGTTCTTCACATACCCCTGCATTCAAGCTGGGGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACG : 1300
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : AGGAGGTGCAACAGTGGACAGTTTTATCAAACTGTGACAAATTCGTTCTTCACATACCCCTGCATTCAAGCTGGGGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACG : 1300
SnoJHE4 : -----
AGGAGGTGCAACAGTGGACAGTTTTATCAAACTGTGACAAATTCGTTCTTCACATACCCCTGCATTCAAGCTGGGGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACG

*          1320          *          1340          *          1360          *          1380          *          1400
SnoJHE1 : TCGGCAGCTACATGATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAAGTTTGGTAAAATGTTGAGCTACCCAGGAGGAGGGGCTCAGCTTGAGG : 1400
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : TCGGCAGCTACATGATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAAGTTTGGTAAAATGTTGAGCTACCCAGGAGGAGGGGCTCAGCTTGAGG : 1400
SnoJHE4 : -----
TCGGCAGCTACATGATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAAGTTTGGTAAAATGTTGAGCTACCCAGGAGGAGGGGCTCAGCTTGAGG

*          1420          *          1440          *          1460          *          1480          *          1500
SnoJHE1 : ACCAGACATTTGTTTACCGGTCAAATCTCTTAAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCCTAGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAC : 1500
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : ACCAGACATTTGTTTACCGGTCAAATCTCTTAAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCCTAGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAC : 1500
SnoJHE4 : -----
ACCAGACATTTGTTTACCGGTCAAATCTCTTAAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCCTAGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAC

*          1520          *          1540          *          1560          *          1580          *          1600
SnoJHE1 : GTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCAAGCCACCAATTTGTGACCAATAAATCGGAAATGGCCAGCGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAAG : 1600
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCAAGCCACCAATTTGTGACCAATAAATCGGAAATGGCCAGCGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAAG : 1527
SnoJHE4 : -----
GTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCAAGCCACCAATTTGTGACCAATAAATCGGAAATGGCCAGCGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAAG

*          1620          *          1640          *          1660          *          1680          *          1700
SnoJHE1 : GAACCCATGCTCATAAACAATAACCTCAACCTGACGGGAGAAGTCCGAGCTGAATTCGACTTCAGGACACGCTCTTTAAAATGGCCACAATAACGAGGAG : 1700
SnoJHE2 : -----
SnoJHE3 : GAACCCATGCTCATAAACAATAACCTCAACCTGACGGGAGAAGTCCGAGCTGAATTCGACTTCAGGACACGCTCTTTAAAATGGCCACAATAACGAGGAG : 1531
SnoJHE4 : -----
gaaccatgctcataaacaataac caacctgacgggagaagctcgagctgaattcgacttcaggacacgctctttaaataaggcacaataacgagagc

*          1720
SnoJHE1 : AGCAAGAGTGCCTGATCCTAGTGTG : 1725
SnoJHE2 : AGCAAGAGTGCCTGATCCTAGTGTG : 1411
SnoJHE3 : AGCAAGAGTGCCTGATCCTAGTGTG : 1556
SnoJHE4 : AGCAAGAGTGCCTGATCCTAGTGTG : 1119
AGCAAGAGTGCCTGATCCTAGTGTG

```

Λόγω της σημαντικής ομολογίας, ήταν δύσκολο να απομονωθούν τα 5' και 3' UTRs των *SnoJHE2*, *SnoJHE3* και *SnoJHE4* (τα 5' και 3' UTR του *SnoJHE1* αλλουλήθηκαν από προηγούμενη εργασία).

Εντούτοις, οι προβλεφθείσες αμινοξικές ακολουθίες των τριών νέων cDNAs περιείχαν ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμφανίζουν μεγάλη ομολογία με γνωστές JHEs και σχεδόν ταυτόσημη ομολογία με την SnoJHE. Οι προβλεφθείσες αμινοξικές ακολουθίες και των τεσσάρων γονιδίων στοιχήθηκαν με το πρόγραμμα CLUSTALX, (Εικ. 3.3.3.).

Οι περιοχές που επιλέχθηκαν για την στοίχιση ξεκινούσαν από την αρχή των πεπτιδίων (όχι την πρώτη μεθειονίνη) μέχρι το τελευταίο αμινοξύ, πριν το κωδικόνιο λήξης.

Από την στοίχιση προέκυψε πως τα τέσσερα αυτά πολυπεπίδια, κατά ένα μεγάλο τμήμα της αλληλουχίας τους, εμφάνιζαν ομολογία της τάξης του 100%, ενώ οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα μεγέθη τους (*SnoJHE* -1: 563, -2: 458, -3: 516, -4: 516 αμινοξέα) οφείλονταν σε διαφοροποιήσεις στα άμινο- και καρβόξυ τελικά άκρα τους (Εικ. 3.3.3.).



```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100
SnoJHE1 : FCYCCGSPTFSSANKNNTLDCDVATRIDSGLVCGRVWTAENVHYASEIRGMPYAKQPIREIRKELQLLEWAGVLLATKEGPICQYDEIYGLARFVGMSESC : 104
SnoJHE2 : -----HVTVAEARRSRRI RTTTLWTVTWPHASTLDWFVGESEGPQRKMLSTPASGECRTRSSHCE----- : 58
SnoJHE3 : FCYCCGSPTFSSANKNNTLDCDVATRIDSGLVCGRVWTAENVHYASEIRGMPYAKQPIREIRKELQLLEWAGVLLATKEGPICQYDEIYGLARFVGMSESC : 104
SnoJHE4 : -----HVTVAEARRSRRI RTTTLWTVTWPHASTLDWFVGESEGPQRKMLSTPASGECRTRSSHCE----- : 33
              V A R 4 L 6 5 LD 5 G p e r

      *          120          *          140          *          160          *          180          *          200
SnoJHE1 : ILANVHVPLDVYDRRSKAICQKKTGLPILVFIHGGGFQAGSGSDSLHGPEYLVSKGVIVITENYRINRVFGYLSLNSTSVPGNNGLRDAITLLKQVQRNARAFGGD : 208
SnoJHE2 : -----SYGLRINRVFGYLSLNSTSVPGNNGLRDAITLLKQVQRNARAFGGD : 103
SnoJHE3 : VLANVHVPLDVYDRRSKAICQKKTGLPILVFIHGGGFQAGSGSDSLHGPEYLVSKGVIVITENYRINRVFGYLSLNSTSVPGNNGLRDAITLLKQVQRNARAFGGD : 208
SnoJHE4 : -----rinvfgylslnstsvpgnngl daitllkwqrnarafggd : -

      *          GQSCG          *          240          *          260          *          280          *          300          *
SnoJHE1 : PENVTLAGQSCG SVA AHLVSLSKA SVGLLKRVIILMSGVNGGFY TASPAYAQS VATMFLGYVGINS TDADKIHEQLIHTPLDKIMEANRIVQLKTGLVSFVPVV : 312
SnoJHE2 : PENVTLAGQSCG SVA AHLVSLSKA SVGLLKRVIILMSGVNGGFY TASPAYAQS VATMFLGYVGINS TDADKIHEQLIHTPLDKIMEANRIVQLKTGLVSFVPVV : 207
SnoJHE3 : PETVTLAGQSCG SVA AHLVSLSKA SVGLLKRVIILMSGVNGGFY TASPAYAQS VATMFLGYVGINS TDADKIHEQLIHTPLDKIMEANRIVQLKTGLVSFVPVV : 312
SnoJHE4 : -----LLKRVIILMSGVNGGFY TASPAYAQS VATMFLGYVGINS TDADKIHEQLIHTPLDKIMEANRIVQLKTGLVSFVPVV : 110
pe vtlagqscgsvaahlvslska vgLLKRVIILMSGVNGGFY TASPAYAQS VATMFLGYVGINS TDADKIHEQLIHTPLDKIMEANRIVQLKTGLVSFVPVV

      320          *          340          *          360          *          380          *          400          *
SnoJHE1 : EPERPGVTRILDDYPANLVKRGRAKDLPMIVGVTSVECCQFFKQRIEYLDMLGIIDDNSIAILPPNITYSVSESEALRLSKITIDRYFEGGATVDKFIKYCTNSF : 416
SnoJHE2 : EPERPGVTRILDDYPANLVKRGRAKDLPMIVGVTSVECCQFFKQRIEYLDMLGIIDDNSIAILPPNITYSVSESEALRLSKITIDRYFEGGATVDKFIKYCTNSF : 311
SnoJHE3 : EPERPGVTRILDDYPANLVKRGRAKDLPMIVGVTSVECCQFFKQRIEYLDMLGIIDDNSIAILPPNITYSVSESEALRLSKITIDRYFEGGATVDKFIKYCTNSF : 416
SnoJHE4 : EPERPGVTRILDDYPANLVKRGRAKDLPMIVGVTSVECCQFFKQRIEYLDMLGIIDDNSIAILPPNITYSVSESEALRLSKITIDRYFEGGATVDKFIKYCTNSF : 214
EPPERPGVTRILDDYPANLVKRGRA4DLP MIVGVTSVECCQFFKQRIEYLDMLGIIDDNSIAILPPNITYSVSESEALRLSKITIDRYFEGGATVDKFIKYCTNSF

      420          *          440          *          460          *          480          *          500          *          520
SnoJHE1 : FTYPAFKLAEWTSVGTSAVYMYQDFDSEFNAVKFGKMLTYPGGGAHVEDQTFVLRVNSLMDPDEKSFPPRTRDDLKMYWMTTFVFNFMRC SHPICDHKSEWE : 520
SnoJHE2 : FTYPAFKLAEWTSVGTSAVYMYQDFDSEFNAVKFGKMLTYPGGGAHVEDQTFVLRVNSLMDPDEKSFPPRTRDDLKMYWMTTFVFNFMRC SHPICDHKSEWE : 415
SnoJHE3 : FTYPAFKLAEWTSVGTSAVYMYQDFDSEFNAVKFGKMLTYPGGGAHVEDQTFVLRVNSLMDPDEKSFPPRTRDDLKMYWMTTFVFNFMRC -----RSSKS : 513
SnoJHE4 : FTYPAFKLAEWTSVGTSAVYMYQDFDSEFNAVKFGKMLTYPGGGAHVEDQTFVLRVNSLMDPDEKSFPPRTRDDLKMYWMTTFVFNFMRC SHPICDHKSEWE : 318
FTYPAFKLAEWTSVGTSAVYMYQDFDSEFNAVKFGKMLTYPGGGAHVEDQTFVLRVNSLMDPDEKSFPPRTRDDLKMYWMTTFVFNFMRCshpicdh4Sewp

      *          540          *          560
SnoJHE1 : ATDAKQLNYQLIKEPMLINNNINLTGELRAEFDQDLFKMAQ : 563
SnoJHE2 : ATDAKQLNYQLIKEPMLINNNINLTGELRAEFDQDLFKMAQ : 458
SnoJHE3 : ASS----- : 516
SnoJHE4 : ATDAKQLNYQLIKEPMLINNNINLTGELRAEFDQDLFKMAQ : 361
A3dakqlnyqlikepmlinnn nltgelraefdqdlfkmaq

```

**A.**

```

SnoJHE2 : HVTVAEARRSRRI RTTTLWTVTWPHASTLDWFVGESEGPQRKMLSTPASGECRTRSSHCE SYGL
SnoJHE4 : HVTVAEARRSRRI RTTTLWTVTWPHASTLDWFVGESEGPQRKMLSTPASGECRTRSSHCE

```

**B.**

SnoJHE3 RSSKS ASS

**Γ.**

**Εικόνα 3.3.3. Α.** Στοιχίση των αμινοξικών ακολουθιών των SnoJHE -1, -2, -3 και -4 με το πρόγραμμα CLUSTALX. **Β.** Τα 33 κοινά αμινοξικά κατάλοιπα των Ν'-άκρων των SnoJHE-2,-4 (μπλε τετραγωνισμένη περιοχή) και τα επιπλέον 29 αμινοξικά κατάλοιπα που ακολουθούν στο SnoJHE2 μετά από την περιοχή αυτή τα οποία δεν εντοπίζονται στο SnoJHE4 (κόκκινη τετραγωνισμένη περιοχή). **Γ.** Το διαφοροποιημένο C'-άκρο των 8 αμινοξέων (RSSKSASS) στο SnoJHE3.



Οι αμινοξικές ακολουθίες των τεσσάρων αυτών γονιδίων εμφάνιζαν θεμελιώδεις διαφορές μόνο στα άμινο και καρβόξυ τελικά άκρα τους. Οι διαφορές αυτές των αμινοξικών ακολουθιών, οι οποίες εμφανίστηκαν ύστερα από την στοίχιση, μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

1. Τα SnoJHE-1,-2,-3 διαθέτουν το καταλυτικό μοτίβο GX SXG (GQSCG) ενώ στο SnoJHE4 φαίνεται να απουσιάζει το μοτίβο αυτό (Εικ. 3.3.3.).
2. Τα SnoJHE-1,-2,-3,-4 εμφανίζουν μια υψηλά συντηρημένη, σχεδόν ταυτόσημη κεντρική περιοχή (μπλέ χρώμα), ενώ οι κύριες διαφορές τους εντοπίζονται στα καρβόξυ και αμινο τελικά άκρα τους (Εικ. 3.3.3.).
3. Τα SnoJHE-1,-2,-4 διαθέτουν ένα σχεδόν ταυτόσημο C-άκρο, ενώ το SnoJHE3 διαφοροποιείται σε 8 αμινοξέα (RSSKSASS) στο άκρο αυτό (Εικ. 3.3.3.).
4. Τα SnoJHE-1-2-3 στην αμινοτελική περιοχή διαθέτουν μια υψηλά συντηρημένη περιοχή, που περιέχει και το καταλυτικό μοτίβο (GQSCG) (πορτοκαλί χρώμα) (Εικ. 3.3.3.) .
5. Τα SnoJHE-1,-3 εμφανίζουν ένα N- τελικό άκρο ταυτόσημο (κίτρινο χρώμα), ενώ τα SnoJHE-2,-4 εμφανίζουν ένα N- τελικό άκρο διαφορετικό από τις υπόλοιπες 2 εστεράσες (Εικ. 3.3.3.).
6. Τα SnoJHE-2,-4 στα Ν'-άκρα τους εμφανίζουν κοινά 33 αμινοξικά κατάλοιπα (μπλε τετραγωνισμένη περιοχή), ενώ το SnoJHE2 περιέχει επιπλέον 29 αμινοξικά κατάλοιπα μετά από την περιοχή αυτή, τα οποία δεν εντοπίζονται στο SnoJHE4 (Εικ. 3.3.3.).

### 3.4 Γονιδιωματική ανάλυση.

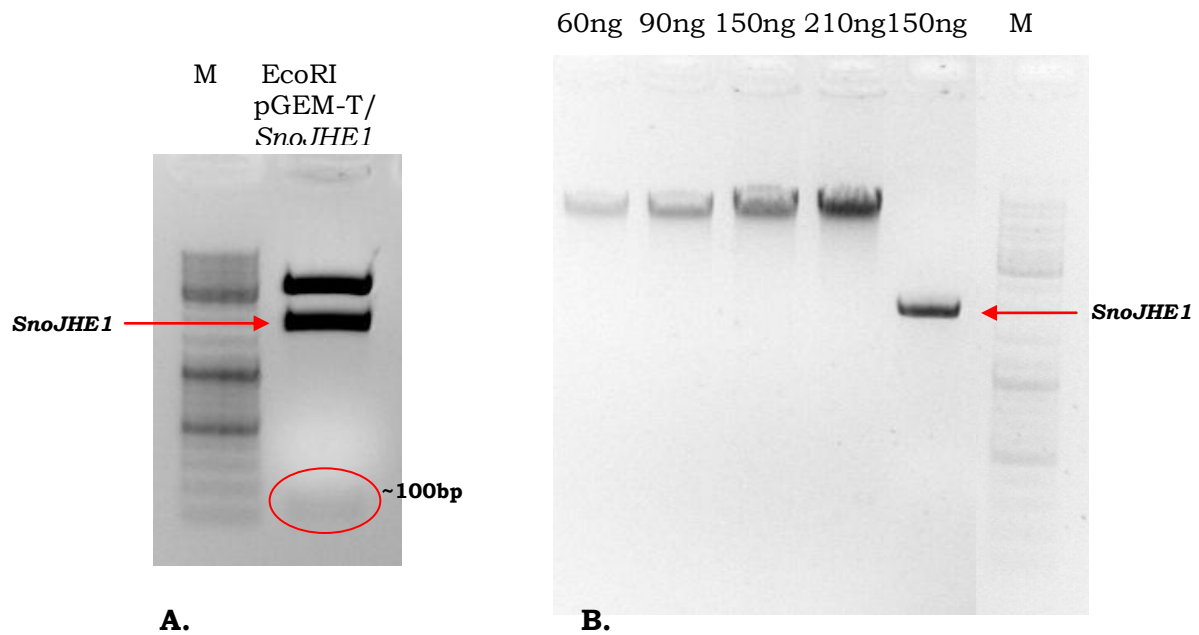
#### 3.4.1 Υβριδισμός κατά Southern και ανίχνευση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο γονιδίωμα του εντόμου *S.nonagrioides*.

Για να ερευνηθεί εάν τα τέσσερα μεταγραφήματα ήταν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός γονιδίου ή προϊόντα διαφορετικών γονιδίων, που βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα της *S.nonagrioides*, έγινε υβριδισμός κατά Southern, σε γονιδιωματικό DNA από ολόκληρο σώμα προνυμφών πέμπτου προνυμφικού σταδίου.

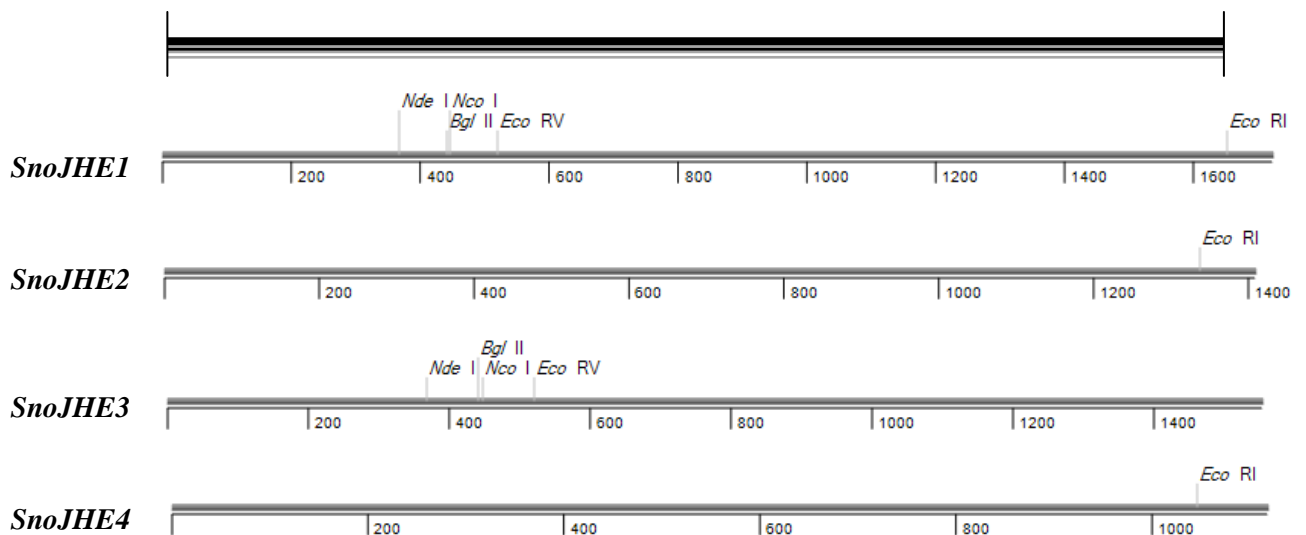
Αρχικά σχεδιάστηκαν οι χάρτες περιορισμού και για τα τέσσερα γονίδια με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής SeqBuilder (Lasergene) (Εικ.3 .4.1.2.). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό του χάρτη ήταν τα *Bgl II*, *EcoRI*, *EcoRV*, *NcoI* και *NdeI*.

Σαν ικνηλάτης χρησιμοποιήθηκε τμήμα του *SnoJHE1* cDNA, που είχε κλωνοποιηθεί στον φορέα pGEM-t easy Vector (Εικ. 3.4.1.1.). Το τμήμα απομονώθηκε από τον φορέα, ύστερα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* (σημ.: Το *EcoRI* κόβει μία φορά στο *SnoJHE1*) (Εικ. 3.4.1.1.). Το τμήμα που προέκυψε από την πέψη αυτή εκκυλίστηκε από το gel και αφού προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του με μάρτυρα φαγικό DNA γνωστής συγκέντρωσης, 300 ng αυτού χρησιμοποιήθηκαν για σήμανση με μη ραδιενεργό μίγμα σήμανσης (DIG high prime, Roche) (Εικ. 3.4.1.1.).

15 μg γενωματικού DNA υπέστησαν πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *Bgl II*, *EcoRI*, *EcoRV*, *NcoI*, *NdeI*, αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0.7% w/v και μεταφέρθηκαν σε πλαστική μεμβράνη (Nylon membrane positively charged, Boehringer Mannheim). Ο υβριδισμός έλαβε χώρα στους 60°C σε διάλυμα υβριδισμού/προυβριδισμού, που περιείχε 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5M Na[P] pH=7.2 και 7% SDS. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν δύο φορές στους 60°C σε διάλυμα που περιείχε 5% SDS, 40mM Na[P] και 1mM EDTA, και τρεις φορές στους 50°C σε διάλυμα που περιείχε 1% SDS, 40mM Na[P] and 1mM EDTA. Η ανίχνευση του σήματος επιτεύχθηκε με εμπορικό κιτ (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche, 68298 Mannheim Germany), (Εικ. 3.4.1.3.).

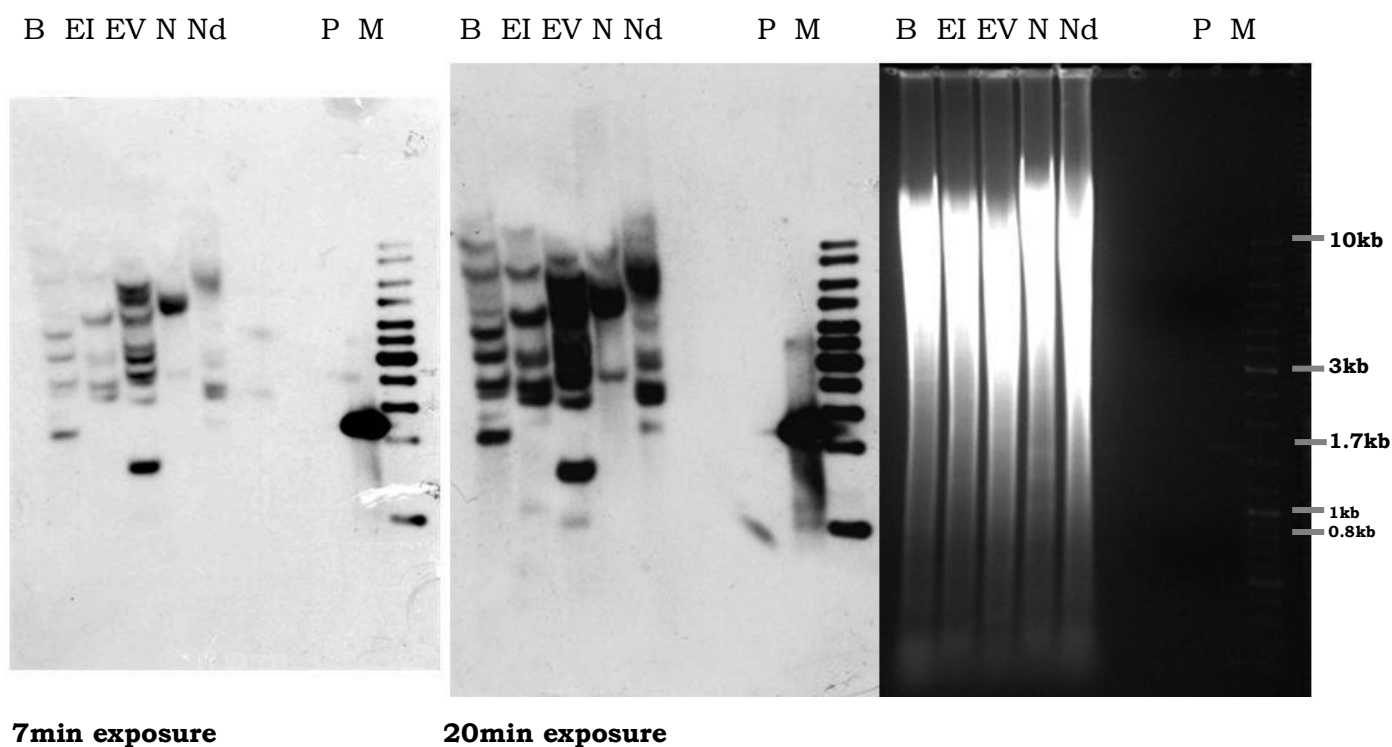


**Εικόνα 3.4.1.1. A.** Πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* του *SnoJHE1* από τον φορέα pGEM-T, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του ικνηλάτη. Με κόκκινο κύκλο υποδεικνύεται τμήμα ~100 bp, το οποίο αποκόπηκε και δεν χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του ικνηλάτη. **B.** Το τμήμα του *SnoJHE1* το οποίο εκκυστίστηκε από το gel αριστερά και ποσοτικοποιήθηκε με φαγικό DNA γνωστής συγκέντρωσης.



**Εικόνα 3.4.1.2.** Χάρτες περιορισμού των *SnoJHE -1, -2, -3, -4*. Η μπάρα πάνω από το *SnoJHE1* υποδεικνύει το τμήμα των ~1600bp που χρησιμοποιήθηκε σαν ικνηλάτης για τον υβριδισμό.

Από τον υβριδισμό κατά Southern προέκυψαν πολλές θετικές ζώνες σε κάθε μία από τις πέψεις του gDNA. Συγκρίνοντας τον αριθμό των θετικών ζωνών που προέκυψαν από τον υβριδισμό (Εικ. 3.4.1.3.) με τον περιοριστικό χάρτη του *SnoJHE1* (Εικ. 3.4.1.2.), φαίνεται πως η JHE στο έντομο *S. nonagrioides* κωδικοποιείται από περισσότερα του ενός γονίδια.



**Εικόνα 3.4.1.3.** Δεξιά, πέψη γονιδιωματικού DNA με τα ένζυμα περιορισμού *Bgl II* (B), *EcoRI* (EI), *EcoRV* (EV), *NcoI* (N), *NdeI* (Nd) και το αποτέλεσμα του υβριδισμού κατά Southern. Με P συμβολίζεται το τμήμα του *SnoJHE1*, 30 ng του οποίου φορτώθηκαν στο gel και στην συνέχεια υβριδίστηκαν ενώ με M συμβολίζεται ο marker, ο οποίος επίσης χρησιμοποιήθηκε στον υβριδισμό. Αριστερά υποδεικνύεται το αυτοραδιόγραμμα ύστερα από έκθεση σε x-ray film για 7 λεπτά, ενώ στο κέντρο ύστερα από έκθεση για 20 λεπτά.

### 3.4.2 Απομόνωση των γονιδίων της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο έντομο *S.nonagrioides* από γονιδιωματικό DNA.

Αφού επιβεβαιώθηκε ότι η JHE στο έντομο *S. nonagrioides* κωδικοποιείται από πολυοικογένεια γονιδίων, επόμενος στόχος ήταν η απομόνωση των γονιδίων αυτών από γονιδιωματικό DNA. Η απομόνωση έγινε τμηματικά, με αλληλεπικαλυπτόμενους εκκινητές που σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του *SnoJHE*.

Έγιναν PCR αντιδράσεις με τρία ζεύγη εκκινητών:

α. Wf:AACATGTTACTGTTGCGGAAGC/5'R:GTACCCATTTGAGCAAAGTGATG,

β. 3'f:AGGGACGACCTCATGAAATACTG/3'R:GACACTAGGATGACGCACTCTTG,

γ. Mf:CAACGTGTTCCGGATATCTCTC/MR:GATGCAGCCACCCAATTTGTGA.

Όλα τα προϊόντα που προέκυψαν από αυτές τις αντιδράσεις κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Αφού επιβεβαιώθηκε με τον αλγόριθμο BLAST ότι τα προϊόντα αυτά ήταν JHE-related, στοιχήθηκαν με τα τέσσερα cDNAs που απομονώθηκαν προηγουμένως, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ClustalX2.

Συγκεκριμένα, από το πρώτο ζευγάρι εκκινητών προέκυψαν 3 προϊόντα μεγέθους 281, 596 και 1990 bp αντίστοιχα. Από την αντιστοίχιση των προϊόντων αυτών με τα *SnoJHE* γονίδια, προέκυψε πως: το πρώτο προϊόν είχε 100% ομολογία με την περιοχή που οριοθετούνταν από τους Wf/5'R εκκινητές στο *SnoJHE2*. Το δεύτερο με την αντίστοιχη περιοχή στα *SnoJHE -1* και *-3*. Το τρίτο εμφάνιζε και αυτό 100% ομολογία με την περιοχή που οριοθετούνταν από τους Wf/5'R εκκινητές στα *SnoJHE -1* και *-3*, με την διαφορά ότι η περιοχή αυτή διακοπτόταν από δύο μεγάλα και ένα μικρό ιντρόνιο (σύνολο 3 ιντρόνια).

Από το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών προέκυψαν 3 προϊόντα μεγέθους 257 bp, 1090 bp και 1340 bp αντίστοιχα. Από την αντιστοίχιση φάνηκε πως το πρώτο προϊόν εμφάνιζε 100% ομολογία με την περιοχή που οριοθετούνταν από τους 3'f/3'R εκκινητές στα *SnoJHE -1*, *-2* και *-4*. Τα υπόλοιπα δύο προϊόντα εμφάνιζαν και αυτά 100% ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή των *SnoJHE -1*, *-2* και *-4*, με την διαφορά ότι τα εξώνια της περιοχής αυτής διακόπτονταν από ένα μικρό και ένα μεγάλο ιντρόνιο. Τα ιντρόνια διέκοπταν τις κωδικές περιοχές στα ίδια σημεία, αλλά διέφεραν μεταξύ τους στο μέγεθος, εμφανίζοντας διάσπαρτους πολυμορφισμούς σε τμήματα των αλληλουχιών τους.

Τέλος, από το τρίτο ζευγάρι εκκινητών προέκυψαν πέντε προϊόντα, εκ των οποίων μόνο το ένα, μεγέθους 1034 bp ήταν JHE. Το προϊόν αυτό εμφάνιζε 100% ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές των *SnoJHE1*, *SnoJHE2* και *SnoJHE3*.

**Εικόνα 3.4.2.1.** Αμινοξική και νουκλεοτιδική ακολουθία του *SnoJHE* και οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

gattcacggcgtacttaac**atg**atgagacacttttacttctttatttgtttttgc**caaca**<sup>Wf</sup>  
I H G V L N M M R H F Y F F I C F L T T  
**tgttactgttgcggaagc**ccgacgttctcggcgaataagaacaacactttggactgtgac  
C Y C C G S P T F S A N K N N T L D C D  
gtggccacacgcacatcgactctggattggtttgtgggagagtctggaccgcagaggaaaat  
V A T R I D S G L V C G R V W T A E E N  
gttaagtacgccagcttcaggggaatgccgtacgcgaagcagccactgagagactacg  
V K Y A S F R G M P Y A K Q P L R E L R  
ttaaggaattacaaccattagatccctgggcccgtgttctactagccacaaaagaaggt  
F K E L Q P L D P W A G V L L A T K E G  
cccatctgtccccagtatgatgagatatatggcgtctggccaagccagtgggcatgagt  
P I C P Q Y D E I Y G R L A K P V G M S  
gaatctgtatcctcgccaatgtccacgttcccctcgatgtctacgaccgacggtcaaag  
E S C I L A N V H V P L D V Y D R R S K  
gcatatgccaaaaactggctctcccctcctgttttcatacatggtggaggtttccaa  
A I C Q K T G L P I L V F I H G G G F Q  
gctggttcgggtggctcagatctccatggaccgaatatttagtcagcaaaggcgttatt  
A G S G G S D L<sup>Mf</sup> H G P E Y L V S K G V I  
gtcatcacttttaactatagaat**caacgtgttcggatctctc**ctgaactctacgtcc  
V I T F N Y R I N V F G Y L S L N S T S<sup>5'R</sup>  
gtacctggtaacaacgggcttcgggac**catcaacttggctcaaatgggtac**agaggaac  
V P G N N G L R D A I T L L K W V Q R N  
gcgctgccttcggtggagaccctgaaaacgtcaccctggcaggacagagttgtggctca  
A R A F G G D P E N V T L A G Q S C G S  
gtcgcgcgcacatctagtctcactatctaaagcctctgtgagactactgaagagagtaata  
V A A H L V S L S K A S V R L L K R V I  
ttgatgagcgggtgtgggcaacggcgggtttctacacggcctcgctgcctacgctcaatct  
L M S G V G N G G F Y T A S P A Y A Q S  
gtcgcgactatgtttctgggatacgtaggcataaactctactgacgctgataaaatccat  
V A T M F L G Y V G I N S T D A D K I H  
gaacaactcatacacactcttgacaagatcatggaggccaacaggatcgtacagtta  
E Q L I H T P L D K I M E A N R I V Q L  
aagactggtctagtttcttcgttctgttggtaaccggaacgtccaggagtcactcgc  
K T G L V S F V P V V E P E R P G V T R  
atcctggatgattatcccgcaaaccctgtaaaacggggccgggccaaggaccttctatg  
I L D D Y P A N L V K R G R A K D L P M  
atcgtgggcttacaagtgttgagtgccagttctttaaacaagaattgaatatttgac  
I V G V T S V E C Q F F K Q R I E Y L D  
atgcttgggataatagacgacaattctatagcaattctaccaccaaacttacttattca  
M L G I I D D N S I A I L P P N I T Y S  
gtgtctgaaagcgaagcgttctgtctgcaagataacgattgataaatatttccgaagga  
V S E S E A L R L S K I T I D K Y F E G  
ggtgcaacagtggaaggtttatcaaatactgtacaaattcgttcttcacataccctgca  
G A T V D K F I K Y C T N S F F T Y P A  
ttcaagctggcggggtggacagcttcagttggaacgtcggcagctcatatgatcagttt  
F K L A G W T A S V G T S A V Y M Y Q F  
gacttcgacagcgaatttaagtctgtaaagtttggtaaaatgttgacgtaccgggagga  
D F D S E F N A V K F G K M L T Y P G G  
gggctcacggttgaggaccagacatttgtgttacgctcaattctttaatggatccggac  
G A H V E D Q T<sup>3'f</sup> F V L R V N S L M D P D  
gaaaagtctttccgcctagaacc**agggacgacctcatgaataactggat**gacaacgttt  
E K S F P P R T R D D L<sup>MR</sup> M K Y W M T T F  
tttgtcaactttatg**gatgcagccaccaatttgtga**ccataaatcggaatggccagcg  
F V N F M R C S H P I C D H K S E W P A  
acggatgcaagcagctcaactaccagctgatcaaggaacccatgctcataaacaataac  
T D A K Q L N Y Q L I K E P M L I N N N  
atcaacctgacgggggaactgagagccgaattcgacttccaggaccagctctttaaagt  
I N L T G E L R A E F D F<sup>3'R</sup> Q D Q L F K M  
gcacaat**taac**gagagc**gcaagagtgcgatccttagtgt**ctgaatttttttttacagac  
A Q - R E Q Q E C V I L V S E F F F T D  
aaaaatattttgttacaagaaaaaaaaaaaaaaaaa  
K K Y F V T R K K K K K



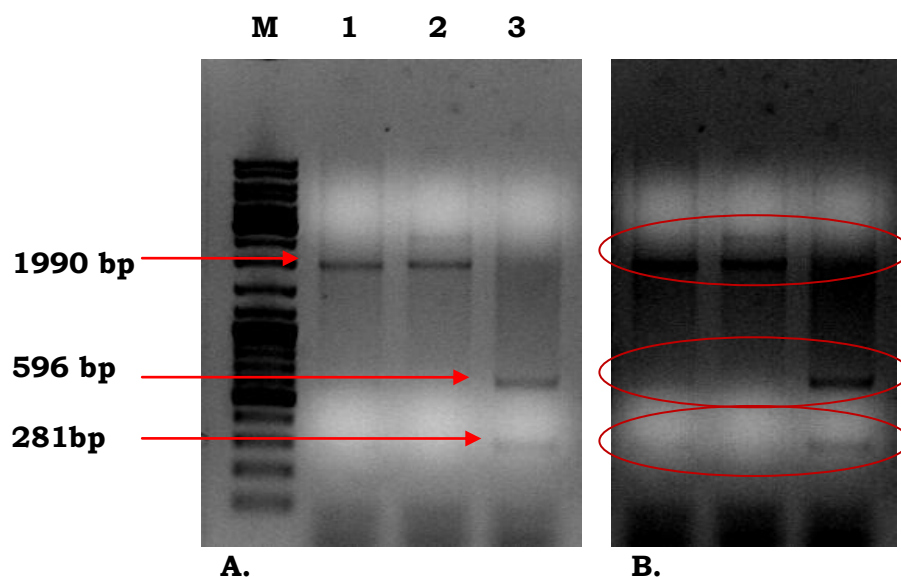
### 3.4.2.1 Wf/5'R εκκινητές.

Οι Wf/5'R εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε PCR με As extension σε gDNA που απομονώθηκε από 3 διαφορετικά άτομα μη διαπαύουσων προνυμφών 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου.

Έγιναν 3 ανεξάρτητες αντιδράσεις με τους παραπάνω εκκινητές. Από τις αντιδράσεις 1 και 2 προέκυψε ένα προϊόν μεγέθους 1990 bp ενώ από την αντίδραση 3 προέκυψαν δύο προϊόντα μεγέθους 281 και 596 bp, (Εικ. 3.4.2.1.1.A.).

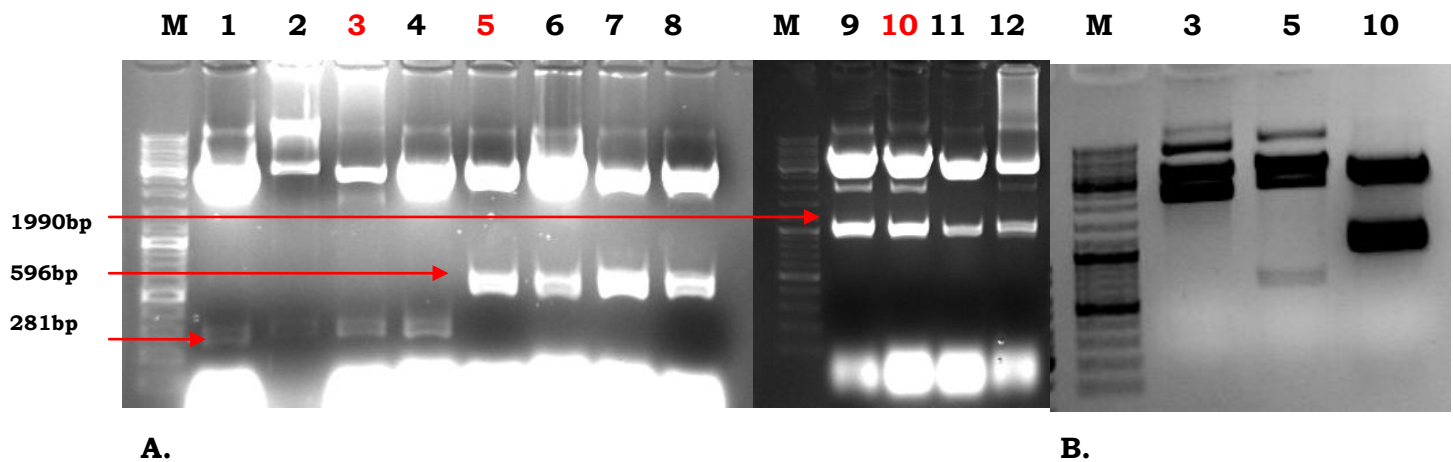
Παρ'ότι φαίνεται πως τα προϊόντα αυτά διασπείρονται ανεξάρτητα σε διαφορετικά άτομα του ίδιου πληθυσμού, μία προσεκτικότερη ματιά σε μεγαλύτερο contrast φαίνεται πως και τα τρία προκύπτουν από το κάθε ένα άτομο ξεχωριστά (Εικ. 3.4.2.1.1.B.).

Και τα 3 αυτά προϊόντα απομονώθηκαν κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν, (Εικ. 3.4.2.1.2.).



**Εικόνα 3.4.2.1.1. A.** Το αποτέλεσμα της PCR με τους Wf/5'R σε gDNA που απομονώθηκε από 3 διαφορετικά άτομα μη διαπαύουσων προνυμφών 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου. Τα προϊόντα και τα μεγέθη τους υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη. **B.** Το ίδιο gel με μεγαλύτερο contrast, με κύκλο υποδεικνύονται τα προϊόντα αυτά σε κάθε μία από τις τρεις αντιδράσεις ξεχωριστά.

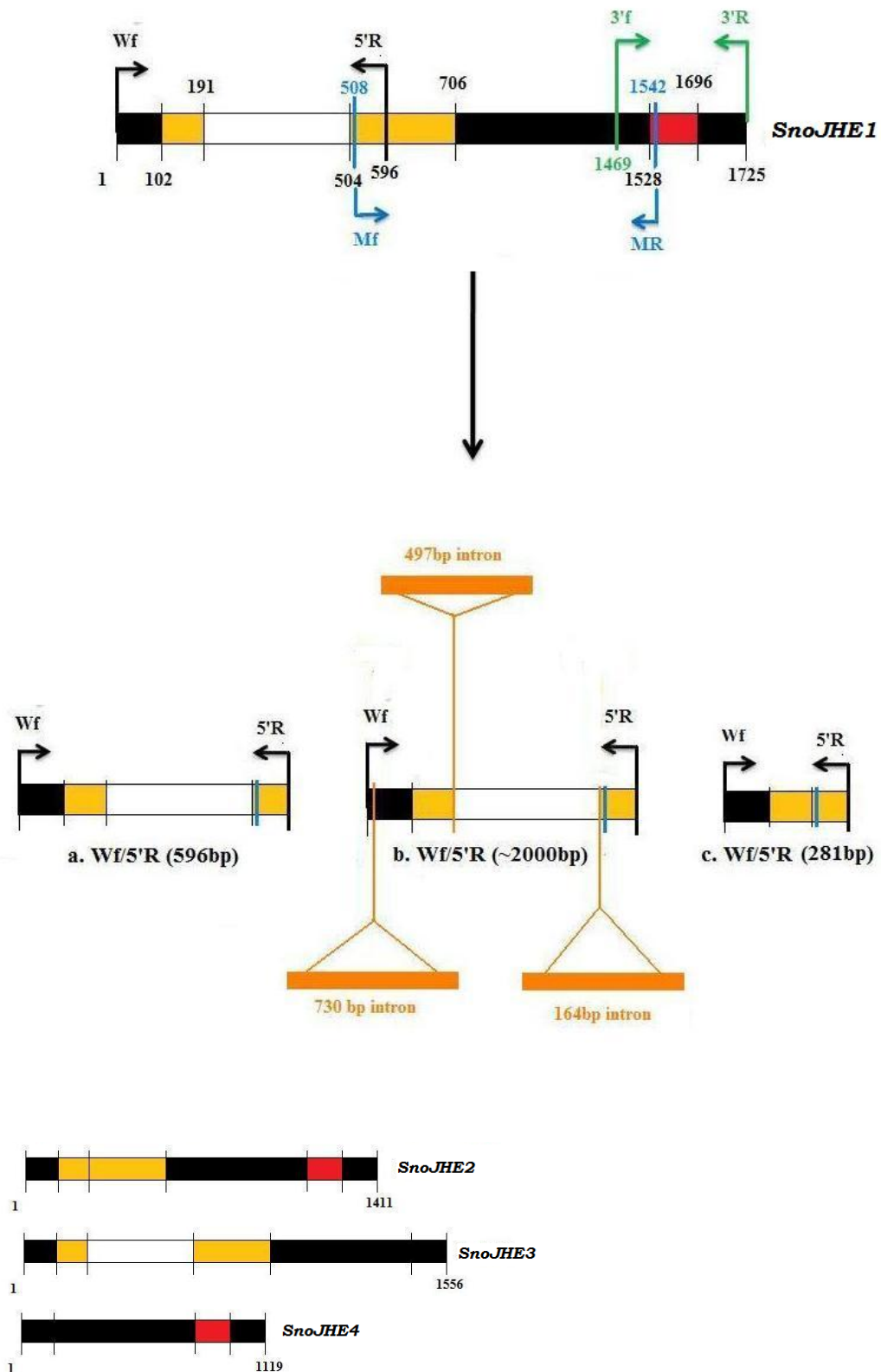




**Εικόνα 3.4.2.1.2. A.** Δοκιμασία πέψης των πλασμιδίων κλωνοποίησης pGEM-T που φέρουν τα προϊόντα των 1990, 281 και 596bp με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Το προϊόν των 1990 bp κόπτεται 1 φορά ακριβώς στην μέση της αλληλουχίας του προκύπτωντας έτσι δύο προϊόντα που κινούνται στις 1000 bp. **B.** Οι κλώνοι 3, 5 και 10 που φέρουν τα προϊόντα των 281, 596 και 1990 bp δοκιμάστηκαν ξανά με πέψη περιορισμού *EcoRI* αφού απομονώθηκαν με εμπορικό kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (QIAGEN) και στην συνέχεια αλληλουχήθηκαν.

Όπως προαναφέρθηκε, από την αλληλούχηση προέκυψε πως το προϊόν των 281 bp εμφανίζει 100% ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή του *SnoJHE2*, το προϊόν των 596 bp με την αντίστοιχη περιοχή των *SnoJHE -1* και *-3*, ενώ το τρίτο προϊόν εμφανίζει και αυτό 100% ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή των *SnoJHE -1* και *-3*, διακόπτεται όμως από δύο μεγάλα και ένα μικρό ιντρόνιο (Εικ. 3.4.2.1.3.).

Παρακάτω αναπαρίσταται σχηματικά η ομολογία των προϊόντων αυτών με το αρχικό (*SnoJHE1*), αλλά και με τα υπόλοιπα cDNA γονίδια της οικογένειας.

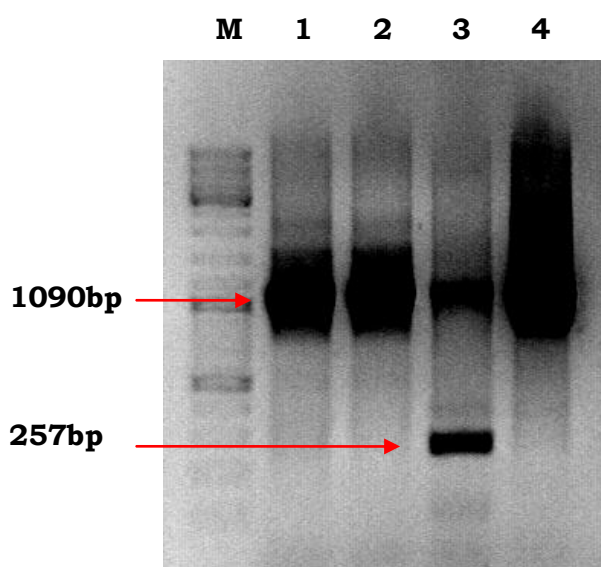


**Εικόνα 3.4.2.1.3.** Σχηματική απεικόνιση του *SnoJHE1* και των 3 προϊόντων που προέκυψαν από τους Wf/5'R εκκινήτες και οι θέσεις υβριδισμού τους στο *SnoJHE1*. Με τα τριγωνικά σχήματα πορτοκαλί χρώματος, συμβολίζονται τα ιντρόνια που παρατηρήθηκαν στο ένα από τα τρία προϊόντα. Ίδια χρώματα αντιστοιχούν σε ταυτόσημες περιοχές μεταξύ των προϊόντων και των *SnoJHE -1, -2, -3* και *-4* γονιδίων.

### 3.4.2.2 3'f/3'R εκκινητές.

Οι 3'f/3'R χρησιμοποιήθηκαν σε PCR με *As* extension σε gDNA που απομονώθηκε από 4 διαφορετικά άτομα μη διαπαύουσων προνυμφών 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου.

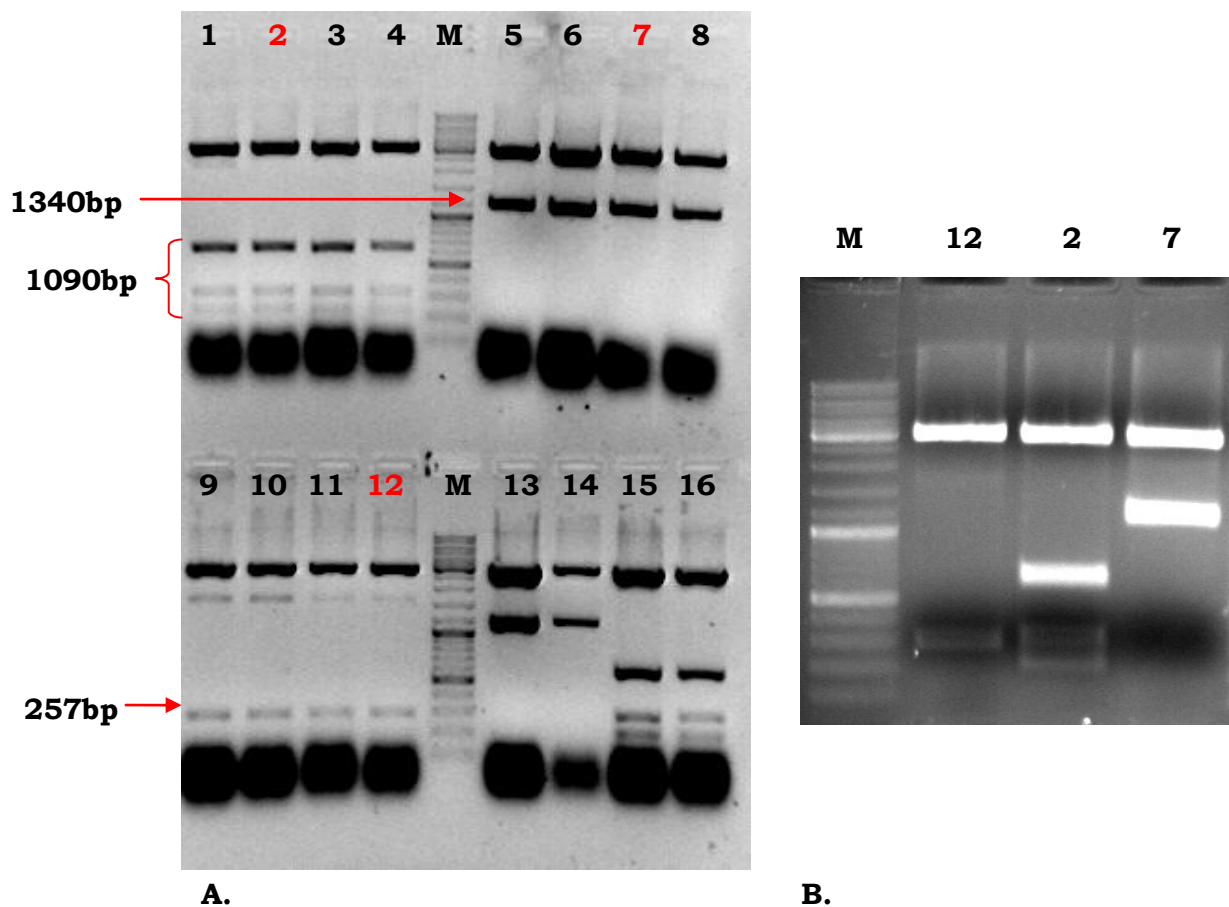
Έγιναν 4 ανεξάρτητες αντιδράσεις με τους παραπάνω εκκινητές, σε gDNA που απομονώθηκε από ολόκληρο σώμα προνυμφών 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου. Από τις αντιδράσεις 1, 2 και 4 προέκυψε ένα προϊόν μεγέθους 1090 bp, ενώ από την αντίδραση 3 προέκυψαν δύο προϊόντα, το προϊόν των 1090 bp και άλλο ένα προϊόν μεγέθους 257 bp, (Εικ. 3.4.2.2.1.). Τα προϊόντα αυτά απομονώθηκαν κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν, (Εικ. 3.4.2.2.2.).



**Εικόνα 3.4.2.2.1.** Το αποτέλεσμα της PCR με τους 3'f/3'R σε gDNA που απομονώθηκε από 4 διαφορετικά άτομα μη διαπαύουσων προνυμφών 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου. Τα προϊόντα και τα μεγέθη τους υποδεικνύονται με κόκκινα βέλη.

Όταν τα κλωνοποιηθέντα προϊόντα δοκιμάστηκαν με πέψεις περιορισμού -για να ταυτοποιηθεί η θετική ένθεσή τους στα πλασμίδια-, προέκυψαν 6 κλώνοι οι οποίοι εμφάνιζαν διαφορετικό pattern περιορισμού από το αναμενόμενο (Εικ. 3.4.2.2.2.).

Οι κλώνοι αυτοί είχαν μέγεθος 1340bp, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους 6, οι οποίοι κόβωνταν 2 φορές με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* μέσα στην αλληλουχία τους, τα τμήματα των οποίων είχαν συνολικό άθροισμα 1090bp, (Εικ. 3.4.2.2.2.).



**Εικόνα 3.4.2.2.2. Α.** Δοκιμασία πέψης των πλασμιδίων κλωνοποίησης pGEM-T που φέρουν τα προϊόντα των 1090, 257 και 1340 bp με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Το προϊόν των 1090 bp κόβεται δύο φορές στην αλληλουχία του και προκύπτουν τρία προϊόντα. **Β.** Οι κλώνοι 2, 7 και 12 που φέρουν τα προϊόντα των 1090, 1340 και 257 bp, δοκιμάστηκαν ξανά με πέψη περιορισμού *EcoRI* και αφού απομονώθηκαν με εμπορικό kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (QIAGEN), στην συνέχεια αλληλουχήθηκαν.

Ένας από τους κλώνους αυτούς και οι υπόλοιποι δύο που αντιστοιχούσαν στα προϊόντα των 1090 bp και 257 bp αλληλουχήθηκαν (Εικ. 3.4.2.2.2.). Από την αλληλούχηση προέκυψε πως το προϊόν των 257 bp εμφάνιζε 100% ομολογία με τα *SnoJHE -1, -2 και -4*. Τα δύο άλλα προϊόντα των 1090 και 1340 bp παρουσίασαν και εκείνα 100% ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή των *SnoJHE -1, -2 και -4*, αλλά διακόπτονταν από ένα μικρό και ένα μεγάλο ιντρόνιο. Τα ιντρόνια αυτά και στα δύο προϊόντα, διέκοπταν τις κωδικές περιοχές στα ίδια σημεία, αλλά διέφεραν μεταξύ τους στο μέγεθος, εμφανίζοντας διάσπαρτους πολυμορφισμούς σε διάφορα τμήματα των αλληλουχιών τους (Εικ. 3.4.2.2.3.; Εικ. 3.4.2.2.4.).

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      1
090910-26_ : AGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAACGTTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCAGGTAAGA-----CGATGGAACATATAGGCAGTCTGAT : 91
090910-26_ : AGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAACGTTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCAGGTAAGAATTTTGTGATGCTGGAACATATAGGCAGTCTGAT : 98
AGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAACGTTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCAGGTAAGA-----G TGAACAT ATAGGCAGT  TGAT

00      *      120      *      140      *      160      *      180      *
090910-26_ : AAAAAATGATGATTTTGTGATATCCTTCGTGTTACCCAGGAAATTTCTTTAAATAATGTTGGTGTCTCCAGCCACCCCAATTTGTGACCATTAATCGGA : 189
090910-26_ : GAAAATGATGATTTTGTGATATCCTTCGTGTTACCCAGGAAATTTCTTTAAATAATGTTGGTGTCTCCAGCCACCCCAATTTGTGACCATTAATCGGA : 196
AAAAATGATGATTTT GTGATATCCTTCGTGTTACC A GA AATTTCTTTAA A TGTGGTGTCTCCAGCCACCCCA TTTGTGAC AT AATC GA

200      *      220      *      240      *      260      *      280      *
090910-26_ : ATGGCCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGACCCCATCTCATAAACATAACATCAACCTGACGGGAGAAGCTGCGAGCTG : 287
090910-26_ : ATGGCCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGACCCCATCTCATAAACATAACATCAACCTGACGGGAGAAGCTGCGAGCTG : 294
ATGGCCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGAT AAGGA CCC T CTCATAAACATAACATCAACCTGACGGGAGAAGCTGCGAGCTG

300      *      320      *      340      *      360      *      380      *
090910-26_ : AATTCGACTTCCAGGACCAGTCTTATAAATCGCCATTAACGAGTAAAAATTTTT--ATGTATTCATTAACCTGACAGGTTTAAAGATACCCGTACC : 383
090910-26_ : AATTCGACTTCCAGGACCAGTCTTATAAATCGCCATTAACGAGTAAAAATTTTT--ATGTATTCATTAACCTGACAGGTTTAAAGATAC----- : 386
AAT CGACTTCCAGGACCAG TCT TAAAAAT GC CA T ACGG TAAAAATTTTT--ATGTATTCATTAAC CTGA AGGTTTAAAGATAC

400      *      420      *      440      *      460      *      480      *
090910-26_ : AAGAAGTCCGGCTCAGCTGTTCCAAATCACAGTTCGAAACACCCGACGTTTGAA--CAGCATGTTTGATCTAGGCTTGGATTCCAAACAATTTAAT : 479
090910-26_ : AAGAAGTCCGGCTCAGCTGTTCCAAATCACAGTTCGAAACACCCGACGTTTGAA--CAGCATGTTTGATCTAGGCTTGGATTCCAAACAATTTAAT : 482
AAGAAGTCCGGCT ACG GTTC AAATCACAGTTCGAAAC ACCGACGTTTGAA CA G GTTTGAT TA GCTTGGATTCC AA AA T T

500      *      520      *      540      *      560      *      580      *
090910-26_ : ATTGGGAGTTTCTTACCAAGAATTCCTCCATCTGGCTTCCTGCGCCAG-----CTTATG-----G : 532
090910-26_ : ATTGGGAGTTTCTTACCAAGAATTCCTCCATCTGGCTTCCTGCGCCAG-----CTTATG-----G : 579
A TGGG TTC C TT CCC ATCTGGC TC TGC CAG TTAT

600      *      620      *      640      *      660      *      680      *
090910-26_ : AGATAGC-----TCGCACCTC-----TCATAT-----T-----G-----G-----G----- : 562
090910-26_ : AGATAGC-----TCGCACCTC-----TCATAT-----T-----G-----G-----G----- : 677
A AT GC TC C CCCTC T ATAT TTTAGGAAAAAAGTAGGACTTTATTTTAAACAGGCTTTGGGTTTGTATATAATGGCA

700      *      720      *      740      *      760      *      780      *
090910-26_ : --TCAAATATATGCGCCAA-----T-----T-----T-----T-----T-----T----- : 606
090910-26_ : AATTAGCATATGCGCCAGATATAAAGGGATTAGAACCCCTCTATGTC-----AATTTTAAACAGGCTTTGGGTTTGTATATAATGGCA : 775
T A ATAT G CGC A AAT TT A TAAT CTA A

800      *      820      *      840      *      860      *      880      *
090910-26_ : ---CATCTCGCTTACCGCTTTGGGGATTACAAGTGTGATGACTGTAAGCAAAGGCACGGCTTATTTGAGATGAAGATGATTAACGATATGCGTCT : 701
090910-26_ : TTTCACTCTCGCTTGGTGGTTGGGAAAGAGCAATTAAGAGGCAAGGTAACCAAAGGCACCGAAGATGAGATGATC--ATGAGATACCGCTTGGGCTCT : 872
CA CTC GCTT G T GG A CAA T GA G A GTAA CAAAGGCAC G T G AGATG AT GAT C T TGGTCTCT

900      *      920      *      940      *      960      *      980      *
090910-26_ : TCAGAACTAATATATATTCGACAC-----T-----T-----T-----T-----T-----T----- : 778
090910-26_ : TCAGAACTAATATATATTCGACAC-----T-----T-----T-----T-----T-----T----- : 970
TCAGAA T AATATAT T GA CAC T TA AACGTG A CG AATGGTATATACATATCAAGGGCACGGCTT TTT

1000      *      1020      *      1040      *      1060      *      1080      *
090910-26_ : AATGATATCAAAAGATATTCGAAGATTTCAACTCAAAATAAAATACTCTAGAAATTATACCAAAATGTTCCGTTAC-----T----- : 855
090910-26_ : AATGATATCAAAAGATATTCGAAGATTTCAACTCAAAATAAAATACTCTAGAAATTATACCAAAATGTTCCGTTAC-----T----- : 1068
A ATGATATCAAAAC ATATT GAAG ATTTCAACTCAAAATAAAATACTCTAGAAATTATACCAAAATGTTCCG TTAC

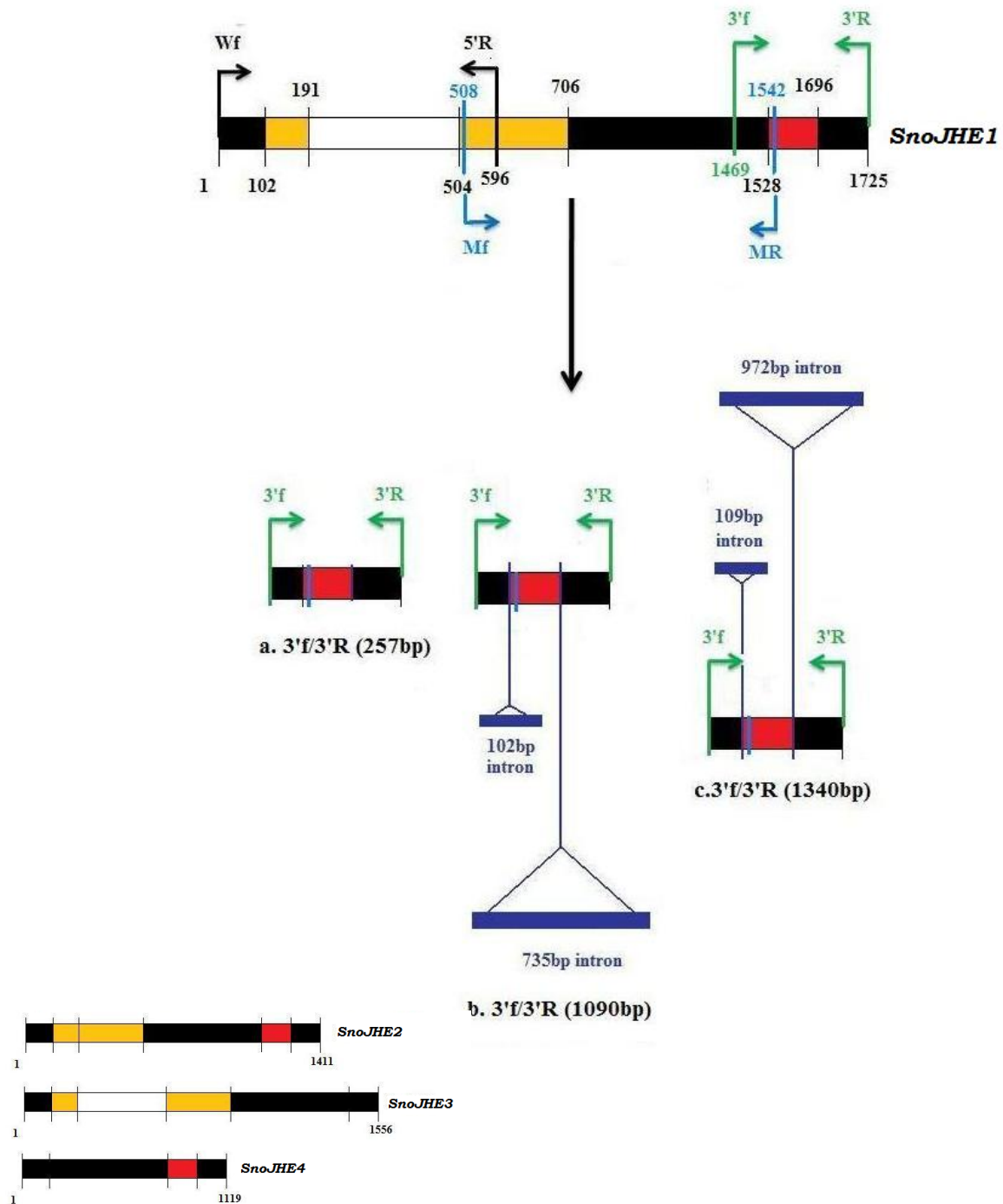
80      *      1100      *      1120      *      1140      *      1160      *
090910-26_ : -----TACCGCAGTCGATATTTTTTTCCGTAATTTTCGACACGAAGAAABACCAGGATATAAGTTGATAGCA-----AABA : 927
090910-26_ : AGCGGCTAGTATCATATTAACCTACCGCAGTCGATATTTTTTTCCGTAATTTTCGACACGAAGAAABACCAGGATATAAGTTGATAGCA-----AABA : 1166
TACCGCAGTCGATATTTTTTT C GTAATTT TCG ACA GAAGAA A ACCGATATAAGTTGATAGCA AA A

1180      *      1200      *      1220      *      1240      *      1260      *
090910-26_ : AGCCGTGCTCCTTGTTACATAGCACACGGTTCAAAATGGCTTGGCAAAATCATTTTTTTGTAATTTT-----TTGTGTTCTGTAATCTCGTAATATGT : 1020
090910-26_ : AGCCGTGCTCCTTGTTACATAGCACACGGTTCAAAATGGCTTGGCAAAATCATTTTTTTGTAATTTT-----TTGTGTTCTGTAATCTCGTAATATGT : 1264
AGCCGTGC CCT GTTACATAGCACACGGTTCAAAATGGCTTGGCAAA CATTTTTTGTAATTT TA-----TTGTGTTCT GTAA CTCGTAATAT T

1280      *      1300      *      1320      *      1340      *
090910-26_ : TTTTCAATGTCATATCCGTTGATTTAATTCGCTGCTTTTCTCCAGGACAGCAAGAGTGCCTCATCTAGTGTG : 1096
090910-26_ : TTTTCAATGTCATATCCGTTGATTTAATTCGCTGCTTTTCTCCAGGACAGCAAGAGTGCCTCATCTAGTGTG : 1340
TTTTCA ATGTCATATC GTGATT TAATTCGC TG TTTCTCCAGSA CAGCAAGAGTGCCTCATCTAGTGTG

```

**Εικόνα 3.4.2.2.3.** Στοιχισμός με το πρόγραμμα CLUSTALX, των δύο προϊόντων των 1090 και 1340 bp. Πανομοιότυπα νουκλεοτιδία είναι σκιασμένα με χρώμα μαύρο. Οι τετραγωνισμένες περιοχές κόκκινου χρώματος υποδεικνύουν την αρχή και το τέλος των δύο ιντρονίων ενώ οι τετραγωνισμένες περιοχές πράσινου χρώματος υποδεικνύουν τους διάφορους πολυμορφισμούς.

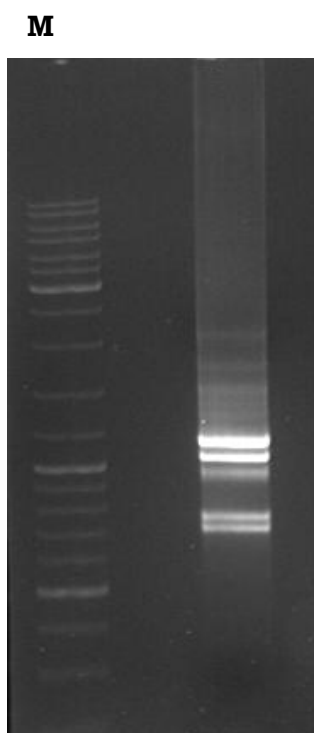


**Εικόνα 3.4.2.2.4.** Σχηματική απεικόνιση του *SnoJHE1* και των 3 προϊόντων που προέκυψαν από τους 3'f/3'R εκκινητές και οι θέσεις υβριδισμού τους στο *SnoJHE1*. Με τα τριγωνικά σχήματα μπλέ χρώματος συμβολίζονται τα ιντρόνια των δύο προϊόντων. Ίδια χρώματα αντιστοιχούν σε ταυτόσημες περιοχές μεταξύ των προϊόντων και των *SnoJHE -1, -2, -3, -4* γονιδίων.

### 3.4.2.3 Mf/MR εκκινητές.

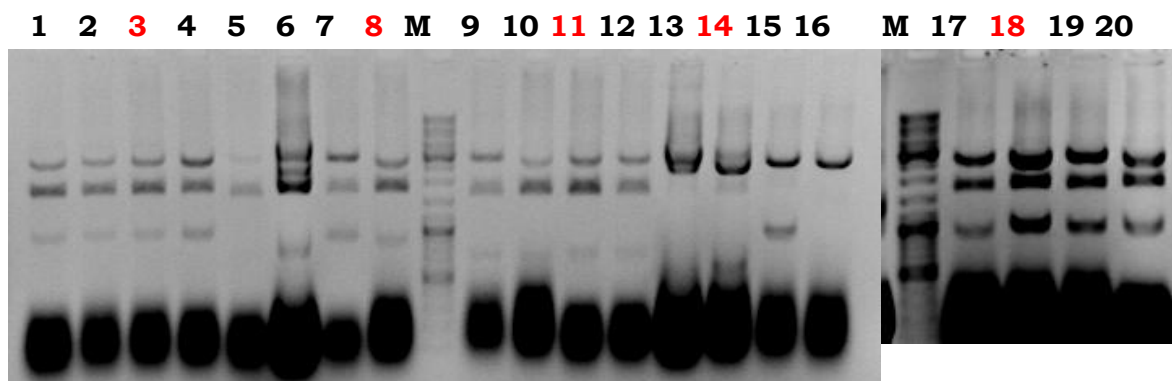
Για την απομόνωση της κεντρικής περιοχής χρησιμοποιήθηκαν οι Mf/MR εκκινητές σε PCR με *As extension* σε gDNA που απομονώθηκε από μη διαπαύουσα προνύμφη 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου.

Έγινε μία αντίδραση PCR με τους παραπάνω εκκινητές. Από την αντίδραση αυτή προέκυψαν πέντε προϊόντα που κυμαίνονταν μεταξύ 800-1200 bp. Τα προϊόντα αυτά απομονώθηκαν κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν (Εικ. 3.4.2.3.1.; Εικ. 3.4.2.3.2.).

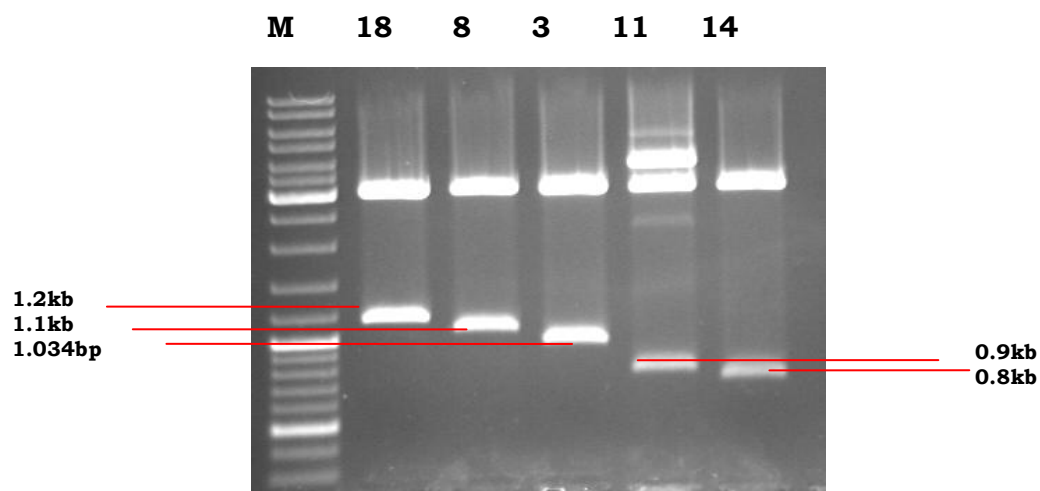


**Εικόνα 3.4.2.3.1.** Το αποτέλεσμα της PCR με τους Mf/MR σε gDNA που απομονώθηκε από μη διαπαύουσα προνύμφη 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου.





**A.**

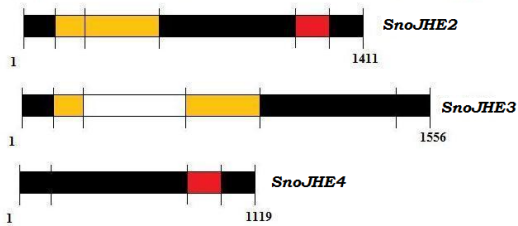
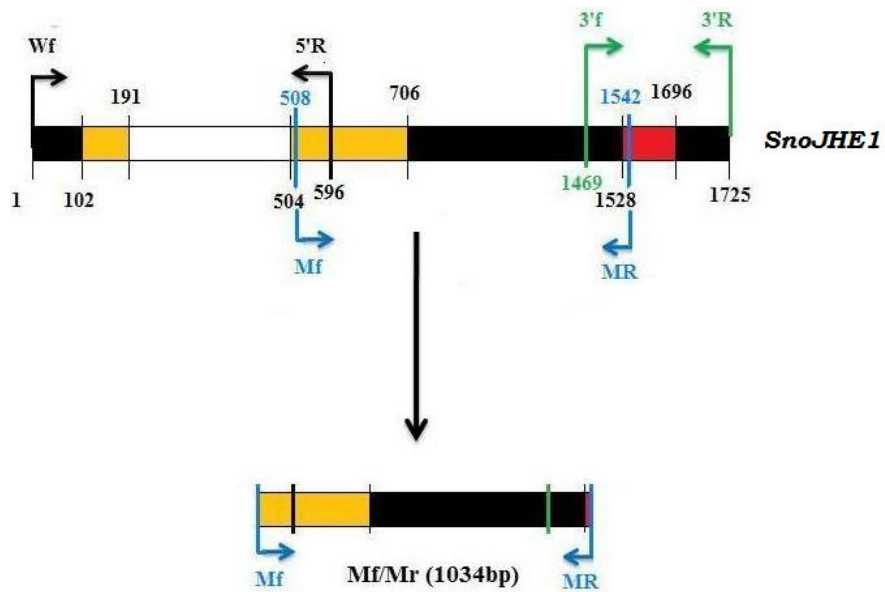


**B.**

**Εικόνα 3.4.2.3.2. Α.** Δοκιμασία πέψης των πλασμιδίων κλωνοποίησης pGEM-T που φέρουν τα προϊόντα των 800-1200 bp με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. **Β.** Οι κλώνοι 18, 8, 3, 11 και 14 δοκιμάστηκαν ξανά με πέψη περιορισμού *EcoRI*, αφού απομονώθηκαν με εμπορικό kit απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (QIAGEN) και στην συνέχεια αλληλουχήθηκαν.

Υστερα από την αλληλούχηση προέκυψε πως από τα πέντε προϊόντα, μόνο το ένα ήταν JHE, εκείνο των 1034 bp. Το προϊόν αυτό ήταν ομόλογο με τις αντίστοιχες περιοχές των *SnoJHE1*, *SnoJHE2* και *SnoJHE3* και δεν διακοπτόταν από κανένα ιντρόνιο, όπως φάνηκε να συμβαίνει στα 5' και 3' άκρα του γονιδίου (Εικ. 3.4.2.3.3).





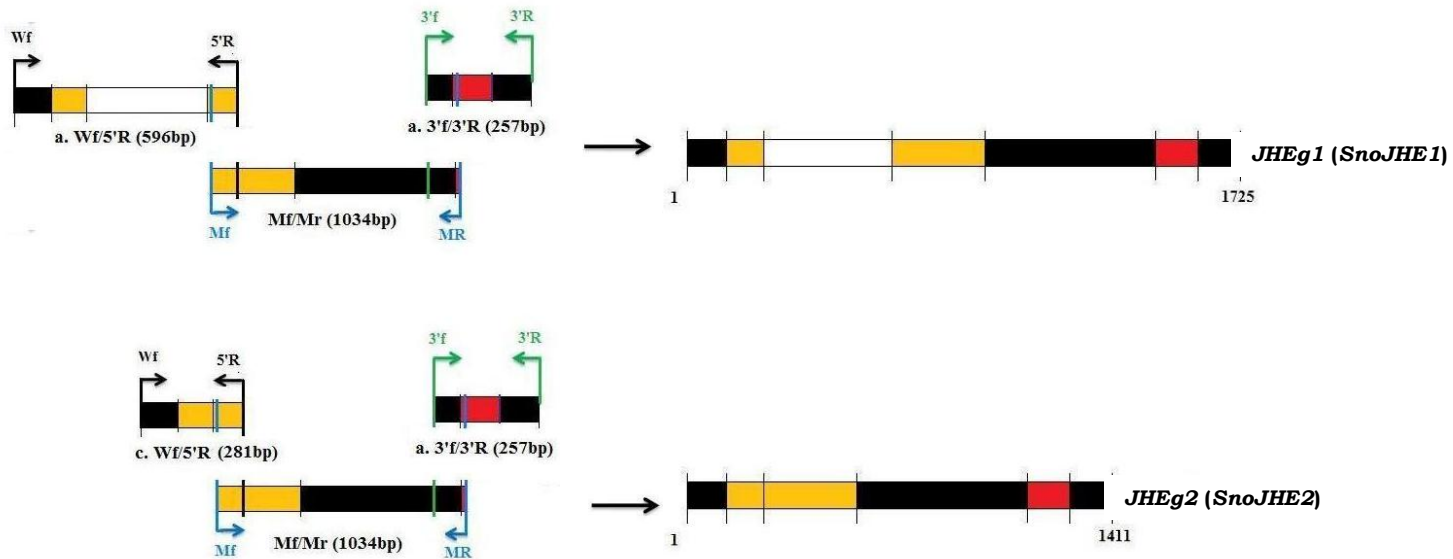
**Εικόνα 3.4.2.3.3.** Σχηματική απεικόνιση του *SnoJHE1* και του προϊόντος που προέκυψε από τους Mf/MR εκκινητές και οι θέσεις υβριδισμού τους στο *SnoJHE1*. Τα διαφορετικά χρώματα των εξωνίων αντιστοιχούν με ταυτόσημες περιοχές με τα *SnoJHE-1, -2, -3* και *-4*.

#### 3.4.2.4 *In Silico*.

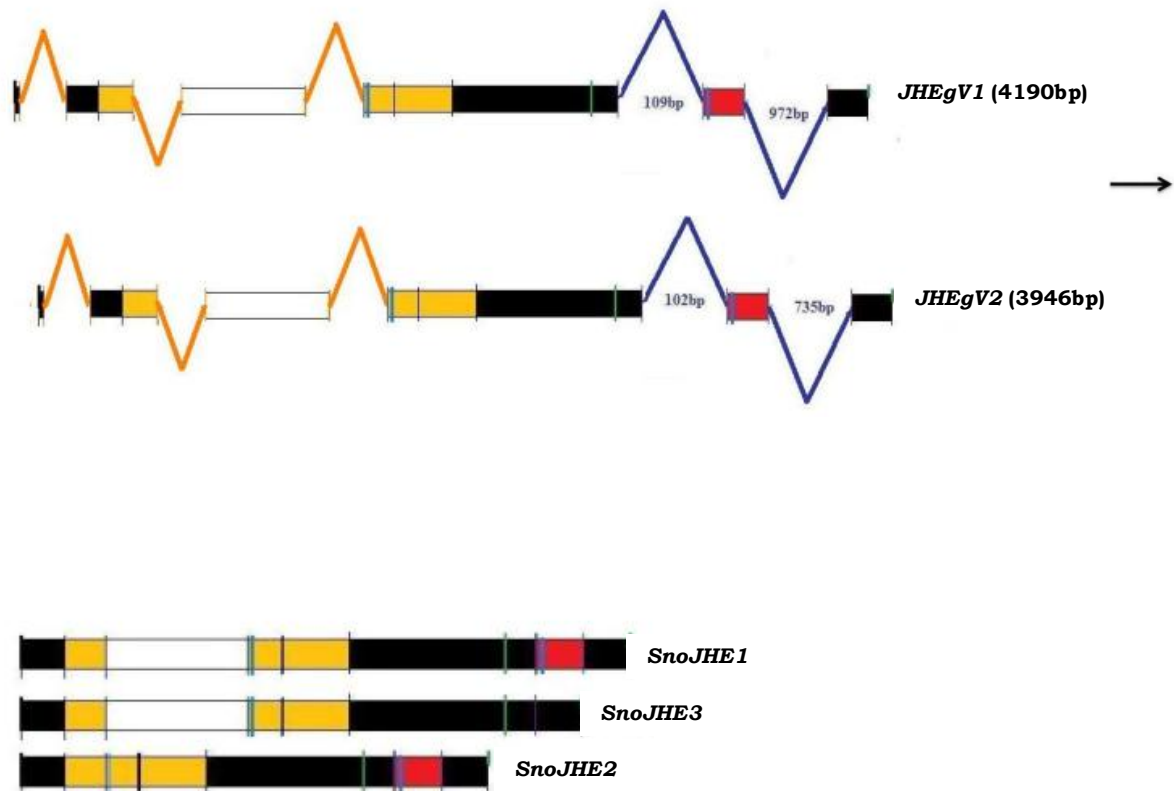
Υπάρχουν 9 πιθανοί συνδυασμοί με βάση τις ομόλογες περιοχές των προϊόντων που προέκυψαν από τις προηγούμενες αντιδράσεις, από τους οποίους μπορούν να σχεδιαστούν 9 διαφορετικά γονίδια (Εικ. 3.4.2.4.1.; Εικ. 3.4.2.4.2.; Εικ. 3.4.2.4.3.).

Από τα γονίδια αυτά, 7 περιέχουν ιντρόνια στις κωδικές τους περιοχές και από αυτά μεταγράφονται και ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα, προκύπτουν τα *SnoJHE -1,-2* και *-3* (Εικ. 3.4.2.4.1.; Εικ. 3.4.2.4.2.; Εικ. 3.4.2.4.3.). Δύο από τα γονίδια αυτά, τα *JHEg1* και *JHEg2*, δεν διακόπτονται από ιντρόνια και εμφανίζουν 100% ομολογία με τα *SnoJHE1* και *SnoJHE2*, (Εικ. 3.4.2.4.1.). Το μόνο cDNA το οποίο δεν μπορεί να εξηγηθεί με τα υπάρχοντα δεδομένα, είναι το *SnoJHE4*.

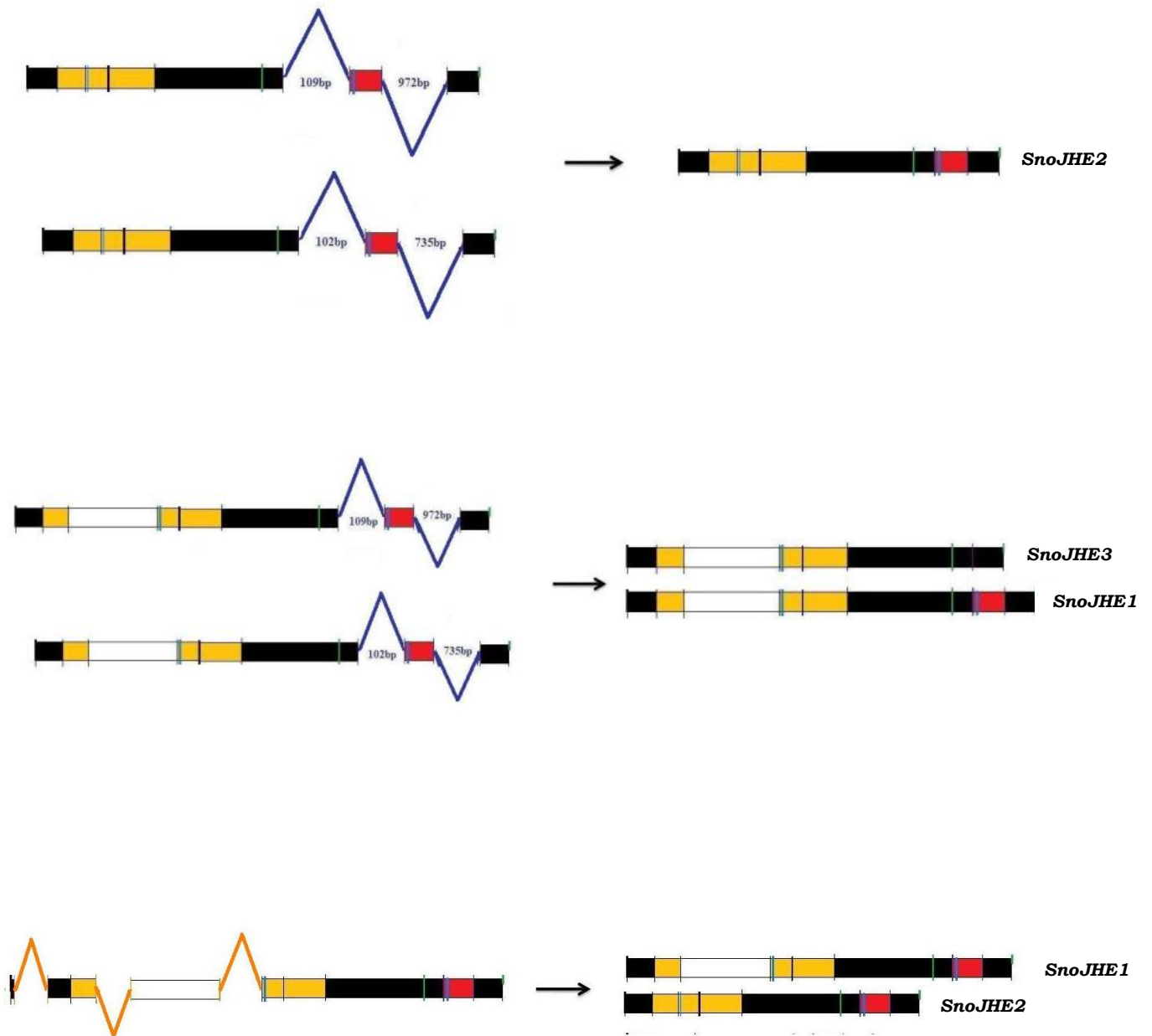
Επειδή δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα σε επίπεδο αλληλούχησης, ποιού ακριβώς από τους συνδυασμούς αυτούς είναι υπαρκτοί στο γονιδίωμα του *S. nonagrioides* και προκειμένου να παρουσιαστούν οι αλληλουχίες των τμημάτων που απομονώθηκαν βασιζόμενοι στον υβριδισμό κατά Southern, θεωρούμε ότι τέσσερα είναι τα γονίδια που πιθανώς να υπάρχουν στο γονιδίωμα του *S. nonagrioides*, τα *JHEg1*, *JHEg2*, *JHEgV1* και *JHEgV2* (Εικ. 3.4.2.4.1.; Εικ.3.4.2.4.2.).



**Εικόνα 3.4.2.4.1.** Συνδυασμοί 1 και 2: Σχηματική απεικόνιση των *JHEg-1* και *-2*. Στην αριστερή πλευρά του σχήματος αναπαρίστανται γραφικά τα προϊόντα, βάσει των ομόλογων περιοχών των οποίων σχεδιάστηκαν τα δύο γονίδια.. Τα *JHEg-1* και *-2* δεν διαθέτουν ιντρόνια και είναι ταυτόσημα με τα *SnoJHE-1* και *-2*. Τα διαφορετικά χρώματα των εξωνίων αντιστοιχούν σε ταυτόσημες περιοχές των *SnoJHE-1*, *-2*, *-3* και *-4* γονιδίων.



**Εικόνα 3.4.2.4.2.** Συνδυασμοί 3 και 4; Σχηματική απεικόνιση των *JHEgV-1* και *-2*. Τα εξώνια των δύο γονιδίων είναι ταυτόσημα με το *SnoJHE1*. Με πορτοκαλί και μπλε κυματοειδείς γραμμές αναπαρίστανται τα ιντρόνια των γονιδίων αυτών. Από τα γονίδια αυτά ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να προκύψουν τα *SnoJHE-1*, *-2* και *-3*. Τα δύο γονίδια διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στα ιντρόνια του 3' άκρου (μπλέ χρώμα) τα οποία διαφοροποιούνται σε μέγεθος λόγω διάσπαρτων πολυμορφισμών που παρατηρήθηκαν κατά μήκος την νουκλεοτιδικής ακολουθίας των δύο μεγαλύτερων ιντρονίων του *JHEgV1*. Τα διαφορετικά χρώματα των εξωνίων αντιστοιχούν σε ταυτόσημες περιοχές των *SnoJHE-1*, *-2*, *-3* και *-4* γονιδίων.



**Εικόνα 3.4.2.4.3.** Συνδυασμοί 5, 6, 7, 8 και 9; Σχηματική απεικόνιση και άλλων γονιδίων που μπορούν να σχεδιαστούν με βάση τις ομόλογες περιοχές των προϊόντων που προέκυψαν. Από τα γονίδια αυτά ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να προκύψουν τα *SnoJHE-1*, *-2*, *-3*. Τα διαφορετικά χρώματα των εξωνίων αντιστοιχούν σε ταυτόσημες περιοχές των *SnoJHE-1*, *-2*, *-3* και *-4* γονιδίων.

**Εικόνα 3.4.2.4.4.** Επόμενη σελίδα. Στοιχισή των *SnoJHE -1, -2, -3* και *-4*, *JHEg -1* και *-2* και *JHEgV -1* και *-2* με το πρόγραμμα CLUSTALX. Πανομοιότυπα ή παρόμοια νουκλεοτίδια είναι σκιασμένα με χρώμα μαύρο ή γκρι αντίστοιχα. Με κόκκινα βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των γονιδίων.

Wf



JHEgV2 : AACATGTTACTGTTGCGGAAGCCTTGTTATTATTATTAACACAGTTCATTAATTTTGGTAATCTTTTATATGCTTTTCAAACCTATGAAAAATAGAAT : 102  
 JHEgV1 : AACATGTTACTGTTGCGGAAGCCTTGTTATTATTATTAACACAGTTCATTAATTTTGGTAATCTTTTATATGCTTTTCAAACCTATGAAAAATAGAAT : 102  
 SnoJHE1 : AACATGTTACTGTTGCG----- : 17  
 JHEg1 : AACATGTTACTGTTGCG----- : 17  
 SnoJHE2 : AACATGTTACTGTTGCG----- : 17  
 JHEg2 : AACATGTTACTGTTGCG----- : 17  
 SnoJHE3 : AACATGTTACTGTTGCG----- : 17  
 SnoJHE4 : AACATGTTACTGTTGCG----- : 17  
 AACATGTTACTGTTGCG

JHEgV2 : AAGGTAAGAATTTTGACCGCGAGGGACCTTTTACGGTCGATGTTGACCACCTTCTCTTTCTTATATACGCACCAAAACACGTTAACACCATGAAAAGAAAGAG : 204  
 JHEgV1 : AAGGTAAGAATTTTGACCGCGAGGGACCTTTTACGGTCGATGTTGACCACCTTCTCTTTCTTATATACGCACCAAAACACGTTAACACCATGAAAAGAAAGAG : 204  
 SnoJHE1 : ----- : -  
 JHEg1 : ----- : -  
 SnoJHE2 : ----- : -  
 JHEg2 : ----- : -  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ----- : -

JHEgV2 : ATAGCGTGTCAATGACAAGTTTCAAGGTGACTTTTTGATCTTCACTGTTTGATTGAGAGTGTCCAGTTTACCTATAAGTTTCTTGGTCATACTAGTCAA : 306  
 JHEgV1 : ATAGCGTGTCAATGACAAGTTTCAAGGTGACTTTTTGATCTTCACTGTTTGATTGAGAGTGTCCAGTTTACCTATAAGTTTCTTGGTCATACTAGTCAA : 306  
 SnoJHE1 : ----- : -  
 JHEg1 : ----- : -  
 SnoJHE2 : ----- : -  
 JHEg2 : ----- : -  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ----- : -

JHEgV2 : GCGCTTTCATTTTCATACTCATATTGAGAATCACGTGAAGAAAAGTAATTCGAGATTTTGAAGTTGCGGTTCATATTGAACCGATTTTCATCAAAAATAGCTAC : 408  
 JHEgV1 : GCGCTTTCATTTTCATACTCATATTGAGAATCACGTGAAGAAAAGTAATTCGAGATTTTGAAGTTGCGGTTCATATTGAACCGATTTTCATCAAAAATAGCTAC : 408  
 SnoJHE1 : ----- : -  
 JHEg1 : ----- : -  
 SnoJHE2 : ----- : -  
 JHEg2 : ----- : -  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ----- : -

JHEgV2 : GTAAACTGAACACTGCGCGTTCAAATTCGTGTGACGTCACCTGACGCTACACTTTTTAGCGGCCAGTGACGTCCAGCCACCACCTCCTGATCTTTAATGC : 510  
 JHEgV1 : GTAAACTGAACACTGCGCGTTCAAATTCGTGTGACGTCACCTGACGCTACACTTTTTAGCGGCCAGTGACGTCCAGCCACCACCTCCTGATCTTTAATGC : 510  
 SnoJHE1 : ----- : -  
 JHEg1 : ----- : -  
 SnoJHE2 : ----- : -  
 JHEg2 : ----- : -  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ----- : -

JHEgV2 : CTTTTATACTTGTCAATTTTTATTGATTTGATAAAAACAAAATGTATGTGTCTAGTATTTTTTGGAAATCTCACTGACGGAATAATTAGTTTTTCTCTCTCCC : 612  
 JHEgV1 : CTTTTATACTTGTCAATTTTTATTGATTTGATAAAAACAAAATGTATGTGTCTAGTATTTTTTGGAAATCTCACTGACGGAATAATTAGTTTTTCTCTCTCCC : 612  
 SnoJHE1 : ----- : -  
 JHEg1 : ----- : -  
 SnoJHE2 : ----- : -  
 JHEg2 : ----- : -  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ----- : -

JHEgV2 : AATGTATATTTTTAATATATTTTTGTCTCATCAATATCTCGTGGAGATATAGTTCCCAACTAAAATCAGAGAGGTGTTTTTAAATTTCCCATTTCCAATAACT : 714  
 JHEgV1 : AATGTATATTTTTAATATATTTTTGTCTCATCAATATCTCGTGGAGATATAGTTCCCAACTAAAATCAGAGAGGTGTTTTTAAATTTCCCATTTCCAATAACT : 714  
 SnoJHE1 : ----- : -  
 JHEg1 : ----- : -  
 SnoJHE2 : ----- : -  
 JHEg2 : ----- : -  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ----- : -

Wf



JHEgV2 : TAGGGTCTTTACATTGTTAATGTACATCTTCCAGGAAGCCCGACGTTCTCGGCGAATAAGAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCT : 816  
 JHEgV1 : TAGGGTCTTTACATTGTTAATGTACATCTTCCAGGAAGCCCGACGTTCTCGGCGAATAAGAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCT : 816  
 SnoJHE1 : ----- : 85  
 JHEg1 : ----- : 85  
 SnoJHE2 : ----- : 85  
 JHEg2 : ----- : 85  
 SnoJHE3 : ----- : 85  
 SnoJHE4 : ----- : 85  
 GAAGCCCGACGTTCTCGGCGAATAAGAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCT  
 GAAGCCCGACGTTCTCGGCGAATAAGAACAACACTTTGGACTGTGACGTGGCCACACGCATCGACTCT

```

      820          *          840          *          860          *          880          *          900          *          9
JHEgV2 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 918
JHEgV1 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 918
SnoJHE1 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 187
JHEg1 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 187
SnoJHE2 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 187
JHEg2 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 187
SnoJHE3 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 187
SnoJHE4 : GGATTGGTTTGTGGGAGAGTCTGGACCGCAGAGGAAAATGTTAAGTACGCCAGCTTCAGGGGAATGCCGTACGCCAAGCAGCCACTGCCAGAGCTACGGTTT : 101
      GGATTGGTTTGTGGGAGagctctggaccgagagaaaatgttaagtacgccagcttcaggggaatgccgtacgccaagcagccactgagagactacggttt

      20          *          940          *          960          *          980          *          1000          *          1020
JHEgV2 : AAGGTACACCGCGGGGTATTCCTTTTTCACAAACTAAACTAAATATAAGTTAAGTGCATCTTTTATTCTAATTCATTAAGAAAAGGACGAAAGATAGAC : 1020
JHEgV1 : AAGGTACACCGCGGGGTATTCCTTTTTCACAAACTAAACTAAATATAAGTTAAGTGCATCTTTTATTCTAATTCATTAAGAAAAGGACGAAAGATAGAC : 1020
SnoJHE1 : AAG----- : 190
JHEg1 : AAG----- : 190
SnoJHE2 : AAG----- : 190
JHEg2 : AAG----- : 190
SnoJHE3 : AAG----- : 190
SnoJHE4 : ----- : -
      aag

      *          1040          *          1060          *          1080          *          1100          *          1120
JHEgV2 : AGTTTAAACTTGAGGGCGAATTCTCGTAATTTAACACGGCTAATTTGAGAGGTTCTCCGGATAAGGTGGGAGCCGCGGGAGGCCAGCGTATAACCACTGTGG : 1122
JHEgV1 : AGTTTAAACTTGAGGGCGAATTCTCGTAATTTAACACGGCTAATTTGAGAGGTTCTCCGGATAAGGTGGGAGCCGCGGGAGGCCAGCGTATAACCACTGTGG : 1122
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

      *          1140          *          1160          *          1180          *          1200          *          1220
JHEgV2 : AGATCGCCCTGAGGACACGGTGGAGGTCTGCTCGGCATGGGTTCGAGCACCATCGTGTCCCTCGTGGCGCGATCGGTGGCGATCTCTCGCGTCCGGCCCTGGC : 1224
JHEgV1 : AGATCGCCCTGAGGACACGGTGGAGGTCTGCTCGGCATGGGTTCGAGCACCATCGTGTCCCTCGTGGCGCGATCGGTGGCGATCTCTCGCGTCCGGCCCTGGC : 1224
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

      *          1240          *          1260          *          1280          *          1300          *          1320
JHEgV2 : CAGGCCGGAGCGTCTTCTCGCAAGCAGTGATGCTGGCGGAGTGGCTGAGGGAGCGGAAAATTTCCGCGCCCTCAGCCCTCTAGCCGCCGAGGAGAATACTG : 1326
JHEgV1 : CAGGCCGGAGCGTCTTCTCGCAAGCAGTGATGCTGGCGGAGTGGCTGAGGGAGCGGAAAATTTCCGCGCCCTCAGCCCTCTAGCCGCCGAGGAGAATACTG : 1326
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

      *          1340          *          1360          *          1380          *          1400          *          1420
JHEgV2 : ATCAGGAGACAATAATCGAGCTCCAGGCCACCGTAGTCGCGGACTAACCGTACAGTTCGTTTATAAAACAATTAATTTGAATACATTCAGGAATTACAA : 1428
JHEgV1 : ATCAGGAGACAATAATCGAGCTCCAGGCCACCGTAGTCGCGGACTAACCGTACAGTTCGTTTATAAAACAATTAATTTGAATACATTCAGGAATTACAA : 1428
SnoJHE1 : ----- : 199
JHEg1 : ----- : 199
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : 199
SnoJHE4 : ----- : -

      *          1440          *          1460          *          1480          *          1500          *          1520          *
JHEgV2 : CCATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCGTG : 1530
JHEgV1 : CCATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCGTG : 1530
SnoJHE1 : CCATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCGTG : 301
JHEg1 : CCATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCGTG : 301
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : CCATTAGATCCCTGGGCCGGTGTCTACTAGCCACAAAAGAAGGTCCCATCTGTCCCCAGTATGATGAGATATATGGGCGTCTGGCCAGGCCAGTGGGCGTG : 301
SnoJHE4 : ----- : -

      1540          *          1560          *          1580          *          1600          *          1620          *
JHEgV2 : AGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGCTACGACCGACGGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAATGGTCTCCCCATCCTTGTTTTC : 1632
JHEgV1 : AGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGCTACGACCGACGGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAATGGTCTCCCCATCCTTGTTTTC : 1632
SnoJHE1 : AGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGCTACGACCGACGGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAATGGTCTCCCCATCCTTGTTTTC : 403
JHEg1 : AGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGCTACGACCGACGGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAATGGTCTCCCCATCCTTGTTTTC : 403
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : AGTGAATCTTGTATCCTCGCCAATGTCCACGTTCCCTCGATGCTACGACCGACGGTCAAAGGCCATATGCCAAAAAATGGTCTCCCCATCCTTGTTTTC : 403
SnoJHE4 : ----- : -

```



1640 \* 1660 \* 1680 \* 1700 \* 1720 \*

JHEgV2 : ATACATGGTGAAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGTCCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTGCATCACTTTTAACTATAG : 1734

JHEgV1 : ATACATGGTGAAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGTCCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTGCATCACTTTTAACTATAG : 1734

SnoJHE1 : ATACATGGTGAAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGACCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTGCATCACTTTTAACTATAG : 504

JHEg1 : ATACATGGTGAAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGACCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTGCATCACTTTTAACTATAG : 504

SnoJHE2 : ----- : -

JHEg2 : ----- : -

SnoJHE3 : ATACATGGTGAAGGTTTCCAAGCTGGTTCGGGTGACTCAGATCTCCATGGACCCGAATATTTAGTCAGCAAAGGCGTTATTGTGCATCACTTTTAACTATAG : 504

SnoJHE4 : ----- : -

1740 \* 1760 \* 1780 \* 1800 \* 1820 \*

JHEgV2 : TTAGTAACAACCTCCTACCATTGTATGTAAAATAGTTCAGGTGATTATAATAGAAGTATGTTAATATCCAAGAATAGGACAAACATTGAAATGGAATTTTAA : 1836

JHEgV1 : TTAGTAACAACCTCCTACCATTGTATGTAAAATAGTTCAGGTGATTATAATAGAAGTATGTTAATATCCAAGAATAGGACAAACATTGAAATGGAATTTTAA : 1836

SnoJHE1 : ----- : -

JHEg1 : ----- : -

SnoJHE2 : ----- : -

JHEg2 : ----- : -

SnoJHE3 : ----- : -

SnoJHE4 : ----- : -

Mf

1840 \* 1860 \* 1880 \* 1900 \* 1920 \*

JHEgV2 : TTACCTTGTGCTATGTATCAATGTGACCTTGACTTAGAGCGCGATTGTTGTTTTATAGAAATCAAACGTTTCGGATATCTCTCCCTGAACCTCTACGCTCC : 1938

JHEgV1 : TTACCTTGTGCTATGTATCAATGTGACCTTGACTTAGAGCGCGATTGTTGTTTTATAGAAATCAAACGTTTCGGATATCTCTCCCTGAACCTCTACGCTCC : 1938

SnoJHE1 : ----- : 544

JHEg1 : ----- : 544

SnoJHE2 : ----- : 230

JHEg2 : ----- : 230

SnoJHE3 : ----- : 544

SnoJHE4 : ----- : -

5'R

40 \* 1960 \* 1980 \* 2000 \* 2020 \* 2040

JHEgV2 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 2040

JHEgV1 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 2040

SnoJHE1 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 646

JHEg1 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 646

SnoJHE2 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 332

JHEg2 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 332

SnoJHE3 : GTACCTGGTAAACAACGGGCTTCGGGACGCCATCACTTTGCTCAAATGGGTACAGAGGAACGGCGCTGCCCTTCGGTGGAGACCCCTGAAAACGCTCACCCCTGGCA : 646

SnoJHE4 : ----- : -

aatcaacggttcgggatattctctccctgaactctacg cc

gtacctggttaacaacgggcttcgggacgccatcactttgctcaaatgggtacagaggaacggcgctgcccttcggtggagacccctgaaaacgctcacccctggca

\* 2060 \* 2080 \* 2100 \* 2120 \* 2140

JHEgV2 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 2142

JHEgV1 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 2142

SnoJHE1 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 748

JHEg1 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 748

SnoJHE2 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 434

JHEg2 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 434

SnoJHE3 : GGACAGAGTTGTGGCTCAGTCGCCGCGCATCTAGTCTCACTATCTAAAGCCCTCTGTGGGACTACTGAAGAGAGTAATATTGATGAGCGGTGTGGGCAACGGC : 748

SnoJHE4 : ----- : 143

ggacagagttgtggctcagtcgccgcgcatcactagctcaactatctaaagccctctgtgggaactactgaagagagtaatattgatgagcggtgtgggcaacggc

\* 2160 \* 2180 \* 2200 \* 2220 \* 2240

JHEgV2 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 2244

JHEgV1 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 2244

SnoJHE1 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 850

JHEg1 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 850

SnoJHE2 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 536

JHEg2 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 536

SnoJHE3 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 850

SnoJHE4 : GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA : 245

GGTTCCTACACGGCCTCGCCTGCCCTACGCTCAATCTGTTCGGGACTATGTTCTGGGATACGTAGGCATAAACTACTGACGCTGATAAAATCCATGAACAA

\* 2260 \* 2280 \* 2300 \* 2320 \* 2340

JHEgV2 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 2346

JHEgV1 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 2346

SnoJHE1 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 952

JHEg1 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 952

SnoJHE2 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 638

JHEg2 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 638

SnoJHE3 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 952

SnoJHE4 : CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA : 347

CTCATACATACACCTCTTGATAAGATCATGGAGGCCAACAGGATCGTACAGTTAAAGCTGGTCTAGTTTCCTTCGTTCCCTGTTGTAACCCGAACGTCCA

\* 2360 \* 2380 \* 2400 \* 2420 \* 2440

JHEgV2 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 2448

JHEgV1 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 2448

SnoJHE1 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 1054

JHEg1 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 1054

SnoJHE2 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 740

JHEg2 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 740

SnoJHE3 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 1054

SnoJHE4 : GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG : 449

GGAGTCACTCGCATCCTGGATGATTATCCCGCAAACCTTGTA AAAACGGGGCCGGGGCAAGGACCTTCCATGATCGTGGGCGTTACAAGTGTGAGTGCCAG

\* 2460 \* 2480 \* 2500 \* 2520 \* 2540 \*  
 JHEgV2 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 2550  
 JHEgV1 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 2550  
 SnoJHE1 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 1156  
 JHEg1 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 1156  
 SnoJHE2 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 842  
 JHEg2 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 842  
 SnoJHE3 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 1156  
 SnoJHE4 : TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC : 551  
 TTCTTTAAACAAGAATTGAATATTTGGACATGCTGGGATAATAGACGACAATTCATAGCAATTCACCACCAACATTACTTATTCAGTGTCTGAAAGC

2560 \* 2580 \* 2600 \* 2620 \* 2640 \*  
 JHEgV2 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 2652  
 JHEgV1 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 2652  
 SnoJHE1 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 1258  
 JHEg1 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 1258  
 SnoJHE2 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 944  
 JHEg2 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 944  
 SnoJHE3 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 1258  
 SnoJHE4 : GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC : 653  
 GAAGCGCTTCGCTCTGTCAAAGATAACGATTGATAAATATTTGCAAGGAGGTGCAACAGTGGACAAGTTTATCAAATACTGTACAAATTCGTTCTTCACATAC

2660 \* 2680 \* 2700 \* 2720 \* 2740 \*  
 JHEgV2 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 2754  
 JHEgV1 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 2754  
 SnoJHE1 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 1360  
 JHEg1 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 1360  
 SnoJHE2 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 1046  
 JHEg2 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 1046  
 SnoJHE3 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 1360  
 SnoJHE4 : CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT : 755  
 CCTGCATTCAGCTGGCGAGTGGACAGCTTCAGTTGGAACGTCGGCAGTCTACATGTATCAGTTTGACTTCGACAGCGAATTTAATGCTGTAAGTTTGGT

2760 \* 2780 \* 2800 \* 2820 \* 2840 \*  
 JHEgV2 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 2856  
 JHEgV1 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 2856  
 SnoJHE1 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 1462  
 JHEg1 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 1462  
 SnoJHE2 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 1148  
 JHEg2 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 1148  
 SnoJHE3 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 1462  
 SnoJHE4 : AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC : 857  
 AAAATGTTGACGTACCCAGGAGGAGGGGCTCCGTTGAGGACAGACATTTGTTGTTACCGGTCAATTCCTTTAATGGATCCGGACGAAAAGTCTTTTCCGCC

2860 \* 2880 \* 2900 \* 2920 \* 2940 \* 29  
 JHEgV2 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 2951  
 JHEgV1 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 2958  
 SnoJHE1 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 1527  
 JHEg1 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 1527  
 SnoJHE2 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 1213  
 JHEg2 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 1213  
 SnoJHE3 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 1527  
 SnoJHE4 : AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAGTAAAGA-----CGATGGAACATAATAGGCAGTCTCTG : 922  
 AGAACCAGGGACGACCTCATGAAATACTGGATGACAAAGTTTTTGTCAACTTTATGCGATGCGAG

60 \* 2980 \* 3000 \* 3020 \* 3040 \* 3060  
 JHEgV2 : ATAAAAATGATGATTTCTGTATATCCTTCTGTTACCAGGAAAAATTTCTTTAAAAATGTTGGTGTCTTCCAGCCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 3053  
 JHEgV1 : ATGAAAAATGATGATTTTGTGATATCCTTCTGTTACCAAGATAAATTTCTTTAAAAATGTTGGTGTCTTCCAGCCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 3060  
 SnoJHE1 : -----CCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 1556  
 JHEg1 : -----CCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 1556  
 SnoJHE2 : -----CCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 1242  
 JHEg2 : -----CCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 1242  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : -----CCACCCATTGTTGACCATAAATCGGAAT : 951  
 ccacca tttgtgac at aatcgga t

\* 3080 \* 3100 \* 3120 \* 3140 \* 3160  
 JHEgV2 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 3155  
 JHEgV1 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 3162  
 SnoJHE1 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 1658  
 JHEg1 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 1658  
 SnoJHE2 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 1344  
 JHEg2 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 1344  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : GGGCAGCGACGGATGCGAAGCAGCTCAACTACCAGCTGATCAAGGAACCCATGCTCATAAACAATAACATCAACCTGACGGGAGAACTGCGAGCTGAATTCG : 1053  
 ggcagcgacggatgccaagcagctcaactaccagctgatcaaggaacccatgctcataaaacaataaacatcaacctgacgggagaaactgcgagctgaaatccg

\* 3180 \* 3200 \* 3220 \* 3240 \* 3260  
 JHEgV2 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGTAAATAATTTT--ATGATTTTCATTAACCTGAGAGGTTTAAAGATACCCGTACCAAGAAGCTCC : 3255  
 JHEgV1 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGTAAATAATTTTATGATTTTCATTAACCTGAGAGGTTTAAAGATACCA-----AAGAAGCTCC : 3258  
 SnoJHE1 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGT----- : 1696  
 JHEg1 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGT----- : 1696  
 SnoJHE2 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGT----- : 1382  
 JHEg2 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGT----- : 1382  
 SnoJHE3 : ----- : -  
 SnoJHE4 : ACTTCCAGGACCGAGCTCTTAAAAATGGCAACAATACCGGT----- : 1091  
 acttccagaccagctctt aaatggc ca t acga

```

*      3280      *      3300      *      3320      *      3340      *      3360
JHEgV2 : GGCTGACGTGTTTCGAAATCACAGTTCGAAACGACCGACGTTTGAA--CAAGATGTTTGATGTAGAGCTGGATTTCGAAGAATTTAATATTGGGAGTTTCTA : 3355
JHEgV1 : GGCTCACGGGTTCCAAATCACAGTTCGAAACTACCGACGTTTGAAATGCATGGAGTTTGATCTAATGCTTGGATTCCAAAAAG--TGGTAGTGGGTAGTTC-G : 3357
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

*      3380      *      3400      *      3420      *      3440      *      3460
JHEgV2 : CCAAGAATTCCCCGATCTGGCTTCGTGCCAG-----CTTATG-----GAGATAGGC-----TC : 3404
JHEgV1 : TCTCACCTTTCCCAATCTGGCATCATGCTCAGGGAAACCGGATAGGTATCCCGTTTTTATATGGGTTCCAAACATCATCAAAGAAATGTGCACAAAAATC : 3459
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

*      3480      *      3500      *      3520      *      3540      *      3560      *
JHEgV2 : GCACCCTC-----TGATAT-----GGGATT-----TCAAAATATAGTCGCCAA-- : 3442
JHEgV1 : CCCCCCTCCCTTCTCCATAATATTTAGGAAAAAGTAGGACTTTATTTTAAACAGGCTTGGGGTTGTATATAATGGCAAATTAGGATATTGCCGCAGATA : 3561
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

      3580      *      3600      *      3620      *      3640      *      3660      *
JHEgV2 : -----AATGTTGATGTTACTAATGCTAGGTA-----CATCTCTGCTTAACCGTTTGGGG : 3491
JHEgV1 : AAAAGGGATTTAGAACCCCTCTATGTCCAATCTTAAAACAGATAAATACTAAACAAGAAGCGGTAACCTTGGCTCGTTTCACCTCCGCTTGGTGGATGGGAA : 3663
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

      3680      *      3700      *      3720      *      3740      *      3760      *
JHEgV2 : ATTACAAGTGTGATGTACTGTAAGCAAAGGCACGAGTTATTTGAAGATGAAGATTGATTAACATATGGTCCTTCAGAACTAAATATATTTCGAACAC----- : 3588
JHEgV1 : AGAGCAAATAAGAAGCAAGGTAACAAGGCACCCGAAGATAGTAGATGTC-ATCGATACCGGTGTGGTCCTTCAGAAATTAATATATCTTGATCACGTGTA : 3764
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

      3780      *      3800      *      3820      *      3840      *      3860      *
JHEgV2 : -----TATACAACGTGCAACGGAAATGGTATATACATATCAAGGGCACGGCTTCTTTAAATGATATCAAAACATATTGGAAGAATTTCAAC : 3674
JHEgV1 : AAACGTTTTAAATATGTGTAACCGTGTATCGAAAATGGTATATACATATCAAGGGCACGGCTTTTTTAGATGATATCAAACGATATTCGAAGGATTTCAAC : 3866
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

      3880      *      3900      *      3920      *      3940      *      3960      *      39
JHEgV2 : TCAAAATAAAATACTCTAGAAATATACCAAATGTTCCGGTTAC-----TACCGCAGTCGATATT : 3733
JHEgV1 : TCAAAATAAAATACTCTAGAAATATACCAAATGTTTCGATTACATATAAACGTCGGAAATTTTAAAGCGCTAGTATCATATTAACCTACCGCAGTCGATATT : 3968
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

      80      *      4000      *      4020      *      4040      *      4060      *      4080
JHEgV2 : TTTTCCGTAATTTTCGAACACGAAGAAAAACCGGATATAAGTTGATAGCA----AAAAGCCGTGCTCCTTGTACATAGCACACGGTTCAAAATGGCTT : 3831
JHEgV1 : TTTTCCGTAATTTTCGACATGAAGAATAGACCGGATATAAGTTGATAGCATCCAAATAAGCCGTGCCCTGGTTACATAGCACACGGTTCAAAATGGCTT : 4070
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```



```

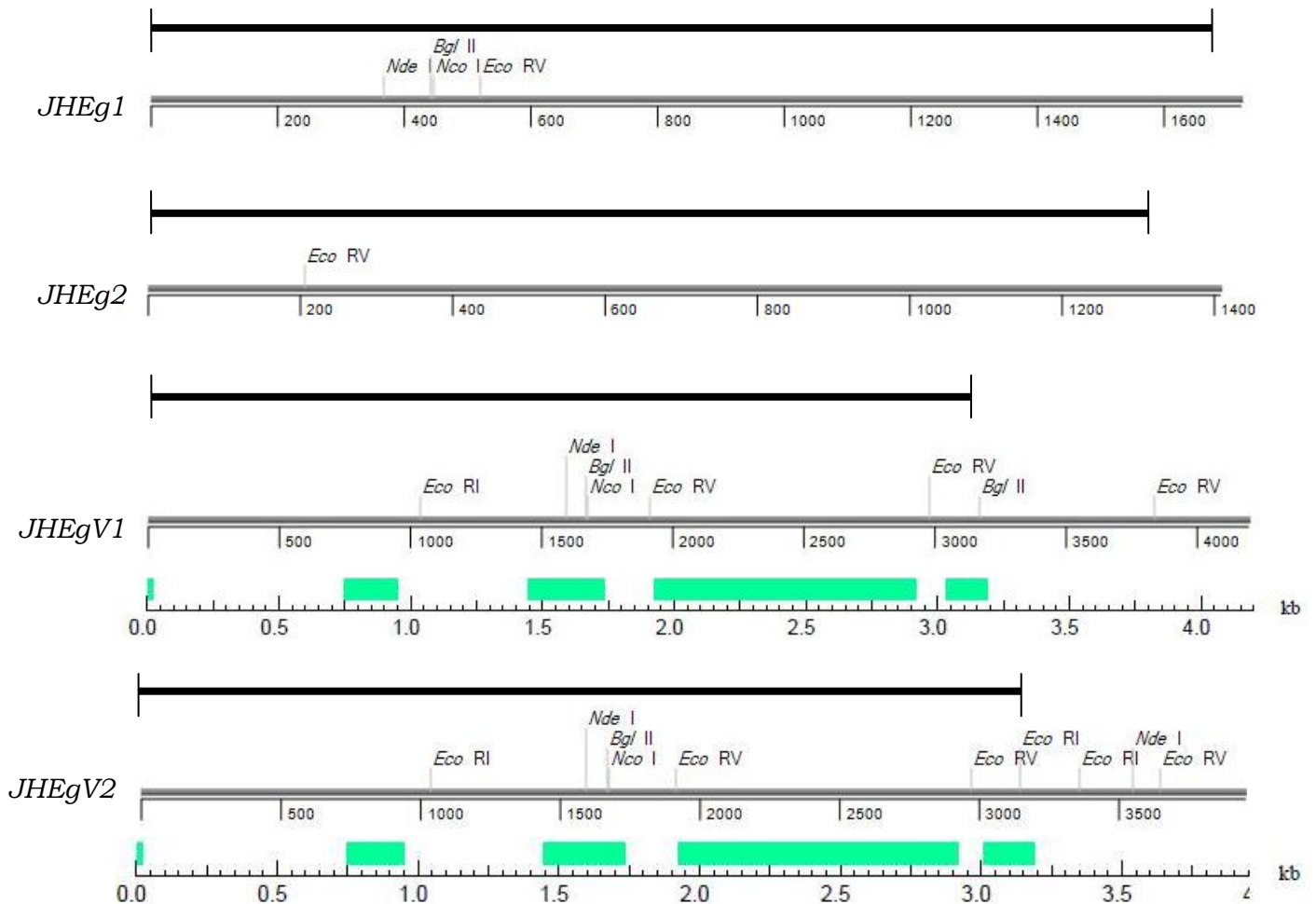
          *           4100           *           4120           *           4140           *           4160           *           4180
JHEgV2 : GGCAAATCATT TTTTGTAA TTTATA-----TTGTG TTCAGTAATCTCGTAATATG TTTTCAAATGTCATATCCG TGATTTTAATTCGCGTGC TTTGTTCCA : 3928
JHEgV1 : GGCAAACATT TTTTGTAA TTTGTA AATTATTGTTTCGGTAACCTCGTAATATAT TTTTTCACATGTCATATCCG TGATTTTAATTCGCGTGC TTTGTTCCA : 4172
SnoJHE1 : ----- : -
JHEg1 : ----- : -
SnoJHE2 : ----- : -
JHEg2 : ----- : -
SnoJHE3 : ----- : -
SnoJHE4 : ----- : -

```

```

          *           4200           *
          ←----- 3'R -----→
JHEgV2 : GGAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 3958
JHEgV1 : GGAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 4202
SnoJHE1 : -GAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 1725
JHEg1 : -GAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 1725
SnoJHE2 : -GAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 1411
JHEg2 : -GAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 1411
SnoJHE3 : -GAGCAGCAAGAGTGCCTCATCCTAGTGTC : 1556
SnoJHE4 : -GAGCAGCAAGAGTGCCT-ATCCTAGTGTC : 1119
          GAgCAGCAAGAGTGCCTcATCCTAGTGTC

```



**Εικόνα 3.4.2.4.5.** Περιοριστικοί χάρτες των *JHEg -1, -2* και *JHEgV -1, -2*. Για τα τελευταία δύο, κάτω από τον χάρτη υποδεικνύονται με πράσινο χρώμα οι κωδικές περιοχές των γονιδίων. Η μπάρα μαύρου χρώματος υποδεικνύει την περιοχή του ικνηλάτη. Σημείωση: Ο ικνηλάτης δεν υβριδίζει στις ιντρονικές περιοχές των γονιδίων.

**Πίνακας 3.4.2.4.1.** Αναμενόμενες θετικές ζώνες, και ο αριθμός ζωνών που ελήφθησαν από τον υβριδισμό (Εικ.3.4.1.3).

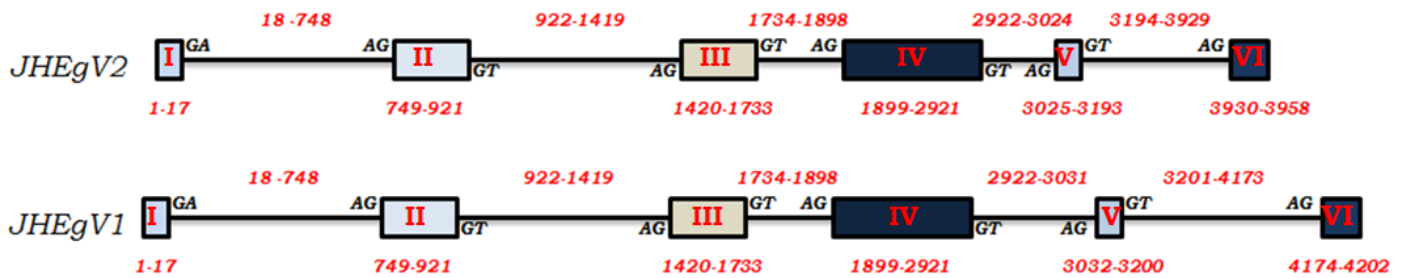
Ενζυμο περιορισμού	Αναμένονται	Ελήφθησαν
<i>Bgl II</i>	7	8
<i>EcoRI</i>	6	5
<i>EcoRV</i>	9	9
<i>NcoI</i>	7	4
<i>NdeI</i>	7	7

Όπως φαίνεται και στο alignment (Εικ. 3.4.2.4.4.), τα *JHEgV1* και *JHEgV2* είναι τα μόνα γονίδια τα οποία διακόπτονται από ιντρόνια. Τα ιντρόνια αυτά διακόπτουν τις κωδικές περιοχές στα ίδια σημεία, ενώ αριθμούνται σε 5. Τα τρία ιντρόνια του 5' άκρου έχουν μέγεθος 730, 497 και 164 bp αντίστοιχα. Τα δύο ιντρόνια του 3' άκρου έχουν μέγεθος 102 και 735 bp στο *JHEgV2* και 109 και 972 bp στο *JHEgV1* αντίστοιχα (Εικ. 3.4.2.4.6.). Οι διαφορές αυτές στα μεγέθη οφείλονται σε διάσπαρτους πολυμορφισμούς, οι οποίοι εντοπίζονται στα ιντρόνια του 3' άκρου του *JHEgV1*.

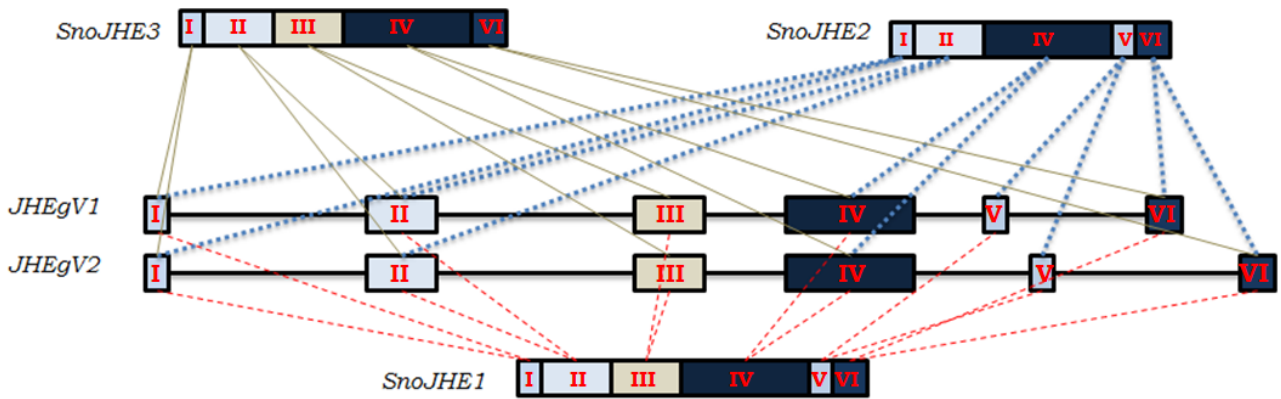
Τα ιντρόνια οριοθετούνται από τα συντηρημένα δινουκλεοτίδια 5'-GT...AG-3' (GU..AG), χαρακτηριστικό όλων των ευκαρυωτικών ιντρονίων, εκτός του πρώτου ιντρονίου του 5' άκρου, μεγέθους 730 bp, το οποίο οριοθετείται από τα 5'-GA...AG-3' (Εικ. 3.4.2.4.6.).

Εάν συγκριθούν τα γονίδια με τα μεταγραφήματα τα οποία έχουμε αλληλουχήσει, τότε φαίνεται πως ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να προκύψουν τα *SnoJHE -1*, *-2* και *-3*. Το πρώτο γονίδιο προκύπτει από την συρραφή όλων των εξωνίων και αποβολή όλων των ιντρονίων. Αντιθέτως, το *SnoJHE2* προκύπτει από την αποβολή του 3<sup>ου</sup> εξωνίου και την συρραφή των υπόλοιπων πέντε, ενώ το *SnoJHE3* προκύπτει από την αποβολή του 5<sup>ου</sup> εξωνίου και την συρραφή των υπόλοιπων πέντε, (Εικ.3.4.2.4.7.).

Το *SnoJHE4* δεν μπορεί να εξηγηθεί από το τρόπο συρραφής που υποδεικνύουν οι θέσεις των ιντρονίων στα *JHEgV1* και *JHEgV2*.

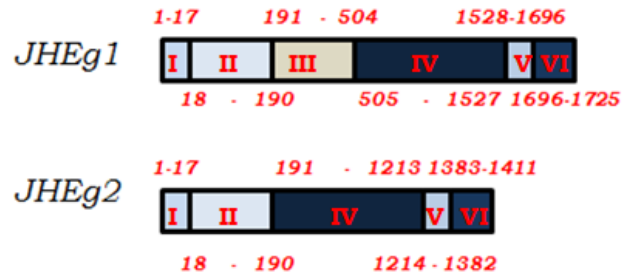


**Εικόνα 3.4.2.4.6.** Σχηματική αναπαράσταση των *JHEgV* -1 και -2. Οι τετραγωνισμένες περιοχές αντιστοιχούν στα έξι εξόνια των γονιδίων αυτών, ενώ οι ευθείες γραμμές αντιστοιχούν στα ιντρόνια. Οι κόκκινου χρώματος αριθμοί αναπαριστούν τις θέσεις στην νουκλεοτιδική ακολουθία των γονιδίων των ιντρόνιων και των εξωνίων.



**Εικόνα 3.4.2.4.7.** Σχηματική αναπαράσταση των *JHEgV* -1 και -2, και των *SnoJHE* -1, -2, -3. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν τα εξόνια των *JHEgV* -1 και -2 που συμμετέχουν για τον σχηματισμό των *SnoJHE* -1, -2, -3.

Τα *JHEg1* και *JHEg2* αντιθέτως δεν περιέχουν κάποια ιντρόνια, τα εξώνια τους είναι ταυτόσημα με εκείνα των *JHEgV-1* και *-2* ενώ είναι επίσης ταυτόσημα με τα *SnoJHE1* και *SnoJHE2*, (Εικ. 3.4.2.4.8.).



**A.**



**B.**

**Εικόνα 3.4.2.4.8. A.** Σχηματική αναπαράσταση των *JHEg -1* και *-2*. Οι τετραγωνισμένες περιοχές αντιστοιχούν στα εξώνια των γονιδίων αυτών. Οι κόκκινου χρώματος αριθμοί αναπαριστούν τις θέσεις στην νουκλεοτιδική ακολουθία των εξονίων. **B.** Σχηματική αναπαράσταση των *JHEg -1* και *-2* και των προϊόντων τους *SnoJHE1* και *SnoJHE2*.



### 3.5 Ημιποσοτική έκφραση.

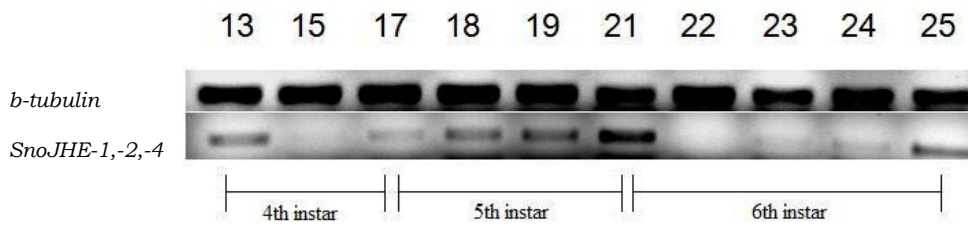
Λόγω της υψηλής ομολογίας που παρουσίασαν τα τέσσερα cDNAs, ήταν δύσκολο να σχεδιαστούν εκκινητές εξειδικευμένοι για κάθε ένα μεταγράφημα ξεχωριστά.

Παρασκευάστηκε cDNA από λιπώδη ιστό προνυμφών 13, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 και 25 ημερών από την στιγμή της εκκόλαψης. Πραγματοποιήθηκε ημιποσοτικό PCR με τους εκκινητές 3'f/3'R στα παραπάνω αναπτυξιακά στάδια, οι οποίοι πολυμερίζουν προϊόν 257bp, το οποίο όμως αντιπροσωπεύει τρία μεταγραφήματα μαζί, δηλαδή τα *SnoJHE -1, -2, -4*.

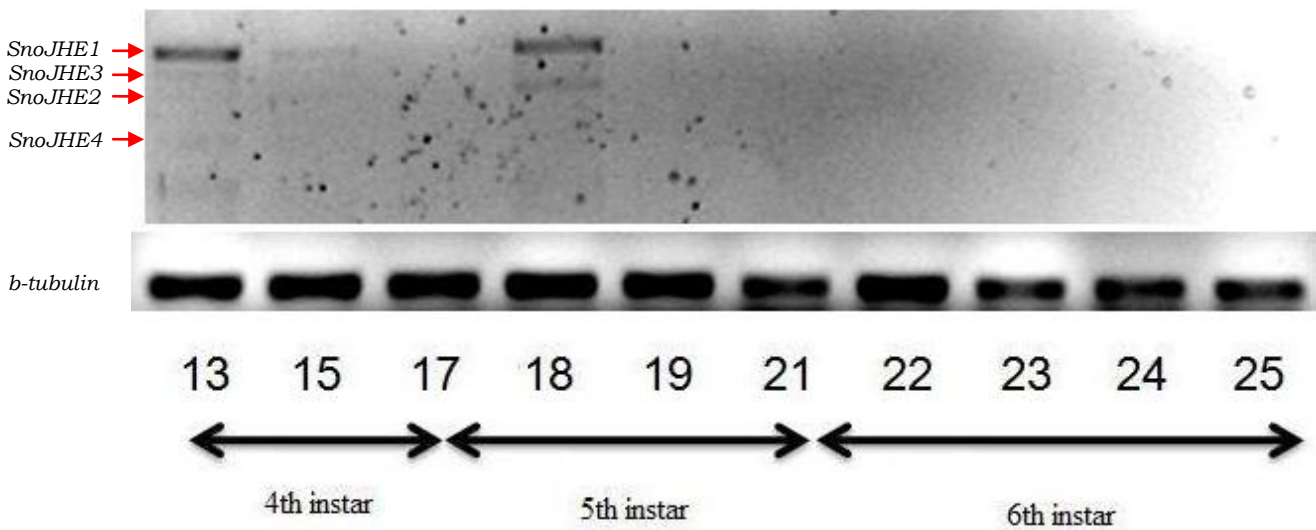
Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές αυτούς φάνηκε, πως και τα τρία γονίδια εκφράζονται στις αρχές του 4<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου, αυξάνονται σταδιακά μέχρι τις αρχές του 6<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου, όπου εμφανίζουν ένα μέγιστο της έκφρασής τους, στην συνέχεια μηδενίζονται και αυξάνονται ξανά στο τέλος του 6<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου (Εικ. 3.5.1.).

Αντιθέτως, όταν πραγματοποιήθηκε ημιποσοτικό PCR στα ίδια αναπτυξιακά στάδια που αναφέρθηκαν προηγουμένως και με μία δεύτερη επανάληψη ξεχωριστά, στα στάδια των 13, 18, 21, 23 και 25 ημερών από την στιγμή της εκκόλαψης, χρησιμοποιώντας τους Wf/3'R εκκινητές, φάνηκε πως κανένα μεταγράφημα δεν εκφράζεται την 21<sup>η</sup>, 23<sup>η</sup> και 25<sup>η</sup> ημέρα (ειδικότερα την 21<sup>η</sup> που αναμένονταν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης) (Εικ. 3.5.2.; Εικ. 3.5.3.).

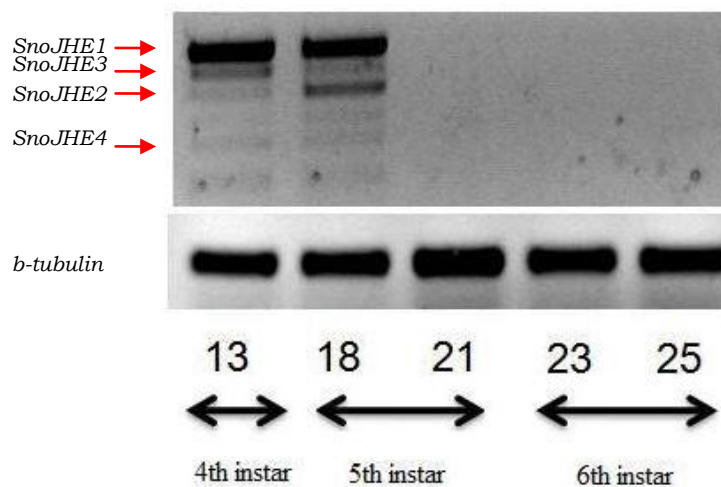
Αντιθέτως, και τα τέσσερα μεταγραφήματα εμφανίζονται την 13<sup>η</sup> και την 18<sup>η</sup> ημέρα μόνο. Και στα δύο αυτά στάδια, το *SnoJHE1* εκφράζεται σταθερά και κατά πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα μεταγραφήματα της οικογενείας, ενώ το *SnoJHE2* εμφανίζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης την 18<sup>η</sup> και το *SnoJHE3* την 13<sup>η</sup> ημέρα από την στιγμή της εκκόλαψης (Εικ. 3.5.2.; Εικ. 3.5.3.).



**Εικόνα 3.5.1.** Αποτέλεσμα ημιποσοτικού PCR με τους εκκινητές 3'f/3'R. Σαν control χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-τουμπουλίνης (DQ147771).



**Εικόνα 3.5.2.** Αποτέλεσμα ημιποσοτικού PCR με τους εκκινητές Wf/3'R, για τα ίδια αναπτυξιακά στάδια που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Σαν control χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-τουμπουλίνης (DQ147771).



**Εικόνα 3.5.3.** Αποτέλεσμα ημιποσοτικού PCR με τους εκκινητές Wf/3'R, για τα αναπτυξιακά στάδια στα οποία τα *SnoJHE-1*, *-2* και *-4* με τους 3'f/3'R εκκινητές φαίνεται να εμφανίζουν τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης.

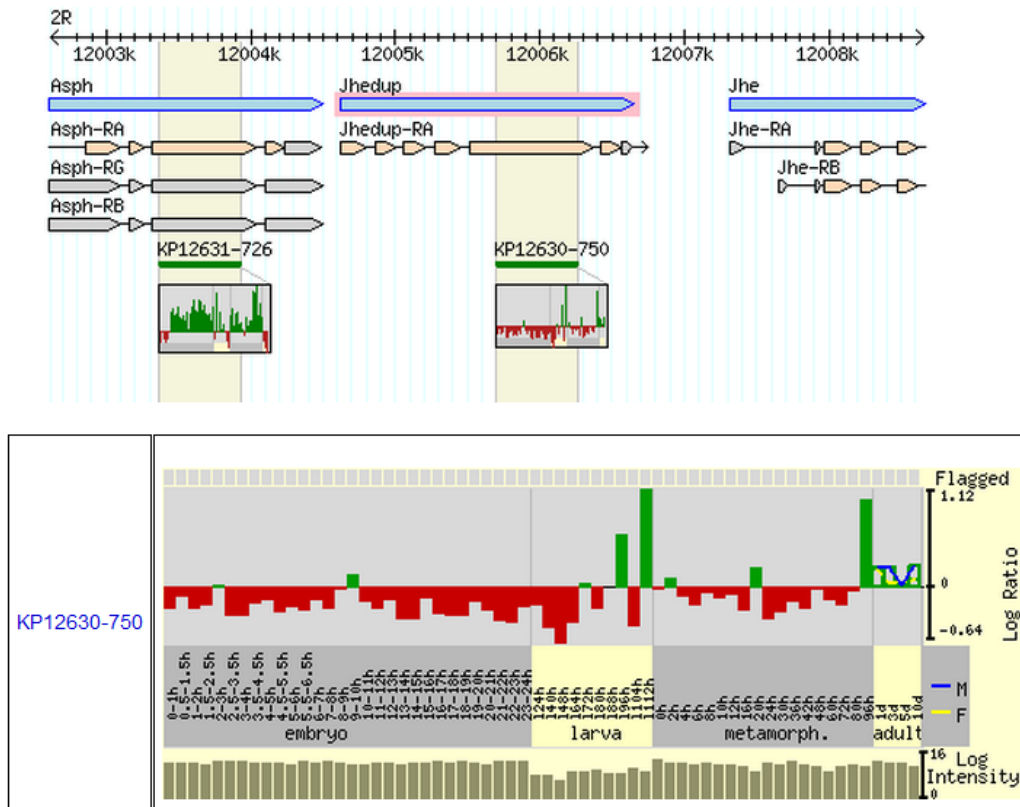
#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εστεράση της ορμόνης νεότητας, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που εμπλέκονται στην ρύθμιση του αναπτυξιακού προγράμματος των εντόμων.

Ως κύριος ρυθμιστής της συγκέντρωσης των ορμονών νεότητας στους ιστούς των εντόμων, η JHE αποτρέπει την παραμονή του εντόμου στο εκάστοτε προνυμφικό στάδιο και προωθεί την ανάπτυξη στα επόμενα προνυμφικά στάδια, κατευθύνοντας έτσι τον οργανισμό στην ενηλικίωση και στην αναπαραγωγική ωρίμανση.

Στην *D. melanogaster* αλλά και στα υπόλοιπα έντομα που έχουν μελετηθεί έως τώρα, τα επίπεδα έκφρασης του *JHE* είναι μέγιστα εκεί όπου ο τίτλος των *JHs* είναι μειωμένος. Στην *Drosophila*, δεδομένα από μικροσυστοιχίες αποκαλύπτουν πως το γονίδιο *Jhedup*, λειτουργικός διπλασιασμός του *JHE*, εμφανίζει μέγιστα ποσοστά έκφρασης στα τέλη του τελευταίου προνυμφικού σταδίου, όπως και για τη *S. nonagrioides* (Εικ. 4.1).

Από το γεγονός αυτό φαίνεται πως τα ένζυμα αυτά έχουν έναν συντηρημένο βιοχημικό ρόλο σε όλα τα είδη των εντόμων, δηλαδή την προτροπή για μεταμόρφωση. Επομένως, οι JHEs ανταγωνίζονται τον τίτλο των ορμονών νεότητας και τις επιδράσεις τους στα κύτταρα στόχους, μέσω υδρόλυσης των τελευταίων, ενισχύοντας έτσι την δράση των εκδυστεροειδών.



**Εικόνα 4.1.** Ποσοτική έκφραση του *Jhedup*, στην *Drosophila melanogaster*, (Gauhar et al. 2008.10.3).

Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δράσης των εστερασών της ορμόνης νεότητας παραμένει αδιευκρίνιστος, αφού είναι λίγα ακόμα τα δεδομένα που απαντούν σε κρίσιμα ερωτήματα, όπως είναι η ακριβής υποκυτταρική τους τοποθέτηση, ο αριθμός των ισομορφών και των γονιδίων που τις κωδικοποιούν, η εξελικτική τους προέλευση κ.α.

Για την εξελικτική τους προέλευση, από την βιβλιογραφία προκύπτει ότι τα γονίδια αυτά δεν διατηρούν κάποιον βαθμό συντήρησης στους διάφορους οργανισμούς, αφού υπάρχει ποικιλομορφία όσον αφορά τον αριθμό αντιτύπων, ισομορφών και γονιδιακών προϊόντων, γεγονός που ενισχύει την αιτιολογική τους φύση.

Στο *S. nonagrioides*, χαρακτηρίστηκαν τέσσερα cDNA γονίδια σε μεταγραφικό επίπεδο, που κωδικοποιούν για εστεράσες των ορμονών νεότητας. Και τα τέσσερα αυτά γονίδια διαθέτουν σχεδόν ταυτόσημη ομολογία μεταξύ τους, εκτός από κάποιες σημαντικές ελλείψεις, που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία των ακολουθιών τους, ενώ εμφανίζουν ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια, που κωδικοποιούν για εστεράσες των ορμονών νεότητας.

Τρία από τα τέσσερα γονίδια φαίνεται να διαθέτουν το καταλυτικό μοτίβο GQSCG, ενώ το τέταρτο, το SnoJHE4, φαίνεται να μην διαθέτει καθόλου το γενικευμένο GxSxG και κατά συνέπεια το GQSCG μοτίβο που παρατηρήθηκε στα υπόλοιπα τρία γονίδια.

Τα τέσσερα γονίδια εμφανίζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις και σημαντικές ομοιότητες στα N- και C- άκρα τους, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με διαφορετική υποκυτταρική ή ιστολογική τους τοποθέτηση.

Από τα τέσσερα μεταγραφήματα, δύο εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στις αρχές του 4<sup>ου</sup> και 5<sup>ου</sup> προνυμφικού σταδίου, τα *SnoJHE -2* και *-3*, ενώ το *SnoJHE1* εκφράζεται σταθερά και κατά πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα, στα στάδια αυτά.

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει διαφορετικό μεταγραφικό έλεγχο των τεσσάρων γονιδίων, γεγονός που υποκρύπτει πιθανή διαφοροποίηση στον βιοχημικό τους ρόλο.

Σε επίπεδο γονιδιώματος, η ανάλυση κατά Southern έδειξε πως υπάρχουν περισσότερα του ενός γονίδια που κωδικοποιούν για εστεράσες της ορμόνης νεότητας στο *S.nonagrioides*. Η αλληλούχηση των γονιδιωματικών τους κλώνων έδειξε πως υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα γονίδια.

Τα γονίδια αυτά, με τις ονομασίες *JHEg1*, *JHEg2*, *JHEgV1* και *JHEgV2* έχουν μέγεθος 1725, 1411, 4202 και 3958 bp αντίστοιχα. Τα *JHEgV1* και *JHEgV2* διακόπτονται από 5 ιντρόνια. Τα ιντρόνια αυτά διακόπτουν τις κωδικές περιοχές στα ίδια σημεία, ενώ τα μεγέθη τους με φορά 5'→3' είναι 730, 497, 164, 102 και 735 bp στο *JHEgV2*, ενώ στο *JHEgV1*, 730, 497, 164, 109 και 972 bp αντίστοιχα. Οι διαφορές στα μεγέθη των ιντρονίων των 3' άκρων οφείλονται σε πολυμορφισμούς μεταξύ των δύο τελευταίων ιντρονίων του 3' άκρου των *JHEgV1* και *-2*.

Εάν συγκριθούν τα γονίδια αυτά με τα τέσσερα μεταγραφήματα που αλληλουχήθηκαν, φαίνεται πως ύστερα από εναλλακτικό μάτισμα των *JHEgV1* και *-2* μπορούν να προκύψουν τα *SnoJHE -1*, *-2* και *-3*. Το *SnoJHE1* προκύπτει από την συρραφή όλων των εξωνίων και αποβολή όλων των ιντρονίων των *JHEgV1* και *-2*. Το *SnoJHE2* προκύπτει από την αποβολή του 3<sup>ου</sup> εξωνίου και την συρραφή των υπόλοιπων πέντε, ενώ το *SnoJHE3* προκύπτει από την αποβολή του 5<sup>ου</sup> εξωνίου και την συρραφή των υπόλοιπων πέντε εξωνίων των *JHEgV1* και *-2* γονιδίων. Το *SnoJHE4* αντιθέτως, δεν μπορεί να εξηγηθεί από το τρόπο συρραφής που υποδεικνύουν οι θέσεις των ιντρονίων στα *JHEgV1* και *JHEgV2*.

Αντιθέτως, τα *JHEg1* και *JHEg2*, δεν περιέχουν ιντρόνια στις κωδικές τους περιοχές, ενώ φαίνεται να είναι ταυτόσημα με τα *SnoJHE1* και *-2*. Από την άλλη πλευρά, τα *SnoJHE1* και *-2* αποτελούν κάποια από τα μεταγραφικά προϊόντα των *JHEgV1* και *-2*.

Από τα παραπάνω προκύπτει πως, δύο κοινά μεταγραφικά προϊόντα, δύο διαφορετικών γονιδίων, φαίνεται να υπάρχουν ταυτόχρονα σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμα του ίδιου οργανισμού και να κωδικοποιούν κοινά μεταγραφήματα με τα μητρικά τους γονίδια.

Φαίνεται δηλαδή πως τα *SnoJHE -1* και *-2* επανήλθαν και ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα του *S. nonagrioides* και διατηρήθηκαν σαν ανεξάρτητα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ίδια μεταγραφικά προϊόντα από τα οποία προήλθαν.

Με ποιόν όμως μηχανισμό δύο μεταγραφήματα επανέρχονται και ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του οργανισμού από τον οποίο προήλθαν; Την

απάντηση στο προηγούμενο ερώτημα μπορεί να δώσει, η θεωρία της δημιουργίας ή της αποβολής ιντρονίων (Intron gain or loss, IGL).

Η εξελικτική ιστορία των ιντρονίων παραμένει ακόμα άγνωστη, ενώ είναι ακόμα αδιευκρίνιστο εάν η εξαπλώσή τους επιτεύχθηκε από έναν ευκαρυωτικό ή από έναν προ-ευκαρυωτικό πρόγονο (introns-early hypothesis) ή εάν νέα ιντρόνια συνεχίζουν να δημιουργούνται ακόμα και σήμερα (intron late-intron middle hypothesis). Σχετικά νέα μοντέλα για την εξέλιξη των ιντρονίων έχουν βασιστεί κυρίως στην μελέτη τους σαν ομάδες ορθόλογων γονιδίων από ευκαρυώτες οργανισμούς-μοντέλα (Logsdon et al., 1998). Μέχρι σήμερα, οι μελέτες της δυναμικής των ιντρονίων έχουν περιοριστεί σε συγκρίσεις ιντρονικών περιοχών μεταξύ υψηλά συντηρημένων ορθόλογων ή παράλογων γονιδίων, συχνά από είδη τα οποία εξελικτικά είναι πολύ απομακρισμένα (Rogozin et al., 2005; Yoshihama et al., 2007). Το πρόβλημα με αυτή την προσέγγιση είναι, πως το πολύ μικρό ποσοστό καθώς και η μεγάλη εξελικτική απόσταση μεταξύ των ειδών που έχουν χρησιμοποιηθεί έως τώρα, έχει οδηγήσει σε παρερμηνεία των υπό ανάλυση αποτελεσμάτων.

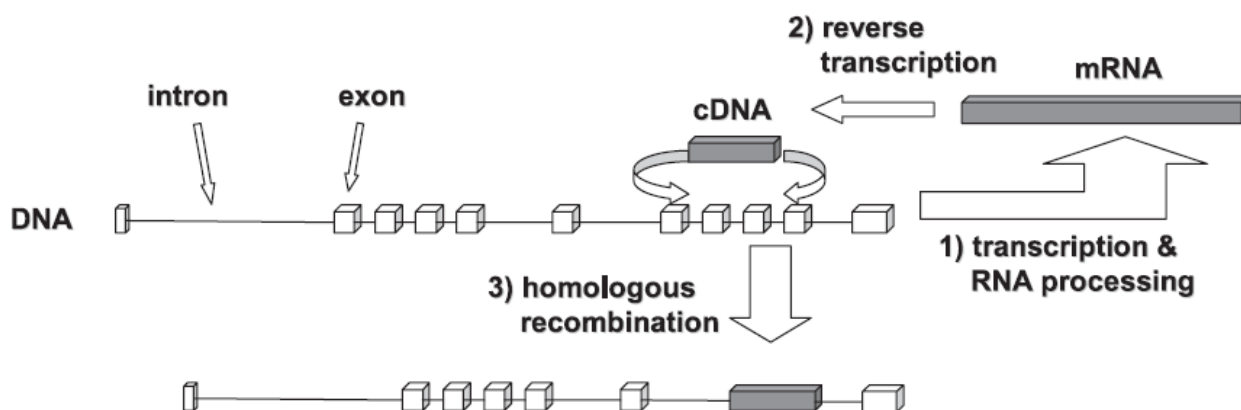
Για παράδειγμα, η πρόσφατη αλληλούχηση της θαλάσσιας ανεμώνης, άλλαξε το προβλεφθέν ποσοστό των ιντρονίων του ανθρώπου, τα οποία δημιουργήθηκαν πριν από 500 Myrs, από 20% σε 80% (Putnam et al., 2007). Κυρίως γι'αυτόν τον λόγο, πρόσφατες ανακοινώσεις δημιουργίας ιντρονίων έχουν επικριθεί (Logsdon et al. 1998; Roy and Penny 2006).

Η αποβολή ιντρονίων, φαίνεται να συμβαίνει συχνότερα, σχεδόν με μετρήσιμους ρυθμούς στους περισσότερους ευκαρυώτες, ενώ η δημιουργία ιντρονίων φαίνεται να συμβαίνει τουλάχιστον κάθε 100 Myrs και σε συγκεκριμένους ταξονομικούς κλάδους.

Πρόσφατα έχουν αναφερθεί περισσότερα από 100 γεγονότα αποβολής ιντρονίων μεταξύ του ανθρώπου, του σκύλου και των τρωκτικών (Coulombe-Huntington and Majewski, 2007).

Η αποβολή των ιντρονίων είναι πλέον ένας αρκετά μελετημένος μηχανισμός. Η επικρατέστερη θεωρία του βιολογικού αυτού μηχανισμού περιλαμβάνει την μεταγραφή του γονιδίου σε mRNA (intronless) και την αντίστροφη μεταγραφή του σε cDNA στα γεννητικά κύτταρα.

Στην συνέχεια το cDNA αλληλεπιδρά με ομόλογο ανασυνδυασμό με την γονιδιωματική περιοχή του γονιδίου, αφαιρώντας έτσι την μη ομόλογη ιντρονική περιοχή. Η ανάστροφη μεταγραφή φαίνεται να επιτυγχάνεται από ρετροτρανσποζόνια, τα οποία μπορούν να μεταγράψουν αναστρόφως mRNAs, διαφορετικά από τα δικά τους μεταγραφήματα (C. Esnault et al., 2000) (Εικ 4.2). Ο μηχανισμός αυτός αποδείχτηκε πειραματικά στην ζύμη (Derr et al., 1991).



**Εικόνα 4.2.** Ο μηχανισμός IL (intron loss) όπως έχει περιγραφεί από τους C. Esnault et al.(2000).

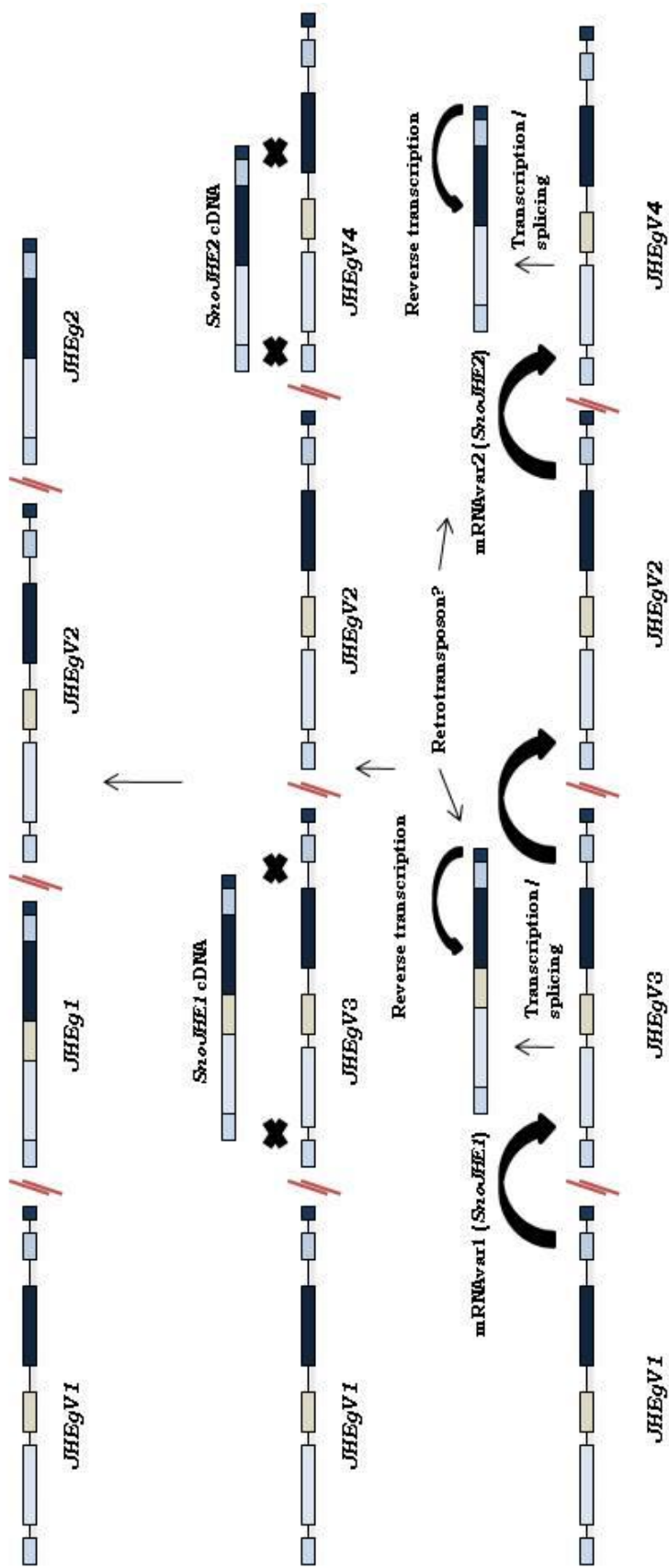
Πως όμως μπορεί να συσχετιστούν τα γονίδια της εστεράσης της ορμόνης νεότητας με τον IGL μηχανισμό; Στο γονιδίωμα του *S. nonagrioides*, τα *JHE* γονίδια φαίνεται πως διατηρούνται και στις δύο μορφές τους, τόσο στην intron-less όσο και στην intron-rich μορφή. Εάν υπήρχε μόνο το γεγονός αφαίρεσης των ιντρονίων, τότε θα έπρεπε από την αλληλούχηση να προκύψει ένα μόνο γονίδιο intron-less.

Αντιθέτως, από την αλληλούχηση προέκυψαν δύο intron-rich γονίδια, τα *JHEgV1* και *JHEgV2* και άλλα δύο intron-less γονίδια τα *JHEg1* και *JHEg2*. Επομένως, αυτός καθ' αυτός ο IGL μηχανισμός δεν μπορεί να εξηγήσει την δημιουργία των *JHE* γονιδίων στο *S. nonagrioides*. Για να εξηγηθεί ο μηχανισμός αυτός, θα πρέπει να έχουν συμβεί διάφορα άλλα γεγονότα πριν την αφαίρεση των ιντρονίων.

Υποθέτουμε ότι αρχικά ένα intron-rich *JHE* γονίδιο τετραπλασιάστηκε και δημιουργήθηκαν έτσι τέσσερα *JHE* γονίδια, τα *JHEgV-1*, *-2*, *-3*, *-4*. Τα γονίδια αυτά δίνουν σαν μεταγραφικά προϊόντα τα *SnoJHE-1*, *-2*, *-3*. Δύο από τα προϊόντα αυτά, τα *SnoJHE-1* και *-2* με τον μηχανισμό IGL, πιθανώς να μεταγράφηκαν σε cDNA από μια ρετροτρανσποζάση. Στην συνέχεια, με ομόλογο ανασυνδυασμό επέστρεψαν στο γονιδίωμα, αλληλεπιδρώντας το *SnoJHE1* με το *JHEgV3*, δίνοντας γένεση στο *JHEg1* και το *SnoJHE2* με το *JHEgV4*, δίνοντας γένεση στο *JHEg2* (Εικ. 4.3).

Ανάλυση με ημιποσοτικό PCR έδειξε, πως το *SnoJHE1* εκφράζεται πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας και κατά έναν τρόπο σταθερό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί επειδή το *SnoJHE1* αποτελεί μεταγραφικό προϊόν τουλάχιστον τριών γονιδίων, των *JHEg1*, *JHEgV1* και *-2*.

Αντιθέτως, τα υπόλοιπα μεταγραφήματα φαίνεται να εκφράζονται σε μικρότερο βαθμό, παρ' όλο που το *SnoJHE2* αποτελεί και αυτό μεταγραφικό προϊόν τουλάχιστον τριών γονιδίων, των *JHEg2*, *JHEgV1* και *-2*. Σε αυτό μπορεί να οφείλεται η διαφορετική τοπολογία του *JHEg2* στο γονιδίωμα του *S. nonagrioides*.



**Εικόνα 4.3.** Πιθανός μηχανισμός εξέλιξης και δημιουργίας των JHE γονιδίων στο *S. nonagroides*.



Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως η διαφορά σε νουκλεοτιδικό επίπεδο μεταξύ των *JHEgV-1* και *-2* γονιδίων, εντοπίστηκε μόνο στα ιντρόνια του 3' άκρου τους. Τα ιντρόνια αυτά εμφανίζουν διάφορους διάσπαρτους πολυμορφισμούς, ενώ τα εξώνια της περιοχής αυτής παραμένουν σχεδόν ταυτόσημα. Στον γρύλο (*Gryllus assimilis*) (Zera et al., 1995), ένας πολυμορφισμός 19 bp στο δεύτερο ιντρόνιο του 3' άκρου του γονιδίου της JHE, είναι αρκετός για να αυξήσει την ενζυμική δραστηριότητα της JHE στους ιστούς των εντόμων. Πιθανώς στο *S. nonagrioides* η διαφορά αυτή των ιντρονίων του 3' άκρου των *JHEgV1* και *JHEgV2* γονιδίων, να συντηρεί αυτήν την ποικιλομορφία στην ενζυμική δραστηριότητα της JHE που παρατηρήθηκε στον *Gryllus assimilis*.

Όποια και να είναι η φύση και οι λόγοι αυτής της εξέλιξης, τα γονίδια της εστεράσης της ορμόνης νεότητας στο *S.nonagrioides* φαίνεται πως αποτελούν αξιόλογο παράδειγμα πρόσφατων εξελικτικών διαδικασιών, υπενθυμίζοντας μας την σημαντικότητα των JHEs, στην φυσιολογία και στην ανάπτυξη των εντόμων.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdel-Aal, Y.A.L, and Hammock, B.D. (1986) *Science* 233, 1073-1076.
2. A. J. Zera and C. Zhang (1995) Evolutionary Endocrinology of Juvenile Hormone Esterase in *Gryllus Assimilis*: Direct and Correlated Responses to Selection. *Genetics*. 141(3): 1125–1134.
3. Anjang Tan, Hiromasa Tanaka, Toshiki Tamura, and Takahiro Shiotsuki (2005). Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase. *PNAS*. 16,(102),no.33, 11751-11756.
4. Campbell P.M; Oakeshott J.G; Healy M.J. (1998) Purification and kinetic characterisation of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect biochemistry and molecular biology*; 28(7):501-15.
5. C. Esnault, J. Maestre, T. Heidmann. (2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genet*. 24, 363.
6. Coulombe-Huntington J, Majewski J. (2007). Characterization of intron loss events in mammals. *Genome Res*. 17:23–32.
7. Damodar, R.K., Srinivasa C.P., Zheng,S., Qi-Li Feng, Krell,P., Retnakaran,A.,Palli, S.R. (2004). Identification and Characterization of a Juvenile Hormone (JH) Response Region in the JH Esterase Gene from the Spruce Budworm,*Choristoneura fumiferana*.*The Journal of Biological Chemistry*. 19:19634-19642.
8. Derr LK, Strathern JN, Garfinkel DJ. (1991). RNA-mediated recombination in *S. cerevisiae*. *Cell*. 67: 355–364.
9. de Souza, S.J. (2003) The emergence of a synthetic theory of intron evolution. *Genetica* 118, 117–121.
- 10.E.J. Crone, A.J. Zera, A. Anand, J.G. Oakeshott, T.D. Sutherland, R.J. Russell, L.G. Harshman, F.G. Hoffmann and C. Claudianos. (2007) JHE in *Gryllus assimilis*: Cloning, sequence-activity associations and phylogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37 (12), 1359-1365.
- 11.Fischer,M. The Lipase Engineering Database-a navigation and analysis tool for protein families.  
[http://elib.unistuttgart.de/opus/volltexte/2006/2678/pdf/Fischer\\_2003.pdf](http://elib.unistuttgart.de/opus/volltexte/2006/2678/pdf/Fischer_2003.pdf).

12. Gauhar, Z., Ghanim, M., Herreman, T., Lambert, J.D., Li, T.R., Mason, C., Rifkin, S., Sun, L., White, K.P., Costello, J.C., Andrews, J.R. (2008). *Drosophila melanogaster* life-cycle gene expression dataset and microarray normalisation protocols.
13. Hartfelder, K. (2000) Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian journal of Medical and Biological Research* 33: 157-177.
14. Hua Bai, Parthasarathy Ramaseshadri, and Subba Reddy Palli (2007). Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 37(8):829-837.
15. Logsdon, J.M. (1998) The recent origins of spliceosomal introns revisited. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 637–648.
16. Logsdon JM Jr, Stoltzfus A, Doolittle WF. (1998). Molecular evolution: Recent cases of spliceosomal intron gain? *Curr Biol.* 8:R560–R563.
17. Lynch, M. and Richardson, A.O. (2002) The evolution of spliceosomal introns. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 701–710.
18. Madasamy Shanmugavelu, Apollo R. Baytan, Jonathan D. Chesnut, and Bryony C. Bonning (2000). A novel protein that binds juvenile hormone esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. *The journal of biological chemistry*, 275 (3), 1802-1806.
19. P.J. Gullan and P.S. Cranston (2005). *The Insects, An Outline of Entomology*. Third edition. Blackwell Publishing Ltd.
20. Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, et al. (19 co-authors). (2007) Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science.* 317: 86–94.
21. Rogozin IB, Sverdlov AV, Babenko VN, Koonin EV. (2005). Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. *Brief Bioinform.* 6: 118–134.
22. Roy SW, Penny D. (2006). Smoke without fire: most reported cases of intron gain in nematodes instead reflect intron losses. *Mol Biol Evol.* 23: 2259–2262.

23. Terry N. Hanzlik and Bruce D. Hammock (1987). Characterization of Affinity-purified Juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni*. The journal of biological chemistry, 28, 13584-13591.
24. Terry N. Hanzlik, Yehia A.I. Abdel-Aal, Lawrence G. Harshman, and Bruce D. Hammock (1989). Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. The journal of biological chemistry, 264 (21), 12419-12425.
25. Yoshihama M, Nguyen HD, Kenmochi N. (2007). Intron dynamics in ribosomal protein genes. PLoS ONE. 2:e141.
26. Wogulis, M., Wheelock, C.E., Kamita, S.G., Hinton, A.C., Whetstone, P.A., Hammock, B.D., Wilson, D.K. (2006). Structural Studies of a Potent Insect Maturation Inhibitor Bound to the Juvenile Hormone Esterase of *Manduca sexta*. Biochemistry, 13: 4045-4057.
27. Κοντογιαννάτος, Δ. (2008). Απομόνωση και χαρακτηρισμός του cDNA του γονιδίου της εστεράσης της ορμόνης νεότητας, (JHE) από το έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ την Καθηγήτριά μου κ<sup>α</sup> Κούρτη Άννα και τον Καθηγητή κ<sup>ο</sup> Χατζόπουλο Πολυδεύκη, τους υποψήφιους διδάκτορες του τμήματος, Θεόδωρο Γκουβίτσα, Γεράσιμο Δάρα και Θεώνη Μαργαριτοπούλου.

Ευχαριστώ επίσης, τους Φώτη Γαζή και Χρήστο Μιχαηλίδη, τον Παντελή, την Ξένια, τον Ντικράν και τον Κώστα καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κάθε ένα από τα οποία συνεισέφερε με τον δικό του τρόπο ξεχωριστά στην ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

