



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Κατανομή, έκφραση και μοριακή εξέλιξη των αγκυρινών στο συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia*



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΣΙΩΖΙΟΣ

Αγρίνιο 2009

Στους γονείς μου...

*“Το να διδάσκεις είναι να δείχνεις αυτό που είναι δυνατό.
Το να μαθαίνεις είναι να το κάνεις δυνατό για τον εαυτό σου.”*

Paulo Coelho

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπούρτζης Κωνσταντίνος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
------------------------	--

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπούρτζης Κωνσταντίνος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
------------------------	--

Ματθόπουλος Δημήτριος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
-----------------------	--

Μίντζας Αναστάσιος	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
--------------------	---

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπούρτζης Κωνσταντίνος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
------------------------	--

Ζαχαροπούλου Αντιγόνη	Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
-----------------------	--

Ματθόπουλος Δημήτριος	Καθηγητής, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
-----------------------	--

Μίντζας Αναστάσιος	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
--------------------	---

Κίλιας Γεώργιος	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
-----------------	---

Βλαστός Δημήτριος	Λέκτορας, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
-------------------	---

Τσιάμης Γεώργιος	Λέκτορας, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
------------------	---

Μίλτο και τον Μιχαήλ. Μαζί τους έχω μοιραστεί τις πιο δυνατές στιγμές αυτού του διδακτορικού και ο καθένας τους με έχει στηρίξει με τον δικό του τρόπο. Ακόμη και αν έχω ξεχάσει να αναφέρω κάποιους σε αυτή τη λίστα, όλοι τους έχουν μια ξεχωριστεί θέση στην καρδιά μου και αισθάνομαι πολύ τυχερός που βρίσκονται δίπλα μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που έχουν περάσει από το εργαστήριο για την άψογη συνεργασία που είχαμε αλλά και για την συμβολή τους στην δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος μέσα στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ και την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου οι οποίοι αποτέλεσαν τους στυλοβάτες όλης αυτής της προσπάθειας. Τους ευχαριστώ για την συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η αφιέρωση του καρπού αυτής της πολύχρονης προσπάθειας είναι το ελάχιστο που μπορώ να κάνω. Φυσικά δεν θα μπορούσα να ξεχάσω και τις αδερφές μου Λυδία και Ελένη. Τις ευχαριστώ για την κατανόηση και την υποστήριξη τους.

Δεκέμβριος 2009

Στέφανος Σιώζιος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ, **1**

THESIS SUMMARY, **4**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – Εισαγωγή, **7**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – Μελέτη της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης σε διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia*, **67**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας - Φυλογενετική και εξελικτική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης, **95**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης, **151**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – Γενική συζήτηση – συμπεράσματα, **181**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ, **193**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Ενδοσυμβιωτική θεωρία.	9
Εικόνα 1.2. Εξελικτικές πορίες συμβιωτικών μικροοργανισμών στα έντομα (Dale & Moran. 2006).	11
Εικόνα 1.3. Η φυλογένεια της <i>Wolbachia</i> . Το σχήμα παρουσιάζει ένα άρριζο φυλογενετικό δένδρο των υπερομάδων της <i>Wolbachia</i> . Από το δένδρο λείπει η υπερομάδα G καθώς η εγκυρότητά της έχει αμφισβητηθεί.	14
Εικόνα 1.4. Μονόδρομη (Α) και αμφίδρομη (Β) κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.	18
Εικόνα 1.5. Τα στάδια τις πρώτης εμβρυικής μιτωτικής διαίρεσης: σε μια φυσιολογική διασταύρωση μη μολυσμένων ατόμων, σε μια ασύμβατη διασταύρωση και σε μια διασταύρωση όπου και τα δύο άτομα είναι μολυσμένα με το ίδιο στέλεχος <i>Wolbachia</i> . Στην ασύμβατη διασταύρωση, η συμπύκνωση και αποσυμπύκνωση των πατρικών χρωμοσωμάτων (μπλε) αποτυγχάνει να συγχρονιστεί με αυτή των μητρικών (ροζ). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον μη σωστό διαχωρισμό των πατρικών χρωμοσωμάτων στο στάδιο της ανάφασης. Όταν το έμβρυο είναι μολυσμένο επίσης με το ίδιο στέλεχος <i>Wolbachia</i> , ο συγχρονισμός μεταξύ των δύο προπυρήνων αποκαθίσταται (Werren et al. 2008).	19
Εικόνα 1.6. Εικόνα πολυταινικού χρωμοσώματος της <i>Drosophila ananassae</i> (κόκκινο) το οποίο έχει υβριδοποιηθεί με έναν ιχνηθέτη που αναγνωρίζει μια γενετική περιοχή του γονιδιώματος της <i>Wolbachia</i> (πράσινο). (Hotopp et al. 2007).	24
Εικόνα 1.7. (Α) Τρισδιάστατη απεικόνιση πρωτεΐνης με 4 επαναλήψεις αγκυρίνης, όπου διακρίνεται η διάταξη των α-ελίκων (κύλινδροι) και των β-πτυχώσεων (βέλη). (Β) Παράδειγμα συναινετικής αλληλουχίας της επανάληψης αγκυρίνης όπου παρουσιάζονται τα πιο συντηρημένα κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή των επαναλήψεων (Sedgwick & Smerdon 1999).	37
Εικόνα 2.1. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων <i>Drosophila-Wolbachia</i> σύμφωνα με τη μέθοδο MLST (Paraskevopoulos et al. 2006). Με το γκρίζο πλαίσιο αναπαριστανται οι σχέσεις στις οποίες εστιάστηκε η παρούσα διατριβή.	70
Εικόνα 2.2. Κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης στο στέλεχος wMel.	77
Εικόνα 2.3. Ανίχνευση με τη μέθοδο PCR των γονιδίων αγκυρίνης, WD0292 (Α), WD0514 (Β), WD0498 (Γ) και WD0766 (Δ) στις 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις <i>Drosophila-Wolbachia</i> που μελετήθηκαν. Τα σχήματα δεξιά των εικόνων, παρουσιάζουν τη κατεύθυνση 5'-3' των γονιδίων, τη θέση υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2.2) καθώς και το μέγεθος του προϊόντος στο στέλεχος αναφοράς wMel. 1: wMel, 2: wMelPopcorn, 3: wAu, 4: wTei, 5: wYak, 6: wSan, 7: wRi, 8: wHa, 9: wNo, 10: wMa, 11: wMau, 12: αρνητικός μάρτυρας.	78
Εικόνα 2.4. Ανίχνευση με τη μέθοδο της αποτύπωσης κατά Southern των γονιδίων αγκυρίνης WD0441 (Α) και WD0294 (Β). Κάθε μεμβράνη υβριδοποιήθηκε ταυτόχρονα με δύο ιχνηθέτες, έναν ιχνηθέτη για το γονίδιο αγκυρίνης και έναν ιχνηθέτη για το γονίδιο <i>fisZ</i> που αποτέλεσε τον μάρτυρα για την ύπαρξη <i>Wolbachia</i> DNA. 1: wMel, 2: wMelPopcorn, 3: wAu, 4: wTei, 5: wYak, 6: wSan, 7: wRi, 8: wHa, 9: wNo, 10: wMa, 11: wMau.	79
Εικόνα 2.5. Η κατανομή των 23 γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wMel μεταξύ διαφορετικών στελεχών <i>Wolbachia</i> με βάση της PCR και Southern αναλύσεις της παρούσας μελέτης. Το δενδρόγραμμα, αναπαριστά τις φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών, και ανακατασκευάστηκε βάσει των αποτελεσμάτων της MLST ανάλυσης (Baldo et al. 2006; Paraskevopoulos et al. 2006). Τα γονίδια αγκυρίνης των δύο προφάγων WO-A και WO-B φαίνονται με το κίτρινο και το πράσινο χρώμα αντίστοιχα. Η κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης των στελεχών wUni, wPip και wBm βασίζεται στη δημοσιευμένη αλληλουχία (ολική για το wPip και wBm ή μερική για το wUni) των γονιδιωμάτων τους (Klasson et al. 2008; Klasson et al. 2009; Foster et al. 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή των γονιδίων στο στέλεχος wRi επιβεβαιώθηκε και με την πρόσφατη δημοσίευση του γονιδιώματος (Klasson et al. 2009).	84
Εικόνα 3.1. Προσδιορισμός της αμφίκλωνης συναινετικής αλληλουχίας (consensus sequence) για το ομόλογο του γονιδίου WD0566 του στελέχους wTei.	100
Εικόνα 3.2. Παράδειγμα ευθυγράμμισης του γονιδίου αγκυρίνης WD0498 σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μετατροπής της στην αντίστοιχη ευθυγράμμιση σε νουκλεοτιδικό επίπεδο.	103

- Εικόνα 3.3.** Γραφική αναπαράσταση των παραμέτρων της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγος βάσεων (π) και εκτιμώμενης νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά νουκλεοτιδική θέση (θ). 109
- Εικόνα 3.4.** Γραφική αναπαράσταση του λόγου των μη συνώνυμων προς το ρυθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων (K_a / K_s). Οι μπλε μπάρες αναπαριστούν τα γονίδια αγκυρίνης των οποίων ο λόγος είναι >1 υποδηλώνοντας ότι τα γονίδια αυτά βρίσκονται υπό θετική επιλογή. Οι κόκκινες μπάρες αναπαριστούν τα γονίδια των οποίων ο λόγος είναι >1 υποδηλώνοντας αφαιρετική επιλογή. 111
- Εικόνα 3.5.** Παράδειγμα διακοπή του αναγνωστικού πλαισίου (ORF) λόγω ένθεσης ενός νουκλεοτιδίου γουανίνης στο ομόλογο γονίδιο WD0636 στο στέλεχος wAu. 113
- Εικόνα 3.6.** Τα ομόλογα του γονιδίου WD0766 στα δύο συγγενικά στελέχη wYak και wSan έχουν γίνει στόχος ένθεσης ενός μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου (A). Τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τις τρανποζάσες παρουσιάζονται με τα μωβ βέλη. Τα δύο μικρότερα πορτοκαλί βέλη αντιπροσωπεύουν τις δύο αντίστροφες επαναληπτικές ακολουθίες που οριοθετούν το μεταθέσιμο στοιχείο. Το κόκκινο αστέρι συμβολίζει την έλλειψη ενός νουκλεοτιδίου. Για σύγκριση παρατίθεται η ακολουθία του ομόλογου γονιδίου στο επίσης συγγενικό στέλεχος wTei το οποίο, με εξαίρεση την περιοχή ένθεσης, παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τα προηγούμενα (B). 113
- Εικόνα 3.7.** Φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών τις *Wolbachia* με βάση τα χρωμοσωμικά γονίδια WD0035, WD0073, WD0147, WD0191, WD0385, WD0438, WD0441, WD0498, WD0550, WD0754, WD0766 και WD1213 σύμφωνα με τη μέθοδο ML. Στα φυλογενετικά δέντρα παρουσιάζονται και οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας που προέκυψαν από 100 επαναληπτικές δοκιμές (οι τιμές που ήταν μικρότερες από 50% παραλήφθηκαν). 115
- Εικόνα 3.8.** Φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών *Wolbachia* με βάση τα προφαρικά γονίδια WD0291, WD0292, WD0566, WD0596, WD0633, WD0636 και WD0637 σύμφωνα με τη μέθοδο ML. Στα φυλογενετικά δέντρα παρουσιάζονται και οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας που προέκυψαν από 100 επαναληπτικές δοκιμές (οι τιμές που ήταν μικρότερες από 50% παραλήφθηκαν). 117
- Εικόνα 3.9.** Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου WD0294. Για οικονομία χώρου παρουσιάζονται μόνο οι συστοιχίες των επαναλήψεων. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις ενώ με τα βέλη διπλής κατεύθυνσης αναπαρίστανται ένα γεγονός διπλασιασμού. 120
- Εικόνα 3.10.** Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου WD0385. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης (κόκκινα βέλη). Στο 3' άκρο του γονιδίου διακρίνεται το τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί για τις διαμεμβρανικές περιοχές και το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική ομολογία μεταξύ των στελεχών. 121
- Εικόνα 3.11.** Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου WD0438. Με τις στικτές γραμμές αντιστοιχούνται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις σε επίπεδο γονιδίου ενώ με τα βέλη διπλής κατεύθυνσης αναπαρίστανται τα γεγονότα διπλασιασμού. 122
- Εικόνα 3.12.** Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου WD0514. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις. 122
- Εικόνα 3.13.** Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου WD0550. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις. 123
- Εικόνα 3.14.** Γραφική αναπαράσταση της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγος βάσεων (π), κατά μήκος των ομόλογων του γονιδίου WD0550 στα στελέχη wMel, wRi, και wUni, βάση της μεθόδου του ολισθαίνοντος παραθύρου. Το 3' άκρο του γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για τις διαμεμβρανικές περιοχές, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των στελεχών σε αντίθεση με το τμήμα του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί για τις επαναλήψεις αγκυρίνης. (Μέγεθος παραθύρου: 50 nt, βήμα: 5nt, από τις στοιχισμένες ακολουθίες τα κενά παραλήφθηκαν). 123
- Εικόνα 3.15.** Α) Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομόλογων του γονιδίου WD0766. Για οικονομία χώρου παρουσιάζονται μόνο οι συστοιχίες των επαναλήψεων. Επίσης παρουσιάζεται και η ανακατασκευασμένη ακολουθία των στελεχών wYak και wSan. Με τις στικτές γραμμές αντιστοιχούνται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις σε επίπεδο γονιδίου ενώ με τα βέλη διπλής κατεύθυνσης αναπαρίστανται τα γεγονότα διπλασιασμού. Β) Νουκλεοτιδικές ομοιότητες και διαφορές της δεύτερης επανάληψης αγκυρίνης στο στέλεχος wMel που αποδεικνύει την χιμαιρική του προέλευση. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση του βρόγχου μεταξύ των δύο α-ελίκων στη δομή της επανάληψης αγκυρίνης. 125

- Εικόνα 3.16.** Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο *WD0073*. Α) Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας με τη μέθοδο *bootstrap* (1000 επαναλήψεις) οι οποίες υπολογίστηκαν για ένα μετακινούμενο παράθυρο 200 bp με βήμα 10 bp κατά μήκος των στοιχισμένων ακολουθιών των ομολόγων γονιδίων. Για κάθε παράθυρο, οι γενετικές αποστάσεις και οι φυλογενετικές σχέσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο *Neighbor joining*. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται το όριο αξιοπιστίας 70% ενώ η εικόνα πάνω από το διάγραμμα δείχνει τη θέση των επαναλήψεων αγκυρίνης. Β, Γ) Φυλογενετικές σχέσεις των εμπλεκόμενων στελεχών που προκύπτουν με βάση το ανασυνδυασμένο τμήμα (Β) και με βάση το υπόλοιπο τμήμα του γονιδίου (Γ) όπου φαίνεται ξεκάθαρα η αλλαγή της ομαδοποίησης του στελέχους (*wUni*) που φέρει την ανασυνδυασμένη ακολουθία. 127
- Εικόνα 3.17.** Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο *WD0438*. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του προγράμματος *MaxChi* για την πρώτη και σημαντικότερη περίπτωση γενετικού ανασυνδυασμού στην ακολουθία του στελέχους *wRi* όπου φαίνονται καθαρά τα δύο στατιστικά σημαντικά σημεία διακοπής (*break points*) που οριοθετούν το ανασυνδυασμένο τμήμα της ακολουθίας. 128
- Εικόνα 3.18.** Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο *WD0550*. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του προγράμματος *RPD* και παρουσιάζουν την ομοιότητα ανά ζεύγος η οποία υπολογίστηκε για ένα μετακινούμενο παράθυρο 30 bp κατά μήκος των ευθυγραμμισμένων ακολουθιών που εμπλέκονται στο φαινόμενο. 129
- Εικόνα 3.19.** Ανασυνδυασμός στο φαγικό γονίδιο *WD0633*. Α) Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας με τη μέθοδο *bootstrap* (1000 επαναλήψεις) οι οποίες υπολογίστηκαν για ένα ολισθαίνον παράθυρο 200 bp με βήμα 10 bp κατά μήκος των στοιχισμένων ακολουθιών των ομολόγων γονιδίων. Για κάθε παράθυρο, οι γενετικές αποστάσεις και οι φυλογενετικές σχέσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο *Neighbor joining*. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται το όριο αξιοπιστίας 70% ενώ η εικόνα πάνω από το διάγραμμα δείχνει τη θέση των επαναλήψεων αγκυρίνης. Β, Γ) Φυλογενετικές σχέσεις των εμπλεκόμενων στελεχών που προκύπτουν από την περιοχή πριν (Β) και μετά το ρήγμα (Γ) όπου φαίνεται ξεκάθαρα η αλλαγή της ομαδοποίησης του στελέχους (*wAu*) που φέρει την ανασυνδυασμένη ακολουθία. 130
- Εικόνα 3.20.** Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο *WD0766*. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του προγράμματος *MaxChi* για την πρώτη και σημαντικότερη περίπτωση γενετικού ανασυνδυασμού στις ακολουθίες των στελεχών *wYak* και *wSan* όπου φαίνονται καθαρά τα δύο στατιστικά σημαντικά σημεία ρηγμάτων (*breakpoints*). 131
- Εικόνα 3.21.** Τοπικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της νουκλεοτιδικής ποικιλοτήτας κατά μήκος του γονιδίου *WD0441*. Η ανάλυση της γενετικής απόστασης με τη μέθοδο του ολισθαίνοντος παραθύρου, μεταξύ στελεχών της *Wolbachia* που ανήκουν στις υπερομάδες Α και Β, φανερώνει τη μεγαλύτερη ομοιότητα που παρουσιάζουν στο 3' άκρο του γονιδίου. 138
- Εικόνα 3.22.** Μοντέλο επίδρασης του παράτυπου ανασυνδυασμού στην εξέλιξη των μοτίβων αγκυρίνης. Τα διαφορετικού χρώματος διαγραμμισμένα ορθογώνια πλαίσια αναπαριστούν διαφορετικά μοτίβα αγκυρίνης. Τα μαύρα ορθογώνια πλαίσια στο εσωτερικό τους αναπαριστούν πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις (DRs). Όταν τα DRs βρίσκονται στα όρια των μοτίβων αγκυρίνης μπορούν να οδηγήσουν σε διπλασιασμό ή έλλειμμα μοτίβων ανάλογα με το εάν η ολισθαίνουσα αλυσίδα DNA είναι η νεοσυντεθείσα ή το εκμαγείο (Α). Όταν τα DRs είναι εσωτερικά τότε μπορούν να δημιουργηθούν χιμαιρικά μοτίβα αγκυρίνης (Β). 139
- Εικόνα 4.1.** Αντιδράσεις ελέγχου της ποιότητας του cDNA στα στελέχη *wSan* (Α), *wAu* (Β) και *wNo* (Γ). Το RT- υποδηλώνει την απουσία της αντίστροφης μεταγραφάσης από την αντίδραση σύνθεσης του cDNA. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, Ο: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, ο/η: έμβρυα 16 ωρών, και gDNA: γενομικό DNA. 159
- Εικόνα 4.2.** Μεταγραφή του 3' άκρου του ομολόγου γονιδίου *WD0385* στο στέλεχος *wAu*. Η θέση του μεταθέσιμου στοιχείου καθώς και η περιοχή ενίσχυσης των εκκινητών φαίνεται στη γραφική απεικόνιση του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, Ο: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, ο/η: έμβρυα 16 ωρών, και gDNA: γενομικό DNA. 162
- Εικόνα 4.3.** RT-PCR ανάλυση της έκφρασης του ομολόγου γονιδίου *WD0766* στα συγγενικά στελέχη *wTei*, *wYak* και *wSan*. Α) Αποτελέσματα εμφωλιασμένης (*nested*) PCR όπου φαίνεται η απουσία έκφρασης στους αναπαραγωγικούς ιστούς των στελεχών *wYak* και *wSan*. Β) Γραφική απεικόνιση του γονιδίου στα στελέχη *wYak* και *wSan* όπου διακρίνεται η περιοχή ένθεσης του μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου καθώς και η περιοχή ενίσχυσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, Ο: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, ο/η: έμβρυα 16 ωρών, και gDNA: γενομικό DNA. 164

Εικόνα 4.4. Γραφική αναπαράσταση του ομολόγου γονιδίου *WD0766* στα στελέχη *wYak* και *wSan* (Α) και του ομολόγου γονιδίου *WD0385* στο στέλεχος *wAu* (Β), τα οποία έχουν υποστεί ρήξη λόγω ένθεσης μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων. Με τα μπλε βέλη αναπαρίστανται τα γονίδια των τρανσποζασών ενώ με τα πορτοκαλί βέλη οι αντίστροφες επαναληπτικές ακολουθίες. Τα κόκκινα βέλη αναπαριστούν τη θέση και την κατεύθυνση πιθανών υποκινητών της μεταγραφής (πλαίσιο του Pribnow).

174

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1.	Προγράμματα αποκωδικοποίησης γονιδιωμάτων της <i>Wolbachia</i> .	28
Πίνακας 1.2.	Πρωτεΐνες με επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης.	38
Πίνακας 1.3.	Ο αριθμός των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών στελεχών <i>Wolbachia</i> .	39
Πίνακας 2.1.	Οι έντεκα συμβιωτικές σχέσεις <i>Drosophila-Wolbachia</i> που μελετήθηκαν.	73
Πίνακας 2.2.	Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των 23 γονιδίων αγκυρίνης.	75
Πίνακας 2.3.	Αποτελέσματα της συνδυασμένης μελέτης της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης με τις μεθόδους PCR και ανάλυσης κατά Southern σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις <i>Drosophila-Wolbachia</i> .	80
Πίνακας 2.4.	Η πυκνότητα των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών οργανισμών.	82
Πίνακας 3.1.	Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης.	101
Πίνακας 3.2.	Τα γενετικά χαρακτηριστικά των γονιδίων αγκυρίνης της <i>Wolbachia</i> .	108
Πίνακας 3.3.	Μεγάλες δομικές αλλαγές στα γονίδια αγκυρίνης της <i>Wolbachia</i> .	112
Πίνακας 3.4.	Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμής Shimodaira-Hasegawa για τη σημαντικότητα των τοπολογικών διαφορών μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων που προκύπτουν από τα γονίδια αγκυρίνης του προφάγου WO-B και του χρωμοσώματος της <i>Wolbachia</i> .	118
Πίνακας 3.5.	Αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμής Shimodaira-Hasegawa για τη σημαντικότητα των τοπολογικών διαφορών μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων των γονιδίων αγκυρίνης που συσχετίζονται με τον προφάγο WO-B.	119
Πίνακας 3.6.	Πιθανά γεγονότα γενετικού ανασυνδυασμού στο γονίδιο WD0438.	128
Πίνακας 3.7.	Πιθανά γεγονότα γενετικού ανασυνδυασμού στο γονίδιο WD0766.	131
Πίνακας 3.8.	Πυκνότητα των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων κοινής κατεύθυνσης (DRs) που είναι μεγαλύτερες από 8 νουκλεοτίδια κατά μήκος των γονιδίων αγκυρίνης. Με τη σκιαγράφηση παρουσιάζονται τα γονίδια αγκυρίνης τα οποία εμφανίζουν πολυμορφισμό σε επίπεδο αριθμού επαναλήψεων αγκυρίνης.	
Πίνακας 4.1.	Οι 11 συμβιωτικές σχέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης.	154
Πίνακας 4.2.	Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης.	157
Πίνακας 4.3.	Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση <i>D. melanogaster</i> (wMel), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.	160
Πίνακας 4.4.	Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση <i>D. melanogaster</i> (wMelPopcorn), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.	161
Πίνακας 4.5.	Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση <i>D. melanogaster</i> (wMel), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης ενώ με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.	163
Πίνακας 4.6.	Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στις συμβιωτικές σχέσεις <i>D. teissieri</i> (wTei), <i>D. yakuba</i> (wYak) και <i>D. santomea</i> (wSan) όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου, με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR, ενώ με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται οι περιπτώσεις όπου τα επίπεδα έκφρασης είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.	165

- Πίνακας 4.7.** Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wRi), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης ενώ με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων. 166
- Πίνακας 4.8.** Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wHa), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων. 167
- Πίνακας 4.9.** Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wNo), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων. 168
- Πίνακας 4.10.** Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. mauritiana* (wMai), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων. 169
- Πίνακας 4.11.** Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wMa), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων. 170

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η *Wolbachia* (α-πρωτεοβακτήρια, Rickettsiales) είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομούμενο βακτήριο που απαντά σε πολλά είδη αρθροπόδων και νηματωδών. Εκτιμάται ότι το 65% των εντόμων (περίπου 10^6 είδη) είναι μολυσμένα με *Wolbachia* καθιστώντας την το πιο ευρέως διαδεδομένο συμβιωτικό βακτήριο που υπάρχει. Η *Wolbachia* επιδρά στις αναπαραγωγικές λειτουργίες των ξενιστών της με πολλούς και απρόσμενους τρόπους προκειμένου να εξασφαλίσει τη μητρική μεταβίβασή της. Συγκεκριμένα, η *Wolbachia* επάγει θηλυκοποίηση, παρθενογένεση, θανάτωση αρσενικών ατόμων και συνηθέστερα κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (ΚΑ). Η ΚΑ αποτελεί ένα είδος εμβρυικής θνησιμότητας η οποία στην πιο απλή της μορφή προκύπτει όταν μολυσμένα αρσενικά άτομα γονιμοποιούν μη μολυσμένα θηλυκά. Η ΚΑ παρέχει ένα αναπαραγωγικό πλεονέκτημα στα μολυσμένα άτομα με αποτέλεσμα την εξάπλωση του βακτηρίου σε έναν πληθυσμό. Λόγω της ευρείας διάδοσης και των ιδιοτήτων της πιστεύεται ότι η *Wolbachia* έχει παίξει καταλυτικό ρόλο: (α) στην οικολογία των εντόμων, διευρύνοντας τους οικολογικούς θώκους, και (β) στην εξέλιξη, συμβάλλοντας στην αύξηση της βιοποικιλότητας, της πιο πολυπληθούς, σε αριθμό ειδών, ομάδας του ζωικού βασιλείου, των εντόμων. Επίσης, η *Wolbachia* και η *Wolbachia*-επαγόμενη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα έχουν προταθεί, και πρόσφατα χρησιμοποιηθεί, ως ένα φιλικό προς το περιβάλλον εργαλείο πληθυσμιακού ελέγχου επιβλαβών ειδών χωρίς τη χρήση χημικών ουσιών.

Παρόλο όμως το όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον, οι σύνθετες τροφικές ανάγκες της *Wolbachia*, οι οποίες υπαγορεύονται από τη συμβιωτική φύση της, έχουν παρεμποδίσει τη μελέτη του βακτηρίου με τα κλασικά εργαλεία της βακτηριακής γενετικής. Ωστόσο, η πρόσφατη αλληλούχιση του πρώτου γονιδιώματος της *Wolbachia* (στέλεχος wMel) αποκαλύπτει νέα στοιχεία για τη βιολογία του βακτηρίου και τους μοριακούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης με τους ξενιστές του. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα του wMel περιέχει έναν ασυνήθιστα μεγάλο αριθμό γονιδίων (23) τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μοτίβα αγκυρινών (ankyrin domains). Τα μοτίβα των αγκυρινών βρίσκονται κυρίως σε ευκαρυωτικές και ιικές πρωτεΐνες και είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και απαντούν σε κυτταροσκελετικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες, μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστές της μεταγραφής, αναστολείς καθώς και τοξίνες. Ο αριθμός αυτός των γονιδίων είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακός αν αναλογιστούμε ότι τα βακτήρια κωδικοποιούν ελάχιστες πρωτεΐνες με μοτίβα αγκυρινών.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, και αναλογιζόμενοι τη σημαντικότητα των αγκυρινών και τον ιδιαίτερα εντυπωσιακό τους αριθμό στη *Wolbachia*, πραγματοποιήθηκε μια συγκρι-

τική μελέτη προκειμένου να εξετασθεί: α) η κατανομή των 23 αγκυρινών, που αρχικά εντοπίστηκαν στο στέλεχος wMel, σε 11 διαφορετικές, φαινοτυπικά και εξελικτικά, συμβιωτικές σχέσεις *Wolbachia-Drosophila*, (β) η γενετική ποικιλομορφία καθώς και οι φυλογενετικές και εξελικτικές σχέσεις των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* και (γ) η έκφραση των γονιδίων αυτών σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και ιστούς του ξενιστή και για τις 11 συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*.

Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από τη μελέτη της κατανομής, υποστηρίζουν την άποψη ότι τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* αποτελούν μια εξαιρετικά πολυπληθή και δυναμική ομάδα γονιδίων, ενώ φαίνεται ότι τα προφαγικά στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση των γονιδίων αυτών. Η ύπαρξη των γονιδίων αυτών πιθανόν σχετίζεται με τον ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής της *Wolbachia* καθώς και τις ιδιαίτερες συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσει το βακτήριο αυτό με τους ξενιστές του. Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας εργασίας είναι ότι ορισμένα από τα γονίδια αγκυρίνης (WD0035, WD0191, WD0438, WD0441, WD0498, WD0636, WD0637, WD0766 και WD1213) ανιχνεύονται σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* που μελετήθηκαν (υπερομάδες A και B). Η παρουσία των γονιδίων αυτών σε φαινοτυπικά και εξελικτικά απομακρυσμένα στελέχη *Wolbachia* πιθανόν σχετίζεται με τη συμμετοχή τους στους μηχανισμούς που υπαγορεύουν τον ενδοκυτταρικό τρόπο διαβίωσης και την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων με τον εκάστοτε ξενιστή.

Επίσης, στα πλαίσια τις παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε η πρώτη εκτεταμένη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και της εξέλιξης των γονιδίων αγκυρίνης που απαντούν σε διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*. Η διαλεύκανση των μηχανισμών οι οποίοι υπαγορεύουν την εξέλιξη της οικογένειας των γονιδίων αγκυρίνης στο βακτήριο της *Wolbachia* είναι πολύ σημαντική και αποτελεί το πρώτο βήμα για την κατανόηση του ρόλου των αγκυρινών αφενός στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων της *Wolbachia* με τους ξενιστές και αφετέρου στην επαγωγή των αναπαραγωγικών ανωμαλιών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φανερώνουν ότι οι αγκυρίνες της *Wolbachia* αποτελούν μια από τις πλέον δυναμικές και ευμετάβλητες ομάδες γονιδίων του βακτηρίου. Ο γενετικός ανασυνδυασμός, είτε με την μορφή του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination) είτε με την μορφή του παράτυπου-μη ομόλογου ανασυνδυασμού (illegitimate recombination), αποτελεί ένα βασικό μηχανισμό στη δημιουργία της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας και της εξέλιξης των γονιδίων αυτών. Επίσης, η ύπαρξη ενός μεγάλου ποσοστού προφαγικών και μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων στο γονιδίωμα της *Wolbachia* φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξάπλωση και τη διαμόρφωση της ομάδας αυτής των γονιδίων.

Τέλος, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο για την κατανόηση της λειτουργίας τους καθώς και του πιθανού τους ρόλου στην επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Η μελέτη της έκφρασης των wMel ομόλογων αγκυρινών πραγματοποιήθηκε μέσω RT-PCR ή/και nested RT-PCR σε πρώιμα και τελικά εμβρυικά στάδια, ωοθήκες και όρχεις καθώς επίσης και σε ενήλικα άτομα (θηλυκά και αρσενικά). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Οι διαφορές αυτές εξαρτώνται από τη συμβιωτική σχέση καθώς και από τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο που εξετάζεται. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φυλοειδικές διαφορές γιατί ίσως να συνδέονται με τους μηχανισμούς επαγωγής των αναπαραγωγικών φαινοτύπων, όπως αυτός της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Ωστόσο, ένας άμεσος συσχετισμός της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης με τους φαινοτύπους της *Wolbachia* δεν κατέστη δυνατός στην παρούσα μελέτη πιθανά λόγω της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει την επαγωγή των φαινοτύπων αυτών. Επίσης, ένα σημαντικό εύρημα ήταν και το γεγονός ότι τα εκφυλισμένα γονίδια αγκυρίνης μεταγράφονται. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό δεν είναι ακόμα κατανοητός, αλλά δίνει νέες προεκτάσεις στον πιθανό λειτουργικό ρόλο παρόμοιων γονιδίων. Η αποσαφήνιση του ρόλου της οικογένειας αυτής των γονιδίων θα δώσει νέα στοιχεία και θα βοηθήσει στην κατανόηση της βιολογίας και της οικολογίας ενός από τους πιο διαδεδομένους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς στη φύση.

THESIS SUMMARY

Wolbachia (α -proteobacteria, Rickettsiales) comprise a group of intracellular and maternally inherited bacteria, known to infect many species of arthropods and nematodes. Recent studies estimate that >65% of insect species (about 10^6 different insect species) are infected with *Wolbachia* making it one of the most abundant symbionts in nature. *Wolbachia* manipulates host reproduction in many different and unusual ways in order to insure its maternal transmission. The most common effects of *Wolbachia* infection includes: feminization of genetic males, thekytokous parthenogenesis, male killing and cytoplasmic incompatibility (CI) which is the most widespread and, perhaps, the most prominent feature that *Wolbachia* impose on their hosts. CI results in embryonic mortality in mating between infected males with females having different *Wolbachia* infection status. The unique biology of *Wolbachia* together with its pandemic distribution has attracted considerable interest for its ecological and evolutionary effects, influencing aspects such as the adaptation to a wide variety of ecological niches and contributing to the biodiversity of the most numerous group of the animal kingdom, the group of insects. Furthermore, *Wolbachia* and *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility proposed for its potential application in pest and disease vector control.

However, *Wolbachia*'s fastidious uncultivable nature hampers its study with the classical tools of bacterial genetics; so, little is known about the molecular mechanisms that underline the fascinating effects *Wolbachia* impose in their hosts. The recent sequencing of the first *Wolbachia* genome (wMel strain) provided novel insights into the potential molecular mechanisms used by this symbiont to manipulate its hosts. One interesting feature of wMel *Wolbachia*'s genome is the presence of an unusually high number of genes containing ankyrin repeat domains (23). Most commonly found in eukaryotic and viral proteins, ankyrin repeats act as scaffolds that mediate protein-protein interactions. Proteins with ankyrin repeats are known to involve in functions including: cell-cycle regulation, transcriptional regulation, cytoskeleton interactions and may act as toxins. This number of genes is in itself astonishing, as most of bacteria code for none to very few proteins with ankyrin repeats, indicating a putative role in host-*Wolbachia* interactions.

Considering the potential importance of ankyrin repeats in mediating protein-protein interactions and their abundance in *Wolbachia*, we performed a comparative study to examine: a) the distribution of 23 ankyrin repeat-containing genes present in the wMel genome in various *Wolbachia* strains, b) the sequence variability between different ankyrin genes in various *Wolbachia*

strains and their phylogenetic relationships and c) the transcription of ankyrin genes in different developmental stages and tissues.

Distribution results indicate that *Wolbachia* ankyrins comprise an abundant and dynamic gene family. Several ankyrin genes have been found in prophage segments suggesting that bacteriophages have a key role in introducing and spreading of ankyrin genes within *Wolbachia*. Interestingly, a group of ankyrin genes (WD0035, WD0191, WD0438, WD0441, WD0498, WD0636, WD0637, WD0766 and WD1213) seem to be present in all *Drosophila-Wolbachia* associations tested (both A and B group strains). The universal distribution of ankyrin genes between phenotypic and evolutionary distantly related *Wolbachia* strains might be correlated with the establishment of the symbiotic association between *Wolbachia* and their host.

Furthermore, the present study consists the first extensive study of the genetic diversity and molecular evolution of *Wolbachia* ankyrins between different *Drosophila-Wolbachia* associations. Understanding the mechanisms of evolution of ankyrin genes is an important aim and key step in understanding their functional role. Our results indicate that ankyrin genes comprise a rapidly evolving *Wolbachia* gene family and yields several results regarding the mechanisms that implicate in their evolution. Among them classical homologues recombination, illegitimate recombination and the genomic flux provided by the prophages have influenced the shaping of their genetic diversity.

Finally, in the present study we used a semi-quantitative RT-PCR approach and we performed an extensive transcription analysis of the *Wolbachia* ankyrin genes in different *Drosophila-Wolbachia* symbiotic associations. Tissue-, developmental-, and host-specific expression patterns are explored in order to elucidate the biological role of *Wolbachia* ankyrins. Our results indicate that ankyrin genes expression presents great diversity depending on the symbiotic association, the tissue and the developmental stage. Of great interest are the host- and sex-specific transcription patterns which might affect CI. However, there is no clear correlation of ankyrin expression patterns with the different CI phenotypes. Another interesting finding is that all the truncated ankyrin genes retained their ability to transcribe. This is not yet understood, but raises questions about their putative functional role. The elucidation of the functional roles and mechanisms of evolution of this family of genes will provide many insights into *Wolbachia*'s biology.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Συμβίωση και ενδοσυμβίωση	8
1.2 <i>Wolbachia pipientis</i> : ο πιο διαδεδομένος συμβιωτικός μικροοργανισμός στη φύση.....	12
1.2.1 Γενική επισκόπηση – Ιστορική αναδρομή	12
1.2.2 Φυλογένεια και εξάπλωση της <i>Wolbachia</i>	12
1.2.3 Αλληλεπιδράσεις με τους ξενιστές.....	15
1.2.4 Η συμβολή της <i>Wolbachia</i> στις ειδογενετικές διαδικασίες και την αύξηση της βιοποικιλότητας.....	21
1.2.5 Πρακτικές εφαρμογές: Η <i>Wolbachia</i> ως μέσο καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων	24
1.2.6 Το γονιδίωμα της <i>Wolbachia</i> : κατανοώντας τις μοριακές αλληλεπιδράσεις με τους ξενιστές	27
1.2.6.1 Επαναλαμβανόμενα μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία	29
1.2.6.2 Βακτηριοφάγοι.....	30
1.2.6.3 Διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ <i>Wolbachia</i> -ξενιστή και σύστημα έκκρισης τελεστών	32
1.2.6.4 Ο ρόλος του γενετικού ανασυνδυασμού στη <i>Wolbachia</i>	33
1.2.7 Η <i>Wolbachia</i> και το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.....	35
1.2.8 Γονίδια (πρωτεΐνες) με επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης	36
1.3 Σκοπός της παρούσας διατριβής.....	42
1.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

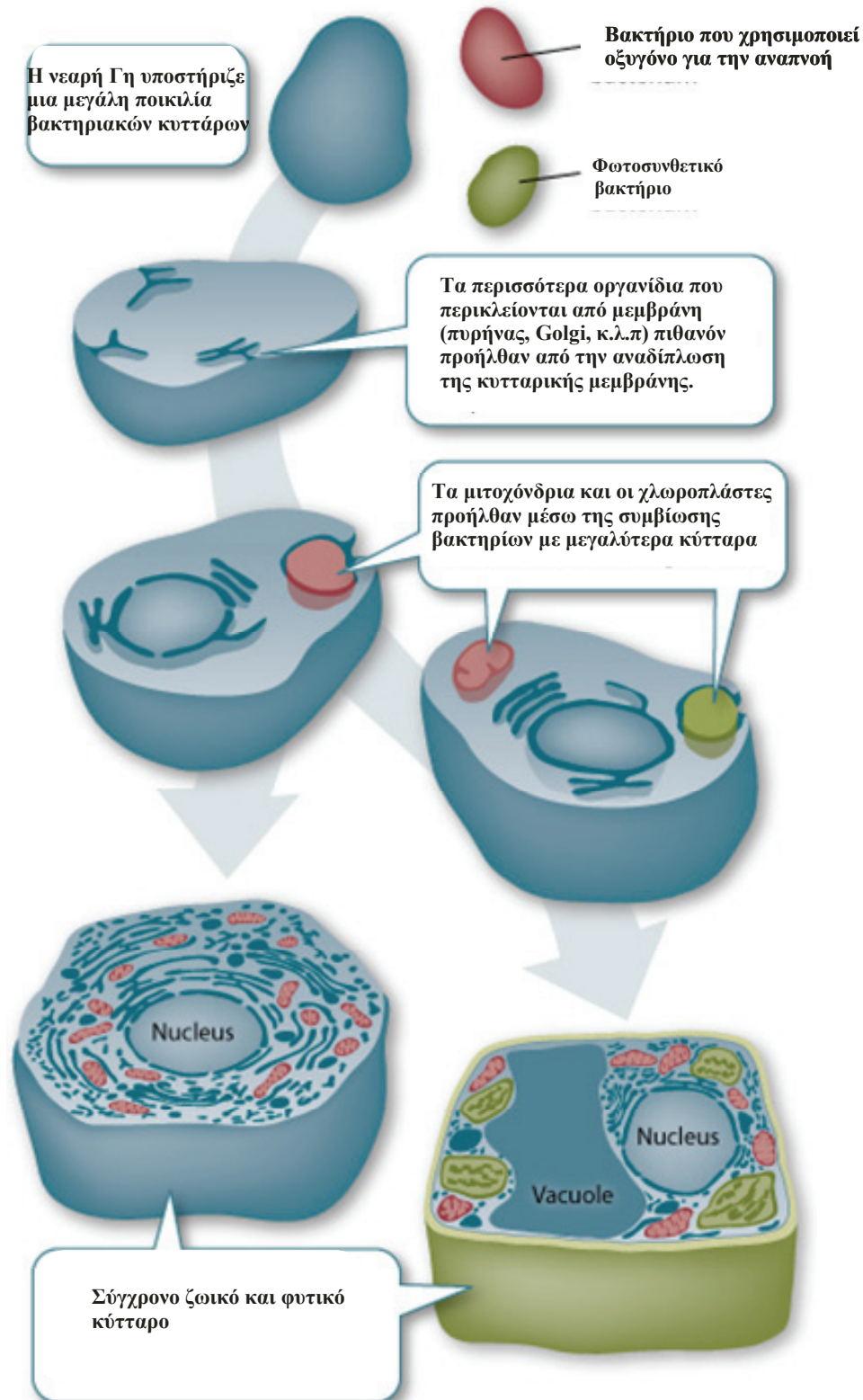
1.1 Συμβίωση και ενδοσυμβίωση

Με τον όρο “συμβίωση” χαρακτηρίζουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων διαφορετικών οργανισμών οι οποίοι ζουν σε στενή σχέση μεταξύ τους. Από εξελικτική σκοπιά, η “συμβίωση” χρονολογείται πολύ πριν την εμφάνιση των μεγαλύτερων και πολυπλοκότερων πολυκύτταρων οργανισμών. Μάλιστα, κατά την δεκαετία του '70, οι επιστήμονες ανέπτυξαν μια θεωρία σύμφωνα με την οποία η ίδια η εξέλιξη των ευκαρυωτικών οργανισμών οφείλεται στην ενδοσυμβιωτική προέλευση των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών (Margulis 1970; Gray & Doolittle 1982). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες, αποτελούν τους απογόνους πρόδρομων προκαρυωτικών κυττάρων. Κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, τα προκαρυωτικά αυτά κύτταρα, ενσωματώθηκαν στο κυτταρόπλασμα των πρόδρομων ευκαρυωτικών κυττάρων παρέχοντας του ενέργεια με αντάλλαγμα ένα σταθερό περιβάλλον άφθονο σε θρεπτικά συστατικά (Εικόνα 1.1). Με την πάροδο του χρόνου, η αλληλεξάρτηση αυτή έγινε τόσο στενή που οδήγησε στο μετασχηματισμό των βακτηριακών αυτών κυττάρων σε ενδοκυτταρικά οργανίδια.

Η εμφάνιση των μεγαλύτερων πολυκύτταρων οργανισμών παρείχε στους προκαρυωτικούς οργανισμούς νέα, σταθερά, και πλούσια σε θρεπτικά ενδιαιτήματα προς εξερεύνηση και αξιοποίηση. Αυτό το γεγονός είχε ως αποτέλεσμα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, μια πολύ μεγάλη ομάδα οργανισμών που απαντώνται σε κάθε είδους οικότοπο (χερσαίο, λιμναίο, θαλάσσιο), να αναπτύξει πολύπλοκες συμβιωτικές σχέσεις με μια πληθώρα μικροοργανισμών το εύρος και η σημασία των οποίων άρχισε να αποκαλύπτεται μόνο μετά την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών στη βιολογία (Moran 2006). Η ανάπτυξη αυτών των σχέσεων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην οικολογία των ξενιστών, επηρεάζοντας οικολογικές παραμέτρους όπως η θρέψη και η άμυνα ενάντια των φυσικών εχθρών (Zientz *et al.* 2004; Baumann 2005; Scarborough *et al.* 2005; Dunbar *et al.* 2007; Teixeira *et al.* 2008; Oliver *et al.* 2009), όσο και στην εξέλιξή τους, επιδρώντας πάνω στο αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών με αποτέλεσμα την αναπαραγωγική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών του ξενιστή και την ειδογένεση (Hurst & Werren 2001; Bandi *et al.* 2001; Charlat *et al.* 2003).

Οι συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσουν τα έντομα είναι από τις καλύτερα μελετημένες. Τα έντομα είναι η τάξη εκείνη των ζώων που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα περιλαμβάνοντας πάνω από 1.000.000 είδη (δηλαδή πάνω από τα μισά είδη που είναι γνωστά σε αυτόν τον πλανήτη) [Ishikawa 2003]. Τα έντομα απαντούν σε πλήθος οικοτόπων. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των εντόμων να τρέφονται με διαφορετικούς τύπους τροφής το οποίο με τη σει-

ρά του οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς τους (Ishikawa 2003).



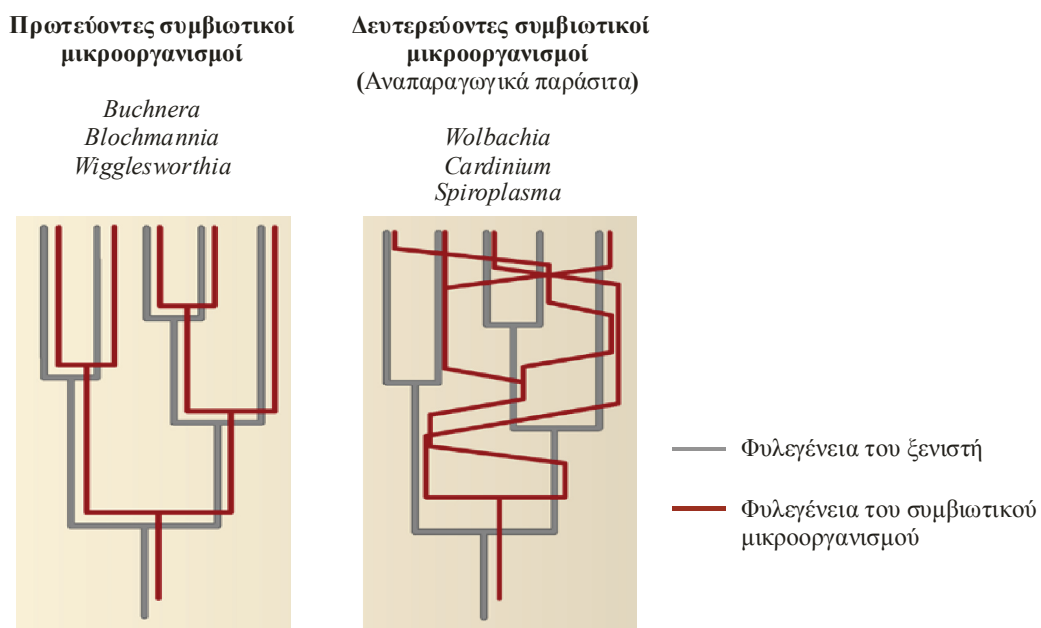
Εικόνα 1.1. Ενδοσυμβιωτική θεωρία.

Οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί των εντόμων σχηματίζουν στενές σχέσεις με τους ξενιστές τους οι οποίες μπορούν να πάρουν διάφορες μορφές ανάλογα με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να εγκαθιδρύσουν τις συμβιωτικές σχέσεις με τους εκάστοτε ξενιστές, τις επιδράσεις που θα έχει η συμβιωτική αυτή σχέση στη βιολογία του ξενιστή, την εξελικτική ιστορία της σχέσης καθώς και τα γενωμικά χαρακτηριστικά των συμβιωτικών βακτηρίων (Moran 2006). Αν και η διάκριση μεταξύ τους μπορεί να γίνει μερικές φορές ασαφής, λόγω της δυναμικής φύσης των σχέσεων αυτών οι οποίες μπορούν να αλλάξουν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ακόμα και στην περίπτωση του ίδιου οργανισμού κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες, μπορούμε να διακρίνουμε τις εξής γενικές κατηγορίες.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους λεγόμενους πρωτεύοντες συμβιωτικούς μικροοργανισμούς (primary symbionts ή P-symbionts) οι οποίοι αναπτύσσουν μια υποχρεωτική και αμοιβαίας ωφέλειας σχέση με τους ξενιστές τους. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα και ίσως το καλύτερα μελετημένο, είναι αυτό των μητρικά κληρονομούμενων συμβιωτικών βακτηρίων του είδους *Buchnera* που βρίσκονται σε πολλά είδη αφίδων. Η σχέση αυτή είναι τόσο στενή που οι αφίδες έχουν εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να παράγουν εξειδικευμένα κύτταρα-όργανα τα λεγόμενα βακτηριοκύτταρα τα οποία στεγάζουν τα βακτήρια και εξασφαλίζουν τη μεταφορά τους από τη μητέρα στους απογόνους. Σε αντάλλαγμα των σταθερών συνθηκών διαβίωσης, η *Buchnera* έχει την ικανότητα να παρέχει στον ξενιστή της διάφορα θρεπτικά που δεν μπορούν να βρουν οι αφίδες μέσω της κανονικής τους διαίτας όπως για παράδειγμα βιταμίνες και βασικά αμινοξέα (λευκίνη και θρυπτοφάνη) (Zientz *et al.* 2004; Baumann 2005; Dale & Moran 2006). Η ηλικία αυτού του είδους των συμβιωτικών σχέσεων χρονολογείται πολύ πριν την εμφάνιση των θηλαστικών και όλων των σύγχρονων μορφών ζωής (30-270 εκατομμύρια χρόνια πριν). Η μακρόχρονη αυτή αλληλεξάρτηση αντικατοπτρίζεται επίσης και στη συν-εξέλιξη μεταξύ βακτηρίου και ξενιστή όπως φαίνεται από την παράλληλη φυλογένεια (Εικόνα 1.2) [Moran *et al.* 1993; Dale and Moran 2006].

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους λεγόμενους δευτερεύοντες ή προαιρετικούς συμβιωτικούς μικροοργανισμούς (secondary symbionts ή S-symbionts). Σε αντίθεση με τους πρωτεύοντες συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταδίδονται αποκλειστικά από τη μητέρα, οι δευτερεύοντες συμβιωτικοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ειδών (Moran *et al.* 2008). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να εισβάλουν και να εγκατασταθούν σε διάφορους τύπους κυττάρων μεταξύ των οποίων και τα αναπαραγωγικά όργανα. Μπορούν επίσης να παραμένουν εξωκυττάρια χρησιμοποιώντας την αιμολémie των εντόμων ως το ενδιαίτημά τους. Η επιτυχής όμως μετακίνηση και εξάπλωση των προαιρετικών συμβιωτικών μικροοργανισμών προϋποθέτει την ανάπτυξη μηχανισμών οι οποίοι

θα παρέχουν στους μολυσμένους πληθυσμούς ένα πλεονέκτημα έναντι των μη μολυσμένων. Η φύση αυτών των μηχανισμών μας δίνει τη δυνατότητα να διαχωρίσουμε τις συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί αυτοί σε δύο υποκατηγορίες. Η πρώτη υποκατηγορία περιλαμβάνει τους μικροοργανισμούς εκείνους που αναπτύσσουν σχέσεις αμοιβαίας ωφέλειας με τους ξενιστές τους. Οι δεύτεροι επωφελούνται από αυτή την συνύπαρξη επειδή τους προσδίδεται ανθεκτικότητα σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. υψηλές θερμοκρασίες), προστασία έναντι φυσικών εχθρών (π.χ. παρασιτοειδή και ιούς) ή τους παρέχεται η δυνατότητα να εκμεταλλευτούν συγκεκριμένους τύπους τροφής (Moran *et al.* 2005; Oliver *et al.* 2003; Scarborough *et al.* 2005; Dunbar *et al.* 2007). Η δεύτερη υποκατηγορία περιλαμβάνει τα αναπαραγωγικά παράσιτα. Οι μικροοργανισμοί αυτής της κατηγορίας έχουν υιοθετήσει μια σειρά από μηχανισμούς για να επεμβαίνουν πάνω στην αναπαραγωγική επιτυχία των ξενιστών τους με σκοπό να εξασφαλίσουν τη μητρική τους μετάδοση. Μια από τις πιο διαδεδομένες επιδράσεις είναι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων πληθυσμών του ξενιστή κατά την οποία τα μολυσμένα αρσενικά άτομα στερώνουν κατά κάποιο τρόπο τα μη μολυσμένα θηλυκά άτομα αυξάνοντας έτσι την αναλογία των μολυσμένων θηλυκών τα οποία μπορούν να μεταδώσουν τους μικροοργανισμούς. Άλλοι τρόποι επέμβασης πάνω στην αναπαραγωγική επιτυχία των ξενιστών είναι η παρθενογένεση (parthenogenesis), η θανάτωση των αρσενικών (male killing) και η θηλυκοποίηση (feminization) (Werren 1997; O'Neill *et al.* 1992; Stouthamer *et al.* 1999; Bourtzis & Miller 2003, 2006, 2008; Gotoh *et al.* 2007; Pool *et al.* 2006). Από τα πλέον καλά μελετημένα αναπαραγωγικά παράσιτα είναι η *Wolbachia pipientis*, τη βιολογία του οποίου θα εξετάσουμε στις επόμενες παραγράφους.



Εικόνα 1.2. Εξελικτικές πορείες συμβιωτικών μικροοργανισμών στα έντομα (Dale & Moran 2006).

1.2 *Wolbachia pipientis*: ο πιο διαδεδομένος συμβιωτικός μικροοργανισμός στη φύση

1.2.1 Γενική επισκόπηση – Ιστορική αναδρομή

Η *Wolbachia pipientis* (*Wolbachia* για τον σκοπό της παρούσας διατριβής) είναι ένα ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομήσιμο βακτήριο το οποίο ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '20 από τους Hertig και Wolbach - από τον οποίο πήρε και το όνομά του - μετά από μικροσκοπικές παρατηρήσεις των ωοθηκών του κουνουπιού *Culex pipiens* (Hertig & Wolbach 1924). Μια λεπτομερέστερη μορφολογική περιγραφή του βακτηρίου έγινε για πρώτη φορά μετά από 12 χρόνια από τον Hertig (Hertig 1936). Η *Wolbachia* παρουσιάζει σε γενικές γραμμές τα χαρακτηριστικά των βακτηριακών ειδών του γένους *Rickettsiae*. Εμφανίζεται με δύο μορφές είτε ως πολύ μικρά ραβδόμορφα βακτήρια (μεγέθους 0.5 – 1.3 μm) είτε με κοκκοειδή μορφή (διαμέτρου 0.25 – 0.5 μm) (Kozek, 1977; Kozek & Marroquin, 1977; Wright *et al.*, 1978; Wright & Barr, 1980; Wright & Wang, 1980). Η *Wolbachia* βρίσκεται έγκλειστη σε ένα κυστίδιο και περιβάλλεται από τρία στρώματα μεμβρανών: ένα κυτταρικό τοίχωμα, μια εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη και μια εξωτερική μεμβράνη η οποία πιστεύεται ότι προέρχεται πιθανότατα από τον ξενιστή (Kozek, 1977; Kozek & Marroquin, 1977; Wright *et al.*, 1978; Wright & Barr, 1980; Wright & Wang, 1980; Louis & Nigro, 1989).

Το φαινόμενο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, αποτέλεσε το έναυσμα για την μελέτη του (Laven, 1951; Gheletovich, 1952; Laven, 1959). Η θετική συσχέτιση της παρουσίας της *Wolbachia* στον ξενιστή με το φαινόμενο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας έγινε μετά από δύο δεκαετίες, όπου με τη χρήση κατάλληλων αντιβιοτικών εξαλείφθηκε τόσο το βακτήριο όσο και η επαγωγή του φαινοτύπου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Yen & Barr, 1971).

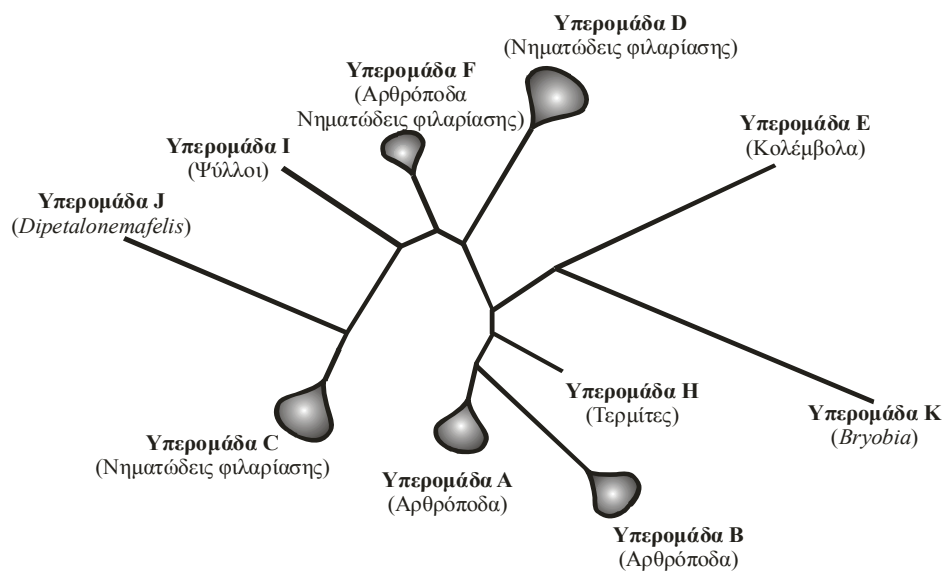
1.2.2 Φυλογένεια και εξάπλωση της *Wolbachia*

Στις μέρες μας η *Wolbachia pipientis* είναι το μόνο αναγνωρισμένο είδος του γένους *Wolbachia* ενώ οι φυλογενετικές μελέτες με βάση το γονίδιο 16S *rDNA* κατατάσσει το είδος στην υποομάδα των πρωτεοβακτηρίων, στην τάξη των Rickettsiales, οικογένεια Rickettsiaceae (Breeuwer *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1992). Η τάξη των Rickettsiales περιλαμβάνει μια ποικιλόμορφη ομάδα ενδοκυτταρικών βακτηρίων τα οποία αναπτύσσουν ένα ευρύ φάσμα συμβιωτικών σχέσεων με τους ξενιστές τους από παρασιτικές μέχρι σχέσεις αμοιβαίας ωφέλειας. Αν και ο κύκλος ζωής συγγενικών γενών όπως αυτά των *Anaplasma*, *Ehrlichia* και *Rickettsia* περιλαμβάνει τόσο φορείς που ανήκουν στα ασπόνδυλα όσο και ξενιστές που ανή-

κουν στα θηλαστικά, η *Wolbachia* δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα να μολύνει θηλαστικά. Οι ξενιστές της περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία ασπόνδυλων όπως ακάρεα, ισόποδα, αραχνοειδή, σκορπιούς, νηματώδεις της φιλαρίας αλλά κυρίως έντομα (Rousset *et al.* 1992, Sironi *et al.* 1995, Werren *et al.* 1995, Breeuwer & Jacobs 1996, Werren & O'Neill 1997, Werren 1997, West *et al.* 1998, Bandi *et al.* 1998, Stouthamer *et al.* 1999, Bourtzis & Braig 1999, Jeyaparakash & Hoy 2000; Stevens *et al.* 2001, Nirgianaki *et al.* 2003, Kikuchi & Fukatsu 2003, Gotoh *et al.* 2003, Rowley *et al.* 2004, Tagami & Miura 2004, Bordenstein & Rosengaus 2005, Baldo *et al.* 2007, Baldo *et al.* 2008, Hilgenboecker *et al.* 2008; Ros *et al.* 2009). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η πρόσφατη ανίχνευση του βακτηρίου *Wolbachia* σε φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις (Haegeman *et al.* 2009). Πρόσφατες μελέτες εκτιμούν ότι πάνω από το 65% των ειδών εντόμων είναι μολυσμένα με το βακτήριο *Wolbachia* (Jeyaparakash & Hoy 2000, Hilgenboecker *et al.* 2008) καθιστώντας το τον πιο ευρέως διαδεδομένο ενδοκυττάριο συμβιωτικό μικροοργανισμό του πλανήτη καθώς εκτιμάται ότι απαντά σε τουλάχιστον 10^6 είδη εντόμων.

Φυλογενετικές μελέτες βασιζόμενες κυρίως στους γονιδιακούς τόπους 16S *rDNA*, *wsp*, *ftsZ*, *dnaA*, *groEL* και *gltA* έχουν αναδείξει 11 τουλάχιστον υπερομάδες στελεχών *Wolbachia* οι οποίες έχουν ονομαστεί από το A μέχρι το K (Werren *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1998; Casiraghi *et al.* 2005; Lo *et al.*, 2007; Ros *et al.* 2009) [Εικόνα 1.3]. Οι υπερομάδες A – D θεωρούνται από τις κυριότερες καθώς περιλαμβάνουν και τα περισσότερα στελέχη, με τις A και B να απαντούν μόνο σε αρθρόποδα κυρίως έντομα και χερσαία ισόποδα αλλά και κάποια ακάρεα, ενώ οι C και D απαντούν μόνο στους νηματώδεις της φιλαρίας (Werren *et al.* 1995; Bandi *et al.* 1998). Η υπερομάδα E περιγράφηκε πιο πρόσφατα στα Κολέμβολα (Czarnetzki & Tebbe 2004) ενώ η υπερομάδα F έχει βρεθεί τόσο σε αρθρόποδα όπως γρύλους, αράχνες, σκορπιούς, κοριούς και ψείρες όσο και σε νηματώδεις του γένους *Mansonella* (Rowley *et al.* 2004; Sakamoto & Rasgon 2006; Covacin & Barker 2007; Panaram & Marshall 2007; Baldo *et al.* 2007; Casiraghi *et al.* 2005). Οι υπερομάδες G και H έχουν βρεθεί αντίστοιχα σε αράχνες τις Αυστραλίας (Rowley *et al.* 2004) και τερμίτες (Bordenstein & Rosengaus 2005). Ωστόσο, η εγκυρότητα της υπερομάδας G αμφισβητείται καθώς ο χαρακτηρισμός της βασίστηκε μόνο στις αλληλουχίες των γονιδίων *wsp* και 16S *rDNA* ενώ τα δεδομένα που προέκυψαν με το πρόσφατα ανεπτυγμένο σύστημα MLST (MultiLocus Sequence Typing) δείχνουν ότι τα στελέχη αυτής της υπερομάδας μοιάζουν με αυτά της υπερομάδας A (Baldo *et al.* 2006a; Baldo & Werren 2007). Εκτός από τις υπερομάδες A-F και H, οι οποίες είναι οι πλέον χαρακτηρισμένες, τρεις νέες υπερομάδες της *Wolbachia* έχουν περιγραφεί: η υπερομάδα I που απαντά σε ψύλλους (Casiraghi *et al.* 2005; Gorhan *et al.* 2003), η υπερομάδα J που απαντά σε νηματώδεις της φιλαρίας του είδους *Dipetalonema gracile* (Casiraghi *et al.* 2004) και η υπερομάδα K, η οποία αποτελεί και την πιο πρόσφατα χαρα-

κτηρισμένη ομάδα, και απαντά σε ακάρεα του γένους *Bryobia* (Ros *et al.* 2009). Η εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ κάθε υπερομάδας παρέχει χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά την εξέλιξη και τη βιολογία του βακτηρίου. Η φυλογένεια των στελεχών της *Wolbachia* που ανήκουν στις υπερομάδες A και B φαίνεται να μην είναι σε συμφωνία με τη φυλογένεια των ξενιστών τους (Werren *et al.* 1995), υποδηλώνοντας ότι η *Wolbachia* αν και μεταβιβάζεται μητρικά στους απογόνους έχει την δυνατότητα να μεταφέρεται και οριζόντια μεταξύ διαφορετικών ειδών αρthropόδων. Το πρώτο πιθανό παράδειγμα οριζόντιας μεταφοράς του βακτηρίου αναφέρθηκε από τον Werren και τους συνεργάτες του (Werren *et al.* 1995) οι οποίοι ανακάλυψαν ότι παρασιτοειδή έντομα του γένους *Nasonia* και οι ξενιστές τους είναι μολυσμένα με παρόμοια στελέχη *Wolbachia*. Πιο πρόσφατες και άμεσες αποδείξεις του φαινομένου αυτού βρέθηκαν σε παρασιτικές σφήκες οι οποίες μοιράζονταν την ίδια τροφή (Huigens *et al.* 2000) ωστόσο οι μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι. Αντίθετα με την περίπτωση των αρthropόδων, η φυλογένεια των στελεχών *Wolbachia* που μολύνουν τους νηματώδεις της φιλαρίας είναι παράλληλη με αυτή των ξενιστών τους (Casiraghi *et al.* 2001). Αυτό υποδηλώνει μια αυστηρά εξαρτημένη σχέση μεταξύ της *Wolbachia* και των νηματωδών κάτι που υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι η απομάκρυνση της *Wolbachia* με την χρήση αντιβιοτικών καθιστά αδύνατη την ανάπτυξη των νηματωδών (Langworthy *et al.* 2000).



Εικόνα 1.3. Η φυλογένεια της *Wolbachia*. Το σχήμα παρουσιάζει ένα άρριζο φυλογενετικό δένδρο των υπερομάδων της *Wolbachia*. Από το δένδρο λείπει η υπερομάδα G καθώς η εγκυρότητά της έχει αμφισβητηθεί (Ros *et al.* 2009).

1.2.3 Αλληλεπιδράσεις με τους ξενιστές

Εκτός από την ευρεία εξάπλωσή της, άλλο ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της βιολογίας της *Wolbachia* είναι και η μεγάλη ποικιλία συμβιωτικών σχέσεων (από αμοιβαίας ωφέλειας μέχρι παρασιτικές) που μπορεί και αναπτύσσει με τους εκάστοτε ξενιστές της (Werren 1997; Stouthamer *et al.* 1999; Bourtzis & Miller 2003). Σχέσεις αμοιβαίας ωφέλειας έχουν παρατηρηθεί, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στους νηματώδεις της φιλαρίασης όπου η *Wolbachia* είναι απαραίτητη για την σωστή ανάπτυξη και την γονιμότητα των νηματωδών (Taylor *et al.* 2005). Επίσης έχει βρεθεί ότι σε παρασιτοειδείς σφήκες του είδους *Asobara tabida* η παρουσία του βακτηρίου είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη των ωοθηκών (Dedene *et al.* 2001). Από την άλλη μεριά, στα χερσαία αρθρόποδα η *Wolbachia* επιδρά πάνω στις κυτταρικές και αναπαραγωγικές διαδικασίες των ξενιστών της με μια ποικιλία μηχανισμών μοναδική για συμβιωτικό μικροοργανισμό. Μόνο άλλη μια ομάδα συμβιωτικών μικροοργανισμών που ανήκουν στο γένος *Candidatus Cardinium hertigii* (της τάξης Bacteroides) έχει βρεθεί να επάγουν παρόμοια ποικιλία αναπαραγωγικών φαινοτύπων στους ξενιστές τους (Zchori-Fein & Perlman 2004). Η ποικιλία αυτή των αναπαραγωγικών φαινοτύπων παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξασφάλιση της μητρικής μετάδοσης της *Wolbachia*. Οι μηχανισμοί αυτοί περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

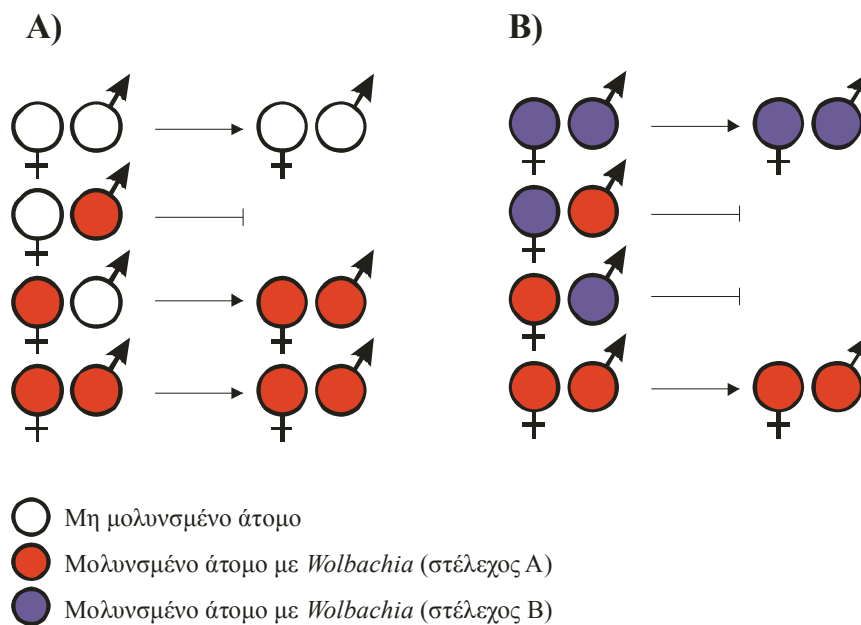
Θηλυκοποίηση (feminization): Με τον όρο θηλυκοποίηση χαρακτηρίζεται το φαινόμενο της μετατροπής των γενετικά αρσενικών ατόμων σε πλήρως λειτουργικά θηλυκά άτομα λόγω της παρουσίας της *Wolbachia*. Το φαινόμενο της θηλυκοποίησης παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα χερσαία ισόποδα ενώ έχει μελετηθεί εκτεταμένα στο είδος *Armadillidium vulgare* όπου έχει βρεθεί ότι η *Wolbachia* επηρεάζει τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία των ανδρογόνων αδένων στα μολυσμένα αρσενικά άτομα (Martin *et al.* 1990; Juchault *et al.* 1992; Rigaud 1997; Bouchon *et al.* 1998; Cordaux *et al.* 2001; Vandekerckhove *et al.* 2003). Οι αδένες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των ανδρογόνων ορμονών οι οποίες με την σειρά τους είναι υπεύθυνες για την διαφοροποίηση των όρχεων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Χωρίς την παρουσία αυτής της ορμόνης, οι αδιαφοροποίητες γονάδες αναπτύσσονται σε ωοθήκες μετατρέποντας τα άτομα σε λειτουργικά θηλυκά (Martin *et al.* 1990). Εκτός από τα χερσαία ισόποδα, ο φαινότυπος της θηλυκοποίησης έχει περιγραφεί και σε δύο είδη εντόμων, στο είδος *Eurema hecabe* της τάξης των Λεπιδοπτέρων (Hiroki *et al.* 2002) και στο είδος *Zyginidia pullula* της τάξης των Υμενόπτερων (Negri *et al.* 2008). Ο ακριβής μηχανισμός της θηλυκοποίησης στα έντομα δεν είναι ακόμα γνωστός καθώς ο καθορισμός του φύλου δεν είναι ορμονικός στα είδη αυτά όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ισοπόδων. Παρόλα αυτά, το στέλεχος της *Wolbachia* που μολύνει το είδος *Eurema hecabe* φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με το σύστημα φυλοκαθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια

της ανάπτυξης του εντόμου για την πλήρη έκφραση του φαινοτύπου καθώς η απομάκρυνση του βακτηρίου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφυλετικότητας (Werren *et al.* 2008, Narita *et al.* 2007). Έχει προταθεί ότι το βακτήριο της *Wolbachia* μέσω του φαινομένου της θηλυκοποίησης μπορεί να οδηγήσει στην εξέλιξη νέων συστημάτων φυλοκαθορισμού. Πράγματι, στα χερσαία ισόποδα (αρσενικά άτομα = **ZZ**, θηλυκά άτομα = **WZ**) ο υψηλός ρυθμός μετάδοσης του βακτηρίου μαζί με την επίδραση του φαινομένου της θηλυκοποίησης έχουν οδηγήσει σχεδόν στην εξαφάνιση του χρωμοσώματος **W** που καθορίζει την ανάπτυξη των θηλυκών ατόμων και την αντικατάσταση του χρωμοσωμικού συστήματος φυλοκαθορισμού με ένα κυτταροπλασματικό σύστημα (αρσενικά άτομα = **ZZ**, θηλυκά άτομα = **ZZ** + *Wolbachia*) [Bouchon *et al.* 1998].

Θανάτωση των αρσενικών ατόμων (male killing): Στελέχη της *Wolbachia* τα οποία επάγουν θανάτωση των αρσενικών ατόμων έχουν περιγραφεί σε Κολεόπτερα (Fialho & Stevens 2000), Δίπτερα (Dyer & Jaenike 2004), Λεπιδόπτερα (Jiggins *et al.* 2001) και Ψευδοσκορπιούς (Zeh *et al.* 2005). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η *Wolbachia* “σκοτώνει” τους αρσενικούς απογόνους των μολυσμένων θηλυκών τόσο στα αρχικά εμβρυικά στάδια, όσο και στα ύστερα προνυμφικά (Charlat *et al.* 2007). Μέσω του μηχανισμού αυτού ευνοείται η ανάπτυξη των θηλυκών ατόμων, τα οποία μπορούν να μεταδώσουν το βακτήριο, καθώς έχουν στη διάθεσή τους περισσότερη τροφή. Λεπτομέρειες για το μηχανισμό θανάτωσης προέρχονται από τη μελέτη του φαινομένου στο λεπιδόπτερο *Ostrinia scapularis* όπου έχει παρατηρηθεί ότι όλοι οι απόγονοι είναι θηλυκά άτομα. Αυτό αποδόθηκε αρχικά σε θηλυκοποίηση αλλά στη συνέχεια όταν από τις “μητέρες” απομακρύνθηκε η μόλυνση με χρήση αντιβιοτικών οι απόγονοι που προέκυψαν ήταν όλοι αρσενικοί. Πιο συγκεκριμένα, τα αρσενικά θανατώνονταν αφού πρώτα είχαν μετατραπεί σε θηλυκά. Δηλαδή ο θάνατός τους οφείλεται σε μία θανατηφόρο θηλυκοποίηση (Kageyama *et al.* 2002; Kageyama & Traut 2004). Με βάση τα μέχρι στιγμής δεδομένα, ωστόσο, δεν γνωρίζουμε με ποιον τρόπο η *Wolbachia* αναγνωρίζει το σύστημα φυλοκαθορισμού στους ξενιστές της. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι το συμβιωτικό βακτήριο *Spiroplasma*, που επίσης θανατώνει τα αρσενικά άτομα του ξενιστή του, φαίνεται να αλληλεπιδρά με άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο με τον μηχανισμό της αντιστάθμισης του γονιδιακού πλεονάσματος στην *Drosophila melanogaster* (Dosage Compensation Complex) [Veneti *et al.* 2005]. Ο μηχανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για τον διπλασιασμό της μεταγραφικής δραστηριότητας όλων σχεδόν των γονιδίων στο X χρωμόσωμα του αρσενικού ατόμου και αποτελεί βασικό κομμάτι του συστήματος φυλοκαθορισμού (Gelbart & Kuroda 2009).

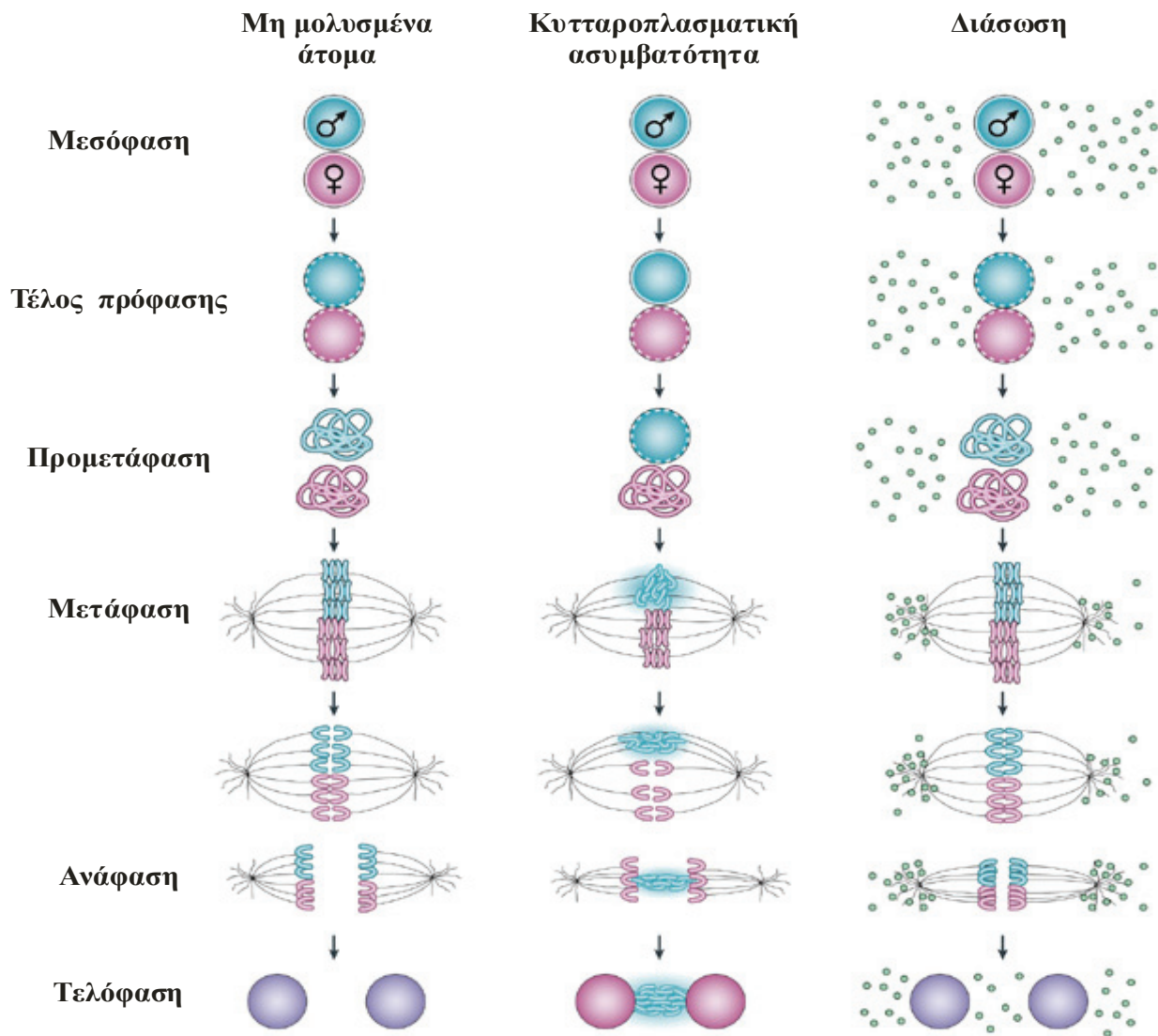
Θηλυτόκος παρθενογένεση (Thelytoky parthenogenesis): Ως παρθενογένεση ορίζεται το φαινόμενο της αναπαραγωγής απογόνων χωρίς να έχει προηγηθεί γονιμοποίηση των θηλυκών ατόμων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως σε απλοδιπλοειδή είδη εντόμων. Θηλυτοκία είναι μια μορφή του φαινομένου κατά την οποία τα μη γονιμοποιημένα αβγά θηλυκών ατόμων, που είναι μολυσμένα με *Wolbachia* αναπτύσσονται ως θηλυκά άτομα ενώ στην αντίθετη περίπτωση θα είχαν αναπτυχθεί ως αρσενικά (αρρενοτοκία). Στελέχη της *Wolbachia* τα οποία επάγουν θηλυτόκο παρθενογένεση έχουν εντοπιστεί στα υμενόπτερα όπως σφήκες, στα θυσανόπτερα όπως οι θρίπες αλλά και σε ακάρεα (Stouthamer 1997; Zchori-Fein *et al.* 1998; Arakaki *et al.* 2001a; Arakaki *et al.* 2001b; Weeks & Breeuwer 2001; Jeong & Stouthamer 2005). Στα είδη αυτά, αντί της παραγωγής αρσενικών ατόμων από τα μη γονιμοποιημένα αβγά των μολυσμένων θηλυκών ατόμων, παράγονται μόνο θηλυκά άτομα ευνοώντας άμεσα την κάθετη μετάδοση του βακτηρίου. Έχει βρεθεί ότι το φαινόμενο της παρθενογένεσης το οποίο επάγεται από το βακτήριο *Wolbachia* οφείλεται στη “διατάραξη” του κυτταρικού κύκλου κατά τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διπλοειδών θηλυκών ατόμων από μη γονιμοποιημένα απλοειδή ωάρια (θηλυτοκία).

Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Cytoplasmic incompatibility): Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα αποτελεί τον πιο καλά μελετημένο και ίσως τον πιο διαδεδομένο φαινότυπο που επάγεται από το βακτήριο *Wolbachia*. Η πρώτη συσχέτιση του φαινομένου με την παρουσία του βακτηρίου έγινε το 1971 από τους Yen & Barr (Yen & Barr 1971) οι οποίοι απέδειξαν ότι η *Wolbachia* ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που είχε παρατηρηθεί σε πληθυσμούς του κουνουπιού *Culex pipiens* σχεδόν είκοσι (20) χρόνια πριν (Laven 1951). Στην πιο απλή της μορφή (μονόδρομη ασυμβατότητα), η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα παρατηρείται όταν μολυσμένα με το βακτήριο αρσενικά άτομα ζευγαρώνουν με μη-μολυσμένα θηλυκά άτομα (Εικόνα 1.4). Σε αυτού του είδους τις διασταυρώσεις, η γονιμοποίηση αποτυγχάνει. Αντίθετα, η γονιμοποίηση πραγματοποιείται κανονικά όταν και τα θηλυκά άτομα είναι μολυσμένα ή όταν τα μολυσμένα θηλυκά διασταυρώνονται με μη μολυσμένα αρσενικά (Bourtzis *et al.* 2003). Αυτό δίνει στα μολυσμένα θηλυκά ένα αναπαραγωγικό πλεονέκτημα έναντι των μη-μολυσμένων σε μεικτούς πληθυσμούς εντόμων με αποτέλεσμα την εξάπλωση της μόλυνσης. Μια πιο πολύπλοκη μορφή αναπαραγωγικής απομόνωσης είναι αυτή της αμφίδρομης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Η μορφή αυτή παρατηρείται όταν αρσενικά και θηλυκά άτομα είναι μολυσμένα με διαφορετικά και αμοιβαία ασύμβατα στελέχη της *Wolbachia* (Εικόνα 1.4). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι διασταυρώσεις να είναι ασύμβατες και προς τις δύο κατευθύνσεις (Bourtzis *et al.* 2003).



Εικόνα 1.4. Μονόδρομη (A) και αμφίδρομη (B) κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.

Αν και ο μοριακός μηχανισμός της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που επάγεται από το βακτήριο *Wolbachia* παραμένει άγνωστος, κυτταρογενετικές μελέτες δείχνουν ότι η *Wolbachia* επιδρά με κάποιον άγνωστο τρόπο πάνω στα πατρικά χρωμοσώματα κατά το στάδιο της σπερματογένεσης (Presgraves 2000). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η συμπεριφορά των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης με αποτέλεσμα την απώλεια του μιτωτικού συγχρονισμού (Εικόνα 1.5) (Breeuwer & Werren 1990; O'Neill & Karr 1990; Reed & Werren 1995; Lassy & Karr 1996; Tram & Sullivan 2002; Tram *et al.* 2003). Οι ασύμβατες διασταυρώσεις οφείλονται στον μη συγχρονισμό μεταξύ των δύο προπυρήνων “θηλυκό” και “αρσενικό” κατά τα αρχικά στάδια της μίτωσης. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί καθυστέρηση της αποδιοργάνωσης της πυρηνικής μεμβράνης των αρσενικών γαμετών καθώς και καθυστέρηση της φωσφορυλίωσης της ιστόνης H3, μια τροποποίηση η οποία είναι απαραίτητη για την έναρξη της μίτωσης (Tram & Sullival 2002; Tram *et al.* 2003; Landmann *et al.* 2009). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα μητρικής προέλευσης χρωμοσώματα να έχουν συμπυκνωθεί σωστά στο στάδιο της μετάφασης ενώ τα πατρικά όχι. Στο επόμενο στάδιο της ανάφασης, τα μητρικά χρωμοσώματα προχωρούν χωρίς πρόβλημα στο διαχωρισμό σε αντίθεση με τα πατρικά χρωμοσώματα τα οποία “χάνονται” σχηματίζοντας γέφυρες χρωματίνης μεταξύ των δύο πυρήνων (Tram & Sullival 2002; Tram *et al.* 2003). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την εμβρυική θνησιμότητα σε διπλοειδή είδη εντόμων ενώ στα απλοδιπλοειδή είδη τα απλοειδή έμβρυα αναπτύσσονται ως αρσενικά άτομα (Reed & Werren 1995).



Εικόνα 1.5. Τα στάδια της πρώτης εμβρυικής μιτωτικής διαίρεσης: σε μια φυσιολογική διασταύρωση μη μολυσμένων ατόμων, σε μια ασύμβατη διασταύρωση και σε μια διασταύρωση όπου και τα δύο άτομα είναι μολυσμένα με το ίδιο στέλεχος *Wolbachia*. Στην ασύμβατη διασταύρωση, η συμπύκνωση και αποσυμπύκνωση των πατρικών χρωμοσωμάτων (μπλε) αποτυγχάνει να συγχρονιστεί με αυτή των μητρικών (ροζ). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον μη σωστό διαχωρισμό των πατρικών χρωμοσωμάτων στο στάδιο της ανάφασης. Όταν το έμβryo είναι μολυσμένο επίσης με το ίδιο στέλεχος *Wolbachia*, ο συγχρονισμός μεταξύ των δύο προπυρήνων αποκαθίσταται (Werren *et al.* 2008).

Τα βακτηριακά γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην επαγωγή του φαινομένου δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Η φαινομενολογία όμως εξηγείται ικανοποιητικά από το μοντέλο “τροποποίηση – διάσωση” (modification – rescue model) το οποίο προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Werren το 1997 (Werren 1997) και υποστηρίχθηκε γενετικά από τους (Bourtzis *et al.* 1998; Merçot & Poinot 1998). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό υπάρχουν δυο διακριτές λειτουργίες: η πρώτη είναι η λειτουργία της τροποποίησης (*mod*, modification) η οποία λαμβάνει χώρα κατά τη σπερματογένεση και έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των πατρικών χρωμοσωμάτων ενώ η δεύτερη είναι η λειτουργία της διάσωσης (*resc*, rescue) η οποία διεξάγεται μέσα στο έμβryo α-

μέσως μετά τη γονιμοποίηση και αποκαθιστά την σωστή ανάπτυξη του εμβρύου. Τρεις είναι οι θεωρίες που έχουν διατυπωθεί μέχρι σήμερα για να εξηγήσουν το μηχανισμό δράσης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Poinsot *et al.* 2003). Η θεωρία του “λανθασμένου συγχρονισμού” (mistiming) εικάζει ότι η θανάτωση των εμβρύων προκύπτει από την έλλειψη συγχρονισμού μεταξύ του πατρικού και του μητρικού προπυρήνα κατά την πρώτη ζυγωτική μίτωση (Calaini *et al.* 1997, Tram & Sullivan 2002, Tram *et al.* 2003). Από την άλλη μεριά, οι θεωρίες του “κλειδιού και της κλειδαριάς” (lock and key) και της “κατακράτησης και απελευθέρωσης” (titration and restitution) προτείνουν ότι η *Wolbachia* εκκρίνει και εισάγει ένα βακτηριακό παράγοντα ή απομακρύνει αντίστοιχα κάποιον σημαντικό παράγοντα από τους προπυρήνες των αρσενικών γαμετών οδηγώντας σε αποτυχία της ανάπτυξης του εμβρύου (Breeuwer & Werren 1990; Hurst 1991; Kose & Karr 1995; Werren 1997; Poinsot & Mercot 1999). Από τις τρεις θεωρίες, αυτές του “κλειδιού και της κλειδαριάς” και της “κατακράτησης και απελευθέρωσης” φαίνεται να επικρατούν όπως προκύπτει από διάφορες μελέτες (Poinsot *et al.* 2003; Ferree & Sullivan 2006).

Ανάλογα με το εάν οι δύο λειτουργίες της τροποποίησης (*mod*) και της διάσωσης (*resc*) εκφράζονται, τα στελέχη της *Wolbachia* (ή/και οι συμβιωτικές σχέσεις κατ’ επέκταση) κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες (Bourtzis *et al.* 2003): (α) στελέχη *mod*⁺/*resc*⁺, τα οποία είναι ικανά τόσο να προκαλούν την τροποποίηση όσο και να τη διασώζουν (Hoffmann *et al.* 1986, Hoffmann 1988, O’Neill & Karr 1990, Bourtzis *et al.* 1994, Braig *et al.* 1994, Hoffmann *et al.* 1994, Mercot *et al.* 1995, Bourtzis *et al.* 1996, 1998, Reynolds & Hoffmann 2002, Weeks *et al.* 2002), (β) στελέχη *mod*⁻/*resc*⁻, τα οποία δεν μπορούν ούτε να προκαλούν τροποποίηση ούτε να σώζουν αυτήν που προκαλεί κάποιο άλλο στέλεχος (Hoffmann *et al.* 1996), (γ) στελέχη *mod*⁻/*resc*⁺, που δεν μπορούν να προκαλέσουν τροποποίηση ενώ μπορούν να διασώσουν αυτήν που προκαλείται από κάποιο άλλο στέλεχος (Bourtzis *et al.* 1998, Mercot & Poinsot 1998), και (δ) στελέχη *mod*⁺/*resc*⁻, που ενώ προκαλούν τροποποίηση δεν είναι σε θέση να τη σώσουν (Werren 1997; Charlat *et al.* 2001; Zabalou *et al.* 2008). Μια πρόσφατη μελέτη ωστόσο (Zabalou *et al.* 2008), δείχνει ότι υπάρχει μια πιο πολύπλοκη σχέση ανάμεσα στις δύο αυτές λειτουργίες. Πειράματα μεταφοράς στελεχών της *Wolbachia* από διαφορετικά είδη ξενιστών σε ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο υποστηρίζουν ότι ένα στέλεχος του βακτηρίου μπορεί να διαθέτει πολλαπλούς παράγοντες τροποποίησης ή/και διάσωσης, η έκφραση των οποίων μπορεί να εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του εκάστοτε ξενιστή.

Εκτός όμως από τη μεγάλη ποικιλία των σχέσεων και των φαινοτύπων που αναπτύσσει η *Wolbachia* με τους ξενιστές της (από παρασιτικές έως και αμοιβαίας ωφέλειας), μεγάλο ενδιαφέρον

παρουσιάζει επίσης και η δυνατότητα μετάπτωσης που παρατηρείται μεταξύ των φαινοτύπων αυτών. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, η Zabalou και οι συνεργάτες της (Zabalou *et al.* 2008) έδειξαν ότι, κάτω από διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, ο φαινότυπος και οι λειτουργίες της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας του ίδιου στελέχους *Wolbachia* μπορεί να αλλάξουν δραματικά. Έτσι για παράδειγμα ενώ τα στελέχη της *Wolbachia* τα οποία απαντούν στη φύση σε είδη *Drosophila yakuba*, *Drosophila teissieri* και *Drosophila santomea* (σύμπλεγμα *yakuba*) δεν επάγουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (*mod*-) (Zabalou *et al.* 2004a), η μεταφορά των στελεχών αυτών σε γενετικό υπόβαθρο *Drosophila simulans* προκαλεί μετάπτωση του φαινοτύπου σε (*mod*+) και δυνατότητα επαγωγής κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας η οποία μπορεί να φτάσει έως και 100%. Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν περιπτώσεις μετάπτωσης μεταξύ διαφορετικών φαινοτύπων όπως είναι αυτό του στελέχους της *Wolbachia* το οποίο μολύνει το λεπιδόπτερο *Cadra cautella*. Το στέλεχος αυτό επάγει κανονικά κυτταροπλασματική ασυμβατότητα αλλά όταν μεταφερθεί στο είδος λεπιδοπτέρου *Anagasta kuehniella* (πρώην *Ephestia kuehniella*) προκαλεί θανάτωση των αρσενικών (Sasaki & Ishikawa 2000). Επίσης το είδος *Drosophila recens* είναι μολυσμένο με ένα στέλεχος της *Wolbachia* το οποίο επάγει κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Όταν το ίδιο στέλεχος μεταφερθεί στο αδελφό είδος *Drosophila subquinaria* τότε ο φαινότυπος μεταπίπτει σε θανάτωση των αρσενικών ατόμων (Jaenike 2007b). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τόσο βακτηριακοί παράγοντες όσο και το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή, συμμετέχουν στην έκφραση των φαινοτύπων της *Wolbachia*.

1.2.4 Η συμβολή της *Wolbachia* στις ειδογενετικές διαδικασίες και την αύξηση της βιοποικιλότητας

Δύο είναι τα χαρακτηριστικά εκείνα τα οποία ξεχωρίζουν την *Wolbachia* μεταξύ των υποχρεωτικά ενδοκυττάρων συμβιωτικών βακτηρίων. Το πρώτο είναι η ευρεία εξάπλωση του βακτηρίου. Η *Wolbachia* θεωρείται από τα πλέον διαδεδομένα συμβιωτικά βακτήρια στον πλανήτη μολύνοντας τουλάχιστον τα αρθρόποδα και τους νηματώδεις ενώ υπολογίζεται ότι πάνω από το 65% των ειδών εντόμων (Hilgenboecker *et al.* 2008) είναι μολυσμένα με το βακτήριο, αριθμός που αντιστοιχεί σε περίπου 10^6 είδη εντόμων. Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι η εντυπωσιακή ποικιλία των επιδράσεων που είναι σε θέση να προκαλέσει στους ξενιστές της. Η *Wolbachia* μπορεί να προκαλέσει τη θανάτωση των αρσενικών ατόμων, να τα μετατρέψει σε θηλυκά, να στειρώσει μη μολυσμένα θηλυκά άτομα αλλά μπορεί να αναπτύξει και σχέσεις αμοιβαίας συμβίωσης με τους ξενιστές της. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, η *Wolbachia* έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των εξελικτικών βιολόγων για τη συμβολή της στην επιτάχυνση ειδογενετικών διεργασιών.

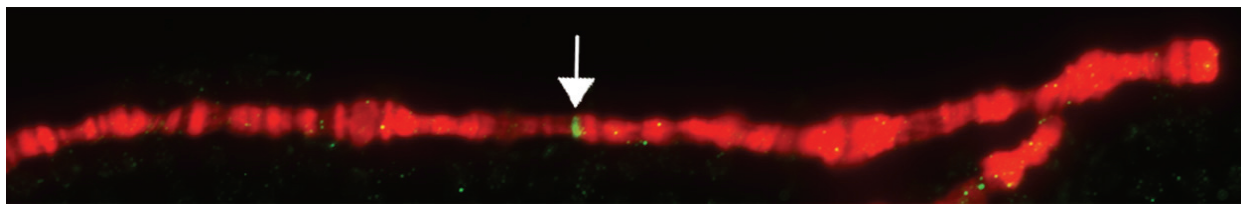
Για παράδειγμα, η πιθανή συμβολή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που επάγεται από την *Wolbachia* σε ειδογενετικές διεργασίες είχε προταθεί από τις πρώτες κιόλας μελέτες του χαρακτηρισμού του φαινομένου (Laven 1959; Werren 1998; Hurst & Schilthuisen 1998; Bordenstein 2003). Η βασική ιδέα είναι ότι μέσω της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας μπορεί να αποτραπεί ή να μειωθεί η γονιδιακή ροή μεταξύ των ασύμβατων πληθυσμών, γεγονός που θα μπορούσε εν δυνάμει να οδηγήσει στη διαφοροποίηση τους σε νέα είδη. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι, σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, πολλά είδη εντόμων είναι μολυσμένα με διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia* (Merçot *et al.* 1995; Baudry *et al.* 2003; Keller *et al.* 2004). Επίσης, υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες η αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μεταξύ πληθυσμών πολύ συγγενικών ειδών που είναι μολυσμένοι με ασύμβατα μεταξύ τους στελέχη *Wolbachia* μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα αναπαραγωγικής απομόνωσης, ακόμη και στην περίπτωση συμπατρικών πληθυσμών, γεγονός που θα μπορούσε εν δυνάμει να οδηγήσει στη διαφοροποίηση τους σε νέα είδη. Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση αδελφών ειδών του γένους *Nasonia* (Bordenstein *et al.* 2001) αλλά και μεταξύ των ειδών *Drosophila recens* και *Drosophila subquinaria* (Shoemaker *et al.* 1999). Αν και η συμβολή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας στην επιτυχή μείωση της γονιδιακής ροής μεταξύ φυσικών πληθυσμών παραμένει ακόμα ως ένα βαθμό αμφιλεγόμενη, θεωρητικές μελέτες δείχνουν ότι τόσο η αμφίδρομη όσο και η μονόδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορούν να περιορίσουν σημαντικά τη γονιδιακή ροή μεταξύ παραπατρικών πληθυσμών (Telschow *et al.* 2002; Telschow *et al.* 2005b; Telschow *et al.* 2007). Επίσης έχει βρεθεί ότι η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα μπορεί να οδηγήσει και στην εμφάνιση προσυζευκτικής απομόνωσης ενισχύοντας (reinforcement) με αυτόν τον τρόπο την αναπαραγωγική απομόνωση και σταδιακά την γενετική απόκλιση των πληθυσμών (Telschow *et al.* 2005a; Janicke *et al.* 2006; Koukou *et al.* 2006). Ο λόγος για τον οποίο μπορεί να συμβαίνει αυτό είναι ότι εφόσον σε μία διασταύρωση δεν υπάρχουν απόγονοι, η διασταύρωση αυτή “σπαταλά” τους γαμέτες. Έτσι, θα επιλεγούν εκείνα τα άτομα που θα προτιμούν να ζευγαρώνουν με άλλα συμβατά άτομα (Bordenstein 2003).

Εκτός όμως από την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, και οι υπόλοιπες αναπαραγωγικές επιδράσεις της *Wolbachia* μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο σε ειδογενετικές διεργασίες. Η εξάπλωση στελεχών της *Wolbachia* τα οποία προκαλούν θηλυκοποίηση πιθανά να έχει οδηγήσει σε αλλαγή του συστήματος φυλοκαθορισμού. Συγκεκριμένα, η *Wolbachia* λειτουργεί ως ο καθοριστικός παράγοντας για την παραγωγή θηλυκών ατόμων και ισορροπεί με τα γονίδια του ξενιστή τα οποία “προσπαθούν” να αντισταθμίσουν την επίδραση και τη μετάδοση του βακτηρίου λειτουργώντας με τη σειρά τους ως παράγοντες για την παραγωγή αρσενικών

ατόμων (Charlat *et al.* 2003). Επίσης, υπάρχουν στοιχεία ότι στελέχη της *Wolbachia* τα οποία επάγουν παρθενογένεση έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν στην εξέλιξη αυστηρώς παρθενογενετικών ειδών εντόμων όπως στην περίπτωση ατόμων του είδους *Muscidifurax uniraptor* (Υμενόπτερα) τα οποία χάνουν την ικανότητα σεξουαλικής αναπαραγωγής μετά την απομάκρυνση της *Wolbachia* με αποτέλεσμα ο ξενιστής να είναι πλήρως εξαρτημένος από το συμβιώτη για την αναπαραγωγή του (Gottfried & Zchori-Fein 2001).

Άλλος ένας τρόπος με τον οποίο η *Wolbachia* πιθανά να επιταχύνει τις εξελικτικές διαδικασίες είναι μέσω της ταχείας εξέλιξης των γονιδίων των ξενιστών της. Συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι η *Wolbachia* λόγω των στενών αλληλεπιδράσεων με τους μηχανισμούς φυλοκαθορισμού, γαμετο-γένεσης αλλά και τις διεργασίες του κυτταρικού κύκλου προκαλεί την αύξηση του εξελικτικού ρυθμού των γονιδίων εκείνων που εκφράζονται στους αναπαραγωγικούς ιστούς των ξενιστών της στην προσπάθειά τους να αντισταθμίσουν τις επιπτώσεις της μόλυνσης (Charlat *et al.* 2003; Werren *et al.* 2008).

Ωστόσο η μεγαλύτερη ίσως επίδραση που θα μπορούσε να έχει η *Wolbachia* σε εξελικτικές διαδικασίες προέρχεται από τη δυνατότητα μεταφοράς βακτηριακών γονιδίων στα χρωμοσώματα των ξενιστών της. Αυτή η οριζόντια μεταφορά γονιδίων από τη *Wolbachia* στα ασπόνδυλα φαίνεται να είναι πολύ διαδεδομένη (Kondo *et al.* 2002, Hotopp *et al.* 2007; Nikoh *et al.* 2008). Περίπου στο ένα-τρίτο των γονιδιωμάτων των ασπόνδυλων που έχουν αποκωδικοποιηθεί μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί ενθέσεις γονιδιακών τμημάτων της *Wolbachia* (Werren *et al.* 2008) τα οποία μπορεί να φτάνουν στο μέγεθος ενός πλήρους γονιδιώματος της *Wolbachia* (>1 Mb στο είδος *Drosophila ananassae*) (εικόνα 1.6). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε κάποιες από τις περιπτώσεις ορισμένα από τα εντεθειμένα γονίδια εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα μεταγραφής ενώ άλλα έχουν κατακερματιστεί από μεταθέσιμα στοιχεία της *Drosophila* (Hotopp *et al.* 2007). Δημιουργείται λοιπόν το ερώτημα εάν αυτού του είδους οι ενθέσεις μπορούν να εξελιχθούν σε νέες λειτουργίες για τον ξενιστή. Αν και αυτό δεν έχει αποδειχτεί ακόμα, η ευρεία εξάπλωση της *Wolbachia* μεταξύ των αθροπόδων καθώς και η συχνή εμφάνιση τέτοιων φαινομένων οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού αυξάνει τις πιθανότητες κάποιες από αυτές τις περιπτώσεις να εξελιχθούν σταδιακά σε νέα λειτουργικά γονίδια. Κάτι τέτοιο δεν είναι καθόλου νέο στη φύση αρκεί να αναλογιστούμε την περίπτωση ενός μακρινού συγγενή της *Wolbachia* αυτού των μιτοχονδρίων. Ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της ενδοσυμβιωτικής προέλευσης των μιτοχονδρίων, η οποία οδήγησε στην εξέλιξη των σύγχρονων μορφών ζωής πάνω στον πλανήτη, ήταν η σταδιακή μεταφορά ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων των μιτοχονδρίων στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα (Blanchard & Lynch 2000).



Εικόνα 1.6. Εικόνα πολυταινικού χρωμοσώματος της *Drosophila ananassae* (κόκκινο) το οποίο έχει υβριδοποιηθεί με έναν ιχνηθέτη που αναγνωρίζει μια γενετική περιοχή του γονιδιώματος της *Wolbachia* (πράσινο). (Hotopp *et al.* 2007)

1.2.5 Πρακτικές εφαρμογές: Η *Wolbachia* ως μέσο καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων

Είναι γνωστό ότι τόσο τα έντομα όσο και οι νηματώδεις της φιλαρίας προκαλούν σοβαρά προβλήματα σε παγκόσμιο επίπεδο στους τομείς της υγείας, της γεωργίας, των δασών και του φυσικού περιβάλλοντος. Στην περίπτωση των επιβλαβών εντόμων, οι συνήθεις πρακτικές για τον έλεγχο των πληθυσμών τους περιλαμβάνουν τόσο την ευρεία χρήση χημικών εντομοκτόνων όσο και την χρήση βιολογικών μεθόδων (Bourtzis & Robinson 2006). Η χρήση χημικών για την καταπολέμηση των βλαβερών εντόμων θεωρείται μέχρι στιγμής η πιο αποτελεσματική, αλλά συνοδεύεται από πολλά μειονεκτήματα. Τα πιο σημαντικά μειονεκτήματα είναι η μόλυνση του φυσικού περιβάλλοντος και του υδροφόρου ορίζοντα, η άμεση και έμμεση απειλή της υγείας, καθώς και το υψηλό κόστος. Επίσης η εκτεταμένη χρήση χημικών παρουσιάζει και περιορισμούς όπως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα έντομα απέναντι στις δραστικές ουσίες, που καθιστούν τη χημική αντιμετώπισή τους αναποτελεσματική (Curtis *et al.* 1993; Bourtzis & Robinson 2006). Αντίθετα, οι βιολογικές μέθοδοι ελέγχου είναι πολλά υποσχόμενες και έχουν αρχίσει να κερδίζουν πρόσφορο έδαφος ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες. Οι πιο κλασικές τεχνικές περιλαμβάνουν την χρήση άλλων οργανισμών όπως παρασιτοειδών, θηρευτών, μυκήτων, βακτηρίων, και ιών, για την καταστολή και την καταπολέμηση των επιβλαβών ειδών (Caltagirone 1981). Ωστόσο εκφράζονται σοβαρές ανησυχίες σε ότι αφορά τις πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις της εισαγωγής και χρήσης “εξωτικών” ειδών σε αυτά τα προγράμματα βιολογικού ελέγχου (Van Lenteren *et al.* 2003). Από τις πιο διαδεδομένες σήμερα βιολογικές μεθόδους καταπολέμησης επιβλαβών ειδών, με πληθώρα προγραμμάτων να είναι σε εξέλιξη, είναι αυτή του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique – SIT) στόχος της οποίας είναι η μείωση της γονιμότητας στον πληθυσμό – στόχο (Bourtzis & Robinson 2006).

Τις τελευταίες δεκαετίες η *Wolbachia*, λόγω της ευρείας εξάπλωσής της και των αναπαραγωγικών φαινοτύπων που επάγει στους ξενιστές της, έχει προσελκύσει ένα τεράστιο ενδιαφέρον ως προς την προοπτική χρήσης της ως ένα νέο και περιβαλλοντικά φιλικό εργαλείο βιολογικού ελέγχου επιβλαβών ειδών (Bourtzis & Robinson 2006; Ioannidis & Bourtzis 2007; Bourtzis 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πιο κοινός και πλέον μελετημένος φαινότυπος της

κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Έχουν προταθεί δύο κυρίως τρόποι χρήσης του φαινομένου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας: α) ως ένα εργαλείο πληθυσμιακής καταστολής ανάλογο της μεθόδου του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique – SIT) και β) ως μηχανισμός εξάπλωσης επιθυμητών γενοτύπων (gene driving system) όπως για παράδειγμα γονίδια τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα στη μετάδοση ασθενειών από έντομα φορείς.

Η δυνατότητα χρήσης ενός συστήματος κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας σε μια προσπάθεια καταστολής πληθυσμών κουνουπιού φορέων της φιλαρίωσης είχε γίνει αντιληπτή πριν καν αποδοθούν στη *Wolbachia* τα φαινόμενα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας τα οποία είχαν παρατηρηθεί μεταξύ πληθυσμών του κουνουπιού *Culex pipiens* (Laven 1967). Η τεχνική αυτή έγινε γνωστή και ως η τεχνική του ασύμβατου εντόμου (Incompatible Insect Technique – IIT) (Boller & Bush 1974; Zabalou *et al.* 2004b; Zabalou *et al.* 2009) και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την τεχνική του στείρου εντόμου καθώς κοινός τους στόχος είναι η μείωση της γονιμότητας στον πληθυσμό – στόχο (Bourtzis & Robinson 2006). Η τεχνική του ασύμβατου εντόμου περιλαμβάνει τη μαζική απελευθέρωση μολυσμένων αρσενικών εντόμων των οποίων η διασταύρωση με μη μολυσμένα θηλυκά (μονόδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα) ή θηλυκά άτομα με διαφορετική μόλυνση (αμφίδρομη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα) δεν παράγει απογόνους. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε πιλοτικά πειράματα τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα (Brower 1978; Russ & Faber 1978; Zabalou *et al.* 2004b; Xi *et al.* 2005; Zabalou *et al.* 2009) όσο και στο πεδίο (Laven 1967) για την καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων όπως τα κουνούπια *Culex pipiens* και *Aedes aegypti*, λεπιδόπτερα του είδους *Cadra cautella*, την μύγα του κερασιού *Rhagoletis cerasi* και τη μύγα της Μεσογείου *Ceratitis capitata* με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Το πλεονέκτημα της εφαρμογής μιας τέτοιας μεθόδου έγκειται από τη μια στο γεγονός ότι η *Wolbachia* απαντά σε έναν τεράστιο αριθμό ειδών εντόμων στη φύση στα οποία περιλαμβάνονται και επιβλαβή είδη. Από την άλλη, υπάρχει η δυνατότητα να μεταφέρουμε και να επιμολύνουμε με το βακτήριο πληθυσμούς εντόμων που δεν είναι μολυσμένοι (Zabalou *et al.* 2004b; Xi *et al.* 2005; Ruang-areerate & Kittayapong 2006) και στη συνέχεια να τα χρησιμοποιήσουμε σε μια προσπάθεια καταστολής των φυσικών πληθυσμών.

Εκμεταλλεόμενοι την ικανότητά της να εξαπλώνεται γρήγορα σε έναν πληθυσμό μέσω της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, η *Wolbachia* μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και ως σύστημα εξάπλωσης επιθυμητών γενοτύπων (gene driving system) σε πληθυσμούς επιβλαβών εντόμων (Sinkins & O'Neill 2000; Sinkins & Godfray 2004; Sinkins & Gould 2006). Κάθε μητρικά κληρονομήσιμος παράγοντας όπως τα μιτοχόνδρια, συμβιωτικά βακτήρια και ιοί ή τα γονίδια τα οποία εκφράζονται από τους παράγοντες αυτούς έχουν την δυνατότητα να εξαπλωθούν μαζί με την *Wolbachia* (Beard *et al.* 1993; Bourtzis & O'Neill 1998). Στην περίπτωση των φο-

ρέων ασθενειών αυτά τα γονίδια μπορεί να στοχεύουν τον παρασιτικό μικροοργανισμό είτε σκοτώνοντάς τον κατά την είσοδο στον εν λόγω φορέα είτε εμποδίζοντας τη μετάδοσή του (Sinkins & Gould 2006). Επίσης έχει προταθεί η έμμεση χρήση της *Wolbachia* για την εξάπλωση επιθυμητών γονιδίων τα οποία θα ενσωματώνονται σε “κασέτες” μαζί με τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας όταν αυτά ανακαλυφθούν (Sinkins *et al.* 1997). Θεωρητικά μοντέλα ενισχύουν αυτή την υπόθεση (Sinkins & Godfray 2004).

Τα τελευταία χρόνια εξετάζονται και νέοι τρόποι με τους οποίους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η *Wolbachia* στις προσπάθειες βιολογικής καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων όπως για παράδειγμα η χρήση στελεχών τα οποία προκαλούν μείωση του χρόνου ζωής των ξενιστών τους όπως το στέλεχος *wMelpopcorn* (Min & Benzer 1997; McGraw *et al.* 2002; Cook *et al.* 2008; McMeniman *et al.* 2009; Turley *et al.* 2009). Μάλιστα, μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία του στελέχους *wMelpopcorn* στο κουνούπι *A. aegypti* προκαλεί την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσοαπόκριση (Kambris *et al.* 2009). Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των νηματωδών της φιλαρίασης που μεταφέρονται μέσω του κουνουπιού (Kambris *et al.* 2009). Παρόμοια “επιθετικά” στελέχη της *Wolbachia* έχουν επίσης περιγραφεί και στα χερσαία ισόποδα υποδηλώνοντας ότι αυτή η γενετική ιδιότητα μπορεί να είναι διαδεδομένη μεταξύ των στελεχών (Bourtzis 2008). Η χρήση τέτοιων “επιθετικών” στελεχών μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στον έλεγχο εντόμων – φορέων στα οποία ο παράγοντας της ασθένειας απαιτεί ένα μακρόχρονο χρονικό διάστημα επώασης μέσα στον φορέα, όπως στην περίπτωση του δάγκειου πυρετού που μεταφέρεται μέσω κουνουπιών του γένους *Aedes* (Brownstein *et al.* 2003).

Τέλος, στην περίπτωση του νηματώδη της φιλαρίασης, η *Wolbachia* φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια όπως προκύπτει από μελέτη στην οποία αποδεικνύεται ο ρόλος των βακτηριακών πρωτεϊνών στη φλεγμονώδη αντίδραση ατόμων μολυσμένων με το νηματώδη (Saint Andre *et al.* 2002). Η παρατήρηση αυτή μαζί με το γεγονός ότι η *Wolbachia* έχει εγκαθιδρύσει μια σχέση αμοιβαίας συμβίωσης με το νηματώδη ξενιστή ενώ η παρουσία της θεωρείται καταλυτικής σημασίας για τη γονιμότητα και επιβίωση του (Bandi *et al.* 1998; Taylor *et al.*, 2000a; Taylor *et al.*, 2000b), έχει οδηγήσει σε μια προσπάθεια ανάπτυξης νέων φαρμάκων τα οποία θα έχουν πλέον ως στόχο τη *Wolbachia*. Τέτοιου είδους θεραπείες, σε συνδυασμό με τις κλασικές θεραπείες που εφαρμόζονται, είναι πολλά υποσχόμενες τόσο ως προς την κατεύθυνση την απομάκρυνσης των νηματωδών από άτομα που νοσούν όσο και στον μετριασμό των συμπτωμάτων της μόλυνσης (Werren *et al.* 2008).

1.2.6 Το γονιδίωμα της *Wolbachia*: κατανοώντας τις μοριακές αλληλεπιδράσεις με τους ξενιστές

Πώς η *Wolbachia* έχει καταφέρει και έχει εξαπλωθεί σε έναν τόσο μεγάλο αριθμό ειδών αρthropόδων αλλά και νηματωδών; Πως καταφέρνει να επάγει έναν τόσο μεγάλο αριθμό διαφορετικών φαινοτύπων; Ποια είναι η μοριακή βάση της επικοινωνίας και των αλληλεπιδράσεων της *Wolbachia* με τους ξενιστές της; Αυτά είναι μερικά από τα ερωτήματα τα οποία έχουν απασχολήσει και συνεχίζουν να απασχολούν τους επιστήμονες που μελετούν το βακτήριο. Δυστυχώς όμως, ο ενδοκυτταρικός τρόπος ζωής και οι πολύπλοκες διατροφικές συνήθειες που έχει αναπτύξει η *Wolbachia* καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξής της έχει καταστήσει αδύνατη μέχρι στιγμής την καλλιέργεια και τη μελέτη της μέσω των κλασικών μεθόδων γενετικής. Σε αυτήν την περίπτωση, τα δεδομένα τα οποία προκύπτουν από τη μερική ή την πλήρη αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος τους παρέχουν τη βάση για την κατανόηση σε μοριακό επίπεδο της πολύπλοκης βιολογίας παρόμοιων συμβιωτικών μικροοργανισμών. Μέχρι στιγμής έχουν αποκωδικοποιηθεί τα γονιδιώματα τεσσάρων στελεχών του βακτηρίου της *Wolbachia*: (α) του στελέχους wMel το οποίο επάγει μέτριας έντασης κυτταροπλασματική ασυμβατότητα στη *Drosophila melanogaster* και αποτελεί μάλιστα το πρώτο γονιδίωμα στελέχους της *Wolbachia* που αποκωδικοποιήθηκε (Wu *et al.* 2004), (β) του στελέχους wBm το οποίο αναπτύσσει υποχρεωτική και αμοιβαίας ωφέλειας σχέση με το νηματώδη της φιλαρίας *Brugia malayi* (Foster *et al.* 2005), (γ) του στελέχους wPip το οποίο επάγει ισχυρή κυτταροπλασματική ασυμβατότητα σε πληθυσμούς του κουνουπιού *Culex pipiens* (Klasson *et al.* 2008) και (δ) του στελέχους wRi το οποίο επάγει επίσης ισχυρή κυτταροπλασματική ασυμβατότητα στη *Drosophila simulans* (Klasson *et al.* 2009a). Επίσης, αν και μερικώς αποκωδικοποιημένα, τα γονιδιώματα δύο στελεχών της *Wolbachia* (wAna και wSim) προέκυψαν ως παραπροϊόντα της αποκωδικοποίησης των γονιδιωμάτων των ξενιστών τους *Drosophila ananassae* και *Drosophila simulans* αντίστοιχα (Salzberg *et al.* 2005a, 2005b). Τέλος, μια πληθώρα στελεχών αντιπροσωπευτικών της φαινοτυπικής ποικιλότητας της *Wolbachia* βρίσκονται αυτή τη στιγμή στο στάδιο της αποκωδικοποίησης ή στα τελικά στάδια της ανάλυσης των δεδομένων (Πίνακας 1.1).

Τα γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος της *Wolbachia* μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με αυτά των γονιδιωμάτων άλλων δευτερευόντων συμβιωτικών βακτηρίων και αντικατοπτρίζουν το γενετικό μινιμαλισμό που χαρακτηρίζει την προσαρμογή τους σε έναν αυστηρώς ενδοκυττάριο τρόπο διαβίωσης. Το μέγεθος του γονιδιώματος της *Wolbachia* είναι μικρό και κυμαίνεται από 1.08 Mb στο στέλεχος wBm έως και ~1.7 Mb που είναι το εκτιμώμενο μέγεθος του γονιδιώματος του στελέχους wVul που μολύνει το χερσαίο ισόποδο *Armadillidium vulgare* ενώ το ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης στο γονιδίωμα (%GC) βρίσκεται μεταξύ 34 – 35%. Παρό-

λο όμως το γενετικό μινιμαλισμό, το γονιδίωμα της *Wolbachia*, με εξαίρεση ίσως αυτό του στελέχους wBm, στερείται της σταθερότητας που χαρακτηρίζει τα γονιδιώματα των πρωτευόντων συμβιωτικών μικροοργανισμών που έχουν αναπτύξει μακροχρόνιες σχέσεις αμοιβαίας ωφέλειας με τους ξενιστές τους όπως είναι τα στελέχη της *Buchnera* (Tamas *et al.* 2002; Silva *et al.* 2003; Moran *et al.* 2008). Το γονιδίωμα της *Wolbachia* χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού μεταθετών στοιχείων (mobile genetic elements), βακτηριοφάγων και επαναλαμβανόμενων περιοχών, στοιχεία τα οποία προσδίδουν μεγάλη γενετική πλαστικότητα στο βακτήριο (Wu *et al.* 2004; Klasson *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2009).

Πίνακας 1.1. Προγράμματα αποκωδικοποίησης γονιδιωμάτων της *Wolbachia*.

Στέλεχος <i>Wolbachia</i>	Ξενιστής	Υπερομάδα	Φαινότυπος	Κατάσταση	Αναφορά	Κωδικός GeneBank
wMel	<i>Drosophila melanogaster</i>	A	KA	ολοκληρωμένο	Wu <i>et al.</i> 2004	AE017196
wBm	<i>Brugia malayi</i>	D	ΑΣ	ολοκληρωμένο	Foster <i>et al.</i> 2005	AE017321
wRi	<i>D. simulans</i>	A	KA	ολοκληρωμένο	Klasson <i>et al.</i> 2009	CP001391
wPip	<i>Culex pipiens</i>	B	KA	ανολοκληρωτό	Klasson <i>et al.</i> 2008	AM999887
wUni	<i>Muscidifurax uniraptor</i>	A	Π	ανολοκληρωτό	Klasson <i>et al.</i> 2009	ACFP00000000
wSim	<i>D. simulans</i>	A	άγνωστο	ανολοκληρωτό	Salzberg <i>et al.</i> 2005	AAGC00000000
wAna	<i>D. ananassae</i>	A	άγνωστο	ανολοκληρωτό	Salzberg <i>et al.</i> 2005	AAGB00000000
wVul	<i>Armadillidium vulgare</i>	B	Θ	υπό εξέλιξη	-	-
wMelPop	<i>D. melanogaster</i>	A	KA	υπό εξέλιξη	-	-
wDim	<i>Dirofilaria immitis</i>	C	ΑΣ	υπό εξέλιξη	-	-
wOv	<i>Onchocerca volvulus</i>	C	ΑΣ	υπό εξέλιξη	-	-

Πηγή: Werren *et al.* 2008

KA: Κυτταροπλασματική Ασυμβατότητα; ΑΣ: Αμοιβαία Συμβίωση; Π: Παρθενογένεση; Θ: Θηλυκοποίηση

1.2.6.1 Επαναλαμβανόμενα μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία

Τα μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία (Transposable elements) αποτελούν αυτόνομες αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν την ικανότητα της αυτομετακίνησης από τη μία θέση ενός χρωμοσώματος σε μια άλλη θέση (Siguier *et al.* 2006). Η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων στο βακτήριο της *Wolbachia* έγινε το 1999 από τον Masui και συνεργάτες (Masui *et al.* 1999) οι οποίοι εντόπισαν πάνω 20 αντίγραφα ενός μεταθέσιμου στοιχείου της οικογένειας των “Ένθετων Αλληλουχιών” (Insertion Sequences) IS200 στο γονιδίωμα του στελέχους *wTai* το οποίο μολύνει γρύλους του είδους *Teleogryllus taiwanemma*. Αν και ο αριθμός αυτός είναι εκπληκτικός δεδομένου της συμβιωτικής φύσης του βακτηρίου, το πλήρες εύρος του αριθμού τους και η ποικιλότητα των γενετικών αυτών στοιχείων έγινε αντιληπτή μόνο μετά την αποκωδικοποίηση των γονιδιωμάτων της *Wolbachia*. Η πυκνότητα των μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων μπορεί να αναλογεί έως και το 22% του γονιδιώματος της *Wolbachia* ενώ σε αυτά περιλαμβάνεται μια μεγάλη ποικιλία τόσο ένθετων στοιχείων αλληλουχιών (IS) όσο και ρετροστοιχείων καθώς επίσης και μια σειρά νέων μη χαρακτηρισμένων μεταθέσιμων στοιχείων τα οποία δεν μπορούν τα καταταχθούν σε κάποια από τις γνωστές οικογένειες (Wu *et al.* 2004; Foster *et al.* 2005; Klasson *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2009a). Αν και πολλά από αυτά φαίνεται να βρίσκονται σε στάδιο απενεργοποίησης, όπως υποδηλώνουν και οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στα γονίδια των τρανσποζασών τους, κάποιες από τις οικογένειες των μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων φαίνεται να παρουσιάζουν πρόσφατη και μεγάλη ενεργότητα καθώς επίσης και δυνατότητα συχνής οριζόντιας μεταφοράς μεταξύ στελεχών της *Wolbachia* κάτι που μπορεί εν μέρει να εξηγήσει την ασυνήθιστα μεγάλη πυκνότητα των μεταθέσιμων στοιχείων σε αυτόν τον συμβιωτικό μικροοργανισμό (Wu *et al.* 2004; Cordaux *et al.* 2008).

Γιατί όμως ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο συμβιωτικό βακτήριο έχει συσσωρεύσει έναν τόσο μεγάλο αριθμό μεταθέσιμων στοιχείων δεν είναι πλήρως κατανοητό. Οι επιστήμονες ωστόσο έχουν παρατηρήσει ότι τα ενδοκυττάρια βακτήρια έχουν την τάση να συσσωρεύουν μεταθέσιμα στοιχεία στο γονιδίωμά τους κατά τα πρώτα στάδια της προσαρμογής τους στον ενδοκυττάριο τρόπο ζωής (Moran & Plague 2004; Bordenstein & Reznikoff 2005). Για να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο, οι επιστήμονες πρότειναν μια υπόθεση σύμφωνα με την οποία η επίδραση της αρνητικής επιλογής πάνω στο γονιδίωμα μειώνεται κατά την μετάβαση από την ελεύθερη διαβίωση στον ενδοκυττάριο τρόπο ζωής με αποτέλεσμα γονίδια τα οποία είναι πλέον περιττά ή μικρής σημασίας να γίνονται στόχος ενθέσεων χωρίς αυτό να έχει αρνητική επίδραση στον μικροοργανισμό (Moran & Plague 2004). Η επίδραση των μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων είναι ωστόσο πολύ μεγάλη. Η μετάθεση τους προκαλεί την απενεργοποίηση γονιδίων τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται σταδιακά συμβάλλοντας στο γενικότερο μινιμαλισμό που χαρακτηρί-

ζει τον ενδοκυττάριο τρόπο ζωής. Επίσης, η επαναλαμβανόμενη μετάθεση των στοιχείων αυτών δημιουργεί ομόλογες περιοχές διασκορπισμένες πάνω στο χρωμόσωμα. Αυτές οι περιοχές αποτελούν τη βάση ενός αυξημένου ρυθμού χρωμοσωμικών αναδιατάξεων μέσω του φαινομένου του ανασυνδυασμού, όπως έχει παρατηρηθεί από τη σύγκριση των γονιδιωμάτων της *Wolbachia* (Klasson *et al.* 2009). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αφθονία μεταθέσιμων στοιχείων, μέσω των αναδιατάξεων που επάγουν, προσδίδει ευπλαστότητα στα γονιδιώματα της *Wolbachia* επιδρώντας στην προσαρμοστικότητα του βακτηρίου (Foster *et al.* 2005).

1.2.6.2 Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί οι οποίοι μολύνουν προκαρυωτικά κύτταρα και αποτελούν την πληθύτερη και πλέον διαδεδομένη ομάδα οργανισμών στον πλανήτη (Hendrix *et al.* 1999; Bordenstein & Reznikoff 2005). Αποτελούν επίσης μια από τις δυναμικότερες ομάδες αυτομετακινούμενων γενετικών στοιχείων στα βακτήρια καθώς διαθέτουν την ικανότητα της μεταφοράς γενετικών πληροφοριών μεταξύ απομονωμένων πληθυσμών του ίδιου ή και διαφορετικού είδους μικροοργανισμών συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην αύξηση της βακτηριακής ποικιλότητας (Casjens 2003). Οι ιδιαίτερα μολυσματικοί βακτηριοφάγοι (virulent phages) εκμεταλλεύονται τους μηχανισμούς του ξενιστή τους προκειμένου να πολλαπλασιάσουν το γενετικό τους υλικό και να παράγουν τα δομικά τους στοιχεία και στη συνέχεια απελευθερώνονται στο εξωτερικό περιβάλλον προκαλώντας τη λύση και το θάνατο του βακτηρίου (λυτικός κύκλος). Από την άλλη μεριά οι ήπιες μορφές βακτηριοφάγοι (temperate phages), αντί της προηγούμενης λυτικής οδού, εισέρχονται σε μια κατάσταση που λέγεται λυσιγονία κατά την οποία το γονιδίωμά τους ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή ως προφάγος έχοντας την δυνατότητα να περάσει με παθητικό τρόπο στις επόμενες γενιές.

Οι προφαγικές αλληλουχίες είναι γενετικά στοιχεία που απαντώνται αρκετά συχνά στα γονιδιώματα των ελευθέρως διαβιούντων βακτηρίων καθώς και στα προαιρετικώς ενδοκυττάρια βακτήρια (Bordenstein & Reznikoff 2005). Η παρουσία τους, ωστόσο, στα ενδοσυμβιωτικά βακτήρια κάθε άλλο παρά συνηθισμένη μπορεί να χαρακτηριστεί. Σε αντίθεση με τα γονιδιώματα των ενδοσυμβιωτικών μικροοργανισμών που αναπτύσσουν μακροχρόνιες και αμοιβαίας ωφέλειας σχέσεις με τους ξενιστές τους όπου τα προφαγικά στοιχεία απουσιάζουν πλήρως (Bordenstein & Reznikoff 2005), το γονιδίωμα της *Wolbachia* αποτελεί εξαίρεση. Η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη φαγικών σωματίων στην *Wolbachia* έγινε το 1978 και βασίστηκε σε μικροσκοπικές παρατηρήσεις (Wright *et al.* 1978). Οι πρώτες εργασίες όμως, οι οποίες απέδειξαν την παρουσία προφαγικών στοιχείων στο γονιδίωμα της *Wolbachia* (ο προφάγος ονομάστηκε **WO** από το *Wolbachia* phage) και τα συσχέτισαν με την ύπαρξη των ισσωματίων, ήρθαν μετά από είκοσι

(20) χρόνια (Masui *et al.* 2000a; Masui *et al.* 2001). Με την αλληλούχηση του γονιδιώματος της *Wolbachia* αποκαλύφθηκε η ύπαρξη δύο βασικών οικογενειών του προφάγου οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν WO-A και WO-B αντίστοιχα (Wu *et al.* 2004). Χαρακτηριστικό είναι ότι διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia* διαθέτουν διαφορετικό αριθμό προφαγικών στοιχείων. Το στέλεχος wBm δεν περιέχει κανένα ίχνος προφαγικής αλληλουχίας (Foster *et al.* 2005) γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με τη σχέση αμοιβαίας συμβίωσης που έχει αναπτύξει το στέλεχος ή/και με την απουσία της ικανότητας επαγωγής αναπαραγωγικών φαινοτύπων. Από την άλλη μεριά, τα στελέχη wMel, wRi και wPip περιέχουν δύο (2), τέσσερα (4) και πέντε (5) προφάγους αντίστοιχα (Wu *et al.* 2004; Klasson *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2009a). Προφαγικά γονίδια επίσης βρέθηκαν και στα ατελή γονιδιώματα των στελεχών wAna και wSim (Salzberg *et al.* 2005a).

Από τις δύο οικογένειες προφάγων, ο WO-B φαίνεται να είναι ο πιο διαδεδομένος. Μοριακές και φυλογενετικές μελέτες αφενός τον έχουν κατατάξει σε τρεις υποομάδες (Bordenstein & Wernegreen 2004; Gavotte *et al.* 2004; Sanogo & Dodson 2004) και αφετέρου έχουν φανεώσει την ευρεία εξάπλωση του ανιχνεύοντας τον σε περίπου το 90% των στελεχών της *Wolbachia* που μελετήθηκαν (Bordenstein & Wernegreen 2004). Το πιο εντυπωσιακό όμως χαρακτηριστικό των προφάγων της *Wolbachia* είναι η ικανότητα που έχουν να μετακινούνται οριζόντια μεταξύ διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου, στελέχη τα οποία μπορεί να ανήκουν και σε διαφορετικές υπερομάδες (π.χ. μεταξύ στελεχών της A και B υπερομάδας) (Masui *et al.* 2000; Bordenstein & Wernegreen 2004; Gavotte *et al.* 2004). Οι Bordenstein και Wernegreen πρότειναν την υπόθεση της “ενδοκυττάριας αρένας” (intracellular arena hypothesis) σύμφωνα με την οποία είναι δυνατή η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ υποχρεωτικά ενδοκυττάρων βακτηρίων τα οποία μολύνουν τον ίδιο ξενιστή (Bordenstein & Wernegreen 2004). Αν και οι παραπάνω μελέτες αποδεικνύουν την ισχύ της υπόθεσης για στελέχη του ίδιου γένους δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν γενετικό υλικό μπορεί να μεταφερθεί μεταξύ συμβιωτικών βακτηρίων που ανήκουν σε διαφορετικά γένη και μολύνουν ταυτόχρονα τον ίδιο ξενιστή. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι μια περιοχή 10kb παρουσίαζε 70% ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο μεταξύ ενός στελέχους *Wolbachia* και ενός στελέχους *Rickettsia* (Ishmael *et al.* 2009). Η περιοχή αυτή στην *Wolbachia* οριοθετείται από προφαγικά γονίδια ενώ στην *Rickettsia* εντοπίζεται πάνω σε ένα πλασμίδιο και οριοθετείται από τρανσποζάσες. Αν και η κατεύθυνση και ο τρόπος μεταφοράς είναι δύσκολο να εξακριβωθούν, η περίπτωση αυτή αποτελεί την πρώτη ένδειξη οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού μεταξύ συμβιωτικών βακτηρίων τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά γένη ενισχύοντας έτσι την υπόθεση της “ενδοκυττάριας αρένας”. Και τα δύο είδη είναι δυνατόν να μολύνουν ταυτόχρονα τον ίδιο ξενιστή (*Ixodes scapularis*) παρέχοντας τη δυνατότητα μιας τέτοιας μεταφοράς (Benson *et al.* 2004). Η ικανότητα αυτή η οποία είναι μοναδική μεταξύ των υποχρεωτικά συμ-

βιωτικών μικροοργανισμών, μαζί με τα φαινόμενα ανασυνδυασμού που μπορούν να συμμετάσχουν τα γονίδια τους, κάνει τους προφάγους της *Wolbachia* μια σημαντική πηγή γενετικής ποικιλότητας που επηρεάζει την εξέλιξη του βακτηρίου (Bordenstein & Wernegreen 2004). Τέλος, εκτός από την τεράστια συμβολή που μπορεί να έχουν οι βακτηριοφάγοι στην αύξηση της ποικιλότητας μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia* λειτουργώντας ως μεταφορείς γενετικού υλικού, μελέτες δείχνουν ότι έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει άμεσα την έκφραση των αναπαραγωγικών φαινοτύπων όπως αυτός της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας ρυθμίζοντας την βακτηριακή πυκνότητα μέσω της εισόδου ή της εξόδου από τη λυσιγόνο κατάσταση (Bordenstein *et al.* 2006).

1.2.6.3 Διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ *Wolbachia*-ξενιστή και σύστημα έκκρισης τελεστών

Η εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων της *Wolbachia* και η επαγωγή των διαφόρων αναπαραγωγικών φαινοτύπων προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μηχανισμού επικοινωνίας μεταξύ της *Wolbachia* και των κυττάρων του ξενιστή. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, τα βακτήρια, παθογόνα αλλά και συμβιωτικά, έχουν αναπτύξει μια πληθώρα συστημάτων και μηχανισμών για τη διευκόλυνση αυτής της επικοινωνίας μέσω της μεταφοράς μακρομορίων όπως πρωτεΐνες και DNA από και προς τα κύτταρα των ξενιστών τους (Tseng *et al.* 2009). Ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς, το σύστημα έκκρισης τύπου 4 (Type IV Secretion System, T4SS) είναι γνωστό ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε έναν μεγάλο αριθμό παθογόνων και μη βακτηρίων όπως τα είδη *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Brucella* spp., *Bartonella henselae*, *Rickettsia prowazekii*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila* και *Mesorhizobium loti*. Η *Wolbachia* διαθέτει ένα πλήρες σετ γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν για τις βασικές υπομονάδες ενός T4SS (Masui *et al.* 2000b; Wu *et al.* 2004; Foster *et al.* 2005; Felix *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2008; Klasson 2009a; Pichon *et al.* 2009). Το T4SS σύστημα της *Wolbachia* είναι συγγενικό με το αντίστοιχο σύστημα του *Agrobacterium tumefaciens* (Frank *et al.* 2005) με τη διαφορά ότι λείπουν τα γονίδια εκείνα τα οποία κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δομή του ινιδίου (VirB1, -B2, -B5 και B7). Το ινίδιο συμμετέχει στην πρόσδεση πάνω στα κύτταρα του ξενιστή και η απουσία του πιθανόν να οφείλεται στον ενδοκυττάριο τρόπο διαβίωσης της *Wolbachia* (Pichon *et al.* 2009). Επίσης, σε αντίθεση με το *Agrobacterium tumefaciens*, τα γονίδια του T4SS της *Wolbachia* βρίσκονται κατανομημένα σε δύο ξεχωριστά οπερόνια (Wu *et al.* 2004; Foster *et al.* 2005; Felix *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2008; Klasson 2009a). Το πρώτο περιλαμβάνει τα γονίδια (*virB8*, -B9, -B10, -B11 και -D4) ενώ το δεύτερο τα γονίδια (*virB3*, -B4 και -B6). Η οργάνωση και η αλληλουχία των γονιδίων είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των στε-

λεχών της *Wolbachia* που είτε δρουν ως αναπαραγωγικά παράσιτα είτε αναπτύσσουν σχέσεις αμοιβαίας ωφέλειας (Pichon *et al.* 2009). Επίσης, και τα δύο οπερόνια είναι μεταγραφικώς ενεργά σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις και σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν γεγονός που υποδηλώνει ότι το T4SS της *Wolbachia* είναι λειτουργικό και απαραίτητο για την εγκαθίδρυση των διαφόρων συμβιωτικών σχέσεων με τους εκάστοτε ξενιστές (Masui *et al.* 2000; Wu *et al.* 2004; Felix *et al.* 2008; Rances *et al.* 2008; Klasson 2009a; Pichon *et al.* 2009). Παρόλα αυτά, ακόμη δεν έχει καταστεί δυνατόν η απόδοση συγκεκριμένης λειτουργίας για το T4SS της *Wolbachia* ούτε είναι ξεκάθαρο αν αυτό χρησιμοποιείται για να μεταφέρει πρωτεΐνες ή νουκλεοπρωτεΐνες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, οι σηματοδοτικές αλληλουχίες οι οποίες αναγνωρίζονται από τα T4SS δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένες και επομένως, δεν είναι δυνατή η πρόβλεψη των πρωτεϊνών τελεστών στη *Wolbachia*. Είναι ενδιαφέρον ότι στο ένα από τα δύο οπερόνια του T4SS της *Wolbachia* περιλαμβάνεται ένα παράλογο γονίδιο της κύριας επιφανειακής πρωτεΐνης (WSP) του βακτηρίου (Wu *et al.* 2004). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό εάν η πρωτεΐνη αυτή εκκρίνεται μέσω του T4SS ή αποτελεί κάποιο δομικό συστατικό του. Άλλη μια ενδιαφέρουσα ομάδα πρωτεϊνών – υποψήφιων τελεστών είναι οι πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης για τις οποίες θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω. Σε μια πρόσφατη μελέτη των προϊόντων έκκρισης του νηματώδη της φιλαρίασης *Brugia malayi*, που αναπτύσσει σχέσεις αμοιβαίας συμβίωσης με την *Wolbachia*, εντοπίστηκαν μεταξύ των άλλων δύο εκκρινόμενες πρωτεΐνες της *Wolbachia* με επαναλήψεις αγκυρίνης (Bennuru *et al.* 2009). Αν και δεν είναι σίγουρο αν αυτές εκκρίνονται μέσω του T4SS, μελέτες δείχνουν ότι σε άλλα ενδοκυττάρια παθογόνα βακτήρια, όπως η *Legionella* και η *Coxiella*, πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης αποτελούν μια νέα ομάδα τελεστών του T4SS (Pan *et al.* 2008).

1.2.6.4 Ο ρόλος του γενετικού ανασυνδυασμού στη *Wolbachia*

Ο γενετικός ανασυνδυασμός αφορά τη φυσική ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ δύο γενετικών τόπων. Υπάρχουν δύο βασικά είδη γενετικού ανασυνδυασμού: (α) ομόλογος ανασυνδυασμός (RecA εξαρτώμενος) και (β) μη ομόλογος ανασυνδυασμός. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός οδηγεί στη γενετική ανταλλαγή ομόλογων αλληλουχιών DNA από διαφορετικά γονιδιώματα ή από διαφορετικές θέσεις του ίδιου γονιδιώματος, ενώ ο μη ομόλογος επηρεάζει γονιδιακές αλληλουχίες που δεν είναι σχετικές μεταξύ τους. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι εξαιρετικά σημαντικός τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς αποτελεί έναν πανίσχυρο μηχανισμό αύξησης της γενετικής ποικιλομορφίας και επιτάχυνσης της γονιδιακής εξέλιξης. Φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού μπορούν να εντοπιστούν τόσο μεταξύ διαφορετικών γονιδίων (διαγονιδιακός ανασυνδυασμός ή intergenic recombination) όσο και

μεταξύ διαφορετικών αλληλομόρφων του ίδιου γονιδίου (ενδογονιδιακός ανασυνδυασμός ή intragenic recombination). Και οι δύο περιπτώσεις έχουν σημαντικές επιπτώσεις πάνω στη γονιδιακή εξέλιξη. Μέσω του διαγονιδιακού ανασυνδυασμού είναι δυνατή η μεταφορά νέων γονιδίων σε διαφορετικά γενωμικά υπόβαθρα και η εμφάνιση νέων γονιδιακών συνδυασμών αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη γενωμική ποικιλία. Ο ενδογονιδιακός ανασυνδυασμός από την άλλη, οδηγεί στη δημιουργία νέων γονιδιακών παραλλαγών ανασυνδυάζοντας διαφορετικά αλληλόμορφα και προάγοντας με τον τρόπο αυτό την εξέλιξη νέων φαινοτύπων (Rajalingam *et al.* 2004). Ωστόσο ο ανασυνδυασμός μπορεί να δημιουργήσει και προβλήματα κατά τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των βακτηριακών στελεχών. Τις περισσότερες φορές οι φυλογενετικές μελέτες δεν λαμβάνουν υπόψη την ύπαρξη ανασυνδυασμού με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος να εξαχθούν λάθος συμπεράσματα από τη φυλογενετική ανάλυση νουκλεοτιδικών περιοχών με διαφορετική εξελικτική ιστορία/προέλευση.

Φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού έχουν εντοπιστεί σε διάφορα βακτηριακά είδη, όπως *Neisseria* (Gibbs *et al.* 1989; Holmes *et al.* 1999), *Anaplasma* (Brayton *et al.* 2002; Meeus *et al.* 2003), *Leptospira* (Haake *et al.* 2004) και *Borrelia* (Cadavid *et al.* 1994; Rich *et al.* 2001). Τέτοια φαινόμενα παρατηρούνται τόσο σε γονίδια βασικών λειτουργιών όσο και σε γρήγορα εξελισσόμενα γονίδια όπως είναι αυτά που κωδικοποιούν για επιφανειακές πρωτεΐνες. Ειδικότερα στα δεύτερα, το φαινόμενο του ανασυνδυασμού θεωρείται υπεύθυνο για τη δημιουργία φαινοτυπικών ποικιλιών που πιθανότατα απαιτούνται για την προσαρμογή και εξέλιξη των βακτηρίων σε παρασιτικές αλληλεπιδράσεις. Ο γενετικός ανασυνδυασμός σε βακτήρια τα οποία κληρονομούνται μόνο μητρικά είναι πολύ σπάνιος, αν όχι απών (Moran 1996; Tamas *et al.* 2002). Σε αυτό το γεγονός πιθανότατα οφείλεται η απώλεια των γονιδίων εκείνων που είναι υπεύθυνα για τη διεκπεραίωση του γενετικού ανασυνδυασμού όπως στην περίπτωση του υποχρεωτικά συμβιωτικού βακτηρίου *Buchnera* από το γονιδίωμα της οποίας λείπουν απαραίτητα γονίδια των επιδιορθωτικών μηχανισμών όπως το *recA* (Tamas *et al.* 2002). Επίσης οι ασθενείς εξελικτικές πιέσεις που χαρακτηρίζουν το σχετικώς σταθερό και προστατευμένο ενδοκυττάριο περιβάλλον (Frank *et al.* 2002) δεν ευνοούν την εμφάνιση γενετικού ανασυνδυασμού. Τα παραπάνω επιβιώνονται από τα πολύ σταθερά, και με ελάχιστο γενετικό ανασυνδυασμό, γονιδιώματα διαφόρων ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων που απαντούν σε έντομα, όπως *Buchnera aphidicola* (ενδοσυμβιωτικό βακτήριο αφίδων), *Wigglesworthia glossinidia brevipalpis* (ενδοσυμβιωτικό βακτήριο μυγών τσε-τσε) και *Blochmannia* (ενδοσυμβιωτικό βακτήριο μυρμηγκιών) (Shigenobu *et al.* 2000; Akman *et al.* 2002; Tamas *et al.* 2002; van Ham *et al.* 2003; Degnan *et al.* 2005).

Σε αντίθεση με τα περισσότερα συμβιωτικά βακτήρια, στη *Wolbachia* ο ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών στελεχών φαίνεται να είναι ευρέως διαδεδομένος. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποι-

εί την κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη του βακτηρίου έχει βρεθεί ότι υπόκειται σε εκτεταμένα φαινόμενα ανασυνδυασμού (Werren and Bartos 2001; Reuter and Keller 2003; Keller *et al.* 2004; Malloch and Fenton 2005; Baldo *et al.* 2005). Επίσης φαινόμενα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε άλλες γενετικές περιοχές της *Wolbachia* όπως: (α) γονίδια βασικών λειτουργιών (Jiggings *et al.* 2001; Jiggins 2002; Baldo *et al.* 2006; Klasson *et al.* 2009a), (β) προφαγικά γονίδια (Bordenstein and Wernegreen 2004), (γ) αλληλουχίες ένθεσης (Duron *et al.* 2005), (δ) γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου 4 (Klasson *et al.* 2009a), (ε) η περιοχή έναρξης της αντιγραφής του βακτηρίου (Ioannidis *et al.* 2007) καθώς και (στ) το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA (Ros *et al.* 2009). Στην πραγματικότητα πολλά από τα στελέχη της *Wolbachia* είναι χιμαιρικά μεταξύ των διάφορων υπερομάδων όπως προέκυψε από την μελέτη του διαγονιδιακού ανασυνδυασμού ο οποίος ευθύνεται για την ανταλλαγή μεγάλων τμημάτων γενετικού υλικού μεταξύ των στελεχών (Baldo *et al.* 2006). Τα φαινόμενα ανασυνδυασμού στην *Wolbachia* πιστεύεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στη γρήγορη εξέλιξη της, στην προσαρμοστικότητα της αλλά και στην ανάπτυξη του μεγάλου αριθμού αναπαραγωγικών φαινοτύπων που επάγει στους ξενιστές.

1.2.7 Η *Wolbachia* και το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή

Προκειμένου όμως η *Wolbachia* να εξασφαλίσει μια σταθερή συμβιωτική σχέση με τον εκάστοτε ξενιστή και να επάγει τους διάφορους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους, θα πρέπει πρώτα να ξεπεράσει ένα σημαντικό φραγμό που είναι το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή της. Όπως παρουσιάστηκε, η *Wolbachia* μολύνει τόσο τους αναπαραγωγικούς ιστούς όσο και τους σωματικούς ιστούς του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου και της αιμολέμφου (Dobson *et al.* 1999). Επίσης, έχει την δυνατότητα να μετακινείται οριζόντια μεταξύ διαφορετικών ξενιστών (Heath *et al.* 1999; O'Neill *et al.* 1992; Werren *et al.* 1995). Πειραματικές μελέτες διαμόλυνσης δείχνουν επίσης ότι, εάν βακτηριακά κύτταρα *Wolbachia* εισαχθούν στην αιμολέμφο της *Drosophila*, μπορούν να διασχίσουν τους σωματικούς ιστούς και τελικά να εγκατασταθούν στους αναπαραγωγικούς ιστούς του εντόμου (Frydman *et al.* 2006). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η *Wolbachia* έρχεται σε επαφή με βασικά συστήματα της ανοσοαπόκρισης των εντόμων. Με ποιόν τρόπο όμως η *Wolbachia* αλληλεπιδρά με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και ανταπεξέρχεται στις επιδράσεις του;

Υπάρχουν δύο εναλλακτικές εξηγήσεις του πιθανού τρόπου με τον οποίο η *Wolbachia* καταφέρνει να ξεφεύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή: είτε (α) αναγνωρίζεται ως κομμάτι του ξενιστή και έτσι δεν προκαλεί την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού είτε (β) με κάποιον άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο επιδρά πάνω στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή

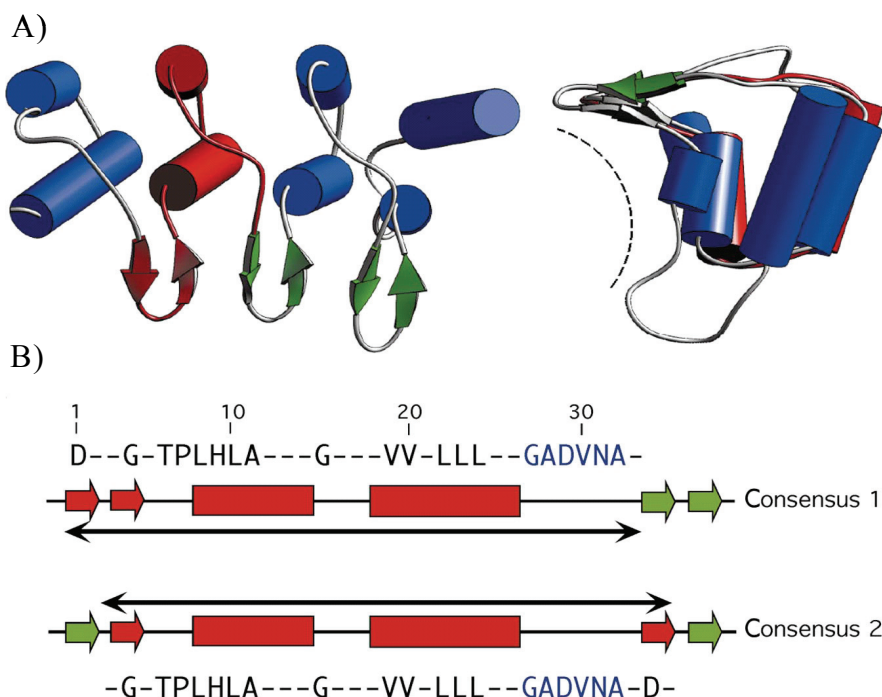
με αποτέλεσμα τη μη αναγνώριση του βακτηρίου από τους μηχανισμούς αυτούς (Siozios *et al.* 2008). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η *Wolbachia* φαίνεται να μην προκαλεί άλλα ούτε καταστέλλει την επαγωγή των αντιβακτηριακών πεπτιδίων διπερισίνη και κεκροπίνη, τα οποία δρουν κατά των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων στη *Drosophila* καθώς και σε άλλα έντομα (Bourtzis *et al.* 2000). Παρόλα αυτά, η *Wolbachia* μπορεί να επηρεάζει άλλα συστήματα του αμυντικού μηχανισμού. Πράγματι, όπως φαίνεται από μελέτες, η παρουσία του βακτηρίου στην *Drosophila simulans* φαίνεται να μειώνει την αποτελεσματικότητα της ανοσοαπόκρισης έναντι του παρασιτοειδούς *Leptopilina heterotoma* (Fytrou *et al.* 2006). Επίσης, πιο πρόσφατα φάνηκε ότι το βακτήριο έχει την δυνατότητα να επάγει την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) οι οποίες αποτελούν σημαντικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο εντόμων όσο και θηλαστικών (Brennan *et al.* 2008).

Ακόμα δεν είναι γνωστό μέσω ποιόν μηχανισμών ή συστατικών της η *Wolbachia* προκαλεί αυτή την απόκριση. Ωστόσο πειράματα δείχνουν ότι η κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη WSP έχει την δυνατότητα να προκαλεί την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (Bratting *et al.* 2004; Bazzocchi *et al.* 2007; Morchon *et al.* 2007). Τα στοιχεία που προκύπτουν από την αλληλούχηση του γονιδιώματος της *Wolbachia* ίσως βοηθήσουν στο να διαλευκανθεί η πολύπλοκη βιολογία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ *Wolbachia* και ξενιστή συμπεριλαμβανομένου και του πως καταφέρνει το βακτήριο αυτό να παραμένει ουσιαστικά “αόρατο” από τα αμυντικά συστήματα του ξενιστή.

1.2.8 Γονίδια (πρωτεΐνες) με επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης

Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων μοτίβων είναι πολύ κοινή σε έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (Marcotte *et al.* 1998). Ο βιοχημικός και ο δομικός χαρακτηρισμός τους αποκάλυψε ότι τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα λειτουργούν ως δομικές υπομονάδες οι οποίες στοιβάζονται πλάι-πλάι σχηματίζοντας τη διεπιφάνεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών. Ένα από τα πιο διαδεδομένα και ίσως σε μεγαλύτερη αφθονία επαναλαμβανόμενα μοτίβα είναι τα μοτίβα αγκυρίνης. Η επανάληψη αγκυρίνης ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1987 από τους Breeden και Nasmyth σαν ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο 33 περίπου αμινοξέων στις πρωτεϊνικές ακολουθίες των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου της ζύμης Swi6 και Cdc10 καθώς και στους αναπτυξιακούς ρυθμιστές Notch και LIN-12 της μύγας *Drosophila melanogaster* και του νηματώδη *Caenorhabditis elegans* (Breeden & Nasmyth 1987). Ωστόσο το μοτίβο της αγκυρίνης έλαβε το όνομά του μεταγενέστερα από την πρωτεΐνη αγκυρίνη που σχετίζεται με τον κυτταροσκελετό όταν ανακαλύφθηκαν σε αυτή 24 επαναλήψεις του μοτίβου (Lux *et al.* 1990). Κάθε μοτίβο αγκυρίνης διαθέτει χαρακτηριστική δευτεροταγή και τριτοταγή δομή αποτελούμενη από ένα ζεύ-

γος αντιπαράλληλων α -ελίκων οι οποίες στοιβάζονται δίπλα-δίπλα και ενώνονται με μια σειρά παρεμβλλόμενων β -πτυχώσεων (Εικόνα 1.7). Τα διαδοχικά μοτίβα αγκυρίνης διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο σχηματίζοντας μια χαρακτηριστική δομή σχήματος L όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.7.



Εικόνα 1.7. (Α) Τρισδιάστατη απεικόνιση πρωτεΐνης με 4 επαναλήψεις αγκυρίνης, όπου διακρίνεται η διάταξη των α -ελίκων (κύλινδροι) και των β -πτυχώσεων (βέλη). (Β) Παράδειγμα ομόφωνης αλληλουχίας της επανάληψης αγκυρίνης όπου παρουσιάζονται τα πιο συντηρημένα κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή των επαναλήψεων (Sedgwick & Smerdon 1999).

Επαναλήψεις των μοτίβων αγκυρίνης έχουν βρεθεί σε έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (Πίνακας 1.2) συμπεριλαμβανομένου πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, μεμβρανικές πρωτεΐνες, μεταγραφικούς και αναπτυξιακούς ρυθμιστές, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, μεταγωγείς σήματος, ακόμη και τοξίνες (Bork 1993, Sedgwick & Smerdon 1999). Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών που περιέχουν επαναλήψεις μοτίβων αγκυρίνης είναι ότι λειτουργούν ως διαμεσολαβητές των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ενώ καμία ενζυμική λειτουργία δεν έχει αποδοθεί μέχρι στιγμής στα μοτίβα των αγκυρινών (Sedgwick & Smerdon 1999; Mosavi *et al.* 2004). Πρωτεΐνες με μοτίβα αγκυρίνης απαντώνται σε ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών συμπεριλαμβαν-

νομένου των ευκαρυωτικών, των βακτηρίων, των αρχαίων αλλά και πολλών ιών. Παρόλα αυτά, η πλειονότητα τους απαντάται κυρίως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ τα γονίδια εκείνα που έχουν βρεθεί σε βακτήρια και ιούς εικάζεται ότι προήλθαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Bork 1993). Η ύπαρξη αυτού του μεγάλου αριθμού γονιδίων με μοτίβα αγκυρίνης στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα πιστεύεται ότι σχετίζεται με την ανάγκη ρύθμισης μιας μεγάλης ποικιλίας κυτταρικών μονοπατιών που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των πολύπλοκων πολυκύτταρων οργανισμών (Marcotte *et al.* 1999).

Πίνακας 1.2. Πρωτεΐνες με επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης.

Πρωτεΐνη	Είδος	Λειτουργία
Ankyrin	Άνθρωπος	Διασυνδεδετική πρωτεΐνη κυτταροσκελετού
Swi4, Swi 6, Cdc10	Ζύμη	Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου
Noch	Μύγα, Ζύμη, βάτραχος, άνθρωπος	Κυτταρική διαφοροποίηση
Lin-12	Νηματώδεις	
FEM1	Νηματώδεις	Φυλοκαθορισμός
IκB, NfκB	Μύγα, Ζύμη, βάτραχος, άνθρωπος	Μεταγραφικοί παράγοντες
Latrotoxin/ Latroisectotoxin	Αράχνη	Τοξίνη
Tankyrase	Άνθρωπος	Poly(ADP-ribose) polymerase
Wariai	Dictyostelium	Anterior-posterior patterning
M-T5	Ιός μυξωμάτωσης	Καθορισμός του εύρους των ξενιστών

(Bork 1993; Hryniewicz-Jankowska *et al.* 2002)

Ένα από τα ποιο ενδιαφέροντα ίσως χαρακτηριστικά της *Wolbachia* είναι η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού, για προκαρυωτικό οργανισμό, γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης. Το μέγεθος του αριθμού αυτού γίνεται ακόμα πιο εντυπωσιακό εάν αναλογιστούμε το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος της *Wolbachia*. Η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη γονιδίων αγκυρίνης στη *Wolbachia* προέρχεται από την εργασία των Masui και των συνεργατών του (Masui *et al.* 2000a) οι οποίοι ανέφεραν την παρουσία τεσσάρων τέτοιων γονιδίων στο στέλεχος wKue εκ των οποίων τα τρία σχετίζονταν με το προφαγικό στοιχείο που εντοπίστηκε στο γονιδίωμα του στελέχους. Η μετέπειτα αποκωδικοποίηση των γονιδιωμάτων διαφόρων στελεχών της *Wolbachia* αποκάλυψε ότι όχι μόνο ο αριθμός αυτών των γονιδίων είναι ασυνήθιστα υψηλός, σε σύγκριση με την πλειοψηφία των βακτηρίων, αλλά και ότι ο αριθμός αυτός ποικίλει από στέλεχος σε στέλεχος (Πίνακας 1.3). Ο εκπληκτικός αριθμός τους σε συνάρτηση με την ικανότητα των πρωτεϊνών με μοτίβα αγκυρίνης να συμμετέχουν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις καθώς και το γεγονός ότι οι ομόφωνες αλληλουχίες των επαναλαμβανόμενων μοτίβων αγκυρίνης της

Wolbachia μάλλον παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τις αντίστοιχες ευκαρυωτικές και όχι τις προκαρυωτικές (Ioannidis, PhD Thesis), υποδηλώνουν ότι τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* μπορεί να παίζουν κεντρικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου με τους ξενιστές του.

Πίνακας 1.3. Ο αριθμός των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών στελεχών *Wolbachia*.

Στέλεχος <i>Wolbachia</i>	Ξενιστής	Αριθμός γονιδίων αγκυρίνης	Μέγεθος Γονιδιώματος (Mb)	Αναφορά
wMel	<i>D. melanogaster</i>	23	1.27	Wu <i>et al.</i> 2004
wRi	<i>D. simulans</i>	35	1.45	Klasson <i>et al.</i> 2009a
wAna	<i>D. ananassae</i>	34	1.47	Salzberg <i>et al.</i> 2005a
wPip	<i>C. pipiens</i>	60	1.50	Klasson <i>et al.</i> 2008
wVul	<i>A. vulgare</i>	76	1.70	Pichon <i>et al.</i> 2008
wBm	<i>B. malayi</i>	12	1.08	Foster <i>et al.</i> 2005

Ωστόσο η λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών είναι δύσκολο να προβλεφθεί από τη στιγμή που οι περισσότερες από αυτές δεν παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα, πέραν των μοτίβων αγκυρίνης, με γνωστής λειτουργίας πρωτεΐνες που είναι καταχωρημένες στις βάσεις δεδομένων. Αν και μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει άμεση συσχέτιση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* με τους φαινοτύπους που αυτή επάγει στους ξενιστές της μια σειρά μελετών υποδεικνύουν ότι ορισμένα από τα γονίδια αυτά μπορεί να σχετίζονται με το μοναδικό τρόπο διαβίωσης της ή/και με την επαγωγή αναπαραγωγικών ανωμαλιών. Η πρώτη προσπάθεια συσχέτισης των γονιδίων αγκυρίνης με τους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους της *Wolbachia* έγινε από τον Sinkins και τους συνεργάτες του (Sinkins *et al.* 2005) οι οποίοι έδειξαν ότι δύο γονίδια αγκυρίνης (*pk1* και *pk2*) που σχετίζονταν με τον προφάγο WO της *Wolbachia* παρουσίαζαν σημαντικά επίπεδα πολυμορφισμού μεταξύ δύο ασύμβατων πληθυσμών του κουνουπιού *Culex quinquefasciatus* (πληθυσμοί Pel και Bei). Μάλιστα, από τα δύο γονίδια το *pk2* φάνηκε ότι εκφράζεται μόνο στα θηλυκά άτομα όπως προέκυψε χρησιμοποιώντας συμβατική RT-PCR ενισχύοντας τις υπόνοιες για την πιθανή συμμετοχή των γονιδίων αυτών στον μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Sinkins *et al.* 2005; Walker *et al.* 2007). Ωστόσο, σε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη των Duron και των συνεργατών του (Duron *et al.* 2007), οι οποίοι εξέτασαν τη γενετική ποικιλότητα 60 γονιδίων αγκυρίνης σε 15 ασύμβατους πληθυσμούς του κουνουπιού *Culex pipiens*, δεν προέκυψε συσχέτιση των διαφορετικών προτύπων κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας με την παρατηρούμενη ποικιλότητα των γονιδίων αγκυρίνης ή/και των επιπέδων έκφρασής τους. Αν και η τελευταία εργασία δεν περιλάμβανε τους ίδιους πληθυσμούς, που χρησιμοποιήθηκαν από τους Sinkins και

Walker, υποδηλώνει ωστόσο την πολυπλοκότητα που διέπει τον μηχανισμός της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

Στην περίπτωση των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει η *Wolbachia* με διαφορετικά είδη *Drosophila* ο Iturbe-Ormaetxe και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι στελέχη του βακτηρίου τα οποία επάγουν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ξενιστές τους διαφέρουν ως προς το ρεπερτόριο των γονιδίων αγκυρίνης (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005). Επίσης, οι ίδιοι ερευνητές, όταν εξέτασαν τις ακολουθίες των γονιδίων αγκυρίνης των συγγενικών στελεχών *wMel* και *wAu* τα οποία όμως επάγουν διαφορετικούς φαινοτύπους στους ξενιστές τους (το στέλεχος *wMel* επάγει κυτταροπλασματική ασυμβατότητα ενώ το στέλεχος *wAu* όχι) παρατήρησαν σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ των δύο στελεχών σε 10 από τα συνολικά 23 γονίδια αγκυρίνης. Οι διαφορές αυτές σχετίζονταν με την απουσία γονιδίων όπως η περίπτωση του γονιδίου WD0514 από το στέλεχος *wAu*, τον πολυμορφισμό όσον αφορά τον αριθμό των επαναλύσεων αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων γονιδίων, τον πρόωρο τερματισμό της πολυπεπτιδικής ακολουθίας λόγω ένθεσης μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων ή μεταλλάξεων αναγνωστικού πλαισίου (frame shift mutations). Αν και δεν πραγματοποιήθηκε μια άμεση συσχέτιση των παραπάνω διαφορών με την φαινοτυπική ποικιλότητα των στελεχών τα γονίδια αυτά θεωρήθηκαν σημαντικοί υποψήφιοι για την επαγωγή ή τουλάχιστον τη ρύθμιση της έκφρασης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005).

Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι ο μεγάλος αριθμός γονιδίων αγκυρίνης δεν αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο της *Wolbachia* μεταξύ των προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Μελέτες των τελευταίων χρόνων δείχνουν ότι η υπερ-αντιπροσώπευση αυτής της οικογένειας γονιδίων είναι κοινό χαρακτηριστικό πολλών ενδοκυττάρων παθογόνων βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Orientia* (Nakayama *et al.* 2008), *Rickettsia* (Ogata *et al.* 2005; Ogata *et al.* 2006), *Coxiella* (Seshadri *et al.* 2003) και *Legionella* (Cazalet *et al.* 2004; Chien *et al.* 2004). Η παρουσία των γονιδίων αυτών πιθανόν σχετίζεται με τον ιδιαίτερο τρόπο διαβίωσης των βακτηρίων αυτών. Μάλιστα, στην περίπτωση του είδους *Anaplasma phagocytophilum* βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη AnkA εκκρίνεται μέσω ενός συστήματος έκκρισης τύπου IV (T4SS) και αλληλεπιδρά με την χρωματίνη του ξενιστή (Caturegli *et al.* 2000; Park *et al.* 2004; Lin *et al.* 2007) υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο της στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή. Πιο πρόσφατες μελέτες των γονιδίων αγκυρίνης των παθογόνων βακτηρίων *Legionella pneumophila* και *Coxiella burnetii* έδειξαν ότι αυτά αποτελούν μια νέα οικογένεια τελεστών του συστήματος έκκρισης τύπου IV (T4SS) (Pan *et al.* 2008). Μάλιστα, κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές αποδείχτηκε ότι παίζουν ενεργό ρόλο στην εγκαθίδρυση της μόλυνσης καθώς και στη ρύθμιση βακτηριακής αντιγραφής μέσα στα φαγοσωμάτια τόσο στους ενδιάμεσους ξενιστές (πρωτόζωα) όσο και στα ανθρώπινα

μακροφάγα (Habyarimana *et al.* 2008; Pan *et al.* 2008). Αν και δεν υπάρχει σημαντική ομολογία των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* με αυτά των υπολοίπων παθογόνων βακτηρίων, τα παραπάνω στοιχεία ενισχύουν την πιθανή συμμετοχή τους στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων και ίσως στην επαγωγή των αναπαραγωγικών ανωμαλιών. Μάλιστα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μια πρόσφατη πρωτεωμική ανάλυση των προϊόντων έκκρισης του νηματώδη παρασίτου *Brugia malayi* που είναι μολυσμένο με *Wolbachia* αποκάλυψε, μεταξύ των άλλων, την παρουσία δύο πρωτεϊνών με επαναλήψεις αγκυρίνης βακτηριακής προέλευσης (Bennuru *et al.* 2009). Ωστόσο, το κατά πόσο η *Wolbachia* χρησιμοποιεί το T4SS που διαθέτει για να εκκρίνει κάποιες από της αγκυρίνες της είναι ακόμα άγνωστο και μένει να διερευνηθεί.

1.3 Σκοπός της παρούσας διατριβής

Η *Wolbachia* αποτελεί έναν από τους πλέον διαδεδομένους και επιτυχημένους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς στη φύση, καθώς απαντά σε έναν μεγάλο αριθμό αρthropόδων και νηματωδών. Η οικολογική αυτή επιτυχία οφείλεται κυρίως στο μεγάλο εύρος των διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει η *Wolbachia* με τους ξενιστές της, οι οποίες κυμαίνονται από σχέσεις αμοιβαίας συμβίωσης (για παράδειγμα στους νηματώδεις της φιλαρίας) έως σχέσεις αναπαραγωγικού παρασιτισμού (στα αρthropόδα). Στη δεύτερη περίπτωση, η *Wolbachia* αλληλεπιδρά με το αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών της προκειμένου να εξασφαλίσει τη μητρική της μεταβίβαση προκαλώντας θηλικοποίηση, παρθενογένεση, θανάτωση αρσενικών ατόμων και, κυρίως, κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Λόγω της μεγάλης οικολογικής εξάπλωσης και της εντυπωσιακής ποικιλίας των αναπαραγωγικών φαινοτύπων του επάγει στους ξενιστές της, η *Wolbachia* έχει προσελκύσει το μεγάλο ενδιαφέρον των επιστημόνων για δύο κυρίως λόγους: (α) την πιθανή συμμετοχή της σε διεργασίες ειδογένεσης και αύξησης της βιοποικιλότητας και (β) τη χρησιμοποίησή της ως ένα νέο και φιλικό προς το περιβάλλον εργαλείο πληθυσμιακού ελέγχου επιβλαβών ειδών περιβαλλοντικής, γεωργικής ή/και ιατρικής σημασίας.

Παρά το αυξανόμενο ενδιαφέρον, οι σύνθετες τροφικές ανάγκες της *Wolbachia*, οι οποίες υπαγορεύονται από τη συμβιωτική φύση της, έχουν παρεμποδίσει τη μελέτη του βακτηρίου με τα κλασικά εργαλεία της βακτηριακής γενετικής. Η αλληλούχηση όμως του γονιδιώματος της *Wolbachia* αποκάλυψε νέα στοιχεία για τη βιολογία του βακτηρίου και τους μοριακούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης με τους ξενιστές του. Ένα από αυτά είναι και η παρουσία ενός μεγάλου, αναλογικά με το μέγεθος του γονιδιώματος, αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης.

Αναλογιζόμενοι τη σημαντικότητα της οικογένειας αυτής των πρωτεϊνών, η παρούσα μελέτη διερεύνει τον ρόλο των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* τόσο στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων και την επαγωγή των αναπαραγωγικών φαινοτύπων στους ξενιστές της καθώς και τη γενετική ποικιλότητα και την εξέλιξή του βακτηρίου. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω επίπεδα:

α) Στο πρώτο επίπεδο (**Κεφάλαιο 2**) μελετήθηκε η κατανομή των 23 γονιδίων αγκυρίνης που εντοπίστηκαν στο πρώτο αποκωδικοποιημένο γονιδίωμα στελέχους της *Wolbachia* (wMel) σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Wolbachia-Drosophila*. Στις σχέσεις που μελετήθηκαν περιλαμβάνονταν βακτηριακά στελέχη τα οποία ανήκουν στις δύο κύριες υπερομάδες (Α και Β) οι οποίες απέχουν εξελικτικά, 60-80 εκατομμύρια χρόνια. Επίσης τα στελέχη αυτά διαφέρουν με-

ταξύ τους αφενός ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν και να σώζουν την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα και αφετέρου ως προς την κατανομή του βακτηρίου στα πρώιμα εμβρυικά στάδια. Στόχος μας ήταν να εξετάσουμε την ποικιλότητα που χαρακτηρίζει το ρεπερτόριο των αγκυρινών μεταξύ συγγενικών και μη στελεχών της *Wolbachia*, σε μια προσπάθεια να συσχετιστεί η παρουσία ή η απουσία τους με τους διαφορετικούς φαινοτύπους που επάγονται από το βακτήριο.

β) Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μερική, και όπου ήταν δυνατόν πλήρης, αλληλούχηση των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης από τις 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις. Στόχος ήταν να μελετηθεί η γενετική ποικιλότητα μεταξύ των ομολόγων γονιδίων και να διερευνηθεί η σχέση της με τους διαφορετικούς φαινοτύπους της *Wolbachia*. Επίσης, μελετήθηκε η φυλογενετική και εξελικτική σχέση των γονιδίων αγκυρίνης σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τη διαμόρφωση και την εξέλιξη της ενδιαφέρουσας αυτής οικογένειας γονιδίων της *Wolbachia* (**Κεφάλαιο 3**).

γ) Στο **Κεφάλαιο 4** παρουσιάζεται η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης σε μεταγραφικό επίπεδο, σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και ιστούς των ξενιστών στις 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις. Η μελέτη εστιάστηκε κυρίως στους αναπαραγωγικούς ιστούς αρσενικών και θηλυκών ατόμων καθώς επίσης και σε τρία αναπτυξιακά στάδια (ενήλικα αρσενικά και θηλυκά άτομα, πρώιμα έμβρυα και ώριμα έμβρυα). Στόχος ήταν να εξετασθεί η ύπαρξη φυλοειδικών ή αναπτυξιακών προτύπων έκφρασης, οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των συμβιωτικών σχέσεων και να διερευνηθεί αν διαφορετικά πρότυπα ή/και επίπεδα έκφρασης σχετίζονται με τους μοριακούς μηχανισμούς αναπαραγωγικών ανωμαλιών όπως η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.

δ) Στο πέμπτο και τελευταίο κεφάλαιο συνοψίζονται και σχολιάζονται τα ευρήματα της παρούσας διατριβής σε μια προσπάθεια κατανόησης της εξέλιξης και του ρόλου μιας από τις πιο ενδιαφέρουσες οικογένειας πρωτεϊνών του συμβιωτικού βακτηρίου *Wolbachia*.

1.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akman, L., A. Yamashita, H. Watanabe, K. Oshima, T. Shiba, M. Hattori, and S. Aksoy.** 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics* **32**:402-407.
- Arakaki, N., T. Miyoshi, and H. Noda.** 2001b. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Fanklinothrips vespiformis* (Thysanoptera : Insecta). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**:1011-1016.
- Arakaki, N., T. Oishi and H. Noda.** 2001a. Parthenogenesis induced by *Wolbachia* in *Gronotoma micromorpha*(Hymenoptera: Eucoilidae). *Entomological Science* **4**:9-15.
- Baldo, L., N. A. Ayoub, C. Y. Hayashi, J. A. Russell, J. K. Stahlhut, and J. H. Werren.** 2008. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Molecular Ecology* **17**:557-569.
- Baldo, L., S. Bordenstein, J. J. Wernegreen, and J. H. Werren.** 2006b. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **23**:437-449.
- Baldo, L., J. C. D. Hotopp, K. A. Jolley, S. R. Bordenstein, S. A. Biber, R. R. Choudhury, C. Hayashi, M. C. J. Maiden, H. Tettelin, and J. H. Werren.** 2006a. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:7098-7110.
- Baldo, L., N. Lo, and J. H. Werren.** 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology* **187**:5406-5418.
- Baldo, L., L. Prendini, A. Corthals, and J. H. Werren.** 2007. *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. *Current Microbiology* **55**:367-373.
- Baldo, L., and J. H. Werren.** 2007. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: Spurious lineages and discordance with MLST. *Current Microbiology* **55**:81-87.
- Bandi, C., J.W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco and L. Sacchi.** 1998. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *International Journal of Parasitology* **29**:357-364.
- Bandi, C., T. J. C. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter.** 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:2407-2413.

- Bandi, C., A. M. Dunn, G. D. D. Hurst, and T. Rigaud.** 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in Parasitology* **17**:88-94.
- Baudry, E., J. Bartos, K. Emerson, T. Whitworth, and J. H. Werren.** 2003. *Wolbachia* and genetic variability in the birdnest blowfly *Protocalliphora sialia*. *Molecular Ecology* **12**:1843-1854.
- Baumann, P.** 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**:155-189.
- Bazzocchi, C., S. Comazzi, R. Santoni, C. Bandi, C. Genchi, and M. Mortarino.** 2007. *Wolbachia* surface protein (WSP) inhibits apoptosis in human neutrophils. *Parasite Immunology* **29**:73-79.
- Beard, C. B., S.L. O'Neill, R.B. Tesh, F.F. Richards and S. Aksoy.** 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitology Today* **9**:179-183.
- Bennuru, S., R. Semnani, Z. Meng, J. M. C. Ribeiro, T. D. Veenstra, and T. B. Nutman.** 2009. *Brugia malayi* Excreted/Secreted Proteins at the Host/Parasite Interface: Stage- and Gender-Specific Proteomic Profiling. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**.
- Benson, M. J., J. D. Gawronski, D. E. Eveleigh, and D. R. Benson.** 2004. Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:616-620.
- Blanchard, J. L., and M. Lynch.** 2000. Organellar genes - why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics* **16**:315-320.
- Boller, E. F., and G.L. Bush.** 1974. Evidence for genetic variation in populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) based on physiological parameters and hybridization experiments. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **17**:279-293.
- Bordenstein S.** 2003. Symbiosis and the origin of species. In: Bourtzis K, Miller T (eds) *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 283-304.
- Bordenstein, S., and R. B. Rosengaus.** 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. *Current Microbiology* **51**:393-398.
- Bordenstein, S. R., M. L. Marshall, A. J. Fry, U. Kim, and J. J. Wernegreen.** 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathogens* **2**:384-393.
- Bordenstein, S. R., F. P. O'Hara, and J. H. Werren.** 2001. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* **409**:707-710.

- Bordenstein, S. R., and W. S. Reznikoff.** 2005. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**:688-699.
- Bordenstein, S. R., and J. J. Wernegreen.** 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): Infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. *Molecular Biology and Evolution* **21**:1981-1991.
- Bork, P.** 1993. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins - mobile modules that cross phyla horizontally. *Proteins-Structure Function and Genetics* **17**:363-374.
- Bouchon, D., T. Rigaud, and P. Juchault.** 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:1081-1090.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango and C. Savakis.** 1994. A prokaryotic *dnaA* sequence in *D. melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Molecular Biology* **3**:131-142.
- Bourtzis, K., and S.L. O'Neill.** 1998. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. *Bioscience* **48**:287-293.
- Bourtzis, K., S.L. Dobson, H.R. Braig and S.L. O'Neill.** 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature* **391**:852-853.
- Bourtzis, K.** 2008. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* **627**:104-113.
- Bourtzis, K., and H.R. Braig.** 1999. The many faces of *Wolbachia*. Pp. 199-219 in D. Raoult, and T. Hackstadt, ed. *Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Elsevier, Amsterdam.
- Bourtzis K, Braig H, Karr T** (2003) Cytoplasmic Incompatibility. In: Bourtzis K, Miller T (eds) *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 217-246.
- Bourtzis, K., and T. Miller.** 2003. *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-347
- Bourtzis, K., and T. Miller.** 2006. *Insect Symbiosis 2*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-276
- Bourtzis, K., and T. Miller.** 2008. *Insect Symbiosis 3*. CRC press, Boca Raton, FL, pp 1-408
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis.** 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* **144**:1063-1073.
- Bourtzis, K., M. M. Pettigrew, and S. L. O'Neill.** 2000. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Molecular Biology* **9**:635-639.
- Bourtzis K, Robinson A.** 2006. Insect pest control using *Wolbachia* and/or radiation. In: Bourtzis K, Miller T (eds) *Insect Symbiosis 2*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 225-246.

- Braig, H. R., H. Guzman, R. B. Tesh, and S. L. O'Neill.** 1994. Replacement of the Natural *Wolbachia* Symbiont of *Drosophila simulans* with a Mosquito Counterpart. *Nature* **367**:453-455.
- Brattig, N. W., C. Bazzocchi, C. J. Kirschning, N. Reiling, D. W. Buttner, F. Ceciliani, F. Geisinger, H. Hochrein, M. Ernst, H. Wagner, C. Bandi, and A. Hoerauf.** 2004. The major surface protein of *Wolbachia* endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *Journal of Immunology* **173**:437-445.
- Brayton, K. A., G. H. Palmer, A. Lundgren, J. Yi, and A. F. Barbet.** 2002. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microbiology* **43**:1151-1159.
- Breeden, L., and K. Nasmyth.** 1987. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the notch gene of *Drosophila*. *Nature* **329**:651-654.
- Breeuwer, J. A. J., R. Stouthamer, S.M. Barns, D.A. Pelletier, W.G. Weisburg and J.H. Werren.** 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology* **1**:25-36.
- Breeuwer, J. A. J., and G. Jacobs.** 1996. *Wolbachia*: Intracellular manipulators of mite reproduction. *Experimental & Applied Acarology* **20**:421-434.
- Breeuwer, J. A. J., and J. H. Werren.** 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**:558-560.
- Brennan, C. A., and K. V. Anderson.** 2004. *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response. *Annual Review of Immunology* **22**:457-483.
- Brower, J. H.** 1978. Suppression of laboratory populations of *Ephestia cautella* (Walker)(Lepidoptera: Pyralidae) by release of males with cytoplasmic incompatibility. *Journal of Stored Products Research* **15**:1-4.
- Brownstein, J. S., E. Hett, and S. L. O'Neill.** 2003. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **84**:24-29.
- Cadavid, D., D. D. Thomas, R. Crawley, and A. G. Barbour.** 1994. Variability of a Bacterial Surface Protein and Disease Expression in a Possible Mouse Model of Systemic Lyme Borreliosis. *Journal of Experimental Medicine* **179**:631-642.
- Callaini, G., R. Dallai, and M. G. Riparbelli.** 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of Cell Science* **110**:271-280.

- Caltagirone, L. E.** 1981. Landmark examples in classical biological-control. *Annual Review of Entomology* **26**:213-232.
- Campbell, B. C., T. S. Bragg, and C. E. Turner.** 1992. Phylogeny of symbiotic bacteria of 4 weevil species (Coleoptera, Curculionidae) based on analysis of 16s Ribosomal DNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22**:415-421.
- Casiraghi, M., T. J. C. Anderson, C. Bandi, C. Bazzocchi, and C. Genchi.** 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* **122**:93-103.
- Casiraghi, M., O. Bain, R. Guerrero, C. Martin, C. Pocacqua, S. L. Gardner, A. Franceschi, and C. Bandi.** 2004. Mapping the presence of *Wolbachia* pipientis on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. Pp. 191-203. Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Casiraghi, M., S. R. Bordenstein, L. Baldo, N. Lo, T. Beninati, J. J. Wernegreen, J. H. Werren, and C. Bandi.** 2005. Phylogeny of *Wolbachia* pipientis based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology-Sgm* **151**:4015-4022.
- Casjens, S.** 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology* **49**:277-300.
- Caturegli, P., K. M. Asanovich, J. J. Walls, J. S. Bakken, J. E. Madigan, V. L. Popov, and J. S. Dumler.** 2000. *ankA*: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infection and Immunity* **68**:5277-5283.
- Cazalet, C., C. Rusniok, H. Bruggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser, and C. Buchrieser.** 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics* **36**:1165-1173.
- Charlat, S., C. Calmet and H. Mercot.** 2001. On the *mod resc* model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types. *Genetics* **159**:1415-1422.
- Charlat, S., G. D. D. Hurst, and H. Mercot.** 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics* **19**:217-223.
- Charlat, S., M. Reuter, E. A. Dyson, E. A. Hornett, A. Duploux, N. Davies, G. K. Roderick, N. Wedell, and G. D. D. Hurst.** 2007. Male-killing bacteria trigger a cycle of increasing male fatigue and female promiscuity. *Current Biology* **17**:273-277.

- Chien, M. C., I. Morozova, S. D. Shi, H. T. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. H. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georghiou, I. C. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Y. Qu, A. Rzhetsky, P. S. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Y. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman, and J. J. Russo.** 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**:1966-1968.
- Cook, P. E., C. J. McMeniman, and S. L. O'Neill.** 2008. Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Adv Exp Med Biol* **627**:126-140.
- Cordaux, R., S. Pichon, A. Ling, P. Perez, C. Delaunay, F. Vavre, D. Bouchon, and P. Greve.** 2008. Intense transpositional activity of insertion sequences in an ancient obligate endosymbiont. *Molecular Biology and Evolution* **25**:1889-1896.
- Cordaux, R., A. Michel-Salzat, and D. Bouchon.** 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology* **14**:237-243.
- Covacin, C., and S. C. Barker.** 2007. Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta : Phthiraptera). *Parasitology Research* **100**:479-485.
- Curtis, C. F., N. Hill, and S. H. Kasim.** 1993. Are There Effective Resistance Management Strategies for Vectors of Human-Disease. *Biological Journal of the Linnean Society* **48**:3-18.
- Czarnetzki, A. B., and C. C. Tebbe.** 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environmental Microbiology* **6**:35-44.
- Dale, C., and N. A. Moran.** 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* **126**:453-465.
- Dedine, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M. E. Hochberg, and M. Bouletreau.** 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:6247-6252.
- Degnan, P. H., A. B. Lazarus, and J. J. Wernegreen.** 2005. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Research* **15**:1023-1033.
- Dobson, S. L., K. Bourtzis, H. R. Braig, B. F. Jones, W. G. Zhou, F. Rousset, and S. L. O'Neill.** 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**:153-160.

- Dunbar, H. E., A. C. C. Wilson, N. R. Ferguson, and N. A. Moran.** 2007. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biology* **5**:1006-1015.
- Duron, O., A. Boureux, P. Echaubard, A. Berthomieu, C. Berticat, P. Fort, and M. Weill.** 2007. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Bacteriology* **189**:4442-4448.
- Duron, O., J. Lagnel, M. Raymond, K. Bourtzis, P. Fort, and M. Weill.** 2005. Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. *Molecular Ecology* **14**:1561-1573.
- Dyer, K. A., and J. Jaenike.** 2004. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: Molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics* **168**:1443-1455.
- Felix, C., S. Pichon, C. Braquart-Varnier, H. Braig, L. Chen, R. A. Garrett, G. Martin, and P. Greve.** 2008. Characterization and transcriptional analysis of two gene clusters for type IV secretion machinery in *Wolbachia* of *Armadillidium vulgare*. *Research in Microbiology* **159**:481-485.
- Ferree, P. M., and W. Sullivan.** 2006. A genetic test of the role of the maternal pronucleus in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **173**:839-847.
- Fialho, R. F., and L. Stevens.** 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**:1469-1473.
- Foster, J., M. Ganatra, I. Kamal, J. Ware, K. Makarova, N. Ivanova, A. Bhattacharyya, V. Kapatral, S. Kumar, J. Posfai, T. Vincze, J. Ingram, L. Moran, A. Lapidus, M. Omelchenko, N. Kyrpides, E. Ghedin, S. Wang, E. Goltzman, V. Joukov, O. Ostrovskaya, K. Tsukerman, M. Mazur, D. Comb, E. Koonin, and B. Slatko.** 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* **3**:599-614.
- Frank, A. C., C. M. Alsmark, M. Tholleson, and S. G. E. Andersson.** 2005. Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Molecular Biology and Evolution* **22**:1325-1336.
- Frank, A. C., H. Amiri, and S. G. E. Andersson.** 2002. Genome deterioration: loss of repeated sequences and accumulation of junk DNA. *Genetica* **115**:1-12.
- Frydman, H. M., J. M. Li, D. N. Robson, and E. Wieschaus.** 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* **441**:509-512.

- Fytrou, A., P. G. Schofield, A. R. Kraaijeveld, and S. F. Hubbard.** 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**:791-796.
- Gavotte, L., F. Vavre, H. Henri, M. Ravallec, R. Stouthamer, and M. Bouletreau.** 2004. Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species. *Insect Molecular Biology* **13**:147-153.
- Gelbart, M. E., and M. I. Kuroda.** 2009. Drosophila dosage compensation: a complex voyage to the X chromosome. *Development* **136**:1399-1410.
- Ghelelovitch, S.** 1952. Sur le determinisme ge'ne'tique de la ste'rilite' dans les croisements entre diffe'rentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **234**:2386-2388.
- Gibbs, C. P., B. Y. Reimann, E. Schultz, A. Kaufmann, R. Haas, and T. F. Meyer.** 1989. Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by 2 distinct mechanisms. *Nature* **338**:651-652.
- Giorgini, M., M. M. Monti, E. Caprio, R. Stouthamer, and M. S. Hunter.** 2009. Feminization and the collapse of haplodiploidy in an asexual parasitoid wasp harboring the bacterial symbiont Cardinium. *Heredity* **102**:365-371.
- Gorham, C. H., Q. Q. Fang, and L. A. Durden.** 2003. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *Journal of Parasitology* **89**:283-289.
- Gotoh, T., H. Noda, and X. Y. Hong.** 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari : Tetranychidae) in Japan. *Heredity* **91**:208-216.
- Gotoh, T., H. Noda, and S. Ito.** 2007. Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity* **98**:13-20.
- Gottlieb, Y., and E. Zchori-Fein.** 2001. Irreversible thelytokous reproduction in *Muscidifurax uniraptor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **100**:271-278.
- Gray, M. W., and W. F. Doolittle.** 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proven. *Microbiological Reviews* **46**:1-42.
- Haake, D. A., M. A. Suchard, M. M. Kelley, M. Dundoo, D. P. Alt, and R. L. Zuerner.** 2004. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *Journal of Bacteriology* **186**:2818-2828.
- Habyarimana, F., S. Al-Khodori, A. Kalia, J. E. Graham, C. T. Price, M. T. Garcia, and Y. Abu Kwaik.** 2008. Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophi-*

la in parasitism of protozoan hosts and human macrophages. *Environmental Microbiology* **10**:1460-1474.

Haegeman, A., B. Vanholme, J. Jacob, T. T. M. Vandekerckhove, M. Claeys, G. Borgonie, and G. Gheysen. 2009. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup. *International Journal for Parasitology* **39**:1045-1054.

Heath, B. D., R. D. J. Butcher, W. G. F. Whitfield, and S. F. Hubbard. 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* **9**:313-316.

Hendrix, R. W., M. C. M. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:2192-2197.

Hertig, M. 1936. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis*(Gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* **28**:453-486.

Hertig M, Wolbach S. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *Journal of Medical Research* **44**: 329-374.

Hilgenboecker, K., P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Telschow, and J. H. Werren. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**:215-220.

Hiroki, M., Y. Kato, T. Kamito, and K. Miura. 2002. Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera : Pieridae). *Naturwissenschaften* **89**:167-170.

Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons. 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* **40**:692-701.

Hoffmann, A. A. 1988. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **48**:61-67.

Hoffmann, A. A., D. Clancy, and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* **76**:1-8.

Hoffmann, A. A., D. J. Clancy, and E. Merton. 1994. Cytoplasmic Incompatibility in Australian Populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **136**:993-999.

Holmes, E. C., R. Urwin, and M. C. J. Maiden. 1999. The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* **16**:741-749.

- Hotopp, J. C. D., M. E. Clark, D. Oliveira, J. M. Foster, P. Fischer, M. C. Torres, J. D. Giebel, N. Kumar, N. Ishmael, S. L. Wang, J. Ingram, R. V. Nene, J. Shepard, J. Tomkins, S. Richards, D. J. Spiro, E. Ghedin, B. E. Slatko, H. Tettelin, and J. H. Werren.** 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* **317**:1753-1756.
- Hryniewicz-Jankowska, A., A. Czogalla, E. Bok, and A. F. Sikorski.** 2002. Ankyrins, multifunctional proteins involved in many cellular pathways. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* **40**:239-249.
- Huigens, M. E., R. F. Luck, R. H. G. Klaassen, M. Maas, M. Timmermans, and R. Stouthamer.** 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature* **405**:178-179.
- Hurst, G. D. D., and M. Schilthuizen.** 1998. Selfish genetic elements and speciation. *Heredity* **80**:2-8.
- Hurst, G. D. D., and J. H. Werren.** 2001. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* **2**:597-606.
- Hurst, L. D.** 1991. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **244**:91-99.
- Ioannidis P, Bourtzis K.** 2007. Insect symbionts and applications: The paradigm of cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia*. *Entomological Research* **36**: 125-138.
- Ioannidis, P., J. C. D. Hotopp, P. Sapountzis, S. Siozios, G. Tsiamis, S. R. Bordenstein, L. Baldo, J. H. Werren, and K. Bourtzis.** 2007. New criteria for selecting the origin of DNA replication in *Wolbachia* and closely related bacteria. *BMC Genomics* **8**.
- Ishikawa, H.** 2003. Insect Symbiosis: An introduction. Pp. 1 - 21 in M. T. Bourtzis K, ed. *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ishmael, N., J. C. D. Hotopp, P. Ioannidis, S. Biber, J. Sakamoto, S. Siozios, V. Nene, J. Werren, K. Bourtzis, S. R. Bordenstein, and H. Tettelin.** 2009. Extensive genomic diversity of closely related *Wolbachia* strains. *Microbiology* **155**:2211-2222.
- Iturbe-Ormaetxe, I., G. R. Burke, M. Riegler, and S. L. O'Neill.** 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology* **187**:5136-5145.
- Jaenike, J.** 2007b. Spontaneous emergence of a new *wolbachia* phenotype. *Evolution* **61**:2244-2252.
- Jaenike, J.** 2007a. Fighting back against male-killers. *Trends in Ecology & Evolution* **22**:167-169.

- Jaenike, J., K. A. Dyer, C. Cornish, and M. S. Minhas.** 2006. Asymmetrical reinforcement and *Wolbachia* infection in *Drosophila*. *PLoS Biology* **4**:1852-1862.
- Jeong, G., and R. Stouthamer.** 2005. Genetics of female functional virginity in the Parthenogenesis-*Wolbachia* infected parasitoid wasp *Telenomus nawai* (Hymenoptera : Scelionidae). *Heredity* **94**:402-407.
- Jeyaprakash, A., and M. A. Hoy.** 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* **9**:393-405.
- Jiggins, F. M.** 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. *Molecular Biology and Evolution* **19**:1640-1643.
- Jiggins, F. M., G. D. D. Hurst, J. Schulenburg, and M. E. N. Majerus.** 2001. Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. *Heredity* **86**:161-166.
- Jiggins, F. M., J. H. G. von der Schulenburg, G. D. D. Hurst, and M. E. N. Majerus.** 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**:1423-1427.
- Juchault, P., T. Rigaud, and J. P. Mocquard.** 1992. Evolution of Sex-Determining mechanisms in a wild population of *Armadillidium vulgare* Latr (Crustacea, Isopoda) - Competition between 2 feminizing parasitic sex factors. *Heredity* **69**:382-390.
- Kageyama, D., G. Nishimura, S. Hoshizaki, and Y. Ishikawa.** 2002. Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera : Crambidae). *Heredity* **88**:444-449.
- Kageyama, D., and W. Traut.** 2004. Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapularis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**:251-258.
- Kambris, Z., P. E. Cook, H. K. Phuc, and S. P. Sinkins.** 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* **326**:134-136.
- Keller, G. P., D. M. Windsor, J. M. Saucedo, and J. H. Werren.** 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Molecular Ecology* **13**:2405-2420.
- Kikuchi, Y., and T. Fukatsu.** 2003. Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:6082-6090.

- Klasson, L., Z. Kambris, P. E. Cook, T. Walker, and S. P. Sinkins.** 2009b. Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. *Bmc Genomics* **10**.
- Klasson, L., T. Walker, M. Sebaihia, M. J. Sanders, M. A. Quail, A. Lord, S. Sanders, J. Earl, S. L. O'Neill, N. Thomson, S. P. Sinkins, and J. Parkhill.** 2008. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. *Molecular Biology and Evolution* **25**:1877-1887.
- Klasson, L., J. Westberg, P. Sapountzis, K. Nasiund, Y. Lutnaes, A. C. Darby, Z. Veneti, L. M. Chen, H. R. Braig, R. Garrett, K. Bourtzis, and S. G. E. Andersson.** 2009a. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:5725-5730.
- Kondo, N., N. Nikoh, N. Ijichi, M. Shimada, and T. Fukatsu.** 2002. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:14280-14285.
- Kose, H., and T. L. Karr.** 1995. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an Anti-*Wolbachia* Monoclonal-Antibody. *Mechanisms of Development* **51**:275-288.
- Koukou, K., H. Pavlikaki, G. Kiliass, J. H. Werren, K. Bourtzis, and S. N. Alahiotis.** 2006. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution* **60**:87-96.
- Kozek, W. J.** 1977. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *Journal of Parasitology* **63**:992-1000.
- Kozek, W. J., and H. F. Marroquin.** 1977. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **26**:663-678.
- Landmann, F., G. A. Orsi, B. Loppin, and W. Sullivan.** 2009. *Wolbachia*-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pronucleus. *PLoS Pathogens* **5**.
- Langworthy, N. G., A. Renz, U. Mackenstedt, K. Henkle-Duhrsen, M. B. D. Bronsvoort, V. N. Tanya, M. J. Donnelly, and A. J. Trees.** 2000. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**:1063-1069.

- Lassy, C. W., and T. L. Karr.** 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development* **57**:47-58.
- Laven, H.** 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* **5**:370-375.
- Laven, H.** 1959. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens*-complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **24**:166-173.
- Laven, H.** 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature* **216**:383-384.
- LeGrand, J. J., LeGrand-Hamelin, E. & Juchault, P.** 1987. Sex determination in Crustacea. *Biol Rev* **62**:439-470.
- Lin, M. Q., A. den Dulk-Ras, P. J. J. Hooykaas, and Y. Rikihisa.** 2007. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cellular Microbiology* **9**:2644-2657.
- Lo, N., C. Paraskevopoulos, K. Bourtzis, S. L. O'Neill, J. H. Werren, S. R. Bordenstein, and C. Bandi.** 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:654-657.
- Louis, C., and L. Nigro.** 1989. Ultrastructural Evidence of *Wolbachia*-Rickettsiales in *Drosophila simulans* and Their Relationships with Unidirectional Cross-Incompatibility. *Journal of Invertebrate Pathology* **54**:39-44.
- Lux, S. E., K. M. John, and V. Bennett.** 1990. Analysis of cdna for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* **344**:36-42.
- Malloch, G., and B. Fenton.** 2005. Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. *Molecular Ecology* **14**:627-637.
- Marcotte, E. M., M. Pellegrini, T. O. Yeates, and D. Eisenberg.** 1998. A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology* **293**:151-160.
- Margulis, L.** 1970. *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press.
- Martin G, P. Juchault, O. Sorokine, A. Vandorsselaer.** 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr (Crustacea, Oniscidea). *General and Comparative Endocrinology* **80**: 349-354.
- Masui, S., T. Sasaki and H. Ishikawa.** 2000b. Genes for the type IV secretion system in an intracellular symbiont, *Wolbachia*, a causative agent of various sexual alterations in arthropods. *Journal of Bacteriology* **182**:6529-6531.

- Masui, S., S. Kamoda, T. Sasaki, and H. Ishikawa.** 1999. The first detection of the insertion sequence ISW1 in the intracellular reproductive parasite *Wolbachia*. *Plasmid* **42**:13-19.
- Masui, S., S. Kamoda, T. Sasaki, and H. Ishikawa.** 2000a. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *Journal of Molecular Evolution* **51**:491-497.
- Masui, S., H. Kuroiwa, T. Sasaki, M. Inui, T. Kuroiwa, and H. Ishikawa.** 2001. Bacteriophage WO and virus-like particles in *Wolbachia*, an endosymbiont of arthropods. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**:1099-1104.
- McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill.** 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:2918-2923.
- McMeniman, C. J., R. V. Lane, B. N. Cass, A. W. C. Fong, M. Sidhu, Y. F. Wang, and S. L. O'Neill.** 2009. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science* **323**:141-144.
- Meeus, P. F. M., K. A. Brayton, G. H. Palmer, and A. F. Barbet.** 2003. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Molecular Microbiology* **47**:633-643.
- Mercot, H., and D. Poinso.** 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* **391**:853.
- Mercot, H., B. Llorente, M. Jacques, A. Atlan, and C. MontchampMoreau.** 1995. Variability within the Seychelles Cytoplasmic Incompatibility System in *Drosophila simulans*. *Genetics* **141**:1015-1023.
- Min, K.-T., and S. Benzer.** 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**:10792-10796.
- Moran, N. A.** 2006. Symbiosis. *Current Biology* **16**:R866-R871.
- Moran, N. A.** 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:2873-2878.
- Moran, N. A., J. P. McCutcheon, and A. Nakabachi.** 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**:165-190.
- Moran, N. A., M. A. Munson, P. Baumann, and H. Ishikawa.** 1993. A Molecular Clock in Endosymbiotic Bacteria Is Calibrated Using the Insect Hosts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **253**:167-171.

- Moran, N. A., and G. R. Plague.** 2004. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**:627-633.
- Moran, N. A., J. A. Russell, R. Koga, and T. Fukatsu.** 2005. Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:3302-3310.
- Morchon, R., C. Bazzocchi, J. Lopez-Belmonte, J. R. Martin-Pacho, L. H. Kramer, G. Grandi, and F. Simon.** 2007. iNOs expression is stimulated by the major surface protein (rWSP) from *Wolbachia* bacterial endosymbiont of *Dirofilaria immitis* following subcutaneous injection in mice. *Parasitology International* **56**:71-75.
- Mosavi, L. K., T. J. Cammett, D. C. Desrosiers, and Z. Y. Peng.** 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* **13**:1435-1448.
- Nakayama, K., A. Yamashita, K. Kurokawa, T. Morimoto, M. Ogawa, M. Fukuhara, H. Urakami, M. Ohnishi, I. Uchiyama, Y. Ogura, T. Ooka, K. Oshima, A. Tamura, M. Hattori, and T. Hayashi.** 2008. The Whole-genome Sequencing of the Obligate Intracellular Bacterium *Orientia tsutsugamushi* Revealed Massive Gene Amplification During Reductive Genome Evolution. *DNA Research* **15**:185-199.
- Narita, S., D. Kageyama, M. Nomura, and T. Fukatsu.** 2007. Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: Feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4332-4341.
- Negri, I., M. Pellicchia, P. J. Mazzoglio, A. Patetta, and A. Alma.** 2006. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex-determination system. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**:2409-2416.
- Nikoh, N., K. Tanaka, F. Shibata, N. Kondo, M. Hizume, M. Shimada, and T. Fukatsu.** 2008. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Research* **18**:272-280.
- Nirgianaki, A., G. K. Banks, D. R. Frohlich, Z. Veneti, H. R. Braig, T. A. Miller, I. D. Bedford, P. G. Markham, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology* **47**:93-101.
- Ogata, H., B. La Scola, S. Audic, P. Renesto, G. Blanc, C. Robert, P. E. Fournier, J. M. Claverie, and D. Raoult.** 2006. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genetics* **2**:733-744.

- Ogata, H., P. Renesto, S. Audic, C. Robert, G. Blanc, P. E. Fournier, H. Parinello, J. M. Claverie, and D. Raoult.** 2005. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *PLoS Biology* **3**:1391-1402.
- Oliver, K. M., P. H. Degnan, G. R. Burke, and N. A. Moran.** 2009. Facultative Symbionts of Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology* **55**.
- Oliver, K. M., J. A. Russell, N. A. Moran, and M. S. Hunter.** 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:1803-1807.
- O'Neill, S. L., R. Giordano, A.M.E. Colbert, T.L. Karr and H.M. Robertson.** 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**:2699-2702.
- O'Neill, S. L., and T. L. Karr.** 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* **348**:178-180.
- Pan, X. X., A. Luhrmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce, and C. R. Roy.** 2008. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**:1651-1654.
- Panaram, K., and J. L. Marshall.** 2007. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? *Genetica* **130**:53-60.
- Park, J., K. J. Kim, K. Choi, D. J. Grab, and J. S. Dumler.** 2004. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cellular Microbiology* **6**:743-751.
- Pichon, S., D. Bouchon, R. Cordaux, C. Braquart-Varnier, K. Brugger, L. M. Chen, R. A. Garrett, and P. Greve.** 2008. Type IV secretion system and ankyrin genes in *Wolbachia pipientis* harbored by terrestrial crustacean isopods. 5th International *Wolbachia* Conference. 9-14 June, Kolymbari, Greece.
- Pichon, S., D. Bouchon, R. Cordaux, L. M. Chen, R. A. Garrett, and P. Greve.** 2009. Conservation of the Type IV Secretion System throughout *Wolbachia* evolution. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **385**:557-562.
- Poinsot, D., S. Charlat, and H. Mercot.** 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *Bioessays* **25**:259-265.

- Poinsot, D., and H. Mercot.** 1999. *Wolbachia* can rescue from cytoplasmic incompatibility while being unable to induce it in *E. Wagner, J. Normann, H. Greppin, J. H. P. Hackstein, R. G. Herrmann, K. V. Kowallik, H. E. A. Schenk, and J. Seckbach*, eds. From Symbiosis to Eukaryotism - Endocytobiology VII. Universities of Geneva and Freiburg im Breisgau.
- Pool, J. E., A. Wong, and C. F. Aquadro.** 2006. Finding of male-killing *Spiroplasma* infecting *Drosophila melanogaster* in Africa implies transatlantic migration of this endosymbiont. *Heredity* **97**:27-32.
- Presgraves, D. C.** 2000. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Genetics* **154**:771-776.
- Rajalingam, R., P. Parham, and L. Abi-Rached.** 2004. Domain shuffling has been the main mechanism forming new hominoid killer cell Ig-like receptors. *Journal of Immunology* **172**:356-369.
- Rances, E., D. Voronin, V. Tran-Van, and P. Mavingui.** 2008. Genetic and functional characterization of the type IV secretion system in *Wolbachia*. *J Bacteriol* **190**:5020-5030.
- Reed, K. M., and J. H. Werren.** 1995. Induction of Paternal Genome Loss by the Paternal-Sex-Ratio Chromosome and Cytoplasmic Incompatibility Bacteria (*Wolbachia*) - a Comparative-Study of Early Embryonic Events. *Molecular Reproduction and Development* **40**:408-418.
- Reuter, M., and L. Keller.** 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Molecular Biology and Evolution* **20**:748-753.
- Reynolds, K. T., and A. A. Hoffmann.** 2002. Male age, host effects and the weak expression or nonexpression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genetical Research* **80**:79-87.
- Rich, S. M., S. A. Sawyer, and A. G. Barbour.** 2001. Antigen polymorphism in *Borrelia hermsii*, a clonal pathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:15038-15043.
- Rigaud, T.** 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. Pp. 81-101 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford.
- Ros, V. I. D., V. M. Fleming, E. J. Feil, and J. A. J. Breeuwer.** 2009. How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Super-group Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1036-1043.

- Rousset, F., D. Bouchon, B. Pintureau, P. Juchault and M. Solignac.** 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. Proceedings of Royal Society of London Biological Series **250**:91-98.
- Rowley, S. M., R. J. Raven, and E. A. McGraw.** 2004. *Wolbachia* pipientis in Australian spiders. Current Microbiology **49**:208-214.
- Ruang-areerate, T., and P. Kittayapong.** 2006. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: A potential gene driver of dengue vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**:12534-12539.
- Russ, K., and B. Faber.** 1978. The possible use of IIT to control *Rhagoletis cerasi*, the European cherry fruit fly in Austria. FAO?, Vienna.
- Saint Andre, A. V., N. M. Blackwell, L. R. Hall, A. Hoerauf, N. W. Brattig, L. Volkmann, M. J. Taylor, L. Ford, A. G. Hise, J. H. Lass, E. Diaconu, and E. Pearlman.** 2002. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. Science **295**:1892-1895.
- Sakamoto, J. M., and J. L. Rasgon.** 2006. Geographic distribution of *Wolbachia* infections in *Cimex lectularius* (Heteroptera : Cimicidae). Journal of Medical Entomology **43**:696-700.
- Salzberg, S. L., J. C. D. Hotopp, A. L. Delcher, M. Pop, D. R. Smith, M. B. Eisen, and W. C. Nelson.** 2005a. Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species. Genome Biology **6**.
- Salzberg, S. L., J. C. D. Hotopp, A. L. Delcher, M. Pop, D. R. Smith, M. B. Eisen, and W. C. Nelson.** 2005b. Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species (vol 6, art no R23, 2005). Genome Biology **6**.
- Sanogo, Y. O., and S. L. Dobson.** 2004. Molecular discrimination of *Wolbachia* in the *Culex pipiens* complex: evidence for variable bacteriophage hyperparasitism. Insect Molecular Biology **13**:365-369.
- Sasaki, T., and H. Ishikawa.** 2000. Transinfection of *Wolbachia* in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. Heredity **85**:130-135.
- Scarborough, C. L., J. Ferrari, and H. C. J. Godfray.** 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. Science **310**:1781-1781.
- Sedgwick, S. G., and S. J. Smerdon.** 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends in Biochemical Sciences **24**:311-316.
- Seshadri, R., I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, K. E. Nelson, W. C. Nelson, N. L. Ward, H. Tettelin, T. M. Davidsen, M. J. Beanan, R. T. Deboy, S. C. Daugherty, L. M. Brinkac, R. Madupu, R. J. Dodson, H. M. Khouri, K. H. Lee, H. A. Carty, D. Scan-**

- lan, R. A. Heinzen, H. A. Thompson, J. E. Samuel, C. M. Fraser, and J. F. Heidelberg. 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**:5455-5460.
- Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Ishikawa. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp APS. Nature **407**:81-86.
- Shoemaker, D. D., V. Katju, and J. Jaenike. 1999. *Wolbachia* and the evolution of reproductive isolation between *Drosophilla recens* and *Drosophila subquinaria*. Evolution **53**:1157-1164.
- Siguier, P., J. Filie, and M. Chandler. 2006. Insertion sequences in prokaryotic genomes. Current Opinion in Microbiology **9**:526-531.
- Silva, F. J., A. Latorre, and A. Moya. 2003. Why are the genomes of endosymbiotic bacteria so stable? Trends in Genetics **19**:176-180.
- Sinkins, S. P., C.F. Curtis and S.L. O'Neill. 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. Pp. 155-175 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. Influential passengers. Oxford University Press, Oxford.
- Sinkins, S. P., and H. C. J. Godfray. 2004. Use of *Wolbachia* to drive nuclear transgenes through insect populations. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **271**:1421-1426.
- Sinkins, S. P., and F. Gould. 2006. Gene drive systems for insect disease vectors. Nature Reviews Genetics **7**:427-435.
- Sinkins, S. P., T. Walker, A. R. Lynd, A. R. Steven, B. L. Makepeace, H. C. J. Godfray, and J. Parkhill. 2005. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. Nature **436**:257-260.
- Sinkins, S. P. and S.L. O'Neill. 2000. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. Pp. 271-287. Insect transgenesis: Methods and Applications.
- Siozios, S., P. Sapountzis, P. Ioannidis, and K. Bourtzis. 2008. *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. Insect Science **15**:89-100.
- Sironi, M., C. Bandi, L. Sacchi, B. DiSacco, G. Damiani, and C. Genchi. 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. Molecular and Biochemical Parasitology **74**:223-227.

- Stevens, L., R. Giordano, and R. F. Fialho.** 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**:519-545.
- Stouthamer, R.** 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. Pp. 102-124 in S. L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren, ed. *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford.
- Stouthamer, R., J. A. J. Breeuwer, and G. D. D. Hurst.** 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* **53**:71-102.
- Tagami, Y., and K. Miura.** 2004. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Insect Molecular Biology* **13**:359-364.
- Tamas, I., L. Klasson, B. Canback, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, J. J. Wernegreen, J. P. Sandstrom, N. A. Moran, and S. G. E. Andersson.** 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* **296**:2376-2379.
- Taylor, M. J., C. Bandi, A. M. Hoerauf, and J. Lazdins.** 2000b. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes: A target for control? *Parasitology Today* **16**:179-180.
- Taylor, M. J., H. F. Cross and K. Bitlo.** 2000a. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *Journal of Experimental Medicine* **191**:1429-1435.
- Taylor, M. J., C. Bandi, and A. Hoerauf.** 2005. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in Parasitology*, Vol 60 **60**:245-284.
- Teixeira, L., A. Ferreira, and M. Ashburner.** 2008. The Bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* **6**:2753-2763.
- Telschow, A., M. Flor, Y. Kobayashi, P. Hammerstein, and J. H. Werren.** 2007. *Wolbachia*-induced unidirectional cytoplasmic incompatibility and speciation: mainland-island model. *PLoS ONE* **2**:e701.
- Telschow, A., P. Hammerstein, and J. H. Werren.** 2002. Effects of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: Mainland-island model. *Integrative and Comparative Biology* **42**:340-351.
- Telschow, A., P. Hammerstein, and J. H. Werren.** 2005a. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution* **59**:1607-1619.
- Telschow, A., N. Yamamura, and J. H. Werren.** 2005b. Bidirectional cytoplasmic incompatibility and the stable coexistence of two *Wolbachia* strains in parapatric host populations. *Journal of Theoretical Biology* **235**:265-274.

- Tram, U., P. A. Ferree, and W. Sullivan.** 2003. Identification of *Wolbachia*-host interacting factors through cytological analysis. *Microbes and Infection* **5**:999-1011.
- Tram, U., and W. Sullivan.** 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* **296**:1124-1126.
- Tseng, T.-T., B. Tyler, and J. Setubal.** 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology* **9**:S2.
- Turley, A. P., L. A. Moreira, S. L. O'Neill, and E. A. McGraw.** 2009. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**: e516.
- Vandekerckhove, T. T. M., S. Watteyne, W. Bonne, D. Vanacker, S. Devaere, B. Rumes, J. P. Maelfait, M. Gillis, J. G. Swings, H. R. Braig, and J. Mertens.** 2003. Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with *Wolbachia pipientis* (alpha-Proteobacteria). *Belgian Journal of Zoology* **133**:61-69.
- van Ham, R., J. Kamerbeek, C. Palacios, C. Rausell, F. Abascal, U. Bastolla, J. M. Fernandez, L. Jimenez, M. Postigo, F. J. Silva, J. Tamames, E. Viguera, A. Latorre, A. Valencia, F. Moran, and A. Moya.** 2003. Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:581-586.
- van Lenteren, J. C., D. Babendreier, F. Bigler, G. Burgio, H. M. T. Hokkanen, S. Kuske, A. J. M. Loomans, I. Menzler-Hokkanen, P. C. J. Van Rijn, M. B. Thomas, M. G. Tommasini, and Q. Q. Zeng.** 2003. Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *Biocontrol* **48**:3-38.
- Veneti, Z., J. K. Bentley, T. Koana, H. R. Braig, and G. D. D. Hurst.** 2005. A functional dosage compensation complex required for male killing in *Drosophila*. *Science* **307**:1461-1463.
- Walker, T., L. Klasson, M. Sebaihia, M. J. Sanders, N. R. Thomson, J. Parkhill, and S. P. Sinkins.** 2007. Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of *Wolbachia* from the *Culex pipiens* group. *BMC Biology* **5**.
- Weeks, A. R., and J. A. J. Breeuwer.** 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**:2245-2251.
- Weeks, A. R., K. T. Reynolds, A. A. Hoffmann, and H. Mann.** 2002. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology & Evolution* **17**:257-262.

- Werren, J. H.** 1997. Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology **42**:587-609.
- Werren, J. H., W. Zhang and L.R. Guo.** 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proceedings of Royal Society of London Biological Series **261**:55-63.
- Werren, J. H.** 1998. *Wolbachia* and speciation. Pp. 245-260 in D. Howard, and S. Berlocher, ed. Endless forms: Species and speciation. Oxford University Press, Oxford.
- Werren, J. H., L. Baldo, and M. E. Clark.** 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology **6**:741-751.
- Werren J, O'Neill S.** 1997. The evolution of heritable symbionts. In: O'Neill S, Hoffmann A, Werren J (eds) Influential passengers. Oxford University Press, Oxford, pp 1-41.
- Werren, J. H., and J. D. Bartos.** 2001. Recombination in *Wolbachia*. Current Biology **11**:431-435.
- West, S. A., J. M. Cook, J. H. Werren, and H. C. J. Godfray.** 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. Molecular Ecology **7**:1457-1465.
- Wright, J. D., and A. R. Barr.** 1980. The ultrastructure and symbiotic relationships of *Wolbachia* of the *Aedes scutellaris* group. Journal of Ultrastructure Research **72**:52-64.
- Wright, J. D., F. S. Sjostrand, J. K. Portaro, and A. R. Barr.** 1978. Ultrastructure of Rickettsia-like microorganism *Wolbachia pipientis* and associated virus-like bodies in mosquito *Culex pipiens*. Journal of Ultrastructure Research **63**:79-85.
- Wright, J. D. a. B.-T. Wang.** 1980. Observations on *Wolbachiae* in mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology **35**:200-208.
- Wu, M., L. V. Sun, J. Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J. C. Brownlie, E. A. McGraw, W. Martin, C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, R. Madupu, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, Y. Mohamoud, P. Lee, K. Berry, M. B. Young, T. Utterback, J. Weidman, W. C. Nierman, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, S. L. O'Neill, and J. A. Eisen.** 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. PLoS Biology **2**:327-341.
- Xi, Z. Y., C. C. H. Khoo, and S. L. Dobson.** 2005. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. Science **310**:326-328.
- Yen, J. H., and A.R. Barr.** 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. Nature **232**:657-658.

- Zabalou, S., A. Apostolaki, I. Livadaras, G. Franz, A. S. Robinson, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2009. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**:232-240.
- Zabalou, S., A. Apostolaki, S. Pattas, Z. Veneti, C. Paraskevopoulos, I. Livadaras, G. Markakis, T. Brissac, H. Mercot, and K. Bourtzis.** 2008. Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. *Genetics* **178**:2145-2160.
- Zabalou, S., S. Charlat, A. Nirgianaki, D. Lachaise, H. Mercot, and K. Bourtzis.** 2004a. Natural *wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the *w*Ri modification. *Genetics* **167**:827-834.
- Zabalou, S., M. Riegler, M. Theodorakopoulou, C. Stauffer, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2004b. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:15042-15045.
- Zchori-Fein, E., and S. J. Perlman.** 2004. Distribution of the bacterial symbiont Cardinium in arthropods. *Molecular Ecology* **13**:2009-2016.
- Zchori-Fein, E., R. T. Roush, and D. Rosen.** 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of Aphytis (Hymenoptera : Aphelinidae). *Current Microbiology* **36**:1-8.
- Zeh, D. W., J. A. Zeh, and M. M. Bonilla.** 2005. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity* **95**:41-49.
- Zhou, W. G., F. Rousset, and S. O'Neill.** 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:509-515.
- Zientz, E., T. Dandekar, and R. Gross.** 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**:745-770.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Μελέτη της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης σε διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia*

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	68
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
2.2.1 Στελέχη <i>Drosophila</i> και <i>Wolbachia</i>	73
2.2.2 Απομόνωση DNA και ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.	73
2.2.3 Ανίχνευση ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης με τη μέθοδο της αποτύπωσης κατά Southern.....	76
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
2.3.1 Μελέτη της κατανομής των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης σε 11 συμβιωτικές σχέσεις <i>Drosophila-Wolbachia</i>	77
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	82
2.4.1 Τα γονίδια αγκυρίνης της <i>Wolbachia</i> παρουσιάζουν μεγάλη πυκνότητα.....	82
2.4.2 Γονίδια αγκυρίνης και προφαγικά στοιχεία στη <i>Wolbachia</i>	85
2.4.3 Συντηρημένα γονίδια μεταξύ των διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων <i>Drosophila-Wolbachia</i>	85
2.4.4 Κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης και φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των στελεχών <i>Wolbachia</i>	87
2.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια του γένους *Wolbachia* (α-πρωτεοβακτήρια, *Rickettsiales*) αποτελούν ένα από τους πλέον διαδεδομένους και επιτυχημένους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς στη φύση. Η *Wolbachia* αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις με έναν μεγάλο αριθμό αρθροπόδων όπως έντομα, αραχνοειδή, ακάρεα, χερσαία ισόποδα καθώς επίσης και με νηματώδεις (Werren 1997; Bandi *et al.* 1998; Stouthamer *et al.* 1999; Bourtzis & Braig 1999, Jeyaprakash & Hoy 2000; Ros *et al.* 2009). Μόνο μεταξύ των εντόμων, εκτιμάται ότι πάνω από το 65% (περίπου 10^6 είδη) των ειδών εντόμων είναι μολυσμένα με το βακτήριο (Jeyaprakash & Hoy 2000; Hilgenboecker *et al.* 2008). Η τεράστια επιτυχία της *Wolbachia* οφείλεται εν μέρει στο μεγάλο εύρος των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει με τους ξενιστές της, οι οποίες κυμαίνονται από σχέσεις αμοιβαίας συμβίωσης έως και σχέσεις αναπαραγωγικού παρασιτισμού. Στη δεύτερη περίπτωση, η *Wolbachia* επιδρά με έναν απρόσμενο τρόπο πάνω στην αναπαραγωγική επιτυχία των ξενιστών της προκειμένου να εξασφαλίσει τη μητρική μετάβαση από γενιά σε γενιά. Οι επιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν την παρθενογένεση, τη θηλυκοποίηση, τη θανάτωση των αρσενικών και την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα είναι η πιο διαδεδομένη και η εκτενέστερα μελετημένη επίδραση της *Wolbachia* (Bourtzis *et al.* 2003). Ο μοριακός μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την έκφραση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας δεν είναι ακόμα γνωστός. Ωστόσο το μοντέλο “τροποποίηση – διάσωση” (modification ή mod – rescue ή resc) περιγράφει ικανοποιητικά το φαινόμενο (Werren 1997; Bourtzis *et al.* 1998; Mercot & Poinot 1998).

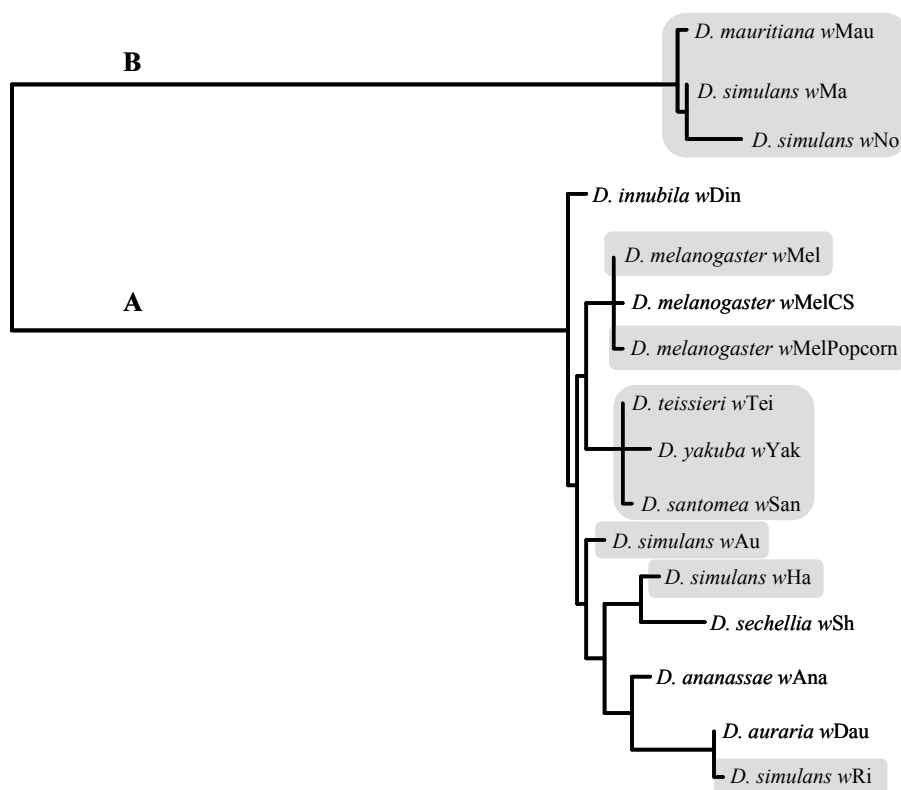
Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η *Wolbachia* με κάποιον άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό, τροποποιεί τους πατρικούς γαμέτες (Presgraves 2000) με αποτέλεσμα την ασύγχρονη είσοδό τους στη πρώτη ζυγωτική μίτωση και το θάνατο του εμβρύου (Tram & Sullivan 2002; Tram *et al.* 2003; Landmann *et al.* 2009). Αντίθετα, η παρουσία του ίδιου ή ενός συμβατού στελέχους *Wolbachia* στο ωάριο μπορεί να αντισταθμίσει την τροποποίηση επιτρέποντας τη δημιουργία του ζυγώτη (Ferree & Sullivan 2006). Βάσει του παραπάνω μοντέλου, διακρίνονται τέσσερις τύποι στελεχών *Wolbachia* και κατ' επέκταση συμβιωτικές σχέσεις ανάλογα με την ικανότητά τους να επάγουν (mod) και να σώζουν (resc) την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα: α) τα στελέχη $mod^+/resc^+$ είναι ικανά να προκαλέσουν και να διασώσουν την τροποποίηση, β) τα στελέχη $mod^-/resc^+$ δεν είναι ικανά να προκαλέσουν τροποποίηση, μπορούν όμως να διασώσουν αυτήν που προκαλείται από κάποιο άλλο “συμβατό” στέλεχος, γ) τα στελέχη $mod^-/resc^-$ τα οποία δεν είναι σε θέση ούτε να προκαλέσουν ούτε να διασώσουν την τροποποίηση και δ) τα στελέχη

mod⁺/resc⁻, που ενώ προκαλούν τροποποίηση δεν είναι σε θέση να τη διασώσουν (Werren *et al.* 1997; Bourtzis *et al.* 1998; Mercot & Poinso 1998; Zabalou *et al.* 2008).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει η *Wolbachia* με διάφορα είδη του γένους *Drosophila*. Έτσι λοιπόν είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος όγκος πληροφοριών για μια πληθώρα καλά χαρακτηρισμένων στελεχών όσον αφορά το φαινότυπο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Για παράδειγμα, τα πολύ συγγενικά στελέχη *wMel* και *wMelPorcorn* που μολύνουν το είδος *D. melanogaster* είναι γνωστό ότι επάγουν μέτριας έντασης κυτταροπλασματική ασυμβατότητα στους ξενιστές και χαρακτηρίζονται ως *mod⁺/resc⁺* στελέχη (Bourtzis *et al.* 1994; McGraw *et al.* 2001, 2002; Reynolds *et al.* 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το στέλεχος *wMelPorcorn* μειώνει το χρόνο ζωής του ξενιστή λόγω ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού στους νευρικούς ιστούς (Min & Benzer 1997). Από την άλλη μεριά, τα στελέχη της *Wolbachia* που μολύνουν τα είδη του συμπλέγματος *yakuba* [*D. yakuba*(*wYak*), *D. teissieri*(*wTei*), *D. santomea*(*wSan*)] [Lachaise *et al.* 2000], και παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με το στέλεχος *wMel*, δεν είναι δυνατόν να προκαλέσουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα στο φυσικό ξενιστή τους (Zabalou *et al.* 2004). Ωστόσο έχουν την ικανότητα να διασώζουν πλήρως την τροποποίηση που προκαλείται από το φυλογενετικά απομακρυσμένο στέλεχος *wRi* και, για τον λόγο αυτό, χαρακτηρίζονται ως *mod⁺/resc⁺*. Τα στελέχη *wRi*, *wHa*, *wNo*, *wMa* και *wAu* αναπτύσσουν, όλα τους, συμβιωτικές σχέσεις με το είδος *D. simulans*. Μεταξύ τους όμως παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές τόσο φυλογενετικά όσο και φαινοτυπικά (Mercot & Charlat 2004). Τα στελέχη *wRi*, *wHa* και *wNo* είναι σε θέση να επάγουν υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας και να διασώζουν τον φαινότυπο αυτό στο φυσικό τους ξενιστή (*mod⁺/resc⁺*) ενώ μεταξύ τους είναι αμφίδρομα ασύμβατα (Hoffman *et al.* 1986; O'Neill & Karr 1990; Mercot *et al.* 1995). Αντιθέτως, το στέλεχος *wMa* χαρακτηρίζεται ως *mod⁺/resc⁺* γιατί δεν επάγει κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, ωστόσο, είναι σε θέση να διασώζει την τροποποίηση που προκαλεί το στέλεχος *wNo* (Bourtzis *et al.* 1998; James & Ballard 2000; Charlat *et al.* 2003). Το στέλεχος *wAu* είναι το μόνο μέχρι στιγμής στέλεχος *Wolbachia* το οποίο ούτε επάγει κυτταροπλασματική ασυμβατότητα αλλά ούτε μπορεί να διασώζει την τροποποίηση άλλων στελεχών (*mod⁺/resc⁻*) [Hoffman *et al.* 1996; James & Ballard 2000; Charlat *et al.* 2003]. Τέλος, το είδος *D. mauritiana* είναι μολυσμένο με το στέλεχος *wMau* το οποίο παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά με το *wMa* (*mod⁺/resc⁺*) [Giordano *et al.* 1995].

Τα προαναφερθέντα στελέχη *Wolbachia* ανήκουν στις δύο υπερομάδες Α (*wMel*, *wMelPorcorn*, *wAu*, *wTei*, *wYak*, *wSan*, *wRi*, *wHa*) και Β (*wNo*, *wMa*, *wMau*), οι οποίες απέχουν εξελικτικά περίπου 60 εκατομμύρια χρόνια (Werren *et al.* 1995). Μερικά από αυτά φαίνεται να

είναι πολύ συγγενικά μεταξύ τους σε τέτοιο βαθμό που δεν είναι σε θέση να διαχωριστούν βάσει του γρήγορα εξελισσόμενου γενετικού μάρτυρα *wsp*, που χρησιμοποιείται ευρέως για την ταξινόμηση των στελεχών της *Wolbachia* (Zhou *et al.* 1998; Lachaise *et al.* 2000). Για παράδειγμα τα στελέχη *wMel* και *wMelPopcorn* είναι πανομοιότυπα με βάση το γενετικό μάρτυρα *wsp*. Επίσης, τα στελέχη *wTei*, *wYak* και *wSan* εμφανίζουν μόνο μια νουκλεοτιδική διαφορά με τη νουκλεοτιδική ακολουθία *wsp* του στελέχους *wAu*. Τέλος, τα στελέχη της B υπερομάδας, *wMa* και *wMau*, έχουν 100% ομοιότητα στην ακολουθία του γονιδίου *wsp*. Η ανάπτυξη ενός συστήματος MLST (Multilocus Sequence Typing) για τη *Wolbachia* αποτέλεσε ουσιαστική συμβολή στη προσπάθεια ταξινόμησης και διαχωρισμού πολύ συγγενικών στελεχών (Paraskevopoulos *et al.* 2006; Baldo *et al.* 2006). Στην Εικόνα 2.1 παρουσιάζονται οι φυλογενετικές σχέσεις των παραπάνω στελεχών σύμφωνα με το σύστημα MLST που αναπτύχθηκε από τους (Paraskevopoulos *et al.* 2006) και βασίζεται στη συνδυασμένη ανάλυση 9 γενετικών μαρτύρων. Ο διαχωρισμός μεταξύ πολύ συγγενικών στελεχών, τα οποία όμως παρουσιάζουν φαινοτυπικές διαφορές, αποτελεί θεμέλιο λίθο στην προσπάθεια κατανόησης της εξέλιξης των φαινοτύπων αυτών μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia*.



Εικόνα 2.1. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia* σύμφωνα με τη μέθοδο MLST (Paraskevopoulos *et al.* 2006). Με το γκριζο πλαίσιο αναπαρίστανται οι σχέσεις στις οποίες εστιάστηκε η παρούσα διατριβή.

Αντίθετα με τη συνεχή διεύρυνση της κατανόησης των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των αλληλεπιδράσεων *Drosophila-Wolbachia* καθώς και των εξελικτικών τους σχέσεων, οι γνώσεις μας γύρω από το μοριακό υπόβαθρο των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι στοιχειώδεις. Ωστόσο, η ύπαρξη αυτής της πληθώρας των χαρακτηρισμένων στελεχών, μας δίνει τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε συγκριτικές μελέτες και να συσχετίσουμε τους διαφορετικούς φαινοτύπους με το γενετικό περιεχόμενο των αντίστοιχων στελεχών *Wolbachia*. Για παράδειγμα, η εργασία της Veneti και των συνεργατών της έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής κατανομής στα έμβρυα της *Drosophila* και της φυλογένειας της *Wolbachia* (Veneti *et al.* 2004). Μάλιστα, η κατανομή αυτή παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και δεν αλλάζει μετά τη μεταφορά του βακτηριακού στελέχους σε διαφορετικό ξενιστή (Veneti *et al.* 2004). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα στελέχη που ανήκουν στην υπερομάδα A (*wMelPopcorn*, *wAu*, *wTei*, *wYak*, *wSan*), και είναι πιο συγγενικά στο στέλεχος *wMel*, κατανέμονται κυρίως στο οπίσθιο τμήμα του εμβρύου, στην περιοχή που αναπτύσσονται τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα. Αντιθέτως, τα στελέχη που ανήκουν στην υπερομάδα B (*wNo*, *wMa*, *wMau*) δείχνουν προτίμηση για πρόσθιο το τμήμα του εμβρύου. Τέλος, τα στελέχη *wRi* και *wHa* παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή.

Η αποκωδικοποίηση του πρώτου γονιδιώματος της *Wolbachia*, του στελέχους *wMel* το οποίο παρασιτεί στο είδος *D. melanogaster* (Wu *et al.* 2004), έφερε στο φως νέα στοιχεία για το γενετικό περιεχόμενο και κατ' επέκταση τη βιολογία αυτού του εκπληκτικού συμβιωτικού βακτηρίου. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα, και συνάμα ασυνήθιστα, χαρακτηριστικά ήταν η ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού (23) γονιδίων με επαναλήψεις αγκυρίνης. Ο αριθμός αυτός είναι πραγματικά εντυπωσιακός εάν αναλογιστούμε μάλιστα ότι τα περισσότερα βακτήρια, με εξαίρεση ορισμένα ενδοκυτταρικά παθογόνα, διαθέτουν ελάχιστα γονίδια με επαναλήψεις αγκυρίνης. Οι επαναλήψεις αγκυρίνης βρίσκονται κυρίως σε ευκαρυωτικές και ικές πρωτεΐνες και είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα σε αναστολείς του κυτταρικού κύκλου (CDK) [Sedwick & Smerdon 1999]. Έχει ήδη προταθεί ότι ο φαινότυπος της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας οφείλεται στην ασύγχρονη συμπίκνωση/αποσυμπύκνωση των πατρικών χρωμοσωμάτων στο στάδιο της καρυογαμίας, μια διαδικασία η οποία απαιτεί την ενεργοποίηση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης CDK1 (Tram & Sullivan 2002; Tram *et al.* 2003; Landmann *et al.* 2009). Λόγω των ιδιοτήτων τους, τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* αποτέλεσαν βασικούς υποψηφίους για τη συμμετοχή τους στους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η συγκριτική μελέτη της κατανομής των 23 γονιδίων αγκυρίνης που ανιχνεύθηκαν στο στέλεχος αναφοράς *wMel* σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές

σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* [*D. melanogaster*(wMel), *D. melanogaster*(wMelPopcorn), *D. simulans*(wAu), *D. teissieri*(wTei), *D. yakuba*(wYak), *D. Santomea*(wSan), *D. simulans*(wRi), *D. simulans*(wHa), *D. simulans*(wNo), *D. simulans*(wMa) και *D. maurutiana*(wMau)]. Όπως προαναφέρθηκε, οι σχέσεις αυτές περιλαμβάνουν τόσο συγγενικά όσο και πιο απομακρυσμένα εξελικτικά στελέχη των δύο υπερομάδων Α και Β. Επίσης, διαφέρουν στο φαινότυπο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που επάγουν ($mod^+/resc^+$, $mod^-/resc^+$, $mod^-/resc^-$) καθώς και ως προς τη βακτηριακή κατανομή στα έμβρυα του ξενιστή. Η επιλογή των στελεχών βασίστηκε στο σκεπτικό ότι η βακτηριακή κατανομή στα έμβρυα του ξενιστή πιθανά σχετίζεται με την ιστική κατανομή στα ενήλικα άτομα και το φαινόμενο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε τόσο η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) όσο και η μέθοδος της ανάλυσης κατά Southern. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποστηρίζουν την άποψη ότι τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* αποτελούν μια εξαιρετικά πολυπληθή και δυναμική ομάδα γονιδίων και μάλιστα φαίνεται ότι τα προφαγικά στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση των γονιδίων αυτών.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Στέλεχη *Drosophila* και *Wolbachia*

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν συνολικά έντεκα (11) συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Η καλλιέργεια της κάθε σειράς έγινε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) και σταθερής φωτοπεριόδου (12 ώρες φώς και 12 ώρες σκοτάδι) πάνω σε θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από καλαμποκάλευρο, γλυκόζη και εκχύλισμα ζύμης. Οι συμβιωτικές σχέσεις επιλέχτηκαν με βάση το αν μπορούν ή όχι να εκφράζουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (**modification/rescue phenotype**) όπως επίσης και με βάση την εμβρυική κατανομή του βακτηρίου (πρόσθια, οπίσθια, ομοιόμορφη).

Πίνακας 2.1. Οι έντεκα συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* που μελετήθηκαν.

Ξενιστής	Στέλεχος <i>Wolbachia</i>	Υπερ-ομάδα	Εμβρυική κατανομή	Φαινότυπος ΚΑ*
<i>D. melanogaster</i>	wMel	A	οπίσθια	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. melanogaster</i>	wMelpopcorn		οπίσθια	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wAu		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁻
<i>D. teissieri</i>	wTei		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. yakuba</i>	wYak		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. santomea</i>	wSan		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wRi		ομοιόμορφη	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wHa	B	ομοιόμορφη	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wNo		πρόσθια	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. mauritiana</i>	wMau		πρόσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wMa		πρόσθια	mod ⁻ resc ⁺

* ΚΑ: Κυτταροπλασματική ασυμβατότητα

2.2.2 Απομόνωση DNA και ενίσχυση με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Ολικό DNA απομονώθηκε από κάθε συμβιωτική σχέση σύμφωνα με τη μέθοδο που ανέπτυξαν οι Holmes and Bonner 1973 (Αναλυτικά το πρωτόκολλο στο Παράρτημα, Π.1). Επίσης, ολικό DNA απομονώθηκε και από τα στελέχη *D. melanogaster* (wMelT) και *D. simulans* (wRiT) από τα οποία απομακρύνθηκε η *Wolbachia* με τη χρήση τετρακυκλίνης προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Για κάθε ένα από τα είκοσι τρία (23) γονίδια αγκυρίνης που απαντούν στο στέλεχος wMel σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές (Πίνακας 2.2) και χρησιμοποιήθηκαν

για την ανίχνευση ομολόγων γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και στις έντεκα συμβιωτικές σχέσης του Πίνακα 2.1. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μ l και κάθε αντίδραση περιείχε 1X ρυθμιστικό διάλυμα (*Taq* reaction buffer) αποτελούμενο από (750 mM Tris-Cl pH 8.8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Tween 20), 1.5 mM MgCl_2 , 125 μ M dNTPs, 10 pmol από κάθε εκκινητή, 1 unit *Taq* πολυμεράση (Promega) και ~50 ng ολικό DNA. Οι αντιδράσεις έγιναν με τη χρήση του θερμοκυκλοποιητή PTC-200 της εταιρίας MJ Research ενώ το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- ✓ Αρχική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA στους 94°C για 5 min.
- ✓ 35 κύκλοι
 - Αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec.
 - Υβριδοποίηση των εκκινητών για 30 sec χρησιμοποιώντας τις θερμοκρασίες που αναγράφονται στον Πίνακα 2.2 ανάλογα με το γονίδιο αγκυρίνης που ενισχύεται.
 - Ενίσχυση στους 72°C για 2 min.
- ✓ Τελικό στάδιο στους 72°C για 10 min.
- ✓ Διατήρηση των δειγμάτων στους 10°C.

Επίσης για να ελέγξουμε την κατάσταση της μόλυνσης των στελεχών που χρησιμοποιήσαμε πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητες αντιδράσεις με τους εκκινητές *wsp81F* 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' και *wsp691R* 5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3' (Zhou *et al.*, 1998) για την ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη της *Wolbachia*. Μετά το πέρας των αντιδράσεων ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% σε διάλυμα 1X Tris-Acetate-EDTA (0.04 M Tris-acetate, 0.001M EDTA) το οποίο περιείχε 100 μ g βρωμιούχο αιθίδιο για τον προσδιορισμό του μεγέθους του ενισχυμένου γονιδιακού τμήματος.

Πίνακας 2.2. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των 23 γονιδίων ακυρίνης.

Γονίδιο ακυρίνης	Πρόσθιος εκκινήτης (5' - 3')	Οπίσθιος εκκινήτης (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Ενδεικτική θερμοκρασία υβριδοποίησης (°C)
WD0035	CCATCGGACGCAAAACAAT	AGCGCAATATCCAAAGCATC	559	52
WD0073	GGTGCAAAACATCAGGAAGAG	CTGCAATAGCCCAATGTAAATG	436	57
WD0147	TTGTGGCTCATATTATTCTCAT	CTTCTTTACCCCTCGTTCTAT	817	52
WD0191	AGAGGGAAATACATTACTACATCA	ATCGCTTTAGCCTGTTTCATAG	396	54
WD0285	TGCAGGCAAAATGTCTAAAAA	ATACCTCCCTTGTCTCTTCATCAC	392	52
WD0286	TTAGTAAGAAAGAAAGAGAAG	TTTTGCTACTATCACACC	536	48
WD0291	CTAATGGGGCTAATGTTCTGTG	ACTTCCGTACTTCCCTCCTTCTCT	292	57
WD0292	ATCGCGCTTCTGCTATGG	TTGGCTGTAAAGTCTGTGTAAATG	1102	56
WD0294	ATGGCCATGAAGAGATAGTA	ATTAGCGGCTGATGATTG	487	50
WD0385	TACTGGGAGCAAAAGAAAATCAATG	CCCCAGGTGAAGAAGAAATCATC	683	56
WD0438	GCGATGCTGTGTGATATTATG	GCGCCAGAGAAGAGGGTTTAT	1400	56
WD0441	TCCAAGGACCGCAATAGAGTAA *	TCAGCACCTTGTAAATAAGAGAAAG *	404	56
	TATCGAAAAGCAACACTGATG †	TACATCTCTGAGTCTTCTTCA †	817	55
WD0498	ATGGCGGTGAGGAAGA	CGCAATCTAACGCATCAAAAC	733	54
WD0514	ATACAGTGGCCGGATAAAATAAC	AGCACCACAACATAAACTTCTCA	256	56
WD0550	TACAACGGGTGGAAAGATAACAAG	ATACGCAGCCCCATAGGAA	865	56
WD0566	TATAATGAAAGAGATAAACTACA	CAGCATTATAGAGCAAAGTG	481	50
WD0596	CGTTACACTTAGCGGCAGGAG	AACCCAGCATTAGGAACATTAT	308	57
WD0633	CTCGGTGGCTACTCGGTCTACAA	CCACGATTTACGAGCTCACTTTCA	650	60
WD0636	AGAAAAAGAGGATGAACATAAAAG	GCATAATCCATCGCTGTCATC	372	52
WD0637	TGGGAAAGTGAAAAAGTATTATCTA	ATTTCTGTTTACTTGGCACATTATC	272	50
WD0754	ATGGAGGGGATGGGATAAAATACTA	GTCGCTTGTCTCTTCCATACACA	1280	57
WD0766	AAGAGTAAACCTGACAAACGATAG	TGGTACAGATAGGGCAGTAG	1161	57
WD1213	ACCAGCAGAGATAATTCTTCACC *	TTTCTGCGCTTATTCTTCTACACT *	718	54
	AGGGGGTATAATCATGG †	ATTTTATATCGACAGCCTCC †	1206	54

* Ο αστερίσκος υποδεικνύει το ζεύγος των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του ιχνήετη για την ανάλυση κατά Southern.
† Το ζεύγος των εκκινήτων χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση, με τη μέθοδο PCR, των στελεχών της υπερομάδας B (wNo, wMa, wMau).

2.2.3 Ανίχνευση ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης με τη μέθοδο της αποτύπωσης κατά Southern

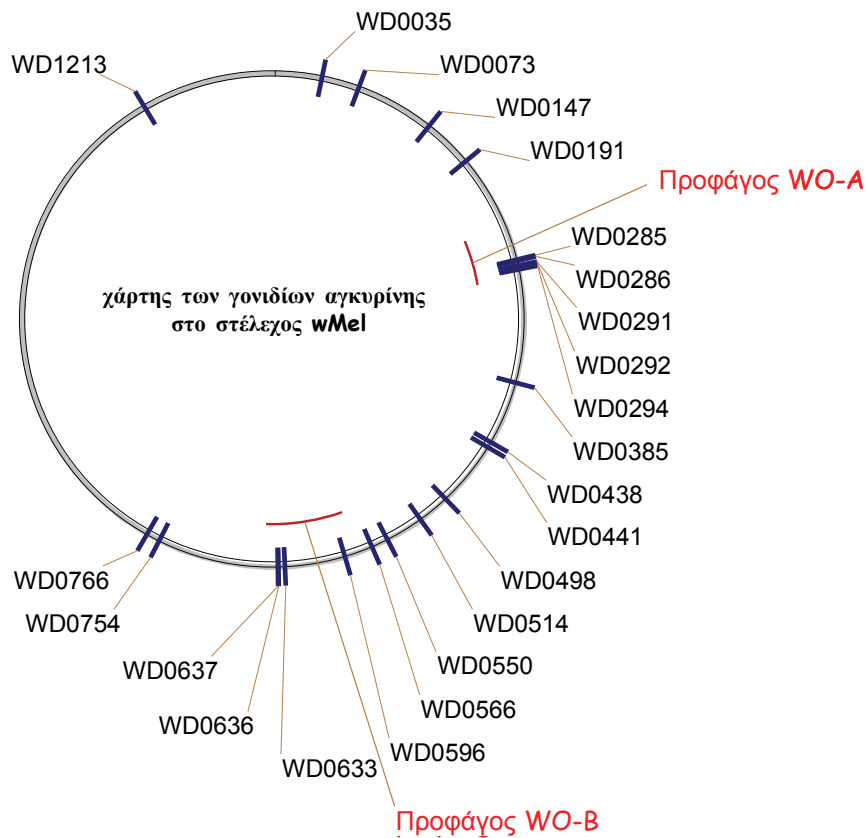
Για την ανάλυση κατά Southern, πραγματοποιήθηκε πέψη 5 ug ολικού DNA με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*. Τα περιοριστικά θραύσματα του DNA που δημιουργήθηκαν αρχικά διαχωρίστηκαν σε αραιό πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0.8%, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν με τη μέθοδο της αποτύπωσης πάνω σε μεμβράνη Immobilon-Ny+ της Millipore σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή και τελικά μονιμοποιήθηκαν με θέρμανση στους 80°C για 2 ώρες (Αναλυτικά το πρωτόκολλο στο Παράρτημα, Π.3). Η υβριδοποίηση των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε στους 68°C για 18hr σε διάλυμα Denhardt's με την παρακάτω σύσταση (5X διάλυμα Denhardt's, 6X SSC, 0.5% SDS και 200 ug/ml αποδιαταγμένο salmon sperm DNA). Μετά το πέρας της υβριδοποίησης, οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν σε συνθήκες μέτριας αυστηρότητας (medium stringency conditions) στους 65°C (15min σε διάλυμα 2X SSC, 0.1% SDS και 15min σε διάλυμα 1X SSC, 0.1% SDS).

Οι ιχνηθέτες (probes) για τα 23 γονίδια αγκυρίνης κατασκευάστηκαν ενισχύοντας γονιδιακά τμήματα του στελέχους *wMel* της *Wolbachia* χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές του Πίνακα 2.2 και με τις συνθήκες που αναγράφονται παραπάνω. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι στη συγκεκριμένη διαδικασία: (α) οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 ul, (β) ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων των αντιδράσεων χρησιμοποιώντας το PCR purification kit (Qiagen®) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και (γ) ποσοτικός προσδιορισμός με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του καθαρισμένου προϊόντος. Τέλος, τα προϊόντα σημάνθηκαν ραδιενεργά με [α -³²P]dATP (IZOTOP) χρησιμοποιώντας το Prime-a-gene labeling kit της Promega. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης μάρτυρας για την ύπαρξη DNA της *Wolbachia* το γονίδιο *ftsZ*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για την έκφραση της πρωτεΐνης FtsZ, η οποία συμμετέχει στην βακτηριακή κυτταροδιαίρεση. Η ενίσχυση του μάρτυρα πραγματοποιήθηκε με PCR και χρησιμοποιώντας το ζεύγος των εκκινητών *ftsZ1* 5'-GTATGCCGATTGCAGAGCTTG-3' και *ftsZ2* 5'-GCCATGAGTATTCACTT GGCT-3' (Holden *et al.* 1993). (Αναλυτικότερα τα πρωτόκολλα της ανάλυσης κατά Southern παρατίθενται στο παράρτημα, Π.4, Π.5).

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

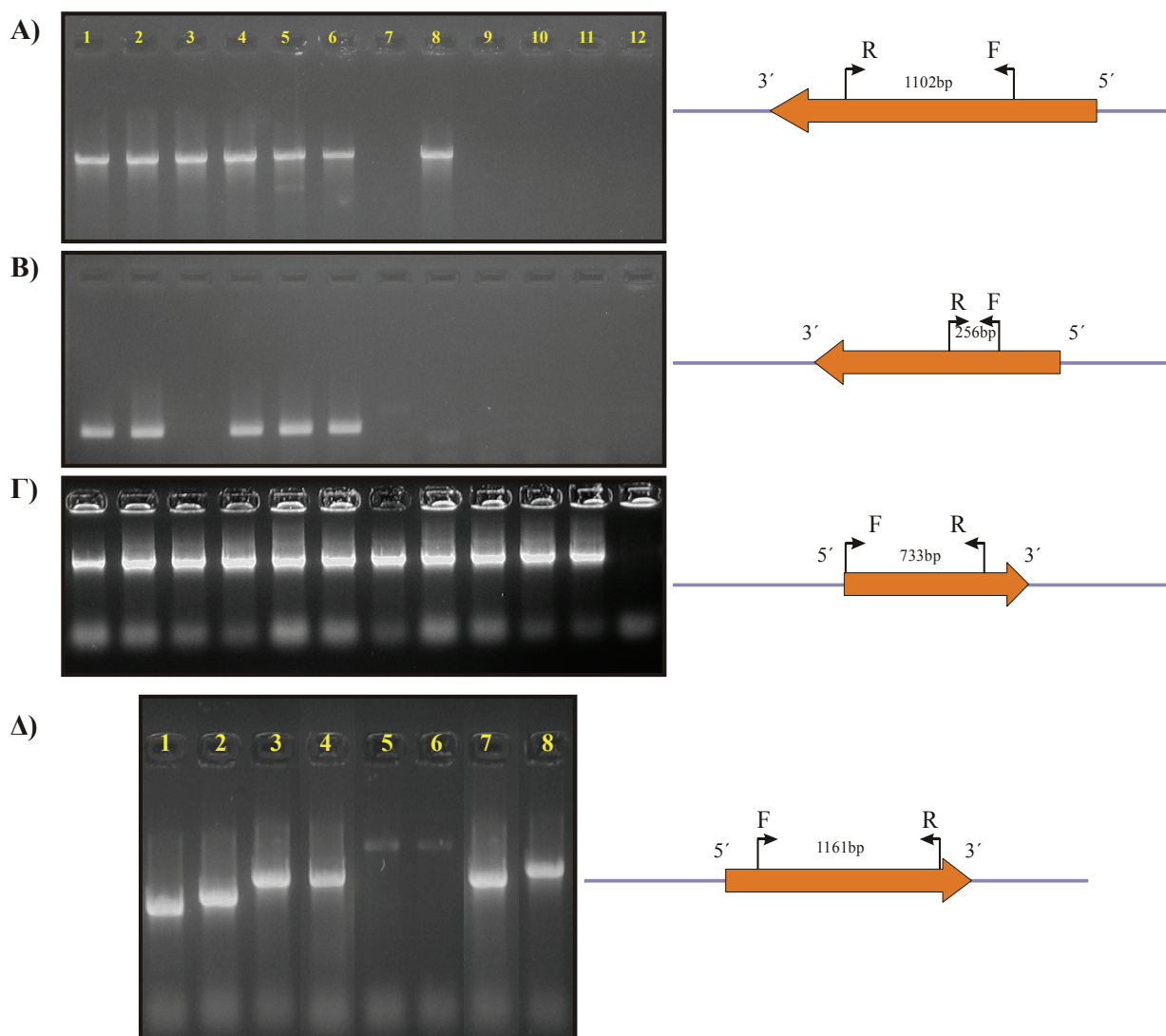
2.3.1 Μελέτη της κατανομής των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης σε 11 συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*

Ανάλογα με τη θέση τους πάνω στο γονιδίωμα της *Wolbachia*, τα 23 γονίδια αγκυρίνης του στελέχους *wMel* μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο ομάδες (Wu *et al.* 2004). Η πρώτη ομάδα αποτελείται από 13 γονίδια (WD0035, WD0073, WD0147, WD0191, WD0385, WD0438, WD0441, WD0498, WD0514, WD0550, WD0754, WD0766 και WD1213) τα οποία βρίσκονται κατανεμημένα πάνω στο χρωμόσωμα του βακτηρίου ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα γονίδια (WD0285, WD0286, WD0291, WD0292, WD0294, WD0566, WD0596, WD0633, WD0636, WD0637) τα οποία βρίσκονται πάνω στα δύο κύρια προφαγικά στοιχεία που έχουν εντεθεί στο γονιδίωμα του στελέχους *wMel*. Στην Εικόνα 2.2 φαίνεται η αναπαράσταση του γονιδιώματος του στελέχους *wMel* και η κατανομή των 23 γονιδίων αγκυρίνης.

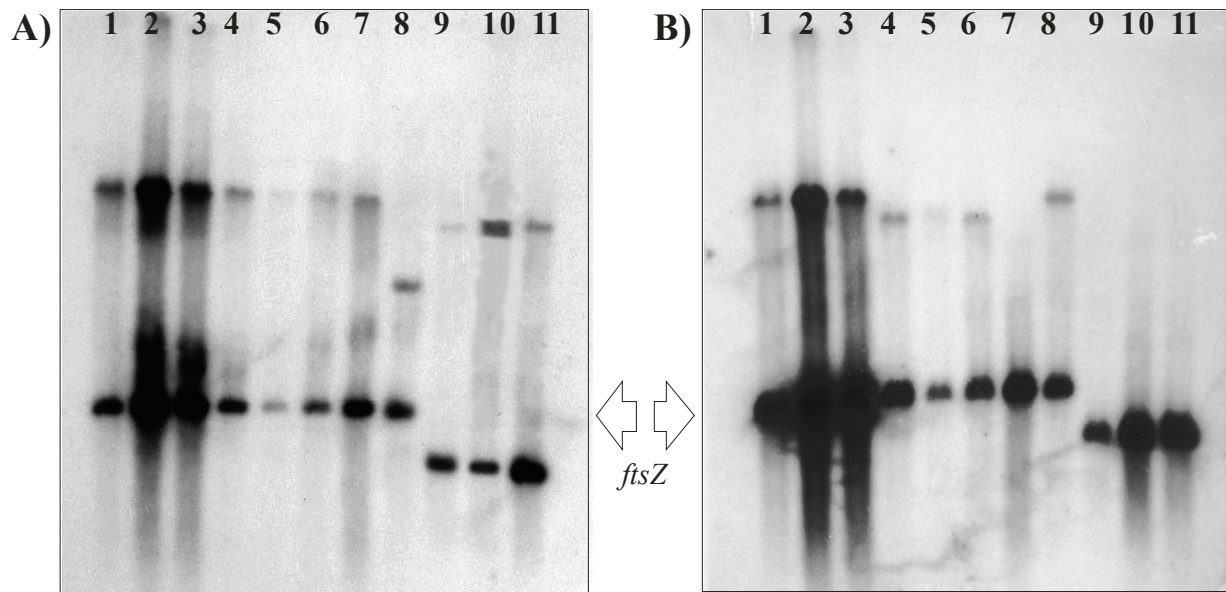


Εικόνα 2.2. Κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης στο στέλεχος *wMel*.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η ύπαρξη ομολόγων των 23 γονιδίων αγκυρίνης που απαντώνται στο στέλεχος *wMel* της *Wolbachia* σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* (Πίνακας 2.1). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε τόσο η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) όσο και η τεχνική της αποτύπωσης κατά Southern. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την PCR ανάλυση (Εικόνα 2.3) και την ανάλυση κατά Southern (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.3. Ανίχνευση με τη μέθοδο PCR των γονιδίων αγκυρίνης, WD0292 (A), WD0514 (B), WD0498 (Γ) και WD0766 (Δ) στις 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* που μελετήθηκαν. Τα σχήματα δεξιά των εικόνων, παρουσιάζουν τη κατεύθυνση 5'-3' των γονιδίων, τη θέση υβριδοποίησης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2.2) καθώς και το μέγεθος του προϊόντος στο στέλεχος αναφοράς *wMel*. 1: *wMel*, 2: *wMelPorcorn*, 3: *wAu*, 4: *wTei*, 5: *wYak*, 6: *wSan*, 7: *wRi*, 8: *wHa*, 9: *wNo*, 10: *wMa*, 11: *wMau*, 12: αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 2.4. Ανίχνευση με τη μέθοδο της αποτύπωσης κατά Southern των γονιδίων αγκυρίνης WD0441 (A) και WD0294 (B). Κάθε μεμβράνη υβριδοποιήθηκε ταυτόχρονα με δύο ιχνηθέτες, έναν ιχνηθέτη για το γονίδιο αγκυρίνης και έναν ιχνηθέτη για το γονίδιο *ftsZ* που αποτέλεσε τον μάρτυρα για την ύπαρξη *Wolbachia* DNA. 1: wMel, 2: wMelPopcorn, 3: wAu, 4: wTei, 5: wYak, 6: wSan, 7: wRi, 8: wHa, 9: wNo, 10: wMa, 11: wMau.

Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης αυτής ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3 και μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- 1) Δεν υπάρχουν γονίδια αγκυρίνης τα οποία απαντούν αποκλειστικά στο στέλεχος wMel.
- 2) Στο στέλεχος wMelPopcorn ανιχνεύτηκαν και τα είκοσι τρία (23) γονίδια αγκυρίνης.
- 3) Επίσης τα στελέχη (wAu, wTei, wYak, wSan) περιέχουν στο γονιδιώμά τους και τα 23 γονίδια αγκυρίνης που απαντούν στο στέλεχος wMel. Μόνη εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο WD0514 το οποίο απουσιάζει από το στέλεχος wAu.
- 4) Μόνο 9 από τα 23 γονίδια αγκυρίνης ανιχνεύτηκαν και στις 11 συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* που μελετήθηκαν. Τα 7 από τα 9 γονίδια αυτά βρίσκονται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου και είναι τα (WD0035, WD0191, WD0438, WD0441, WD0498, WD0766, WD1213) ενώ τα άλλα 2 βρίσκονται πάνω στον προφάγο WO-B και είναι τα (WD0636 και WD0637). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία των γονιδίων WD0035, WD0438 και WD0766 στα στελέχη της υπερομάδας B (wNo, wMa και wMau) δεν επιβεβαιώθηκε με PCR.

Πίνακας 2.3. Αποτελέσματα της συνδυασμένης μελέτης της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης με τις μεθόδους PCR και ανάλυσης κατά Southern σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*.

Γονίδια αγκυρίνης	Υπερ-ομάδα Α								Υπερ-ομάδα Β		
	wMel	wMel popcorn	wAu	wTei	wYak	wSan	wRi	wHa	wNo	wMau	wMa
WD0035	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0073	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
WD0147	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
WD0191	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0285	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
WD0286	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
WD0291	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
WD0292	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
WD0294	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
WD0385	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
WD0438	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0441	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0498	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0514	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
WD0550	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
WD0566	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
WD0596	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
WD0633	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
WD0636	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0637	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD0754	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
WD0766	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WD1213	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Η παρουσία του γονιδίου έχει επιβεβαιωθεί με PCR και με ανάλυση κατά Southern

- Η απουσία του γονιδίου έχει επιβεβαιωθεί με PCR και με ανάλυση κατά Southern

++ Τα αποτελέσματα δεν ήταν δυνατόν να επιβεβαιωθούν με PCR

Τα γονίδια αγκυρίνης που βρίσκονται στους προφάγους παρουσιάζονται με γκρι σκιαγράφηση

Τα γονίδια που απαντούν σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις που μελετήθηκαν παρουσιάζονται με μπλε σκιαγράφηση

- 5) Τρία γονίδια αγκυρίνης, το χρωμοσωμικό WD0073 και τα προφαγικά WD0596 και WD0633, εντοπίστηκαν μόνο στα στελέχη της υπερ-ομάδας Α.
- 6) Τα στελέχη της υπερ-ομάδας Α wRi και wHa βρέθηκαν θετικά για περίπου τον ίδιο αριθμό γονιδίων (17 και 16 αντίστοιχα). Όμως, μόνο τα 12 από αυτά ήταν κοινά και για τα δύο στελέχη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομάδα των 5 γονιδίων αγκυρίνης τα οποία βρίσκονται πάνω στον προφάγο WO-A του στελέχους wMel (WD0285, WD0286, WD0291, WD0292, WD0294). Τα γονίδια αυτά ανιχνεύτηκαν στο στέλεχος wHa αλλά όχι στο στέλεχος wRi.

- 7) Τα στελέχη της υπερ-ομάδας B έφεραν μόνο τα 9 γονίδια αγκυρίνης που βρέθηκαν να απαντούν και στις 11 συμβιωτικές σχέσεις που μελετήθηκαν. Πιθανές εξηγήσεις για αυτό το εύρημα παρουσιάζονται στη συζήτηση αυτού του κεφαλαίου.
- 8) Ορισμένα γονίδια αγκυρίνης εμφάνισαν φαινόμενα πολυμορφισμού σχετικά με το μέγεθος του ενισχυμένου PCR προϊόντος μεταξύ των διαφόρων στελεχών (Εικόνα 2.3 Δ). Ο χαρακτηρισμός αυτής της γενετικής ποικιλομορφίας παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 3.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.4.1 Τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* παρουσιάζουν μεγάλη πυκνότητα.

Η αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος διαφόρων στελεχών της *Wolbachia* αποκάλυψε την ύπαρξη ενός εκπληκτικά μεγάλου αριθμού γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης (Wu et al. 2004; Foster et al. 2005; Klasson et al. 2008; Klasson et al. 2009). Ο αριθμός αυτός είναι ένας από τους μεγαλύτερους που έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικά γονιδιώματα και γίνεται ακόμα πιο εντυπωσιακός εάν αναλογιστούμε το μικρό μέγεθος του γονιδιώματος της *Wolbachia* (1.08 – 1.7 Mb), τυπικό παράδειγμα “γενωμικού μινιμαλισμού”, που χαρακτηρίζει την προσαρμογή σε έναν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής. Στην πραγματικότητα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.4, η “πυκνότητα” των γονιδίων αγκυρίνης, η οποία εκφράζεται ως ο λόγος του αριθμού αυτών των γονιδίων προς το μέγεθος του αντίστοιχου γονιδιώματος, είναι πολύ μεγάλη στη *Wolbachia*. Μάλιστα, η “πυκνότητα” είναι μεγάλη τόσο σε σχέση με τους άλλους προκαρυωτικούς οργανισμούς όσο και σε σχέση με τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η “πυκνότητα” είναι παραπλήσια μόνο με αυτή των ιών.

Πίνακας 2.4. Η πυκνότητα των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών οργανισμών.

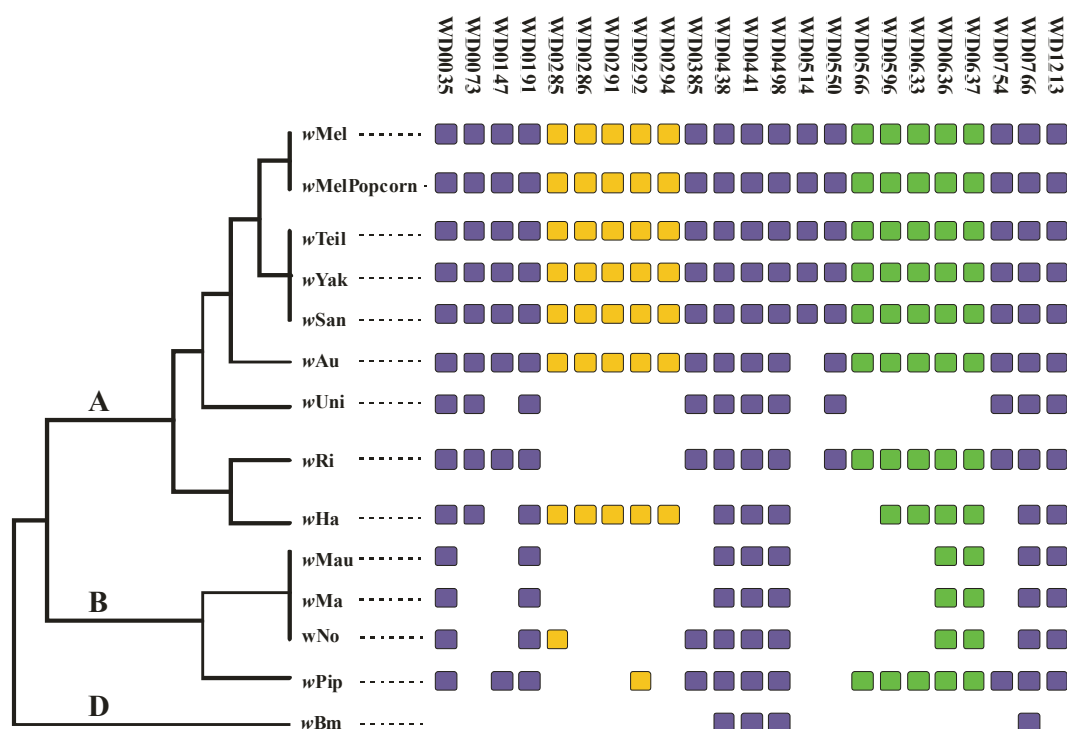
	Οργανισμός	Αριθμός γονιδίων αγκυρίνης	Μέγεθος γονιδιώματος (Mb)	πυκνότητα των γονιδίων αγκυρίνης
Βακτήρια	<i>Wolbachia</i>			
	wMel	23	1.27	18.11
	wRi	35	1.45	24.14
	wPip	60	1.50	40
	wBm	5-12*	1.08	4.36-16.45
	<i>Rickettsia</i> spp.	1-25	1.11-1.52	0.9-16.45
	<i>Escherichia coli</i>	3	4.64	0.65
Ευκαρυωτικοί	<i>Drosophila melanogaster</i>	112	180	0.62
	<i>Anopheles gambiae</i>	112	220	0.51
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	116	97	1.19
Ιοί	Mimivirus	66	1.2	55
	Canarypox virus	51	0.36	141.6
	Fowlpox virus	31	0.3	103.3
	Microplitis demolitor bracovirus	12	0.2	60

* 7 από τα 12 γονίδια αγκυρίνης του στελέχους wBm θεωρούνται ψευδογονίδια.

Στην παρούσα εργασία εστιάσαμε την προσοχή μας στην ανίχνευση και τη μελέτη της κατανομής των 23 γονιδίων αγκυρίνης, που απαντούν στη συμβιωτική σχέση αναφοράς *D. melanogaster*(wMel), σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Wolbachia-Drosophila*. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνηγορούν στη διατήρηση της μεγάλης πυκνότητας των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών *Wolbachia*. Προφανώς η ύπαρξη νέων γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia* τα οποία δεν υπάρχουν στο wMel δεν μπορεί να αποκλειστεί όπως επιβεβαιώνεται με την αποκωδικοποίηση όλο και περισσότερων στελεχών του βακτηρίου (Klasson *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2009). Η πρώτη μελέτη της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης σε διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* πραγματοποιήθηκε το 2005 από τον Iturbe-Ormaetxe και τους συνεργάτες του. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υβριδοποίησης σημείου (dot blot) καθώς και της ενίσχυσης με PCR και μελετήθηκε η κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wMel σε εννέα (9) στελέχη της *Wolbachia*. Επτά (7) από αυτά τα στελέχη ήταν κοινά με στελέχη της παρούσας εργασίας. Γενικά τα αποτελέσματα των δύο μελετών για αυτά τα 7 στελέχη συμφωνούν. Υπάρχουν όμως και κάποιες διαφορές οι οποίες εστιάζονται κυρίως στα στελέχη της υπερομάδας B. Συγκεκριμένα, η παρούσα μελέτη ανίχνευσε στα στελέχη wNo, wMa και wMau της υπερομάδας B γονίδια αγκυρίνης που δεν είχαν ανιχνευτεί στην προηγούμενη. Οι πιθανές εξηγήσεις για αυτές τις διαφορές είναι: (1) η χρήση διαφορετικών ανιχνευτών στην ανάλυση κατά Southern μεταξύ των δύο μελετών όπως το μήκος του ανιχνευτή και η θέση του πάνω στο γονίδιο, (2) οι διαφορές στις συνθήκες υβριδοποίησης και (3) τα διαφορετικά ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση PCR.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ποικιλότητα σχετικά με τον αριθμό και την κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia*. Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 2.5, στελέχη τα οποία ανήκουν στην ίδια φυλογενετική ομάδα παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά ως προς την κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης. Για παράδειγμα, τα στελέχη wMelPorcorn, wTei, wYak, wSan, διαθέτουν στο ρεπερτόριο τους και τα 23 γονίδια αγκυρίνης που απαντούν στο στέλεχος αναφοράς wMel. Μάλιστα, τα γονιδιώματα των στελεχών wMel και wMelPorcorn παρουσιάζουν την ίδια οργάνωση με εξαίρεση μια χρωμοσωμική αναστροφή (Sun *et al.* 2003). Το στέλεχος wAu, το οποίο φαίνεται να διαφοροποιείται εξελικτικά από τα υπόλοιπα, διαθέτει τα 22 από τα 23 γονίδια με εξαίρεση το WD0514. Επιπλέον, σύμφωνα με την μελέτη των Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005 απουσιάζει η ευρύτερη περιοχή του οπερονίου WD0512-WD0514. Μεταξύ των στελεχών της υπερομάδας A, τα στελέχη wRi και wHa παρουσιάζουν τις περισσότερες διαφορές. Μάλιστα, η πρόσφατη αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του στελέχους wRi ανέδειξε την ύπαρξη 35 γονιδίων αγκυρί-

νης (Klasson *et al.* 2009). Από τα 23 γονίδια αγκυρίνης του στελέχους *wMel*, μόνο τα 17 παρουσιάζουν ομολογία με τα γονίδια του στελέχους *wRi* (Εικόνα 2.5). Στο στέλεχος *wHa* ανιχνεύθηκαν 16 από τα 23 γονίδια αγκυρίνης, ωστόσο, σε σχέση με το στέλεχος *wRi* υπάρχουν διαφορές οι οποίες επικεντρώνονται κυρίως στα προφαγικά γονίδια. Στα στελέχη *Wolbachia* που ανήκουν στην υπερομάδα B ανιχνεύθηκε ο μικρότερος αριθμός ομολόγων γονιδίων. Η διαφορά αυτή πιθανόν οφείλεται σε δυσκολία ανίχνευσης των γονιδίων αυτών λόγω της μεγάλης εξελικτικής απόστασης που χωρίζει τις δύο υπερομάδες μεταξύ τους, η οποία εκτιμάται ότι είναι περίπου 60 εκατομμύρια χρόνια (Werren *et al.* 1995). Είναι ενδιαφέρον ότι η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του στελέχους *wPip*, το οποίο ανήκει στην B υπερομάδα, ανέδειξε έναν εκπληκτικά μεγάλο αριθμό γονιδίων αγκυρίνης (Klasson *et al.* 2008). Συνολικά εντοπίστηκαν 60 γονίδια αγκυρίνης, ωστόσο, μόνο 15 από τα 23 γονίδια του στελέχους *wMel* έχουν ξεκάθαρη ομολογία με το στέλεχος *wPip* (Walker *et al.* 2007; Klasson *et al.* 2008).



Εικόνα 2.5. Η κατανομή των 23 γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους *wMel* μεταξύ διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* με βάση της PCR και Southern αναλύσεις της παρούσας μελέτης. Το δένδρο-γραμμα, αναπαριστά τις φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών, και ανακατασκευάστηκε βάσει των αποτελεσμάτων της MLST ανάλυσης (Baldo *et al.* 2006; Paraskevanopoulos *et al.* 2006). Τα γονίδια αγκυρίνης των δύο προφάγων WO-A και WO-B φαίνονται με το κίτρινο και το πράσινο χρώμα αντίστοιχα. Η κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης των στελεχών *wUni*, *wPip* και *wBm* βασίζεται στη δημοσιευμένη αλληλουχία (ολική για το *wPip* και *wBm* ή μερική για το *wUni*) των γονιδιωμάτων τους (Klasson *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2009; Foster *et al.* 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή των γονιδίων στο στέλεχος *wRi* επιβεβαιώθηκε και με την πρόσφατη δημοσίευση του γονιδιώματος (Klasson *et al.* 2009).

2.4.2 Γονίδια αγκυρίνης και προφαγικά στοιχεία στη *Wolbachia*.

Όπως είδαμε αρκετά γονίδια αγκυρίνης έχουν βρεθεί στα προφαγικά στοιχεία τα οποία βρίσκονται εντεθειμένα στο γονιδίωμα της *Wolbachia*. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι προφάγοι μπορούν να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξάπλωση των γονιδίων αυτών μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia* συμβάλλοντας στην παρατηρούμενη ποικιλότητα μεταξύ των στελεχών αυτών. Πράγματι, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι το γονιδιακό περιεχόμενο των δύο προφάγων διαφέρει μεταξύ των στελεχών, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των γονιδίων αγκυρίνης του προφάγου WO-A μεταξύ των στελεχών wRi και wHa. Τα προφαγικά αυτά γονίδια απαντούν στο στέλεχος wHa ενώ απουσιάζουν από το στέλεχος wRi (Εικόνα 2.5). Είναι αξιοσημείωτο ότι η διαφορά αυτή δεν οφείλεται στην απουσία του ίδιου του προφάγου. Η αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος του στελέχους wRi επιβεβαίωσε την ύπαρξη ενός ομολόγου προφαγικού στοιχείου στο γονιδίωμα του στελέχους wRi με βάση τις ομοιότητες των βασικών δομικών τους γονιδίων (Klasson *et al.* 2009). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το προφαγικό αυτό στοιχείο διαθέτει διαφορετικό ρεπερτόριο γονιδίων αγκυρίνης, το οποίο μάλιστα, από τα μέχρι στιγμής δεδομένα, φαίνεται να απαντά μόνο στο στέλεχος wRi (Klasson *et al.* 2009). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται πιθανόν σε ανεξάρτητη πρόσληψη της κάθε ομάδας των γονιδίων αγκυρίνης από τους δύο προφάγους. Επίσης, από τα συνολικά δέκα (10) γονίδια αγκυρίνης που βρίσκονται πάνω στους προφάγους του στελέχους wMel, μόνο τα δύο από αυτά (WD0636, WD0637) ανιχνεύτηκαν και στα 11 στελέχη που μελετήθηκαν. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με εκείνα πρόσφατης μελέτης (Ishmael *et al.* 2009) στην οποία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των συγκριτικών υβριδισμών σε επίπεδο γονιδιώματος (Comparative Genomic Hybridizations – CGH) με τη χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays) για τη σύγκριση διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia*. Τέσσερα από τα στελέχη που μελετήθηκαν από την Ishmael και συνεργάτες (wMel, wAu, wRi και wSan) είναι κοινά με στέλεχος της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή έδειξε ότι τα γονίδια αγκυρίνης, και σε μεγαλύτερο βαθμό αυτά τα οποία βρίσκονται πάνω στα προφαγικά στοιχεία της *Wolbachia*, υπερ-αντιπροσωπεύονται στις ομάδες εκείνες των γονιδίων που εμφανίζουν τις μεγαλύτερες διαφορές (απουσία ή πολυμορφισμός) μεταξύ των στελεχών.

2.4.3 Συντηρημένα γονίδια μεταξύ των διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι κάποια από τα γονίδια αγκυρίνης ανιχνεύθηκαν σε όλα τα στελέχη της *Wolbachia* που μελετήθηκαν ανεξαρτήτως του φαινοτύπου που επάγουν

αυτά στο ξενιστή τους (Εικόνα 2.5). Από τα εννέα αυτά γονίδια, τα τέσσερα (WD0438, WD0441, WD0498 και WD0766) έχουν βρεθεί και σε στέλεχη του βακτηρίου τα οποία μολύνουν διαφορετικά είδη ξενιστών όπως για παράδειγμα στο στέλεχος wUni το οποίο προκαλεί παρθενογένεση στο παρασιτοειδές έντομο *Muscidifurax uniraptor* (Klasson *et al.* 2009), στο στέλεχος wPir το οποίο προκαλεί κυτταροπλασματική συμβατότητα σε κουνούπια του είδους *Culex pipiens* (Walker *et al.* 2007) καθώς και στο στέλεχος wBm το οποίο αναπτύσσει σχέσεις αμοιβαίας συμβίωσης με το νηματώδη της φιλαρίωσης *Brugia malayi* (Foster *et al.* 2005). Μάλιστα, στο στέλεχος wBm έχουν βρεθεί μόνο δώδεκα (12) γονίδια αγκυρίνης εκ των οποίων τα επτά (7) έχουν χαρακτηριστεί ως ψευδογονίδια ενώ μεταξύ των υπολοίπων πέντε (5) είναι και τα προαναφερθέντα. Ο αριθμός αυτός είναι ο μικρότερος μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia* γεγονός που αποδίδεται στην αμοιβαία συμβιωτική σχέση που έχει αναπτύξει το στέλεχος αυτό με το ξενιστή του (Foster *et al.* 2005). Η συντηρημένη παρουσία των γονιδίων αυτών, μεταξύ φαινοτυπικά και εξελικτικά απομακρυσμένων στελεχών *Wolbachia*, υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή τους σε βασικούς μηχανισμούς αλληλεπιδράσεων μεταξύ *Wolbachia* και ξενιστή. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να σχετίζονται με: (α) την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων, (β) τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό του βακτηρίου καθώς και (γ) την μετακίνηση και την εξασφάλιση της κατακόρυφης μετάδοσης της *Wolbachia* από τη μητέρα στους απογόνους. Μελέτες σε διαφορετικά συστήματα συμβιωτικών ή/και παρασιτικών σχέσεων φαίνεται να ενισχύουν μια τέτοια προοπτική. Για παράδειγμα, στη συμβιωτική σχέση που αναπτύσσει το φυτό *Lotus japonicus* με το βακτήριο *Mesorhizobium loti*, το φυτικό γονίδιο *ignI*, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με επαναλήψεις αγκυρίνης, φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της σχέσης αυτής (Kumagai *et al.* 2007). Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι δύο από τα γονίδια αγκυρίνης, που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του βακτηριακού είδους *Legionella pneumophila*, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προσαρμογή και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου μέσα σε μια ποικιλία κυττάρων ξενιστών (de Felipe *et al.* 2005; Habyarimana *et al.* 2008). Τα γονίδια αυτά πιστεύεται ότι εκκρίνονται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου IV που διαθέτει η *L. pneumophila* και παίζουν κάποιο ρόλο στη βιογένεση των φαγοσωματίων (Habyarimana *et al.* 2008).

Αν και η *Wolbachia* διαθέτει ένα σύστημα έκκρισης τελεστών τύπου IV, δεν είναι γνωστό ακόμα εάν αυτό χρησιμοποιείται για την έκκριση κάποιων εκ των αγκυρινών. Ωστόσο, η πιθανότητα αυτή είναι πολύ μεγάλη καθώς οι πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλήψεις αγκυρίνης ενδέχεται να αποτελούν μια νέα κατηγορία τελεστών του εκκριτικού συστήματος IV σε διάφορα παθογόνα ενδοκυτταρικά βακτήρια (Lin *et al.* 2007; Pan *et al.* 2008). Προσφάτως, μια εκτε-

νής πρωτεωμική ανάλυση έδειξε ότι μεταξύ των πρωτεϊνικών προϊόντων έκκρισης του νηματώδη *Brugia malayi* βρέθηκαν και δύο πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης οι οποίες προέρχονταν από την *Wolbachia* (Bennuru *et al.* 2009). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν προϊόντα των ομόλογων γονιδίων WD0438 και WD0441 οι οποίες απαντούν σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις που μελετήθηκαν. Οι πρωτεΐνες αυτές, είναι οι πρώτες της οικογένειας των αγκυρινών της *Wolbachia* οι οποίες φαίνεται ότι εκκρίνονται από το βακτήριο γεγονός που ενισχύει τις υποψίες της ενεργού συμμετοχής τους στην επικοινωνία *Wolbachia* και ξενιστή. Ωστόσο, χρειάζονται επιπλέον μελέτες προκειμένου να αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου IV.

2.4.4 Κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης και φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των στελεχών *Wolbachia*.

Μέχρι σήμερα, ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων αγκυρίνης στην *Wolbachia*, παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, το γεγονός ότι οι επαναλήψεις αγκυρίνης συνήθως συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών καθώς και ο μεγάλος αριθμός τους στο γονιδίωμα της *Wolbachia* καθιστά τα γονίδια αυτά ενδιαφέροντες υποψηφίους για τη συμμετοχή τους στους μοριακούς μηχανισμούς επικοινωνίας μεταξύ βακτηρίου και ξενιστή. Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν να εξετασθεί εάν συνδέονται τα πρότυπα της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης με τους διαφορετικούς φαινοτύπους του βακτηρίου. Από τις πρώτες κιόλας μελέτες των γονιδίων αγκυρίνης το ενδιαφέρον των επιστημόνων είχε στραφεί στον πιθανό ρόλο των γονιδίων αυτών στους μηχανισμούς επαγωγής των αναπαραγωγικών φαινοτύπων και κυρίως στη σχέση που μπορεί να έχουν αυτά με την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Μια πρώτη προσπάθεια συσχέτισης της παρουσίας ή της απουσίας των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia* με τον φαινότυπο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας έγινε από τον Iturbe-Ormaetxe και τους συνεργάτες του (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005). Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, ένα από τα γονίδια αγκυρίνης το οποίο αποτελεί σημαντικό υποψήφιο για τη συμμετοχή του στους μηχανισμούς της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας είναι το WD0514 καθώς και η ευρύτερη περιοχή του οπερονίου WD0512-WD0524. Το γονίδιο αυτό φαίνεται να είναι παρόν μόνο στα συγγενικά στελέχη wMel – wMelCS – wMelporcorn τα οποία επάγουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα ενώ απουσιάζει από το στέλεχος wAu το οποίο δεν επάγει κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Παρόλα αυτά όμως, όπως προκύπτει και από την παρούσα μελέτη, η αγκυρίνη WD0514 απουσιάζει και από στελέχη τα οποία επάγουν πολύ ισχυρή κυτταροπλασματική ασυμβατότητα όπως είναι το wRi και το wNo στις συμβιωτι-

κές σχέσεις *D. simulans* (wRi) και *D. simulans* (wNo) αντίστοιχα ενώ είναι παρόν σε στελέχη τα οποία δεν την επάγουν όπως τα wTei, wYak, wSan στις συμβιωτικές σχέσεις *D. teissieri* (wTei), *D. yakuba* (wYak) και *D. santomea* (wSan) αντίστοιχα. Μάλιστα, στην περίπτωση του wRi, όπως προκύπτει και από την ανάλυση του γονιδιώματος του, απουσιάζει ολόκληρο το οπερόνιο (Klasson *et al.* 2009; Ishmael *et al.* 2009). Θεωρώντας ότι οι συμβιωτικές σχέσεις που εμφανίζουν παρόμοιο φαινότυπο κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας θα πρέπει να διαθέτουν παρόμοιο ρεπερτόριο γονιδίων, η παρούσα μελέτη δεν ήταν δυνατόν να συσχετίσει, τουλάχιστον άμεσα, την παρουσία ή την απουσία γονιδίων αγκυρίνης με το φαινότυπο αυτό. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα όταν εξετάσθηκε η κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης υπό το πρίσμα της εμβρυικής κατανομής των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia*.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ φαινοτυπικά διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* φανερώνουν την εκπληκτική αφθονία τους στο βακτήριο αυτό. Αρκετά από τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στα προφαγικά στοιχεία της *Wolbachia* τα οποία πιστεύεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξάπλωση και τη διαμόρφωση των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia*, συμβάλλοντας στην παρατηρούμενη ποικιλότητα. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συντηρημένη παρουσία ορισμένων γονιδίων (WD0438, WD0441, WD0498 και WD0766) μεταξύ φαινοτυπικά και εξελικτικά απομακρυσμένων στελεχών. Τα γονίδια αυτά εικάζεται ότι μπορεί να είναι σημαντικοί παράγοντες στην εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων της *Wolbachia*. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής απορρίπτουν μια άμεση συσχέτιση της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* με τις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των συμβιωτικών σχέσεων. Η πολυπλοκότητα που διέπει τις αλληλεπιδράσεις αυτές καθιστά δύσκολη την απόδοση συγκεκριμένων λειτουργιών στα γονίδια αγκυρίνης. Παράγοντες όπως για παράδειγμα το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή θα πρέπει να ληφθούν υπόψη καθώς επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση των φαινοτύπων αυτών. Νέα εργαλεία είναι απαραίτητα προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο πιθανός ρόλος των γονιδίων αγκυρίνης στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης *Wolbachia*-ξενιστή.

2.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baldo, L., J. C. D. Hotopp, K. A. Jolley, S. R. Bordenstein, S. A. Biber, R. R. Choudhury, C. Hayashi, M. C. J. Maiden, H. Tettelin, and J. H. Werren.** 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:7098-7110.
- Bandi, C., T. J. C. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter.** 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:2407-2413.
- Bennuru, S., R. Semnani, Z. Meng, J. M. C. Ribeiro, T. D. Veenstra, and T. B. Nutman.** 2009. *Brugia malayi* excreted/secreted proteins at the host/parasite interface: stage- and gender-specific proteomic profiling. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango and C. Savakis.** 1994. A prokaryotic *dnaA* sequence in *D. melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Molecular Biology* **3**:131-142.
- Bourtzis, K., and H.R. Braig.** 1999. The many faces of *Wolbachia*. Pp. 199-219 in D. Raoult, and T. Hackstadt, ed. *Rickettsiae and Rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Elsevier, Amsterdam.
- Bourtzis K, Braig H, Karr T.** 2003. Cytoplasmic Incompatibility. In: Bourtzis K, Miller T (eds) *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 217-246.
- Bourtzis, K., S. L. Dobson, H. R. Braig, and S. L. O'Neill.** 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature* **391**:852-853.
- Charlat, S., L. Le Chat, and H. Mercot.** 2003. Characterization of non-cytoplasmic incompatibility inducing *Wolbachia* in two continental African populations of *Drosophila simulans*. *Heredity* **90**:49-55.
- de Felipe, K. S., S. Pampou, O. S. Jovanovic, C. D. Pericone, S. F. Ye, S. Kalachikov, and H. A. Shuman.** 2005. Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *Journal of Bacteriology* **187**:7716-7726.
- Ferree, P. M., and W. Sullivan.** 2006. A genetic test of the role of the maternal pronucleus in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **173**:839-847.

- Foster, J., M. Ganatra, I. Kamal, J. Ware, K. Makarova, N. Ivanova, A. Bhattacharyya, V. Kapratl, S. Kumar, J. Posfai, T. Vincze, J. Ingram, L. Moran, A. Lapidus, M. Omelchenko, N. Kyrpides, E. Ghedin, S. Wang, E. Goltzman, V. Joukov, O. Ostrovskaya, K. Tsukerman, M. Mazur, D. Comb, E. Koonin, and B. Slatko.** 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* **3**:599-614.
- Giordano, R., S. L. O'Neill, and H. M. Robertson.** 1995. *Wolbachia* infections and the expression of Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. Mauritiana*. *Genetics* **140**:1307-1317.
- Habyarimana, F., S. Al-Khodir, A. Kalia, J. E. Graham, C. T. Price, M. T. Garcia, and Y. Abu Kwaik.** 2008. Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophila* in parasitism of protozoan hosts and human macrophages. *Environmental Microbiology* **10**:1460-1474.
- Hilgenboecker, K., P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Telschow, and J. H. Werren.** 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**:215-220.
- Hoffmann, A. A., M. Turelli and G.M. Simmons.** 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution* **40**:692-701.
- Hoffmann, A. A., D. Clancy, and J. Duncan.** 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* **76**:1-8.
- Holden, P. R., J. F. Y. Brookfield, and P. Jones.** 1993. Cloning and characterization of an *ftsZ* homolog from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics* **240**:213-220.
- Holmes, D. S., and J. Bonner.** 1973. Preparation, molecular-weight, base composition, and secondary structure of giant nuclear ribonucleic-acid. *Biochemistry* **12**:2330-2338.
- Ishmael, N., J. C. D. Hotopp, P. Ioannidis, S. Biber, J. Sakamoto, S. Siozios, V. Nene, J. Werren, K. Bourtzis, S. R. Bordenstein, and H. Tettelin.** 2009. Extensive genomic diversity of closely related *Wolbachia* strains. *Microbiology* **155**:2211-2222.
- Iturbe-Ormaetxe, I., G. R. Burke, M. Riegler, and S. L. O'Neill.** 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology* **187**:5136-5145.

- James, A. C., and J. W. O. Ballard.** 2000. Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipientis*. *Evolution* **54**:1661-1672.
- Jeyaprakash, A., and M. A. Hoy.** 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* **9**:393-405.
- Klasson, L., T. Walker, M. Sebahia, M. J. Sanders, M. A. Quail, A. Lord, S. Sanders, J. Earl, S. L. O'Neill, N. Thomson, S. P. Sinkins, and J. Parkhill.** 2008. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. *Molecular Biology and Evolution* **25**:1877-1887.
- Klasson, L., J. Westberg, P. Sapountzis, K. Nasiund, Y. Lutnaes, A. C. Darby, Z. Veneti, L. M. Chen, H. R. Braig, R. Garrett, K. Bourtzis, and S. G. E. Andersson.** 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:5725-5730.
- Kumagai, H., T. Hakoyama, Y. Umehara, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, and H. Kouchi.** 2007. A novel ankyrin repeat membrane protein, IGN1, is required for persistence of nitrogen-fixing symbiosis in root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **143**:1293-1305.
- Lachaise, D., M. Harry, M. Solignac, F. Lemeunier, V. Benassi, and M. L. Cariou.** 2000. Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from Sao Tome. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**:1487-1495.
- Landmann, F., G. A. Orsi, B. Loppin, and W. Sullivan.** 2009. *Wolbachia*-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pro-nucleus. *PLoS Pathogens* **5**(3):e1000343.
- Lin, M. Q., A. den Dulk-Ras, P. J. J. Hooykaas, and Y. Rikihisa.** 2007. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cellular Microbiology* **9**:2644-2657.
- McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill.** 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**:2565-2570.

- McGraw, E. A., D. J. Merritt, J. N. Droller, and S. L. O'Neill.** 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:2918-2923.
- Mercot, H., and D. Poinso.** 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature* **391**:853.
- Mercot, H., B. Llorente, M. Jacques, A. Atlan, and C. MontchampMoreau.** 1995. Variability within the Seychelles Cytoplasmic Incompatibility System in *Drosophila simulans*. *Genetics* **141**:1015-1023.
- Mercot, H., and S. Charlat.** 2004. *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica* **120**:51-59.
- Min, K.-T., and S. Benzer.** 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**:10792-10796.
- O'Neill, S. L., and T. L. Karr.** 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature* **348**:178-180.
- Pan, X. X., A. Luhrmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce, and C. R. Roy.** 2008. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**:1651-1654.
- Paraskevopoulos, C., S. R. Bordenstein, J. J. Wernegreen, J. H. Werren, and K. Bourtzis.** 2006. Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: Discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Current Microbiology* **53**:388-395.
- Presgraves, D. C.** 2000. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Genetics* **154**:771-776.
- Reynolds, K. T., L. J. Thomson, and A. A. Hoffmann.** 2003. The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain popcorn in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **164**:1027-1034.
- Ros, V. I. D., V. M. Fleming, E. J. Feil, and J. A. J. Breeuwer.** 2009. How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1036-1043.
- Sedgwick, S. G., and S. J. Smerdon.** 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* **24**:311-316.

- Stouthamer, R., J. A. J. Breeuwer, and G. D. D. Hurst.** 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* **53**:71-102.
- Sun, L. V., M. Riegler, and S. L. O'Neill.** 2003. Development of a physical and genetic map of the virulent *Wolbachia* strain wMelPop. *Journal of Bacteriology* **185**:7077-7084.
- Tram, U., P. A. Ferree, and W. Sullivan.** 2003. Identification of *Wolbachia*-host interacting factors through cytological analysis. *Microbes and Infection* **5**:999-1011.
- Tram, U., and W. Sullivan.** 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* **296**:1124-1126.
- Veneti, Z., M. E. Clark, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2004. Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:5366-5372.
- Walker, T., L. Klasson, M. Sebaihia, M. J. Sanders, N. R. Thomson, J. Parkhill, and S. P. Sinkins.** 2007. Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of *Wolbachia* from the *Culex pipiens* group. *BMC Biology* **5**:39.
- Werren, J. H.** 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* **42**:587-609.
- Werren, J. H., W. Zhang, and L. R. Guo.** 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **261**:55-63.
- Wu, M., L. V. Sun, J. Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J. C. Brownlie, E. A. McGraw, W. Martin, C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, R. Madupu, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, Y. Mahmoud, P. Lee, K. Berry, M. B. Young, T. Utterback, J. Weidman, W. C. Nierman, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, S. L. O'Neill, and J. A. Eisen.** 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* **2**:327-341.
- Zabalou, S., A. Apostolaki, S. Pattas, Z. Veneti, C. Paraskevopoulos, I. Livadaras, G. Markakis, T. Brissac, H. Mercot, and K. Bourtzis.** 2008. Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. *Genetics* **178**:2145-2160.
- Zabalou, S., M. Riegler, M. Theodorakopoulou, C. Stauffer, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:15042-15045.

Zhou, W. G., F. Rousset, and S. O'Neill. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **265**:509-515.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας – Φυλογενετική και εξελικτική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	96
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	99
3.2.1 Ενίσχυση με τη μέθοδο PCR και προσδιορισμός αλληλουχίας	99
3.2.2 Κλωνοποίηση	99
3.2.3 Επεξεργασία δεδομένων	100
3.2.4 Ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας	103
3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση	104
3.2.6 Στατιστικός έλεγχος της φυλογενετικής σύγκλισης	105
3.2.7 Ανίχνευση φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού	105
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	107
3.3.1 Γονιδιακές αλληλουχίες και γενετική ποικιλότητα	107
3.3.2 Φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων αγκυρίνης	114
3.3.3 Πολυμορφισμός σε επίπεδο αριθμού και οργάνωσης των επαναλήψεων αγκυρίνης	120
3.3.4 Ανίχνευση φαινομένων ανασυνδυασμού στα γονίδια αγκυρίνης	126
3.3.5 Αστάθεια επαναλαμβανόμενων γειτονικών αλληλουχιών DNA και πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης	132
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	134
3.4.1 Γενετική ποικιλότητα	134
3.4.2 Ποιοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης της <i>Wolbachia</i>	137
3.4.3 Συνδέεται η γενετική ποικιλομορφία των αγκυρινών με τους φαινοτύπους της <i>Wolbachia</i> ;	141
3.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	144

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως παρουσιάστηκε και σε προηγούμενα κεφάλαια, το γονιδίωμα της *Wolbachia* χαρακτηρίζεται από έναν ασυνήθιστα μεγάλο αριθμό γονιδίων αγκυρίνης. Μάλιστα, η πυκνότητα τους στη *Wolbachia* υπερβαίνει κατά πολύ αυτή των ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ πλησιάζει αυτή των ιών. Μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών, παρόμοιες τιμές πυκνότητας γονιδίων αγκυρίνης έχουν βρεθεί μόνο σε ορισμένα ενδοκυττάρια παθογόνα βακτήρια όπως η *Coxiella* (Seshadri *et al.* 2003), η *Orientia* (Nakayama *et al.* 2008), η *Legionella* (Cazalet *et al.* 2004; Chien *et al.* 2004) και σε κάποια είδη *Rickettsia* (Ogata *et al.* 2005, 2006). Αντίθετα, τα υποχρεωτικώς ενδοκυττάρια συμβιωτικά βακτήρια όπως η *Buchnera* στερούνται των γονιδίων αυτών. Λόγω του αριθμού τους, καθώς και της δυνατότητας των μοτίβων αγκυρίνης να λαμβάνουν μέρος σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, τα γονίδια αγκυρίνης θεωρούνται ένας από τους πλέον πιθανούς παράγοντες για την ανάπτυξη των συμβιωτικών σχέσεων *Wolbachia* – ξενιστή.

Παρόλα αυτά, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* δεν παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες (πέραν των μοτίβων αγκυρίνης) με γνωστής λειτουργίας πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την απόδοση συγκεκριμένων λειτουργιών στις πρωτεΐνες αυτές και την άμεση συσχέτιση τους με τους φαινοτύπους που επάγονται από το βακτήριο όπως η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Η δυσκολία αυτή ενισχύεται περαιτέρω λόγω της μη καλλιεργήσιμης φύσης του βακτηρίου που δυσχεραίνει την χρήση των κλασικών εργαλείων της βακτηριακής γενετικής. Η συγκριτική γονιδιωματική μελέτη, παράλληλα με την εξελικτική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia*, αποτελούν μια πολύ καλή αρχή και ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών, στην προσπάθεια τους να κατανοήσουν την εξέλιξη και τον ρόλο τους.

Το 2005 ο Sinkins και οι συνεργάτες του (Sinkins *et al.* 2005), εξετάζοντας τις ακολουθίες των γονιδίων αγκυρίνης των στελεχών *Wolbachia* που απαντούν σε δύο αμφίδρομα ασύμβατους πληθυσμούς του κουνουπιού *Culex quinquefasciatus* (Bei και Pel), παρατήρησαν την ύπαρξη πολυμορφισμού σε δύο γονίδια αγκυρίνης τόσο σε νουκλεοτιδικό όσο και σε αμινοξικό επίπεδο. Τα δύο αυτά γονίδια, τα οποία ονομάστηκαν pk1 και pk2, σχετίζονταν με μια προφαγική περιοχή του βακτηρίου και παρουσίαζαν ομοιότητα με τα γονίδια WD0596 και WD0636 αντίστοιχα του προφάγου WO-B στο στελέχους wMel. Το εύρημα αυτό, καθώς και το γεγονός ότι το pk2 βρέθηκε να εκφράζεται μόνο στα θηλυκά άτομα, οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι τα γονίδια αυτά πιθανόν να σχετίζονται με την επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Αργότερα τον ίδιο χρόνο ο Iturbe-Ormaetxe και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν την ύπαρξη

υψηλών επιπέδων πολυμορφισμού στα γονίδια αγκυρίνης μεταξύ στελεχών *Wolbachia* τα οποία επάγουν ή όχι κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005). Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τις γονιδιακές ακολουθίες 22 αγκυρινών μεταξύ των στελεχών *wMel* (*mod*⁺/*resc*⁺) και *wAu* (*mod*⁻/*resc*⁻), οι ερευνητές βρήκαν σημαντικές διαφορές σε 10 γονίδια. Μεταξύ των διαφορών αυτών περιλαμβάνονταν μικρού μήκους ενθέσεις ή/και ελλείμματα καθώς και ο πρώτος τερματισμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας λόγω της ένθεσης μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων ή μεταλλάξεων αναγνωστικού πλαισίου. Ωστόσο, πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός που παρατηρήθηκε στον αριθμό των μοτίβων αγκυρίνης που κωδικοποιούσαν τα ομόλογα γονίδια στα στελέχη *wMel* και *wAu*. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη και θεωρείται ένα από τα πιο γρήγορα εξελισσόμενα γονίδια της *Wolbachia*, διαφέρει μόνο σε 5 αμινοξικές υποκαταστάσεις μεταξύ των δύο στελεχών (*wMel* και *wAu*). Παρόμοιες περιπτώσεις πολυμορφισμού στα γονίδια αγκυρίνης αναδείχθηκαν και με την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του γονιδιώματος και νέων στελεχών *Wolbachia* (Klasson *et al.* 2008 & 2009). Ποιοι είναι όμως οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία του παρατηρούμενου πολυμορφισμού μεταξύ των αγκυρινών και πώς συνδέονται (συσχετίζονται) οι γονιδιακές αυτές διαφορές με τους φαινοτύπους που επάγει η *Wolbachia* παραμένουν προς διερεύνηση;

Σε αντίθεση με τα περισσότερα συμβιωτικά και μητρικά κληρονομούμενα βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη γενετική (γενωμική) σταθερότητα (Moran 1996; Tamas *et al.* 2002), το γονιδίωμα της *Wolbachia* παρουσιάζει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν ένα γρήγορα εξελισσόμενο γονιδίωμα. Μεταξύ αυτών: 1) ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό αυτο-μετακινούμενων γενετικών στοιχείων όπως φάγους και μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία (Wu *et al.* 2004; Bordenstein & Reznikoff 2005) και 2) τη δυνατότητα ανασυνδυασμού (Jiggins *et al.* 2001; Werren and Bartos 2001; Jiggins 2002; Reuter and Keller 2003; Bordenstein and Wernegreen 2004; Keller *et al.* 2004; Duron *et al.* 2005; Malloch and Fenton 2005; Baldo *et al.* 2005; Baldo *et al.* 2006; Ioannidis *et al.* 2007; Klasson *et al.* 2009; Ros *et al.* 2009). Όπως είδαμε και στο Κεφάλαιο 2, πολλά από τα γονίδια αγκυρίνης βρίσκονται πάνω στα προφαγικά στοιχεία της *Wolbachia* υποδηλώνοντας ότι οι φάγοι παίζουν κεντρικό ρόλο στην εισαγωγή και την εξάπλωση των γονιδίων αυτών. Από την άλλη μεριά, ο γενετικός ανασυνδυασμός αποτελεί ίσως έναν από τους πιο ισχυρούς μηχανισμούς αύξησης της γονιδιακής ποικιλομορφίας και εξέλιξης νέων φαινοτύπων τόσο για τους ευκαρυωτικούς όσο και για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς (Posada *et al.* 2002). Καθώς οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τα φαινόμενα ανασυνδυασμού, είναι αποτελεσματικότεροι μεταξύ ομολόγων γενετικών περιοχών, έχει προταθεί ότι τα γονίδια

που κωδικοποιούν για επαναλαμβανόμενα μοτίβα, όπως είναι τα γονίδια αγκυρίνης, αποτελούν βασικούς στόχους του γενετικού ανασυνδυασμού (Andrade *et al.* 2001).

Η διαλεύκανση των μηχανισμών, οι οποίοι υπαγορεύουν την εξέλιξη της οικογένειας των γονιδίων αγκυρίνης στο βακτήριο της *Wolbachia*, έχει εξαιρετική σημασία και αποτελεί το πρώτο βήμα για την κατανόηση του ρόλου των αγκυρινών στην ανάπτυξη των συμβιωτικών σχέσεων της *Wolbachia* με τους ξενιστές της ή/και την επαγωγή των αναπαραγωγικών ανωμαλιών. Για τον λόγο αυτό, στο παρόν κεφάλαιο διεξάχθηκε μια μοριακή εξελικτική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης με σκοπό: α) να αποσαφηνιστεί το εύρος της γενετικής ποικιλοτήτάς τους, β) να μελετηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των 11 διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων *Wolbachia-Drosophila*, γ) να εξακριβώσουμε το εύρος και το ρόλο που κατέχει ο γενετικός ανασυνδυασμός στην εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης και δ) να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των αυτό-μετακινούμενων γενετικών στοιχείων (προφαγικά στοιχεία και μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία) στην εξάπλωση και την εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φανερώνουν ότι οι αγκυρίνες της *Wolbachia* αποτελούν μια από τις πλέον δυναμικές και ευμετάβλητες ομάδες γονιδίων του βακτηρίου. Ο γενετικός ανασυνδυασμός, είτε με την μορφή του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination) είτε με την μορφή του παράτυπου ανασυνδυασμού (illegitimate recombination), αποτελεί την κινητήρια δύναμη στη δημιουργία της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας και τη γρήγορη εξέλιξη των γονιδίων αυτών. Επίσης, η ύπαρξη ενός μεγάλου ποσοστού προφαγικών και μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων στο γονιδίωμα της *Wolbachia* έχει συμβάλλει καθοριστικά στην εξάπλωση και τη διαμόρφωση της ομάδας αυτής των γονιδίων.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Ενίσχυση με τη μέθοδο PCR και προσδιορισμός αλληλουχίας

Τα ομόλογα γονίδια αγκρίνης, που απαντούν στα διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia* (Βλέπε Πίνακα 2.3 στο Κεφάλαιο 2), ενισχύθηκαν με τη μέθοδο PCR χρησιμοποιώντας εσωτερικούς ή/και εξωτερικούς εκκινητές (όπου ήταν δυνατό), σε μια προσπάθεια να ενισχύσουμε και να απομονώσουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο τμήμα των γονιδίων. Τα ζεύγη των εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1. Σε κάποιες περιπτώσεις έγινε προσπάθεια να σχεδιαστούν εξειδικευμένοι εκκινητές για τα στελέχη της υπερομάδας B με βάση τις κατατεθειμένες, στη βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information), αλληλουχίες ομόλογων αγκρινών από το στέλεχος της *Wolbachia* wPip.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 με τη διαφορά ότι ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 50 μl προκειμένου να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA (~1-2 μg) για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας των προϊόντων (~5μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1% για την επαλήθευση της ύπαρξης DNA. Στη συνέχεια, τα PCR προϊόντα καθαρίζονταν χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο επιλεκτικής κατακρήμνισης με polyethylene glycol (PEG) για την απομάκρυνση των ολιγονουκλεοτιδίων (αναλυτικά το πρωτόκολλο παρουσιάζεται στο Παράρτημα, Π.2). Το τελικό προϊόν του καθαρισμού ποσοτικοποιείτο και ~1000ng του προϊόντος στέλνονταν σε ξηρή μορφή στην εταιρία MACROGEN (<http://www.macrogen.com>, Κορέα) για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές του Πίνακα 3.1.

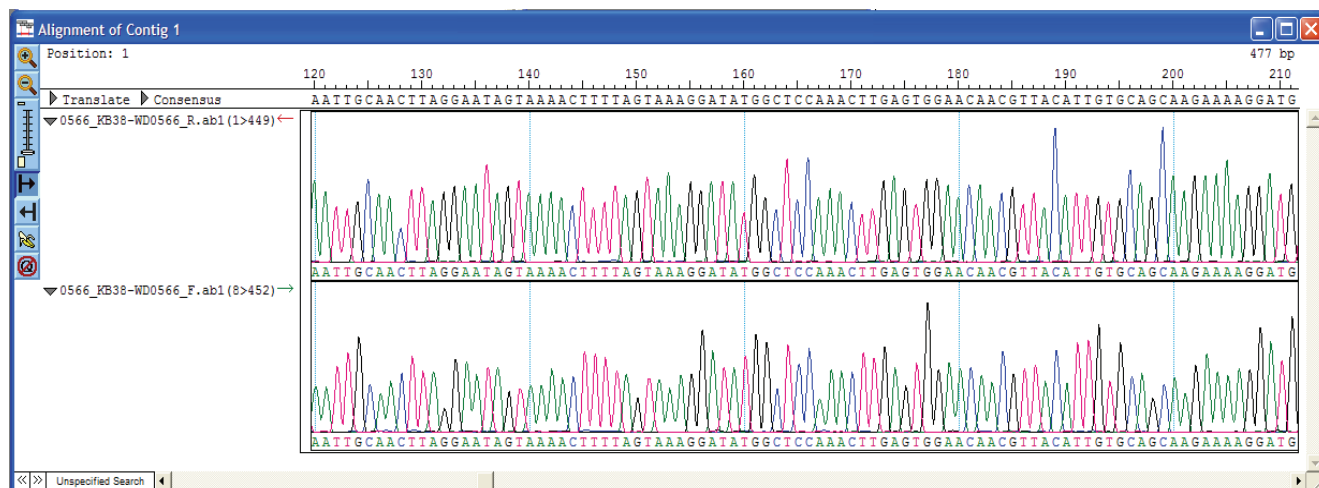
3.2.2 Κλωνοποίηση

Στις περιπτώσεις όπου η ενίσχυση των ομόλογων γονιδίων με τη μέθοδο PCR δεν παρείχε αρκετό υλικό για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας ή/και εμφάνιζε πολλαπλές ζώνες προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κλωνοποίησης. Αρχικά, τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών εκχυλίστηκαν από το πήκτωμα της αγαρόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις υποδείξεις των κατασκευαστών. Στη συνέχεια, τα προϊόντα αυτά ενσωματώθηκαν, μέσω της αντίδρασης της λιγάσης, στο φορέα κλωνοποίησης pGEM-T Easy (Promega) σύμφωνα με τις υποδείξεις των κατασκευαστών. Τέλος, ο ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει τα επιδεκτικά κύτταρα DH5α. Η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων έγινε με χρωματικό διαχωρισμό των αποικιών (blue

white selection) σε στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιείχε 100μg/ml αμπικιλίνη, 0.5mM IPTG και 80μg/ml X-Gal. Οι λευκές ανασυνδυασμένες αποικίες ελέγχθηκαν για την παρουσία του επιθυμητού ενθέματος μέσω colony PCR το οποίο στη συνέχεια καθαρίστηκε και προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική του αλληλουχία όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα.

3.2.3 Επεξεργασία δεδομένων

Τα ανεπεξέργαστα αποτελέσματα της διαδικασίας αλληλούχησης (χρωματογραφήματα) ελέγχθηκαν για τυχόν λάθη, όπως πολλαπλές κορυφές και υψηλό θόρυβο με το πρόγραμμα SeqMan-II του λογισμικού πακέτου DNASTar 5.0. Με το ίδιο πρόγραμμα προσδιορίστηκε επίσης η αμφίκλωνη συναινετική αλληλουχία (consensus sequence) για κάθε ομόλογο γονίδιο αγκυρίνης ενώνοντας τα διαφορετικής κατεύθυνσης επιμέρους γονιδιακά τμήματα που προέκυψαν με κάθε εκκινήτη όπως για παράδειγμα φαίνεται στην Εικόνα 3.1 για το ομόλογο του γονιδίου WD0566 του στελέχους *wTei*.



Εικόνα 3.1. Προσδιορισμός της αμφίκλωνης συναινετικής αλληλουχίας (consensus sequence) για το ομόλογο του γονιδίου WD0566 του στελέχους *wTei*.

Πίνακας 3.1. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση των ομολόγων γονιδίων αγκρίνης.

Γονίδιο αγκρίνης	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Οπίσθιος εκκινητής (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Ενδεικτική θερμοκρασία υβριδισμού (°C)
WD0035	CCATCGGACGCAAAACAAT	AGCGCAATATCCAAAGCATC	559	52
WD0073	GGTGCAAAACATCAGGAAGAG	CTGCAATAGCCCAATGTAAATG	436	57
WD0147	TTGTGGCTCATATTATTCTCAT	CTTCTTTACCCCTCGTTCTAT	817	52
WD0191	AGAGGGAATACATTACTACATCA *	ATCGCTTTAGCCTGTTCATAG *	396	54
	ATTTTCCCGTCGATAAATCA	TGGTGTGTGTTCGAGTAA	949 †	55
	AAATACATGGCCAGTCCAAT	AGGAAAGAGAGATCGGGTTT	945 †	55
WD0285	TGCAGGCAAAATTGTCTAAAAA	ATACCTCCCTTGTCTCTTCATCAC	392	52
WD0286	TTAGTAAGAAAAGAAAGAGAAG	TTTTGTCTACTATCACACC	536	48
WD0291	CCGATACATCTGTCACTTTTG	AAGCAAGAGATCAAGGGATG	939 †	54
WD0292	ATCGCGCTTCTGCTATGG	TTGGCTGAAGTCTGTGTAAATG	1102	56
WD0294	ATGGCCATGAAGAGATAGTA	ATTAGCGGCTGATGATTG	487	50
	ACCGTCACTATTCTTGCGT	TAATATTGGTGGCCAAAGTTC	946 †	54
WD0385	TACTGGGAGCAAAAGAAATCAATG	CCCCAGGTGAAGAAAGAAATCATC	683	56
WD0438	GCGATGCTGGTGATGATTATG	GCGCCAGAGAAAGAGGGTTTAT	1400	56
WD0441	AAGAGGCTGAGAGCAAAAGA	CATCTTGCTTATCGCACT	1002	54
	TATCGAAAAAGCAACACTGATG *	CAACATCATTAACAGTAGAACT *	817	50
WD0498	ATGGCGGTGAGGAAGA	CGCAATCTAACGCATCAAAAAC	733	54
WD0514	TTCTTAACACGTCAGCAAAA	TTATGCCATGCAACGACTAT	964 †	54
	GTTTTAAAGTTGCTGATCTTG	CGGTGAGCTGGTAGAAGTTT	853 †	54
WD0550	TACAACGGGTGAAAAGATAACAAG	ATACGCAGCCCCATAGGAA	865	56
WD0566	TATAATGAAAGAGATAAACTACA	CAGCATTATAGAGCAAGTG	481	50
WD0596	CGGCAATAAGAGATCCAAGT	AACATAAGTCCCTTTCGTCG	955 †	54
	TTAGAGAAGGAATGCGGAC	CTGCACTCACTTGTTTTCTCA	988	54
WD0633	AGAAATTGCAAAAGGCTGCTAC	ACTCTGGAGGATTGCTTGC	968	54
	CCTGATGACTTCTATCTAGGGC	ACAGAATCAATTATCGAAAAA	931	54
WD0636	AGAAAAAGAGGATGAATAAAAG	GCATAATCCATCGCTGTCATC	372	52
WD0637	TGGGAAAGTGAAAAAGTATTATCTA	ATTTCGTTTACTTGGCACATTATC	272	50

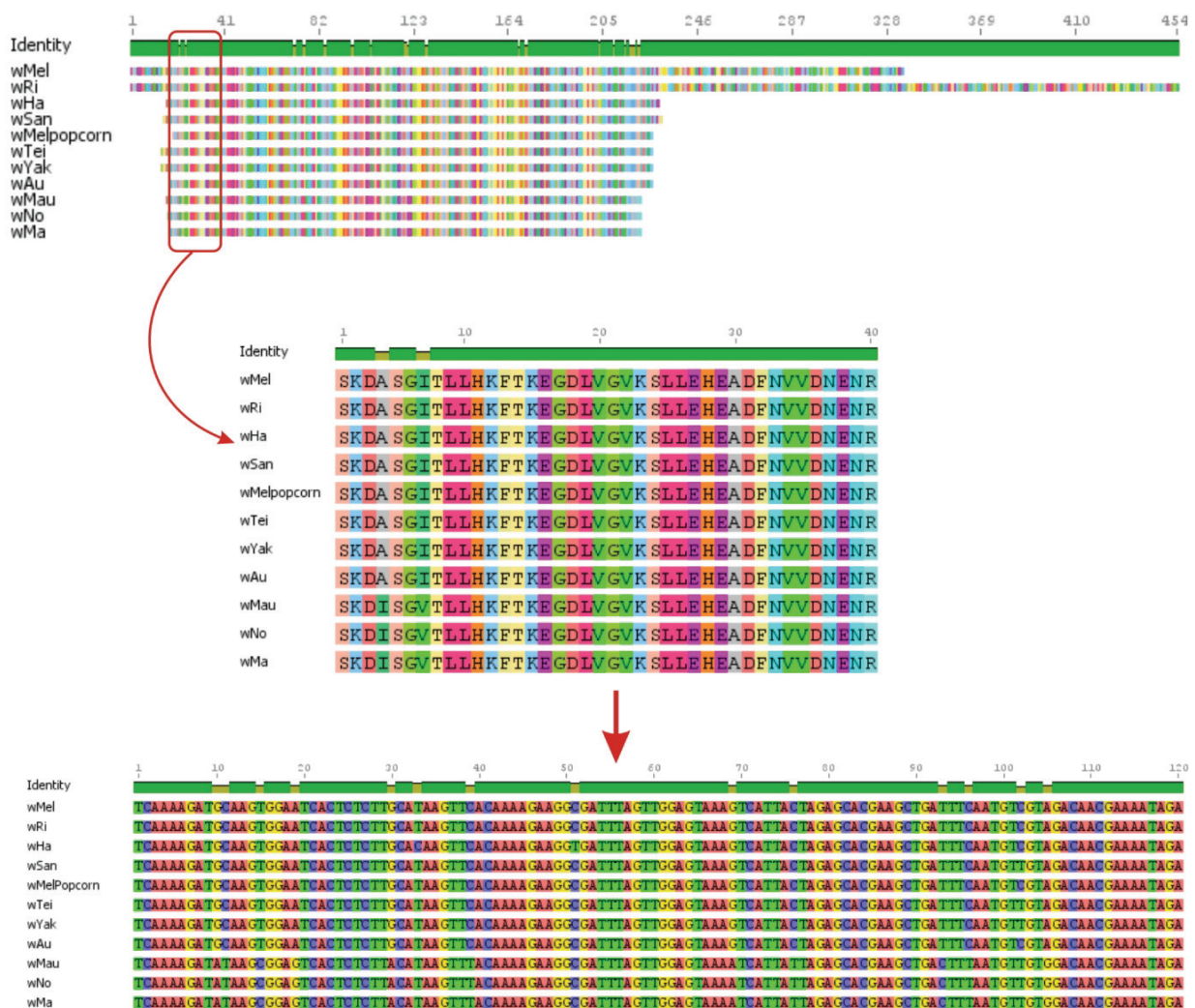
AAGATGGGCCAGTTTTATCA				
WD0754	ATGGAGGGGATGGGATAAATACTA	GTCGCTTGCTCTTCCATACACA	1280	57
WD0766	AAGAGTAAACCTGACAAACGATAG	TGGTACAGATAGGGCAGTAG	1161	57
WD1213	AGGGGGTATAATCATGG	ATTTATATCGACAGCCTCC	1200	54

* Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των ομολόγων γονιδίων στα στελέχη της B υπερομάδας.

† Ένας από τους δύο εκκινητές υβριδοποιείται έξω από το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου.

3.2.4 Ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας

Για κάθε γονίδιο αγκρίνης ξεχωριστά, οι ομόλογες αλληλουχίες από τα διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia* μεταφράστηκαν σε πρωτεϊνική αλληλουχία, ελέγχθηκαν για την ύπαρξη τυχόν κωδικονίων λήξης ή μεταλλάξεων μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου και ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας τα προγράμματα MUSCLE (Edgar 2004) και ClustalW (Thompson *et al.* 1994) μέσω της λογισμικής πλατφόρμας Genious 4.0.3 (Drummond *et al.* 2008). Ακολούθησε οπτική επιβεβαίωση και διόρθωση των ευθυγραμμίσεων, όπου αυτό ήταν απαραίτητο, και στη συνέχεια οι ευθυγραμμισμένες πρωτεϊνικές αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των αντίστοιχων ευθυγραμμίσεων σε νουκλεοτιδικό επίπεδο (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Παράδειγμα ευθυγράμμισης του γονιδίου αγκρίνης WD0498 σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μετατροπής της στην αντίστοιχη ευθυγράμμιση σε νουκλεοτιδικό επίπεδο.

Η σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και η ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος DnaSP, έκδοση 4.90.1 (Rozas *et al.* 2003). Για τον σκοπό αυτό τμήματα, τα οποία δεν μπορούσαν να ευθυγραμμιστούν με αξιοπιστία, όπως επίσης και τα κενά, απομακρύνθηκαν. Επίσης, με το πρόγραμμα αυτό υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα 23 γονίδια αγκυρίνης: α) ο μέσος όρος της περιεκτικότητας επί της εκατό (%) των νουκλεοτιδικών δεδομένων σε γουανίνη και κυτοσίνη (%GC content), β) η παράμετρος της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγη βάσεων (π) η οποία υπολογίζεται ως ο μέσος όρος όλων των συγκρίσεων ανά ζεύγη (Nei 1987) και γ) η παράμετρος (θ) ή αλλιώς η κατά εκτίμηση ανά βάση νουκλεοτιδική ποικιλομορφία ο υπολογισμός της οποίας έγινε σύμφωνα με την αναλογία του αριθμού των διαφορετικών βάσεων επί του συνόλου (Watterson 1975).

Για την εκτίμηση του ρυθμού των συνώνυμων (Ks) και των μη συνώνυμων (Ka) υποκαταστάσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Codeml το οποίο εμπεριέχεται στο λογισμικό πακέτο PAML έκδοση 4.1 (Yang 2007) το οποίο κάνει χρήση του μοντέλου μεγίστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) των Goldman and Yang (1994).

Επίσης, το σύνολο των αμινοξικών αλληλουχιών ελέγχθηκε για την ύπαρξη επαναλήψεων αγκυρίνης μέσω αναζητήσεων στη βάση δεδομένων Pfam (Finn *et al.* 2008) χρησιμοποιώντας μοντέλα HMMs (Hidden Markov Models).

Τέλος, η αναζήτηση πανομοιότυπων νουκλεοτιδικών επαναλήψεων κοινής κατεύθυνσης (exact direct repeats) μεγαλύτερες των 8 νουκλεοτιδίων πραγματοποιήθηκε με το διαδικτυακό πρόγραμμα REPFIND (Betley 2002, <http://zlab.bu.edu/repfind/form.html>) χρησιμοποιώντας σαν ανώτατο στατιστικά σημαντικό όριο την τιμή 0.0001.

3.2.5 Φυλογενετική ανάλυση

Η εκτίμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μεγίστης πιθανοφάνειας (Maximum-likelihood, ML). Πριν πραγματοποιηθεί η ανάλυση με την μέθοδο ML επιλέχθηκε για κάθε ομάδα δεδομένων ένα κατάλληλο εξελικτικό μοντέλο χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Modeltest έκδοση 3.7 (Posada & Crandall 1998) με βάση το πληροφοριακό κριτήριο Akaike (Akaike information criterion, AIC). Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί ελέγχους μεγίστης πιθανοφάνειας (likelihood ratio test, LRT) ούτως ώστε να επιλέξει και να υπολογίσει τις παραμέτρους του εξελικτικού μοντέλου υποκαταστάσεων (DNA substitution model) το οποίο ερμηνεύει επαρκώς τα νουκλεοτιδικά δεδομένα μας. Η ML ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 100 τυχαίες προσθήκες στελεχών τόσο με τη μέθοδο της διχοτόμησης (bisection) όσο και με τη μέθοδο της επανασύνδεσης (reconnection) χρησιμοποιώντας ανακατανομή των κλάδων κατά TBR (Tree-Bisection-Reconnection). Ο έλεγχος αξιοπιστίας του δένδρου περιελάμβανε 100 επαναληπτικές δοκιμές (bootstrap replicates). Η όλη

ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PAUP, έκδοση 4.0b10 (Swofford 2002) μέσω της πλατφόρμας Genious, έκδοση 4.0.3 (Drummond *et al.* 2008). Τα δένδρα κατασκευάστηκαν χωρίς τη χρήση κάποιας παραομάδας (άριζη ανάλυση – άριζο φυλογενετικό δένδρο).

3.2.6 Στατιστικός έλεγχος της φυλογενετικής σύγκλισης

Για τον στατιστικό έλεγχο των τοπολογικών διαφορών μεταξύ των φυλογενετικών δένδρων, που προέκυψαν για κάθε ομάδα γονιδίων αγκρίνης, χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμή SH (SH test) που αναπτύχθηκε από τους Shimodaira και Hasegawa (1999). Η συγκεκριμένη δοκιμή/ανάλυση εμπεριέχεται στο πρόγραμμα PAUP, έκδοση 4.0b10. Το SH test αποτελεί ένα μη-παραμετρικό έλεγχο της μέγιστης πιθανοφάνειας μεταξύ διαφορετικών φυλογενετικών τοπολογιών. Συγκεκριμένα, ο στατιστικός έλεγχος SH συγκρίνει την τιμή της πιθανοφάνειας (likelihood score, $-lnL$) που λαμβάνει μια ομάδα δεδομένων με βάση την τοπολογία του ίδιου του ML δένδρου με την τιμή της πιθανοφάνειας που λαμβάνει η ίδια ομάδα δεδομένων βάσει εναλλακτικών τοπολογιών, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα ML δένδρα που προκύπτουν από διαφορετικές ομάδες δεδομένων (Bordenstein & Wernegreen 2004). Η αξιολόγηση της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των τιμών πιθανοφάνειας έγινε με τη μέθοδο των επαναληπτικών δοκιμών (bootstrap test) χρησιμοποιώντας 1000 αντιμεταθέσεις (permutations) με τη μέθοδο της πλήρους βελτιστοποίησης (full optimization method) (Swofford 2002).

3.2.7 Ανίχνευση φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού

Οι στοιχισμένες ομόλογες αλληλουχίες των υπό μελέτη γονιδίων αγκρίνης εξετάστηκαν ξεχωριστά για την ύπαρξη σε αυτές φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού. Από τα 23 γονίδια αγκρίνης, μόνο εκείνα τα οποία εμφάνιζαν επαρκή ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών ομολόγων χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη ανάλυση καθότι τέτοια φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μεταξύ αλληλουχιών οι οποίες δεν είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό, από κάθε ομάδα δεδομένων απομακρύνθηκαν όλες εκτός μιας από τις αλληλουχίες που ήταν πανομοιότυπες μεταξύ τους. Επίσης, οι αλληλουχίες οι οποίες εμφάνιζαν μεγάλη ποικιλομορφία (<70% ομοιότητα) απορρίφθηκαν από τις ομάδες δεδομένων προκειμένου να αποφευχθούν οι περιπτώσεις μη αξιόπιστης στοίχισης οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανίχνευση μη πραγματικών “σημάτων” γενετικού ανασυνδυασμού. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα RDP, έκδοση 3b27 (Martin *et al.* 2005) το οποίο εφαρμόζει μια σειρά μη-παραμετρικών μεθόδων ανίχνευσης χωρίς την χρήση υποθετικών γενετικών μοντέλων των πληθυσμών ή/και δεν υπολογίζουν το γενικό πληθυσμιακό ποσοστό ανασυνδυασμού. Κατά κύριο λόγο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MaxChi (Smith 1992; Posada & Crandall 2001). Τα αποτελέσματα των φαινομένων ανασυνδυασμού, που ανιχνεύθηκαν, θεωρή-

θηκαν αξιόπιστα και στατιστικά σημαντικά μόνο αν επιβεβαιώνονταν από περισσότερες τις μιας μεθόδους συμπεριλαμβανομένων των Chimaera (Smith 1992; Posada & Crandall 2001), Geneconv (Padidam *et al.* 1999), RDP (Martin & Rybicki 2000) και Bootscan (Salminen *et al.* 1995). Τα προγράμματα αυτά έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν υποθετικά σημεία θραύσεως ανασυνδυασμού σε στοιχισμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών για την ανίχνευση γενετικού ανασυνδυασμού (Baldo *et al.* 2005; Evans *et al.* 2005; Tsaousis *et al.* 2005; Baldo *et al.* 2006).

Η μέθοδος MaxChi χρησιμοποιεί μια προσέγγιση ολισθαινόντων παραθύρων με σκοπό τον προσδιορισμό, για κάθε πιθανό ζευγάρι ακολουθιών στα ευθυγραμμισμένα γονιδιακά τμήματα, σημαντικών αποκλίσεων που προκύπτουν από τα δύο χωρίσματα του παραθύρου. Έτσι υπολογίζεται μία τιμή χ^2 για την απόδοση της διαφορετικότητας μεταξύ των μεταβλητών θέσεων από κάθε πλευρά του κεντρικού χωρίσματος.

Η μέθοδος Chimaera είναι μια τροποποίηση της μεθόδου MaxChi καθώς, αντί για ζευγάρια ακολουθιών, χρησιμοποιούνται τριπλέτες ακολουθιών για τις οποίες υπολογίζεται μια τιμή μέγιστου στατιστικού χ^2 .

Η μέθοδος Geneconv βασίζεται πάνω στη μέθοδο κατά Sawyer (Sawyer 1989), όπου ζεύγη νουκλεοτιδικών αλληλουχιών συγκρίνονται μεταξύ τους. Έτσι, υπολογίζεται μια τιμή p “σφαιρικής αντιμετάθεσης” (global permutation p -value), η οποία αντιπροσωπεύει το ποσοστό των μεταλλαγμένων ακολουθιών (permuted alignments) για τις οποίες κάποιο μέρος από αυτές έχει υψηλότερη τιμή από αυτή της ολικής ακολουθίας.

Οι μέθοδοι RDP και Bootscan αποτελούν φυλογενετικές μεθόδους οι οποίες στηρίζονται στην ανίχνευση ασύμφωνων προτύπων διακλάδωσης (discordant branching patterns) που δημιουργούνται από την ανάλυση των παρακείμενων στοιχισμένων ακολουθιών για τον εντοπισμό πιθανών φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού.

Οι γενικές ρυθμίσεις των παραμέτρων του προγράμματος ήταν οι παρακάτω:

- όλες οι ακολουθίες θεωρήθηκαν γραμμικές (sequences considered linear)
- σαν ανώτατο στατιστικά σημαντικό όριο επιλέχτηκε η τιμή 0.001
- εφαρμόστηκε στατιστική διόρθωση κατά Bonferroni
- η αξιολόγηση της σημαντικότητας έγινε χρησιμοποιώντας 1000 αντιμεταθέσεις (permutations)

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1 Γονιδιακές αλληλουχίες και γενετική ποικιλότητα

Χρησιμοποιώντας εσωτερικούς ή/και εξωτερικούς εκκινητές κατέστη εφικτό να αλληλουχηθούν μερικώς ή/και πλήρως τα ομόλογα γονίδια αγκρίνης διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* που απαντούν σε είδη/στελέχη *Drosophila*. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επέτρεψε τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας αυτών των ομολόγων γονιδίων. Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές των βασικών παραμέτρων της γενετικής ποικιλότητας για κάθε γονίδιο αγκρίνης όπως επίσης και στατιστικά στοιχεία για τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες όπως για παράδειγμα: το μέγεθος των αξιόπιστα στοιχισμένων νουκλεοτιδίων, ο αριθμός των αλληλόμορφων, το ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης (GC content), η μέση τιμή της γενετικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγος βάσεων (π), η μέση τιμή του ρυθμού των συνώνυμων (K_s) και των μη συνώνυμων (K_a) υποκαταστάσεων καθώς και του λόγου K_a/K_s .

Αναλυτικότερα, η επί της εκατό (%) περιεκτικότητα των ομολόγων γονιδίων σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC content) κυμάνθηκε μεταξύ 31.1% (στο χρωμοσωμικό γονίδιο WD0441) και 41.8% (στο προφαγικό γονίδιο WD0636) με μέσο όρο 35.2%. Η περιεκτικότητα αυτή είναι ανάλογη της συνολικής περιεκτικότητας σε GC του γονιδιώματος της *Wolbachia* η οποία υπολογίζεται γύρω στο 35%.

Από τη συγκριτική μελέτη της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των 23 γονιδίων αγκρίνης προκύπτει ότι από τα δεκατρία (13) χρωμοσωμικά γονίδια αγκρίνης που μελετήθηκαν, τα οχτώ (8) παρουσιάζουν πολύ μικρή νουκλεοτιδική ποικιλομορφία ανά ζεύγος βάσεων μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκρίνης. Για τα γονίδια αυτά, η παράμετρος (π) κυμάνθηκε από 0.00141 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0035) έως 0.04878 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0498). Τα υπόλοιπα πέντε (5) χρωμοσωμικά γονίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ποικιλομορφία ($\pi > 0.05$) η οποία κυμαίνεται από 0.06299 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0441) έως 0.10722 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0438). Ανάλογη είναι και η διακύμανση της εκτιμώμενης νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά νουκλεοτιδική θέση (θ) για τα γονίδια αυτά. Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζεται γραφικά η παράμετρος της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγος βάσεων (π) όπως και η παράμετρος της εκτιμώμενης νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά νουκλεοτιδική θέση (θ). Σε γενικές γραμμές, τα στελέχη *wMel*, *wMelPopcorn*, *wAu*, *wTei*, *wYak* και *wSan* μοιράζονται πολύ μεγάλη ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο για την πλειονότητα των γονιδίων αγκρίνης (σχεδόν 100% ομοιότητα) σε σύγκριση με τα στελέχη *wRi* και *wHa* της υπερομάδας A καθώς επίσης και με τα στελέχη της υπερομάδας B (*wNo*, *wMau* και *wMa*).

Πίνακας 3.2. Τα γενετικά χαρακτηριστικά των γονιδίων αγκουρίνης της *Wolbachia*.

Γονίδιο αγκουρίνης ^a	Αξιόπιστα στοιγισμένες θέσεις	Δεδομένα ^b	Αλληλό- μορφα	Μέση τιμή της περιεκτικότητας GC (%)	π^b	θ^c	Ks ^{στ}	Ka ^ς	Ka/Ks
WD0035	531	M,P,A,T,Y,S,R,H	2	34.3	0.00141	0.00218	0.00537	0	0
WD0073	405	M,P,A,T,Y,S,R	4	34.9	0.03011	0.04302	0.03812	0.01982	0.51994
WD0147	771	M,P,A,T,Y,S,R	3	34.3	0.06448	0.09211	0.10801	0.08785	0.81335
WD0191	288	M,P,A,T,Y,R,H,Mau	4	34.2	0.09115	0.13525	0.417	0.1046	0.25084
WD0285	366	M,P,A,T,Y,S,H	2	39.3	0.00078	0.00112	0	0.001	-
WD0286	510	M,P,A,T,Y,S,H	2	38.2	0.00056	0.0008	0	0.00077	-
WD0291	651	M,P,A,T,Y,S,H	4	34	0.00497	0.00439	0.00458	0.00565	1.23362
WD0292	1668	M,P,A,T,Y,S,H	6	34.9	0.00474	0.00416	0.0024	0.00558	2.325
WD0294	1380	M,P,A,T,Y,S,H	5	34.2	0.00242	0.00296	0.00287	0.00243	0.84669
WD0385	384	M,P,T,Y,S,R	2	38.7	0.01722	0.02263	0.01556	0.01896	1.21851
WD0438	783	M,P,A,T,Y,S,R	4	30.8	0.05011	0.06985	0.10149	0.05573	0.54912
WD0441	591	M,P,A,T,Y,S,R,H,N ₁ Ma,Mau	7	31.5	0.09029	0.07279	0.29176	0.08296	0.28434
WD0498	594	M,P,A,T,Y,S,R,H,N ₁ Ma,Mau	5	34.6	0.04878	0.03868	0.22457	0.02018	0.08986
WD0514	1209	M,P,T,Y,S	3	38.2	0.00182	0.00159	0.00177	0.00184	1.03955
WD0550	693	M,P,A,T,Y,S,R	4	35.6	0.10348	0.14783	0.3864	0.15394	0.3984
WD0566	444	M,P,A,T,Y,S,R	3	31.9	0.1198	0.17099	24.04159	0.13969	0.00581
WD0596	570	M,P,A,T,Y,S,R ^γ ,H	3	35.9	0.06277	0.10393	0.71461	0.03964	0.05547
WD0633	1905	M,P,A,Y,S,R ^γ	4	31.7	0.13001	0.16156	0.57456	0.15113	0.26304
WD0636	190	M ₁ P,A,T,Y,S ^γ ,R ^γ ,H,N ^γ ,Ma,Mau	5	41.8	0.0749	0.05088	0.21723	0.0529	0.24352
WD0637	607	M ₁ P,A,T,S ₁ R ^γ ,H,N ₁ Ma,Mau	7	35.7	0.06163	0.04121	0.22586	0.04016	0.17781
WD0754	762	M,P,A,T,Y,S,R	5	34.5	0.0813	0.1157	0.23918	0.10449	0.43687
WD0766	534	M,P,A,T,R,H	8	35	0.03184	0.02788	0.02218	0.03713	1.67403
WD1213	996	M,P,A,T,Y,S,R,H	6	34.2	0.0033	0.00426	0.00527	0.002761	0.52391

^a Τα προφαγικά γονίδια αγκρίνης παρουσιάζονται με τη γκρι σκίαση.

^b M: wMel, P: wPopcorn, A: wAu, T: wTei, Y: wYak, S: wSan, R: wRi, H: wHa, N: wNo, Ma: wMa, Mau: wMau

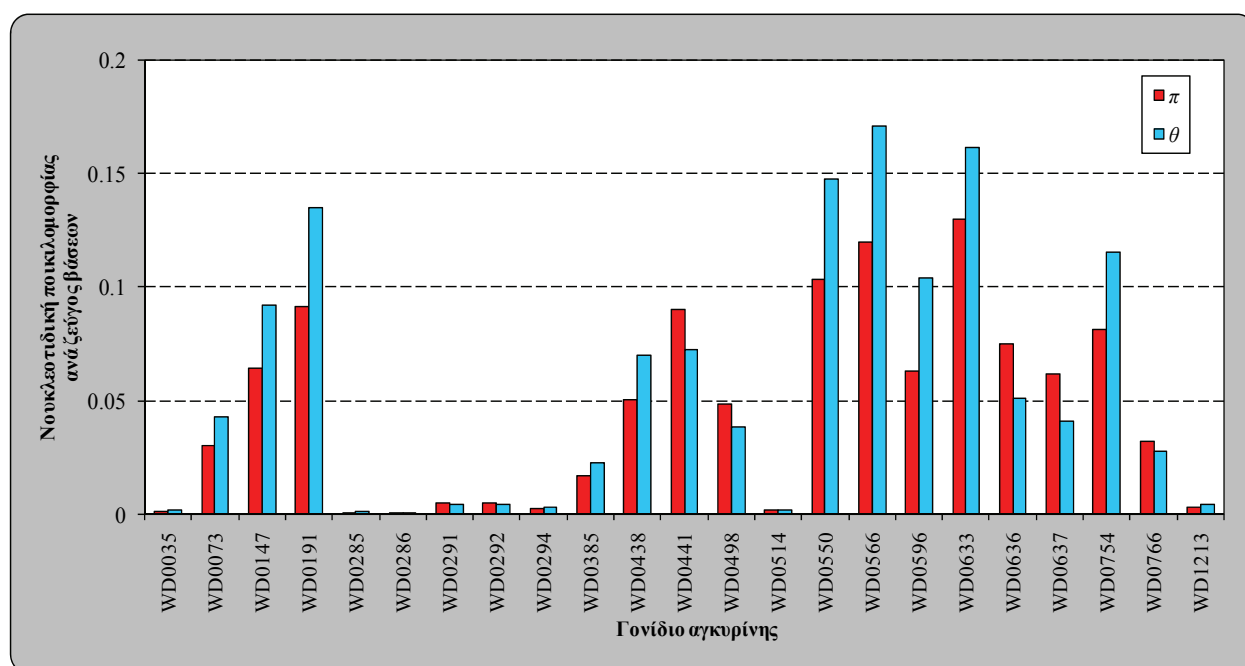
^γ Υποδηλώνει την παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου.

^δ π : μέση τιμή της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγη βάσεων.

^ε θ : εκτιμώμενη νουκλεοτιδική ποικιλομορφία ανά νουκλεοτιδική θέση.

^{στ} μέση τιμή του ρυθμού των συνώνυμων αντικαταστάσεων.

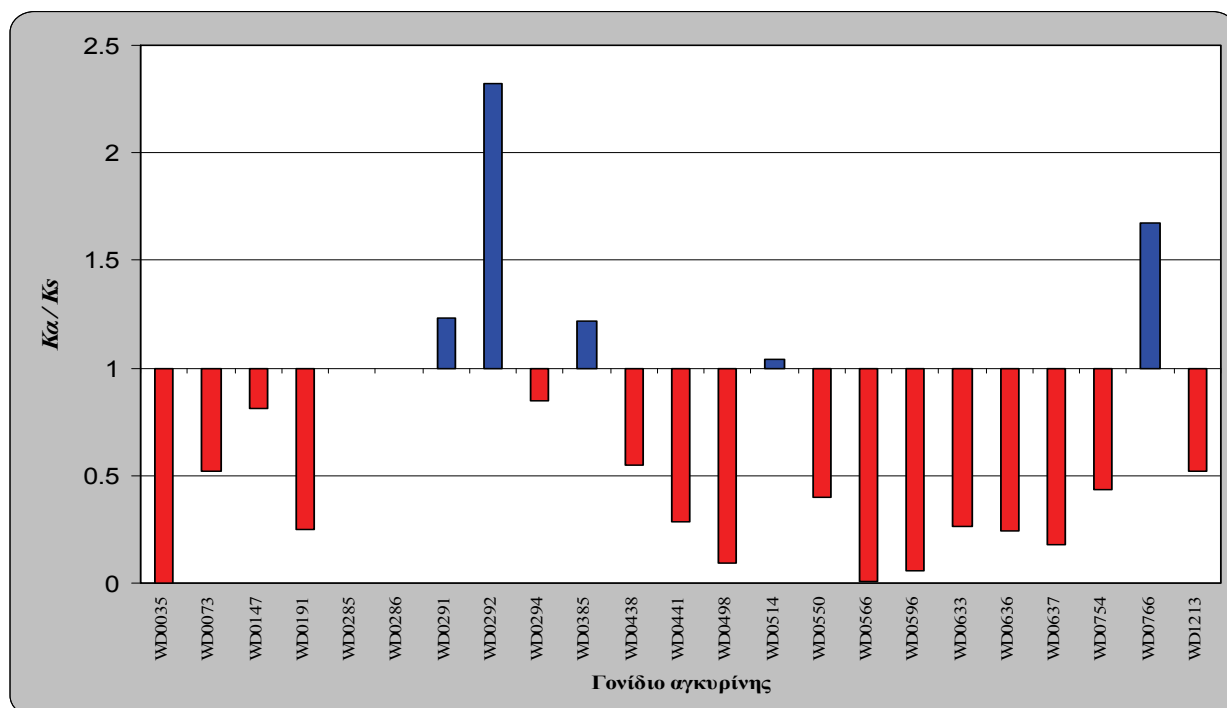
^ζ μέση τιμή του ρυθμού των μη συνώνυμων αντικαταστάσεων



Εικόνα 3.3. Γραφική αναπαράσταση των παραμέτρων της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγος βάσεων (π) και εκτιμώμενης νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά νουκλεοτιδική θέση (θ).

Επίσης είναι αξιοσημείωτο, όπως αναπαρίσταται και στο διάγραμμα της Εικόνας 3.3, ότι τα πρότυπα της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των δύο προφάγων διαφέρουν σημαντικά (Wilcoxon, $p < 0.05$). Συγκεκριμένα, τα γονίδια αγκυρίνης τα οποία ανήκουν στον προφάγο WO-A είναι τα λιγότερο πολυμορφικά παρουσιάζοντας την χαμηλότερη νουκλεοτιδική ποικιλομορφία (π) η οποία κυμαίνεται από 0.00056 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0286) έως 0.00497 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0291). Από την άλλη μεριά, τα γονίδια αγκυρίνης τα οποία ανήκουν στον προφάγο WO-B παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των ομολόγων γονιδίων, με την νουκλεοτιδική ποικιλομορφία να κυμαίνεται από 0.05519 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0633) έως 0.1198 (στην περίπτωση του γονιδίου WD0566). Μάλιστα, στην περίπτωση του γονιδίου WD0636 ανιχνεύθηκαν και αλληλουχήθηκαν δύο αντίγραφα του γονιδίου για τα στελέχη *wSan* (A-υπερομάδα) και *wNo* (B-υπερομάδα). Τα δύο παραομόλογα (paralogous) γονίδια του στελέχους *wSan* παρουσιάζουν ομοιότητα μεταξύ τους 95.2% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο ενώ μεταξύ των δύο παραομόλογων του στελέχους *wNo* η ομοιότητα αυτή φτάνει τα 89%.

Επίσης, στα πλαίσια της μελέτης της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των γονιδίων αγκυρίνης υπολογίστηκε ο μέσος όρος, μεταξύ των ομολόγων γονιδίων, του ρυθμού των συνώνυμων (K_s) και των μη συνώνυμων (K_a) υποκαταστάσεων (Πίνακας 3.2). Συγκρίνοντας τους ρυθμούς αυτούς είναι δυνατόν να εξάγουμε συμπεράσματα εάν και ποια γονίδια αγκυρίνης υπόκεινται σε αφαιρετική (purifying) ή θετική (positive) επιλογή. Συνεπώς, όταν ο λόγος του ρυθμού των μη συνώνυμων προς το ρυθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων είναι μικρότερος από την μονάδα ($K_a / K_s < 1$) υποδηλώνει ότι το γονίδιο αυτό υπόκειται σε αφαιρετική επιλογή ενώ αντίθετα όταν ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος από την μονάδα ($K_a / K_s > 1$) το γονίδιο θεωρείται ότι υπόκειται σε θετική επιλογή. Όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα της Εικόνας 3.4, για την πλειονότητα των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* ο λόγος K_a / K_s είναι μικρότερος από την μονάδα υποδηλώνοντας ότι οι μη συνώνυμες θέσεις υπόκεινται σε λειτουργικούς φραγμούς (αφαιρετική επιλογή) με αποτέλεσμα ο ρυθμός υποκατάστασής τους να είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο ρυθμό των συνώνυμων θέσεων. Ωστόσο, στην περίπτωση δύο προφαγικών γονιδίων (WD0291, WD0292) και δύο χρωμοσωμικών γονιδίων αγκυρίνης (WD0385, WD0766) ο λόγος K_a / K_s είναι μεγαλύτερος από την μονάδα υποδηλώνοντας ότι οι υποκαταστάσεις στις μη συνώνυμες θέσεις παρέχουν στα γονίδια αυτά κάποιο λειτουργικό πλεονέκτημα (θετική επιλογή).



Εικόνα 3.4. Γραφική αναπαράσταση του λόγου των μη συνώνυμων προς το ρυθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων (Ka / Ks). Οι μπλε μπάρες αναπαριστούν τα γονίδια αγκυρίνης των οποίων ο λόγος είναι >1 υποδηλώνοντας ότι τα γονίδια αυτά βρίσκονται υπό θετική επιλογή. Οι κόκκινες μπάρες αναπαριστούν τα γονίδια των οποίων ο λόγος είναι <1 υποδηλώνοντας αφαιρετική επιλογή.

Ωστόσο, όπως είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες των στελεχών *wAu* (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005) και *wRi* (Klasson *et al.* 2009), η γενετική ποικιλότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των ομολόγων γονιδίων δεν προέρχονταν μόνο από απλές υποκαταστάσεις βάσεων αλλά και σε μικρότερες ή μεγαλύτερες ενθέσεις – ελλείμματα, διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης, διακοπή του αναγνωστικού πλαισίου (ORF) λόγω μεταλλάξεων μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου ή/και σε ένθεση μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων. Όλα τα παραπάνω γεγονότα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.3.

Αξίζουν να σημειωθούν τα εξής: (α) στο γονίδιο WD0636, που βρίσκεται στον προφάγο WO-B, ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης, το οποίο προέκυψε από την ένθεση ενός νουκλεοτιδίου γουανίνης, έχει προκαλέσει τη διακοπή του αναγνωστικού πλαισίου στα στελέχη των συμβιωτικών σχέσεων *D. simulans*(*wAu*) [*mod⁻/resc⁻*] και *D. teissieri* (*wTei*)[*mod⁺/resc⁺*]. Η πρόωρη αυτή διακοπή της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου οδηγεί σε έλλειμμα της τελευταίας επανάληψης αγκυρίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.5), (β) για το γονίδιο WD1213 διαπιστώθηκε ότι και τα τρία ομόλογα των στελεχών της B-υπερομάδας (*wNo*, *wMau*, *wMa*), τα οποία μεταξύ τους είναι 100% όμοια, εμφανίζουν συνολικά έντεκα (11) περιπτώσεις ενθέσεων/ελλειμμάτων, σε σχέση με το ομόλογο γονίδιο του στελέχους αναφοράς *wMel*, εκ των οποίων οι τρεις από αυτές προκαλούν μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου με αποτέλεσμα

την εισαγωγή πρόωρων κωδικονίων λήξης περίπου στο μέσο του γονιδίου, (γ) ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης οι περιπτώσεις δύο γονιδίων αγκυρίνης στα οποία έχουν ενσωματωθεί μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία (IS). Συγκεκριμένα, τα ομόλογα του γονιδίου WD0766 στα δύο συγγενικά στελέχη *wYak* και *wSan* βρέθηκε να διαθέτουν από ένα πλήρες μεταθέσιμο στοιχείο της οικογένειας IS5 918 bp στη νουκλεοτιδική θέση 1120 (Εικόνα 3.6).

Πίνακας 3.3. Μεγάλες δομικές αλλαγές στα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia*.

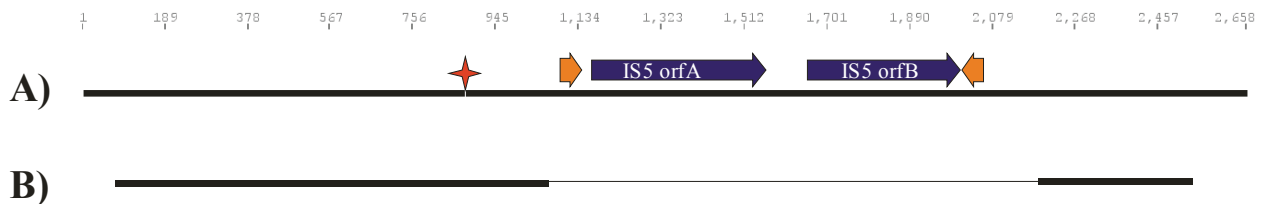
Γονίδια Αγκυρίνης ^α	Ποικιλότητα στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης	Μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου	Ένθεση μεταθέσιμων στοιχείων	Ανασυνδυασμός (MaxChi, $p < 0.001$)
WD0035				
WD0073				Ναι (<i>wUni</i>) ^β
WD0147				
WD0191				
WD0285				
WD0286				
WD0291				
WD0292				
WD0294	Ναι			
WD0385	Ναι	Ναι	Ναι	
WD0438	Ναι			Ναι (<i>wRi</i> , <i>wUni</i>)
WD0441				
WD0498		Ναι		
WD0514	Ναι			
WD0550	Ναι	Ναι		Ναι (<i>wUni</i>)
WD0566				
WD0596				
WD0633				Ναι (<i>wAu</i>)
WD0636		Ναι		
WD0637				
WD0754				
WD0766	Ναι		Ναι	Ναι
WD1213		Ναι		

^α Με τα πλαίσια επισημαίνονται τα προφαγικά γονίδια.

^β Πιθανά θυγατρικά στελέχη.



Εικόνα 3.5. Παράδειγμα διακοπή του αναγνωστικού πλαισίου (ORF) λόγω ένθεσης ενός νουκλεοτιδίου γουανίνης στο ομόλογο γονίδιο WD0636 στο στέλεχος wAu.



Εικόνα 3.6. Τα ομόλογα του γονιδίου WD0766 στα δύο συγγενικά στελέχη wYak και wSan έχουν γίνει στόχος ένθεσης ενός μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου (A). Τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για τις τρανποζάσες παρουσιάζονται με τα μωβ βέλη. Τα δύο μικρότερα πορτοκαλί βέλη αντιπροσωπεύουν τις δύο αντίστροφες επαναληπτικές ακολουθίες που οριοθετούν το μεταθέσιμο στοιχείο. Το κόκκινο αστέρι συμβολίζει την έλλειψη ενός νουκλεοτιδίου. Για σύγκριση παρατίθεται η ακολουθία του ομολόγου γονιδίου στο επίσης συγγενικό στέλεχος wTei το οποίο, με εξαίρεση την περιοχή ένθεσης, παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τα προηγούμενα (B).

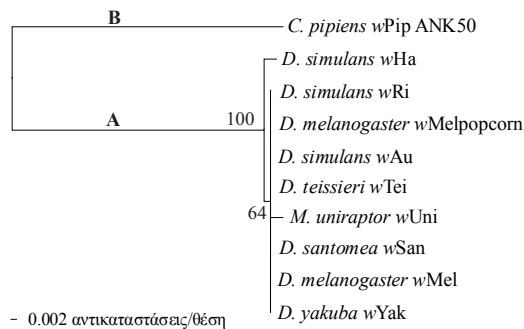
3.3.2 Φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων αγκυρίνης

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθούν οι φυλογενετικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ομολόγων γονιδίων κάθε αγκυρίνης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood, ML). Τα γονίδια αγκυρίνης, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ των διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia* (> 99% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο), εξαιρέθηκαν από την ανάλυση.

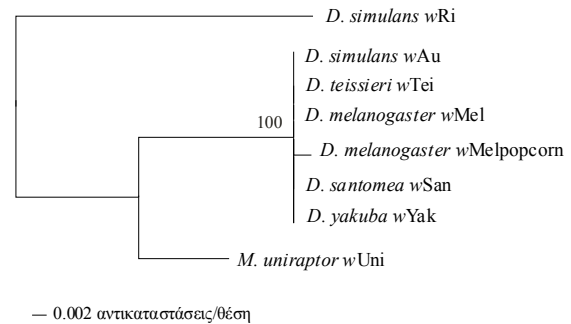
Σε γενικές γραμμές, στα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα φαίνεται ξεκάθαρα ο διαχωρισμός των δύο βασικών υπερομάδων Α και Β. Ωστόσο, το μήκος των κλάδων, οι οποίοι διαχωρίζουν τις δύο υπερομάδες μεταξύ τους καθώς και τα επιμέρους στελέχη σε κάθε υπερομάδα, διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων αγκυρίνης (Εικόνες 3.7 & 3.8). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης που έχει το κάθε γονίδιο αν αναλογιστούμε ότι το μήκος κάθε κλάδου αντιπροσωπεύει τον αριθμό των αντικαταστάσεων ανά νουκλεοτιδική θέση. Μεταξύ των στελεχών της υπερομάδας Α, για την οποία υπάρχουν και τα περισσότερα δεδομένα, οι τοπολογικές διαφορές μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων δεν διαφέρουν σε σημαντικό βαθμό και τοποθετούν την πλειονότητα των στελεχών σε μία ομάδα υποδηλώνοντας έναν αργό εξελικτικό ρυθμό. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, τα ομόλογα γονίδια αγκυρίνης των πιο απομακρυσμένων στελεχών *wRi*, *wHa* και *wUni* (σύμφωνα με φυλογενετικές μελέτες βασισμένες στο γονίδιο *wsr* και σε μεθόδους MLST) (Paraskevanopoulos *et al.* 2006; Baldo *et al.* 2006) διακλαδίζονται ξεκάθαρα σε διαφορετικές θέσεις από τα υπόλοιπα στελέχη της υπερομάδας Α (Εικόνα 3.7). Αυτό υποδηλώνει ότι τα ομόλογα γονίδια στα στελέχη αυτά χαρακτηρίζονται από ταχείς εξελικτικούς ρυθμούς.

Δύο ενδιαφέρουσες περιπτώσεις ήταν αυτές των γονιδίων WD0636 και WD0637 τα οποία σχετίζονται με τον προφάγο WO-B. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα γονίδια αγκυρίνης που βρίσκονται σε αυτόν τον προφάγο παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Εικόνα 3.3) σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια αγκυρίνης. Επίσης, το γονίδιο WD0636 εμφανίζεται σε δύο αντίγραφα τόσο στο στέλεχος *wSan* της Α-υπερομάδας όσο και στο στέλεχος *wNo* της Β-υπερομάδας. Η ανακατασκευή των φυλογενετικών σχέσεων για τα δύο γονίδια αγκυρίνης αποκάλυψε ότι οι τοπολογίες των φυλογενετικών τους δέντρων δεν ήταν σύμφωνες με αυτές των χρωμοσωμικών γονιδίων (Εικόνα 3.8). Συγκεκριμένα, οι φυλογένειες με βάση τα γονίδια WD0636 και WD0637 ξεκάθαρα τοποθετούν τα στελέχη της Α-υπερομάδας *wYak*, *wSan* και *wHa* στην ίδια ομάδα με τα στελέχη της Β-υπερομάδας. Επίσης, παρατηρήσαμε ότι τα γονίδια αυτά δεν παρουσίαζαν τοπολογική ασυμφωνία μόνο με τα χρωμοσωμικά γονίδια αγκυρίνης αλλά και με τα γειτονικά προφαγικά γονίδια αγκυρίνης, όπως το γονίδιο WD0633 (Εικόνα 3.8).

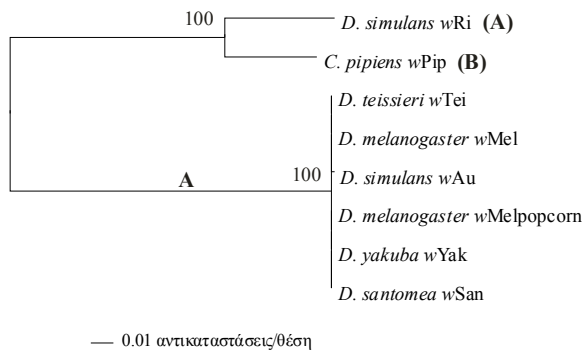
WD0035



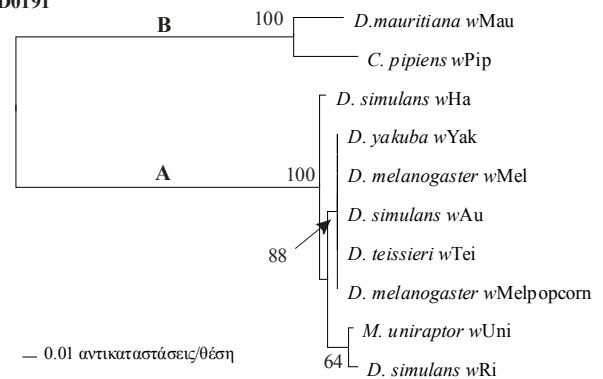
WD0073



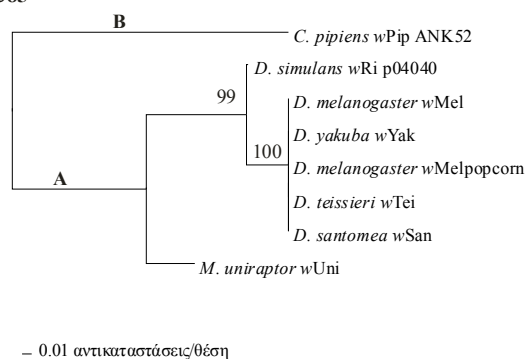
WD0147



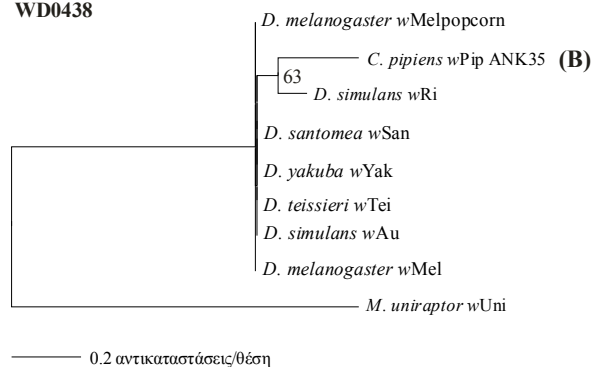
WD0191



WD0385

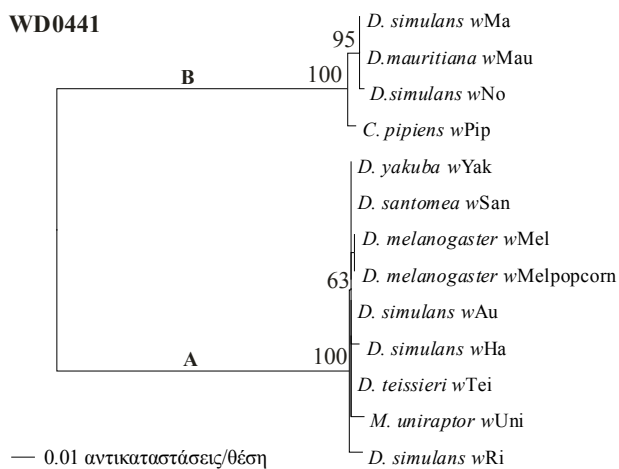


WD0438

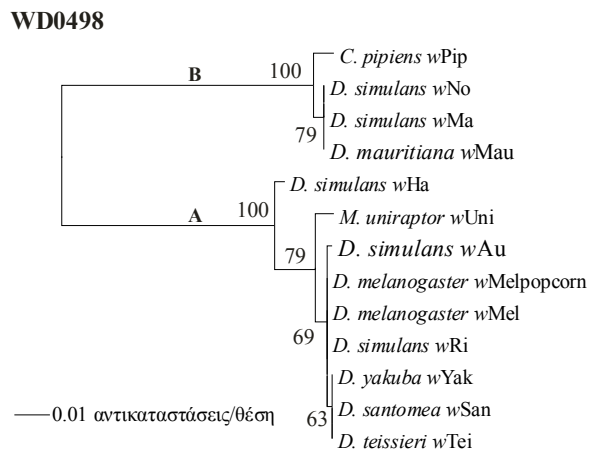


Εικόνα 3.7. Φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών της *Wolbachia* με βάση τα χρωμοσωμικά γονίδια WD0035, WD0073, WD0147, WD0191, WD0385, WD0438, WD0441, WD0498, WD0550, WD0754, WD0766 και WD1213 σύμφωνα με τη μέθοδο ML. Στα φυλογενετικά δέντρα παρουσιάζονται και οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας που προέκυψαν από 100 επαναληπτικές δοκιμές (οι τιμές που ήταν μικρότερες από 50% παραλήφθηκαν).

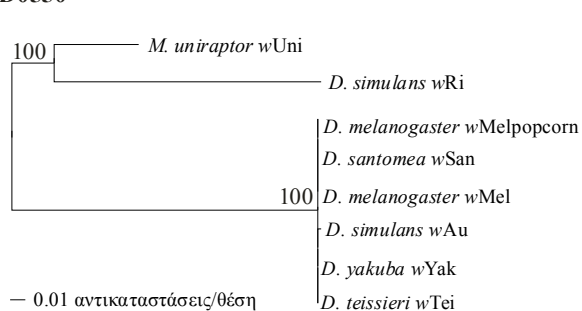
WD0441



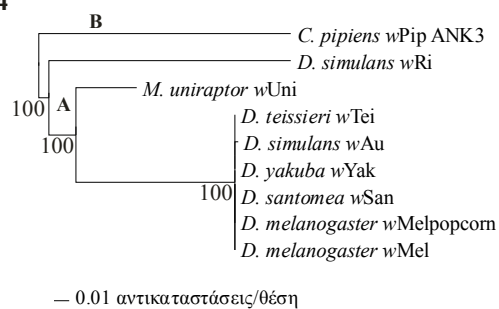
WD0498



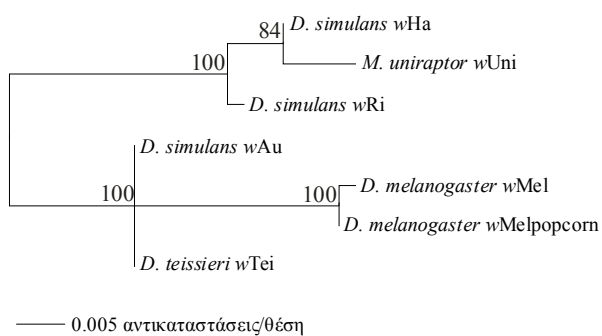
WD0550



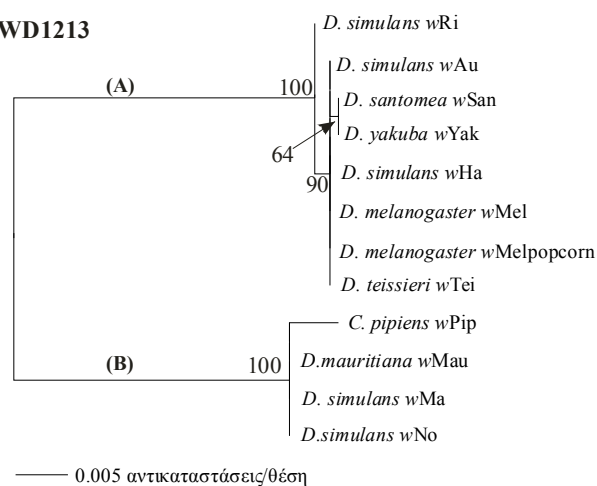
WD0754



WD0766

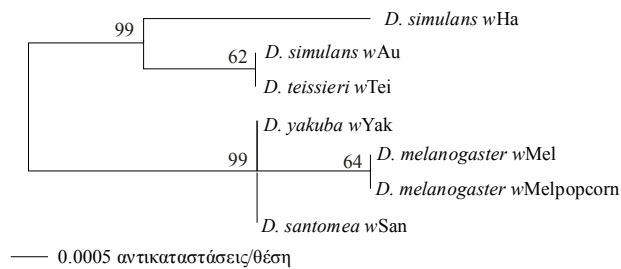


WD1213

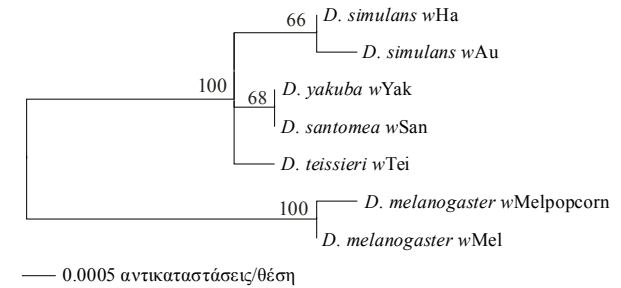


Εικόνα 3.7. Συνέχεια.

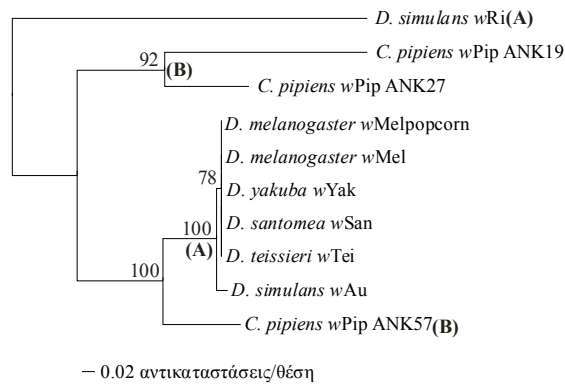
WD0291



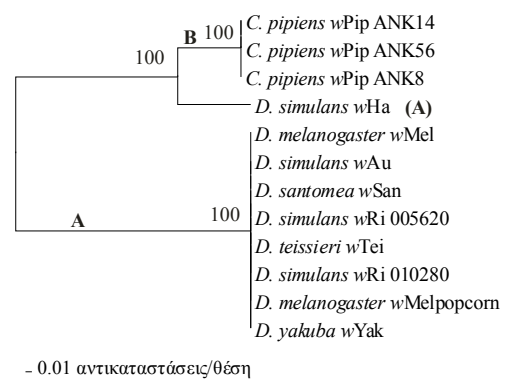
WD0292



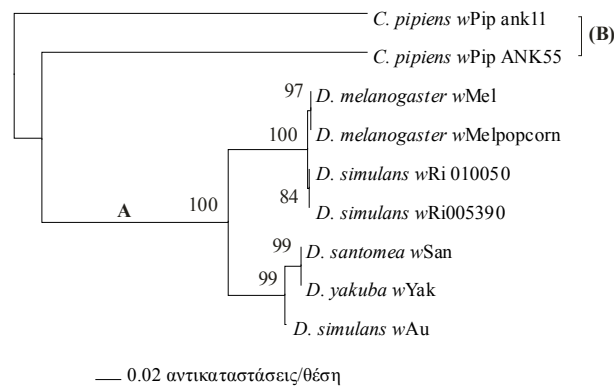
WD0566



WD0596

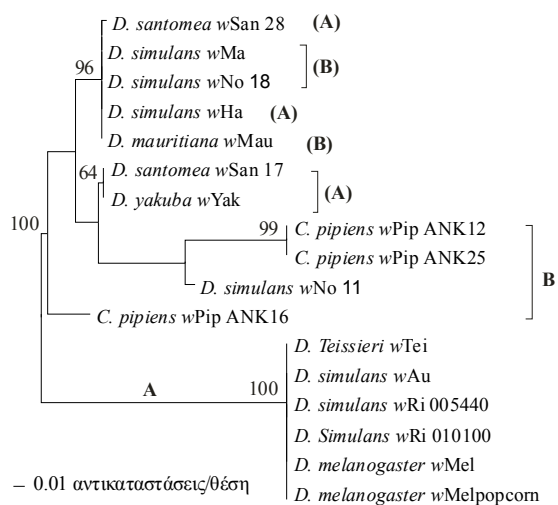


WD0633

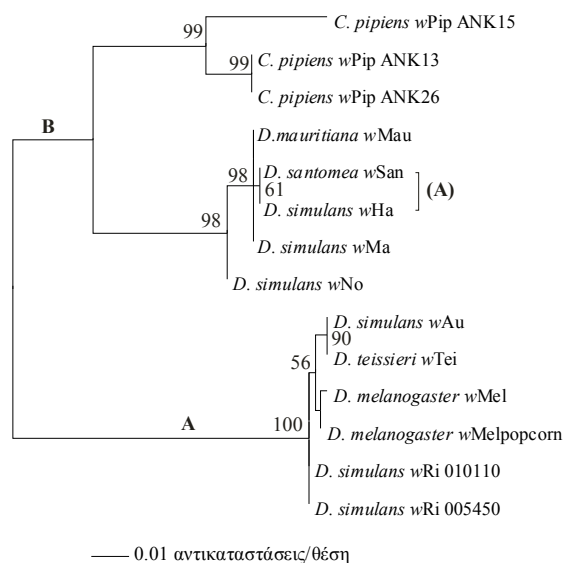


Εικόνα 3.8. Φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών *Wolbachia* με βάση τα προφαγικά γονίδια WD0291, WD0292, WD0566, WD0596, WD0633, WD0636 και WD0637 σύμφωνα με τη μέθοδο ML. Στα φυλογενετικά δέντρα παρουσιάζονται και οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας που προέκυψαν από 100 επαναληπτικές δοκιμές (οι τιμές που ήταν μικρότερες από 50% παραλήφθηκαν).

WD0636



WD0637



Εικόνα 3.8. Συνέχεια.

Για να ελεγχθεί στατιστικά η σημαντικότητα των τοπολογικών διαφορών μεταξύ των φυλογενετικών δένδρων των φαγικών γονιδίων (WD0636 και WD0637) σε σχέση με τα άλλα γονίδια αγκυρίνης χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμή SH (Shimodaira & Hasegawa 1999). Για τη σύγκριση χρησιμοποιήσαμε τα χρωμοσωμικά γονίδια WD0441, WD0498 και WD1213 ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα 8 κοινά στελέχη (wMel, wAu, wTei, wSan, wRi, wHa, wNo και wMau). Χωρίς αμφιβολία, όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.4, οι φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών που προκύπτουν από τα φαγικά γονίδια αγκυρίνης παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με τις τοπολογίες των φυλογενετικών δέντρων που προκύπτουν από τα χρωμοσωμικά γονίδια, και αντίστροφα (SH test $p < 0.001$) υποδηλώνοντας ισχυρή τοπολογική ασυμφωνία των φυλογενειών μεταξύ των προφαγικών γονιδίων και του βακτηριακού χρωμοσώματος.

Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα στατιστικής δοκιμής Shimodaira-Hasegawa για τη σημαντικότητα των τοπολογικών διαφορών μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων που προκύπτουν από τα γονίδια αγκυρίνης του προφάγου WO-B και του χρωμοσώματος της *Wolbachia*.

Τοπολογία	Δεδομένα				
	WD0441	WD0498	WD0636	WD0637	WD1213
WD0441	1228.38	1054.82	497.64***	1599.62***	1196.26
WD0498	1228.56	1046.17	454.18***	1365.17***	1200.87
WD0636	1624.91***	1141.92***	399.14	1118.92	1665.61***
WD0637	1624.91***	1145.01***	409.40	1091.34	1653.28***
WD1213	1228.38	1054.82	497.64***	1565.64***	1188.06

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές της πιθανοφάνειας (likelihood score, -lnL) που προκύπτει για κάθε φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας. Η μικρότερη τιμή (αυτή που προκύπτει από την τοπολογία που εξηγεί καλύτερα τα δεδομένα) φαίνεται με την έντονη γραμματοσειρά. Τα επίπεδα σημαντικότητας βασίστηκαν στη μέθοδο της πλήρους βελτιστοποίησης (full optimization method): *** $p < 0.0001$.

Επίσης ελέγχθηκε η σημαντικότητα των τοπολογικών διαφορών που παρατηρούνται για τα στελέχη *wYak* και *wSan* μεταξύ των φυλογενετικών δένδρων των γονιδίων αγκυρίνης που συσχετίζονται με τον προφάγο WO-B. Για τον σκοπό αυτό, συγκρίθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις που προκύπτουν με τα γονίδια WD0633 και WD0636 χρησιμοποιώντας τα 6 κοινά στελέχη *wMel*, *wPop*, *wAu*, *wSan*, *wRi* και *wPip*. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους καθώς η απόσταση που τα χωρίζει είναι μόνο 2.3kb. Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3.5, οι τοπολογικές διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές (SH test $p < 0.05$).

Πίνακας 3.5. Αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμής Shimodaira-Hasegawa για τη σημαντικότητα των τοπολογικών διαφορών μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων των γονιδίων αγκυρίνης που συσχετίζονται με τον προφάγο WO-B.

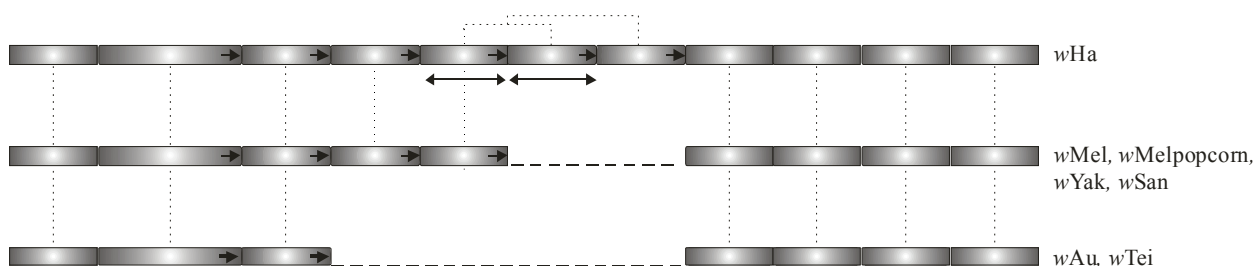
Τοπολογία	Δεδομένα	
	WD0633	WD0636
WD0633	2904.53	419.71**
WD0636	3192.81***	394.14

Στον πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές της πιθανοφάνειας (likelihood score, $-\ln L$) που προκύπτει για κάθε φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο maximum likelihood. Η μικρότερη τιμή (αυτή που προκύπτει από την τοπολογία που εξηγεί καλύτερα τα δεδομένα) φαίνεται με την έντονη γραμματοσειρά. Τα επίπεδα σημαντικότητας βασίστηκαν στη μέθοδο της πλήρους βελτιστοποίησης (full optimization method): ** $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

3.3.3 Πολυμορφισμός σε επίπεδο αριθμού και οργάνωσης των επαναλήψεων αγκυρίνης

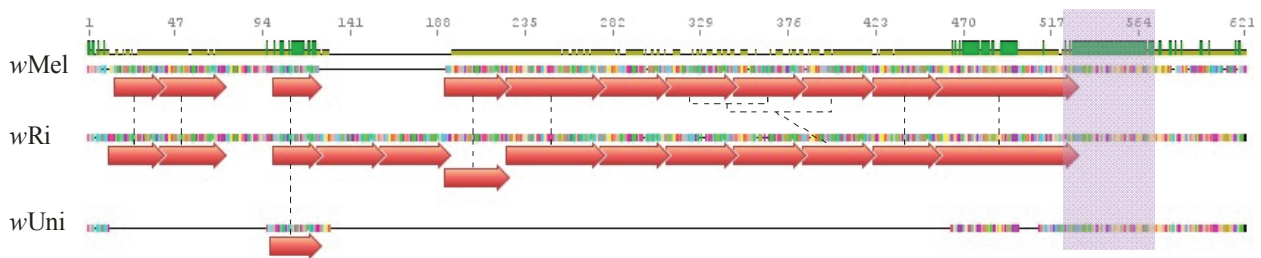
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των γονιδίων αγκυρίνης είναι οι διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων γονιδίων που απαντούν σε διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia*. Το γεγονός αυτό γίνεται ακόμα πιο εμφανές μεταξύ των πολύ συγγενικών στελεχών *wMel*, *wMelporcorn*, *wAu*, *wTei*, *wYak* και *wSan* τα οποία, αν και εμφανίζουν εξαιρετική ομολογία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, διαφέρουν στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης. Όπως θα δούμε αναλυτικά παρακάτω, οι διαφορές αυτές οφείλονται: α) στο διπλασιασμό γειτονικών επαναλήψεων αγκυρίνης, β) στην απομάκρυνση ενός ή περισσότερων επαναλήψεων αγκυρίνης από τα ομόλογα γονίδια ή/και γ) στο ανακάτεμα των δομικών μονάδων (α-έλικες και β-πτυχώσεις) μεταξύ απομακρυσμένων επαναλήψεων αγκυρίνης που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό νέων συνδυασμών. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3, 6 από τα γονίδια που μελετήθηκαν (WD0294, WD0385, WD0438, WD0514, WD0550, WD0766) εμφανίζουν πολυμορφισμό στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης. Η κάθε περίπτωση παρουσιάζεται ξεχωριστά στις επόμενες παραγράφους.

WD0294. Όπως είδαμε και στο δεύτερο κεφάλαιο, το γονίδιο αυτό βρίσκεται πάνω στον προφάγο WO-A και ανιχνεύεται σε όλα τα στελέχη της υπερομάδας A με εξαίρεση το στέλεχος *wRi*. Μεταξύ των στελεχών, η ομοιότητα των ομολόγων είναι εξαιρετικά μεγάλη (πμέση τιμή = 0.00242) σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη έδειξε διαφορές στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών (Εικόνα 3.9). Συγκεκριμένα, τα στελέχη *wAu* και *wTei* περιέχουν δύο επαναλήψεις λιγότερες σε σχέση με τα στελέχη *wMel*, *wMelporcorn*, *wYak* και *wSan* λόγω ελλείμματος της 4^{ης} και της 5^{ης} επανάληψης αγκυρίνης. Σε αντίθεση, το ομόλογο γονίδιο στο στέλεχος *wHa* διαθέτει δύο επιπλέον επαναλήψεις, συνολικά έντεκα (11), σαν αποτέλεσμα του διαδοχικού διπλασιασμού της 5^{ης} επανάληψης αγκυρίνης.



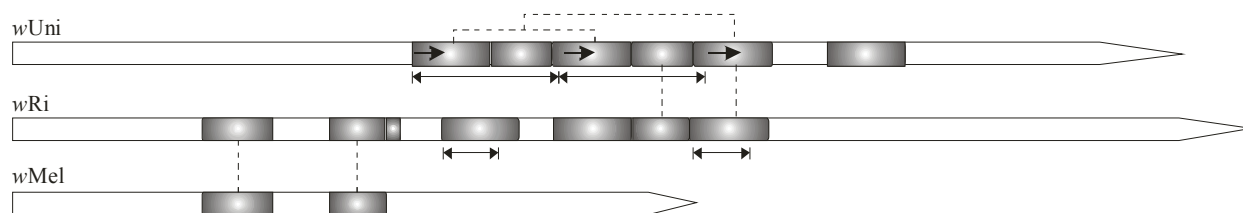
Εικόνα 3.9. Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0294. Για οικονομία χώρου παρουσιάζονται μόνο οι συστοιχίες των επαναλήψεων. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις ενώ με τα βέλη διπλής κατεύθυνσης αναπαρίσταται ένα γεγονός διπλασιασμού.

WD0385. Το χρωμοσωμικό αυτό γονίδιο διαθέτει έντεκα (11) επαναλήψεις αγκυρίνης στο στέλεχος *wMel* που φέρει τον μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων μεταξύ των 23 γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους. Το ομόλογο γονίδιο του WD0385 στο στέλεχος *wRi* διαθέτει δύο επιπλέον επαναλήψεις σε σχέση με το *wMel* (Εικόνα 3.10). Η διαφορά αυτή οφείλεται πιθανόν σε έλλειμμα δύο επαναλήψεων αγκυρίνης στο γονίδιο του στελέχους *wMel*. Τα υπόλοιπα στελέχη, με εξαίρεση το *wAu* το οποίο όπως είδαμε και προηγουμένως περιέχει ένα μεταθέσιμο στοιχείο, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους, ~99% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι το ομόλογο γονίδιο στο στέλεχος *wUni*, που μολύνει το παρασιτοειδές έντομο *Muscidifurax uniraptor*, φέρει μόνο μία επανάληψη αγκυρίνης (Εικόνα 3.10). Τέλος, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το 3' άκρο του γονιδίου, το οποίο περιλαμβάνει τις διαμεμβρανικές περιοχές (transmembrane domains), παρουσιάζει εξαιρετική ομολογία μεταξύ των στελεχών.



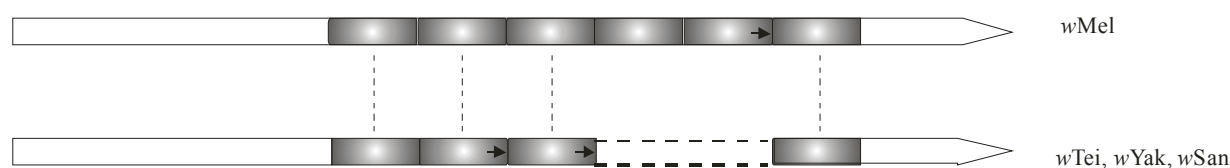
Εικόνα 3.10. Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0385. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης (κόκκινα βέλη). Στο 3' άκρο του γονιδίου διακρίνεται το τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί για τις διαμεμβρανικές περιοχές και το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική ομολογία μεταξύ των στελεχών.

WD0438. Το χρωμοσωμικό αυτό γονίδιο ανιχνεύθηκε σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις που μελετήθηκαν. Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατή η αλληλούχηση των ομολόγων γονιδίων από τα στελέχη της υπερομάδας B, καθώς και στο στέλεχος *wHa*. Μεταξύ των στελεχών που ανήκουν στην ομάδα A, τα στελέχη (*wMel*, *wMelPop*, *wAu*, *wTei*, *wYak*, *wSan*) παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Επίσης διαθέτουν δύο επαναλήψεις αγκυρίνης στο 5' άκρο του γονιδίου. Αντιθέτως, το ομόλογο γονίδιο στο στέλεχος *wRi*, διαθέτει 6-7 επαναλήψεις αγκυρίνης ενώ παρουσιάζει μερική ομολογία στο 5' άκρο των υπολοίπων ομολόγων συμπεριλαμβανομένου των δύο πρώτων επαναλήψεων (Εικόνα 3.11). Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι το μεσαίο τμήμα του γονιδίου παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με το στέλεχος *wUni* (Εικόνα 3.11).



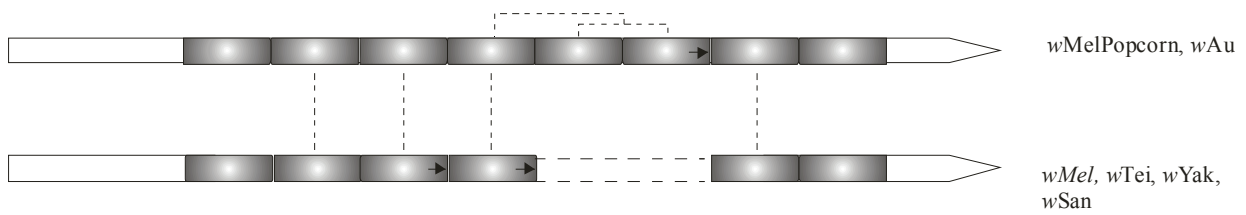
Εικόνα 3.11. Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0438. Με τις στικτές γραμμές αντιστοιχούνται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις σε επίπεδο γονιδίου ενώ με τα βέλη διπλής κατεύθυνσης αναπαρίστανται τα γεγονότα διπλασιασμού.

WD0514. Το γονίδιο αυτό ανιχνεύεται μόνο στα στελέχη της υπερομάδας A εκτός των στελεχών *wAu*, *wRi* και *wHa*. Μεταξύ των ομολόγων, η ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο είναι εξαιρετικά μεγάλη ($\pi_{\text{μεση τιμή}} = 0.00182$). Ωστόσο, τα ομόλογα γονίδια στα στελέχη *wTei*, *wYak* και *wSan* διαθέτουν δύο επαναλήψεις λιγότερες σε σχέση με τα στελέχη *wMel* και *wMelPorcorn* (Εικόνα 3.12). Η διαφορά αυτή φαίνεται ότι προκύπτει από το έλλειμμα των επαναλήψεων 4 και 5 των στελεχών *wMel* και *wMelPor* και όχι λόγω κάποιου διπλασιασμού.

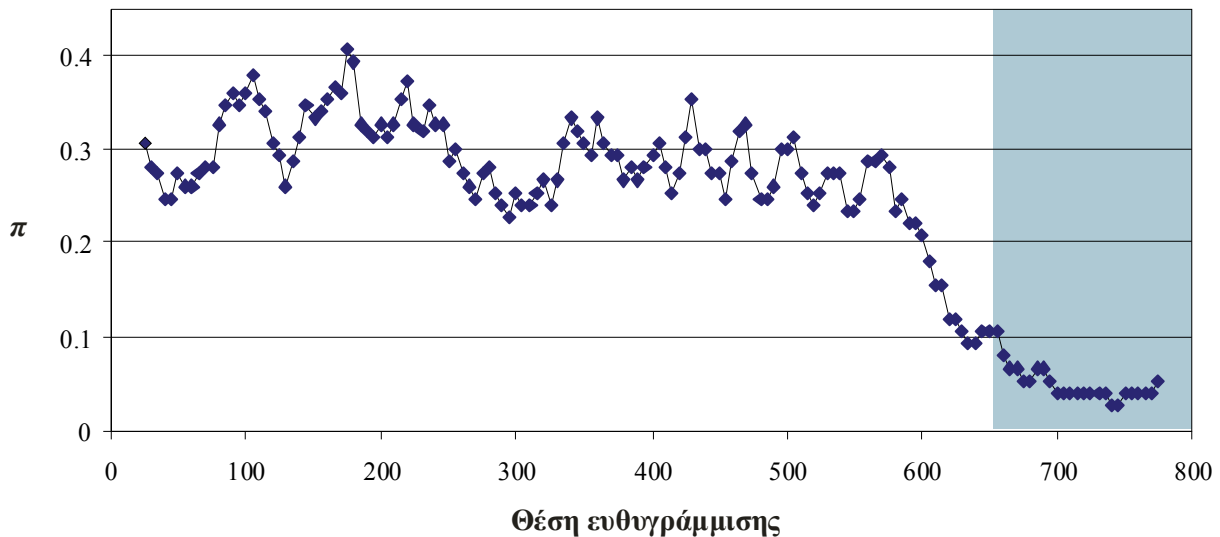


Εικόνα 3.12. Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0514. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις.

WD0550. Το γονίδιο αυτό ανιχνεύεται μόνο στα στελέχη της υπερομάδας A εκτός από το στέλεχος *wHa*. Μεταξύ των στελεχών *wMel*, *wMelPorcorn*, *wAu*, *wTei*, *wYak* και *wSan*, τα ομόλογα γονίδια παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο με μόνο δύο μη συνώνυμες υποκαταστάσεις βάσεων. Ωστόσο, τα στελέχη *wMelPorcorn* και *wAu* είναι μεγαλύτερα κατά δύο επαναλήψεις αγκυρίνης λόγω ενός διαδοχικού διπλασιασμού της 4^{ης} επανάληψης (Εικόνα 3.13). Αντιθέτως, το στέλεχος *wRi*, αν και διαθέτει τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων αγκυρίνης με το στέλεχος *wMel*, παρουσιάζει πολύ μικρή ομολογία (55% ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και 42% σε αμινοξικό επίπεδο). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το 3' άκρο μεταξύ των ομολόγων παρουσιάζει μεγάλη συντήρηση μεταξύ των στελεχών (Εικόνα 3.14). Η περιοχή αυτή κωδικοποιεί για δύο διαμεμβρανικά τμήματα της πρωτεΐνης (transmembrane domains).



Εικόνα 3.13. Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0550. Με τις στικτές γραμμές συνδέονται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαριστούνται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις.



Εικόνα 3.14. Γραφική αναπαράσταση της νουκλεοτιδικής ποικιλομορφίας ανά ζεύγος βάσεων (π), κατά μήκος των ομολόγων του γονιδίου WD0550 στα στελέχη *wMel*, *wRi*, και *wUni*, βάση της μεθόδου του ολισθαίνοντος παραθύρου. Το 3' άκρο του γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για τις διαμεμβρανικές περιοχές, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των στελεχών σε αντίθεση με το τμήμα του γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί για τις επαναλήψεις αγκυρίνης. (Μέγεθος παραθύρου: 50 nt, βήμα: 5nt, από τις στοιχισμένες ακολουθίες τα κενά παραλήφθηκαν).

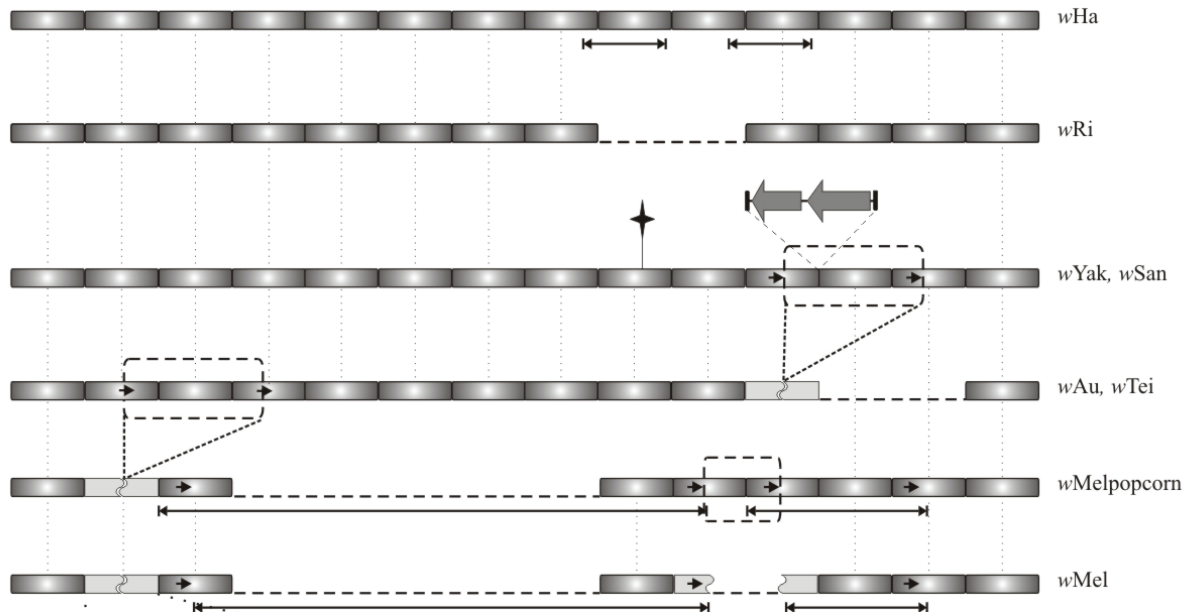
WD0766. Ίσως η πιο περίπλοκη και ενδιαφέρουσα περίπτωση πολυμορφισμού σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης είναι αυτή του γονιδίου WD0766. Το γονίδιο αυτό παρουσιάζει εκτεταμένη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών στελεχών τόσο στον αριθμό όσο και στην οργάνωση των επαναλήψεων αγκυρίνης (Εικόνα 3.15 Α). Όπως προαναφέρθηκε για τα πολύ συγγενικά στελέχη *wYak* και *wSan*, το γονίδιο παρουσιάζει ένθεση ενός μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου και μια μετάλλαξη μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου. Η ανακατασκευή των προγονικών αλληλουχιών για τα δύο στελέχη αποκάλυψε ότι αποτελούνται από 14 επαναλήψεις αγκυρίνης, δύο λιγότερες σε σχέση με το ομόλογο γονίδιο του πολύ συγγενικού στελέχους *wTei* το οποίο είναι 100% όμοιο με αυτό του στελέχους *wAu*. Είναι άξιο προσοχής ότι τόσο το 5' όσο και το 3'

άκρο του γονιδίου, τα οποία περιλαμβάνουν την πρώτη και την τελευταία επανάληψη αγκυρίνης, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ των στελεχών. Ωστόσο, οι εκτεταμένοι διπλασιασμοί και τα ελλείμματα των εσωτερικών επαναλήψεων δημιουργούν πρόβλημα στη σωστή στοίχιση των ομόλογων γονιδίων. Ένα σημαντικό εύρημα το οποίο προέκυψε από την προσεκτική παρατήρηση των στοιχισμένων αλληλουχιών ήταν ότι κάποιες από τις περιπτώσεις ελλειμμάτων εσωτερικών περιοχών των γονιδίων οδήγησαν στο ανακάτεμα των δομικών μονάδων (α-έλικες και β-πτυχώσεις) μεταξύ απομακρυσμένων επαναλήψεων αγκυρίνης.

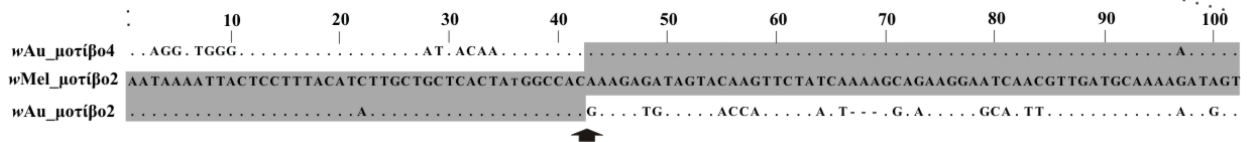
Μια περίπτωση είναι αυτή της προέλευσης της 2^{ης} επανάληψης αγκυρίνης στα ομόλογα γονίδια των στελεχών wMel και wMelporcorn. Όπως προκύπτει από την ανάλυση των στοιχισμένων ομολόγων γονιδίων, η αλληλουχία αυτής της επανάληψης είναι χιμαιρική. Συγκεκριμένα, τα πρώτα 42 νουκλεοτίδια τα οποία κωδικεύουν για την πρώτη α-έλικα (αμινοξέα 1-14) παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της 2^{ης} επανάληψης αγκυρίνης του ομόλογου γονιδίου στα στελέχη wAu, wTei, wYak, wSan, wRi και wHa (διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο). Από την άλλη μεριά, τα εναπομείναντα 57 νουκλεοτίδια τα οποία κωδικεύουν για τη δεύτερη α-έλικα (αμινοξέα 15-33) παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της 4^{ης} επανάληψης αγκυρίνης των ίδιων στελεχών (επίσης, διαφέρουν σε ένα νουκλεοτίδιο) [Εικόνα 3.15 B].

Με έναν παρόμοιο τρόπο φαίνεται να έχει προκύψει και η 11^η επανάληψη αγκυρίνης στα ομόλογα γονίδια των στελεχών wAu και wTei. Από την ανάλυση των στοιχισμένων γονιδίων προκύπτει ότι η επανάληψη αυτή είναι το αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού μεταξύ της 11^{ης} και της 13^{ης} επανάληψης αγκυρίνης των ομολόγων γονιδίων των στελεχών wYak και wSan. Επίσης, τα ομόλογα γονίδια των πολύ συγγενικών στελεχών wMel και wMelporcorn διαφέρουν κατά μια επανάληψη αγκυρίνης ενώ φέρουν και 2 μη-συνώνυμες υποκαταστάσεις. Η διαφορά στον αριθμό των επαναλήψεων αγκυρίνης φαίνεται να έχει προκύψει από ένα έλλειμμα στο στέλεχος wMelporcorn μεταξύ των επαναλήψεων αγκυρίνης 5 και 6 του ομόλογου γονιδίου η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία της 5^{ης} επανάληψης αγκυρίνης στο στέλεχος wMel (Εικόνα 3.15 A). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι και άλλες επαναλήψεις αγκυρίνης έχουν προκύψει από παρόμοια φαινόμενα ανασυνδυασμού τόσο μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0766 όσο και άλλων γονιδίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο εκτεταμένος ή ο πολύ περιορισμένος πολυμορφισμός που παρατηρείται μεταξύ των επαναλήψεων μπορεί να κρύψει αυτά τα φαινόμενα.

A



B



Εικόνα 3.15. Α) Πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων (μοτίβων) αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων του γονιδίου WD0766. Για οικονομία χώρου παρουσιάζονται μόνο οι συστοιχίες των επαναλήψεων. Επίσης παρουσιάζεται και η ανακατασκευασμένη ακολουθία των στελεχών wYak και wSan. Με τις στικτές γραμμές αντιστοιχούνται οι ομόλογες επαναλήψεις αγκυρίνης. Με τα μικρά βέλη αναπαρίστανται οι πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις σε επίπεδο γονιδίου ενώ με τα βέλη διπλής κατεύθυνσης αναπαρίστανται τα γεγονότα διπλασιασμού. **Β)** Νουκλεοτιδικές ομοιότητες και διαφορές της δεύτερης επανάληψης αγκυρίνης στο στέλεχος wMel που αποδεικνύει την χιμαιρική του προέλευση. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση του βρόγχου μεταξύ των δύο α-ελίκων στη δομή της επανάληψης αγκυρίνης.

3.3.4 Ανίχνευση φαινομένων ανασυνδυασμού στα γονίδια αγκυρίνης

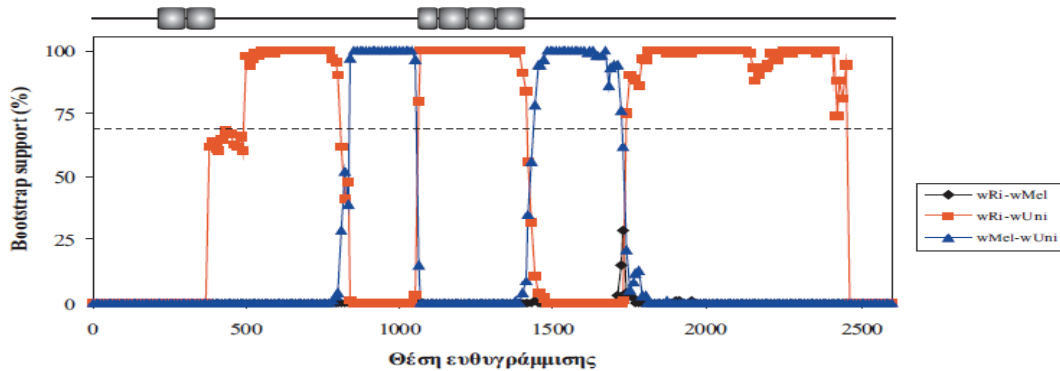
Ο ομόλογος ανασυνδυασμός αποτελεί έναν πανίσχυρο μηχανισμό διαμόρφωσης και επιτάχυνσης της γονιδιακής εξέλιξης τόσο στους προκαρυωτικούς όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Σε αντίθεση με τα περισσότερα ενδοκυττάρια βακτήρια, η *Wolbachia* παρουσιάζει ευρέως διαδεδομένα φαινόμενα ανασυνδυασμού. Για παράδειγμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη του βακτηρίου (*wsp*) εμφανίζει εκτεταμένα φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia* (Werren and Bartos 2001; Reuter and Keller 2003; Keller *et al.* 2004; Malloch and Fenton 2005; Baldo *et al.* 2005). Επίσης, φαινόμενα ανασυνδυασμού έχουν εντοπιστεί και σε άλλα γονίδια της *Wolbachia* όπως: (α) σε γονίδια βασικών λειτουργιών (Jiggings *et al.* 2001; Jiggins 2002; Baldo *et al.* 2006; Klasson *et al.* 2009), (β) σε γονίδια τα οποία απαντούν στους προφάγους (Bordenstein and Wernegreen 2004), (γ) σε γονίδια τα οποία συνθέτουν τις υπομονάδες του εκκριτικού συστήματος τύπου IV (Klasson *et al.* 2009), (δ) σε μεταθέσιμα στοιχεία (Duron *et al.* 2005), (ε) στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής (Ioannidis *et al.* 2007) καθώς και στο 16S rDNA (Ros *et al.* 2009).

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε ο ρόλος που διαδραματίζει ο γενετικός ανασυνδυασμός στην εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης. Η αναζήτηση φαινομένων ανασυνδυασμού πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MaxChi το οποίο εμπεριέχεται στο πακέτο RDP3b27. Η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών ενδείξεων ανασυνδυασμού επιβεβαιώθηκε και με τα προγράμματα Chimera, Geneconv, RDP και Bootscan. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3, πέντε (5) γονίδια αγκυρίνης παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά στοιχεία ενδογονιδιακού ανασυνδυασμού (MaxChi, $P < 0.001$ με βάση 1,000 αντιμεταθέσεις): τα χρωμοσωμικά γονίδια WD0073, WD0438, WD0550, WD0766 καθώς και το προφαγικό γονίδιο WD0633. Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφεται η κάθε περίπτωση ξεχωριστά.

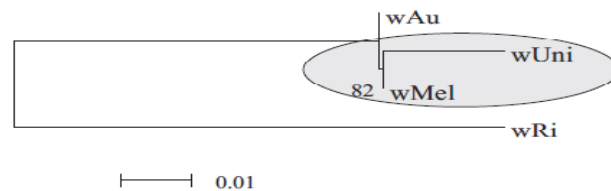
WD0073: Στην περίπτωση του γονιδίου αυτού, δύο στατιστικά σημαντικά γεγονότα γενετικού ανασυνδυασμού ανιχνεύθηκαν και με τα πέντε προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ($P < 0.001$ με βάση 1,000 αντιμεταθέσεις). Τα εμπλεκόμενα στελέχη της *Wolbachia* είναι αφενός το wUni το οποίο έχει και τη φερόμενη ως ανασυνδυασμένη (χιμαιρική) νουκλεοτιδική ακολουθία και αφετέρου τα στελέχη wRi και wMel-wAu τα οποία και πιθανά αποτελούν τα γονικά στελέχη (parental strains). Η πρώτη περιοχή που λαμβάνει μέρος στο γενετικό ανασυνδυασμό βρίσκεται μεταξύ των θέσεων 780 και 1080 των στοιχισμένων ακολουθιών ενώ η δεύτερη περιοχή βρίσκεται μεταξύ των θέσεων 1425 και 1790. Και οι δύο περιοχές βρίσκονται έξω από τις συστοιχίες των επαναλήψεων αγκυρίνης που έχουν ανιχνευθεί ελέγχοντας στη βάση δεδομένων Pfam τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές ακολουθίες. Όπως παρατηρούμε και στην Εικόνα 3.16 A, με βάση τον έλεγχο αξιοπιστίας με τη μέθοδο των επαναληπτικών δοκιμών (Bootscan

method), στις δύο ανασυνδυασμένες περιοχές του γονιδίου το στέλεχος wUni ομαδοποιείται με τα στελέχη wMel και wAu ενώ αντιθέτως, εκτός των περιοχών αυτών, το wUni ομαδοποιείται ξεκάθαρα με το στέλεχος wRi. Η ανεξάρτητη ανακατασκευή των φυλογενετικών σχέσεων των εμπλεκόμενων στελεχών με βάση τα ανασυνδυασμένα (Εικόνα 3.16.B) και μη (Εικόνα 3.16.Γ) τμήματα του γονιδίου επίσης ενισχύουν τη σημαντικότητα των γεγονότων γενετικού ανασυνδυασμού που ανιχνεύθηκαν. Τα δύο αυτά γεγονότα πιθανά αποτελούν είτε δύο ανεξάρτητα περιστατικά είτε ένα μοναδικό περιστατικό το οποίο περιλάμβανε την ανταλλαγή των δύο γονιδιακών τμημάτων.

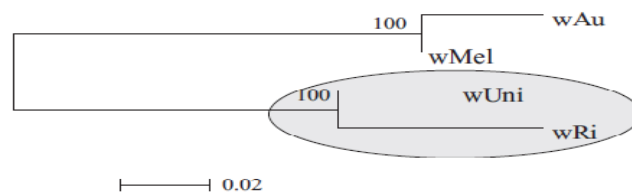
A)



B)



Γ)

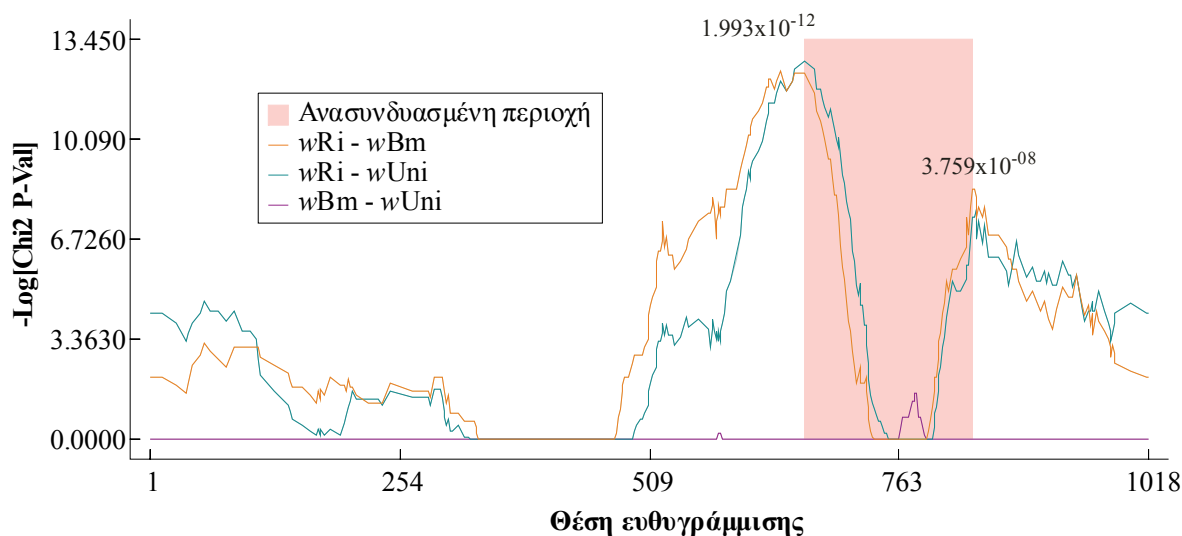


Εικόνα 3.16. Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο WD0073. **A)** Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας με τη μέθοδο bootstrap (1000 επαναλήψεις) οι οποίες υπολογίστηκαν για ένα μετακινούμενο παράθυρο 200 bp με βήμα 10 bp κατά μήκος των στοιχισμένων ακολουθιών των ομολόγων γονιδίων. Για κάθε παράθυρο, οι γενετικές αποστάσεις και οι φυλογενετικές σχέσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Neighbor joining. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται το όριο αξιοπιστίας 70% ενώ η εικόνα πάνω από το διάγραμμα δείχνει τη θέση των επαναλήψεων αγκρίνης. **B, Γ)** Φυλογενετικές σχέσεις των εμπλεκόμενων στελεχών που προκύπτουν με βάση το ανασυνδυασμένο τμήμα (B) και με βάση το υπόλοιπο τμήμα του γονιδίου (Γ) όπου φαίνεται ξεκάθαρα η αλλαγή της ομαδοποίησης του στελέχους (wUni) που φέρει την ανασυνδυασμένη ακολουθία.

WD0438: Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος MaxChi ανιχνεύθηκαν τρεις πιθανές περιπτώσεις γενετικού ανασυνδυασμού (Πίνακας 3.6). Οι δύο από αυτές τις περιπτώσεις, οι οποίες στατιστικά ήταν και οι σημαντικότερες, αφορούσαν την ακολουθία του στελέχους wRi ενώ η τρίτη ανιχνεύθηκε στο στέλεχος wMel. Στην Εικόνα 3.17 βλέπουμε τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου MaxChi για την πρώτη περίπτωση γενετικού ανασυνδυασμού ($P = 5.03 \times 10^{-13}$) στην ακολουθία του στελέχους wRi. Συγκεκριμένα, το πρόγραμμα εντόπισε δύο σημεία διακοπής (breakpoints) στις θέσεις 666 και 838 αντίστοιχα της νουκλεοτιδικής ευθυγράμμισης. Εντός της περιοχής αυτής, η ακολουθία του wRi παρουσιάζει ομολογία με το στέλεχος wBm ενώ εκτός αυτής, η νουκλεοτιδική ομολογία είναι μεγαλύτερη με το στέλεχος wUni. Στη δεύτερη περίπτωση ανασυνδυασμού που ανιχνεύθηκε στο στέλεχος wRi ($P = 5.56 \times 10^{-05}$) τα πιθανά γονικά στελέχη φαίνεται να είναι τα wUni και wMel. Στην τελευταία περίπτωση, αν και η σημαντικότητα του γεγονότος ήταν μικρότερη ($P = 1.36 \times 10^{-03}$), η ακολουθία του στελέχους wMel φαίνεται να έχει προκύψει από τον ανασυνδυασμό των στελεχών wRi και wBm.

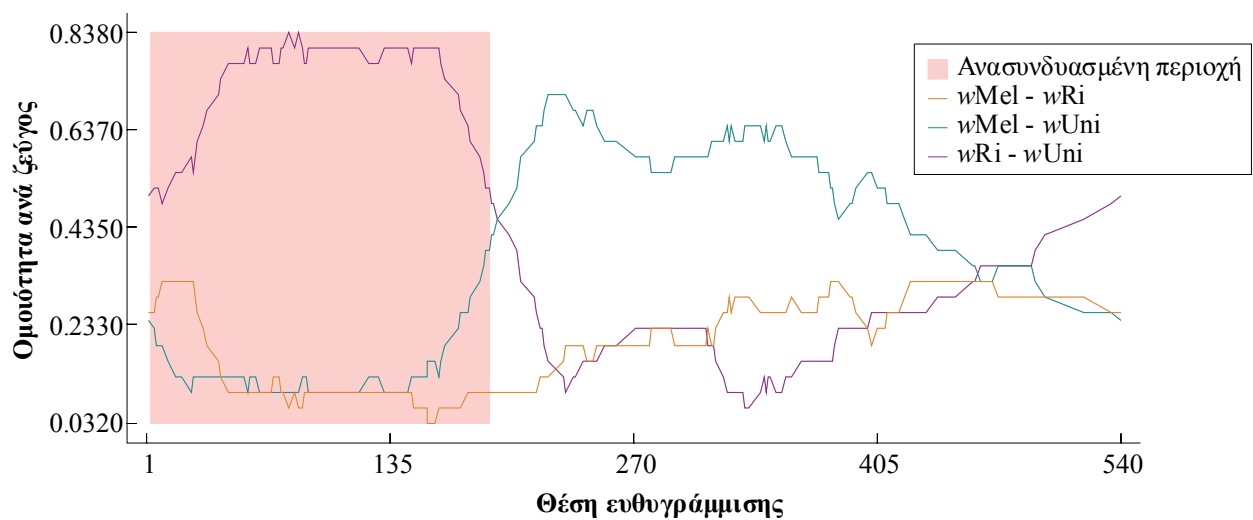
Πίνακας 3.6. Πιθανά γεγονότα γενετικού ανασυνδυασμού στο γονίδιο WD0438.

Γεγονός	Θυγατρική ακολουθία	Πατρική ακολουθία 1	Πατρική ακολουθία 2	Περιοχή ανασυνδυασμού	MaxChi P
1	wRi	wUni	wBm	666 - 838	5.03×10^{-13}
2	wRi	wUni	wMel	2 - 346	5.56×10^{-05}
3	wMel	wRi	wBm	357 - 406	1.36×10^{-03}



Εικόνα 3.17. Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο WD0438. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του προγράμματος MaxChi για την πρώτη και σημαντικότερη περίπτωση γενετικού ανασυνδυασμού στην ακολουθία του στελέχους wRi όπου φαίνονται καθαρά τα δύο στατιστικά σημαντικά σημεία διακοπής (break points) που οριοθετούν το ανασυνδυασμένο τμήμα της ακολουθίας.

WD0550: Στην περίπτωση του χρωμοσωμικού γονιδίου WD0550, τα πέντε προγράμματα ανίχνευσαν ένα πιθανό φαινόμενο γενετικού ανασυνδυασμού μεταξύ των θέσεων ευθυγράμμισης 1-190 (MaxChi, $P = 1.29 \times 10^{-11}$). Τα πιθανά εμπλεκόμενα στελέχη είναι τα wUni, wMel και wRi ενώ το σημείο διακοπής των στοιχισμένων ακολουθιών αντιστοιχεί στην αρχή της 4^{ης} επανάληψης αγκυρίνης του στελέχους wMel. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.18 όπου απεικονίζεται διαγραμματικά η ομοιότητα ανά ζεύγη των εμπλεκόμενων στελεχών με βάση την προσέγγιση ολισθαινόντων παραθύρων, η ακολουθία του στελέχους wUni (θυγατρική ακολουθία) φαίνεται να έχει προκύψει από τον ανασυνδυασμό των ακολουθιών των στελεχών wMel και wRi (πατρικά στελέχη).

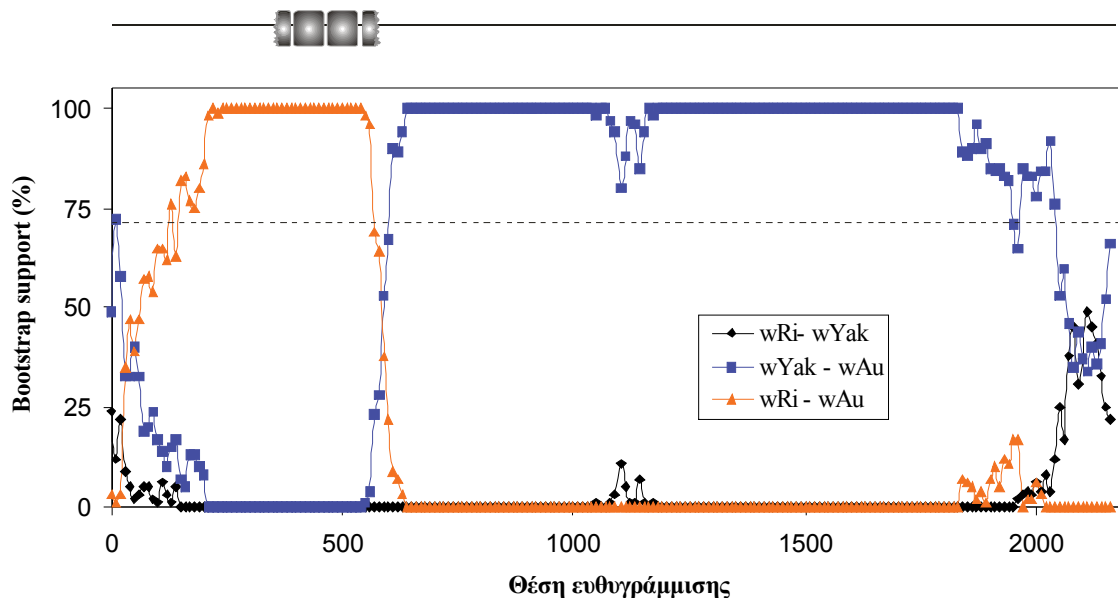


Εικόνα 3.18. Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο WD0550. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του προγράμματος RPD και παρουσιάζουν την ομοιότητα ανά ζεύγος η οποία υπολογίστηκε για ένα μετακινούμενο παράθυρο 30 bp κατά μήκος των ευθυγραμμισμένων ακολουθιών που εμπλέκονται στο φαινόμενο.

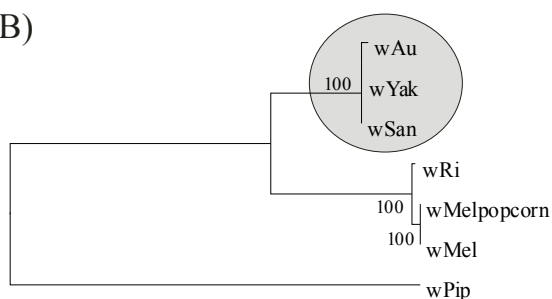
WD0633: Το γονίδιο WD0633 ανήκει στον προφάγο WO-B του στελέχους wMel. Στην περίπτωση αυτή, το πρόγραμμα MaxChi ανίχνευσε την παρουσία ενός στατιστικά σημαντικού γεγονότος γενετικού ανασυνδυασμού το οποίο επιβεβαιώθηκε και από τα υπόλοιπα προγράμματα ($P < 0.001$ με βάση 1,000 αντιμεταθέσεις). Το ρήγμα (breakpoint) εντοπίζεται γύρω από τη θέση 620 των ευθυγραμμισμένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών και χωρίζει τις στοιχισμένες ακολουθίες σε δύο τμήματα εκ των οποίων το πρώτο περιλαμβάνει την συστοιχία των επαναλήψεων αγκυρίνης (Εικόνα 3.19.A). Συγκεκριμένα, πριν το ρήγμα, η νουκλεοτιδική ακολουθία του στελέχους wAu (ανασυνδυασμένη-χμιαϊκή ακολουθία) παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με τα στελέχη wRi και wMel ενώ μετά το σημείο αυτό, η ομολογία του στελέχους είναι μεγαλύτερη με τα στελέχη wYak και wSan όπως παρατηρούμε και από τις τιμές αξιοπιστίας με την μέθοδο των επαναληπτικών δοκιμών (Bootscan method). Επίσης, η ανακατασκευή των φυλογενετικών σχέσεων των εμπλεκόμενων στελεχών, ανεξάρτητα για τα δύο γονιδιακά τμήματα, ενισχύει τη ση-

μαντικότητα του γεγονότος δείχνοντας ξεκάθαρα το 5' άκρο του γονιδίου του στέλεχος *wAu* να ομαδοποιείται με το στέλεχος *wRi* ενώ το 3' άκρο του να ομαδοποιείται με τα στελέχη *wYak* και *wSan* (Εικόνα 3.19 Β&Γ).

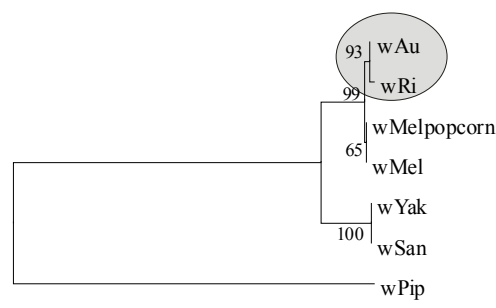
A)



B)



Γ)

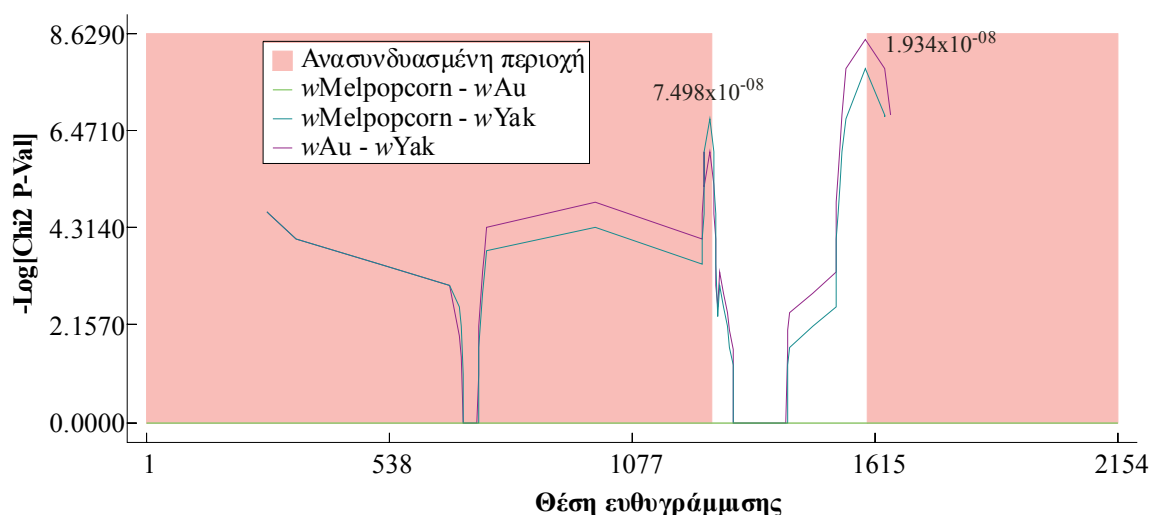


Εικόνα 3.19. Ανασυνδυασμός στο φαγικό γονίδιο WD0633. **A)** Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές ελέγχου αξιοπιστίας με τη μέθοδο bootstrap (1000 επαναλήψεις) οι οποίες υπολογίστηκαν για ένα ολισθαίνον παράθυρο 200 bp με βήμα 10 bp κατά μήκος των στοιχισμένων ακολουθιών των ομολόγων γονιδίων. Για κάθε παράθυρο, οι γενετικές αποστάσεις και οι φυλογενετικές σχέσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Neighbor joining. Με τη διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται το όριο αξιοπιστίας 70% ενώ η εικόνα πάνω από το διάγραμμα δείχνει τη θέση των επαναλήψεων ακιρίνης. **B, Γ)** Φυλογενετικές σχέσεις των εμπλεκόμενων στελεχών που προκύπτουν από την περιοχή πριν (B) και μετά το ρήγμα (Γ) όπου φαίνεται ξεκάθαρα η αλλαγή της ομαδοποίησης του στελέχους (*wAu*) που φέρει την ανασυνδυασμένη ακολουθία.

WD0766: Όπως είδαμε και προηγουμένως, το γονίδιο αυτό παρουσιάζει εκτεταμένη ποικιλογένεση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών τόσο στον αριθμό όσο και στην οργάνωση των επαναλήψεων αγκυρίνης που εν μέρει μπορεί να αποδοθεί σε φαινόμενα παράτυπου (αντικανονικού) ανασυνδυασμού (illegitimate recombination). Επιπλέον, τα ομόλογα γονίδια των στελεχών *wYak* και *wSan* έχουν γίνει στόχος της ένθεσης ενός μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου. Η αναζήτηση ενδείξεων φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού αποκάλυψε επίσης την ύπαρξη δύο στατιστικά σημαντικών γεγονότων όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.7. Στην πρώτη περίπτωση, τα πέντε προγράμματα ανίχνευσης γενετικού ανασυνδυασμού ανίχνευσαν δύο σημεία διακοπής στις ανακατασκευασμένες προγονικές ακολουθίες των στελεχών *wYak* και *wSan* (Εικόνα 3.20). Εκτός της περιοχής που οριοθετούσαν τα σημεία αυτά, οι ακολουθίες των δύο στελεχών (θυγατρικά στελέχη) εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομολογία με τα στελέχη *wAu* και *wTei* (τα οποία είναι 100% όμοια μεταξύ τους) ενώ εντός της περιοχής, η ομολογία είναι μεγαλύτερη με τις ακολουθίες των στελεχών *wMel* και *wMelpopcorn*. Στο δεύτερο γεγονός που ανιχνεύτηκε, η πιθανή θυγατρική αλληλουχία είναι αυτή του στελέχους *wHa* ενώ σαν πατρικές αναγνωρίζονται οι ακολουθίες των στελεχών *wMel* και *wYak-wSan*.

Πίνακας 3.7. Πιθανά γεγονότα γενετικού ανασυνδυασμού στο γονίδιο WD0766.

Γεγονός	Θυγατρική ακολουθία	Πατρική ακολουθία 1	Πατρική ακολουθία 2	Περιοχή ανασυνδυασμού	MaxChi P
1	<i>wYak</i> , <i>wSan</i>	<i>wAu</i> , <i>wTei</i>	<i>wMel</i> , <i>wMelpop</i>	1599 - 1252	7.50×10^{-08}
2	<i>wHa</i>	<i>wMel</i> ,	<i>wYak</i> , <i>wSan</i>	1036 - 1117	1.67×10^{-03}



Εικόνα 3.20. Ανασυνδυασμός στο χρωμοσωμικό γονίδιο WD0766. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα του προγράμματος MaxChi για την πρώτη και σημαντικότερη περίπτωση γενετικού ανασυνδυασμού στις ακολουθίες των στελεχών *wYak* και *wSan* όπου φαίνονται καθαρά τα δύο στατιστικά σημαντικά σημεία ρηγμάτων (breakpoints).

3.3.5 Αστάθεια επαναλαμβανόμενων γειτονικών αλληλουχιών DNA και πολυμορφισμός σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης

Η προσεκτική παρατήρηση των στοιχισμένων αλληλουχιών, που εμφάνιζαν πολυμορφισμό σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης, αποκάλυψε ότι σε κάθε περίπτωση οι περιοχές αυτές, που οριζοθετούσαν τα τμήματα εκείνα του γονιδίου που είχαν υποστεί διπλασιασμό ή έλλειμμα, αποτελούνταν από πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις κοινής κατεύθυνσης (π.χ. Εικόνες 3.9 και 3.15 Α). Οι νουκλεοτιδικές επαναλήψεις αυτού του είδους είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στις διεργασίες διπλασιασμών ή ελλειμμάτων γενετικού υλικού τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο μηχανισμός αυτός είναι γνωστός με τον όρο παράτυπος-μη ομόλογος ανασυνδυασμός (illegitimate recombination) και χαρακτηρίζει όλα εκείνα τα γεγονότα ανασυνδυασμού τα οποία είναι ανεξάρτητα της δράσης της πρωτεΐνης RecA (Bzymek & Lovett 2001; Rocha 2003). Ο παράτυπος-μη ομόλογος ανασυνδυασμός είναι γνωστό ότι πραγματοποιείται μέσω τουλάχιστον δύο διαφορετικών μηχανισμών: α) της ολίσθησης του εκμαγείου DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γονιδιώματος (replication slippage) και β) single-strand annealing. Για να εξεταστεί στατιστικά η παραπάνω υπόθεση υπολογίστηκε για κάθε ομόλογο γονίδιο αγκυρίνης, η πυκνότητα των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων κοινής κατεύθυνσης (DR) που είναι μεγαλύτερες από 8 νουκλεοτίδια ανά kb (αριθμός DR / kb). Στη συνέχεια, ελέγχθηκε εάν τα γονίδια τα οποία εμφανίζουν πολυμορφισμό σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης εμφάνιζαν και μεγαλύτερη πυκνότητα DR (Πίνακας 3.8). Πράγματι, τα γονίδια αυτά περιείχαν σημαντικά πολύ περισσότερες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις κοινής κατεύθυνσης σε σχέση με τα γονίδια τα οποία δεν παρουσίαζαν πολυμορφισμό σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης (μέσος όρος 15.9 και 1.9 DR / kb αντίστοιχα, $P < 0.005$, Mann-Whitney test). Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών είναι ιδιαίτερα πιθανό ότι οι νουκλεοτιδικές επαναλήψεις κοινής κατεύθυνσης που εντοπίζονται στα γονίδια αγκυρίνης να εμπλέκονται σε φαινόμενα παράτυπου ανασυνδυασμού προκαλώντας διπλασιασμούς και ελλείματα επαναλήψεων αγκυρίνης.

Γονίδιο αγκρίνης	DRs
WD0035	0
WD0073	6.66
WD0147	2.99
WD0191	0
WD0285	0
WD0286	0
WD0291	1.49
WD0292	1.51
WD0294	19.35
WD0385	17.9
WD0438	2.82
WD0441	0.56
WD0498	0.62
WD0514	7.92
WD0550	14.40
WD0566	0
WD0596	1.52
WD0633	0.22
WD0636	0.81
WD0637	3.02
WD0754	1.12
WD0766	33.16
WD1213	4.45

Πίνακας 3.8. Πυκνότητα των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων κοινής κατεύθυνσης (DRs) που είναι μεγαλύτερες από 8 νουκλεοτίδια κατά μήκος των γονιδίων αγκρίνης. Με τη σκιαγράφηση παρουσιάζονται τα γονίδια αγκρίνης τα οποία εμφανίζουν πολυμορφισμό σε επίπεδο αριθμού επαναλήψεων αγκρίνης.

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αποκωδικοποίηση του πρώτου γονιδιώματος της *Wolbachia* ανέδειξε έναν εκπληκτικά μεγάλο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης προσελκύοντας το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τον πιθανό ρόλο τους στις αλληλεπιδράσεις βακτηρίου και ξενιστή. Οι επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης, αποτελούν γνώρισμα των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών και πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν και: (α) φέρουν εις πέρας τις πολυάριθμες και πολύπλοκες λειτουργίες των ευκαρυωτικών κυττάρων και (β) επιτρέπουν την ταχεία προσαρμογή των ευκαρυωτικών οργανισμών σε διάφορες μεταβολές του περιβάλλοντος (Marcotte *et al.* 1998; Kobe and Kajava 2000; Mosavi *et al.* 2004). Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* αποτελούν μια γρήγορα εξελισσόμενη οικογένεια γονιδίων. Επίσης, παρέχουν μια πληθώρα στοιχείων όσον αφορά τους μηχανισμούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξή τους. Μάλιστα, τα φαινόμενα παράτυπου (αντικανονικού) και ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού, καθώς και η ιδιαίτερη γονιδιακή “ρευστότητα” που παρέχεται από τα προφαγικά και τα μεταθέσιμα γενετικά στοιχεία, έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γενετικής ποικιλότητας των γονιδίων αυτών.

3.4.1 Γενετική ποικιλότητα

Η αλληλούχηση των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης από τα διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* αποκάλυψε σημαντικά στοιχεία για τη γενετική τους ποικιλότητα. Από την μελέτη της επί της εκατό (%) περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (% GC content) προκύπτει ότι: (α) δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των προφαγικών και των χρωμοσωμικών γονιδίων αγκυρίνης ενώ (β) η περιεκτικότητα αυτή είναι ανάλογη της συνολικής περιεκτικότητας σε GC του γονιδιώματος της *Wolbachia*. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι τα γονίδια αγκυρίνης συνυπάρχουν με το γονιδίωμα της *Wolbachia* για μεγάλο χρονικό διάστημα και δεν έχουν προέλθει από μια σχετικά πρόσφατη οριζόντια μεταφορά. Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης στα διάφορα στελέχη. Η ποικιλομορφία αυτή διακρίνεται σε τρία επίπεδα: (α) την ποικιλομορφία σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, (β) την ποικιλομορφία που παρατηρείται στον αριθμό και την οργάνωση των επαναλήψεων αγκυρίνης και (γ) σε γεγονότα που έχουν ως αποτέλεσμα τον εκφυλισμό των γονιδίων.

Η μέση νουκλεοτιδική ποικιλομορφία ανά ζεύγος βάσεων παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση με πάνω από 200 τάξεις μεγέθους (200-fold) διαφορά μεταξύ των 23 γονιδίων αγκυρίνης. Η μικρότερη νουκλεοτιδική ποικιλότητα παρατηρήθηκε μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης του προφάγου WO-A ενώ η μεγαλύτερη μεταξύ των ομολόγων του προφάγου WO-B. Οι διαφορές στα επίπεδα της ποικιλότητας μεταξύ των δύο προφάγων αντικατοπτρίζονται και στον

αριθμό των αλληλομόρφων των γονιδίων τους. Η ετερογένεια αυτή υποδηλώνει ξεχωριστές εξελικτικές πορείες μεταξύ των δύο προφαγικών στοιχείων. Μια υπόθεση είναι ότι τα γονίδια αγκυρίνης του προφάγου WO-A αποτελούν σχετικά πρόσφατη ενσωμάτωση σε σχέση με τα γονίδια του προφάγου WO-B. Αντιθέτως, η μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταξύ των ομολόγων αγκυρινών του προφάγου WO-B πιθανόν να σχετίζεται με την ύπαρξη φαινομένων οριζόντιας μεταφοράς και ανασυνδυασμού. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται μάλιστα από το γεγονός ότι δεν παρατηρείται φυλογενετική συμφωνία μεταξύ των χρωμοσωμικών γονιδίων και των γονιδίων αγκυρίνης του προφάγου WO-B. Επίσης, η ανίχνευση πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου WD0636 στα στελέχη *wSan* και *wNo*, πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη πολλαπλών προφαγικών στοιχείων του ίδιου τύπου. Είναι επίσης πιθανόν, το γεγονός αυτό να οφείλεται σε φαινόμενα οριζόντιας μεταφοράς. Όσον αφορά τα υπόλοιπα χρωμοσωμικά γονίδια, οι φυλογενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν φαινόμενα μεγαλύτερης φυλογενετικής σύγκλισης. Επιπλέον, μεταξύ των στελεχών της υπερομάδας A, τα στελέχη *wRi* και *wHa* παρουσιάζουν τους γρηγορότερους εξελικτικούς ρυθμούς. Τα υπόλοιπα στελέχη (*wMel*, *wMelPopcorn*, *wAu*, *wTei*, *wYak* και *wSan*) εμφανίζουν μικρότερες γενετικές αποστάσεις, γεγονός που αντικατοπτρίζει και τη μεγαλύτερη συγγένεια τους. Μάλιστα, οι φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών βάσει των χρωμοσωμικών γονιδίων αγκυρίνης, είναι παρόμοια με την MLST φυλογένεια (Paraskevoopoulos *et al.* 2006) υποδηλώνοντας τη μακρόχρονη παρουσία των αγκυρινών στα στελέχη *Wolbachia*.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη της *Wolbachia* υπόκειται σε θετική επιλογή ιδιαίτερα μεταξύ των “ταχέως μεταβαλλόμενων περιοχών” (Hyper Variable Region, HVR) [Baldo *et al.* 2002; Jiggins *et al.* 2002; Baldo *et al.* 2005]. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Jiggins και συνεργάτες (Jiggins *et al.* 2002), θετική επιλογή παρατηρείται μόνο στα στελέχη της *Wolbachia* που αναπτύσσουν παρασιτικές σχέσεις και όχι αυτά που αναπτύσσουν σχέσεις αμοιβαιότητας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η επιλογή ευνοϊκών μεταλλάξεων, οι οποίες παρέχουν λειτουργικό πλεονέκτημα, είναι ισχυρότερη στα παρασιτικά στελέχη λόγω μεγαλύτερου ανταγωνισμού με τον ξενιστή (Jiggins *et al.* 2002). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, πέντε γονίδια αγκυρίνης εμφανίζουν στοιχεία θετικής επιλογής, καθώς ο λόγος των μη συνώνυμων προς το ρυθμό των συνώνυμων υποκαταστάσεων είναι μεγαλύτερος από την μονάδα ($Ka/Ks > 1$). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γονίδιο WD0292 του προφάγου WO-A το οποίο εμφανίζει και τον μεγαλύτερο λόγο ($Ka/Ks = 2.3$). Είναι αξιοσημείωτο ότι ακολουθίες που εμφανίζουν τον ίδιο πολυμορφισμό μοιράζονται κοινά είδη *Drosophila*. Συνεπώς, η επιλογή αυτή μπορεί να σχετίζεται με την προσαρμογή των στελεχών *Wolbachia* στον εκάστοτε ξενιστή. Σε κάθε περίπτωση, η ανίχνευση μεταλλάξεων που υπόκεινται σε θετική επιλογή είναι πολύ σημαντική όχι μόνο για την κατανόηση της εξέλιξης των γονιδίων αγκυρίνης αλλά και για την κατανόηση της λειτουργίας τους.

Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν όμως και οι μεγαλύτερες δομικές διαφορές που ανιχνεύθηκαν σε κάποια από τα γονίδια αγκυρίνης. Στο γονίδιο WD0766 στα στελέχη wYak και wSan έχει εντεθεί ένα μεταθέσιμο γενετικό στοιχείο της οικογένειας IS5. Η οικογένεια αυτή των μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων (IS5) είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στο βακτήριο *Wolbachia* ενώ πιστεύεται ότι έχει σημαντική επίδραση στην προσαρμοστικότητα του (Foster *et al.* 2005). Το στέλεχος wMel διαθέτει 13 πανομοιότυπα αντίγραφα διάσπαρτα στο γονιδιώμα του (Wu *et al.* 2004) ενώ το στέλεχος wRi διαθέτει 17. Το IS5 διαθέτει δύο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) τα οποία κωδικοποιούν για τις τρानσποζάσες (το ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίδραση ένθεσης του στοιχείου) ενώ οριοθετείται στα άκρα του από δύο αντίστροφες επαναληπτικές ακολουθίες. Στην περίπτωση του γονιδίου WD0766, το μεταθέσιμο στοιχείο οριοθετείται από μη συμμετρικές αντίστροφες επαναληπτικές ακολουθίες οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους σε ένα νουκλεοτίδιο (5' - AGA GGT TGT CCG GAA AC(A/T) AGT AAA- 3') όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των 13 μεταθέσιμων στοιχείων του στελέχους wMel. Επίσης, όπως έχει περιγραφεί και από τους Iturbe-Ormaetxe και συνεργάτες (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005), το ομόλογο του γονιδίου WD0385 στο στέλεχος wAu βρέθηκε να περιέχει ένα πλήρες μεταθέσιμο στοιχείο της ίδιας οικογένειας IS5 στη μέση της 7^{ης} επανάληψης αγκυρίνης. Σε αυτή την περίπτωση όμως, το μεταθέσιμο στοιχείο οριοθετείται από πανομοιότυπες αντιστρεπτές επαναληπτικές ακολουθίες (5'-AGAGGTTGTCCGAAACAAGTAAA- 3'). Το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο αυτού του γονιδίου διακόπτεται και στο στέλεχος wRi λόγω της ενσωμάτωσης ενός μεταθέσιμου στοιχείου (Klasson *et al.* 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα γονίδια αγκυρίνης έχουν παρατηρηθεί και μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, όπως στην περίπτωση του προφαγικού γονιδίου WD0636 στα στελέχη wAu και wTei καθώς και του γονιδίου WD1213 στα στελέχη της υπερομάδας B. Και στις δύο περιπτώσεις, οι αλλαγές αυτές πιθανά να έχουν σημαντική επίδραση στην έκφραση ή/και στη λειτουργία των. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί στο υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παθογόνο βακτήριο *Coxiella burnetii*. Οι έρευνες έδειξαν ότι η γενετική ποικιλοότητα που παρατηρείται στα γονίδια αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου έχει άμεση επίπτωση στην έκκριση των πρωτεϊνών μέσω του T4SS. Μέχρι στιγμής δεν έχει αποδειχθεί η συμμετοχή του συστήματος έκκρισης τύπου IV της *Wolbachia* στην έκκριση των αγκυρινών, αν και η πιθανότητα αυτή είναι πολύ μεγάλη (Pan *et al.* 2008; Bennuru *et al.* 2009).

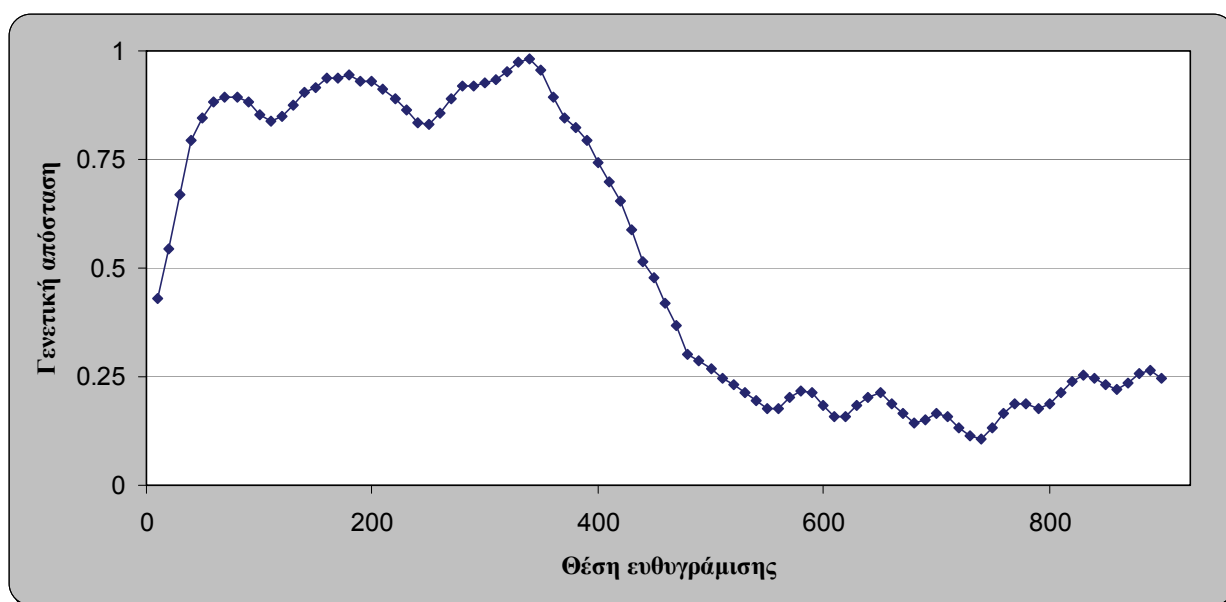
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις πολυμορφισμού σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης, τόσο στον αριθμό όσο και στην οργάνωσή τους μέσα στο γονίδιο. Μάλιστα, τέτοιες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν και μεταξύ ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης, που απαντούν σε πολύ συγγενικά στελέχη, αν και κατά τα άλλα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι, στην εξέλιξη των γο-

νιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* συμμετέχουν μοριακοί μηχανισμοί, εκτός εκείνων που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία μεταλλάξεων σε νουκλεοτιδικό επίπεδο.

3.4.2 Ποιοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia*

Τα φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού αποτελούν ένα πολύ αποτελεσματικό μέσο για την αύξηση της γενετικής ποικιλότητας των βακτηριακών γονιδιωμάτων. Η δράση του ανασυνδυασμού είναι δυνατόν να οδηγήσει στη δημιουργία νέων μορφών γονιδίων και γενοτύπων και κατ' επέκταση νέων φαινοτύπων (Rajalingam *et al.* 2004). Ειδικά στην περίπτωση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με επαναλαμβανόμενα μοτίβα, όπως στην περίπτωση των γονιδίων αγκυρίνης, εικάζεται ότι αυτά μπορούν να εξελιχθούν με πολύ πιο γρήγορους ρυθμούς σε σχέση με τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες χωρίς επαναλαμβανόμενα μοτίβα (Mercotte *et al.* 1998; Tripp and Barrick 2004). Η συγκριτική ανάλυση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* αποκάλυψε ότι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς της δημιουργίας της ποικιλότητας που παρατηρήσαμε μεταξύ των διαφορετικών στελεχών είναι ο γενετικός ανασυνδυασμός τόσο με την κλασική μορφή του ομόλογου ανασυνδυασμού όσο και με την μορφή του παράτυπου (αντικανονικού) ανασυνδυασμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι τα γονίδια αγκυρίνης που απαντούν στη *Wolbachia* υπόκεινται σε φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού. Μάλιστα, η συχνότητα με την οποία συμβαίνει ο γενετικός ανασυνδυασμός στα γονίδια αγκυρίνης φαίνεται να είναι αρκετά υψηλή, δεδομένου ότι ανιχνεύθηκε ένας σημαντικός αριθμός στατιστικά σημαντικών γεγονότων παρά τα περιορισμένα δεδομένα που υπάρχουν για κάθε γονίδιο. Αν και φαινόμενα ανασυνδυασμού ανιχνεύθηκαν μόνο σε 5 από τα 23 συνολικά γονίδια, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι παρόμοια φαινόμενα λαμβάνουν χώρα και στα άλλα γονίδια. Πολλά φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού μπορεί να επισκιαστούν είτε από την εκτεταμένη νουκλεοτιδική ποικιλότητα των ακολουθιών είτε από την πιθανότητα να μην συμπεριλαμβάνονται τα θυγατρικά ή τα πατρικά στελέχη στα διαθέσιμα δεδομένα. Πραγματικά, ένα στοιχείο το οποίο ενισχύει την άποψη αυτή είναι ότι κάποια γονίδια αγκυρίνης, για τα οποία τα προγράμματα απέτυχαν να ανιχνεύσουν φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού, εμφανίζουν τοπικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας μεταξύ των στελεχών. Για παράδειγμα, στο χρωμοσωμικό γονίδιο WD0441 παρατηρείται ότι το 3' άκρο του γονιδίου (το οποίο περιλαμβάνει και τις δύο επαναλήψεις αγκυρίνης) παρουσιάζει μεγάλη συντήρηση μεταξύ των στελεχών (~90% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο) ενώ το 5' άκρο παρουσιάζει εκτεταμένη ποικιλομορφία με λιγότερο από 50% ομοιότητα (Εικόνα 3.21). Αυτή η τοπική διαφορά μπορεί να οφείλεται σε φαινόμενα ανασυνδυασμού.

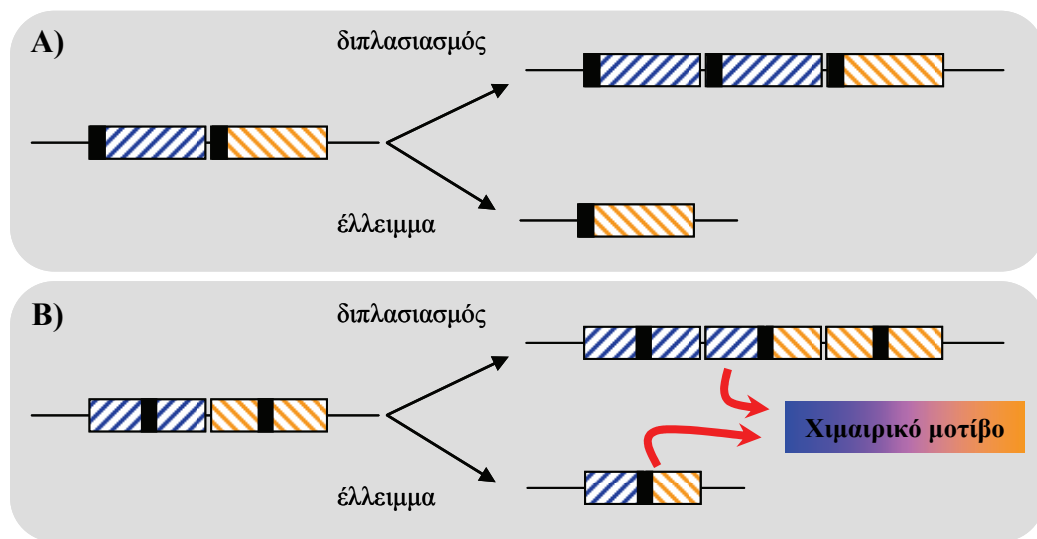


Εικόνα 3.21. Τοπικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της νουκλεοτιδικής ποικιλότητας κατά μήκος του γονιδίου WD0441. Η ανάλυση της γενετικής απόστασης με τη μέθοδο του ολισθαίνοντος παραθύρου, μεταξύ στελεχών της *Wolbachia* που ανήκουν στις υπερομάδες A και B, φανερώνει τη μεγαλύτερη ομοιότητα που παρουσιάζουν στο 3' άκρο του γονιδίου.

Η παρούσα μελέτη εντόπισε φαινόμενα ομόλογου ενδογονιδιακού ανασυνδυασμού τόσο σε χρωμοσωμικά γονίδια όσο και σε προφαγικά γονίδια αγκυρίνης. Φαίνεται ότι η σχετικά συντηρημένη φύση των επαναλήψεων αγκυρίνης αποτελεί στόχο για τους μηχανισμούς που συμμετέχουν στις διαδικασίες του ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού. Σε κάποιες από αυτές τις περιπτώσεις, όπως σε αυτή του προφαγικού γονιδίου WD0633, ο ανασυνδυασμός είχε ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή ολόκληρων συστοιχιών από επαναλήψεις αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia*. Δεδομένου ότι οι επαναλήψεις αγκυρίνης συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, η ανταλλαγή αυτή των συστοιχιών μπορεί να επηρεάσει την συνάφεια των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών ως προς το υπόστρωμά τους και επομένως τη λειτουργία τους.

Επίσης, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι ο παράτυπος-μη ομόλογος ανασυνδυασμός, ο οποίος υφίσταται μεταξύ των μικρού μήκους νουκλεοτιδικών επαναλήψεων κοινής κατεύθυνσης που βρίσκονται διάσπαρτες μεταξύ των μοτίβων αγκυρίνης, κατέχει σημαντική θέση στην αύξηση της ποικιλότητας των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia*. Μέσω αυτού του φαινομένου είναι δυνατόν να προκύψουν νέοι συνδυασμοί μοτίβων αγκυρίνης λόγω διπλασιασμού ή απομάκρυνσης μεμονωμένων μοτίβων καθώς επίσης και να δημιουργηθούν νέα μοτίβα από την αναδιάταξη των δομικών μονάδων μεταξύ απομακρυσμένων επαναλήψεων αγκυρίνης. Στην Εικόνα 3.22 παρουσιάζεται ένα μοντέλο το οποίο δείχνει τους πιθανούς τρόπους δράσης του παράτυπου (αντικανονικού) ανασυνδυασμού στα μοτίβα αγκυρίνης. Σύμφωνα με αυτό, όταν οι μικρού μήκους

νουκλεοτιδικές επαναλήψεις βρίσκονται στα άκρα των μοτίβων μπορούν να οδηγήσουν σε φαινόμενα διπλασιασμού ή έλλειμμάτων (Εικόνα 3.22Α). Όταν όμως οι επαναλήψεις αυτές βρίσκονται εσωτερικά των μοτίβων αγκρίνης τότε οδηγούν στον σχηματισμό νέων χιμαιρικών μοτίβων (Εικόνα 3.22Β). Σε κάθε περίπτωση, η σταθερή θέση των επαναλήψεων στην ίδια θέση μεταξύ των διαφορετικών μοτίβων αγκρίνης είναι απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα του αναγνωστικού πλαισίου του γονιδίου και επομένως η λειτουργικότητά του.



Εικόνα 3.22. Μοντέλο επίδρασης του παράτυπου ανασυνδυασμού στην εξέλιξη των μοτίβων αγκρίνης. Τα διαφορετικού χρώματος διαγραμμισμένα ορθογώνια πλαίσια αναπαριστούν διαφορετικά μοτίβα αγκρίνης. Τα μαύρα ορθογώνια πλαίσια στο εσωτερικό τους αναπαριστούν πανομοιότυπες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις (DRs). Όταν τα DRs βρίσκονται στα όρια των μοτίβων αγκρίνης μπορούν να οδηγήσουν σε διπλασιασμό ή έλλειμμα μοτίβων ανάλογα με το εάν η ολισθαίνουσα αλυσίδα DNA είναι η νεοσυντεθείσα ή το εκμαγείο (Α). Όταν τα DRs είναι εσωτερικά τότε μπορούν να δημιουργηθούν χιμαιρικά μοτίβα αγκρίνης (Β).

Σε αντίθεση με τον ομόλογο ανασυνδυασμό, ο οποίος απαιτεί την συνύπαρξη δύο ή περισσότερων στελεχών της *Wolbachia* στον ίδιο ξενιστή προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανταλλαγή γενετικού υλικού, ο παράτυπος-μη ομόλογος ανασυνδυασμός δεν απαιτεί κάτι τέτοιο ενώ μπορεί να παρέχει στο βακτήριο μια άμεση πηγή γενετικής ποικιλότητας η οποία είναι απαραίτητη για τη γρήγορη προσαρμογή του σε νέα περιβάλλοντα συμπεριλαμβανομένου της μετακίνησης μεταξύ διαφορετικών ξενιστών. Είναι γνωστό εξάλλου ότι πολλά γονίδια προκαρυωτικών οργανισμών, τα οποία συμμετέχουν σε μηχανισμούς απόκρισης καταστάσεων στρες, χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μεγάλου αριθμού νουκλεοτιδικών επαναλήψεων οι οποίες μπορούν να μετασχηματιστούν σε φαινόμενα παράτυπου ανασυνδυασμού, παρέχοντας την απαραίτητη πηγή ποικιλότητας για την ταχεία προσαρμογή στις νέες συνθήκες (Rocha *et al.* 2002). Έχει προταθεί επίσης ότι

η εξελικτική επιτυχία της οικογένειας των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών με μοτίβα αγκυρίνης οφείλεται εν μέρει στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με έναν μεγάλο αριθμό μορίων στόχων. Αυτό επιτυγχάνεται απλά με το να προσαρμόζεται κάθε φορά το αλληλεπιδρών τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελείται από τα μοτίβα αγκυρίνης, μέσω του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων τα οποία κωδικοποιούν για τα μοτίβα αυτά (Tripp and Barrick 2004; Kobe *et al.* 2000; Marcote *et al.* 1998; Cai and Zhang 2005). Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας ματίσματος είναι η δημιουργία εναλλακτικών μορφών της ίδιας πρωτεΐνης οι οποίες διαφέρουν μόνο ως προς τον αριθμό και την οργάνωση των μοτίβων αγκυρίνης.

Λόγω της δομής τους, οι πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα φαίνεται ότι παρουσιάζουν μεγάλη ανοχή σε φαινόμενα διπλασιασμού, ένθεσης ή ελλειμμάτων των δομικών τους μοτίβων (Tripp and Barrick 2004). Συγκεκριμένα, μελέτες δείχνουν ότι σε μια συστοιχία μοτίβων αγκυρίνης, η απομάκρυνση των εξωτερικών μοτίβων επιφέρει λιγότερες δομικές αλλαγές σε σχέση με την απομάκρυνση εσωτερικών μοτίβων. Ωστόσο, οι εσωτερικές αλλαγές μπορούν να προκαλέσουν μεγαλύτερη δομική ποικιλότητα με αποτέλεσμα να ευνοούνται στην περίπτωση που υπόκεινται σε λειτουργική επιλογή (functional selection). Τέτοιου είδους αλλαγές μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, τη συγγενειά τους ως προς τα αλληλεπιδρώντα μόρια και επομένως τη λειτουργία τους (Mosavi *et al.* 2004). Για παράδειγμα, η απομάκρυνση του δεύτερου μοτίβου αγκυρίνης από τον πρωτεϊνικό παράγοντα IkBa έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία της μεταφοράς του στον πυρήνα του κυττάρου (Sachdev *et al.* 1998). Οι αναπαραγωγικές ανωμαλίες που επάγονται από τα διαφορετικά στελέχη της *Wolbachia* θα μπορούσαν για παράδειγμα να ρυθμίζονται μέσω της ποικιλότητας της δομής των γονιδίων αγκυρίνης η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τη σταθερότητα και την ειδικευση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται. Την παρούσα στιγμή, αυτή η παρατήρηση αποτελεί μόνο μια υπόθεση που απαιτεί πειραματική επιβεβαίωση.

Όπως προαναφέραμε, άλλο ένα στοιχείο το οποίο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γενετικής ποικιλότητας των γονιδίων αγκυρίνης στη *Wolbachia* είναι και τα προφαγικά στοιχεία που έχουν βρεθεί στο γονιδιώμα της. Πλήθος μελετών έχουν δείξει ότι οι βακτηριοφάγοι αποτελούν βασικούς συντελεστές της διαμόρφωσης και της εξέλιξης των βακτηριακών γονιδιωμάτων. Η δυνατότητα που έχουν να λειτουργούν ως “όχημα” μεταφοράς γενετικού υλικού ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηριακών κυττάρων προσφέρει στα τελευταία μια πηγή εξελικτικής καινοτομίας η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να αποκτήσουν το πλεονέκτημα έναντι άλλων ειδών και να ανταπεξέλθουν στις γρήγορα μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος (Wagner and Waldor 2002; Casjens 2003; Moran *et al.* 2005).

Αν και τα εξειδικευμένα γονιδιώματα των ενδοκυτταρικών συμβιωτικών βακτηρίων συχνά στερούνται της ύπαρξης προφαγικών στοιχείων, οι μελέτες δείχνουν ότι τα προφαγικά στοιχεία έ-

χουν επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη του γονιδιώματος της *Wolbachia* (Masui *et al.* 2000; Bordenstein and Wernegreen 2004; Gavotte *et al.* 2006). Το πρώτο στοιχείο που οδηγεί σε αυτό το συμπέρασμα είναι η μεγάλη εξάπλωση του βακτηριοφάγου WO μεταξύ των διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia*. Περίπου το 89% των στελεχών που μελετήθηκαν διαθέτουν τουλάχιστον έναν προφάγο ενσωματωμένο στο γονιδιώμα τους (Bordenstein and Wernegreen 2004; Gavotte *et al.* 2006). Το δεύτερο στοιχείο είναι ότι ο βακτηριοφάγος WO έχει την ικανότητα να μεταφέρεται οριζόντια μεταξύ πολύ διαφορετικών στελεχών της *Wolbachia* τα οποία μολύνουν τον ίδιο ξενιστή (για παράδειγμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικές υπερομάδες) [Bordenstein and Wernegreen 2004].

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα προφαγικά στοιχεία της *Wolbachia* έχουν διαδραματίσει και συνεχίζουν να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διάδοση και την εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης. Η έλλειψη φυλογενετικής συμφωνίας μεταξύ των χρωμοσωμικών και των προφαγικών γονιδίων αγκυρίνης υποδηλώνει την εκτεταμένη οριζόντια μεταφορά των φαγικών σωματιδίων μεταξύ των συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*. Οι φάγοι της *Wolbachia* αποτελούν μια σημαντική πηγή γονιδιακής ποικιλότητας η οποία μπορεί να εξαπλωθεί και να διαμορφώσει το γενετικό ρεπερτόριο των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Η ανταλλαγή αυτή γενετικού υλικού είναι καθοριστικής σημασίας για την οικολογική επιτυχία των συμβιωτικών σχέσεων.

3.4.3 Συνδέεται η γενετική ποικιλομορφία των αγκυρινών με τους φαινοτύπους της *Wolbachia*;

Λόγω της ικανότητάς τους να προάγουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών, τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* έχουν προταθεί ως βασικοί συντελεστές των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίου και ξενιστή. Η συγκριτική μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των γονιδίων αγκυρίνης υπό το πρίσμα των διαφορετικών φαινοτύπων, με έμφαση την κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, αποτελεί μια πρόκληση. Σε προηγούμενη μελέτη, η σύγκριση των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών *wMel* (*mod*⁺/*resc*⁺) και *wAu* (*mod*⁺/*resc*⁻) ανέδειξε 10 υποψήφια γονίδια με πιθανό ρόλο στην επαγωγή των αναπαραγωγικών ανωμαλιών (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005). Στο ίδιο πλαίσιο, ο Sinkins και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι υπάρχουν σημαντικά επίπεδα πολυμορφισμού στις ακολουθίες δύο γονιδίων αγκυρίνης (*pk1* και *pk2*) που βρίσκονται σε δύο στελέχη *Wolbachia* που μολύνουν δύο διαφορετικούς και ασύμβατους πληθυσμούς κουνουπιών του είδους *Culex quinquefasciatus* (Sinkins *et al.* 2005). Τα γονίδια αυτά ανήκουν σε ένα προφάγο της *Wolbachia* και παρουσιάζουν ομολογία με τα γονίδια WD0596 και WD0636 του στελέχους *wMel*. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, εξετάστηκε η κατανομή της ποικιλότητας 58 γονιδίων αγκυρίνης σε σχέση με τα πρότυπα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας 14 διακριτών στελε-

χών *Wolbachia* που μολύνουν το είδος *Culex pipiens* (Duron *et al.* 2007). Ωστόσο, δεν βρέθηκε καμία ένδειξη που να συσχετίζει τα πρότυπα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας με την παρατηρούμενη ποικιλότητα στα γονίδια αγκυρίνης (Duron *et al.* 2007). Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, δεν ήταν επίσης δυνατόν να συσχετιστούν άμεσα η ποικιλομορφία των γονιδίων αγκυρίνης με τους διαφορετικούς φαινοτύπους των στελεχών της *Wolbachia* που εξετάστηκαν. Στελέχη του βακτηρίου, τα οποία τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινοτύπους κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας καθώς και εμβρυϊκής κατανομής, φαίνεται να μοιράζονται παρόμοιους τύπους ποικιλότητας μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης. Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία, η άμεση τουλάχιστον συμμετοχή των γονιδίων αγκυρίνης στους μηχανισμούς επαγωγής των διαφορετικών φαινοτύπων είναι λιγότερο πιθανή. Μελέτες δείχνουν ότι η βακτηριακή πυκνότητα στους γενετικούς ιστούς των εντόμων φαίνεται να σχετίζεται με τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που εκφράζουν (Breeuwer & Werren 1993; Poinot *et al.* 1998; Perrot-Minnot & Werren 1999; Noda *et al.* 2001; Veneti *et al.* 2003). Μάλιστα, σε μια πρόσφατη εργασία επισημάνθηκε η πολύπλοκη σχέση των βακτηριοφάγων της *Wolbachia* στην έκφραση της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Οι βακτηριοφάγοι μέσω του λυτικού κύκλου έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την βακτηριακή πυκνότητα και κατ' επέκταση τα επίπεδα της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Bordenstein *et al.* 2006). Επίσης, είναι γνωστό ότι το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση του φαινοτύπου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Bordenstein & Werren 1998; Poinot *et al.* 1998; Clark *et al.* 2002; Sinkins *et al.* 2005).

Αν και η προέλευση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* παραμένει άγνωστη, μελέτες υποστηρίζουν ότι η οικογένεια των γονιδίων αυτών στους προκαρυωτικούς οργανισμούς έχει προέλθει πιθανότατα μέσω οριζόντιας μεταφοράς από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παρά το ότι έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα (Ponting *et al.* 1999). Ένα στοιχείο το οποίο συνηγορεί με την ευκαρυωτική προέλευση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* είναι και η μεγαλύτερη ομοιότητα που παρουσιάζουν αυτά με αντίστοιχα ευκαρυωτικά γονίδια (Wu *et al.* 2004; Ioannidis unpublished). Επίσης, ένα άλλο στοιχείο το οποίο υποστηρίζει την παραπάνω άποψη είναι και το γεγονός ότι εκτός από την *Wolbachia* ο μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών έχει βρεθεί σε γονιδιώματα ενδοκυτταρικών βακτηρίων (υποχρεωτικών και προαιρετικών) τα οποία χρησιμοποιούν ως ξενιστές τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κάνοντας πολύ πιθανή την περίπτωση τα γονίδια αυτά να έχουν μεταφερθεί από τους ξενιστές (Seshadri *et al.* 2003; Chien *et al.* 2004; Cazalet *et al.* 2004; Ogata *et al.* 2005; Ogata *et al.* 2006; Nakayama *et al.* 2008). Η παρουσία ενός τόσο μεγάλου αριθμού γονιδίων αγκυρίνης σε αυτά τα βακτήρια μπορεί να σχετίζεται με το μοναδικό τρόπο διαβίωσής τους και την ανάγκη για συνεχή

επικοινωνία με τους ξενιστές τους. Αρκετές μελέτες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την παρουσία των γονιδίων αγκρίνης με τους διαφορετικούς φαινοτύπους της *Wolbachia* (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005; Sinkins *et al.* 2005; Duron *et al.* 2007). Ωστόσο, μια άμεση (λειτουργική) συσχέτιση δεν έχει επιβεβαιωθεί. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η *Wolbachia* διαθέτει ένα μοναδικό ρεπερτόριο γονιδίων αγκρίνης στη διαμόρφωση και την εξέλιξη του οποίου έχουν συμβάλει α) η οριζόντια μεταφορά των προφαγικών στοιχείων, β) τα φαινόμενα ομόλογου ανασυνδυασμού καθώς και γ) τα φαινόμενα παράτυπου ανασυνδυασμού. Τα γονίδια αυτά πιθανά να αντικατοπτρίζουν εν μέρει τη μεγάλη προσαρμοστικότητα της *Wolbachia* διαδραματίζοντας βασικό ρόλο σε διαφορετικές πτυχές της φυσιολογίας της, όπως η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων, η οριζόντια και κάθετη μετάδοσή της και η έκφραση των αναπαραγωγικών φαινοτύπων. Όλα τα παραπάνω, όμως, αναμένουν πειραματική επιβεβαίωση.

3.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andrade, M. A., C. Perez-Iratxeta, and C. P. Ponting.** 2001. Protein repeats: Structures, functions, and evolution. *Journal of Structural Biology* **134**:117-131.
- Baldo, L., S. Bordenstein, J. J. Wernegreen, and J. H. Werren.** 2006. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **23**:437-449.
- Baldo, L., J. C. D. Hotopp, K. A. Jolley, S. R. Bordenstein, S. A. Biber, R. R. Choudhury, C. Hayashi, M. C. J. Maiden, H. Tettelin, and J. H. Werren.** 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:7098-7110.
- Baldo, L., N. Lo, and J. H. Werren.** 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology* **187**:5406-5418.
- Baldo L, B. J., Werren JH, Bazzocchi C, Casiraghi M, Panelli S.** 2002. Different rates of nucleotide substitutions in *Wolbachia* endosymbionts of arthropods and nematodes: arms race or host shifts? *Parassitologia* **44**:179-187.
- Bennuru, S., R. Semnani, Z. Meng, J. M. C. Ribeiro, T. D. Veenstra, and T. B. Nutman.** 2009. *Brugia malayi* excreted/secreted proteins at the host/parasite interface: stage- and gender-specific proteomic profiling. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**.
- Betley, J. N., M. C. Frith, J. H. Graber, S. Choo, and J. O. Deshler.** 2002. A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Current Biology* **12**:1756-1761.
- Bordenstein, S. R., M. L. Marshall, A. J. Fry, U. Kim, and J. J. Wernegreen.** 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathogens* **2**:384-393.
- Bordenstein, S. R., and W. S. Reznikoff.** 2005. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**:688-699.
- Bordenstein, S. R., and J. J. Wernegreen.** 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): Infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. *Molecular Biology and Evolution* **21**:1981-1991.
- Bordenstein, S. R., and J. H. Werren.** 1998. Effects of A and B *Wolbachia* and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in *Nasonia*. *Genetics* **148**:1833-1844.
- Breeuwer, J. A. J., and J.H. Werren.** 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* **135**:565-574.
- Bzymek, M., and S. T. Lovett.** 2001. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. Pp. 8319-8325.
- Cai, X., and Y. Zhang.** 2006. Molecular Evolution of the Ankyrin Gene Family. **23**:550-558.

- Casjens, S.** 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology* **49**:277-300.
- Cazalet, C., C. Rusniok, H. Bruggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser, and C. Buchrieser.** 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics* **36**:1165-1173.
- Chien, M. C., I. Morozova, S. D. Shi, H. T. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. H. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georghiou, I. C. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Y. Qu, A. Rzhetsky, P. S. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Y. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman, and J. J. Russo.** 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**:1966-1968.
- Clark, M. E., Z. Veneti, K. Bourtzis, and T. L. Karr.** 2002. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **111**:3-15.
- Drummond AJ, A. B., Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A** 2008. Geneious v4.0. Available from <http://www.geneious.com/>
- Duron, O., A. Boureux, P. Echaubard, A. Berthomieu, C. Berticat, P. Fort, and M. Weill.** 2007. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Bacteriology* **189**:4442-4448.
- Duron, O., J. Lagnel, M. Raymond, K. Bourtzis, P. Fort, and M. Weill.** 2005. Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. *Molecular Ecology* **14**:1561-1573.
- Edgar, R. C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792-1797.
- Evans, B. J., D. B. Kelley, D. J. Melnick, and D. C. Cannatella.** 2005. Evolution of RAG-1 in polyploid clawed frogs. *Molecular Biology and Evolution* **22**:1193-1207.
- Finn, R. D., J. Tate, J. Mistry, P. C. Coghill, S. J. Sammut, H. R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S. R. Eddy, E. L. L. Sonnhammer, and A. Bateman.** 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **36**:D281-D288.
- Foster, J., M. Ganatra, I. Kamal, J. Ware, K. Makarova, N. Ivanova, A. Bhattacharyya, V. Kapatral, S. Kumar, J. Posfai, T. Vincze, J. Ingram, L. Moran, A. Lapidus, M. Omelchenko, N. Kyrpides, E. Ghedin, S. Wang, E. Goltsman, V. Joukov, O. Ostrovskaya, K. Tsukerman, M. Mazur, D. Comb, E. Koonin, and B. Slatko.** 2005. The

Wolbachia genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biology **3**:599-614.

Gavotte, L., H. Henri, R. Stouthamer, D. Charif, S. Charlat, M. Bouletreau, and F. Vavre. 2006. A survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria *Wolbachia*. Molecular Biology and Evolution **24**:427-435.

Goldman, N., and Z. H. Yang. 1994. Codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA-sequences. Molecular Biology and Evolution **11**:725-736.

Ioannidis, P., J. C. D. Hotopp, P. Sapountzis, S. Siozios, G. Tsiamis, S. R. Bordenstein, L. Baldo, J. H. Werren, and K. Bourtzis. 2007. New criteria for selecting the origin of DNA replication in *Wolbachia* and closely related bacteria. BMC Genomics **8**.

Iturbe-Ormaetxe, I., G. R. Burke, M. Riegler, and S. L. O'Neill. 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. Journal of Bacteriology **187**:5136-5145.

Jiggins, F. M. 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. Molecular Biology and Evolution **19**:1640-1643.

Jiggins, F. M., G. D. D. Hurst, and Z. H. Yang. 2002. Host-symbiont conflicts: Positive selection on an outer membrane protein of parasitic but not mutualistic Rickettsiaceae. Molecular Biology and Evolution **19**:1341-1349.

Jiggins, F. M., J. H. G. von der Schulenburg, G. D. D. Hurst, and M. E. N. Majerus. 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **268**:1423-1427.

Keller, G. P., D. M. Windsor, J. M. Saucedo, and J. H. Werren. 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). Molecular Ecology **13**:2405-2420.

Klasson, L., T. Walker, M. Sebahia, M. J. Sanders, M. A. Quail, A. Lord, S. Sanders, J. Earl, S. L. O'Neill, N. Thomson, S. P. Sinkins, and J. Parkhill. 2008. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. Molecular Biology and Evolution **25**:1877-1887.

Klasson, L., J. Westberg, P. Sapountzis, K. Naslund, Y. Lutnaes, A. C. Darby, Z. Veneti, L. M. Chen, H. R. Braig, R. Garrett, K. Bourtzis, and S. G. E. Andersson. 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**:5725-5730.

- Kobe, B., and A. V. Kajava.** 2000. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends in Biochemical Sciences* **25**:509-515.
- Malloch, G., and B. Fenton.** 2005. Super-infections of *Wolbachia* in byturid beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. *Molecular Ecology* **14**:627-637.
- Marcotte, E. M., M. Pellegrini, T. O. Yeates, and D. Eisenberg.** 1998. A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology* **293**:151-160.
- Martin, D., and E. Rybicki.** 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* **16**:562-563.
- Martin, D. P., C. Williamson, and D. Posada.** 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**:260-262.
- Masui, S., S. Kamoda, T. Sasaki, and H. Ishikawa.** 2000. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *Journal of Molecular Evolution* **51**:491-497.
- Moran, N. A.** 1996. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:2873-2878.
- Moran, N. A., P. H. Degnan, S. R. Santos, H. E. Dunbar, and H. Ochman.** 2005. The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:16919-16926.
- Mosavi, L. K., T. J. Cammett, D. C. Desrosiers, and Z. Y. Peng.** 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* **13**:1435-1448.
- Nakayama, K., A. Yamashita, K. Kurokawa, T. Morimoto, M. Ogawa, M. Fukuhara, H. Urakami, M. Ohnishi, I. Uchiyama, Y. Ogura, T. Ooka, K. Oshima, A. Tamura, M. Hattori, and T. Hayashi.** 2008. The Whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. *DNA Research* **15**:185-199.
- Nei, M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Noda, H., Y. Koizumi, Q. Zhang, and K. J. Deng.** 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**:727-737.
- Ogata, H., B. La Scola, S. Audic, P. Renesto, G. Blanc, C. Robert, P. E. Fournier, J. M. Claverie, and D. Raoult.** 2006. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genetics* **2**:733-744.

- Ogata, H., P. Renesto, S. Audic, C. Robert, G. Blanc, P. E. Fournier, H. Parinello, J. M. Claverie, and D. Raoult.** 2005. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *PLoS Biology* **3**:1391-1402.
- Padidam, M., S. Sawyer, and C. M. Fauquet.** 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**:218-225.
- Pan, X. X., A. Luhrmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce, and C. R. Roy.** 2008. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**:1651-1654.
- Paraskevopoulos, C., S. R. Bordenstein, J. J. Wernegreen, J. H. Werren, and K. Bourtzis.** 2006. Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: Discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Current Microbiology* **53**:388-395.
- Perrot-Minnot, M. J., and J. H. Werren.** 1999. *Wolbachia* infection and incompatibility dynamics in experimental selection lines. *Journal of Evolutionary Biology* **12**:272-282.
- Poinsot, D., K. Bourtzis, G. Markakis, C. Savakis, and H. Mercot.** 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* **150**:227-237.
- Ponting, C. P., L. Aravind, J. Schultz, P. Bork, and E. V. Koonin.** 1999. Eukaryotic signaling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology* **289**:729-745.
- Posada, D., and K. A. Crandall.** 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**:817-818.
- Posada, D., and K. A. Crandall.** 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:13757-13762.
- Posada, D., K. A. Crandall, and E. C. Holmes.** 2002. Recombination in evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics* **36**:75-97.
- Rajalingam, R., P. Parham, and L. Abi-Rached.** 2004. Domain shuffling has been the main mechanism forming new hominoid killer cell Ig-like receptors. *Journal of Immunology* **172**:356-369.
- Reuter, M., and L. Keller.** 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Molecular Biology and Evolution* **20**:748-753.
- Rocha, E. P. C.** 2003. An appraisal of the potential for illegitimate recombination in bacterial genomes and its consequences: From duplications to genome reduction. *Genome Research* **13**:1123-1132.

- Rocha, E. P. C., I. Matic, and F. Taddei.** 2002. Over-representation of repeats in stress response genes: a strategy to increase versatility under stressful conditions? *Nucleic Acids Research* **30**:1886-1894.
- Ros, V. I. D., V. M. Fleming, E. J. Feil, and J. A. J. Breeuwer.** 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* Supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1036-1043.
- Rozas, J., J. C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas.** 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**:2496-2497.
- Sachdev, S., A. Hoffmann, and M. Hannink.** 1998. Nuclear localization of I kappa B alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the I kappa B alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Molecular and Cellular Biology* **18**:2524-2534.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE.** 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**: 1423-1425.
- Sawyer, S.** 1989. Statistical Tests for Detecting Gene Conversion. *Molecular Biology and Evolution* **6**:526-538.
- Seshadri, R., I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, K. E. Nelson, W. C. Nelson, N. L. Ward, H. Tettelin, T. M. Davidsen, M. J. Beanan, R. T. Deboy, S. C. Daugherty, L. M. Brinkac, R. Madupu, R. J. Dodson, H. M. Khouri, K. H. Lee, H. A. Carty, D. Scanlan, R. A. Heinzen, H. A. Thompson, J. E. Samuel, C. M. Fraser, and J. F. Heidelberg.** 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:5455-5460.
- Shimodaira, H., and M. Hasegawa.** 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* **16**:1114-1116.
- Sinkins, S. P., T. Walker, A. R. Lynd, A. R. Steven, B. L. Makepeace, H. C. J. Godfray, and J. Parkhill.** 2005. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature* **436**:257-260.
- Smith, J. M.** 1992. Analyzing the Mosaic Structure of Genes. *Journal of Molecular Evolution* **34**:126-129.
- Swofford, D. L.** 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Tamas, I., L. Klasson, B. Canback, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, J. J. Wernegreen, J. P. Sandstrom, N. A. Moran, and S. G. E. Andersson.** 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* **296**:2376-2379.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research* **22**:4673-4680.
- Tripp, K. W., and D. Barrick.** 2004. The tolerance of a modular protein to duplication and deletion of internal repeats. *Journal of Molecular Biology* **344**:169-178.
- Tsaousis, A. D., D. P. Martin, E. D. Ladoukakis, D. Posada, and E. Zouros.** 2005. Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **22**:925-933.
- Veneti, Z., M. E. Clark, S. Zabalou, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics* **164**:545-552.
- Wagner, P. L., and M. K. Waldor.** 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity* **70**:3985-3993.
- Watterson, G. A.** 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* **7**: 256-276.
- Werren, J. H., and J. D. Bartos.** 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Current Biology* **11**:431-435.
- Wu, M., L. V. Sun, J. Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J. C. Brownlie, E. A. McGraw, W. Martin, C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, R. Madupu, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, Y. Mohamoud, P. Lee, K. Berry, M. B. Young, T. Utterback, J. Weidman, W. C. Nierman, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, S. L. O'Neill, and J. A. Eisen.** 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* **2**:327-341.
- Yang, Z.** 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. Pp. 1586-1591.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	152
4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	154
4.2.1 Προετοιμασία υλικού και απομόνωση ολικού RNA.....	154
4.2.2 Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	155
4.2.3 Ανίχνευση της μεταγραφής των γονιδίων αγκυρίνης.....	155
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	159
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	171
4.4.1 Η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης της <i>Wolbachia</i> παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των συμβιωτικών σχέσεων και των αναπτυξιακών σταδίων του ξενιστή	171
4.4.2 Είναι τα “ψευδογονίδια” αγκυρίνης λειτουργικά;.....	173
4.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	176

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί αξιόλογη πρόοδος όσον αφορά τη μελέτη της οικολογίας, της γενετικής και της κυτταρικής βιολογίας των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει η *Wolbachia* με τους ξενιστές της. Ελάχιστα όμως είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς που υπαγορεύουν της αλληλεπιδράσεις αυτές. Πώς καταφέρνει η *Wolbachia* να εδραιώσει το πλήθος των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει και να παρακάμψει το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή; Ποιους μηχανισμούς χρησιμοποιεί για τη “μετακίνησή” της; Πώς καταφέρνει να επιδρά πάνω στις αναπαραγωγικές λειτουργίες των ξενιστών της;

Είναι γνωστό ότι η *Wolbachia* μολύνει τόσο τους γενετικούς όσο και τους σωματικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένης και της αιμολέμφου (Dobson *et al.* 1999). Ωστόσο, η παρουσία του βακτηρίου στους γενετικούς ιστούς είναι καίριας σημασίας τόσο για την έκφραση των αναπαραγωγικών φαινοτύπων καθώς και για την μετάδοση του βακτηρίου από γενιά σε γενιά. Κυτταρολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η *Wolbachia* αλληλεπιδρά με το κυτταροσκελετικό σύστημα του ξενιστή της προκειμένου να εξασφαλίσει τη “μετακίνησή” της κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και της εμβρυογένεσης (Callaini *et al.* 1994; Kose & Karr 1995; Ferree *et al.* 2005; Serbus *et al.* 2008). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ουσιώδεις για την αποδοτική μετάδοση του βακτηρίου στους απογόνους. Αν και η *Wolbachia* δεν μεταφέρεται μέσω των αρσενικών ατόμων, η παρουσία της κατά τα στάδια της σπερματογένεσης είναι απαραίτητη για την επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Clark & Karr 2002; Clark *et al.* 2002, 2003; Veneti *et al.* 2003). Σύμφωνα με το μοντέλο της “τροποποίησης-διάσωσης”, που προτάθηκε από τον Werren το 1997, ο φαινότυπος της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας οφείλεται σε δύο διακριτές λειτουργίες της *Wolbachia* (Werren 1997). Η λειτουργία της “τροποποίησης” λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των πατρικών γαμετών (Presgraves 2000; Veneti *et al.* 2003; Serbus *et al.* 2008). Από την άλλη, η λειτουργία της “διάσωσης” πραγματοποιείται στο ωάριο κατά τα πρώτα εμβρυικά στάδια και έχει ως αποτέλεσμα την αντιστάθμιση της τροποποίησης (Ferree & Sullivan 2006).

Το ερώτημα που δημιουργείται είναι, πώς καταφέρνει η *Wolbachia* να ρυθμίζει όλες αυτές τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ιστών; Πολύπλοκες βιολογικές διαδικασίες συχνά περιλαμβάνουν τον συντονισμό έλεγχου της έκφρασης μεμονωμένων ή ομάδων γονιδίων. Η δυνατότητα της *Wolbachia* να διακρίνει και να επιδρά με διαφορετικό τρόπο στους ιστούς των αρσενικών και των θηλυκών εντόμων πιθανά να σχετίζεται με την ενεργοποίηση και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Αξιοσημείωτο όμως είναι το γεγονός ότι η *Wol-*

bachia διαθέτει έναν μικρό αριθμό γονιδίων υπεύθυνων για την ρύθμιση της μεταγραφής (Fenn & Blaxter 2006). Συνεπώς, αυτό πιθανά υποδηλώνει ότι η διαφορική έκφραση των γονιδίων του βακτηρίου μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του ξενιστή, είναι περιορισμένη.

Ένα από τα πιο αινιγματικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γένους *Wolbachia* είναι ο ασυνήθιστα μεγάλος (για προκαρυωτικό οργανισμό) αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με επαναλήψεις αγκυρίνης (Masui *et al.* 2000; Wu *et al.* 2004; Foster *et al.* 2005; Salzberg *et al.* 2005; Klasson *et al.* 2008; Klasson *et al.* 2009). Τα γονίδια αυτά θεωρούνται βασικοί υποψήφιοι για τη συμμετοχή τους στους μοριακούς μηχανισμούς που υπαγορεύουν τις αλληλεπιδράσεις *Wolbachia*-ξενιστή. Τα χαρακτηριστικά εκείνα τα οποία οδηγούν σε αυτό το συμπέρασμα είναι τα εξής: (α) Έχει βρεθεί ότι οι επαναλήψεις αγκυρίνης συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Sedwick & Smerdon 1999) και (β) οι επαναλήψεις αγκυρίνης της *Wolbachia* παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τις επαναλήψεις αγκυρίνης που απαντώνται σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες παρά με τις αντίστοιχες προκαρυωτικές (Ioannidis *et al.* in preparation).

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο για την κατανόηση της λειτουργίας τους καθώς και του πιθανού τους ρόλου στην επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Στα πλαίσια της διατριβής αυτής πραγματοποιήθηκε η πρώτη εκτεταμένη μελέτη της έκφρασης (σε μεταγραφικό επίπεδο) των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia*. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της συμβατικής RT-PCR μελετήθηκαν τα πρότυπα μεταγραφής των γονιδίων αγκυρίνης στους αναπαραγωγικούς ιστούς (όρχεις και ωοθήκες) καθώς και σε τρία αναπτυξιακά στάδια (πρώιμα έμβρυα, ώριμα έμβρυα και ενήλικα άτομα και των δύο φύλων) σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*. Η ανίχνευση ειδικών μεταγραφικών προτύπων ανάλογα με τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο καθώς και τη συμβιωτική σχέση παρέχει σημαντικές πληροφορίες χρήσιμες για το λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων αγκυρίνης και τη συσχέτιση τους με τους διαφορετικούς φαινοτύπους.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Προετοιμασία υλικού και απομόνωση ολικού RNA

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης πραγματοποιήθηκε στους αναπαραγωγικούς ιστούς (όρχεις και ωοθήκες) καθώς και σε τρία (3) αναπτυξιακά στάδια των εντόμων, πρώιμα και τελικά εμβρυικά στάδια καθώς και ενήλικα άτομα (θηλυκά και αρσενικά) σε 11 συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila* - *Wolbachia* (Πίνακα 4.1). Συνολικά απομονώθηκαν οι αναπαραγωγικοί ιστοί από ~150 παρθένα θηλυκά άτομα ηλικίας τριών (3) ημερών και ~300 παρθένα αρσενικά άτομα ηλικίας μιας (1) ημέρας. Τα έντομα διατηρούνταν αναισθητοποιημένα στον πάγο ενώ οι ανατομίες πραγματοποιήθηκαν κάτω από στερεοσκόπιο μέσα σε διάλυμα Ringer (182 mM KCl, 46 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 10 mM Tris-Cl, pH 7.2) προς αποφυγή αφυδάτωσης των ιστών. Μετά την απομάκρυνση τους, οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε μικρό όγκο (100-200 μl) διαλύματος Trizol (Invitrogen) και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

Πίνακας 4.1. Οι 11 συμβιωτικές σχέσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης.

Ξενιστής	Στέλεχος <i>Wolbachia</i>	Υπερ-ομάδα	Εμβρυική κατανομή	Φαινότυπος ΚΑ
<i>D. melanogaster</i>	wMel	A	οπίσθια	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. melanogaster</i>	wMelpopcorn		οπίσθια	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wAu		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁻
<i>D. teissieri</i>	wTei		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. yakuba</i>	wYak		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. santomea</i>	wSan		οπίσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wRi		ομοιόμορφη	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wHa		ομοιόμορφη	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wNo	B	πρόσθια	mod ⁺ resc ⁺
<i>D. mauritiana</i>	wMau		πρόσθια	mod ⁻ resc ⁺
<i>D. simulans</i>	wMa		πρόσθια	mod ⁻ resc ⁺

Για τη συλλογή των εμβρύων, τα έντομα τοποθετούνταν σε ειδικά κλουβιά για ωοαπόθεση σε τρυβλία Petri που περιείχαν μίγμα χυμού μήλου και 3% agar ενώ στο κέντρο τους τοποθετείτο μικρή ποσότητα νωπής μαγιάς. Η συλλογή των πρώιμων εμβρύων πραγματοποιούνταν κάθε δύο (2) ώρες ενώ τα έμβρυα που βρίσκονταν στα τελικά στάδια της ανάπτυξης συλλέγονταν κάθε 16 ώρες. Συνολικά συλλέγησαν περί τα 100-200 μl εμβρύων, αποχωριοποιήθηκαν, για 1 λεπτό σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (50% χλωρίνη – 50% νερό), ξεπλύθηκαν διαδοχικά με απιονισμένο νερό, ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα Trizol (Invitrogen) και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

Ολικό RNA απομονώθηκε μέσω επιλεκτικής εκχύλισης με Trizol (Invitrogene) και χλωροφόρμιο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθούμενη από κατακρήμνιση των

ριβονουκλεϊκών οξέων με τη χρήση ισοπροπανόλης. Η απομόνωση RNA επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το παραγόμενο RNA ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας την απορρόφησή του στα 260 nm. Η καθαρότητα του προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm και υπολογίζοντας το λόγο $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$.

4.2.2 Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Πριν τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA), το ολικό RNA υποβλήθηκε σε επεξεργασία με το ένζυμο της δεσοξυριβονουκλεάσης (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen) προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη DNA που παρέμειναν κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη αξιόπιστα αποτελέσματα. Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια (random hexamer primers) από την Promega. Η ποσότητα του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA ήταν 5μg. Το αρχικό μίγμα αντίδρασης περιείχε 5μg ολικού RNA, μίγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs) 0.1 mM, 50 ng εκκινητών (random hexamer primers) σε τελικό όγκο 15 μl. Το μίγμα RNA/εκκινητών υπέστη θερμική αποδιάταξη για 5 λεπτά στους 65°C και αμέσως τοποθετήθηκε σε πάγο για άλλα 5 λεπτά. Στη συνέχεια, σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 15μl από το μίγμα που περιείχε 1X ρυθμιστικό διάλυμα, 5mM MgCl₂, 0.01M DTT 40 U RnaseOUTTM, Recombinant Ribonuclease Inhibitor και 200 U από την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScriptTM III Reverse Transcriptase. Το νέο μίγμα παρέμεινε για 10 λεπτά στους 25°C και ακολούθησε επώαση για μία ώρα στους 42°C και για 5 λεπτά στους 85°C. Στη συνέχεια, διατηρώντας τις αντιδράσεις στον πάγο, προστέθηκαν 2U RNase H και επώασθηκαν στους 37°C για 20 λεπτά.

4.2.3 Ανίχνευση της μεταγραφής των γονιδίων αγκυρίνης

Η ανίχνευση της μεταγραφής των γονιδίων αγκυρίνης πραγματοποιήθηκε μέσω συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 1μl από κάθε μίγμα cDNA. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Από κάθε αντίδραση, 1-2 μl αποθηκεύονταν στους -20°C ενώ η υπόλοιπη ποσότητα ηλεκτροφορούσαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% σε διάλυμα 1× Tris-Acetate-EDTA το οποίο περιείχε 100 μg βρωμιούχο αιθίδιο για την ανίχνευση της μεταγραφής. Στις περιπτώσεις όπου η ενίσχυση δεν ήταν επιτυχής, χρησιμοποιήθηκε 1μl από το προϊόν ως

υπόστρωμα σε μια νέα αντίδραση PCR (nested PCR) χρησιμοποιώντας έναν εσωτερικό εκκινητή (Πίνακας 4.2) προκειμένου να ανιχνευτούν σπάνια.

Για τον έλεγχο της ποιότητας του cDNA που συντέθηκε πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις για την ενίσχυση του γονιδίου της κύριας επιφανειακής πρωτεΐνης της *Wolbachia* (Wsp) με τους εκκινητές wsp81F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' και wsp691R 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3' (Zhou *et al.*, 1998) καθώς και για την ενίσχυση του γονιδίου της ριβοσωμικής πρωτεΐνης της *Drosophila* *rp49* με τους εκκινητές TH61 5'-GTATCGACAACAGAGTC GGTCTGC-3' και TH62 5'-TTGGTGAGCGGACCGACAGCTGC-3' (Bourtzis *et al.* 1994). Η απουσία DNA μετά την κατεργασία του RNA με DNase I ελέγχθηκε μέσω της αρνητικής ενίσχυσης των γονιδίων *wsp* και *rp49* πριν την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA (-RT controls).

Πίνακας 4.2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης.

Γονίδιο αγκυρίνης	Πρόσθιος εκκινητής (5' - 3')	Οπίσθιος εκκινητής (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Ενδεικτική θερμοκρασία υβριδοποίησης (°C)
WD0035	ΑΑΤΑΑΤΤΓCCTGGΑΑΑΑΑΓΤ	TGGAGGCGCTACCTCT AGCGCAATATCCAAAGCATC *	261 115	50 53
WD0073	GTTGCATAGTTGGACATGAG	GCTATCAGTGCAGATACC GCTAACATAGCTGCAAGGCT *	275 208	52 56
WD0147	TGCGTTACACTGGGGCTACTA	GGTGTGTTTCAATAGTGTCTT CTAGCAACATAGTGCAGCGA *	523 219	55 58
WD0191	GCTATGGTAGGCAGTTTGG	TGTGGCCCCTTTTTACCA ATCGCTTTAGCCTGTTCATAG *	247 200	52 55
B	AGAGGGAATACATTACTACATCA	ATCGCTTTAGCCTGTTCATAG	396	54
WD0285	TGCAGGCAAAATTGTCTAAAAA	TCCTCACAΑΑΑΑΑΑGTCTGC ATACCTCCCTTGTCTCTTCATCAC *	541 390	50 54
WD0286	AATCAΑΑΑΑAGGAGCAGATG	TTTCACCTCTCTTTTTCG TTTTTGCTACTATCACACC *	392 388	50 50
WD0291	CCGATACATCTGTCACTTTTCG	CTAATGGGGCTAATGTTCTGTG TAAAGAGGGTTGGACACTCC *	339 200	58 58
WD0292	ATCGTACTTGATCTGCCCAT GATGAAGCAGGCTTTTCG *	AAGCAAGAGATCAAGGGATG	189 126	56 54
WD0294	ATGGCCATGAAGAGATAGTA	TCTTGTTACCCTTGGTTCA ATTAGCGGCTGATGATTG *	719 486	50 50
WD0385	AATCAGATAATAGCAΑΑGAAGG	GATCACCATTATTTTGTCA CATAAGTATACTAAACAΑACTACC *	304 160	52 52
WD0438	AACATTAGCCTTGAAGGTGC	TAGCGCCAGAGAAGAGG AGCGTTTATAGCCTTATGCAA *	755 153	54 56
WD0441	TGAGGTAGACATAGTGGCCTT	CATCTTGCTTATCGCACT TCGTACATTGCTGAGCTTTC *	235 192	50 58

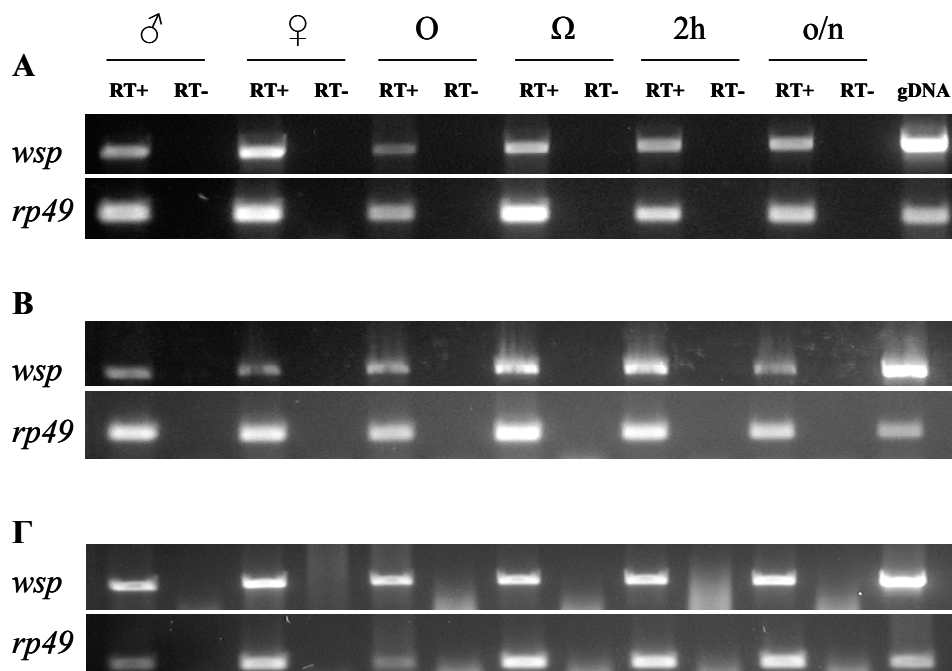
B	TAACAAATTCAAAGAGAGATACTAAGG	TACATCTCTGAGTCTTCTTCA	261	50
B	TCAGCACCTTGTAAATAAGAGAAAAG *		171	50
WD0498	GAATATCTGATAAAGAAAGGTG	TTGGCTCTAACTTCCAAT	451	50
		CGCAATCTAACGCATCAAAAC *	196	54
WD0514	TTATGCCATGCAACGACTAT	TCGCTAACGTAGGAAAGAA	700	54
		GTTTAAAGTTGCTGATCTTG *	112	52
WD0550	GTTTCAGCGTCGATACCCAAAG	ATACGCAGCCCCCATAGGAA	232	56
		GCAGCCCCCATAGGAAA *	228	50
WD0566	GCAAGAAAAAGGATGTTTAGA	TCATGTCTCTTTTTCAGCA	286	48
		CAGCATTATAGAGCAAAGTG *	274	54
WD0596	CCCTAACATTATAGCTGCGG	TCGCTAGCTCTTTCACCA	199	50
		CTGCACTCACTTGTTTCTCA *	144	58
WD0633	GTCTAGAACAAACAGAGGGGATC	CTCATCCATACTAGAGCTTG	500	58
		CCACGATTTACGAGCTCACTTTCA *	148	60
WD0636	CTGAAGAGTATGGCAGTAAATG	TTTTCGCATAATCCATCG	143	50
		GCATAATCCATCGCTGTCTATC *	139	60
B	CTACATTATGCAGTAGACGCAA	CAATCCTGTCTGTTTCTTCT	350	55
WD0637	TGGGAAAGTGAAAAGTATTATCTA	ATTTCGTTTACTTGGCACATTATC	267	50
WD0754	ACAAGCCATTACAGAGCGAT	GTGTGCGCTTGCTCTTCCA	456	54
		AAC TTGCTCAGAACCTACCG *	232	56
WD0766	AGATGTAATGCAGCTTCCAGAG	AAGTGTCTTTTCTGTCTCTC	301	54
		TGGTACAGATAGGGCAGTAG *	175	57
B	CTAATTGAACACGGAGCATAC	AGGACTAGCATTACCTGACA	310	50
B		GTCCACAAACTATCCACAC *	145	50
WD1213	AGTGTAGAAAGAAATAAGGCA	ATATCGACAGCCTCCTATTAC	159	55

*: Εσωτερικός εκκινητής για την επανενίσχυση (nested PCR)

B: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της μεταγραφής στα στέλεχη της υποομάδας B

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η έκφραση των 23 γονιδίων αγκυρίνης μελετήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω συμβατικής RT-PCR χρησιμοποιώντας RNA το οποίο απομονώθηκε από τις ωοθήκες, τους όρχεις, έμβρυα 2 και 16 ωρών καθώς και από ενήλικα άτομα (αρσενικά και θηλυκά) των 11 συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia* που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 4.2.3, για τον έλεγχο της ποιότητας του cDNA που συντέθηκε, ενισχύθηκε το γονίδιο της κύριας επιφανειακής πρωτεΐνης του βακτηρίου (*wsp*) καθώς και της ριβοσωμικής πρωτεΐνης *rp49* της *Drosophila*. Για τον έλεγχο επίσης της πλήρους απομάκρυνσης του γενωμικού DNA από τα δείγματα cDNA, οι ίδιοι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR με υπόστρωμα ολικού RNA πριν την προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης (-RT). Και οι δύο γενετικοί τόποι εκφράζονται σε όλα τα στελέχη της *Wolbachia*, σε όλους τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Αντίθετα, κανένα προϊόν ενίσχυσης δεν παρατηρήθηκε όταν ως υπόστρωμα για την PCR χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA πριν την προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης (Εικόνα 4.1) υποδηλώνοντας την καλή ποιότητα του cDNA απαλλαγμένο από ίχνη γενωμικού DNA.



Εικόνα 4.1. Αντιδράσεις ελέγχου της ποιότητας του cDNA στα στελέχη *wSan* (A), *wAu* (B) και *wNo* (Γ). Το RT- υποδηλώνει την απουσία της αντίστροφης μεταγραφάσης από την αντίδραση σύνθεσης του cDNA. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών, και gDNA: γενωμικό DNA.

Στις παραγράφους που ακολουθούν παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της μεταγραφής των ομολόγων γονιδίων για κάθε ένα στέλεχος της *Wolbachia*.

wMel: Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μεταγραφής των 23 γονιδίων αγκυρίνης όπως αυτή προκύπτει από την RT-PCR ενίσχυση ή/και την επανενίσχυση (nested RT-PCR).

<i>D. melanogaster</i> (wMel)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035						
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285						
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385						
WD0438						
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633						
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.3. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. melanogaster* (wMel), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα περισσότερα γονίδια αγκυρίνης (18 από τα 23) μεταγράφονται σε όλους τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια του στελέχους wMel. Μόνο τα δύο φαγικά γονίδια WD0286 και WD0294 δεν έδωσαν ανιχνεύσιμα επίπεδα μεταγραφής ακόμα και μετά την επανενίσχυση τους. Ωστόσο παρατηρούμε κάποιες ποσοτικές διαφορές στα επίπεδα της έκφρασης. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.3 η μεταγραφής των γονιδίων WD0035, WD0292 και WD0636 ανιχνεύθηκε μόνο μετά την επανενίσχυση γεγονός που οφείλεται στα χαμηλότερα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Επίσης, διαφορές παρατηρήσαμε και μεταξύ των διαφορετικών ιστών που μελετήθηκαν. Για παράδειγμα, το γονίδιο WD0073 εκφράζεται μόνο στα ενήλικα άτομα και στους αναπαραγωγικούς ιστούς ενώ η μεταγραφή δεν είναι ανιχνεύσιμη στα

έμβρυα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η φυλοειδική έκφραση του γονιδίου WD0514. Το γονίδιο εκφράζεται στα αρσενικά άτομα (ενήλικα άτομα και όρχεις) καθώς και στα ύστερα εμβρυικά στάδια.

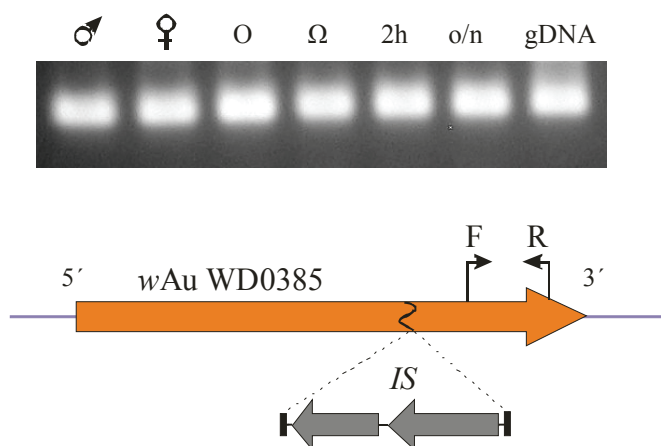
wMelpopcorn: Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μεταγραφής παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στο στέλεχος αυτό είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό όμοια με τα μεταγραφικά πρότυπα του στελεχούς wMel, γεγονός που αντικατοπτρίζει και τη συγγένεια των στελεχών. Αναλυτικότερα, και σε αυτή την περίπτωση, μόνο τα φαγικά γονίδια WD0286 και WD0294 δεν έδωσαν ανιχνεύσιμα επίπεδα μεταγραφής σε κανέναν από τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια ενώ 19 από τα 23 γονίδια εκφράζονται παντού. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι διαφορές μεταξύ των δύο στελεχών. Οι σημαντικότερες επικεντρώνονται στα γονίδια WD0514 και WD0636. Στην περίπτωση του γονιδίου WD0514 και στα δύο στελέχη παρατηρούμε φυλοειδική έκφραση με τη διαφορά ότι στο στέλεχος wMel το γονίδιο εκφράζεται μόνο στα αρσενικά άτομα ενώ στο στέλεχος wMelpopcorn εκφράζεται στα θηλυκά.

<i>D. melanogaster</i> (wMelPopcorn)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035						
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285						
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385						
WD0438						
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633						
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.4. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. melanogaster* (wMelPopcorn), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

Επίσης το φαγικό γονίδιο WD0636 εκφράζεται αποκλειστικά στους αναπαραγωγικούς ιστούς ενώ δεν ανιχνεύεται στα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια. Διαφορές εντοπίστηκαν επίσης και στο γονίδιο WD0073 το οποίο, σε αντίθεση με το *wMel*, εκφράζεται και στα έμβρυα καθώς και στο γονίδιο WD0385 το οποίο εκφράζεται στα ύστερα έμβρυα.

wAu: Στο στέλεχος αυτό, 17 από τα συνολικά 22 γονίδια αγκυρίνης (το γονίδιο WD0514 απουσιάζει) εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν όπως παρουσιάζεται με το πράσινο και μπλε χρώμα στον Πίνακα 4.5. Σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα στελέχη (*wMel* και *wMelporcorn*), μόνο για το φαγικό γονίδιο WD0286 δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση σε κανέναν από τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια. Για το γονίδιο WD0294 ανιχνεύτηκαν χαμηλά, μετά από επανενίσχυση, επίπεδα έκφρασης στους σωματικούς ιστούς των ενήλικων θηλυκών ατόμων και στα πρώιμα έμβρυα. Ενδιαφέρουσες διαφορές με τα προηγούμενα στελέχη παρατηρήθηκαν για τα γονίδια WD0147, WD0285 και WD0637. Στην πρώτη περίπτωση, τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου στα έμβρυα ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης ακόμα και μετά την επανενίσχυση. Επίσης, στην περίπτωση του γονιδίου WD0285 δεν παρατηρήσαμε έκφραση σε κανέναν από τους αναπαραγωγικούς ιστούς όπως επίσης και στα ύστερα εμβρυικά στάδια ενώ το γονίδιο WD0637 δεν εκφράζεται στις ωοθήκες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι παρόλο που το γονίδιο WD0385 έχει γίνει στόχος ένθεσης ενός μεταθέσιμου στοιχείου στο στέλεχος *wAu* τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν χαμηλά επίπεδα μεταγραφής του 3' άκρου του γονιδίου σε όλους τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.2.



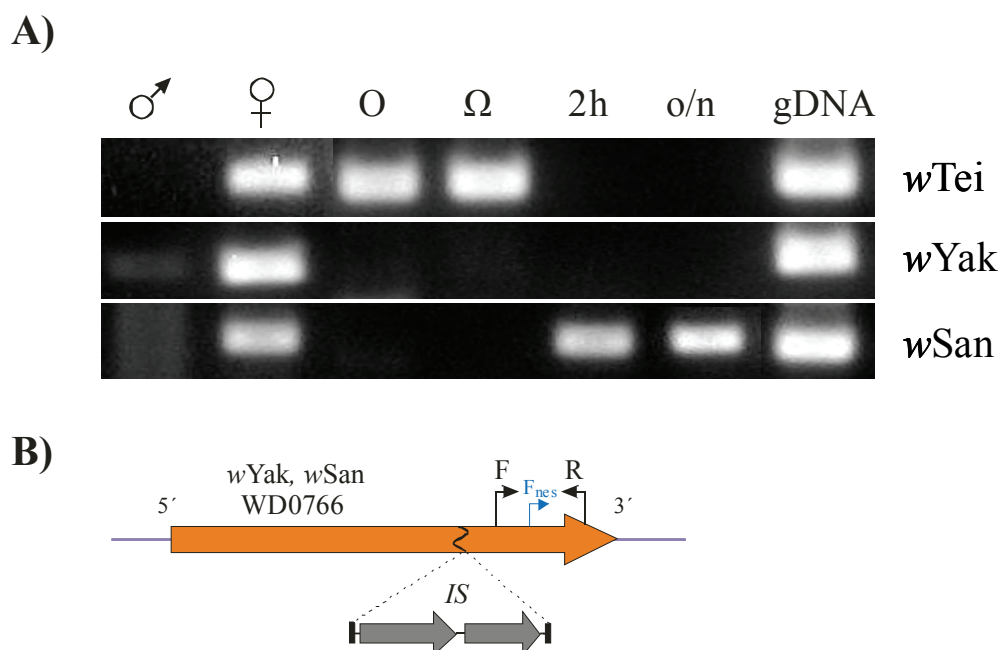
Εικόνα 4.2. Μεταγραφή του 3' άκρου του ομολόγου γονιδίου WD0385 στο στέλεχος *wAu*. Η θέση του μεταθέσιμου στοιχείου καθώς και η περιοχή ενίσχυσης των εκκινήτων φαίνεται στη γραφική απεικόνιση του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών, και gDNA: γενομικό DNA.

<i>D. simulans</i> (wAu)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035	blue	blue	blue	blue	green	green
WD0073	green	blue	blue	blue	blue	blue
WD0147	green	green	green	green	red	red
WD0191	green	green	green	green	green	green
WD0285	green	green	red	red	green	red
WD0286	red	red	red	red	red	red
WD0291	green	green	green	green	green	green
WD0292	green	green	blue	blue	blue	blue
WD0294	red	blue	red	red	blue	red
WD0385	blue	green	green	blue	blue	blue
WD0438	green	green	green	green	green	green
WD0441	green	green	green	green	green	green
WD0498	green	green	green	green	green	green
WD0514	hatched	hatched	hatched	hatched	hatched	hatched
WD0550	green	green	green	green	green	green
WD0566	blue	blue	blue	green	green	green
WD0596	green	green	green	green	green	green
WD0633	green	green	green	green	green	green
WD0636	green	green	green	green	green	green
WD0637	green	green	green	red	green	green
WD0754	green	green	green	green	green	green
WD0766	green	green	green	green	green	blue
WD1213	green	green	green	green	green	green

Πίνακας 4.5. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. melanogaster* (wMel), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης ενώ με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλικά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

***D. teissieri* (wTei), *D. yakuba* (wYak) και *D. santomea* (wSan):** Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης των τριών αυτών συγγενικών στελεχών διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, συγκρινόμενα με αυτά των προηγούμενων στελεχών (Πίνακας 4.6). Σε γενικές γραμμές, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων είναι χαμηλότερα σε σχέση με τις προηγούμενες συμβιωτικές σχέσεις. Συνοπτικά, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.6, μπορούμε να παρατηρήσουμε τα εξής: (α) τα γονίδια WD0291, WD0292 και WD1213 εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια των τριών συμβιωτικών σχέσεων, (β) δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση των γονιδίων WD0286, WD0294 και WD0514 σε καμία από τις τρεις συμβιωτικές σχέσεις και για κανένα αναπτυξιακό στάδιο ή ιστό που μελετήθηκε, (γ) το προφαγικό γονίδιο WD0566 εκφράζεται κυρίως στα εμβρυικά στάδια ενώ δεν ανιχνεύθηκε στους αναπαραγωγικούς ιστούς και των τριών συμβιωτικών σχέσεων, (δ) όπως παρουσιάστηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, στα ομόλογα του γονιδίου WD0766 στα στελέχη wYak και wSan έχει εντεθεί ένα μεταθέσιμο στοιχείο. Είναι αξιοσημείωτο ότι και στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του 3' άκρου του γονιδίου μόνο μετά την χρήση

εμφωλιασμένης (nested) PCR (Εικόνα 4.3). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι, σε αντίθεση με το πολύ συγγενικό στέλεχος *wTei*, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση στους αναπαραγωγικούς ιστούς (όρχεις και ωοθήκες) των στελεχών *wYak* και *wSan*. Αντιθέτως, το γονίδιο εκφράζεται στα ενήλικα θηλυκά άτομα και των τριών στελεχών. Επιπλέον στο στέλεχος *wSan* ανιχνεύτηκε έκφραση του γονιδίου και στα εμβρυικά στάδια και (ε) τα υπόλοιπα γονίδια παρουσιάζουν ανομοιογενή μεταγραφικά πρότυπα μεταξύ των τριών συμβιωτικών σχέσεων ανάλογα με τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο.



Εικόνα 4.3. RT-PCR ανάλυση της έκφρασης του ομολόγου γονιδίου WD0766 στα συγγενικά στελέχη *wTei*, *wYak* και *wSan*. A) Αποτελέσματα εμφωλιασμένης (nested) PCR όπου φαίνεται η απουσία έκφρασης στους αναπαραγωγικούς ιστούς των στελεχών *wYak* και *wSan*. B) Γραφική απεικόνιση του γονιδίου στα στελέχη *wYak* και *wSan* όπου διακρίνεται η περιοχή ένθεσης του μεταθέσιμου γενετικού στοιχείου καθώς και η περιοχή ενίσχυσης των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών, και gDNA: γενωμικό DNA.

Πίνακας 4.6. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων ανγκυρίνης στις συμβιωτικές σχέσεις *D. teissieri* (wTei), *D. yakuba* (wYak) και *D. santomea* (wSan) όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου, με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφολιασμένης (nested) PCR, ενώ με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται οι περιπτώσεις όπου τα επίεδα έκφρασης είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, Ο: όρχις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και ο/η: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

	<i>D. teissieri</i> (wTei)						<i>D. yakuba</i> (wYak)						<i>D. santomea</i> (wSan)					
	♂	♀	O	Ω	2h	o/n	♂	♀	O	Ω	2h	o/n	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red
WD0073	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Green	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red
WD0147	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red
WD0191	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red
WD0285	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue
WD0286	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red
WD0291	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Green	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Green	Red	Green
WD0292	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue
WD0294	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red
WD0385	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue
WD0438	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue
WD0441	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue
WD0498	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue
WD0514	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue
WD0550	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Green
WD0566	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Green
WD0596	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Green	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Green
WD0633	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Green
WD0636	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Green
WD0637	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Green
WD0754	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue
WD0766	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Blue
WD1213	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Green	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red	Green

***D. simulans* (wRi):** Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wRi στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wRi). Έξι από τα 23 γονίδια αγκυρίνης του στελέχους αναφοράς wMel (WD0285, WD0286, WD0291, WD0292, WD0294, WD0514), συμπεριλαμβανομένου των γονιδίων αγκυρίνης του προφάγου WO-A, δεν περιλαμβάνονται στο ρεπερτόριο του στελέχους wRi. Η πλειονότητα των υπολοίπων γονιδίων εκφράζεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς με κάποιες ποσοτικές διαφορές. Για παράδειγμα, τα γονίδια WD0035, WD0073, WD0191 και WD0636 εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα καθώς ανιχνεύθηκαν μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η φυλοειδική έκφραση του χρωμοσωμικού γονιδίου WD0438. Το γονίδιο εκφράζεται στα θηλυκά ενήλικα άτομα και στις ωοθήκες καθώς επίσης και στα εμβρυικά στάδια ενώ δεν ανιχνεύεται η έκφραση του στους ιστούς των αρσενικών εντόμων.

<i>D. simulans</i> (wRi)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035						
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285						
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385						
WD0438						
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633						
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.7. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wRi), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης ενώ με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών και o/n: έμβρυα 16 ωρών. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

***D. simulans* (wHa):** Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wHa στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wHa). Όπως αναφέρθηκε και στο δεύτερο κεφάλαιο, 6 από τα 23 γονίδια αγκυρίνης του στελέχους αναφοράς wMel δεν ανιχνεύθηκαν στην συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wHa). Για τα υπόλοιπα 17 γονίδια προκύπτουν τα εξής: (α) η έκφραση 6 γονιδίων αγκυρίνης ανιχνεύθηκε σε όλους τους ιστούς και τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Από αυτά, τα γονίδια, τα WD0191, WD0291 και WD1213 παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης ενώ τα WD0073, WD0292 τα χαμηλότερα καθώς ανιχνεύθηκαν μόνο μετά τη χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR, (β) τρία γονίδια αγκυρίνης που σχετίζονται με τον προφάγο WO-A (WD0285, WD0286, WD294) εκφράζονται μόνο στους σωματικούς ιστούς των ενηλίκων ατόμων καθώς δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση στους αναπαραγωγικούς ιστούς και στα έμβρυα, (γ) για 3 γονίδια αγκυρίνης, τα WD0385, WD0438 και WD0633, δεν κατέστη δυνατή η μελέτη της έκφρασης λόγω αδυναμίας ενίσχυσης των ομολόγων αυτών.

<i>D. simulans</i> (wHa)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035						
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285						
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385	?					
WD0438	?					
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633	?					
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.8. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wHa), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

***D. simulans* (wNo):** Στον Πίνακα 4.9 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wNo στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wNo). Σε αντίθεση με τα στελέχη *Wolbachia* που ανήκουν στην υπερομάδας A, στα στελέχη της υπερομάδας B δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση των περισσότερων γονιδίων αγκυρίνης. Από τα 11 γονίδια αγκυρίνης που ανιχνεύτηκαν στην σχέση *D. simulans* (wNo) παρατηρούμε ότι: (α) τρία γονίδια (WD0191, WD0441, WD0636) δεν εμφανίζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης σε κανένα από τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς, (β) τα γονίδια WD0498, WD0766 και WD1213 εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς με εξαίρεση την απουσία έκφρασης του ομολόγου του WD0498 στις ωοθήκες και του WD1213 στα ενήλικα θηλυκά άτομα (γ) για το προφαγικό γονίδιο WD0637 ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης μόνο στα ενήλικα θηλυκά άτομα και (δ) για 4 γονίδια αγκυρίνης δεν κατέστη δυνατή η μελέτη της έκφρασης λόγω αδυναμίας ενίσχυσης των ομολόγων αυτών.

<i>D. simulans</i> (wNo)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035	?					
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285	?					
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385	?					
WD0438	?					
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633						
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.9. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wNo), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

***D. mauritiana* (wMau):** Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wMau στη συμβιωτική σχέση *D. mauritiana* (wMau). Από τα 9 συνολικά γονίδια αγκυρίνης που ανιχνεύθηκαν στην συμβιωτική αυτή σχέση: (α) τα επίπεδα έκφρασης του χρωμοσωμικού γονιδίου WD0191, και των προφαγικών WD0636 και WD0637 βρίσκονται κάτω από τα όρια ανίχνευσης καθώς δεν προέκυψε κάποιο προϊόν ενίσχυσης ούτε μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR, (β) αντιθέτως, τα γονίδια WD0498 και WD0766 εκφράζονται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς που μελετήθηκαν, (γ) τα γονίδια WD0441 και WD1213 εκφράζονται κυρίως στους αναπαραγωγικούς ιστούς και στα έμβρυα και (δ) όπως και στο στέλεχος wNo, δεν ήταν δυνατή η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων WD0035 και WD0438 λόγω αδυναμίας ενίσχυσης τους.

***D. mauritiana*
(wMau)**

	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035	?					
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285						
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385						
WD0438	?					
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633						
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.10. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. mauritiana* (wMau), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

***D. simulans* (wMa):** Στον Πίνακα 4.11 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της έκφρασης των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης του στελέχους wMa στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wMa). Τα μεταγραφικά πρότυπα είναι παρόμοια με αυτά των δύο προηγούμενων συμβιωτικών σχέσεων. Και σε αυτή την περίπτωση, η έκφραση των γονιδίων WD0191 και WD0636 είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης, ενώ τα γονίδια WD0498 και WD0766 εκφράζονται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η φυλοειδική έκφραση του γονιδίου WD0441 το οποίο ανιχνεύεται στους ιστούς των θηλυκών εντόμων καθώς επίσης και στα έμβρυα 2 ωρών. Επιπλέον, για το προφαγικό γονίδιο WD0637 ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στους όρχεις. Τέλος, δεν ήταν δυνατή η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων WD0035 και WD0438 λόγω αδυναμίας ενίσχυσης τους.

<i>D. simulans</i> (wMa)	♂	♀	O	Ω	2h	o/n
WD0035	?					
WD0073						
WD0147						
WD0191						
WD0285						
WD0286						
WD0291						
WD0292						
WD0294						
WD0385						
WD0438	?					
WD0441						
WD0498						
WD0514						
WD0550						
WD0566						
WD0596						
WD0633						
WD0636						
WD0637						
WD0754						
WD0766						
WD1213						

Πίνακας 4.11. Τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wMa), όπως προέκυψαν από την RT-PCR ανάλυση. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η έκφραση του γονιδίου. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η ανίχνευση έκφρασης μόνο μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η απουσία έκφρασης. Με τη διαγράμμιση συμβολίζεται η απουσία του γονιδίου. ♂: ενήλικα αρσενικά άτομα, ♀: ενήλικα θηλυκά άτομα, O: όρχεις, Ω: ωοθήκες, 2h: έμβρυα 2 ωρών, o/n: έμβρυα 16 ωρών και ?: η μελέτη της έκφρασης δεν ήταν δυνατή λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του ομολόγου γονιδίου. Με πορτοκαλί χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια των δύο προφαγικών στοιχείων.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.4.1 Η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των συμβιωτικών σχέσεων και των αναπτυξιακών σταδίων του ξενιστή

Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ότι τα μεταγραφικά πρότυπα των γονιδίων αγκυρίνης διαφέρουν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, ανάλογα με την συμβιωτική σχέση, τον ιστό ή/και το αναπτυξιακό στάδιο που μελετήθηκαν. Οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίστηκαν στις τρεις συμβιωτικές σχέσεις *D. teissieri* (wTei), *D. yakuba* (wYak) και *D. santomea* (wSan). Σε γενικές γραμμές, τα γονίδια αγκυρίνης των στελεχών αυτών εμφανίζουν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης. Επίσης, πολλά από τα γονίδια δεν παρουσίασαν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης ακόμα και μετά την χρήση εμφωλιασμένης (nested) PCR. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στα πολύ χαμηλά επίπεδα μόλυνσης που χαρακτηρίζουν τα στελέχη *Wolbachia* αυτών των συμβιωτικών σχέσεων (Veneti *et al.* 2003, 2004), παρά σε πραγματική απουσία έκφρασης. Είναι αξιοσημείωτο ότι ορισμένα γονίδια αγκυρίνης, όπως τα προφαγικά (WD0291, WD0292, WD0633) και χρωμοσωμικά (WD0550 και WD1213) γονίδια, εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς των συμβιωτικών σχέσεων που ανιχνεύονται. Μάλιστα το WD1213 ανήκει στην ομάδα των 9 γονιδίων αγκυρίνης (WD0035, WD0191, WD0438, WD0441, WD0498, WD0636, WD0637, WD0766, WD1213) τα οποία ανιχνεύθηκαν σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό πιθανόν να σχετίζεται με τον ρόλο που μπορεί να έχουν τα γονίδια αυτά στην πραγματοποίηση βασικών λειτουργιών, όπως για παράδειγμα η εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων ή/και η αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Επιπλέον, όπως προκύπτει και από τον λόγο Ka/Ks (Κεφάλαιο 3), τα προφαγικά γονίδια WD0291 και WD0292 πιθανόν να υπόκεινται σε θετική επιλογή, γεγονός που πιθανά αντικατοπτρίζει τον κεντρικό ρόλο των γονιδίων αυτών και επομένως την ευρεία έκφραση τους.

Τα υπόλοιπα γονίδια παρουσιάζουν ανομοιογενή μεταγραφικά πρότυπα ανάλογα με τη συμβιωτική σχέση που εξετάζεται. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις ιστοειδικής έκφρασης κάποιων εκ των γονιδίων αγκυρίνης, που πιθανόν αντικατοπτρίζουν πιο εξειδικευμένες λειτουργίες των γονιδίων αυτών. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονιδίωμα της *Wolbachia* κωδικοποιεί για έναν μικρό αριθμό ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό ίσως υποδηλώνει ότι η διαφορική έκφραση των γονιδίων της σε διαφορετικούς ιστούς και αναπτυξιακά στάδια είναι περιορισμένη (Fenn & Blaxter 2006). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εστιάζεται στη φυλοειδική έκφραση μερικών αγκυρινών που ίσως σχετίζεται με την επαγωγή ή την ρύθμιση των αναπα-

ραγωγικών φαινοτύπων όπως της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Ένα παράδειγμα φυλοειδικής έκφρασης είναι αυτό του γονιδίου WD0514. Όπως παρουσιάστηκε και στο δεύτερο κεφάλαιο, το γονίδιο ανιχνεύεται σε 5 από τις 11 συμβιωτικές σχέσεις. Στη συμβιωτική σχέση *D. melanogaster* (wMel) το γονίδιο εκφράζεται στα ενήλικα αρσενικά άτομα και στους όρχεις καθώς επίσης και στα έμβρυα των 16 ωρών. Ωστόσο, στο συγγενικό στέλεχος wMelPorcorn το γονίδιο εκφράζεται μόνο στους θηλυκούς ιστούς (ενήλικα άτομα και ωοθήκες). Και τα δύο στελέχη έχουν την ικανότητα να επάγουν κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Επίσης, το στέλεχος wMelPorcorn χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης στους σωματικούς ιστούς των εντόμων (νευρικό και μυϊκό σύστημα) με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής του ξενιστή (Min & Benzer 1997). Είναι αξιοσημείωτο ότι, στις τρεις συμβιωτικές σχέσεις *D. teissieri* (wTei), *D. yakuba* (wYak) και *D. santomea* (wSan), που χαρακτηρίζονται με το φαινότυπο (*mod⁺/resc⁺*) [Zabalou *et al.* 2004], δεν παρατηρήθηκαν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε κανέναν ιστό και αναπτυξιακό στάδιο. Μάλιστα, τα ομόλογα γονίδια των τριών αυτών στελεχών είναι κατά 2 επαναλήψεις αγκυρίνης μικρότερα σε σχέση με εκείνα των στελεχών wMel και wMelPorcorn (Κεφάλαιο 3). Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστό αν ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να σχετίζεται με τις παρατηρούμενες διαφορές στην έκφραση τους.

Περιπτώσεις φυλοειδικής έκφρασης έχουν αναφερθεί και σε άλλες συμβιωτικές σχέσεις, όπως στην περίπτωση του κουνουπιού *C. pipiens* (Sinkins *et al.* 2005; Duron *et al.* 2007; Walker *et al.* 2007). Ο Sinkins και οι συνεργάτες του (2005) ανέφεραν την ύπαρξη φυλοειδικών διαφορών όταν μελέτησαν την έκφραση δύο αμφίδρομα ασύμβατων πληθυσμών κουνουπιού του είδους *C. quinquefasciatus* (Sinkins *et al.* 2005). Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι το προφαγικό γονίδιο *pk2* (WD0636) εκφράζεται μόνο στα θηλυκά άτομα γεγονός που το κατέστησε υποψήφιο για την εμπλοκή του στην επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Η ίδια ομάδα, δύο χρόνια αργότερα, χρησιμοποιώντας συμβατική RT-PCR και qRT-PCR επιβεβαίωσαν την ύπαρξη φυλοειδικών διαφορών μόνο σε ορισμένες συμβιωτικές σχέσεις και για άλλα δύο γονίδια αγκυρίνης *pk1* (WD0596) και *ank2* (Walker *et al.* 2007). Ωστόσο τα αποτελέσματά τους δεν ήταν δυνατόν να συσχετιστούν άμεσα με τον φαινότυπο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Το ίδιο έτος, μια δεύτερη ερευνητική ομάδα χρησιμοποιώντας qRT-PCR μελέτησε την έκφραση 58 γονιδίων αγκυρίνης σε 7 διαφορετικούς πληθυσμούς κουνουπιού (Duron *et al.* 2007). Σε αυτή την περίπτωση, τα προαναφερθέντα γονίδια βρέθηκε ότι εκφράζονται στους ιστούς και των δύο φύλων με μικρές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης. Ωστόσο, οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν κυρίως στα διαφορετικά επίπεδα μόλυνσης της *Wolbachia* μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων παρά στην διαφορική ρύθμιση της έκφρασης. Στην περίπτωση των συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia* τα οποία αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας διατριβής, δεν εντοπί-

στηκαν σημαντικές φυλοειδικές διαφορές στην έκφραση των δύο προφαγικών γονιδίων WD0596 και WD0636. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης του WD0636 ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης και στα τρία στελέχη της υπερομάδας B (wNo, wMa, wMau) που εξετάστηκαν. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, δεν κατέστη δυνατή η άμεση συσχέτιση των ποιοτικών καθώς και των ποσοτικών διαφορών στην έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης με την *Wolbachia*-επαγόμενη κυτταροπλασματική ασυμβατότητα.

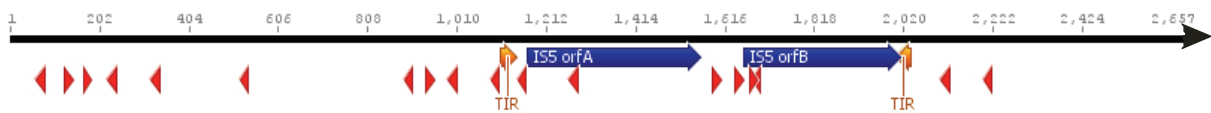
4.4.2 Είναι τα “ψευδογονίδια” αγκυρίνης λειτουργικά;

Όπως προαναφέρθηκε, κάποια από τα γονίδια αγκυρίνης έχουν υποστεί σημαντικές δομικές αλλαγές είτε λόγω ένθεσης μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων είτε μεταλλάξεων μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα γονίδια αυτά εμφανίζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης παρά το γεγονός ότι βρίσκονται στο στάδιο “εκφυλισμού”. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα των γονιδίων αγκυρίνης WD0385 στη συμβιωτική σχέση *D. simulans* (wAu) και WD0766 στις συμβιωτικές σχέσεις *D. yakuba* (wYak) και *D. santomea* (wSan). Και στις τρεις περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του 3' άκρου των γονιδίων. Μάλιστα, σε μια προηγούμενη μελέτη, οι ερευνητές έδειξαν ότι μεταγράφεται εξίσου και το 5' άκρο του γονιδίου WD0385 στο στέλεχος wAu, ενώ αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε έκφραση κατά μήκος της ένθεσης (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα δύο τμήματα του γονιδίου, εκατέρωθεν του μεταθέσιμου στοιχείου, έχουν την δυνατότητα να μεταγράφονται ανεξάρτητα σαν δυο ξεχωριστά γονίδια. Ενδιαφέρουσα είναι και η περίπτωση των ομολόγων του γονιδίου WD1213 στα τρία στελέχη που ανήκουν στη B υπερομάδα. Όπως παρουσιάστηκε στο τρίτο κεφάλαιο, τα τρία ομόλογα έχουν υποστεί μετατόπιση του αναγνωστικού τους πλαισίου λόγω πολλαπλών νουκλεοτιδικών ενθέσεων ή/και ελλειμμάτων. Ωστόσο και τα τρία γονίδια παραμένουν μεταγραφικά ενεργά.

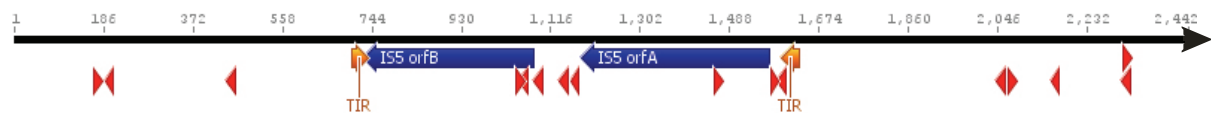
Το ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσον τα γονίδια αυτά βρίσκονται στο στάδιο εκφυλισμού ή παραμένουν λειτουργικά. Σε αντίθεση με τα περισσότερα βακτήρια, η ύπαρξη μεγάλου αριθμού εκφυλισμένων γονιδίων (pseudogenes) είναι σχετικά κοινή στα υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια (Andersson & Andersson 1999a,b; Andersson & Andersson 2001; Ochman & Moran 2001). Μάλιστα, όπως προκύπτει από μελέτες, πολλά από τα εκφυλισμένα γονίδια παραμένουν μεταγραφικά ενεργά δημιουργώντας πολλά ερωτήματα ως προς τη διαδικασία του εκφυλισμού τους καθώς και τον πιθανό τους ρόλο (Ogata *et al.* 2001; Davids *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2009). Πιστεύεται ότι η μεταγραφή παρόμοιων εκφυλισμένων γονιδίων είναι προσωρινή και παρατηρείται κατά τα πρώτα στάδια της διαδικασίας εκφυλισμού ενός γονιδίου (Davids *et al.* 2002). Μάλιστα, στην περίπτωση των υποχρεωτικά ενδοκυττάρων βακτηρίων, εικάζεται ότι λό-

γω του υψηλού ποσοστού αδενίνης και θυμίνης η ρύθμιση της μεταγραφής είναι λιγότερο αποδοτική. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι βακτηριακοί υποκινητές της μεταγραφής (όπως για παράδειγμα το πλαίσιο του Pribnow) είναι πλούσιοι στις παραπάνω βάσεις. Συνεπώς, η συχνότητα εμφάνισης τους μέσα στα γονίδια είναι μεγαλύτερη (Andersson *et al.* 1998; Ogata *et al.* 2001; Davids *et al.* 2002). Πράγματι, η εξέταση των γονιδίων αγκυρίνης, που έχουν υποστεί ρήξη λόγω ένθεσης μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων, αποκάλυψε την ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού πιθανών υποκινητών της μεταγραφής (Εικόνα 4.4). Η ύπαρξη τους θα μπορούσε να οδηγήσει στη διατήρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδιακών αυτών τμημάτων.

A)



B)



Εικόνα 4.4. Γραφική αναπαράσταση του ομολόγου γονιδίου WD0766 στα στελέχη wYak και wSan (A) και του ομολόγου γονιδίου WD0385 στο στέλεχος wAu (B), τα οποία έχουν υποστεί ρήξη λόγω ένθεσης μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων. Με τα μπλε βέλη αναπαρίστανται τα γονίδια των τρανσποζασών ενώ με τα πορτοκαλί βέλη οι αντίστροφες επαναληπτικές ακολουθίες. Τα κόκκινα βέλη αναπαριστούν τη θέση και την κατεύθυνση πιθανών υποκινητών της μεταγραφής (πλαίσιο του Pribnow).

Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο εάν τα μόρια αυτά RNA που παράγονται από εκφυλισμένα γονίδια αγκυρίνης αποτελούν απλώς απομεινάρια παλαιών λειτουργικών γονιδίων ή παίζουν κάποιον ρόλο στη βιολογία της *Wolbachia*. Μια πολύ ενδιαφέρουσα υπόθεση που επικρατεί τα τελευταία χρόνια είναι ότι τα εκφυλισμένα αυτά γονίδια λειτουργούν σαν μια νέα κατηγορία μη κωδικοποιών μορίων RNA (non-coding RNAs ή nc-RNAs). Τα μόρια αυτά λειτουργούν ως ρυθμιστές της μεταγραφής άλλων γονιδίων (Eddy 2001; Erdmann *et al.* 2001a,b). Πράγματι, παρόμοια μη-κωδικοποιά μόρια RNA έχουν βρεθεί σε έναν μεγάλο αριθμό οργανισμών, τόσο προκαρυωτικών όσο και ευκαρυωτικών, και μπορούν να συμμετέχουν σε μηχανισμούς όπως: (α) η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, (β) η γενομική τροποποίηση (genomic imprinting), (γ) η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και (δ) η κυτταρική διαφοροποίηση (Erdmann *et al.* 2001b).

Ανακεφαλαιώνοντας, ο ρόλος των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* παραμένει ακόμα άγνωστος. Παρόλα αυτά, αποτελούν βασικούς υποψηφίους για συμμετοχή στις αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου με τους ξενιστές στους, όπως η εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων και η επαγωγή αναπαραγωγικών φαινοτύπων. Σημαντικά στοιχεία έχουν προκύψει από τη μελέτη συγγενικών βακτηρίων, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη AnkA από την *Anaplasma phagocytophilum*. Η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε ότι εκκρίνεται μέσω ενός συστήματος έκκρισης τύπου IV και δεσμεύεται στη χρωματίνη του ξενιστή (Caturegli *et al.* 2000). Επίσης σε μια πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι μία πρωτεΐνη με επαναλήψεις αγκυρίνης (p200) από την *Ehrlichia chaffeensis* δεσμεύεται σε ρυθμιστές του τύπου *Alu-Sx* στους πυρήνες των ανθρώπινων φαγοκυττάρων (Zhu *et al.* 2009). Γονίδια τα οποία χρησιμοποιούν αυτού του τύπου τους ρυθμιστές σχετίζονται: (α) με τη ρύθμιση της μεταγραφής, (β) την απόπτωση καθώς και (γ) δομικές πρωτεΐνες του πυρήνα και των οργανιδίων του κυττάρου (Zhu *et al.* 2009).

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Οι διαφορές αυτές εξαρτώνται από τη συμβιωτική σχέση καθώς και από τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο που εξετάζεται. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φυλοειδικές διαφορές, γιατί μπορεί να συνδέονται με τους μηχανισμούς επαγωγής των αναπαραγωγικών φαινοτύπων όπως αυτός της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Ωστόσο, ένας άμεσος συσχετισμός της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης με τους φαινοτύπους της *Wolbachia* δεν κατέστη δυνατός στην παρούσα μελέτη. Η αδυναμία αυτή μάλιστα, μπορεί να σχετίζεται με την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει την επαγωγή των φαινοτύπων αυτών. Επίσης, ένα σημαντικό εύρημα ήταν και η ανίχνευση της έκφρασης των εκφυλισμένων γονιδίων αγκυρίνης. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό δεν είναι ακόμα κατανοητός, αλλά δίνει νέες προεκτάσεις όσον αφορά τον λειτουργικό ρόλο παρόμοιων γονιδίων. Η αποσαφήνιση του ρόλου της οικογένειας αυτής των γονιδίων θα δώσει νέα στοιχεία και θα βοηθήσει στην κατανόηση της βιολογίας ενός από τους πιο ιδιαίτερους συμβιώτες στη φύση.

4.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson, J. O., and S. G. E. Andersson.** 1999a. Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**:664-671.
- Andersson, J. O., and S. G. E. Andersson.** 1999b. Genome degradation is an ongoing process in *Rickettsia*. *Molecular Biology and Evolution* **16**:1178-1191.
- Andersson, J. O., and S. G. E. Andersson.** 2001. Pseudogenes, junk DNA, and the dynamics of *Rickettsia* genomes. *Molecular Biology and Evolution* **18**:829-839.
- Andersson, S. G. E., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler, and C. G. Kurland.** 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**:133-140.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, P. Onyango and C. Savakis.** 1994. A prokaryotic *dnaA* sequence in *D. melanogaster*: *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Molecular Biology* **3**:131-142.
- Callaini, G., M. G. Riparbelli, and R. Dallai.** 1994. The Distribution of Cytoplasmic Bacteria in the Early *Drosophila* Embryo Is Mediated by Astral Microtubules. *Journal of Cell Science* **107**:673-682.
- Caturegli, P., K. M. Asanovich, J. J. Walls, J. S. Bakken, J. E. Madigan, V. L. Popov, and J. S. Dumler.** 2000. *ankA*: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infection and Immunity* **68**:5277-5283.
- Clark, M. E., and T. L. Karr.** 2002. Distribution of *Wolbachia* within *Drosophila* reproductive tissue: Implications for the expression of cytoplasmic incompatibility. *Integrative and Comparative Biology* **42**:332-339.
- Clark, M. E., Z. Veneti, K. Bourtzis, and T. L. Karr.** 2002. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **111**:3-15.
- Clark, M. E., Z. Veneti, K. Bourtzis, and T. L. Karr.** 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mechanisms of Development* **120**:185-198.
- Davids, W., H. Amiri, and S. G. E. Andersson.** 2002. Small RNAs in *Rickettsia*: are they functional? *Trends in Genetics* **18**:331-334.

- Dobson, S. L., K. Bourtzis, H. R. Braig, B. F. Jones, W. G. Zhou, F. Rousset, and S. L. O'Neill.** 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**:153-160.
- Duron, O., A. Boureux, P. Echaubard, A. Berthomieu, C. Berticat, P. Fort, and M. Weill.** 2007. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Bacteriology* **189**:4442-4448.
- Eddy, S. R.** 2001. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics* **2**:919-929.
- Erdmann, V. A., M. Z. Barciszewska, A. Hochberg, N. de Groot, and J. Barciszewski.** 2001a. Regulatory RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**:960-977.
- Erdmann, V. A., M. Z. Barciszewska, M. Szymanski, A. Hochberg, N. de Groot, and J. Barciszewski.** 2001b. The non-coding RNAs as riboregulators. *Nucleic Acids Research* **29**:189-193.
- Fenn, K., and M. Blaxter.** 2006. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends in Parasitology* **22**:60-65.
- Ferree, P. M., H. M. Frydman, J. M. Li, J. Cao, E. Wieschaus, and W. Sullivan.** 2005. *Wolbachia* utilizes host microtubules and dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. *PLoS Pathogens* **1**:111-124.
- Ferree, P. M., and W. Sullivan.** 2006. A genetic test of the role of the maternal pronucleus in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **173**:839-847.
- Foster, J., M. Ganatra, I. Kamal, J. Ware, K. Makarova, N. Ivanova, A. Bhattacharyya, V. Kapatral, S. Kumar, J. Posfai, T. Vincze, J. Ingram, L. Moran, A. Lapidus, M. Omelchenko, N. Kyrpides, E. Ghedin, S. Wang, E. Goltsman, V. Joukov, O. Ostrovskaya, K. Tsukerman, M. Mazur, D. Comb, E. Koonin, and B. Slatko.** 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* **3**:599-614.
- Iturbe-Ormaetxe, I., G. R. Burke, M. Riegler, and S. L. O'Neill.** 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology* **187**:5136-5145.
- Klasson, L., T. Walker, M. Sebaihia, M. J. Sanders, M. A. Quail, A. Lord, S. Sanders, J. Earl, S. L. O'Neill, N. Thomson, S. P. Sinkins, and J. Parkhill.** 2008. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. *Molecular Biology and Evolution* **25**:1877-1887.

- Klasson, L., J. Westberg, P. Sapountzis, K. Nasiund, Y. Lutnaes, A. C. Darby, Z. Veneti, L. M. Chen, H. R. Braig, R. Garrett, K. Bourtzis, and S. G. E. Andersson.** 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:5725-5730.
- Kose, H., and T. L. Karr.** 1995. Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal-antibody. *Mechanisms of Development* **51**:275-288.
- Masui, S., S. Kamoda, T. Sasaki, and H. Ishikawa.** 2000. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *Journal of Molecular Evolution* **51**:491-497.
- Min, K.-T., and S. Benzer.** 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**:10792-10796.
- Nakamura, K., T. Akama, P. D. Bang, S. Sekimura, K. Tanigawa, H. Wu, A. Kawashima, M. Hayashi, K. Suzuki, and N. Ishii.** 2009. Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microbial Pathogenesis* **47**:183-187.
- Ochman, H., and N. A. Moran.** 2001. Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**:1096-1098.
- Ogata, H., S. Audic, P. Renesto-Audiffren, P. E. Fournier, V. Barbe, D. Samson, V. Roux, P. Cossart, J. Weissenbach, J. M. Claverie, and D. Raoult.** 2001. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science* **293**:2093-2098.
- Presgraves, D. C.** 2000. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Genetics* **154**:771-776.
- Salzberg, S. L., J. C. D. Hotopp, A. L. Delcher, M. Pop, D. R. Smith, M. B. Eisen, and W. C. Nelson.** 2005. Serendipitous discovery of *Wolbachia* genomes in multiple *Drosophila* species. *Genome Biology* **6**.
- Sedgwick, S. G., and S. J. Smerdon.** 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* **24**:311-316.
- Serbus, L. R., C. Casper-Lindley, F. Landmann, and W. Sullivan.** 2008. The Genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annual Review of Genetics* **42**:683-707.

- Sinkins, S. P., T. Walker, A. R. Lynd, A. R. Steven, B. L. Makepeace, H. C. J. Godfray, and J. Parkhill.** 2005. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature* **436**:257-260.
- Veneti, Z., M. E. Clark, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2004. Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:5366-5372.
- Veneti, Z., M. E. Clark, S. Zabalou, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics* **164**:545-552.
- Walker, T., L. Klasson, M. Sebaihia, M. J. Sanders, N. R. Thomson, J. Parkhill, and S. P. Sinkins.** 2007. Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of *Wolbachia* from the *Culex pipiens* group. *BMC Biology* **5**.
- Werren, J. H.** 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* **42**:587-609.
- Wu, M., L. V. Sun, J. Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J. C. Brownlie, E. A. McGraw, W. Martin, C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, R. Madupu, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, Y. Mohamoud, P. Lee, K. Berry, M. B. Young, T. Utterback, J. Weidman, W. C. Nierman, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, S. L. O'Neill, and J. A. Eisen.** 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* **2**:327-341.
- Zabalou, S., S. Charlat, A. Nirgianaki, D. Lachaise, H. Mercot, and K. Bourtzis.** 2004. Natural *wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification. *Genetics* **167**:827-834.
- Zhou, W. G., F. Rousset, and S. O'Neill.** 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**:509-515.
- Zhu, B., K. A. Nethery, J. A. Kuriakose, A. Wakeel, X. F. Zhang, and J. W. McBride.** 2009. Nuclear translocated *Ehrlichia chaffeensis* ankyrin protein interacts with a specific adenine-rich motif of host promoter and intronic Alu elements. *Infection and Immunity* **77**:4243-4255.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Γενική συζήτηση-συμπεράσματα

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	182
5.1.1 Η κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων <i>Drosophila-Wolbachia</i>	183
5.1.2 Ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας – φυλογενετική και εξελικτική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης	185
5.1.3 Η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης.....	187
5.2 ΣΥΝΟΨΗ.....	189
5.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	190

5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών τις τελευταίες δεκαετίες έφερε στο φως μια κρυμμένη και απίστευτα μεγάλη ποικιλία συμβιωτικών μικροοργανισμών που απαντούν στα αρθρόποδα. Λόγω των δυσκολιών που παρουσίαζαν στην μελέτη τους, η εξάπλωση καθώς και η σημασία των μικροοργανισμών αυτών είχε αρχικά υποεκτιμηθεί. Ωστόσο, καθώς οι γνώσεις μας για τα συμβιωτικά βακτήρια αυξάνονται ολοένα και περισσότερο, αποδεικνύεται ότι αυτά κατέχουν βασικό ρόλο στη οικολογία και την εξέλιξη των ξενιστών τους (Moran *et al.* 2008). Το βακτήριο *Wolbachia* αποτελεί ίσως το πιο ευρέως διαδεδομένο συμβιωτικό βακτήριο στη φύση, μολύνοντας ένα μεγάλο αριθμό ειδών αρθροπόδων (κυρίως έντομα) καθώς και νηματώδεις (Jeyaprakash & Hoy 2000; Hilgenboecker *et al.* 2008; Ros *et al.* 2009). Μόνο μεταξύ των εντόμων πιστεύεται ότι το βακτήριο μολύνει τουλάχιστον ένα εκατομμύριο είδη (Jeyaprakash & Hoy 2000; Hilgenboecker *et al.* 2008). Εκτός όμως από την ευρεία διάδοση του, αυτό που πραγματικά κάνει εντύπωση είναι η ποικιλία των συμβιωτικών σχέσεων που αναπτύσσει η *Wolbachia* με τους ξενιστές της. Οι σχέσεις αυτές κυμαίνονται από την αμοιβαία συμβίωση έως τον αναπαραγωγικό παρασιτισμό (Werren 1997; Stouthamer *et al.* 1999; Bourtzis & Miller 2003). Ως αναπαραγωγικό παράσιτο, η *Wolbachia* επιδρά στην αναπαραγωγική επιτυχία των ξενιστών της προκειμένου να εξασφαλίσει τη μητρική μεταβίβασή της. Οι επιδράσεις αυτές είναι: η θηλυκοποίηση, η παρθενογένεση, η θανάτωση των αρσενικών ατόμων και η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (Werren 1997; Stouthamer *et al.* 1999; Bourtzis & Miller 2003). Λόγω της ευρείας διάδοσής και των ιδιοτήτων της πιστεύεται ότι η *Wolbachia* παίζει σημαντικό ρόλο στις διεργασίες ειδογένεσης των αρθροπόδων (Bordenstein *et al.* 2001; Charlat *et al.* 2003) ενώ έχει προταθεί και η χρήση της ως φιλικό προς το περιβάλλον εργαλείο πληθυσμιακού ελέγχου επιβλαβών ειδών χωρίς τη χρήση χημικών ουσιών (Ioannidis & Bourtzis 2007; Bourtzis 2008).

Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και της εξέλιξης της *Wolbachia* καθώς και της βιολογίας των αλληλεπιδράσεων της με τους ξενιστές βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνητικών προσπαθειών τα τελευταία χρόνια. Η παρούσα διατριβή στηρίχθηκε στα αποτελέσματα της αποκωδικοποίησης του πρώτου γονιδιώματος στελέχους της *Wolbachia* (Wu *et al.* 2004) το οποίο έδωσε νέα στοιχεία για τη βιολογία του βακτηρίου. Μεταξύ αυτών, η παρουσία ενός ιδιαίτερα εντυπωσιακού αριθμού γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με επαναλήψεις (μοτίβα) αγκυρίνης. Τα ερωτήματα τα οποία προσπάθησε να απαντήσει η παρούσα διατριβή ήταν: (α) ποιος είναι ο ρόλος των αγκυρινών στη γενετική ποικιλότητα και την εξέλιξη της *Wolbachia*; (β) ποιοι είναι οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την εξέλιξη των γονιδίων αυτών στη *Wolbachia*; (γ) ποιος είναι ο βιολογικός ρόλος των γονιδίων αυτών της *Wolbachia*; (δ) συμμετέχουν τα γονίδια

αγκυρίνης στην εγκαθίδρυση της συμβίωσης ή/και την επαγωγή των αναπαραγωγικών ανωμαλιών;

Για τον σκοπό αυτό διεξήχθη μια συγκριτική μελέτη προκειμένου να εξετάσουμε: (α) την κατανομή των 23 αγκυρινών που εντοπίζονται στο στέλεχος *wMel* σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Wolbachia-Drosophila* οι οποίες διαφέρουν τόσο ως προς την κατανομή του βακτηρίου στα πρώιμα εμβρυικά στάδια καθώς και ως προς το φαινότυπο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που επάγουν στους ξενιστές τους, (β) την γενετική ποικιλομορφία καθώς και τις φυλογενετικές και εξελικτικές σχέσεις των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών *Wolbachia* και (γ) την έκφραση των γονιδίων αυτών σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και ιστούς του ξενιστή και για τις 11 συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*.

5.1.1 Η κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*

Η ύπαρξη καλά χαρακτηρισμένων συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia* αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων λόγω της συγκριτικής αξίας που έχουν. Εκμεταλλευόμενοι το γεγονός αυτό, η παρούσα ενότητα εστιάστηκε στην ανίχνευση και τη συγκριτική μελέτη της κατανομής των 23 γονιδίων αγκυρίνης που απαντούν στο στέλεχος *Wolbachia wMel*, σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*. Οι σχέσεις αυτές διαφέρουν: (α) ως προς την φυλογενετική κατάσταση των στελεχών, περιλαμβάνοντας τόσο συγγενικά όσο και πιο απομακρυσμένα στελέχη *Wolbachia*, (β) ως προς τη βακτηριακή κατανομή στα έμβρυα του ξενιστή και (γ) ως προς την έκφραση του φαινοτύπου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (βλ. Κεφάλαιο 2).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε πρώτη φάση συνηγορούν με την ύπαρξη ενός ασυνήθιστα, για προκαρυωτικό οργανισμό, μεγάλου αριθμού γονιδίων αγκυρίνης. Η ύπαρξη των γονιδίων αυτών πιθανόν σχετίζεται με τον ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής της *Wolbachia* καθώς και τις ιδιαίτερες συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσει με τους ξενιστές της. Είναι ενδιαφέρον ότι το στέλεχος *wBm*, το οποίο αναπτύσσει αμοιβαία συμβιωτική σχέση με το νηματώδη *Brugia malayi*, διαθέτει μέχρι στιγμής τον μικρότερο αριθμό γονιδίων αγκυρίνης (5 ORFs + 7 ψευδογονίδια) μεταξύ των γονιδιωμάτων της *Wolbachia* που έχουν αποκωδικοποιηθεί πλήρως (Foster *et al.* 2005). Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι πολλά από τα γονίδια αγκυρίνης πιθανόν να σχετίζονται με τους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους που επάγει το βακτήριο. Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας εργασίας είναι ότι ορισμένα από τα γονίδια αγκυρίνης (WD0035, WD0191, WD0438, WD0441, WD0498, WD0636, WD0637, WD0766, WD1213) ανιχνεύονται σε όλες τις συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* που μελετήθηκαν (υπερομάδες Α και Β). Μάλι-

στα, όπως προκύπτει από την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων, ομόλογα των γονιδίων αυτών βρίσκονται μεταξύ των γονιδίων αγκυρίνης που απαντούν στο στέλεχος *wBm* (υπερομάδα D). Επίσης, ομόλογα γονίδια έχουν βρεθεί και στα στελέχη του βακτηρίου που συμβιώνουν με τα είδη *Muscidifurax uniraptor* και *Culex pipiens*. Η συντηρημένη παρουσία γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ φαινοτυπικά και εξελικτικά απομακρυσμένων στελεχών *Wolbachia* θέτει ένα ενδιαφέρον ερώτημα. Θα μπορούσαν τα γονίδια αυτά να συμμετέχουν στους μηχανισμούς που υπαγορεύουν τον ενδοκυττάριο τρόπο διαβίωσης και είναι υπεύθυνοι για την εγκαθίδρυση των συμβιωτικών σχέσεων με τον εκάστοτε ξενιστή; Μια ενδιαφέρουσα θεωρία είναι ότι τα γονίδια αυτά έχουν προέλθει από κάποιον κοινό πρόγονο των στελεχών αυτών πριν το διαχωρισμό των υπερομάδων A, B, D παρά ότι πρόκειται για ανεξάρτητη πρόσληψη των γονιδίων για κάθε υπερομάδα. Πιθανόν, ο πρόγονος της *Wolbachia* “υιοθέτησε” μια ομάδα γονιδίων αγκυρίνης κατά τη μετάβαση του στον ενδοκυττάριο τρόπο διαβίωσης.

Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ετερογένεια που παρατηρείται στην κατανομή των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, στελέχη τα οποία είναι εξελικτικά πιο συγγενικά διαθέτουν παρόμοιο ρεπερτόριο γονιδίων αγκυρίνης. Βασικό ρόλο στην εξάπλωση των γονιδίων αγκυρίνης φαίνεται ότι παίζουν οι προφάγοι που έχουν εντοπιστεί στο γονιδίωμα της *Wolbachia* όπως προκύπτει από τις διαφορές της κατανομής των προφαγικών αγκυρινών μεταξύ των στελεχών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το στέλεχος *wBm*, που μέχρι στιγμής διαθέτει τον μικρότερο αριθμό γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των στελεχών *Wolbachia*, δεν διαθέτει προφάγους στο γονιδίωμά του (Foster *et al.* 2005). Ωστόσο, σε αντίθεση με τους ιούς, οι βακτηριοφάγοι στερούνται γονιδίων αγκυρίνης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια αγκυρίνης μεταφέρθηκαν στους φάγους της *Wolbachia* μέσω του βακτηριακού χρωμοσώματος κατά την διάρκεια της συνύπαρξης βακτηρίου και φάγου. Οι φάγοι στη συνέχεια αποτέλεσαν το όχημα μεταφοράς των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου.

Τα γονίδια αγκυρίνης έχουν προταθεί ως βασικοί υποψήφιοι για τη συμμετοχή τους στους μηχανισμούς έκφρασης της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Wu *et al.* 2004; Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005; Sinkins *et al.* 2005). Η παρούσα μελέτη αξιοποίησε τον μεγάλο αριθμό των φαινοτυπικά χαρακτηρισμένων συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*, που έχει το εργαστήριο μας (Veneti *et al.* 2003, 2004, Zabalou *et al.* 2008) σε μια προσπάθεια να συσχετίσει την παρουσία-απουσία των γονιδίων αγκυρίνης με τους διαφορετικούς φαινοτύπους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η άμεση τουλάχιστον συσχέτιση της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης με τις φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των στελεχών απορρίπτεται. Το γεγονός αυτό δεν αποκλείει ωστόσο την συμμετοχή των γονιδίων αυτών στους παραπάνω μηχανισμούς,

ιδιαίτερα εάν αναλογιστούμε: (α) την πολυπλοκότητα που διέπει τις αλληλεπιδράσεις βακτηρίου-ξενιστή καθώς και (β) το γεγονός ότι το πραγματικό εύρος των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών μπορεί να είναι μεγαλύτερο, κάτι που επιβεβαιώνεται με την αποκωδικοποίηση όλο και περισσότερων στελεχών *Wolbachia* (Klasson *et al.* 2008, 2009). Η ανάπτυξη νέων εργαλείων, όπως η τεχνική των συγκριτικών υβριδισμών σε επίπεδο γονιδιώματος (CGH) με τη χρήση μικροσυστοιχιών, δίνει νέα ώθηση σε παρόμοιες συγκριτικές μελέτες και μπορούν να βοηθήσουν στην ανάδειξη του γονιδιακού πλούτου των αγκυρινών στη *Wolbachia* (Ishmael *et al.* 2009).

5.1.2 Ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας – φυλογενετική και εξελικτική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε η πρώτη εκτεταμένη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και της εξέλιξης των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*. Στόχοι της ενότητας αυτής ήταν αφενός να αποσαφηνιστεί το εύρος της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης και αφετέρου να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί οι οποίοι υπαγορεύουν την εξέλιξη των γονιδίων αυτών στη *Wolbachia*. Η κατανόηση της εξέλιξης των γονιδίων αυτών είναι πολύ σημαντική και αποτελεί το πρώτο βήμα για την κατανόηση του ρόλου των αγκυρινών στην ανάπτυξη των συμβιωτικών σχέσεων της *Wolbachia* με τους ξενιστές της.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικά επίπεδα ποικιλομορφίας στα γονίδια αγκυρίνης ανάμεσα σε διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Wolbachia* (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005; Sinkins *et al.* 2005; Duron *et al.* 2007). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές περιορίστηκαν κυρίως σε μια προσπάθεια συσχετισμού της παρατηρούμενης γονιδιακής ποικιλομορφίας με τον φαινότυπο της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής έγινε αλληλούχηση των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης από 11 διαφορετικά στελέχη *Wolbachia* που αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με διάφορα είδη *Drosophila*. Τα δεδομένα, που προέκυψαν, αποτελούν μέχρι στιγμής το μεγαλύτερο αριθμό δεδομένων για τα γονίδια αγκυρίνης που απαντούν σε συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*.

Από την ανάλυση των παραπάνω δεδομένων προκύπτει ότι τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* αποτελούν μια γρήγορα εξελισσόμενη οικογένεια γονιδίων. Ένα σημαντικό εύρημα αποτελεί η μεγάλη διακύμανση της ποικιλομορφίας μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων. Με λίγα λόγια, ορισμένα γονίδια αγκυρίνης φαίνεται να εξελίσσονται με πιο γρήγορους ρυθμούς από κάποια άλλα. Η ετερογένεια αυτή θα μπορούσε να σχετίζεται με τις διαφορετικές λειτουργίες των γονιδίων. Ο γρήγορος ρυθμός εξέλιξης για ορισμένα από τα γονίδια αγκυρίνης πιθανόν αντανα-

κλά την ανάγκη επικοινωνίας μεταξύ βακτηρίου και νέων ξενιστών καθώς και την προσαρμοστικότητα της *Wolbachia* σε νέα περιβάλλοντα. Η ετερογένεια αυτή γίνεται ιδιαίτερα αισθητή μεταξύ των γονιδίων αγκυρίνης που απαντούν στους δύο προφάγους της *Wolbachia*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ξεχωριστές εξελικτικές πορείες μεταξύ των δύο προφαγικών στοιχείων και πιθανά τα γονίδια αγκυρίνης του προφάγου WO-A να αποτελούν μια σχετικά πρόσφατη ενσωμάτωση στα στελέχη wMel, wMelPopcorn, wAu, wTei, wYak, wSan και wHa.

Ωστόσο, ένα από τα σημαντικότερα και ενδιαφέροντα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ο πολυμορφισμός που παρατηρείται τόσο στον αριθμό όσο και στην οργάνωση των επαναλήψεων αγκυρίνης μεταξύ των ομολόγων γονιδίων αγκυρίνης. Η ύπαρξη διαφορών στον αριθμό και στην οργάνωση των επαναλήψεων αγκυρίνης είχε γίνει αντιληπτή νωρίτερα από τους Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005. Ωστόσο, η μελέτη αυτή είχε βασιστεί στη σύγκριση των γονιδιακών δεδομένων μόνο δύο στελεχών *Wolbachia*, wMel και wAu, χωρίς να δίνεται έμφαση στους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη των γονιδίων αυτών. Η παρούσα εργασία, με την συγκριτική ανάλυση των γονιδίων αγκυρίνης 11 διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia*, αποκάλυψε βασικά στοιχεία όσον αφορά τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την εξέλιξη των γονιδίων αυτών. Η δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς των προφαγικών στοιχείων, ο ομόλογος γενετικός ανασυνδυασμός καθώς και ο παράτυπος-μη ομόλογος ανασυνδυασμός κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και την εξέλιξη των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia*. Μάλιστα, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά για τη συμμετοχή των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* σε φαινόμενα ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο γενετικός ανασυνδυασμός οδηγεί στη δημιουργία νέων γονιδιακών μορφών μέσω της ανταλλαγής και της αναδιάταξης γονιδιακών τμημάτων, και κατ' επέκταση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία νέων φαινοτύπων. Πολύ σημαντικό ρόλο στον γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ των στελεχών της *Wolbachia* φαίνεται έχουν οι προφάγοι οι οποίοι μέσω του μηχανισμού της μεταγωγής αποτελούν το “όχημα” για την ανταλλαγή γενετικού υλικού.

Ωστόσο, ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη του ρόλου του παράτυπου (αντικανονικού) ανασυνδυασμού στη δημιουργία του παρατηρούμενου πολυμορφισμού σε επίπεδο επαναλήψεων αγκυρίνης. Το είδος αυτό του ανασυνδυασμού οφείλεται στην αστάθεια των πανομοιότυπων νουκλεοτιδικών επαναλήψεων που βρίσκονται διάσπαρτες μεταξύ των μοτίβων αγκυρίνης. Το αποτέλεσμα του είναι η δημιουργία διπλασιασμών, ελλειμμάτων αλλά και η αναδιάταξη των δομικών μονάδων διαφορετικών επαναλήψεων αγκυρίνης. Οι δομικές αυτές αλλαγές που υφίστανται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αυτά πιθανά επηρεάζουν τη “δραστική” επιφάνεια τους καθιστώντας έτσι ικανές να αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο αριθμό μορίων στόχων. Η σημαντικότητα του παράτυπου (αντικα-

νονικού) ανασυνδυασμού έγκειται στο γεγονός ότι δρα σε τοπικό επίπεδο παρέχοντας στη *Wolbachia* μια άμεση πηγή ποικιλότητας που είναι απαραίτητη για την ταχεία προσαρμογή της σε νέες συνθήκες. Μάλιστα, είναι ενδιαφέρον ότι ο τρόπος με τον οποίο ανασυνδυάζονται οι επαναλήψεις αγκυρίνης στη *Wolbachia* μέσω του παράτυπου (αντικανονικού) ανασυνδυασμού, έχει μεγάλες ομοιότητες με το εναλλακτικό μάτισμα που υφίστανται τα εξόνια των ευκαρυωτικών γονιδίων αγκυρίνης (Cai & Zhang 2005). Αν και τα γονίδια αγκυρίνης της *Wolbachia* δεν διαθέτουν εξόνια, η ομοιότητα αυτή πιθανόν αντικατοπτρίζει την εύπλαστη και ευπροσάρμοστη φύση των γονιδίων αυτών.

Η φύση των γονιδίων αγκυρίνης έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον ως προς την πιθανή εμπλοκή τους στους μηχανισμούς των αναπαραγωγικών επιδράσεων της *Wolbachia* και κυρίως της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Από τη συγκριτική ανάλυση του παρατηρούμενου πολυμορφισμού στα γονίδια αγκυρίνης με τους διαφορετικούς φαινότυπους των 11 στελεχών *Wolbachia* που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια άμεση συσχέτιση. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί πλήρως με προηγούμενη μελέτη στην οποία είχε εξετασθεί η γενετική ποικιλομορφία των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* μεταξύ ασύμβατων πληθυσμών του κουνουπιού *Culex pipiens* (Duron *et al.* 2007). Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τις αλληλεπιδράσεις της *Wolbachia* με τους ξενιστές της δυσχεραίνει μια άμεση λειτουργική συσχέτιση των γονιδίων αγκυρίνης με τον μηχανισμό της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Νέα εργαλεία είναι απαραίτητα προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα γονίδια εκείνα τα οποία επάγουν κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Η ανάπτυξη ενός συστήματος γενετικού μετασχηματισμού για τη *Wolbachia* θα άνοιγε το δρόμο για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των αγκυρινών αλλά και άλλων γονιδίων του βακτηρίου και τη διαλεύκανση της βιολογίας του. Ο πρόσφατος μάλιστα *in silico* προσδιορισμός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής του DNA στη *Wolbachia* δίνει νέα ώθηση προς στην κατεύθυνση αυτή (Ioannidis *et al.* 2007).

5.1.3 Η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε η πρώτη εκτεταμένη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* σε 11 διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*. Μελέτες της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* έχουν παρουσιαστεί και σε προηγούμενες εργασίες, τόσο σε συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia* (Iturbe-Ormaetxe *et al.* 2005) όσο και σε συμβιωτικές σχέσεις *Culex-Wolbachia* (Sinkins *et al.* 2005; Duron *et al.* 2007). Παρόλα αυτά οι εργασίες αυτές είχαν εστιαστεί στη μελέτη μόνο ενήλικων ατόμων ενώ στην περίπτωση των συμβιωτικών σχέσεων *Drosophila-Wolbachia* δεν έγινε καμία διάκριση μεταξύ των δύο φύλων. Η μελέτη των προτύπων έκφρασης των γονιδίων αγκυ-

ρίνης πραγματοποιήθηκε σε αναπαραγωγικούς ιστούς, ενήλικα άτομα καθώς και σε δύο εμβρυικά στάδια, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της συμβατικής RT-PCR. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και εξαρτάται από τη συμβιωτική σχέση καθώς και από τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο που μελετάται. Ένα σημαντικό πρόβλημα που ανακύπτει κατά τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης της *Wolbachia* είναι τα χαμηλά επίπεδα μόλυνσης που παρατηρούνται σε ορισμένες συμβιωτικές σχέσεις και ιστούς. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την ανίχνευση γονιδίων που μεταγράφονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας εργασίας είναι ότι ορισμένα γονίδια αγκυρίνης εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τους ιστούς. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη συμμετοχή των γονιδίων αυτών στους βασικούς μηχανισμούς επικοινωνίας της *Wolbachia* με τα κύτταρα του ξενιστή ή/και στους μηχανισμούς αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος του εντόμου (Siozios *et al.* 2008). Μάλιστα, από τα δεδομένα της εξελικτικής μελέτης προκύπτει ότι δύο από τα γονίδια αγκυρίνης που εκφράζονται καθολικά πιθανόν υπόκεινται σε θετική επιλογή (WD0291 και WD0292). Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης οι περιπτώσεις ιστοειδικής ή/και φυλοειδικής έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης. Αν και δεν προέκυψε κάποια άμεση συσχέτιση των ποιοτικών και των ποσοτικών διαφορών στην έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης με τους φαινοτύπους της *Wolbachia*, η ιστοειδική έκφραση μπορεί να συνδέεται με τους μηχανισμούς επαγωγής των αναπαραγωγικών φαινοτύπων. Για παράδειγμα, η ειδική έκφραση γονιδίων του βακτηρίου *Wolbachia* στους όρχεις πιθανά συνδέεται με τους μηχανισμούς τροποποίησης των πατρικών χρωμοσωμάτων (modification, **mod**) και επομένως την επαγωγή της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας. Από την άλλη μεριά, η ειδική έκφραση γονιδίων στις ωοθήκες και κατά τα πρώτα εμβρυικά στάδια πιθανά συνδέεται με την λειτουργία της διάσωσης (rescue, **resc**) στις συμβατές διασταυρώσεις.

Οι διαφορές που εντοπίστηκαν στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης αποτελούν μόνο μια ημιποσοτική εκτίμηση. Η ακριβής ποσοτικοποίηση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης μεταξύ των διαφορετικών συμβιωτικών σχέσεων, ιστών και αναπτυξιακών σταδίων, έχει μεγάλη σημασία στις προσπάθειες που γίνονται για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό τους και, κατά την εκτίμησή μας, θα πρέπει να αποτελέσει αντικείμενο μιας μελλοντικής μελέτης.

Τέλος, από τη μελέτη αυτή προέκυψαν ενδιαφέροντα συμπεράσματα όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων αγκυρίνης που έχουν υποστεί σημαντικές δομικές αλλαγές όπως: (α) ένθεση μεταθέσιμων γενετικών στοιχείων και (β) μεταλλάξεων μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου. Αν και τα γονίδια αυτά αρχικά θεωρήθηκαν ανενεργά, όλα τους εμφάνισαν ανιχνεύσι-

μα επίπεδα έκφρασης. Ακόμα δεν είναι ξεκάθαρο γιατί συμβαίνει αυτό. Πιστεύεται ότι εν μέρει μπορεί να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό αδενίνης και θυμίνης που καθιστά τη ρύθμιση της μεταγραφής λιγότερο αποδοτική στα ενδοκυττάρια συμβιωτικά βακτήρια (Davids *et al.* 2002). Ωστόσο, η προοπτική τα γονίδια αυτά να παίζουν κάποιο ρόλο στη βιολογία της *Wolbachia*, αντίστοιχο με τον ρυθμιστικό ρόλο των μη-κωδικοποιών μορίων RNA (nc-RNAs), είναι πολύ ενδιαφέροντα. Νέες μελέτες απαιτούνται όμως προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση.

5.2 ΣΥΝΟΨΗ

Η *Wolbachia* αποτελεί έναν από τους πλέον διαδεδομένους και επιτυχημένους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς στη φύση. Ωστόσο, η έλλειψη ενός συστήματος γενετικού μετασχηματισμού δυσχεραίνει τις προσπάθειες για την αποσαφήνιση των μηχανισμών που υπαγορεύουν τις αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου με τον εκάστοτε ξενιστή. Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστίαστηκε στη μελέτη μιας από τις πιο ιδιαίτερες και ενδιαφέρουσες οικογένειες γονιδίων που έχουν εντοπιστεί στο γονιδίωμα της *Wolbachia*, αυτής των γονιδίων αγκυρίνης. Μέσω της συγκριτικής μελέτης της κατανομής των γονιδίων αγκυρίνης αναδείχτηκε η μεγάλη πυκνότητα και η ποικιλότητα τους σε διαφορετικές συμβιωτικές σχέσεις *Drosophila-Wolbachia*. Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας και της εξέλιξης των γονιδίων αγκυρίνης ανέδειξε βασικές πτυχές των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη διαμόρφωση και την εξέλιξη της οικογένειας αυτής των γονιδίων. Τέλος, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων αγκυρίνης σε διαφορετικούς ιστούς καθώς και αναπτυξιακά στάδια ανέδειξε μια μεγάλη και ενδιαφέρουσα ετερογένεια καθώς: (α) οι ιστοειδικές διαφορές πιθανά να συνδέονται με τους αναπαραγωγικούς φαινοτύπους και (β) η έκφραση των εκφυλισμένων γονιδίων αναδεικνύει νέες προεκτάσεις στον πιθανό λειτουργικό ρόλο των γονιδίων αυτών.

Η περαιτέρω πειραματική μελέτη των γονιδίων αγκυρίνης θα βοηθήσει να κατανοήσουμε το λειτουργικό τους ρόλο καθώς και την πιθανή συμμετοχή τους στις ιδιαίτερες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει η *Wolbachia* με τους ξενιστές της. Μάλιστα, αν αποδειχθεί ότι τα γονίδια αγκυρίνης συμμετέχουν στον μηχανισμό επαγωγής της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, τότε ανοίγει ο δρόμος για την χρήση των γονιδίων αυτών σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος, όπως η ανάπτυξη φιλικών μεθόδων καταπολέμησης επιβλαβών παρασίτων και ασθενειών.

5.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bordenstein, S. R., F. P. O'Hara, and J. H. Werren.** 2001. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409:707-710.
- Bourtzis, K.** 2008. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* 627:104-113.
- Bourtzis, K., and T. Miller.** 2003. *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-347
- Cai, X., and Y. Zhang.** 2006. Molecular Evolution of the Ankyrin Gene Family. 23:550-558.
- Charlat, S., G. D. D. Hurst, and H. Mercot.** 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics* 19:217-223.
- Dauids, W., H. Amiri, and S. G. E. Andersson.** 2002. Small RNAs in *Rickettsia*: are they functional? *Trends in Genetics* 18:331-334.
- Duron, O., A. Boureux, P. Echaubard, A. Berthomieu, C. Berticat, P. Fort, and M. Weill.** 2007. Variability and expression of ankyrin domain genes in *Wolbachia* variants infecting the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Bacteriology* 189:4442-4448.
- Foster, J., M. Ganatra, I. Kamal, J. Ware, K. Makarova, N. Ivanova, A. Bhattacharyya, V. Kapatral, S. Kumar, J. Posfai, T. Vincze, J. Ingram, L. Moran, A. Lapidus, M. Omelchenko, N. Kyrpides, E. Ghedin, S. Wang, E. Goltsman, V. Joukov, O. Ostrovskaya, K. Tsukerman, M. Mazur, D. Comb, E. Koonin, and B. Slatko.** 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* 3:599-614.
- Hilgenboecker, K., P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Telschow, and J. H. Werren.** 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281:215-220.
- Ioannidis, P., and K. Bourtzis.** 2007. Insect symbionts and applications: The paradigm of cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia*. *Entomological Research* 37:125-138.
- Ioannidis, P., J. C. D. Hotopp, P. Sapountzis, S. Siozios, G. Tsiamis, S. R. Bordenstein, L. Baldo, J. H. Werren, and K. Bourtzis.** 2007. New criteria for selecting the origin of DNA replication in *Wolbachia* and closely related bacteria. *BMC Genomics* 8.
- Ishmael, N., J. C. D. Hotopp, P. Ioannidis, S. Biber, J. Sakamoto, S. Siozios, V. Nene, J. Werren, K. Bourtzis, S. R. Bordenstein, and H. Tettelin.** 2009. Extensive genomic diversity of closely related *Wolbachia* strains. *Microbiology* 155:2211-2222.

- Iturbe-Ormaetxe, I., G. R. Burke, M. Riegler, and S. L. O'Neill.** 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology* **187**:5136-5145.
- Jeyaprakash, A., and M. A. Hoy.** 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* **9**:393-405.
- Klasson, L., T. Walker, M. Sebaihia, M. J. Sanders, M. A. Quail, A. Lord, S. Sanders, J. Earl, S. L. O'Neill, N. Thomson, S. P. Sinkins, and J. Parkhill.** 2008. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. *Molecular Biology and Evolution* **25**:1877-1887.
- Klasson, L., J. Westberg, P. Sapountzis, K. Nasiund, Y. Lutnaes, A. C. Darby, Z. Veneti, L. M. Chen, H. R. Braig, R. Garrett, K. Bourtzis, and S. G. E. Andersson.** 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:5725-5730.
- Moran, N. A., J. P. McCutcheon, and A. Nakabachi.** 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**:165-190.
- Ros, V. I. D., V. M. Fleming, E. J. Feil, and J. A. J. Breeuwer.** 2009. How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Super-group Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1036-1043.
- Sinkins, S. P., T. Walker, A. R. Lynd, A. R. Steven, B. L. Makepeace, H. C. J. Godfray, and J. Parkhill.** 2005. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature* **436**:257-260.
- Siozios, S., P. Sapountzis, P. Ioannidis, and K. Bourtzis.** 2008. *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insect Science* **15**:89-100.
- Stouthamer, R., J. A. J. Breeuwer, and G. D. D. Hurst.** 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* **53**:71-102.
- Veneti, Z., M. E. Clark, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2004. Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:5366-5372.
- Veneti, Z., M. E. Clark, S. Zabalou, T. L. Karr, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics* **164**:545-552.

- Walker, T., L. Klasson, M. Sebahia, M. J. Sanders, N. R. Thomson, J. Parkhill, and S. P. Sinkins.** 2007. Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of *Wolbachia* from the *Culex pipiens* group. *BMC Biology* **5**.
- Werren, J. H.** 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* **42**:587-609.
- Wu, M., L. V. Sun, J. Vamathevan, M. Riegler, R. Deboy, J. C. Brownlie, E. A. McGraw, W. Martin, C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, R. Madupu, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, Y. Mohamoud, P. Lee, K. Berry, M. B. Young, T. Utterback, J. Weidman, W. C. Nierman, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, S. L. O'Neill, and J. A. Eisen.** 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology* **2**:327-341.
- Zabalou, S., A. Apostolaki, S. Pattas, Z. Veneti, C. Paraskevopoulos, I. Livadaras, G. Markakis, T. Brissac, H. Mercot, and K. Bourtzis.** 2008. Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. *Genetics* **178**:2145-2160.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

Δημοσίευση Αποτελεσμάτων σε Επιστημονικά Συνέδρια

- S. Siozios, G. Tsiamis, P. Ioannidis and K. Bourtzis. Ankyrin repeat-containing genes in *Wolbachia* and their role in host-symbiont interactions. 56ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 25-27 Νοεμβρίου, Λάρισα, 2004.
- Σ. Σιώζιος, Π. Σαπουντζής, Π. Ιωαννίδης, Γ. Τσιάμης, Κ. Μπούρτζης. Μελέτη της κατανομής και της έκφρασης των βακτηριακών αγκυρινών στη συμβιωτική σχέση *Drosophila-Wolbachia*. Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημών. “Βιοεπιστήμες στον 21^ο Αιώνα”, 13-15 Απριλίου, Αθήνα, 2006.
- S. Siozios, P. Sapountzis, P. Ioannidis, L. Klasson, A. Darby, K. Näslund, H. R. Braig, S. G. E. Andersson and K. Bourtzis. Distribution and expression analysis of bacterial ankyrin genes in different *Drosophila-Wolbachia* symbiotic associations. 4th International Wolbachia Conference. 24-29 June, Puerto Rico, 2006.
- P. Ioannidis, J. C. Dunning Hotopp, P. Sapountzis, S. Siozios, G. Tsiamis, S.R. Bordenstein, L. Baldo, J.H. Werren, and K. Bourtzis. On the Origin of DNA Replication of *Wolbachia* and Closely Related Bacteria. 4th International Wolbachia Conferenc. 24-29 June, Puerto Rico, 2006.
- K. Μωραΐτη, Η. Κουνατίδης, Π. Σαπουντζής, Σ. Σιώζιος, Π. Μαυραγάνη-Τσιπιδου, Ν. Παπαδόπουλος και Κ. Μπούρτζης. Το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia* σε είδη της οικογένειας Tephritidae. 12ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, 13-16 Νοεμβρίου 2007, Λάρνακα, Κύπρος.
- Π. Σαπουντζής, D.A. Voronin, Σ. Σιώζιος, L. Sacchi, C. Bandi, E. Kiseleva, Χ. Σαββάκης και Κ. Μπούρτζης. Χαρακτηρισμός της συμβιωτικής σχέσης του βακτηρίου *Wolbachia* και των ξενιστών του με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. 12ο Πανελλήνιο Εντομολογικό Συνέδριο, 13-16 Νοεμβρίου 2007, Λάρνακα, Κύπρος.
- S. Siozios, P. Sapountzis, P. Ioannidis, A. Saridaki, K. Bourtzis. *Drosophila-Wolbachia* symbiotic associations: exploring the role of wMel ankyrins. 5th International Wolbachia Conference. 9-14 June, Kolymbari, Greece, 2008.

- P. Sapountzis, K. Moraiti, I. Kounatidis, **S. Siozios**, P. Mavragani-Tsipidou, Nikos T. Papadopoulos and K. Bourtzis. *Wolbachia* symbiosis in Tephritidae. Fruit flies's microflora - First Meeting of TEAM. Palma of Mallorca. 7-8th April 2008.
- A. Saridaki, P. Sapountzis, **S. Siozios**, P. Ioannidis, H. Boleti, K. Bourtzis. *Wolbachia* ankyrins and their potential role on *Drosophila-Wolbachia* symbiosis. 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Biochemistry of Cell Regulation, June 28-July 3, Athens, Greece, 2008.
- Tsiamis ,G., **Siozios**, S., Mansfield, J.,and Bourtzis K. Expression of the *hrpA* gene product in *planta* activates plant immunity in *Arabidopsis thaliana*. 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Biochemistry of Cell Regulation, June 28-July 3, Athens, Greece, 2008.
- P. Sapountzis, **S. Siozios**, P. Ioannidis, A. Saridaki, H. Boleti, S. Andersson, K. Bourtzis. *Drosophila-Wolbachia* symbiotic associations: exploring the role of wRi ankyrins. 5th International Wolbachia Conference. 9-14 June, Kolymbari, Greece, 2008.
- P. Sapountzis, **S. Siozios**, P. Ioannidis, A. Saridaki, H. Boleti and K. Bourtzis. *Drosophila-Wolbachia* symbiotic interactions: exploring the role of ankyrins. International Congress of Entomology, 6-12 July 2008, Durban, South Africa.
- A. Saridaki, P. Sapoutzis, **S. Siozios**, P. Ioannidis, H. Boleti, S. Zabalou, C. Savakis, K. Bourtzis. *Wolbachia* Safe Sex: The Triggering Factor for Speciation and Ecological Diversity. 1st MBK conference, 12-14th December 2008, Athens, Greece.

Δημοσίευση Αποτελεσμάτων σε Επιστημονικά περιοδικά

- Vasiliadou, I. A., **S. Siozios**, I. T. Papadas, K. Bourtzis, S. Pavlou, and D. V. Vayenas. 2006. Kinetics of pure cultures of hydrogen-oxidizing denitrifying bacteria and modeling of the interactions among them in mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **95**:513-525.
- Panagiotis Ioannidis, Julie C Dunning Hotopp, Panagiotis Sapountzis, **Stefanos Siozios**, Georgios Tsiamis, Seth R Bordenstein, Laura Baldo, John H Werren and Kostas Bourtzis (2007). New criteria for selecting the origin of DNA replication in *Wolbachia* and closely related bacteria. *BMC Genomics* **8**:182.

- S. Siozios**, P. Sapountzis, P. Ioannidis and K. Bourtzis (2008). *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insect Science*. 15: 89-100.
- Ishmael, N., J. C. Dunning Hotopp, P. Ioannidis, S. Biber, J. Sakamoto, **S. Siozios**, V. Nene, J. Werren, K. Bourtzis, S. R. Bordenstein, and H. Tettelin. (2009). Extensive Genomic Diversity of Closely Related *Wolbachia* Strains. *Microbiology* 155: 2211-2222.
- S. Siozios**, P. Ioannidis and K. Bourtzis. Genetic polymorphism and molecular evolution of the *Wolbachia* ankyrin repeat-containing gene family. *In preparation*.
- S. Siozios**, P. Sapountzis, P. Ioannidis, A. Saridaki, G. Markakis and K. Bourtzis. A comprehensive expression study of *Wolbachia* ankyrin genes in different *Drosophila*-*Wolbachia* associations: combining phenotypic, genetic and expression data. *In preparation*.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Π.1 Απομόνωση γενωμικού DNA με τη μέθοδο Holmes-Bonner	- 2 -
Π.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με επιλεκτική κατακρήμνιση.....	- 3 -
Π.3 Μεταφορά DNA σε νάilon μεμβράνες.....	- 3 -
Π.4 Υβριδοποίηση DNA.....	- 4 -
Π.5 Σήμανση DNA με τυχαίους εκκινητές (Random primed DNA labeling).....	- 5 -

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π.1 Απομόνωση γενωμικού DNA με τη μέθοδο Holmes-Bonner

Υλικά

- Διάλυμα Holmes-Bonner
 - 0.1 M Tris-HCl pH 7.5
 - 0.35 M EDTA pH 8.0
 - 10 mM EDTA pH 8.0
 - 2% SDS
 - 7 M Urea
- Φαινόλη-χλωροφόρμιο (1:1)
- Χλωροφόρμιο
- 3M sodium acetate pH 5.2

Διαδικασία

1. Ομογενοποιούμε X μl μυγών σε 3X όγκο διαλύματος Holmes-Bonner, στον πάγο.
2. Αφού μεταφέρουμε σε κατάλληλο σωληνάριο προσθέτουμε RNase (20 μg/ml, τελική συγκέντρωση) και επωάζουμε για 30 min στους 37°C.
3. Προσθέτουμε 1X όγκο φαινόλη-χλωροφόρμιο (1:1) και αναδεύουμε για 10 min.
4. Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 5000 rpm.
5. Μεταφέρουμε προσεκτικά την υδατίνη (υπερκείμενη) φάση σε νέο σωληνάριο προσέχοντας να μην διαταράξουμε τη μεσόφαση.
6. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2 και 3 άλλες δύο φορές μέχρι να απομακρυνθεί η μεσόφαση.
7. Προσθέτουμε 1 όγκο χλωροφόρμιο και αναδεύουμε για 5 min.
8. Φυγοκεντρούμε για 5 min στις 5000 rpm.
9. Μεταφέρουμε σε νέο σωληνάριο και επαναλαμβάνουμε τα βήματα 6 και 7 άλλη μία φορά.
10. Προσθέτουμε 1/10 όγκους 3M sodium acetate pH 5.2, 2 όγκους 100% αιθανόλη, αναμιγνύουμε και επωάζουμε στους -20°C για τουλάχιστον 1 ώρα.
11. Φυγοκεντρούμε στο μέγιστο για 15 min στους 4 °C.

12. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με 70% αιθανόλη.
13. Απομακρύνουμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε το ίζημα. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε αποστειρωμένο dH₂O.

Π.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με επιλεκτική κατακρήνιση

Υλικά

- Διάλυμα PEG
 - 20% PEG 8000
 - 2.5 M NaCl
- 80% Αιθανόλη
- 100% Αιθανόλη

Διαδικασία

1. Αναμιγνύουμε καλά X μ L PCR προϊόντος με X μ L διαλύματος PEG.
2. Επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά.
3. Φυγοκεντρούμε σε υψηλή ταχύτητα (~14,000 rpm) για 15 λεπτά.
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά και ξεπλένουμε το ίζημα με 200 μ l παγωμένης 80% αιθανόλης.
5. Φυγοκεντρούμε σε υψηλή ταχύτητα για 2 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
6. Ξεπλένουμε με 200 μ l 100% αιθανόλη
7. Απομακρύνουμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε το ίζημα. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ~25 μ l αποστειρωμένο dH₂O.

Π.3 Μεταφορά DNA σε νάilon μεμβράνες

Υλικά

- Διάλυμα 0.2 N HCl
- Διάλυμα αποδιάταξης: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
- Διάλυμα εξουδετέρωσης: 1 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl
- Διάλυμα 20X SSC: 0.3 M Na-Citrate pH 7, 3 M NaCl
- Νάylon μεμβράνη Immobilon-Ny+

- Χαρτί Whatmann 3 mm

Διαδικασία

1. Το DNA υδρολύεται μερικώς με μεταφορά του πηκτώματος σε 0.2 N HCl για 15 λεπτά. Το στάδιο αυτό έχει σκοπό την τμηματοποίηση μεγάλων τμημάτων DNA που είναι δύσκολο να μεταφερθούν.
2. Το πήκτωμα ξεπλένεται 2 φορές με H₂O. Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος αποδιάταξης για 30 λεπτά. Ξεπλένουμε με H₂O και στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα εξουδετέρωσης για 30 λεπτά.
3. Για τη μεταφορά χρησιμοποιείται νάιλον μεμβράνη η οποία διαβρέχεται σε Milli-Q νερό για περίπου 10 λεπτά και ακολουθεί μεταφορά της σε διάλυμα 20X SSC για 5 λεπτά τουλάχιστον.
4. Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3 mm του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε διάλυμα 20X SSC. Απομακρύνονται οι φυσαλίδες μεταξύ πηκτώματος και Whatmann και οι περιοχές του διηθητικού χαρτιού οι οποίες δεν καλύπτονται από το πήκτωμα, καλύπτονται με πλαστική μεμβράνη ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα διέλευσης του διαλύματος μεταφοράς μέσω αυτών.
5. Η μεμβράνη τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα και απομακρύνονται όλες οι φυσαλίδες. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετούνται 3 χαρτιά Whatmann, που έχουν κορεσθεί σε 20X SSC, απορροφητικά χαρτιά ύψους 10 cm και μια γυάλινη πλάκα βάρους περίπου 300 gr.
6. Μετά από 18 ώρες και αφού έχει ολοκληρωθεί η μεταφορά του DNA στη μεμβράνη, αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα 6X SSC, στεγνώνεται και ξηραίνεται για 2 ώρες στους 80°C υπό κενό και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Π.4 Υβριδοποίηση DNA

Υλικά

- Διάλυμα 20X SSC.
- Διάλυμα 50X Denhardt's: 1% φικόλλη,
- 1% πολυβινυλο-πυρρολιδόνη,
- 1% αλβουμίνη ορού βοός (BSA, Fraction V).
- Διάλυμα προϋβριδοποίησης: 6X SSC,

5X Denhardt's,

0.5% SDS,

0.1 mg/ml DNA (αποδιαταγμένο σπέρμα σολομού).

- Διάλυμα υβριδοποίησης: 6X SSC,

5X Denhardt's

0.5% SDS,

0.2 mg/ml DNA (αποδιαταγμένο σπέρμα σολομού).

- Διαλύματα εκπλύσεων: 2X SSC-0.1% SDS,

0.2X SSC-0.1% SDS,

0.1X SSC.

Διαδικασία

Η νάilon μεμβράνη διαβρέχεται σε διάλυμα 6X SSC για δύο λεπτά και μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα φούρνου υβριδοποίησης. Στη συνέχεια τοποθετείται στο σωλήνα προθερμασμένο διάλυμα προϋβριδοποίησης και ακολουθεί επώαση στους 68°C για 2 ώρες. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αντικαθίσταται με προθερμασμένο διάλυμα υβριδοποίησης στο οποίο προστίθεται ο σημασμένος ανιχνευτής ο οποίος έχει αποδιαταχθεί με βράσιμο για 10 λεπτά. Ακολουθεί επώαση για 18 ώρες, στους 68°C αν ο ανιχνευτής είναι ομόλογος ή στους 63°C αν ο ανιχνευτής είναι ετερόλογος. Μετά το τέλος της υβριδοποίησης η μεμβράνη ξεπλένεται σε : 2X SSC-0.1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (2X), 0.2X SSC-0.1% SDS στους 68°C (50°C για ετερόλογο ανιχνευτή) για 30 λεπτά (2X), 0.1X SSC σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, η μεμβράνη καλύπτεται με διάφανη πλαστική μεμβράνη και εκτίθεται για αυτοραδιογραφία στους -80°C. Το φίλμ που χρησιμοποιείται είναι Kodak X-omat AR και η έκθεση διαρκεί 1-5 ημέρες.

Π.5 Σήμανση DNA με τυχαίους εκκινητές (Random primed DNA labeling)

Για τη σήμανση DNA μορίων με τη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκε το της εταιρείας Promega (Prime-a-Gene Labeling SYSTEM, #U1100).

Υλικά

-Διάλυμα Sephadex G-50: 250 ml TE-pH 7.4, 30 gr Sephadex G-50.

Διαδικασία

1. 25-50 ng DNA αποδιατάσσονται στους 100°C για 10 λεπτά και τοποθετούνται σε πάγο για περίπου 5 λεπτά.
2. Στο DNA προστίθενται 2 μl μίγματος δεοξυνουκλεοτιδίων εκτός dATP, 2 μl BSA, 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος (5X), 5 μl [α - ^{32}P]-dATP 3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ και 1 μl DNA πολυμεράσης Klenow (5 u/ μl).
3. Το διάλυμα επωάζεται στους 37°C για 60 λεπτά. Μεταφέρεται σε πάγο και προστίθεται 1 μl διαλύματος EDTA 0.4 M.
4. Τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνονται από το διάλυμα του σημασμένου ανιχνευτή μέσω στήλης μοριακής διήθησης Sephadex G-50.

Η πορεία που χρησιμοποιείται για την παρασκευή στηλών μοριακής διήθησης είναι η εξής:

1. Σε μια κενή μικροφυγοκεντρική στήλη διήθησης προσθέτουμε με μια πιπέτα παστέρ 1 ml διαλύματος Sephadex G-50
2. Φυγοκεντούμε στις 3000 rpm για 1 min.
3. Μεταφέρουμε την στήλη σε νέο σωληνάριο και προσθέτω το σημασμένο DNA από την προηγούμενη διαδικασία.
4. Φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 2 min και πετάμε τη στήλη η οποία έχει συγκρατήσει τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια.