

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη θερμοεπαγωγής και βιολογικών ρολογιών στο έντομο

***Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae)**



ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΓΚΟΥΒΙΤΣΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Άννα Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
2. Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)
3. Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

(Συνεδρία 10η/12 – 4 – 2007 εξ' αναβολής)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Άννα Κούρτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ
2. Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ
3. Δήμητρα Μηλιώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ
4. Ιωάννης Βόντας, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
5. Σταμάτης Ρήγας, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ
6. Luc Swevers, Ερευνητής Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»
7. Κώστας Ιατρού, Ερευνητής Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)

Το θέμα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ορίστηκε αρχικά με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης (Συνεδρία 12η/11 – 5 – 2007 εξ’ αναβολής) και τροποποιήθηκε στη συνέχεια με απόφαση της γενικής Συνέλευσης (Συνεδρία 6η/17-01-2013): «Μελέτη θερμοεπαγωγής και βιολογικών ρολογιών στο έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae).

EΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Άννας Κούρτη και του Καθηγητή Πολυδεύκη Χατζόπουλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου κυρία Άννα Κούρτη. Η κ. Κούρτη μου έδωσε την πρώτη μου ευκαιρία. Μου άνοιξε διάπλατα την πόρτα της εργασιακής μου καριέρας. Εκτός από την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια της θητείας μου στο εργαστήριο, μου έδωσε την αίσθηση της ελευθερίας και της δημιουργικότητας που δεν θα ξεχάσω ποτέ. Με βοήθησε να εξελιχτώ τόσο επιστημονικά αλλά και πνευματικά με έναν ξεχωριστό και μοναδικό τρόπο

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την παραχώρηση του εργαστηρίου του για την εκπόνηση της Διδακτορικής μου Διατριβής και την παροχή όλων των απαραίτητων υλικών, μηχανημάτων, την γνώση αλλά και την τεχνογνωσία, για την επιτυχή ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας. Η συμβολή του στην εξέλιξη μου ήταν καταλυτική.

Και βεβαίως θέλω να ευχαριστήσω τον μικρό Δημήτρη Κοντογιαννάτο, (για έμενα θα είναι πάντα μικρός) που πια μου μαθαίνει και δεν του μαθαίνω. Είναι τεράστια η χαρά μου να τον βλέπω να εξελίσσεται και να πραγματοποιεί τα όνειρα του.

Δεν μπορώ να μην αναφέρω την πολύτιμη βοήθεια όλων των συναδέλφων (φίλων) εντός των εργαστηρίων όπου εκπονήθηκε η Διδακτορική Διατριβή, όχι μόνο για την επιστημονική βοήθεια αλλά πιο πολύ για τις ατέλειωτες δημιουργικές αναζητήσεις που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ πολύ για όλα τον Σταμάτη Ρήγα, τον Μάκη Δάρα, την Δέσποινα Σαμακοβλή, την Έλλη Χατζησταύρου, τον Δημοσθένη Κίζη και τον μοναδικό Φώτη μας.

Κλείνοντας, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το κρατώ για τους γονείς μου και τον αδερφό μου που μου έδωσαν την ευκαιρία να σπουδάσω και ήταν, είναι και θα είναι πάντα δίπλα μου σε ότι και αν αποφασίσω.

Στη Ροζαλία και στο μικρό Ορέστη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
1.ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΡΟΛΟΓΙΑ.....	17
1.1. ΚΙΡΚΑΔΙΚΟΣ ΡΥΘΜΟΣ ΚΑΙ ΚΙΡΚΑΔΙΚΑ ΡΟΛΟΓΙΑ	19
1.1.2. Ο μηχανισμός των κερκαδικών ρυθμών	20
1.1.3. Τα ωρολογιακά (clock genes) γονίδια της <i>Drosophila melanogaster</i>	21
1.1.4. Λειτουργία του κερκαδίου ρολογιού	24
1.2. ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΡΟΛΟΓΙΑ.....	28
1.2.3. Δομή και λειτουργία των φωτοπεριοδικών ρολογιών	28
1.2.4. Θεωρίες για το φωτοπεριοδικό ρόλο.....	29
1.2.5. Ο Φωτοπεριοδικός μετρητής.....	32
2. Η ΔΙΑΠΑΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ	34
2.1. Τύποι διάπαυσης.....	37
2.2. Γενετική και μοριακή προσέγγιση της διάπαυσης.....	38
2.2.1. Ρύθμιση της διάπαυσης.....	38
2.2.2. Έκφραση γονιδίων αποκλειστικά κατά τη διάπαυση.....	38
2.2.3. Ενδοκρινική ρύθμιση της διάπαυσης	41
2.3. Μηχανισμοί της διάπαυσης	43
3. ΟΙ ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	45
3.1. Ο μεταγραφικός παράγοντας της θερμικής καταπόνησης (HSF).....	48
3.2. Πρωτεΐνες καταπόνησης ως μοριακοί συνοδοί	52
3.3. Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών	54
3.3.1. Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.....	55
3.3.2. Η οικογένεια HSP70.....	55
3.3.3. Η οικογένεια HSP90.....	56
3.4. Πρωτεΐνες καταπόνησης και ο ρόλος τους στη διάπαυση των εντόμων	57
i. Οι μικρές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες.....	57
ii. Η θερμοεπαγόμενη Hsp70.....	59
iii. Η θερμοεπαγόμενη Hsp90.....	61
4. ΤΟ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΟ <i>SESAMIA NONAGRIOIDES</i>.....	63
4.1. Τα έντομα και η σημασία τους	63
4.2. ΤΟ ΕΝΤΟΜΟ <i>SESAMIA NONAGRIOIDES</i>	64
4.2.1. Ταξινόμηση του εντόμου <i>Sesamia nonagrioides</i>	64
4.2.2. Κύκλος ζωής του εντόμου <i>S. nonagrioides</i>	66
4.2.3. Η διάπαυση του εντόμου <i>S. nonagrioides</i>	67
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	70
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	72
2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	72
2.1.1. Εκτροφή του εντόμου στο εργαστήριο	72
2.1.2. Χειρισμοί του εντόμου	73
2.1.2.1. Πειράματα Βιολογικών ρολογιών	73
2.1.2.2. Πειράματα θερμοεπαγωγής	74
2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	75
2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από λεπιδόπτερα έντομα.....	75
2.2.2 Phenol/Chloroform treatment DNA και RNA δειγμάτων	75
2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων DNA/RNA με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας	76
2.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό εντόμων/ βακτηριακά κύτταρα	77
2.2.5 DNase Treatment RNA δειγμάτων που περιέχουν DNA	78
2.2.6 Παρασκευή cDNA από ολικό RNA με την μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφής	79
2.2.7 Παρασκευή dNTPs mix	80

2.2.8 Σχεδιασμός/παρασκευή εκκινητών.....	81
2.2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)/ Ημιποσοτικό και ποσοτικό RT-PCR	82
2.2.10 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA σε πηκτή αγαρόζης.....	87
2.2.11 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	89
2.2.12 Αλληλούχιση κλωνοποιημένων ενθέτων και ο pGEM-T Easy vector	89
2.2.13 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA /συμπληρωματικότητα/ Λιγοποίηση	91
2.2.14 Μετασχηματισμός και παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> (Dh5A).....	92
2.2.15 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>E. coli</i>	97
2.2.16 Πέψη νουκλεϊνικών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού	98
2.2.17. Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση.....	99
2.2.18 Southern Hybridization.....	99
2.3 Απομόνωσης cDNA/ Έκφραση γονιδίων με ημιποσοτικό/Real Time	100
2.3.1 Απομόνωση του cDNA της <i>SnoHSP19.5</i>	100
2.3.2 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoHSP20.8</i>	102
2.3.3 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoHSP83</i>	103
2.3.4 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoHSP70</i>	105
2.3.5 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoHSC70</i>	106
2.3.6 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoPer</i>	108
2.3.7 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoTim</i>	109
2.3.8 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoCry</i>	111
2.3.9 Απομόνωση του cDNA του <i>SnoCyc</i>	112
2.3.10 Ημιποσοτικό PCR για <i>SnoHsp19.5</i>	113
2.3.11 Ημιποσοτικό PCR για <i>SnoHsp20.8</i>	114
2.3.12 Ημιποσοτικό PCR για <i>Sno Hsc70</i>	115
2.3.13 Ημιποσοτικό PCR για <i>SnoHsp70</i>	115
2.3.14 Ημιποσοτικό PCR για <i>SnoHsp83</i>	116
2.3.15.Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoPer</i>	117
2.3.16.Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoCyc</i>	117
2.3.17 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoCry</i>	117
2.3.18 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoTim</i>	118
2.3.19 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoHsp19.5</i>	118
2.3.20 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoHsp20.8</i>	119
2.3.21 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoHsc70</i>	119
2.3.22 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoHsp70</i>	119
2.3.23 Ποσοτικό RT-PCR για <i>SnoHsp83</i>	120
ΜΕΡΟΣ Α Μελέτη βιολογικών ρολογιών στο έντομο <i>Sesamia nonagrioides</i>	123
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	123
α. Μελέτη κερκαδικών ρολογιών.....	123
Ι. Αλληλούχιση και μελέτη έκφρασης των γονιδίων <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>cyc</i> και <i>cry</i> στο έντομο <i>S. nonagrioides</i>	124
1. Το γονίδιο <i>per</i>	124
1.1 Αλληλούχιση του <i>per</i>	124
1.2. Σύγκριση ακολουθιών PER και φυλογενετική ανάλυση.....	133
1.3. Μελέτη έκφρασης του <i>Snoper</i> κάτω από φωτοπερίόδους LD 16:8/LD 10:14..	134
2. Το γονίδιο <i>timeless</i>	131
2.1. Αλληλούχιση του <i>timeless</i>	131
2.2. Σύγκριση ακολουθιών TIM και φυλογενετική ανάλυση.....	133
2.3. Μελέτη έκφρασης του <i>Snotim</i> κάτω από φωτοπερίόδους LD 16:8/ LD 10:14	134
3. Το γονίδιο <i>cry</i>	137
3.1. Κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του <i>Snocry1</i> και <i>Snocry2</i>	137
3.2. Σύγκριση ακολουθιών CRY και φυλογενετική ανάλυση.....	139
3.3. Μελέτη έκφρασης <i>Snocry1</i> κάτω από φωτοπερίόδους LD16:8/LD10:14	139
4. Το γονίδιο <i>cycle</i>	143

4.1. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση του γονιδίου <i>cycle</i>	143
4.2. Μελέτη έκφρασης <i>SnoCyc</i> σε φωτοπεριόδους LD16:8 και LD10:14	147
B. Μελέτη φωτοπεριοδικών ρολογιών.....	151
I. Χρονική έκφραση των ωρολογιακών γονιδίων κάτω από φωτοπεριόδους που εισάγουν διάπαυση: (LD10:14), (LD10:62) και (L10:14D: 10L: 62D).....	151
1. Φωτοπερίοδος (LD10:14)	152
2. Φωτοπερίοδος (LD10:62)	154
3. Φωτοπερίοδος (L10:14D: 10L: 62D).....	157
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	161
A. Το κίρκαδικό ρολόι της <i>S. nonagrioides</i>	162
Τα γονίδια <i>SnoPer</i> και <i>SnoTim</i> και ο ρόλος τους στο κίρκαδικό ρολόι	162
Το γονίδιο <i>SnoCry</i> και ο ρόλος του στο κίρκαδικό ρολόι.....	164
Το γονίδιο <i>SnoCycle</i> και ο ρόλος του στο κίρκαδικό ρολόι	166
B. Το φωτοπεριοδικό ρολόι της <i>S. nonagrioides</i>	167
ΜΕΡΟΣ Β.....	171
Μελέτη θερμοεπαγωγής στο έντομο <i>S.nonagrioides</i>	171
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	1711
1. Τα γονίδια <i>Hsp19.5</i> και <i>SnoHsp20.8</i>	1711
1.1 Νουκλεοτιδικές και προβλεπόμενες αμινοξικές αλληλουχίες.....	1711
1.2. Συγκρίσεις αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	174
1.3. Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων μετά από θερμικό και ψυχρό στρες	176
1.4. Έκφραση των <i>SnoHsp19.5 /SnoHsp20.8</i> κατά τη διάρκεια της διάπαυσης.....	178
2. Τα γονίδια <i>SnoHsc70</i> και <i>SnoHsp70</i>	1822
2. 1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός των <i>Hsc/Hsp70</i> cDNA.....	1822
2. 2. Ιδιότητες των πρωτεϊνικών ακολουθιών.....	185
2. 3. Συγκρίσεις αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	185
2.4. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων <i>SnoHsc70/SnoHsp70</i> μετά από θερμικό ή ψυχρό στρες.....	189
2. 5. Έκφραση των <i>SnoHsc/Hsp70</i> κατά τη διάρκεια της διάπαυσης	185
3. Το γονίδιο <i>SnoHsp83</i>	195
3.1. Η <i>Hsp83</i> cDNA ακολουθία της <i>S. nonagrioides</i>	195
3.2. Γονιδιωματική ανάλυση	200
3.3. Μελέτη απόκρισης του γονιδίου <i>Hsp83</i> σε θερμικό στρες.....	201
3.4. Μελέτη έκφρασης <i>SnoHsp83</i> κατά τη διάρκεια της διάπαυσης.....	201
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	208
Τα γονίδια <i>SnoHsp19.5</i> και <i>SnoHsp20.8</i>	208
Τα γονίδια <i>SnoHsp70</i> και <i>SnoHsc70</i>	211
Το γονίδιο <i>SnoHsp83</i>	214
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	218
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	220
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ.....	245

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διάπαυση των εντόμων είναι μια περίοδος περιορισμού της ανάπτυξης που κατευθύνεται από αλλαγές σε αβιοτικά μηνύματα, τα οποία δείχνουν αλλαγές σε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι ο χειμώνας. Κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, πολλά γονίδια δεν εκφράζονται, ενώ κάποια άλλα εκφράζονται και φαίνεται ότι αυτά σχετίζονται με ωρολογιακούς μηχανισμούς και με αντίσταση στις αντίξοες συνθήκες. Τα βιολογικά ρολόγια είναι μοριακοί μηχανισμοί μέτρησης του χρόνου τα οποία ανήκουν σε διάφορους τύπους κυττάρων των οργανισμών.

Η πρόκληση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διακρίνει τη σχέση μεταξύ εσωτερικών και εξωτερικών μηνυμάτων, τα οποία συνδυαστικά οδηγούν τα έντομα σε διάπαυση. Η *D. melanogaster* είναι ένα εξαιρετικό μοντέλο γενετικής, αλλά όχι κατάλληλο για να κατανοήσουμε οικολογικούς όρους, όπως είναι η διάπαυση. Το έντομο *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) έχει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων, όπως είναι η προαιρετικού τύπου διάπαυση στο στάδιο της προνύμφης τελευταίου σταδίου (φωτοπερίοδος μικρής ημέρας, εισάγει διάπαυση, με εκτεταμένη διάρκεια ζωής της προνύμφης) και μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ καλό μοντέλο για μελέτη της διάπαυσης. Τα αντικείμενα της παρούσας διατριβής είναι:

A. Η μελέτη των βιολογικών ρολογιών της *S. nonagrioides*.

B. Η μελέτη θερμοεπαγωγής στο έντομο *S. nonagrioides*.

A. Τα βιολογικά ρολόγια της *S. nonagrioides* τα εξετάσαμε ως κίρκαδικά και ως φωτοπεριοδικά ρολόγια. Για να μελετήσουμε το μοριακό μηχανισμό του **κίρκαδικού ρολογιού** της *S. nonagrioides*, απομονώσαμε από κεφάλια προνυμφών της τα ωρολογιακά γονίδια *per*, *tim*, *cyc* και *cry* και στη συνέχεια μελετήσαμε την έκφραση τους σε φωτοπερίοδο μεγάλης (16L:8D) και μικρής (10L:14D) ημέρας. Απομονώθηκε ένα cDNA 1630 bp (ημιτελής), το *SnoPER*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 469 αμινοξέων και ένα cDNA 2803 bp, το *SnoTim*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 778 αμινοξέων. Δομικά, οι SnoPER και SnoTIM πρωτεΐνες κατέχουν κοινές ομολογίες με άλλα είδη εντόμων. Ιδιαίτερα υψηλά συντηρημένες περιοχές, οι PAS, PAC, NLS, CLD και TIS στην PER μεταξύ της *S. nonagrioides* και άλλων λεπιδοπτέρων, προτείνει ότι στην *S. nonagrioides* ο κίρκαδικός μηχανισμός

λειτουργεί με όμοιο τρόπο, όπως στη *Drosophila* και σε άλλα λεπιδόπτερα. Επίσης κλωνοποιήσαμε δύο cDNA, που χαρακτηρίστηκαν ως *Snocry1* και *Snocry2*. Το *Snocry1* cDNA έχει μέγεθος 1836 bp, ενώ το *Snocry2* cDNA έχει μέγεθος 741 bp. Το *Snocry1* είναι όμοιο με το *cry1* της *D. melanogaster*. Το *Snocry1* κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 528 αμινοξικών καταλοίπων. Η μοριακή μάζα της προβλεπόμενης πρωτεΐνης SnoCRY1 ήταν 59.6 kDa, και το υπολογισμένο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 8.33. Τέλος, απομονώσαμε το *SnoCyc*, που αποτελείται από 2412 bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 667 αμινοξέων. Η SnoCYC περιέχει μία bHLH περιοχή για πρόσδεση στο DNA, και τις PAS-A και PAS-B περιοχές διμερισμού. Για να εξετάσουμε εάν τα *Snoper*, *Snotim*, *Snocyc* και *Snocry* μετάγραφα ταλαντεύονται σε 24ωρο κύκλο, εξετάσαμε τα επίπεδα των mRNA σε κεφάλια προνυμφών κάτω από συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:14 και LD16:8, με την τεχνική του Real-Time PCR. Τα ωρολογιακά γονίδια *Snoper*, *Snotim*, *Snocry* και *Snocyc* στις χρονικές μελέτες σε *S. nonagrioides* προνύμφες, έδειξαν μια καθαρή κερκαδική ταλάντωση και μια φωτοπεριοδική ανταπόκριση. Κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας και τα τέσσερα γονίδια δείχνουν χαμηλότερη έκφραση την ημέρα και υψηλότερη τη νύχτα. Σε συνθήκες μικρής ημέρας και τα τέσσερα γονίδια έδειξαν επίσης μια καθαρή κερκαδική ταλάντωση και μια φωτοπεριοδική ανταπόκριση, με μετατόπιση της κορύφωσης στο σκοτάδι, κατά 1-5 ώρες, σε σχέση με τις συνθήκες μεγάλης ημέρας. Τα μοριακά αποτελέσματα των πειραμάτων μας δείχνουν ότι η αλλαγή φωτοπεριόδου επηρεάζει άμεσα την mRNA έκφραση των ωρολογιακών γονιδίων.

2. Ο στόχος αυτού του μέρους εργασίας μας είναι η μελέτη της σχέσης ανάμεσα στις λειτουργίες του **φωτοπεριοδικού** και του **κερκαδικού** ρολογιού, στο μεταγωγικό μονοπάτι των φωτοπεριοδικών μηνυμάτων για την εκδήλωση προαιρετικής διάπαυσης. Ως μοντέλο χρησιμοποιήθηκε το έντομο *S. nonagrioides*. Εφαρμόστηκε σειρά πειραμάτων διαφορετικών φωτοπεριόδων σε ημερήσιο κύκλο (24 ώρες), τριήμερο κύκλο (72 ώρες) και τετραήμερο κύκλο (96 ώρες). Σε όλες τις περιπτώσεις που αναλύσαμε, πετύχαμε εισαγωγή των προνυμφών σε διάπαυση. Σε συνθήκες **LD10:14** (24 ώρες) εμφανίστηκε ένας καθαρά 24ωρος ρυθμός των *Snoper*, *Snotim*, *Snocry* και *Snocycle* mRNA επιπέδων. Η έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Τα επίπεδα mRNA των *Snoper*, *Snocycle* και *Snocry* εμφανίζουν κορυφή την ίδια ώρα της σκοτόφασης, ενώ το *Snotim* διαφέρει και εμφανίζει κορυφή τρεις ώρες αργότερα. Στη φωτοπερίοδο

LD10:62 (τριήμερος κύκλος) εμφανίστηκε μια ταλάντωση των τεσσάρων γονιδίων και είδαμε μια κορυφή για όλα τα γονίδια, στο τέλος της σκοτόφασης. Σε συνθήκες **L10:14D: 10L: 62D** (τετραήμερος κύκλος) εμφανίστηκε μια ταλάντωση των mRNA επιπέδων των γονιδίων. Τα γονίδια *Snotim* και *Snocry* εμφανίζουν κορυφή στο μέσον της δεύτερης «υποκειμενικής νύχτας». Τα γονίδια *Snooper* και *Snocyc* εμφανίζουν κορυφή στο τέλος της σκοτεινής φάσης, πριν την έναρξη του φωτός του επόμενου κύκλου. Σε σχέση με τον τριήμερο κύκλο (10L: 62D), παρατηρούμε ότι η προσθήκη ενός 24ωρου κύκλου με φωτεινή φάση 10 ωρών, επηρεάζει τα γονίδια *Snotim* και *Snocry* και αλλάζει την εικόνα έκφρασης τους. Για τα γονίδια *Snooper* και *Snocycle* παρατηρούμε ότι δεν αλλάζει η εικόνα έκφρασης και η κορυφή συμπίπτει με την κορυφή του κύκλου LD10:62. Αυτό είναι μια ένδειξη ότι η κερκαδικότητα και η φωτοπεριοδικότητα ρυθμίζονται από τα ίδια γονίδια. Σε σχέση με τα *Snotim* και *Snocry*, των οποίων αλλάζει η εικόνα έκφρασης, φαίνεται ότι έχουμε αποσύζευξη των συστατικών (γονιδίων) του μηχανισμού. Αυτό το γεγονός ίσως δείχνει ότι έχουμε 2 μηχανισμούς, που λειτουργούν όμως με τα ίδια ωρολογιακά γονίδια.

Η έρευνά μας σε σχέση με τη φωτοπεριοδική διάπαυση της *S. nonagrioides* δίνει ενδείξεις ότι το κερκάδιο σύστημα είναι μέρος του φωτοπεριοδικού συστήματος. Τα δύο συστήματα βασίζονται σε μοριακούς ωρολογιακούς μηχανισμούς των γονιδίων του κερκαδικού ρολογιού.

B. Για τη μελέτη της θερμοεπαγωγής στο έντομο *S. nonagrioides*, απομονώσαμε, αναλύσαμε και μελετήσαμε την έκφραση σε συνθήκες μεγάλης και μικρής ημέρας (σε κρύο ή ζέστη) για τα heat shock γονίδια: *SnoHsp19.5*, *SnoHsp20.8*, *SnoHsc70*, *SnoHsp70* και *SnoHsp83*. **a.** Απομονώσαμε και χαρακτηρίσαμε δύο μέλη της οικογένειας α -crystalline/sHSP, το *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* από τη *S. nonagrioides*. Τα cDNAs κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες των 174 και 185 αμινοξέων, υπολογισμένου μοριακού βάρους 19.5 και 20.8 kDa, αναλογικά. Η προβλεπόμενη αμινοξική ακολουθία του *SnoHsp19.5* έδειξε υψηλή ομοιότητα 90% με την *Hsp19.7* της *Mamestra brassicae*. Η *SnoHsp20.8* είχε 83% ομοιότητα με την *Hsp20.4* του *Bombyx mori*. Η έκφραση των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (ζέστη ή κρύο), έδειξε ότι άτομα που δεν ήταν σε διάπαυση, είχαν μετάγραφα τα οποία επάγονταν ισχυρά σε σχέση με θερμικό shock. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων μετά από θερμικό ή ψυχρό shock, ήταν διαφορετική για τα δύο γονίδια. Στο έντομο *S. nonagrioides*, η έκφραση

του γονιδίου *SnoHsp19.5* ήταν σταθερή σε σχέση με τη διάπαυση, όπου εκφράζονταν συνεχώς και έδειξε να επάγεται σε συνθήκες stress. Το γονίδιο *SnoHsp20.8* δεν επάγονταν στη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης και επάγονταν κατά τον τερματισμό της διάπαυσης, σηματοδοτώντας τον τερματισμό της διαδικασίας αυτής. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι τα γονίδια *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* ίσως παίζουν διακριτούς ρόλους στη διαδικασία της ρύθμισης της διάπαυσης.

Απομονώθηκαν επίσης από το έντομο *S. nonagrioides* και χαρακτηρίστηκαν οι πλήρεις cDNA ακολουθίες της Heat shock cognate protein 70 (*SnoHsc70*) και Heat shock protein 70 (*SnoHsp70*). Αυτές κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 653 αμινοξέων (Hsc70) και 633 (Hsp70), με υπολογισμένη μοριακή μάζα 71.5 kDa και 70.2 kDa αναλογικά. Το γονίδιο *SnoHsc70* εκφράζονταν συστατικά και το *SnoHsp70* ήταν έντονα θερμοεπαγόμενο σε μη διαπαύοντα έντομα. Το *SnoHsp70* δεν επάγεται στη διάρκεια της διάπαυσης, ενώ το *SnoHsc70* επάγεται όταν οι προνύμφες εισέρχονται σε βαθιά διάπαυση. Υψηλό θερμικό stress κατά τη διάρκεια της διάπαυσης δεν επηρεάζει επιπλέον τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsc70*. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το γονίδιο *SnoHsc70* ίσως παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια ειδικών σταδίων της διάπαυσης.

Τέλος, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ένα πλήρες cDNA *Hsp83* από τη *S. nonagrioides*, που ονομάστηκε *SnoHsp83*. Γονιδιωματική ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο *SnoHsp83* είναι μοναδικό. Το μέγεθος του *SnoHsp83* mRNA ήταν 2.6 kb. Το προβλεπόμενο πολυπεπίδιο αποτελείται από 717 αμινοξικά κατάλοιπα, με μοριακή μάζα 82.6 kDa. Η πρωτεΐνη περιέχει όλα τα υψηλά συντηρημένα μοτίβα τα οποία χαρακτηρίζουν τα μέλη της οικογένειας hsp90. Μελετήσαμε την έκφραση του γονιδίου *SnoHsp83* σε σχέση με διάπαυση και κρύο/ζέστη. Το *SnoHsp83* ήταν συστατικά εκφρασμένο σε μη διαπαύουσες προνύμφες και επάγονταν κατά 15 φορές σε συνθήκες θερμοκρασίας 40° C. Το *SnoHsp83* στη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης, όταν συμβαίνουν επιπλέον εκδύσεις, επιδεικνύει μια όμοια μορφή έκφρασης με το *SnoHsc70*. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το γονίδιο *SnoHsp83* μπορεί να εμπλέκεται στην αναπτυξιακή διαδικασία η οποία διενεργείται ανάμεσα σε δύο εκδύσεις.

ABSTRACT

Diapause is a period of endocrine-mediated metabolic and developmental arrest induced by changes in abiotic cues that indicate the onset of adverse environmental conditions, such as winter. All eukaryotes, and some prokaryotes, have evolved a circadian clock that is set by light to time various daily activities at the biochemical, physiological and behavioural levels. Some of these organisms have evolved **photoperiodism**, a response to the length of day or night for the timing of development, reproduction and diapause in anticipation of seasonal changes in the environment. **Circadian clocks** are molecular time-keeping mechanisms that reside in a diverse range of cell types in a variety of organisms. Since both circadian rhythms and photoperiodism rely upon daily cycles of environmental change, it seems reasonable to assume that the same clock elements are involved in both processes. However, the functional molecular elements involved in the photoperiodic response are still veiled. The challenge of the proposed work is to define the cross talk between internal signalling pathways and external cues in a combinatorial way leading into insect diapause. *D. melanogaster* is an excellent genetic model but not well understood in terms of ecology, as diapause, while *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) has a number of advantages, such as larval facultative diapause. The Mediterranean corn borer is an oligophagous insect on a narrow range of Gramminae and it is considered a major insect pest of maize *Zea mays* L. (Poaceae) in several countries of the Mediterranean basin. It over winters as full grown diapausing larva and adults emerge from late March to May. Larval diapause is induced by short-day photoperiods.

The objectives of the present work are: **A. The biological clocks of *S. nonagrioides*.** **B. The Heat Shock Proteins of *S. nonagrioides*.**

A. The biological clocks of *S. nonagrioides*

1. One of our long-range goals is to probe the roles of the various **clock genes** in the photoperiodic determination of larval diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). As a first step toward this goal, we report here the sequences and expression patterns of *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *cycle* (*cyc*) and *cryptochrome* (*cry*) mRNA in *S. nonagrioides*. Our results, which focus on

the larval head, demonstrate the influence of daylength on the expression of these genes. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the genes show similarity to homologous genes in other insects that have been investigated. The PERIOD protein has in PAS domain the pentapeptide GTPEK-like sequence. A diel rhythmicity of *per* and *tim* abundance was detected in the larvae heads (peak during scotophase). Also, diel rhythmicity of *cry* and *cyc* mRNA abundance was detected in the larvae heads (peak during scotophase). The abundance of *cyc* mRNA was quite low compared to *per*, *tim* and *cry* mRNA. Photoperiod influenced the expression patterns of *per*, *tim*, *cry* and *cyc* mRNA abundance mRNA: the peak of *per* mRNAs expression shifted in concert with onset of the scotophase, while the shift in *tim* mRNA expression was less pronounced. The amplitude of *tim* mRNA was severely dampened under long day length, but that of *per* mRNA was not affected. These distinct patterns of expression suggest that this information could be used to determine photoperiodic response such as diapause

2. Photoperiodic clocks allow organisms to predict the coming season. In insects, the seasonal adaptive response mainly takes the form of diapause. The extensively studied photoperiodic clock in insects was primarily characterized by a “black-box” approach, resulting in numerous cybernetic models. This is in contrast with the circadian clock, which has been dissected pragmatically at the molecular level, particularly in *Drosophila*. In the current study, we explored different ways in which identified molecular components of the circadian pacemaker may play a role in photoperiodism. In order to evaluate the potential effects of clock gene on diapause regulation, we designed several experimental schedules. Here we examined by Real Time PCR the expression of *snoper*, *snocry* *snotim* and *snocyc* mRNAs in the head of larval, reared under condition: 1st cycle, L10: 14D. 2nd cycle: LD10:62 (3 days cycle) and 3rd cycle: L10:14D: 10L: 62D (4 days cycle). In LD10:62 conditions the *SnoPer*, *SnoTim* and *SnoCyc* mRNA, gives a peak on the and of scotophase. In L10:14D:10L: 62D conditions, the gene *per* and *cycle* gives a peak on the end of scotophase, while the genes *tim* and *cry* gives a peak after the second light. These results give a clue that circadian system is part of photoperiodic system. Future progress in understanding the *Drosophila* circadian pacemaker, particularly as further output components are identified, may provide a direct link between the clock and photoperiodism.

B. The Heat Shock Proteins of *S. nonagrioides*

We isolated and characterized two members of the α -crystalline/sHSP family, the *SnoHsp19.5* and *SnoHsp20.8* from the *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). The cDNAs encoded proteins of 174 and 185 amino acids and calculated molecular weights of 19.5 and 20.8 kDa, respectively. The deduced amino acid sequence of *SnoHsp19.5* showed the highest homology of 90% *Hsp19.7* of *Mamestra brassicae*. The closest match of *SnoHsp20.8* was with *Bombyx mori Hsp20.4* at 83% identity. Genes expression of *SnoHsp19.5* and *SnoHsp20.8* under different environmental conditions (heat or cold), showed that in nondiapausing individuals, even though the transcripts were highly induced in response to heat shock, the accumulation after heat or cold treatment was different. In *S. nonagrioides* the expression of *SnoHsp19.5* gene was consistently expressed in response to diapause and up regulated in stress conditions, while *SnoHsp20.8* gene was down regulated in deep diapause and up regulated at the termination of diapause, marking the termination of the process. Our results suggesting suggesting that these genes may play distinctive roles in the regulation of the diapause process.

The complete cDNA sequences of Heat shock cognate protein 70 (***SnoHsc70***) and Heat shock protein 70 (***SnoHsp70***) were also determined from the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.). They encode 653 amino acids (Hsc70) and 633 amino acids (Hsp70), with calculated molecular masses of 71.5 kDa and 70.2 kDa respectively. *SnoHsc70* is constitutively expressed, and *SnoHsp70* is heat-inducible in non-diapausing insects. *SnoHsp70* is down regulated during diapause, while *SnoHsc70* is induced as the larvae enter deep diapause. High temperature stress during diapause has no further effect on transcript levels of *SnoHsc70*. Our results show that *SnoHsc70* may play important roles in assisting protein conformation during specific stages of diapause.

At the end, a full-length *Hsp83*, named ***SnoHsp83***, cDNA from corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* was cloned and sequenced. Genomic analysis showed that the *SnoHsp83* gene is unique. The size of the *SnoHsp83* mRNA was found to be approximately 2.6 kb. The deduced polypeptide comprised 717 amino acid residues, with a molecular mass of 82.6 kDa. It contains all the highly conserved amino acid motifs that characterize the cytosolic members of the hsp90 family. We investigated

the expression of *SnoHsp83* gene in response to diapause and heat/cold stress. *SnoHsp83* is constitutively expressed in non-diapausing larvae and is induced to fifteen-fold by heat. *SnoHsp83* display a similar pattern with *SnoHsc70* under diapause conditions, when extra larval molts go through. Our results indicate that *SnoHsp83* gene could be involved in the developmental process that occur between two molts.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΡΟΛΟΓΙΑ

Η ρυθμική φύση της ζωής καθοδηγείται από κυκλικά γεωφυσικά φαινόμενα, στα οποία ανταποκρίνεται σε τέτοιο βαθμό, ώστε να αποτελεί ένα μοντέλο πειραματισμού και έρευνας για την περαιτέρω κατανόηση άγνωστων ρυθμικών βιολογικών μηχανισμών. Κάθε ζωντανός οργανισμός υπόκειται σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες, που ενορχηστρώνονται από τις σχετικές κινήσεις των ουράνιων σωμάτων της Γης, της Σελήνης και του Ήλιου. Ο κύκλος της Γης γύρω από τον Ήλιο έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση εποχιακών αλλαγών, με δραματικές επιπτώσεις στη φωτοπερίοδο και στην θερμοκρασία. Έτσι, τα βιολογικά ρολόγια γενικά θεωρούνται προσαρμοσμένα σ' αυτούς τους περιβαλλοντικούς κύκλους. Τα πρώτα πειράματα για την ερμηνεία των βιολογικών ρολογιών, έγιναν στη μύγα *Drosophila melanogaster* και στη συνέχεια βγήκαν συμπεράσματα και για τα υπόλοιπα είδη, στα πλαίσια ανίχνευσης βιολογικών ρολογιών στα κύτταρα τους. Όλα αυτά αποτελούν τον κοινό παρονομαστή, για την κατανόηση της μοριακής βάσης των βιολογικών ρολογιών στους οργανισμούς (Nelson *et al.*, 2010). Σήμερα, σαράντα χρόνια μετά την πρώτη γενετική προσέγγιση στο θέμα των βιολογικών ρολογιών και των κερκαδικών ρυθμών, έχουμε αρκετές γνώσεις, ώστε να συσχετίζονται ασθένειες των ανθρώπων, όπως τα καρδιακά επεισόδια, το άσθμα και η μανιοκατάθλιψη, με βιολογικούς ρυθμούς 24ωρης περιόδου

Ρυθμικά φαινόμενα και τύποι ρυθμών: Ένας βιολογικός ρυθμός, είναι ένα βιολογικό γεγονός ή διαδικασία, που επαναλαμβάνεται μέσα στον χρόνο, με την ίδια σειρά και με το ίδιο διάστημα παύσης. Ένας περιβαλλοντικός ρυθμός, είναι ένα φαινόμενο επανάληψης που παρουσιάζεται στο φυσικό περιβάλλον. Οι περιβαλλοντικοί ρυθμοί παρουσιάζουν μεγάλη σημαντικότητα, διότι ορίζουν την δραστηριότητα πολλών οργανισμών. Υπάρχουν 2 τύποι βιολογικών ρυθμών: α. Εκείνοι που είναι φυσιολογικοί ρυθμοί υψηλής συχνότητας (π.χ χτύποι καρδιάς) και β. Εκείνοι που έχουν έναν γεωφυσικό συσχετισμό. Οι βιολογικοί ρυθμοί δημιουργούνται με δύο τρόπους: 1. Κάποιοι ρυθμοί καθοδηγούνται από περιβαλλοντικούς ή άλλους εξωτερικούς ρυθμούς, οπότε ονομάζονται εξωγενείς. 2.

Κάποιοι καθοδηγούνται από έναν εσωτερικό αυτοδιατηρούμενο ταλαντωτή, ή αλλιώς από ένα βιολογικό ρολόι, οπότε ονομάζονται ενδογενείς (Dunlap, 1996, 1999).

Το βιολογικό ρόλοι στους οργανισμούς: Με τον όρο βιολογικό ρολόι θεωρούμε οποιονδήποτε βιολογικό μηχανισμό, που επάγει μια φυσιολογική ρυθμική διαδικασία σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Κάθε τέτοιος μηχανισμός, οφείλεται στην έκφραση ενός ή περισσοτέρων γονιδίων, γνωστών σαν ωρολογιακά γονίδια (clock genes). Γνωρίζουμε πως υπάρχουν πολλοί βιολογικοί ρυθμοί που ταιριάζουν με τους διακεκριμένους γεωφυσικούς κύκλους, όπως η ηλιακή ημέρα, η σεληνιακή ημέρα, ο σεληνιακός μήνας και το ημερολογιακό έτος. Όλοι αυτοί οι γεωφυσικοί κύκλοι, δημιουργούν ρυθμικές αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρακάτω παρατίθενται κάποια από τα πλεονεκτήματα της ύπαρξης των ρολογιών που δικαιολογούν την σημαντικότητά τους: 1. Εκτίμηση των περιβαλλοντικών αλλαγών, 2. Συγχρονισμός συμπεριφοράς και γεγονότος που δεν γίνεται άμεσα αντιληπτό 3. Συνεχής μέτρηση του χρόνου 4. Συνεχίζουν να λειτουργούν κατά την απουσία των περιβαλλοντικών συγχρονιστών (zeitgeber) 5. Η ενδογενής περίοδος των ταλαντώσεων τους είναι κοντά σε ένα 24ωρο 6. Πυροδοτούνται από περιβαλλοντικά σήματα, με μια καθορισμένη σχέση φάσης. Ιδιότητες των βιολογικών ρολογιών: Τα βιολογικά ρολόγια έχουν τις παρακάτω ιδιότητες. Α. Λειτουργούν υπό σταθερές συνθήκες. Αυτό σημαίνει ότι ακόμα και αν δεν υπάρχει κάποιο εξωτερικό αίτιο, όπως είναι ο κύκλος σκότους-φωτός ή θερμοκρασίας, οι κύκλοι των ρολογιών εξακολουθούν να λειτουργούν. Συνεπώς, τέτοια εξωτερικά αίτια, δεν είναι τα πραγματικά αίτια των ρυθμών. Στην μεταφορά σε σταθερές συνθήκες εργαστηρίου, η περίοδος ενός ρυθμού είναι σχεδόν ίδια με αυτήν της φύσης, με κάποια βράχυνση ή επιμήκυνση. Πρόκειται για το free-running φαινόμενο, η περίοδος του οποίου κυμαίνεται γύρω στις 24 ώρες και σαν φυσιολογική περίοδος του φαινομένου αυτού, καλείται tau. Με βάση το πλάτος της περιόδου, προκύπτει και η ονοματολογία των ρυθμών, όπου με την χρήση του προθέματος «circa» που σημαίνει «περίπου», προκύπτουν οι όροι: circadian (περίπου μια μέρα) (κιρκαδικός), circalunar (περίπου μια σεληνιακή περίοδος), circamonthly (περίπου έναν μήνα) και circannual (περίπου έναν χρόνο) ρυθμοί. Β. Ισορροπούν απέναντι στις αλλαγές της θερμοκρασίας. Τα βιολογικά ρολόγια δεν είναι ευαίσθητα στην θερμοκρασία και εξισορροπούν την λειτουργία τους απέναντι στις αυξομειώσεις της θερμικής κλίμακας. Σαν γενικός κανόνας ισχύει, πως μια αλλαγή 10°C, διπλασιάζει ή και τριπλασιάζει την ταχύτητα

των χημικών αντιδράσεων. Στην περίπτωση των ρολογιών όμως δεν ισχύει αυτό, αφού μια αντίστοιχη αύξηση της θερμοκρασίας, αλλάζει τον ρυθμό λειτουργίας του μόνο κατά 20%. Η επίδραση αυτή μπορεί να περιγραφεί με την παράμετρο Q10, που είναι ένας καθαρός αριθμός και αποτελεί το πηλίκο της περιόδου του ρυθμού του φαινομένου, σε θερμοκρασία T, προς την περίοδο του φαινομένου, σε θερμοκρασία $T+10^{\circ}\text{C}$. Για τις περισσότερες χημικές αντιδράσεις, το Q10 κυμαίνεται από 2 έως 4, ενώ στην περίπτωση της λειτουργίας του ρολογιού, η αντίστοιχη διακύμανση είναι από 0,8 έως 1,04. Αυτό δείχνει πως υπάρχει άμυνα των ρολογιών απέναντι στις μεταβολές της θερμοκρασίας, γεγονός που αποτελεί ιδιότητα των ρολογιών. Γ. Παρέχουν ακρίβεια του μήκους της περιόδου. Κάποιες από τις ιδιότητες των ρολογιών, απαιτούνται στις διαδικασίες χρονοισμού και μια από αυτές είναι οι ακρίβεια του μήκους της περιόδου. Αν απομονώσουμε ένα ζώο σε αμετάβλητες συνθήκες και παίρνουμε μετρήσεις του μήκους της περιόδου ενός ρυθμού, ανά κατάλληλα χρονικά σημεία στην διάρκεια ενός μήνα, θα διαπιστώσουμε μια εκπληκτική ακρίβεια στην επανάληψη των αποτελεσμάτων. Δ. Βρίσκονται υπό γενετικό έλεγχο. Το 1972 έγινε γνωστό πως απλές γονιδιακές μεταλλάξεις, είναι δυνατόν να αλλάζουν καταστάσεις των βιολογικών ρολογιών. Το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι η βράχυνση ή η μεγέθυνση της περιόδου tau. Ε. Είναι ρυθμιζόμενα από περιβαλλοντικούς κύκλους. Όπως έχουμε δει, τα ρολόγια από μόνα τους δεν δουλεύουν με ακρίβεια σε 24ωρο κύκλο. Ωστόσο στην φύση παρατηρείται μια σχετική αυστηρότητα του 24ώρου. Λόγω των ανωτέρω ιδιοτήτων, καταλαβαίνουμε πως τα βιολογικά ρολόγια χρειάζονται ρύθμιση και επανέναρξη του ρυθμού τους, στην ακριβή περίοδο, κατά την έναρξη μιας καινούριας ημέρας. Πιθανότατα αυτόν τον ρόλο τον αναλαμβάνει ο κύκλος φωτός-σκότους. Κάθε τέτοιο περιοδικό σινιάλο, είναι γνωστό ως Zeitgeber. Η λέξη είναι Γερμανική και σε ελεύθερη μετάφραση σημαίνει χρονοδότης (time giver). Ο ρόλος του χρονοδότη αυτού, είναι γνωστός ως entrainment και σαν διαδικασία φαίνεται να εξασφαλίζει την καταλληλότητα λειτουργίας κάθε βιολογικού ρολογιού (Κούρτη, 2013).

1.1. ΚΙΡΚΑΔΙΚΟΣ ΡΥΘΜΟΣ ΚΑΙ ΚΙΡΚΑΔΙΚΑ ΡΟΛΟΓΙΑ

Ο **κίρκαδικός ρυθμός**, είναι το αποτέλεσμα της λειτουργίας ενός βιολογικού ρολογιού των οργανισμών, περιόδου περίπου 24 ωρών. Προέρχεται, όπως αναφέρθηκε, από την λατινική λέξη «circa» που σημαίνει «περίπου» και την λέξη

«die» που σημαίνει ημέρα. Η μελέτη του έχει κριθεί απαραίτητη, μετά τις παρατηρήσεις στο φυσικό περιβάλλον από την συμπεριφορά φυτών, ζώων και ανθρώπων, που ακολουθούν έναν τέτοιο ρυθμό. Μελέτη τέτοιων βιολογικών ρολογιών γίνεται εδώ και 40 χρόνια, όμως σχετικά πρόσφατα βρέθηκαν τα απαραίτητα δεδομένα, για την μελέτη της μοριακής βάσης αυτής της κερκαδικής συμπεριφοράς (Κούρτη, 2013).

Τα κερκαδικά ρολόγια είναι οι ενδογενείς χρονοσυντηρητές που βοηθούν όλους τους οργανισμούς να ανταπεξέρχονται στις ημερήσιες αλλαγές του φωτός, της θερμοκρασίας και άλλων περιβαλλοντολογικών παραγόντων. Ο ρόλος τους εκφράζεται σε συμπεριφορές, όπως η **κινητικότητα, η εύρεση τροφής, η ερωτοτροπία, η συντροφικότητα, η εναπόθεση ωαρίων και έκδυση** (Saunders 2002). Επί πλέον, πολλά θέματα φυσιολογίας, όπως η σύνθεση και απελευθέρωση ορμονών, η πρόοδος μέσω του κύκλου διαίρεσης κυττάρων ή τους μεταβολικούς κύκλους, εμφανίζονται να είναι συνδεδεμένα με την λειτουργία του κερκαδικού ρολογιού. Τα βασικά χαρακτηριστικά του κερκαδικού ρολογιού είναι τα ακόλουθα: A) Συνεχίζουν να λειτουργούν κατά την απουσία των περιβαλλοντικών συγχρονιστών (zeitgebers). B) Η ενδογενής περίοδος των ταλαντωτών τους είναι κοντά σε ένα 24ωρο. Γ) Είναι ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, σε ένα εύρος οικοφυσιολογικών σημαντικών θερμοκρασιών. D) Πυροδοτούνται από περιβαλλοντικά σήματα, με μια καθορισμένη σχέση φάσης. Η γνώση μας σε σχέση με τα κερκαδικά ρολόγια, βασίζεται σε μελέτες του μοντέλου εντόμου *Drosophila melanogaster*, στην οποία σχεδόν όλα τα σημαντικά ωρολογιακά γονίδια πρωτοαναγνωρίστηκαν (Rosato *et al.*, 2006).

1.1.2. Ο μηχανισμός των κερκαδικών ρυθμών

Η φύση του μηχανισμού που δημιουργεί κερκαδικούς ρυθμούς, παραμένει ένα βιολογικό πρόβλημα. Για να κατανοήσουμε αυτόν τον μηχανισμό, πολλά ερωτήματα περί **κερκαδικότητας** και **χρονισμού**, απαιτούν απαντήσεις. Πως ένα ενδογενές ρολόι μετρά τον χρόνο; Υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις ότι τα κερκαδικά ρολόγια λειτουργούν στο επίπεδο του απλού κυττάρου; Πως η αρνητική κυκλική ανάδραση, που περικλείει την ρυθμική μεταγραφή του γονιδίων, βρίσκεται στην καρδιά του μηχανισμού διατήρησης του χρονισμού; Πως τα ρολόγια έρχονται σε συμφωνία με τους κύκλους του φωτός, που προκύπτουν από την πορεία της γης γύρω από τον ήλιο;

Εφόσον το κिरκαδικό ρολόι ανήκει γενικότερα στην κατηγορία των κिरκαδικών ρυθμών, παρουσιάζει τις ιδιότητες που ήδη έχουν αναφερθεί. Άρα, ο κύκλος φωσ-σκοτάδι δεν είναι εκείνος που το ορίζει. Το γεγονός όμως πως ο κिरκαδικός μηχανισμός πηγαίνει παράλληλα με το εξωτερικό περιβάλλον, μας κάνει να πιστεύουμε πως το φως προκαλεί επιδράσεις στα μοριακά συστατικά του ρολογιού και επηρεάζει την λειτουργία του, με αποτέλεσμα αυτόν τον συγχρονισμό. Μοριακά συστατικά μπορεί να είναι γονίδια γνωστά σαν ωρολογιακά γονίδια (clock genes) ή ορμόνες ή πρωτεΐνες, που μέσα σε 24 ώρες έχουν ολοκληρώσει έναν πλήρη κύκλο διαδικασιών, ο οποίος έχει αντίκτυπο στην συμπεριφορά ενός οργανισμού, που διαθέτει αυτά τα συστατικά. Εκείνο που παίζει ρόλο σε έναν τέτοιο κύκλο, είναι τα επίπεδα της μεταγραφής, η ενεργοποίηση των clock γονιδίων και άλλες μοριακές λειτουργίες (Rosato *et al.*, 2006).

1.1.3. Τα ωρολογιακά (clock genes) γονίδια της *Drosophila melanogaster*

Η γνώση μας σε σχέση με τα κिरκαδικά ρολόγια, βασίζεται σε μελέτες του μοντέλου εντόμου *Drosophila melanogaster*, στην οποία σχεδόν όλα τα σημαντικά ωρολογιακά γονίδια πρωτο-αναγνωρίστηκαν (Rosato *et al.*, 2006 a,b). Οι έρευνες για την κατανόηση του κिरκαδικού συστήματος, ξεκίνησαν από την *D.melanogaster* και σταδιακά τα αποτελέσματα έδειχναν ομολογίες και ομοιότητες των ταυτοποιημένων μοριακών συστατικών της, με ως πρόσφατα άγνωστα μοριακά συστατικά των θηλαστικών. Γι αυτόν τον λόγο, γίνεται μια εκτενής αναφορά στα clock γονίδια της *D.melanogaster*. Τα γονίδια *per*, *tim*, *dbt* (double time) ταυτοποιήθηκαν σαν συστατικά του ρολογιού της και προσφάτως γνωρίσαμε τα *clk*, *cyc* και *cry*.

i. Το *per* γονίδιο της *D.melanogaster*

Πρόκειται για το πρώτο clock γονίδιο που ανακαλύφθηκε στα ακμαία της *D.melanogaster*. Η γενετική του προσέγγιση οφείλεται στην ανακάλυψη τριών μεταλλάξεων το 1971, από τους Konopka και Benzer που χαρτογραφήθηκαν στο ίδιο γονίδιο που συνδέεται με το X-χρωμάτωμα του εντόμου και που ονομάστηκε **period** (*per*).

Η βιολογία του *per*: Το γονίδιο *per* ελέγχει: α. Την έξοδο του ακμαίου από το στάδιο της νύμφης (έδρα: εγκέφαλος), β. Την κινητήρια διαδικασία (έδρα: εγκέφαλος), γ. Τη μελωδία σύζευξης (έδρα: θώρακας). Τα χρονικά και σημειακά όρια δράσης του γονιδίου είναι: α. Το ωό, β. Το έμβρυο (σιελογόνοι αδένες, μεσαία γραμμή του

κεντρικού νευρικού συστήματος). γ. Η pronύμφη. δ. Η νύμφη (προθωρακικοί αδένες, οπτικοί λοβοί) και ε. Το ακμαίο (κεραίες, προβοσκίδα, μάτια, οπτικοί λοβοί, κεντρικά εγκεφαλικά κύτταρα, θωρακικό γάγγλιο). Το 1984, έγινε η ταυτοποίηση του γονιδίου και οι επιδράσεις των μεταλλάξεων αυτών στην μεταγραφή του (Bargiello *et al.*, Zehring *et al.*, 1984). Γενικά, οι μεταλλάξεις του εν λόγω γονιδίου, επιδρούν στο μήκος της περιόδου των ρυθμών συμπεριφοράς της *D.melanogaster*. Έτσι, έχουμε ότι:

Per^s : προκαλεί βράχυνση της περιόδου (19 ώρες).

Per^l : προκαλεί επιμήκυνση της περιόδου (29 ώρες).

Per⁰ : προκαλεί απορύθμιση.

Το γονίδιο αυτό (*period*, συμβολισμός: *per*) χαρακτηρίζεται από την **PAS** περιοχή και η λειτουργία του ρυθμίζει ένα μεταγραφικό μεσολαβητή σε σχέση με τη φωτοπερίοδο. Η κυτταρική του τοποθέτηση είναι στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα. Η **PAS** περιοχή, είναι μια επαναλαμβανόμενη αμινοξική περιοχή, που περιέχεται στο προϊόν της μεταγραφής του *per* γονιδίου, δηλαδή στην PER πρωτεΐνη. Η παρουσία της κρίνεται σημαντική και παρακάτω φαίνεται ο ρόλος της στην κυκλική διαδικασία των κερκαδικών φαινομένων. Η PAS περιοχή φαίνεται πως μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταγραφικών διαμεσολαβητών. Οι περισσότεροι από αυτούς, περιέχουν κάποιες καλώς χαρακτηρισμένες περιοχές, προσδεμένες στο DNA, γνωστές σαν **bHLH** (basic helix loop helix) (Zhulin *et al*, 1997).

ii. Το **Timeless** γονίδιο της *D.melanogaster*

Πρόκειται για τον δεύτερο παρόμοιο clock γονίδιο, που ανακαλύφθηκε το 1984, μέσω μιας χρωμοσωμικής μετάλλαξης, που προκαλεί με την δράση της απορύθμιση της κερκαδικότητας δυο συμπεριφορών της *D.melanogaster*: α. της εξόδου των ακμαίων ατόμων από το στάδιο της pronύμφης (eclosion) και β. της κινητηρίου διαδικασίας. Η γενετική χαρτογράφηση τοποθετεί το γονίδιο στον αριστερό βραχίονα του δεύτερου χρωμοσώματος (Myers,1995). Το **Timeless** (συμβολισμός *tim*), χαρακτηρίζεται από την **PAS** περιοχή και λειτουργία του είναι η ρύθμιση της φωτοπεριόδου, σαν μεταγραφικός μεσολαβητής. Κυτταρικά τοποθετείται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα Το προϊόν μεταγραφής του *tim* γονιδίου, η TIM πρωτεΐνη, φαίνεται πως έχει μια συνεργαστική δράση με την αντίστοιχη PER, στην

λειτουργία του κερκαδικού συστήματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι η TIM υφίσταται αρνητικές συνέπειες στην δομή της, παρουσία του φωτός, που δείχνει την εμπλοκή της σε διαδικασίες χρονοισμού, που συμπίπτουν με τον κύκλο φωτός-σκότους (Lee *et al.*, 1999).

iii. Το **double-time** γονίδιο της *D.melanogaster*

Η ονομασία **double-time** (συμβολισμός: **dbt**) είναι για το γονίδιο του οποίου το πρωτεϊνικό προϊόν, η πρωτεϊνική κινάση (DBT), είναι στενά συσχετισμένο με την ανθρώπινη κινάση I και η κυτταρική του τοποθεσία είναι το κυτταρόπλασμα. Οι *dbt^s* και *dbt^l* μεταλλάξεις, που εναλλάσσουν το μήκος της περιόδου στους κερκαδικούς ρυθμούς της *D.melanogaster*, προκαλούν σημειακές αμινοξικές αντικαταστάσεις, σε διατηρημένες περιοχές της, λόγω της κινάσης. Η *dbt* μεταλλάξεις, που εξαλείφουν τους ρυθμούς έκφρασης των *per* και *tim* γονιδίων, υπερ-παράγουν υπο-φωσφοριλιωμένες PER πρωτεΐνες και ακυρώνουν την έκφραση του *dbt*. Το *dbt* mRNA, φαίνεται να εκφράζεται στους ίδιους τύπους κυττάρων, όπως αυτούς των *per* και *tim* γονιδίων. Η DBT πρωτεΐνη είναι ικανή να προσδεθεί στην PER in vitro στα κύτταρα της *D.melanogaster*, υποδεικνύοντας μια φυσική συσχέτιση της PER με την DBT (Ousley *et al.*, 1998).

iv. Το **clock** γονίδιο της *D.melanogaster*

Με το όνομα **clock** (συμβολισμός **clc**), και κατάταξη στην **bHLH- PAS** περιοχή, αναφερόμαστε στο γονίδιο με λειτουργία μεταγραφικού διαμεσολαβητή και κυτταρική τοποθεσία τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Το *clk* της *D.melanogaster*, αποτελεί ένα ομόλογο του *clk* γονιδίου των ποντικών, που είναι γνωστό με την ονομασία *jrk* (Antoch *et al.*, 1997).

v. Το **cycle** γονίδιο της *D.melanogaster*

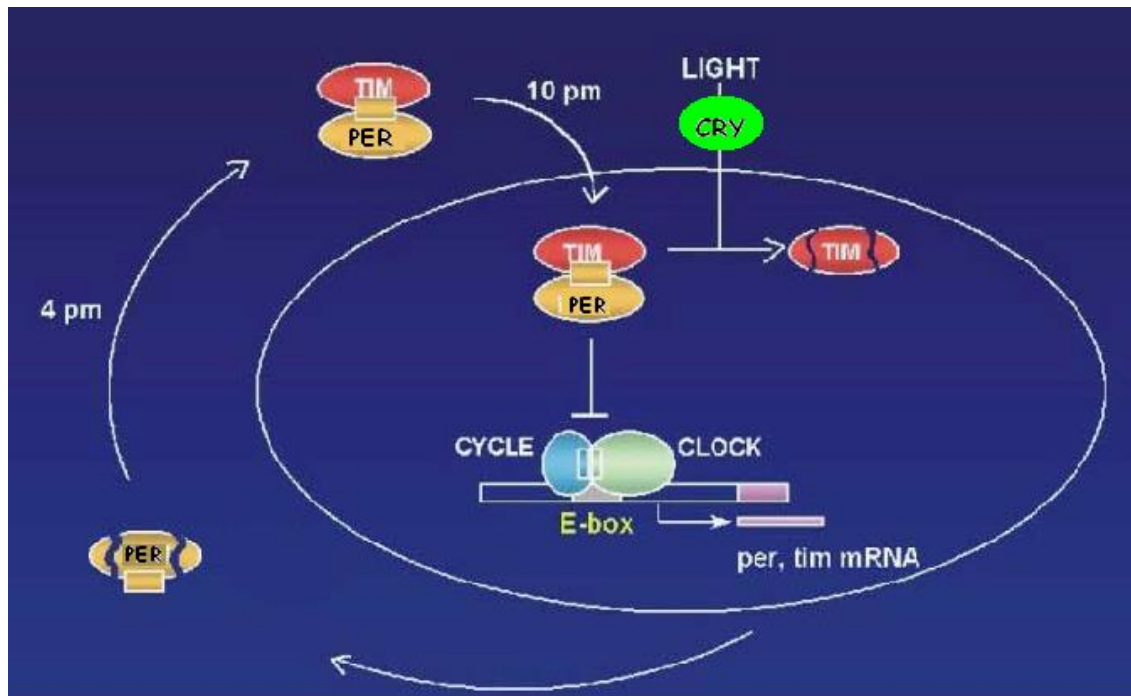
Με το όνομα **cycle** (συμβολισμός: **cyc**) αναφερόμαστε στο γονίδιο που κατατάσσεται στην **bHLH-PAS** περιοχή και λειτουργεί σαν μεταγραφικός διαμεσολαβητής. Κυτταρική του τοποθεσία είναι ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα. Πρόκειται για το δεύτερο bHLH-PAS *clock* γονίδιο, που φέρει την ευθύνη για τη ρυθμικότητα της μεταγραφής των *per* και *tim* γονιδίων. Το διμερές CYC-CLK, προσδέονται στα E-boxes των *per* και *tim*, επηρεάζοντας την κερκαδική μεταγραφή τους (Chang and Reppert, 2003).

vi. Το *cryptochrome* γονίδιο της *D.melanogaster*

Με το όνομα *cryptochrome* (συμβολισμός *cry*) αναφερόμαστε στο γονίδιο που ρυθμίζει τη φωτόλυση και λειτουργεί σαν φωτοδέκτης μέσω της φωτοευαίσθητης φλαβοπρωτεΐνης. Η κυτταρική του τοποθεσία είναι άγνωστη. Το *cry* γονίδιο της *D.melanogaster*, εμπλέκεται στην δράση του υβριδισμού του DNA. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, ανήκει στην ομάδα των φωτο-αισθητήρων και έρχεται σε συγκρίσιμη θέση με τις αντίστοιχες των θηλαστικών, καθώς όλες αυτές οι πρωτεΐνες, έχουν τον ίδιο φωτοδέκτη κυανού φωτός, των φυτών. Η μεταγραφή του *cry*, βρίσκεται κάτω από κερκαδική ρύθμιση, που επηρεάζεται από τα *per*, *tim*, *clk* και *cyc* γονίδια της *Drosophila*. Τα ποσά της *cry* πρωτεΐνης, επηρεάζονται από την έκθεση στο φως, καθώς η κερκαδική φωτοευαίσθησία, αυξάνεται σε μια σειρά υπερ-εκφραζόμενων *cry* γονιδίων (Darlington *et al.*, 1998).

1.1.4. Λειτουργία του κερκάδιου ρολογιού

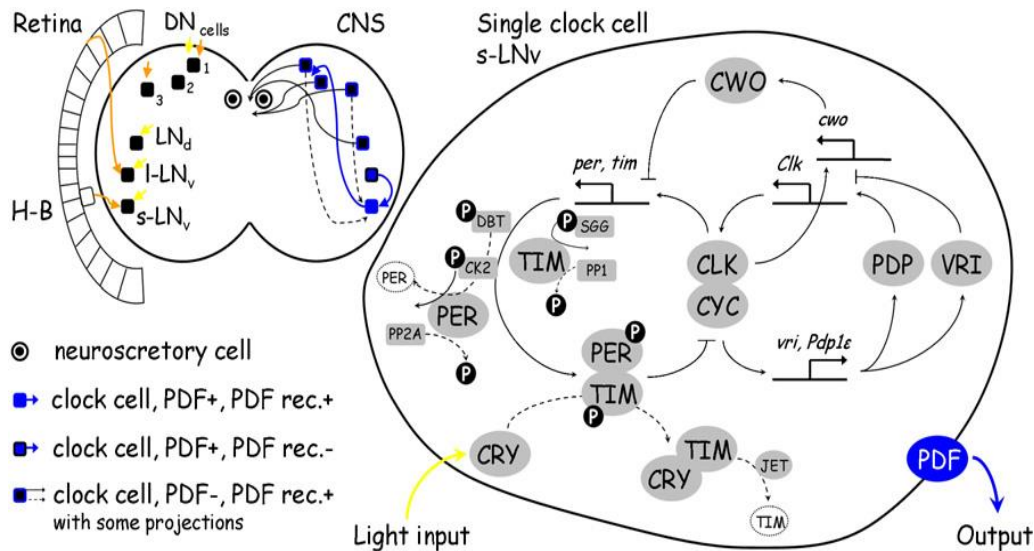
Οι ρυθμικές εκφράσεις των ωρολογιακών γονιδίων σε ειδικούς νευρώνες του εγκεφάλου και οι μεταγραφικοί–μεταφραστικοί βρόχοι ανατροφοδότησης μεταξύ των προϊόντων τους, πιστεύεται ότι σχηματίζουν την μοριακή βάση της λειτουργίας του ρολογιού, που ελέγχει τους ημερήσιους ρυθμούς συμπεριφοράς και μερικές άλλες ρυθμικές παραγωγές του εγκεφάλου (Hall, 2003) (Εικ.1). Το πρώτο ωρολογιακό γονίδιο, *period* (*per*) κλωνοποιήθηκε και εφαρμόστηκε λειτουργικά στην *D. melanogaster* το 1984 (Bargiello *et al.*, – Zehring *et al.*, 1984). Το δεύτερο ωρολογιακό γονίδιο της *D. melanogaster*, το *Timeless* (*tim*), χαρακτηρίστηκε 10 χρόνια αργότερα (Myers, 1995), όταν επίσης βρέθηκε ότι τα προϊόντα των δύο ωρολογιακών γονιδίων μπορεί να διμεριστούν, μέσω του **PAS (PAS Domain)**, της πρωτεΐνης **PERIOD** (Gekakis *et al.*, 1995). Αξίζει να αναφέρουμε ότι το πρώτο θηλαστικό ωρολογιακό γονίδιο (στο ποντίκι) *Clock* (*clk*) (Antoch *et al.*, 1997), ανακαλύφθηκε λίγο αργότερα, μετά το ξέσπασμα των ανακαλύψεων στα έντομα. που παρακίνησε πολύ την κερκαδική έρευνα.



Εικόνα 1. Το βιολογικό ρολόι είναι ένα σύστημα παλινδρομικής δράσης κάποιων πρωτεϊνών που ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν ως ρόλο την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση των γονιδίων clock.

Σε μελέτες στα έντομα, οι επιστήμονες άρχισαν να σχεδιάζουν τα πρώτα λειτουργικά μοντέλα. Το mRNA των ωρολογιακών γονιδίων και τα επίπεδα των ωρολογιακών πρωτεϊνών, βρέθηκαν να ταλαντεύονται με μια ενδογενή περίοδο κοντά στο 24ωρο, στον εγκέφαλο μυγών υπό συνθήκες συνεχούς σκοταδιού. Ενώ τα επίπεδα των mRNA κορυφώθηκαν κατά την διάρκεια της αρχικής νύχτας, τα επίπεδα των πρωτεϊνών καθυστέρησαν μέχρι αργά την νύχτα, προτείνοντας έτσι ένα βρόχο ανατροφοδότησης μεταξύ της μεταγραφής και μετάφρασης (Hardin *et al.*, 1990; Edery *et al.*, 1994). Γύρω στα μεσάνυχτα το διμερές PER–TIM εισέρχεται στον πυρήνα, όπου το TIM σταθεροποιεί την PER. Μετά τη ραγδαία αποδόμηση της, η TIM σταθεροποιεί την PER. Μετά την αποδόμηση της TIM, σε ανταπόκριση με το πρωινό φως, η PER απελευθερώνεται για να δράσει σαν άμεσο εμπόδιο (**αρνητικό στοιχείο**) άλλων δύο πυρηνικών ωρολογιακών πρωτεϊνών, των CLOCK και CYCLE (CLK – CYC) (Curtin *et al.*, 1995, Saez and Young, 1996). Το ομόλογο του CLK των εντόμων, αναγνωρίστηκε λίγο μετά και στα θηλαστικά (Allada *et al.*, 1998), σχεδόν ταυτόχρονα με το CYCLE (Rutila *et al.*, 1998).

Το διμερές CLK–CYC (**θετικό στοιχείο**), είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, που ρυθμίζει μια ομάδα γονιδιακών στόχων, που περιέχουν κατάλληλες περιοχές, όπως τα **E-boxes (CACGTG)**, στις συντηρημένες τους περιοχές (Allada *et al.*, 1998; Darlington *et al.*, 1998). Επειδή τα *per* και *tim* περιέχουν επίσης E-boxes και οι βρόχοι ανατροφοδότησης μπορεί να κλείνουν, η PER πρωτεΐνη ξαναρχίζει τη μεταγραφή του γονιδίου *per* (Lee *et al.*, 1999). Αυτό το μοντέλο όμως, είναι πολύ απλουστευμένο. Η συγκέντρωση των PER και TIM πρωτεϊνών στο κυταρόπλασμα και στα μονοπάτια μετατοποθέτησης και αποδόμησης στον πυρήνα, είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από τις φωσφατάσες PP1 και PP2A. Ένας δεύτερος βρόχος ανατροφοδότησης, που επίσης δραστηριοποιείται από τα CLK–CYC, δια μέσου των E-boxes, περιέχει τους μεταγραφικούς παράγοντες VRI (καταστολέας) και PDP1e (ενεργοποιητής), ρυθμίζοντας την μεταγραφή του *Clk* (Cyran *et al.*, 2003). Τα μαθηματικά μοντέλα (KucZenski *et al.*, 2007) πρότειναν, ότι ένας επιπλέον βρόχος ανατροφοδότησης μπορεί να απαιτείται, για να εξηγήσει όλες τις πειραματικές παρατηρήσεις. Μία καινούργια ωρολογιακή πρωτεΐνη, που μπορεί να περιέχει ένα τέτοιο βρόχο ανατροφοδότησης, η CWO, έχει περιγραφεί (Lim *et al.*, 2007). Η μεταγραφή της CWO ενεργοποιείται από την CLK και η CWO μετά ενεργεί σαν μεταγραφικός καταστολέας, στα στοχευμένα *clk* γονίδια (Richier *et al.*, 2008). Η παρούσα γνώση στα κερκαδικά ρολόγια άλλων εντόμων, εκτός από την *D. melanogaster*, δεν είναι επαρκής, για μια σύγκριση σε βάθος. Όμως τα διαθέσιμα δεδομένα προτείνουν ότι διάφορα είδη εντόμων διαφέρουν στη δομή των ωρολογιακών γονιδίων και σε μερικές λεπτομέρειες της λειτουργίας του ρολογιού, ενώ η βασική αρχή του βρόχου ανατροφοδότησης συντηρείται (Sauman *et al.*, 1996).



Εικόνα 2. Σχηματική δομή του κεντρικού **κίρκαδικού βηματοδότη** (αριστερή πλευρά) και του **κίρκαδικού ρολογιού** σε ένα απλό κύτταρο ρολογιού (δεξιά πλευρά), όπως αυτές είναι γνωστές στη *D. melanogaster*. Στο αριστερό ημισφαίριο του **ΚΝΣ**, οι τρεις ομάδες των πλευρικών νευρώνων (**LN**) και τρεις ομάδες των ραχιαίων νευρώνων (**DN**), που απεικονίζονται μαζί με τα μεγαλύτερα φώτα στα μονοπάτια εισόδου (βέλη). Κίτρινα βέλη σημαίνουν άμεσο φως εισόδου για φλαβίνη, με βάση φωτουποδοχείς. Οπτικοί (αμφιβληστροειδούς βάσης) φωτουποδοχείς στα σύνθετα μάτια και ο Hofbauer-Buchner βρόγχος (**HB**) συμβάλλουν στην εισόδο φωτός (μακρά πορτοκαλί βέλη). Μικρά πορτοκαλί βέλη, σημαίνει ότι ορισμένα κύτταρα που χαρακτηρίζονται ανεπαρκώς, εκφράζουν αμφιβληστροειδείς, που βασίζονται σε φωτουποδοχείς. Στο δεξιό ημισφαίριο, απεικονίζονται μεγάλα αξονικά μονοπάτια. Μπλε βέλη δείχνουν αξονική σύζευξη, προβλέψεις του PDF-1-εκφράζοντας **LN_v** και **s-LN_v** κύτταρα. Μαύρα βέλη δείχνουν ότι πολλοί νευρώνες του ρολογιού, αποστέλλουν αξονικές προβολές τους, στο εξάρτημα του εγκεφάλου (διακεκομμένες γραμμές) και στο ραχιαίο πρωτοεγκέφαλο (συμπαγείς γραμμές). Στο ραχιαίο πρωτοεγκέφαλο, οι προβλέψεις των περισσότερων κυττάρων του ρολογιού, επικαλύπτονται και κατά πάσα πιθανότητα έρχονται σε επαφή με τα νευροεκκριτικά κύτταρα. Στην πραγματικότητα, κάθε ομάδα κυττάρων του ρολογιού μπορεί να περιέχει νευρώνες, που είναι βιοχημικά και λειτουργικά διακριτές. Το **μοριακό ρολόι** σε ένα μόνο νευρώνα ρολογιού βασίζεται σε ένα βρόχο ανάδρασης μεταγραφής-μετάφρασης, μεταξύ θετικών (**CLK-CYC**) και αρνητικών (**PER-TIM**) στοιχείων. Πολλές άλλες πρωτεΐνες του ρολογιού επηρεάζουν αλληλεπιδράσεις στην είσοδο στον πυρήνα, στη σταθερότητα και την αποικοδόμηση του πρωτεοσώματος των κεντρικών αρνητικών στοιχείων. Μερικές άλλες πρωτεΐνες του ρολογιού, προσφέρουν επιπλέον ανατροφοδότηση. Το όλο σύστημα είναι ευαίσθητο στο φως, λόγω της παρουσίας των μορίων του φωτουποδοχέα CRY. Ορισμένοι νευρώνες εκφράζουν τον ωρολογιακό νευροδιαβιβαστή **PDF**, δηλαδή το σήμα εξόδου (Kostal, 2011)

1.2. ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΡΟΛΟΓΙΑ

Τα έντομα αντιμετωπίζουν μη ευνοϊκές εποχές μέσω αξιοσημείωτης φαινοτυπικής πλαστικότητας που συμπεριλαμβάνουν αλλαγές στις δραστηριότητες συμπεριφοράς, στις εποχιακές μορφές, στη μετανάστευση και στην διάπαυση (Andrewartha H.G, 1952, Nijhout H.F, 2003). Ενώ οι αλλαγές στη συμπεριφορά, στο χρωματισμό, στο μέγεθος φτερών, στις δερματικές δομές κ.λπ. μπορεί να εξυπηρετούν στο να τελειοποιήσουν το ενεργό στυλ ζωής στις εναλλασσόμενες συνθήκες περιβάλλοντος. Οι πιο δύσκολες συνθήκες δεν επιτρέπουν στα έντομα να συνεχίσουν την δραστηριότητα, π.χ. στις ψυχρές θερμοκρασίες στους χειμώνες, στα ξηρά μεσογειακά και υποτροπικά καλοκαίρια και στις τροπικές πλημμύρες. Τέτοιες συνθήκες μπορούν να αντιμετωπιστούν με το να μεταναστεύσουν σε πιο ευνοϊκές κατοικίες, ή να εισέλθουν σε διάπαυση (Southwood ,T.R.E 1962). Καθώς η δυνατότητα των εντόμων για μεταναστεύσεις μακρών αποστάσεων είναι μικρή, το να εισέλθουν σε διάπαυση, είναι μέχρι τώρα η πιο συνηθισμένη στρατηγική για να ξεπεραστούν οι δύσκολες εποχές.

1.2.3. Δομή και λειτουργία των φωτοπεριοδικών ρολογιών

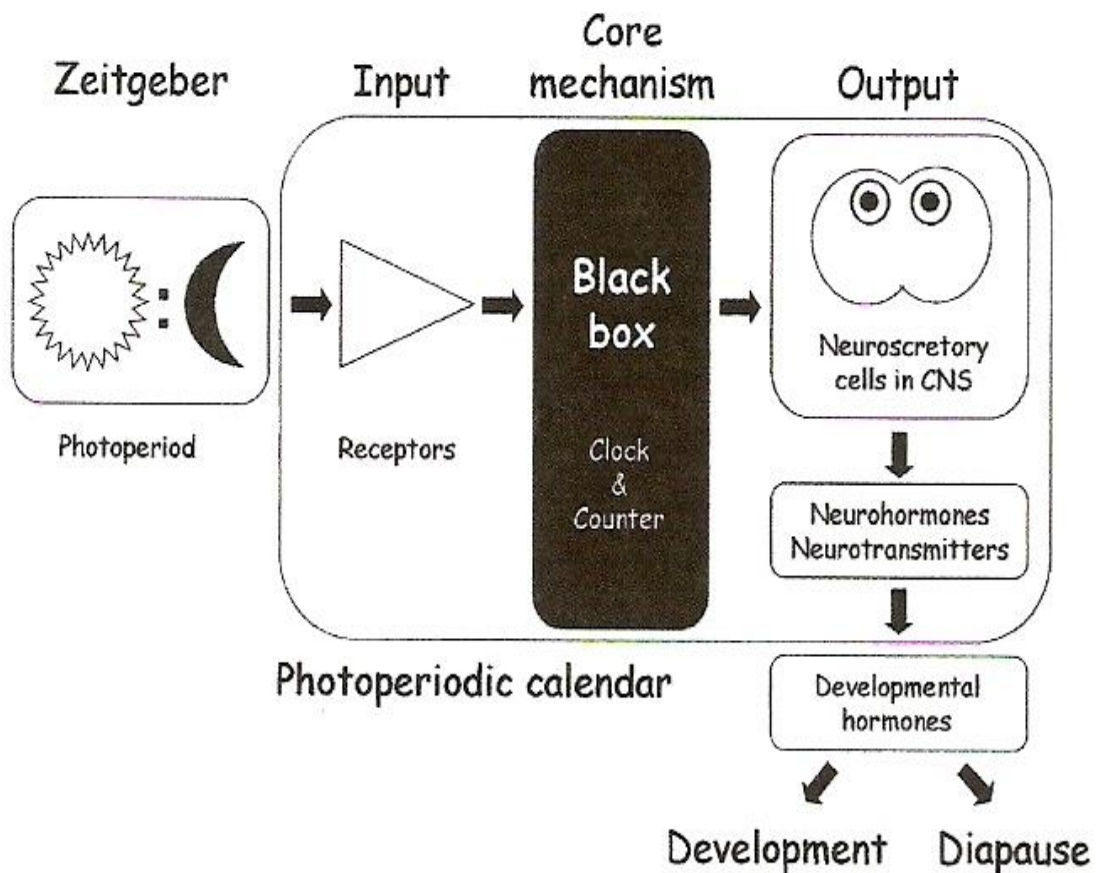
Στην φύση, η **φωτοπερίοδος** είναι η αναλογία της ημέρας προς τη νύχτα, μέσα σε μια ηλιακή ημέρα. Σε πιο γενικούς όρους, είναι η αναλογία της φωτοφάσης προς τη σκοτοφάση (φάση φωτός προς φάση σκοταδιού L:D) μέσα σε ένα κύκλο φωτός. Με το να εκθέτουμε έντομα σε διάφορες σταθερές φωτοπεριόδους 24h στο εργαστήριο, μπορεί να προκύψουν τυπικά σχήματα της φωτοπεριοδικής ανταπόκρισης με αποτέλεσμα την διάπαυση. Υπάρχει ένα άθροισμα οικολογικών φωτοπεριόδων, κατά το οποίο το γεγονός της διάπαυσης παρουσιάζει σχετικά απότομες αλλαγές. Μέσα σε αυτό το άθροισμα, η **κρίσιμη φωτοπερίοδος (CPP)** (ή με περισσότερη ακρίβεια, το κρίσιμο μήκος νύχτας) εμφανίζεται στο μισό δείγμα του πληθυσμού, που εισέρχεται σε διάπαυση, ενώ το άλλο μισό συνεχίζει με άμεση ανάπτυξη. Τα περισσότερα μελετημένα έντομα φαίνεται να εισέρχονται στη διάπαυση, εφόσον ανταποκριθούν ποιοτικά σε περισσότερες ή λιγότερες κριτικά **μεγάλες νύχτες** (ανταπόκριση σε μικρές ή μεγάλες μέρες, αντίστοιχα), χωρίς να μετρήσουμε ποσοτικά το ακριβές μήκος νύχτας ή χωρίς ανταπόκριση στις συνεχείς αλλαγές των φωτοπεριόδων

(Saunders, 2002). Άλλοι περιβαλλοντολογικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η ποσότητα και ποιότητα διατροφής, οι βιοτικές αλληλεπιδράσεις, μπορεί να τροποποιήσουν την φωτοπεριοδική ανταπόκριση (Saunders, 2002; Tauber *et al.*, 1986; Danks, 1987). Το σύστημα αυτό (φωτοπεριοδικό ημερολόγιο), που είναι ευαίσθητο στη φωτοπερίοδο, θεωρητικά αποτελείται από 4 λειτουργικές ενότητες (Εικ. 3). Αν και πιστεύουν ότι το **φωτοπεριοδικό ρολόι** εδρεύει στον εγκέφαλο των εντόμων κανένα από τα μέρη του δεν έχουν ακριβώς εντοπισθεί ή χαρακτηριστεί με φυσιολογικούς και βιοχημικούς όρους. Η καρδιά του συστήματος του σύστημα χαρακτηρίστηκε επαρκώς χάριν στην επιμελή δουλειά των πρωτοστατών της φωτοπεριοδικής επιστήμης, όπως ο Erwin Bunning, Anthony D. Lees και Colin S. Pittendrigh. Τα πειράματα βασίστηκαν σε συστηματική διαφοροποίηση της εισαγωγής στο σύστημα (κυρίως συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας) και παρατηρώντας τις ανταποκρίσεις (κυρίως το γεγονός της διάπαυσης). Όλα, ανάμεσα στην εισαγωγή (input) και την απόδοση (output) αφέθηκαν στο “black box” (Saunders, 2002).

1.2.4. Θεωρίες για το φωτοπεριοδικό ρολόι

Η αρμοδιότητα του φωτοπεριοδικού ρολογιού είναι να μετράει το ακριβές μήκος νύχτας, να την συγκρίνει με την κριτική φωτοπερίοδο (CPP), και να αποφασίζει εάν η μέρα είναι “μικρή” ή “μεγάλη”. Δύο κύριες επίσημες υποθέσεις ανακοινώθηκαν για να εξηγήσουν πως αυτή η αρμοδιότητα επιτυγχάνεται (Saunders, 2005).

Ο **χρονομετρητής κλεψύδρα** εμφανίστηκε σταδιακά, μαζί με αρχικές παρατηρήσεις του φωτοπεριοδισμού στα φυτά και στα έντομα, και κυριάρχησαν στο πεδίο της επιστήμης των εντόμων μέχρι τα τέλη 1950. Αυτή η υπόθεση θεωρεί το φωτοπεριοδικό ρολόι, σαν επακόλουθο των βιοχημικών αντιδράσεων που πρέπει να λήξουν μέσα σε μια περίοδο σκοταδιού. Όταν το χάραμα αναμιγνύεται με αυτήν την διαδικασία, η φωτοπερίοδος έχει την έννοια της μικρής νύχτας. Πολύ σημαντικό είναι, η όλη ακολουθία των αντιδράσεων να ξαναρχίζει καθημερινά από το φως (σε αναλογία με το στρίψιμο μιας κλεψύδρας ανάποδα). Αυτή η υπόθεση υποστηρίχθηκε από τον Lees (1950, 1953, 1955, 1973) στην προνύμφη της κόκκινης αράχνης.



Εικόνα 3. Σχηματική δομή του φωτοπεριοδικού ημερολογίου. Περιβαλλοντικά σήματα, όπως η φωτοπερίοδος, γίνονται αντιληπτά από ελάχιστα χαρακτηρισμένους υποδοχείς και υποβάλλονται σε επεξεργασία, πάνω σε ένα βασικό μηχανισμό που αποτελείται από ένα ρολόι και έναν φωτοπεριοδικό μετρητή. Φυσιολογικές αρχές που διέπουν τη λειτουργία ενός μηχανισμού-πυρήνα, παραμένουν ακόμα άλυτες στα έντομα. Οι περισσότερες από τις τρέχουσες γνώσεις μας, προέρχονται από πειράματα, χρησιμοποιώντας ένα μαύρο κουτί προσέγγισης. Μονοπάτια εξόδου περιλαμβάνουν τα νευροεκκριτικά κύτταρα, που παράγουν νευροορμόνες και νευροδιαβιβαστές που με τη σειρά τους επηρεάζουν τη βιοσύνθεση και απελευθέρωση των ορμονών ανάπτυξης, ο τίτλος των οποίων καθορίζει την αναπτυξιακή μοίρα (άμεση ανάπτυξη έναντι διάπαυση) (Kostal, 2011).

Τα πιο πρόσφατα πειράματα στην προνύμφη της αράχνης *Tetranychio urticae* (Veerman and Veenendaal, 2003) και σε διάφορα είδη εντόμων έφεραν επιπλέον στοιχεία για την υπόθεση της κλεψύδρας (Veerman 2001). Η **υπόθεση του κίρκαδικού ταλαντωτή** αρχικά σχηματίστηκε από τον Erwin Bunning το 1936, για να εξηγήσει τον φωτοπεριοδισμό στα φυτά. και πολύ αργότερα εισήχθη στην επιστήμη των εντόμων (Bunning 1960). Ο Bunning ήταν ο πρώτος που πρότεινε ότι η μέτρηση του φωτοπεριοδικού χρόνου εξαρτάται από την ελεύθερη ροή του ενδογενούς ημερήσιου ρυθμού (κίρκαδικός ρυθμός), που είναι ανάλογη με τις κινήσεις ενός ταλαντωτή, σαν εκκρεμές. Η ιδέα του ύστερα ενισχύθηκε από τον Colin S. Pittendrigh, στο εξωτερικό συμπτωματικό μοντέλο του, που προτείνει δύο διαφορετικούς ρόλους για το φως: Α) Εισβολές του κίρκαδικού ταλαντωτή στον ημερήσιο κύκλο φωτός και Β) Φωτίζει την ιδιαίτερη φάση ευαισθησίας του φωτός (την καλούμενη φωτοεισαγόμενη φάση), που εμφανίζεται στο δεύτερο μισό της νύχτας, και αναφέρεται στο τέλος ενός κρίσιμου μήκους νύχτας (Pittendrigh, 1966). Για αυτό το μήκος νύχτας, έχει την άποψη ότι είναι μεγάλη, όταν η φωτοεισαγόμενη φάση πέφτει στο σκοτάδι και ανάλογα, ότι είναι μικρή όταν πέφτει στο φως. Ο Saunders (2005) ανέφερε ότι η αντίθεση ανάμεσα στα δύο βασικά μοντέλα αρχίζει από τότε που έγιναν συζητήσεις στο “Gold Spring Harbor Symposium” on Quantitative Biology, το 1959. Τρεις δεκαετίες μετά, έχουμε δει εφαρμογές από μια ολόκληρη σειρά επίσημων πειραμάτων σε διάφορα μοντέλα εντόμων (Nunes and Saunders, 1999). Ευφυή πειραματικά πρωτόκολλα εφευρέθηκαν, όπως το πρωτόκολλο Bunshow, το πρωτόκολλο Nanda–Hammer, τα J–πειράματα κ.λπ., για να ερευνήσουν τις σχέσεις μεταξύ των κίρκαδικών ρυθμών και τις φωτοπεριοδικές ανταποκρίσεις. Οι έρευνες είναι σήμερα διαθέσιμες (Saunders 2002, 2007, 2009, 2010 a, b). Γενικά, τα πρωτόκολλα σχεδιάστηκαν για να αποκαλύψουν μια πιθανή συμμετοχή ταλαντωτών στις μετρήσεις του περιοδικού χρόνου. Για αυτό, η ερμηνεία των θετικών τους αποτελεσμάτων ήταν μάλλον απλή. Αποδείξεις και στοιχεία που υποστηρίζουν την ανάμιξη των κίρκαδικών ταλαντωτών στο φωτοπεριοδικό ημερολόγιο έχουν χαρακτηριστεί για κάποια έντομα (Lees 1973). Ακόμα πιο σημαντικό είναι ότι σε έναν αριθμό ειδών, παρατηρήθηκαν θετικά και αρνητικά αποτελέσματα, που εξαρτιόνταν από τον πειραματικό σχεδιασμό (Nunes and Veerman, 1984), την θερμοκρασία (Saunders, 1973), την διατροφή ή τον γεωγραφικό πληθυσμό (Thiele, 1977). Τέτοια αμφίβολα αποτελέσματα αποδεικνύουν την πιο επιβεβλημένη απόδειξη ότι η κλεψύδρα και η υπόθεση του ταλαντωτή είναι δύο διαφορετικές αποδόσεις ενός

μοναδικού μηχανισμού. Αυτή η άποψη υποστηρίχτηκε στον τύπο του ενιαίου μοντέλου “ταλαντωτής” που προτάθηκε από το Bunning (1969) και αργότερα από τους Lewis and Saunders (1987). Χρησιμοποιώντας μαθηματικά μοντέλα και κριτική ανάπτυξη όλων των διαθέσιμων επισήμων πειραμάτων, ο Saunders εξηγεί ότι η φανερή διχοτομία των δύο συναγωνιζόμενων μοντέλων μπορεί να ξεπεραστεί, όταν ο μετρητής κλεψύδρα, θεωρείται σαν ένας κίρκαδικός ταλαντωτής (Saunders 2005, 2010 a, 2010b).

1.2.5. Ο Φωτοπεριοδικός μετρητής

Για να προκαλέσουμε μια φωτοπεριοδική ανταπόκριση (π.χ. για να εισάγουμε την διάπαυση), τα έντομα συνήθως χρειάζεται να εκτίθενται σε εισαγωγικές φωτοπεριόδους για πολλές συνεχόμενες ημέρες, κατά την διάρκεια της περιόδου ευαισθησίας τους (SP, Sencitivity Period). Η SP εμφανίζεται κατά την διάρκεια σταδίων οντογένεσης, καθορισμένων και ειδικών στα διάφορα είδη, που κυμαίνονται από διάφορους περιόδους, μέσω διαφορετικών σταδίων εμβρυϊκής, προνυμφικής και νυμφικής ανάπτυξης, μέχρι την ενηλικίωση (Kostal, 2006). **Ο φωτοπεριοδικός μετρητής** εξυπηρετεί θεωρητικά, για την συγκέντρωση πληροφοριών με την μορφή εισαγωγικών φωτοπεριόδων (Goryshin and Tyshchenko 1970). Όταν ο αριθμός φτάνει σε ένα συγκεκριμένο “κατώφλι”, η φανερή φωτοπεριοδική ανταπόκριση μπορεί να εκφραστεί, με το να πυροδοτήσουν ή να αλλάξουν την δραστηριότητα της παραγωγής των διαφόρων μονοπατιών. Αυτό το “**κατώφλι**” ονομάστηκε-αριθμός κριτικής μέρας ή απαιτούμενος αριθμός ημέρας (RDN, Required Day Number) από τον (Saunders, 1971). Η αναπτυξιακή παραγωγή (π.χ διάπαυση ή άμεση ανάπτυξη) προέρχεται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στη διάρκεια του SP και του RDN. Ενώ το RDN για την εισαγωγή της διάπαυσης είναι ανεξάρτητο από τη θερμοκρασία (Denlinger, 1972; Hardie, 1990), η διάρκεια του SP δεν είναι. Για αυτό, παράγοντες που καθυστερούν την ανάπτυξη, όπως χαμηλή θερμοκρασία ή ανεπαρκής διατροφή, τείνουν να παρατείνουν την διάρκεια του SP, η οποία επιτρέπει έναν επαρκή αριθμό από εισαγωγικές φωτοπεριόδους να συσσωρεύονται, οι οποίες με τη σειρά τους, αυξάνουν το γεγονός της διάπαυσης (Saunders, 2002). Η φυσιολογική φύση του μετρητή παραμένει δυσνόητη. Ο μετρητής συνεργάζεται σε μεγάλο βαθμό με το ρολόι, και για αυτό είναι δυνατόν και τα δύο να είναι στοιχεία ή γνωρίσματα του ίδιου μηχανισμού. Τα μοντέλα αυτά εξηγούν ότι το ρολόι, παρέχει απλές ποιοτικές

πληροφορίες του τύπου yes-or-no (π.χ. μεγάλη ή μικρή νύχτα), ενώ ο μετρητής προσθέτει ποσοτικές πληροφορίες του τύπου “how many” (Goryshin and Tyshchenko, 1970). Ο Gibbs (1975) πρότεινε ένα θεωρητικό μοντέλο, στο οποίο οι συνεχόμενοι κύκλοι μεγάλης νύχτας οδηγούν στη συγκέντρωση ενός άγνωστου βιοχημικού προϊόντος, το “διάλυμα διάπαυσης”, μέχρι κάποιο κατώφλι αναγκαίο για πυροδότηση μιας φανεράς έκφρασης διάπαυσης.

Συνοπτικά, το φωτοπεριδικό ημερολόγιο των εντόμων (Εικ 3) αποτελείται από ένα **φωτοπεριδικό ρολόι** και ένα **μετρητή**, που βρίσκονται σε άγνωστες δομές του εγκεφάλου. Λαμβάνει πολλαπλά εισαγωγικά μονοπάτια, από ελάχιστα χαρακτηριζόμενους φωτουποδοχείς, που είναι τοποθετημένοι είτε στον εγκέφαλο είτε στα σύνθετα μάτια (ή και στα δύο). Οι μοριακοί φωτουποδοχείς παραμένουν άγνωστοι, αλλά φαίνεται να βασίζονται πρωταρχικά σε χρωμοφόρα, όπως η ροδοψίνη (rhodopsins). Η λειτουργική αρχή του φωτοπεριδικού ρολογιού, βασίζεται πιθανόν σε ενιαίο κερκαδικό ταλαντωτή που πυροδοτείται από το κύκλο ημερησίου φωτός και μετράει το μήκος της νύχτας (σκοτόφαση). Μερικοί ερευνητές προτιμούν την αρχή του μετρητή – κλεψύδρα, που είναι μη ταλαντωτικός. Η άγνωστη παραγωγή του φωτοπεριδικού ρολογιού ολοκληρώνει ένα κύριο επίπεδο “κατωφλιού” για την εισαγωγή διάπαυσης, σε ένα υποθετικό μετρητή. Οι πληροφορίες μετά μεταφέρονται σε νευρομυϊκά κύτταρα των PL (PL= Pars Lateralis) και PI (PI=pars intercebralis) του πρωτοεγκεφάλου των εντόμων, που κρύβουν νευροπεπτίδια (π.χ. PTTH (Prothoracicotropic hormone), αλλατοστατίνες, αλλατοτροπίνες, και πεπτίδια ινσουλίνης). Μέσα από αυτά τα νευροπεπτίδια, ή μέσω των άμεσων αξονικών συνδέσεων, τα νευρομυϊκά κύτταρα ελέγχουν τη δραστηριότητα των νευρομυϊκών οργάνων (CC-Corpora cardiaca και CA-corpora allata) και των ενδοκρινών αδένων (προθωρακικός αδένας), που απελευθερώνουν τέτοιες σημαντικές ορμόνες, όπως η ορμόνη νεότητας JH (Juvenile Hormone) και τα εκδυστεροειδή.

2. Η ΔΙΑΠΑΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ

Τα έντομα έχουν αναπτύξει την ικανότητα να προσλαμβάνουν τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, που σχετίζονται με εποχιακές αλλαγές και να αντιδρούν σ' αυτά υφιστάμενα ειδικές φυσιολογικές, μορφολογικές αλλά και αλλαγές συμπεριφοράς, που τα προετοιμάζουν έτσι ώστε να αντεπεξέλθουν σε επικείμενες δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Αυτές οι αλλαγές συνιστούν το “σύνδρομο της διάπαυσης”, μια σημαντική οικολογική προσαρμογή των ειδών, που τους επιτρέπει να συγχρονίζουν τους βιολογικούς τους κύκλους, με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Tauber *et al.*, 1986). Η γεωγραφική εξάπλωση ενός είδους, επηρεάζεται από τον τύπο διάπαυσης που το χαρακτηρίζει. Η κατάσταση της διάπαυσης επηρεάζει την πληθυσμιακή αφθονία των εντόμων εποχιακά, αλλά και την εμφάνιση τους από μια περιοχή σε άλλη. Η σύγχρονη καταπολέμηση των εντόμων βασίζεται στην αρχή, ότι οι διάφορες επεμβάσεις θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πριν οι πληθυσμοί των εχθρών των καλλιεργειών φθάσουν σε επίπεδα, όπου η καταστροφή δεν μπορεί πλέον να αποφευχθεί. Η μελέτη της πρόκλησης, εγκατάστασης και περάτωσης της διάπαυσης σε σχέση με τους ρυθμούς ανάπτυξης του εντόμου, είναι καθοριστική για την εφαρμογή ενός σύγχρονου τρόπου καταπολέμησης. Αυτή πρέπει α. να προβλέπει με ακρίβεια το χρόνο πρόκλησης και περάτωσης της διάπαυσης, μετανάστευσης, ανάπτυξης και αναπαραγωγής των εχθρών στον αγρό, β. να μπορεί να χειρισθεί τους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, που σκοπό έχουν τον περιορισμό των πληθυσμών και γ. να μπορεί να επιλέξει τα καλύτερα προσαρμοσμένα είδη ή βιότυπους για την εφαρμογή βιολογικής καταπολέμησης. Το γεγονός ότι οι καταστάσεις αναστολής ανάπτυξης στα έντομα, δεν οφείλεται μόνο στη δραστηριοποίηση τους λόγω της άμεσης επίδρασης των χαμηλών θερμοκρασιών, παρατηρήθηκε το 1869 στα αυγά του *Bombyx mori*. Πρώτος ο Wheeler το 1893 χρησιμοποίησε τον όρο «διάπαυση», θέλοντας να περιγράψει ένα στάδιο στην εμβρυογένεση της ακρίδας *Xiphidium ensiferum*, αργότερα δε ο Hennequy το 1904 αποσαφήνισε την έννοια συμπεριλαμβάνοντας παρόμοιες περιόδους “αναστολής της οντογενετικής ανάπτυξης” στα διάφορα στάδια των εντόμων.

Ως **διάπαυση** ορίζεται μια δυναμική, ελεγχόμενη νευροορμονικά κατάσταση του βιολογικού κύκλου των εντόμων, την οποία χαρακτηρίζει η έντονα χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα των οργανικών. Η κατάσταση αυτή συνδέεται α. με μειωμένοι μορφογένεση, β. με αυξημένη αντοχή στις περιβαλλοντικές ακρότητες και γ. με αλλαγή στη συμποφορά. (Tauber *et al.*, 1986). Ο Beck (1980) ορίζει ως διάπαυση, τη γενετικά ελεγχόμενη κατάσταση μειωμένης ανάπτυξης (μορφογένεσης ή αναπαραγωγής) των εντόμων, της οποίας η έκφραση ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (κυρίως τη φωτοπερίοδο). Η κατάσταση αυτή αποτελεί μία ιδιαίτερη στρατηγική επιβίωσης των εντόμων κατά τη διάρκεια περιόδων δυσμενών συνθηκών, όπως είναι π.χ. οι χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα, οι υψηλές θερμοκρασίες του θέρους, η ξηρασία ή ακόμα η περιορισμένη διαθεσιμότητα τροφής. Η διαδικασία εισόδου στη διάπαυση αρχίζει πολύ πριν ξεκινήσουν οι δυσμενείς συνθήκες. Με την εγκατάσταση της διάπαυσης, η μεταβολική μεν δραστηριότητα του εντόμου μειώνεται, συντελούνται όμως κάποιες φυσιολογικές αλλαγές. Όταν ολοκληρωθούν οι αλλαγές αυτές, το έντομο περατώνει τη διάπαυση του και επαναδραστηριοποιείται μορφογενετικά ή αναπαραγωγικά, εφόσον βέβαια εν τω μεταξύ έχουν αποκατασταθεί ευνοϊκές για την ανάπτυξη συνθήκες (π.χ. θερμοκρασίας). Τα ερεθίσματα που προκαλούνται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (ρυθμιστές της διάπαυσης) ονομάστηκαν **συμβολικά ερεθίσματα** (token stimuli), γιατί οι παράγοντες αυτοί δεν είναι απαραίτητα οι ίδιοι ευνοϊκοί ή δυσμενείς για την επιβίωση των ζώων, αλλά λειτουργούν ως δείκτες που “προαγγέλλουν” αλλαγή άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτοί οι παράγοντες είναι κυρίως ή φωτοπερίοδος (εναλλαγή φωτόφασης-σκοτόφασης), η θερμοκρασία, η υγρασία, η διαθεσιμότητα τροφής και η πληθυσμιακή πυκνότητα (Nelson *et al.*, 2010).

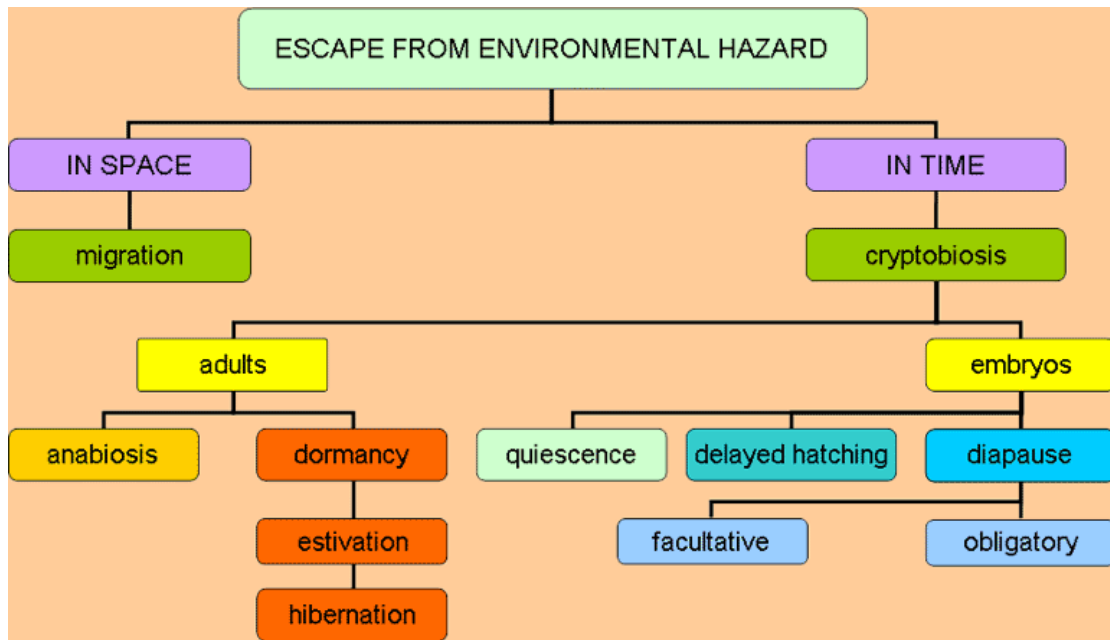
Με τον όρο **φωτοπερίοδος**, εννοούμε την εναλλαγή φωτός και σκότους σε ένα κύκλο που στη φύση έχει διάρκεια 24 ωρών, σε πειράματα όμως εργαστηρίου διερευνούμε και φωτοπερίοδους διαφορετικής διάρκειας. Σε κάθε περίπτωση, η φάση φωτός της φωτοπερίοδου ονομάζεται «φωτόφαση» και η φάση του σκότους «σκοτόφαση». Από όλους τους παράγοντες που αναφέραμε, η φωτοπερίοδος είναι ο πλέον σημαντικός από περιβαλλοντική άποψη, γιατί είναι ο μόνος παράγων του περιβάλλοντος που εμφανίζει απόλυτη κανονικότητα, συνέπεια και ακρίβεια στην επανάληψη του (Goto *et al.*, 2010). Έτσι, δεν είναι περίεργο ότι πολλά ζώα αλλά και φυτά στην περίοδο της εξέλιξης τους, ανέπτυξαν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τη

φωτοπερίοδο σαν αξιόπιστη περιβαλλοντική πληροφορία, με βάση την οποία ρυθμίζουν διάφορες δραστηριότητες κατά τρόπο που ευνοεί την επιβίωσή τους. Οι δραστηριότητες αυτές μπορεί να έχουν ετήσιο κύκλο, όπως π.χ. η μετανάστευση, η αναπαραγωγή, η διάπαυση κλπ, ή ημερήσιο κύκλο όπως π.χ. η σεξουαλική δραστηριότητα, η ωοθεσία, η έξοδος ακμαίων στα έντομα κλπ (Nelson *et al.*, 2010). Η επίδραση της φωτοπεριόδου στην πρόκληση της διάπαυσης, ελέγχεται πειραματικά με την έκθεση διαφόρων πληθυσμών εντόμων, για μέρος ή ακόμα για όλη τη ζωή τους, σε σταθερές συνθήκες φωτοπεριόδου, διατροφής και θερμοκρασίας. Οι καμπύλες της φωτοπεριόδου αντίδρασης συνοψίζουν την αντίδραση ολόκληρου του πληθυσμού ενός είδους. Η φωτόφαση που προκαλεί διάπαυση στο 50% των ατόμων ενός πληθυσμού που εκτίθεται σ' αυτήν, χαρακτηρίζεται ως κρίσιμη (critical daylength). Η κρίσιμη αυτή φωτόφαση, είναι δυνατόν να είναι χαρακτηριστική, με την έννοια ότι διαφοροποιείται η αντίδραση του πληθυσμού σημαντικά πριν ή μετά την τιμή της. Έτσι, σε μερικά είδη εντόμων, είναι δυνατόν μια αλλαγή 10-15 min στη διάρκεια της φωτόφασης να προκαλέσει μια σημαντική αλλαγή στο ποσοστό του πληθυσμού που εισέρχεται σε διάπαυση. Η διαθεσιμότητα τροφής και η υγρασία, είναι δυνατόν να λειτουργούν ως κύριοι παράγοντες ρύθμισης της διάπαυσης, για οργανισμούς που εκδηλώνουν καλοκαιρινή διάπαυση ή για έντομα που ζουν σε τροπικές περιοχές, όπου οι φωτοπεριόδους και θερμοκρασιακές διακυμάνσεις είναι μικρές. Τέλος, η πληθυσμιακή πυκνότητα αν και είναι δύσκολο να διαχωριστεί από την τροφή, έχει βρεθεί ότι επηρεάζει το ποσοστό της διάπαυσης (Saunders *et al.*, 2004). Η ολοκλήρωση της διάπαυσης (diapause development), επηρεάζεται επίσης από τη δράση διαφόρων παραγόντων. Οι σπουδαιότεροι από αυτούς είναι η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία, το νερό, τα θρεπτικά στοιχεία κλπ. Η επίδραση της φωτοπεριόδου στην περάτωση της διάπαυσης έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετά έντομα. Η διάρκεια και η περάτωση της διάπαυσης μπορεί να επιταχυνθούν αν τα διαπαύοντα άτομα ενός πληθυσμού εκτεθούν για μία περίοδο σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου το ψύχος από μόνο του ενεργεί ως βασικός παράγων για την περίπτωση της διάπαυσης. Συνήθως, απαιτείται αλληλεπίδραση χαμηλών ή και υψηλών θερμοκρασιών με τη φωτοπερίοδο, για την ολοκλήρωση της κατάστασης διάπαυσης (Denlinger *et al.*, 2001).

2.1. Τύποι διάπαυσης

Ορισμένα είδη εντόμων εκδηλώνουν **υποχρεωτική** διάπαυση (obligatory), δηλαδή κάθε άτομο κάθε γενιάς διαπαύει ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Τα πιο πολλά από τα είδη αυτά είναι μονοκυκλικά (monovoltine ή univoltine), έχουν δηλαδή μια γενιά το χρόνο. Αλλά είδη εντόμων εκδηλώνουν προαιρετικής φύσεως διάπαυση (facultative), δηλαδή η διάπαυση εκδηλώνεται στα άτομα κάποιας γενεάς ή γενεών, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια κάποιου σταδίου (ή σταδίων), που χαρακτηρίζονται ως «κρίσιμα στάδια» τα οποία προηγούνται του σταδίου όπου εκδηλώνεται η διάπαυση. Τα έντομα αυτά έχουν δύο ή και περισσότερες γενεές το χρόνο και χαρακτηρίζονται ως πολυκυκλικά (multivoltine) (Beck, 1980). Ο όρος προαιρετική διάπαυση, υπονοεί ότι η διάπαυση μπορεί να αρθεί κάτω από συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες και περιγράφει όλες εκείνες τις περιπτώσεις, όπου οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που τις ρυθμίζουν είναι γνωστοί και αναστρέψιμοι.

Προνυμφική διάπαυση: Το φαινόμενο της διάπαυσης σε ένα είδος, εκδηλώνεται σε ένα εντελώς καθορισμένο στάδιο ανάπτυξης του (ωό, προνύμφη, νύμφη ή ενήλικο). Γενικά τα έντομα προσλαμβάνουν τα προκαλούντα τη διάπαυση ερεθίσματα, κατά τη διάρκεια χαρακτηριστικών σταδίων της ζωής τους. Κατά κανόνα, τα ευαίσθητα στάδια σε κάποιο ερέθισμα που προκαλεί διάπαυση είναι διαφορετικά από τα στάδια όπου εκδηλώνεται η διάπαυση για την ίδια γενεά ή στις επόμενες γενεές. Η νυμφική διάπαυση του *Papilio machaon*, για παράδειγμα, καθορίζεται από την ευαισθησία των προνυμφών στις μικρής διάρκειας φωτοφάσεις. Για την εκδήλωση της προνυμφικής διάπαυσης υπεύθυνοι είναι διάφοροι νευροορμονικοί μηχανισμοί (Beck, 1980).



Εικόνα 4. Περιβαλλοντική προσαρμογή και τύποι διάπαυσης

2.2. Γενετική και μοριακή προσέγγιση της διάπαυσης

2.2.1. Ρύθμιση της διάπαυσης

Έχουν περιγραφεί περιβαλλοντικοί και ορμονικοί ρυθμιστές για τη διάπαυση, όμως η κατανόηση της μοριακής της ρύθμισης τώρα επιδιώκεται. Πολλά γονίδια δεν είναι ενεργά κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ενώ άλλα εκφράζονται αποκλειστικά τότε. Ο τερματισμός της διάπαυσης, συνοδεύεται από μια ταχεία ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων που είναι θετικά ρυθμισμένα με αυτή και αύξηση της έκφρασης πολλών γονιδίων, τα οποία δεν είναι θετικά ρυθμισμένα με αυτή. Περιβαλλοντικοί και ορμονικοί ρυθμιστές της διάπαυσης έχουν βρεθεί μέχρι τώρα, όμως η κατανόηση της ρύθμισης της διάπαυσης σε μοριακό επίπεδο δεν είναι ακόμα κατανοητή. Οι τάξεις των γονιδίων που ενεργοποιούνται, μπορούν να διακριθούν βάσει της εικόνας έκφρασης τους. Μερικά ενεργοποιούνται μέσα στη διάπαυση, άλλα εκφράζονται μόνο στην αρχή (early diapause), αργά (late diapause), ή ενδιάμεσα (intermittently). (Kostal, 2006). Ο τερματισμός της διάπαυσης, συνοδεύεται από μία γρήγορη ελάττωση της έκφρασης πολλών γονιδίων, τα οποία ελαττώνουν τη ρύθμιση τους κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Μια σύγκριση της διάπαυσης των εντόμων, με άλλες μορφές χειμερίας νάρκης σε φυτά και ζώα, δείχνει ότι η καταστολή αυτή γίνεται από μια ομάδα γονιδίων –που παράγουν heat shock πρωτεΐνες-, ένα

χαρακτηριστικό κοινό για διαφορετικούς τύπους νάρκης. Η ρύθμιση της διάπαυσης, αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον αναπτυξιακό πρόβλημα (Denlinger *et al.*, 2001).

Μορφές της γονιδιακής έκφρασης: Η έκφραση γονιδίων που συνδέονται με τη διάπαυση, παρατηρήθηκε σε διάφορους ιστούς του σώματος. Η δραστηριότητα στον εγκέφαλο είναι ίσως η πιο ενδιαφέρουσα από τις ρυθμιστικές πλευρές, γιατί ο εγκέφαλος λειτουργεί σαν αποθήκη του διαπαυσικού προγράμματος. Από συγκρίσεις πρωτεϊνών του εγκεφάλου σε διαπαυσιακά και μη άτομα, δύο συμπεράσματα υπάρχουν σχετικά με τη διάπαυση: α. Η διάπαυση αναγκάζει πολλά γονίδια να σιωπήσουν. Β. Ένας μικρός αριθμός γονιδίων εκφράζεται αποκλειστικά κατά το διάστημα αυτό (Denlinger *et al.*, 2005).

2.2.2. Έκφραση γονιδίων αποκλειστικά κατά τη διάπαυση

Το πρώτο τέτοιο γονίδιο που απομονώθηκε, είναι αυτό που κωδικοποιεί μια μικρή heat shock πρωτεΐνη, 23 – kDa. Σε μη διαπαύοντα άτομα, το μετάγραφο είναι υψηλά εκφρασμένο σε σχέση με την περιβαλλοντική καταπόνηση, όπως είναι το θερμό και ψυχρό σοκ. Σε διαπαύουσες νύμφες, το γονίδιο ενεργοποιείται κατά την είσοδο στη διάπαυση. Η έκφραση του ανέρχεται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ακόμα και σε συνθήκες μη καταπόνησης, όπως είναι οι 20⁰C. Έξι ώρες μετά τον τερματισμό της διάπαυσης, έχει απενεργοποιηθεί. Η ενεργοποίηση του *hsp23* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, οδηγεί σε μια ενεργοποίηση επιπρόσθετων heat shock πρωτεϊνών, οι περισσότερες των οποίων είναι υψηλά συντηρημένες και ανήκουν στην οικογένεια 70-kDa. Μέλη αυτής της οικογένειας εκφράζονται σε όλα τα επίπεδα στη διάρκεια της διάπαυσης και η αντίδραση τους είναι ταυτόσημη με αυτή των *hsp23*. Το επίπεδο έκφρασης αλλάζει ανάλογα με τον ιστό, αλλά και για τις δύο, μεγαλύτερη έκφραση εμφανίζεται στον εγκέφαλο και ακολούθως στην επιδερμίδα, ενώ πολύ μικρή στο λίπος. Πάντως, δεν ενεργοποιούνται όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καταπόνησης. Για παράδειγμα, το γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 90-kDa, απενεργοποιείται στη διάρκεια της διάπαυσης. Αυτό δείχνει τον ξεχωριστό ρόλο των διάφορων heat shock πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Ποιός ακριβώς είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών, δεν είναι ακόμα γνωστό, αλλά δύο είναι πιθανοί: α. Οι *hsp23* και *hsp70* ίσως εξασφαλίζουν ένα ψυχρό-προστατευτικό ρόλο. Σαν μοριακά τσαπερόνια, οι heat shock πρωτεΐνες υπεισέρχονται στον κύριο μεταβολισμό των ενζύμων ή στη δομή των πρωτεϊνών στη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών

του χειμώνα. β. Εναλλακτικά, οι heat shock πρωτεΐνες, ίσως συμβάλουν άμεσα στη ρύθμιση της διάπαυσης, εξασφαλίζοντας ένα συγκροτημένο κυτταρικό κύκλο, ο οποίος συνδέεται με την έκφραση των δύο αυτών μικρών heat shock πρωτεϊνών (Denlinger *et al.*, 2001).

Γονίδια που υπολειτουργούν κατά τη διάπαυση: Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη των φωσφορικών αλάτων μεταφοράς, ανήκει στην κατηγορία αυτή. Η έκφραση των *hsp90* φαίνεται να ενεργοποιείται όταν εμφανιστούν εκδυστεροϊδή και απενεργοποιείται όταν εξαφανιστούν.

Γονίδια που εκφράζονται νωρίς στη διάπαυση: Ένα γονίδιο που εκφράζεται νωρίς στη διάπαυση, είναι το *pScD41*. Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε και η ακολουθία των νουκλεοτιδίων του έδειξε ότι είναι ένα ρετροτρανσπόζον. Το *samui*, ένα ψυχρό-συνδεδεμένο γονίδιο στο μεταξοσκώληκα, εκφράζεται επίσης νωρίς στη διάπαυση. Σ' αυτό το είδος, μια περίοδος ψύχους δύο μηνών στους 5° C, είναι απαραίτητη για τον τερματισμό της διάπαυσης. Στις 30 ημέρες, εμφανίζεται η δράση του γονιδίου της υδρογονάσης (*sdh*). Η SDH χρησιμεύει στο μετασχηματισμό του σορβικού οξέος σε γλυκογόνο, τα ενεργειακά αποθέματα του οποίου απαιτούνται κατά το τέλος της διάπαυσης, για την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης.

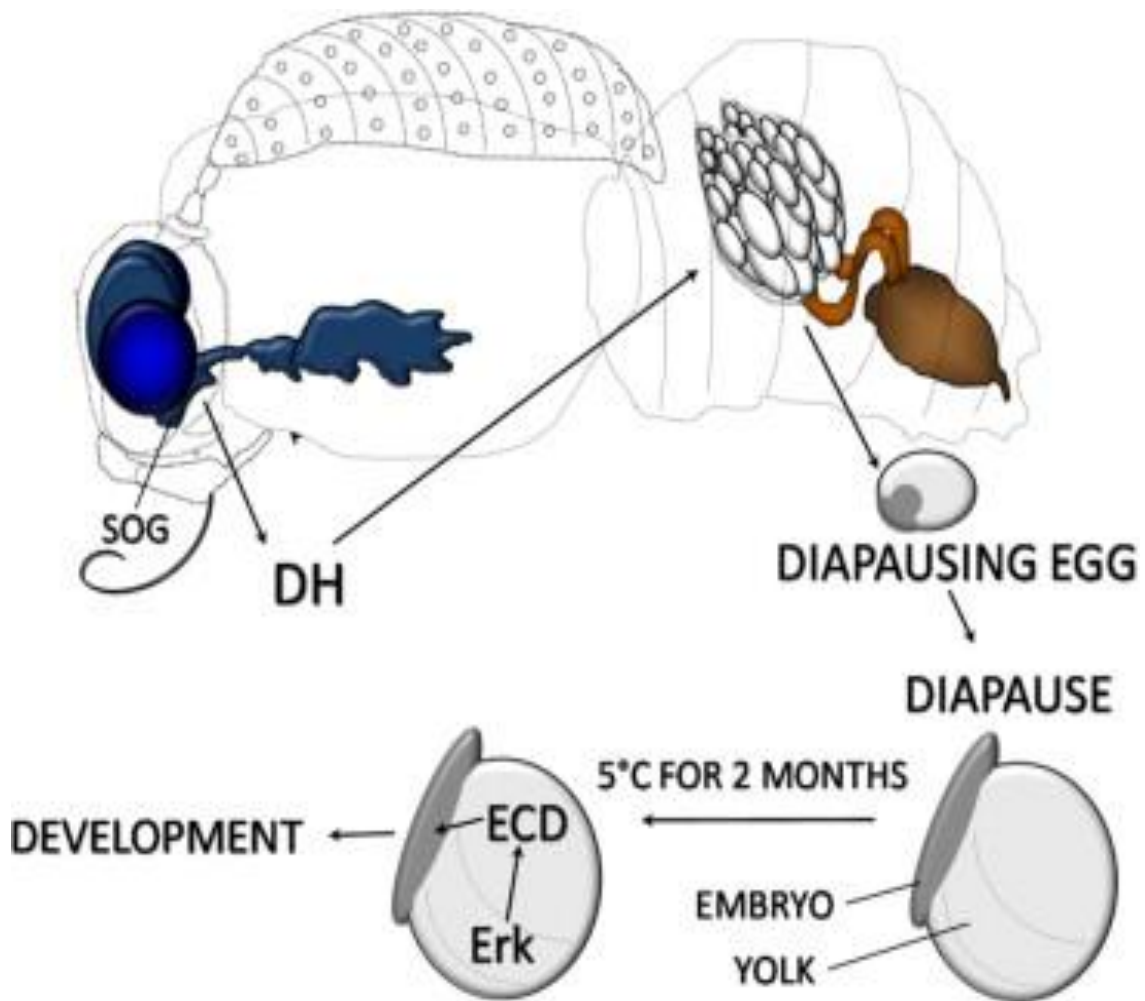
Γονίδια που εκφράζονται αργά στη διάπαυση: Ένα από τα καλύτερα μελετημένα γονίδια αυτού του διαστήματος, είναι αυτό που κωδικοποιεί τη σορπιτόλ-δε-υδρογονάση (SDH, Sorbitol dehydrogenase). Ένα άλλο γονίδιο, που κωδικοποιεί τη ντεφενσιν, μια πρωτεΐνη γνωστή για την αντιμικροβιακή της δράση, ενεργοποιείται αυτό το διάστημα. Η έκφραση της αυξάνει μετά παραμονή αρκετού χρόνου στους 2° C, και παραμένει σ' αυτό το επίπεδο όσο παραμένουν οι λάρβες σε χαμηλή θερμοκρασία. Μια άλλη πρωτεΐνη του κεντρικού νευρικού συστήματος (CNS), σε ένα νυκτόβιο (*Galleria mellonella*), εμφανίζεται στον εγκέφαλο και μάλλον συνδέεται με την επανάληψη της ανάπτυξης (Denlinger *et al.*, 2005). **Τερματισμός της διάπαυσης:** Όταν τερματίζεται η διάπαυση, μπορούμε να δούμε πολλές αλλαγές στην εικόνα έκφρασης των γονιδίων. Τα έντομα τάχιστα αυξάνουν τη μεταβολική ταχύτητα και την ανάπτυξη τους. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχουν τα σήματα τα οποία ξεκινούν την έναρξη του τερματισμού. Σε κάποια είδη, με τοπική εφαρμογή εξανίου, τα έντομα βγαίνουν από τη διάπαυση και έτσι μπορούμε άμεσα να τα μελετήσουμε. Έτσι, μετά απ' αυτή την εφαρμογή, φάνηκε να εμφανίζονται απενεργοποιημένες οι

δύο heat shock πρωτεΐνες, ενώ εμφανίζονται άλλες, όπως είναι η EcR. Πάντως, τα μοριακά γεγονότα που συμβαίνουν νωρίς στον τερματισμό της διάπαυσης είναι πολύ λίγο γνωστά. Προ-θωρακο-τροπικές ορμόνες (PTTH) καθώς και άλλες ορμόνες που διευθύνουν τα γεγονότα του τερματισμού είναι γνωστές, αλλά τα κρίσιμα ερωτήματα εστιάζονται σε γεγονότα που συμβαίνουν στον εγκέφαλο, που καθοδηγεί την έκλυση αυτών των ορμονών στον κατάλληλο χρόνο, απαλλάσσοντας το έντομο από την αναπτυξιακό περιορισμό που βρισκόταν στο διάστημα της διάπαυσης. Ο τερματισμός της διάπαυσης δεν είναι εντελώς κατανοητός και διαφέρει ανάμεσα στα είδη. Ένας κύκλος γεγονότων που συμβαίνουν στη διάρκεια της διάπαυσης του *S. crassipalpis*, δείχνει τη συσσώρευση κάποιων περιοδικά εκφρασμένων γονιδίων που συνδέονται με τη σύνθεση της JH καθώς και με την παραγωγή μεταβολικών ενζύμων που συμμετέχουν στην κατανάλωση του οξυγόνου. Ένα τέτοιο γονίδιο, είναι αυτό που κωδικοποιεί για την 60S ριβοσωμική πρωτεΐνη PO (60S acidic ribosomal protein P0), που είναι μια ενδονουκλεάση. Το γονίδιο εκφράζεται έντονα στις ημέρες με χαμηλή κατανάλωση οξυγόνου (Denlinger *et al.*, 2005).

2.2.3. Ενδοκρινική ρύθμιση της διάπαυσης

Όταν έχει επιτευχθεί το σωστό στάδιο διάπαυσης, το έντομο ξαναρχίζει την ανάπτυξη του, ενεργοποιώντας ένα νέο μεταβολικό μηχανισμό, ο οποίος τον «προμήθευε κατά τη διάρκεια της μεταβολικής καταστολής και τότε «αποφασίζει» το σωστό χρόνο, για επανάληψη της οργάνωσης του. Θα δούμε κάποια ορμονικά συστήματα, τα οποία κατευθύνουν τη διάπαυση και τη γονιδιακή έκφραση, που συνδέεται με το στάδιο αυτό. Αρκετές ορμόνες-κλειδιά χρησιμεύουν σαν ρυθμιστές της διάπαυσης, αλλά ακριβώς ποιες ορμόνες εμπλέκονται, εξαρτάται από το είδος του εντόμου και το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο συμβαίνει. Η **εμβρυϊκή** διάπαυση, ελέγχεται με διάφορους τρόπους, με καλύτερη μελετημένη αυτή που αφορά το μεταξοσκώληκα (*B. mori*) (Εικ. 5). Σε αυτό το είδος, η διάπαυση επηρεάζεται από τη δράση της **ορμόνης διάπαυσης**. Η ορμόνη διάπαυσης, που είναι ο ρυθμιστής της εμβρυϊκής διάπαυσης στο *B. mori*, είναι ένα νευροπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το ίδιο γονίδιο με το νευροπεπτίδιο της βιοσύνθεσης της **φερομόνης**. Αυτό το γονίδιο, εκφράζεται κατά το χρόνο εισαγωγής στη διάπαυση και υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του mRNA, προάγεται από τα υψηλά επίπεδα ντοπαμίνης, που εμφανίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην αιμολέμφο των θηλυκών, που παράγουν διαπαύοντες

απογόνους. Η ορμόνη διάπαυσης διεγείρεται από τη δράση της τρεχαλόζης στα αναπτυσσόμενα ωάρια. (Yamashita, 1996).



Εικόνα 5. Μητρικός έλεγχος της εμβρυϊκής διάπαυσης στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Η ορμόνη διάπαυσης (**DH=Diapause Hormone**) παράγεται από το γάγγλιο suboesophageal (**SOG=Suboesophageal ganglion**) της μητέρας που αναπτύσσεται σε συνθήκες μακράς ημέρας και υψηλής θερμοκρασίας, το καλοκαίρι. Τα DH σήματα στις ωοθήκες, επάγουν την ανάπτυξη των προορισμένων για διάπαυση αυγών. Σε αυτά τα αυγά, η εμβρυϊκή διάπαυση συμβαίνει μετά την ανάπτυξη του κεφαλικού λοβού και την ακόλουθη κατάτμηση στο μεσόδερμα. Τα έμβρυα χρειάζονται 2 -3 μήνες σε χαμηλές θερμοκρασίες (περίπου 5°C) για να μπορούν να συλλάβουν την διάπαυση και συνεχίζουν την ανάπτυξη σε υψηλή θερμοκρασία. Στη φάση αυτή, είναι ενεργοποιημένη η πορεία **ERK** (signal-regulated kinase (ERK)) στα κύτταρα του κρόκου και προάγει την παραγωγή των της 20-OH εκδυσόνης (**ECD, Ecdysone**). Τα σήματα ECD προκαλούν στο έμβryo την απομάκρυνση των εμποδίων που επιβάλλονται προς ανάπτυξη (Yamashita, 1996).

Η δράση της τρεχαλόζης, δημιουργεί υψηλά επίπεδα γλυκογόνου στα ώριμα ωάρια, απαραίτητη προϋπόθεση για διάπαυση. Το γλυκογόνο μετατρέπεται τότε σε γλυκερόλη και σορβιτόλη. Μια πρωτεΐνη-κινάση, που εξαρτάται από Ca^{2+} , υπεισέρχεται όπως φαίνεται. Η πρωτεΐνη κινάση, είναι ένας παρεμποδιστής, που ελαττώνει τη δραστηριότητα της τρεχαλόζης. Η ορμόνη της διάπαυσης, μόνο στο *B. mori* εμφανίζεται ως ρυθμιστής της διάπαυσης. Στο έντομο *Lymantria dispar*, η διάπαυση υποχρεώνεται να γίνει στα τελευταία στάδια ανάπτυξης, αφού έχει ολοκληρωθεί η εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αυτή η διάπαυση, παραμένει μέσω της παραγωγής **εκδυστεροϊδών**, η ισχύς των οποίων ελαττώνεται, πριν η ανάπτυξη προχωρήσει (Denlinger *et al.*, 2005). Ο κεντρικός ρόλος των εκδυστεροϊδών στη ρύθμιση της διάπαυσης δείχνει, ότι γονίδια που συνδέονται με τη δράση τους, ίσως να είναι αποφασιστικά για τη ρύθμιση της διάπαυσης. Στους ιστούς-στόχους, τα εκδυστεροϊδή συνδέονται με τον υποδοχέα της εκδυσόνης (EcR) και διμερίζονται με το ultraspiracle (USP). Με την έναρξη της διάπαυσης, το *EcR* ενεργοποιείται και παραμένει μέχρι το τέλος της, ενώ το *USP* εκφράζεται εντονότερα, όταν τελειώνει η διάπαυση, που σημαίνει ότι μπορεί να σχετίζεται με διεργασίες που οδηγούν σε τερματισμό της (Denlinger *et al.*, 2005).

2.3. Μηχανισμοί της διάπαυσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο παράγων που κύρια ρυθμίζει την είσοδο των ειδών σε διάπαυση είναι η φωτοπερίοδος. Αυτό σημαίνει ότι τα έντομα μπορούν να διακρίνουν τις διάφορες φάσεις και να ρυθμίζουν την αναστολή ή μη της ανάπτυξης τους. Το γεγονός ότι τα έντομα έχουν την ικανότητα να ξεχωρίζουν τη μικρή από τη μεγάλη ημέρα, έχει οδηγήσει αρκετούς ερευνητές στη σκέψη ου πιθανόν να υπάρχει ένα είδος εσωτερικού και κληρονομήσιμου μηχανισμού, ο οποίος επιτρέπει τη μέτρηση της διάρκειας της φωτόφασης ή σκοτόφασης ή και των δύο και την αντίδραση σ' αυτές τις συνθήκες με την αλλαγή του μεταβολισμού τους. Η λειτουργία ενός τέτοιου μηχανισμού προϋποθέτει α) την ύπαρξη κάποιων φωτοδεικτών στα έντομα για τη διαπίστωση της νύκτας ή ημέρας, β) την παρουσία ενός ρολογιού που να μετρά τη διάρκεια των φάσεων της φωτοπεριόδου και να συνδυάζει αυτές τις πληροφορίες και γ) τη ρύθμιση των μεταβολικών διαδικασιών για την είσοδο σε διάπαυση, μέσω ενός τελικού συστήματος ορμονών. Η διάπαυση, όπως και άλλες λειτουργίες (αναπαραγωγή, μεταβολισμός κλπ) των εντόμων, ελέγχεται από το

ενδοκρινικό σύστημα. Το σύστημα αυτό συγκροτούν αδένες και ειδικά κύτταρα, που εκκρίνουν ορμόνες, δηλαδή χημικούς “αγγελιοφόρους” που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις δρουν και επηρεάζουν τις φυσιολογικές αντιδράσεις του εντόμου. Οι πηγές των ορμονών που παίζουν κάποιο ρόλο στο φαινόμενο της διάπαυσης είναι: τα νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου (εκκρίνουν την ορμόνη του εγκεφάλου -brain hormone), οι προθωρακικοί αδένες (εκκρίνουν την εκδυσόνη –ecdysone), το ζεύγος των αδένων που ονομάζεται corpora allata (έκκριση της νεανικής ορμόνης - juvenile hormone) και το ζεύγος των corpora cardiaca. Ανάλογα με το στάδιο στο οποίο εκδηλώνεται η διάπαυση, οι νευροορμονικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι γι’ αυτήν, είναι διαφορετικοί. (Denlinger *et al.*, 2005).

3. ΟΙ ΘΕΡΜΟΕΠΑΓΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (HEAT SHOCK PROTEINS-HSPs)

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης οι πρόγονοι των σημερινών οργανισμών, απέκτησαν διάφορους μηχανισμούς προσαρμοστικότητας, ώστε να αντεπεξέλθουν στις ξαφνικές περιβαλλοντικές μεταβολές που επέφερε ο εποικισμός της ξηράς. Οι μηχανισμοί αυτοί παρείχαν τη βάση για τον εποικισμό όλων των οικοσυστημάτων εκτός νερού. Ο μηχανισμός που καθόρισε την επιτυχή εξάπλωση των διαφόρων οργανισμών είναι η ικανότητα τους να αντιδρούν άμεσα σε ένα εύρος περιβαλλοντικών μεταβολών. Δηλαδή, η εγκατάσταση ενός δικτύου αλληλένδετων κυτταρικών συστημάτων ανταπόκρισης σε καταπονήσεις, ήταν προαπαιτούμενο για την επιβίωση. Οι κυτταρικές αποκρίσεις σε αλλαγές του περιβάλλοντος και σινιάλα, αποτυπώνονται με μια συνδυασμένη έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών προκαθορίζουν τα κυτταρικά χαρακτηριστικά και τη θερμοανθεκτικότητα. Οι ακραίες περιβαλλοντικές αλλαγές δημιουργούν κάποια μορφή “πίεσης” ή στρες που “δοκιμάζουν” τις κανονικές και φυσιολογικές διαδικασίες ανάπτυξης και αύξησης του οργανισμού. Οι οργανισμοί αντιπαρέχονται τις συνθήκες αυτές, αξιοποιώντας τη δυναμική έκφραση εξειδικευμένων γονιδίων (Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Walter and Buchner, 2002).

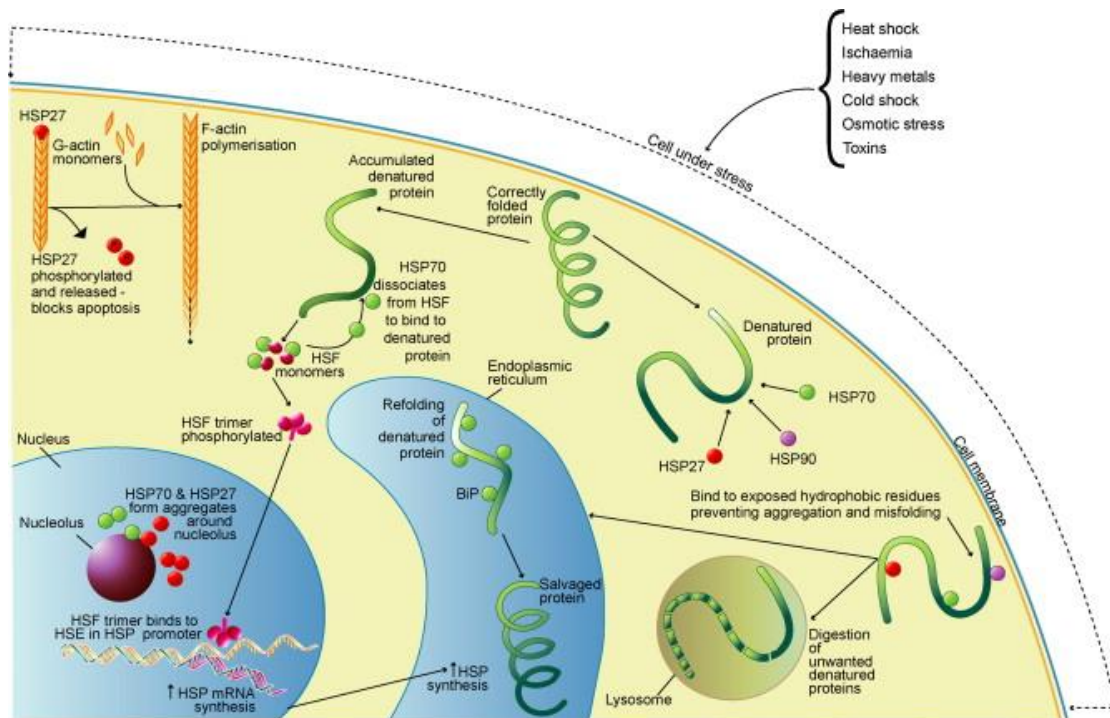
Η μελέτη της μοριακής βάσης της ανταπόκρισης σε παράγοντες καταπόνησης, ξεκίνησε τυχαία όταν το 1962 παρατήρησε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός νέου προτύπου χρωμοσωμικών διογκώσεων (puffs) στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου. Συγκεκριμένα, παρατήρησε ότι οι περισσότερες χρωμοσωμικές διογκώσεις που υπήρχαν πριν από την αύξηση της θερμοκρασίας, ελαττώνονταν σε μέγεθος ή και εξαφανίζονταν τελείως, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονταν καινούριες. Γνωρίζοντας ότι οι χρωμοσωμικές διογκώσεις είναι θέσεις με έντονη μεταγραφική δραστηριότητα, ο ερευνητής αυτός κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων (Ritossa, 1962). Χρειάστηκε όμως να περάσουν 12 ακόμα χρόνια, για να ανακαλυφθούν τα προϊόντα

των γονιδίων αυτών και να αποδοθούν οι όροι θερμοεπαγόμενα γονίδια και θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες αντίστοιχα (Tissieres *et al.*, 1974).

Οι πρωτεΐνες καταπόνησης (heat shock proteins), είναι γνωστές σαν μία ομάδα συντηρημένων πρωτεϊνών, οι οποίες ενεργοποιούνται σε σχέση με κάποια περιβαλλοντική καταπόνηση. Η σύνθεση τους κατ' αρχάς συνδέονταν με τη θερμική καταπόνηση (heat shock), εξ ου και το όνομα heat shock proteins, αλλά πρωτεΐνες καταπόνησης είναι πιο κατάλληλη ονομασία, γιατί γνωρίζομε ότι η σύνθεση τους μπορεί να ενεργοποιείται κατά μεγάλο εύρος, παρουσία πρόσθετων παραγόντων καταπόνησης, όπως είναι το κρύο, η ζέστη, βαρέα μέταλλα και άλλα χημικά, τα οποία προκαλούν αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Lindquist, 1986; Nover and Scharf, 1997).

Πρωτεΐνες καταπόνησης με όμοια ακολουθία, παρουσιάζεται σε οργανισμούς όπως είναι τα βακτήρια, οι ζύμες τα φυτά και τα ζώα. Επιπλέον αυτών των περιβαλλοντικών πιέσεων, οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις μέσα στα κύτταρα υπό κανονικές συνθήκες, ή επάγονται σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Στις περιπτώσεις θερμικού στρες τα γονίδια ονομάζονται θερμοεπαγόμενα (Feder and Hofmann, 1999; Kregel, 2002). Για να κατανοήσουμε πως οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες υπεισέρχονται στην “αποτοξίνωση” του οργανισμού στο στρες και για να ταυτοποιήσουμε τη λειτουργική τους σημασία, είναι αναγκαία μια λεπτομερειακή ανάλυση. Όλα τα προηγούμενα συνθέτουν την εικόνα της έκφρασης των θερμοεπαγόμενων γονιδίων και της σύνθεσης και συσσώρευσης των αντιστοίχων πρωτεϊνών, αλλά όχι μια πραγματική εικόνα της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτών σε κυτταρικό ή οργανικό επίπεδο για τη προπαρασκευή και αντοχή του οργανισμού σε ακραίες θερμοκρασίες (Hart and Hayer-Hartl, 2002; Walter and Buchner, 2002).

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ανιχνεύονται και επάγονται σ' όλους τους οργανισμούς. Η θερμοκρασία επαγωγής διαφέρει μεταξύ των οργανισμών και εξαρτάται άμεσα από την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξή τους (Nover and Scharf, 1997). Επίσης η απόκρισή τους είναι εξαιρετικά γρήγορη και έντονη γεγονός που τους αποδίδει το ρόλο της “άμεσης δράσης”. Οι πιο εκτενώς χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες καταπόνησης, είναι οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες και ειδικότερα στη *D.melanogaster*, στο *Saccharomyces cerevisiae*, και στο *E. coli*.



Εικόνα 6. Διάφοροι παράγοντες και συνθήκες που επάγουν τη σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.

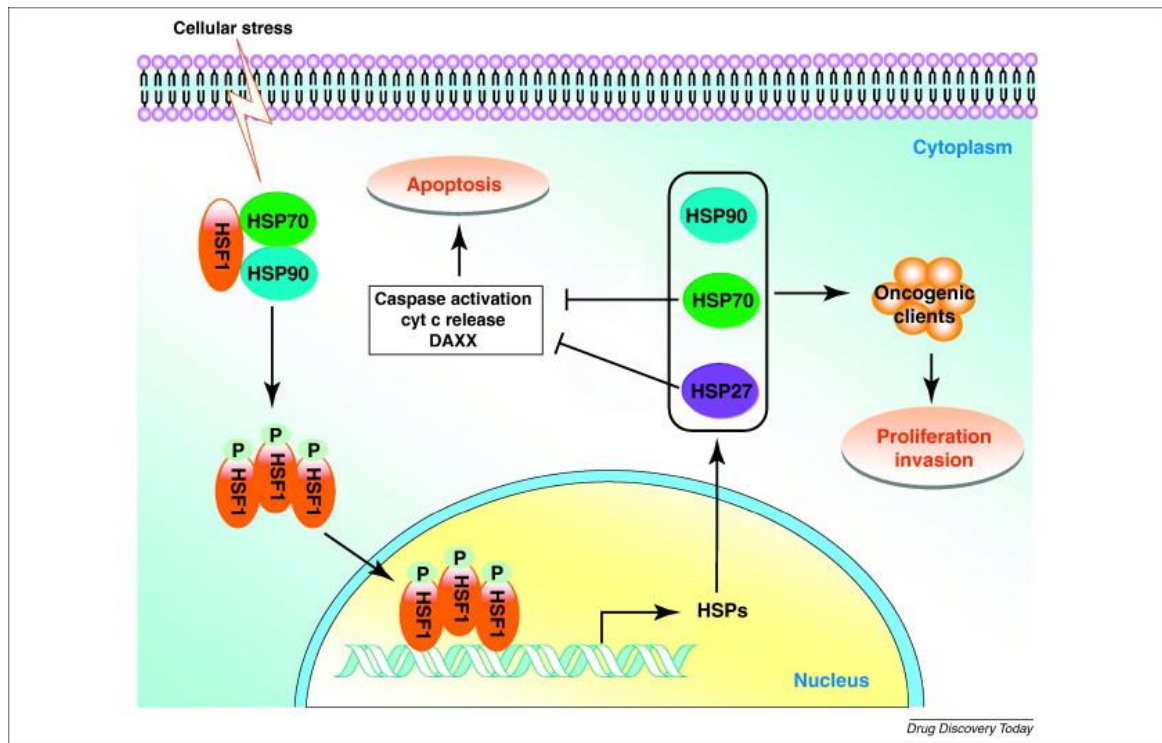
Οι HSP πρωτεΐνες κωδικοποιούνται κυρίως στα πυρηνικά γονίδια, αλλά εντοπίζονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες, τα υπεροξυσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Feige and Polla, 1994). Η σύνθεση ειδικών πρωτεϊνών μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες αναφέρθηκε πρώτα σε κύτταρα της *D.melanogaster* (Tissieres *et al.*, 1974), αλλά δεν άργησε να διαπιστωθεί ότι η κυτταρική αυτή απόκριση είναι κοινή σε όλους τους οργανισμούς, από τα βακτήρια έως και τους ανώτερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς (Nover and Scharf, 1997). Η απόκριση αυτή συνίσταται στη μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων, των θερμοεπαγόμενων γονιδίων (*hsp genes*), τα οποία πριν ήταν ανενεργά ή είχαν μικρή ενεργότητα και στην ταυτόχρονη καταστολή της μεταγραφής των υπολοίπων γονιδίων. Τα νέα mRNAs που συντίθενται μετά το θερμικό στρες μεταφράζονται σε μια ομάδα πρωτεϊνών, που ονομάζονται θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat shock proteins - HSPs). Όταν η θερμοκρασία επανέλθει στα φυσιολογικά για τον οργανισμό επίπεδα, τα θερμοεπαγόμενα γονίδια σταματούν να μεταγράφονται, ενώ αρχίζουν να μεταγράφονται και πάλι τα υπόλοιπα γονίδια των κυττάρων. Η θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται μέγιστη επαγωγή της σύνθεσης των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών εξαρτάται από τη φυσιολογική

θερμοκρασία του κάθε οργανισμού. Μέχρι σήμερα δύο μόνο εξαιρέσεις έχουν βρεθεί στο φαινόμενο της αντίδρασης στο θερμικό στρες. Πρόκειται για δύο είδη ψαριών (*Hydra oligatis* και *Trematomus bernacchii*) που ζουν σε ψυχρά, σταθερής θερμοκρασίας νερά και στα οποία δεν έχει ανιχνευτεί καμιάς μορφής απόκριση στο θερμικό στρες (Katschinski, 2004).

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες δεν εμφανίζονται στα κύτταρα μόνο λόγω αύξησης της θερμοκρασίας. Η σύνθεσή τους επάγεται και από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα βαρέα μέταλλα, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και η ανοξία, καθώς επίσης και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως σε περιπτώσεις μολύνσεων, τραυματισμού των ιστών και πυρετού. Επιπλέον, κάποια από τα μέλη της οικογένειας των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται συγγενείς θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat shock cognates – HSCs), συντίθενται συστατικά (constitutively) και παίζουν ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως ο κυτταρικός κύκλος και η κυτταρική διαφοροποίηση (Feige and Polla, 1994). Η επαγωγή των HSPs πρέπει να υφίσταται αυστηρό έλεγχο δεδομένου ότι η συνεχής παρουσία τους θα διατάρασσε την πρωτεϊνική ομοιόσταση και τις ενδοκυττάριες λειτουργίες, επιφέροντας μη φυσιολογικό έλεγχο της αύξησης και πιθανώς κυτταρικό θάνατο. Η επαγωγή της έκφρασής τους είναι ραγδαία, καθώς μετατρέπονται στο επικρατέστερο προϊόν της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσα στα 15 πρώτα λεπτά από την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες (Lindquist, 1986).

3.1. Ο μεταγραφικός παράγοντας της θερμικής καταπόνησης (Heat Shock Factor- HSF)

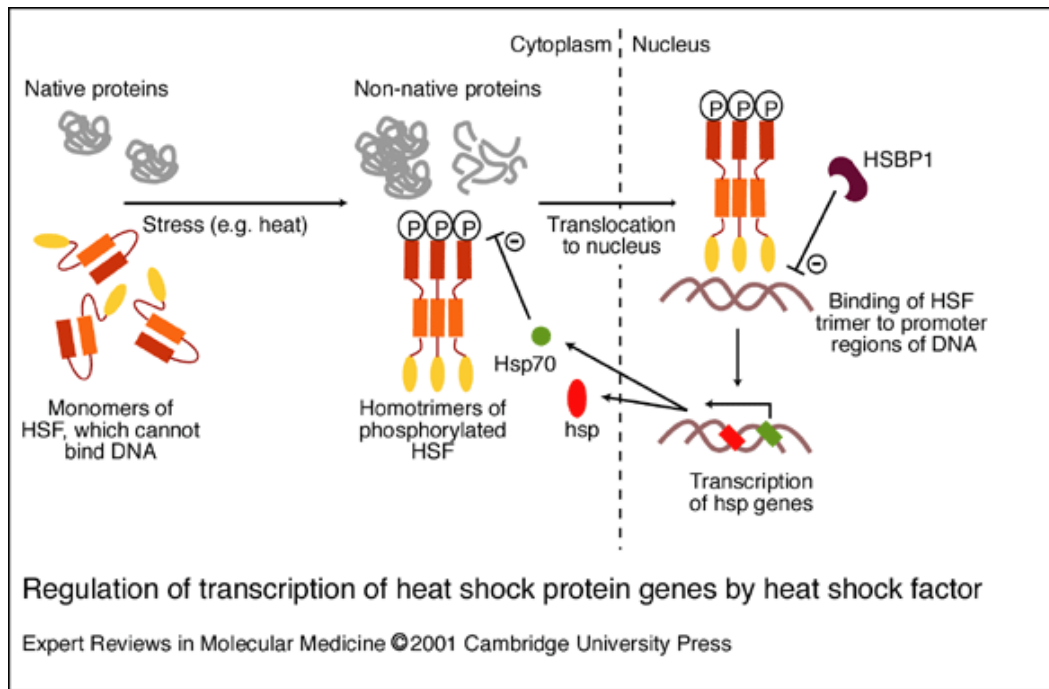
Η μεταγραφή των θερμοεπαγόμενων γονιδίων μετά από θερμικό στρες οφείλεται πρωταρχικά στη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα του θερμικού στρες (HSF) σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή τους. Ο HSF έχει απομονωθεί και κλωνοποιηθεί τόσο από ζωικούς όσο και από φυτικούς οργανισμούς. Στα φυτά και σε μερικούς ζωικούς οργανισμούς μάλιστα, έχουν απομονωθεί περισσότερες από μία ισομορφές, ο ρόλος των οποίων δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.



Εικόνα 7. Διάφοροι παράγοντες και συνθήκες που επάγουν τη σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.

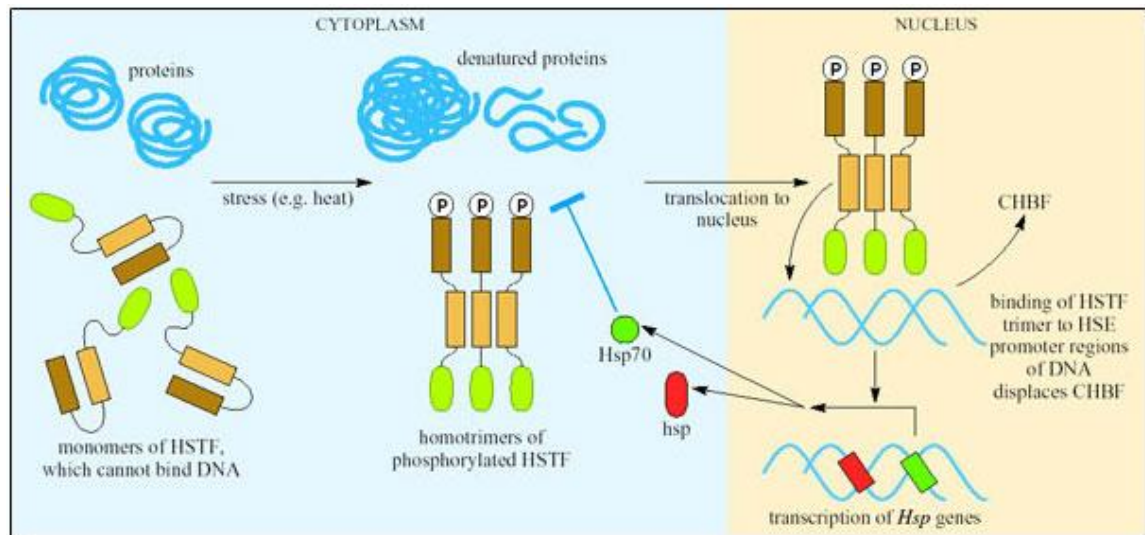
Πιστεύεται ότι η ποικιλία στις ισομορφές του HSF επιτρέπει τη διαφορική ρύθμιση της μεταγραφής, ανάλογα με τον παράγοντα που επάγει τη σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Pirkkala *et al.*, 2001). Στη *D. melanogaster* και στο σακχαρομύκητα υπάρχει μία μόνο ισομορφή, η οποία είναι ομόλογη με την ισομορφή HSF1 που απαντάται στα θηλαστικά (Morimoto, 1998).

Η έκφραση των θερμοεπαγόμενων γονιδίων γίνεται εφικτή με την πρόσδεση του HSF σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή τους, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στη θερμότητα (HSEs). Οι ρυθμιστικές αυτές αλληλουχίες έχουν χαρακτηριστεί και εμφανίζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους. Τοποθέτηση συνθετικής αλληλουχίας HSE μπροστά από ένα βασικό υποκινητή έχει σαν αποτέλεσμα τη θερμοεπαγόμενη έκφραση του γονιδίου (Pelham and Bienz, 1982; Weber *et al.*, 1997). Η θέση και ο αριθμός των HSEs μπορεί να ποικίλλουν (Simon and Lis, 1987).



Εικόνα 8. Ρύθμιση της μεταγραφής των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών από τους μεταγραφικούς παράγοντες της θερμικής καταπόνησης (Heat Shock Factor- HSF)

Το κύριο χαρακτηριστικό των HSEs είναι η ύπαρξη συνεχόμενων ανεστραμμένων επαναλήψεων του πεντανουκλεοτιδίου 5'-nGAAn-3', (Morimoto, 1998; Xiao and Lis, 1988). Για να είναι λειτουργικό ένα τέτοιο στοιχείο απαιτούνται τουλάχιστον δύο επαναλήψεις της αλληλουχίας αυτής (Perisic *et al.*, 1989). Ακόμα έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις μέσα στο κεντρικό τρινουκλεοτίδιο (GAA) μειώνουν τη ισχύ της δέσμευσης με τον HSF. Επιπλέον, το πρώτο νουκλεοτίδιο του πεντανουκλεοτιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του HSF και δείχνει μία ισχυρή προτίμηση να είναι A (Fernandes *et al.*, 1994). Η αλληλουχία επομένως που φαίνεται να αντιπροσωπεύει καλύτερα το στοιχείο απόκρισης στη θερμότητα είναι 5'-AGAAAn-3'. Σημαντικό ρόλο όμως στην ικανότητα της επαγωγής φαίνεται να παίζουν και κάποιες γειτονικές του πεντανουκλεοτιδίου βάσεις, καθώς και άλλες ρυθμιστικές αλληλουχίες (Shorland and Lis, 1996). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ούτε ο αριθμός, ούτε η συγγένεια των HSEs για τον HSF καθορίζουν την ισχύ του υποκινητή, αλλά αυτό που επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητά του είναι μάλλον η γεωμετρία του, όπως για παράδειγμα η απόσταση μεταξύ των HSEs (Vazquez *et al.*, 1993).



Εικόνα 9. Ο HSF συντίθεται συνεχώς σε κανονικές συνθήκες και αποθηκεύεται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα.

Ο HSF συντίθεται συνεχώς σε κανονικές συνθήκες και αποθηκεύεται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή του μονομερή μορφή (Εικόνα 9). Η διατήρηση του HSF σε ανενεργή μορφή, επιτυγχάνεται τόσο μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο υδρόφοβων περιοχών του μορίου, όσο και μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια. Ο τριμερής HSF έχει βρεθεί δεσμευμένος με την HSP70 και με μία άλλη πρωτεΐνη, την HSBP1 (Heat Shock factor Binding Protein 1), οι οποίες φαίνεται ότι μπορεί να παίζουν ρόλο αρνητικού ρυθμιστή αναστέλλοντας τη δράση του. Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν και την HSP90 στη διαδικασία ενεργοποίησης και απενεργοποίησης του HSF (Bharadwaj *et al.*, 1999).

Με την αύξηση της θερμοκρασίας, ή υπό την επίδραση κάποιου άλλου στρεσογόνου παράγοντα, ο HSF ενεργοποιείται με υπερφωσφορυλίωση, μέσω μιας *ras*-εξαρτώμενης οδού μεταβίβασης σήματος, από κινάσες της οδού MAPK. Με τον τρόπο αυτό, ο HSF μεταπίπτει στη φωσφορυλιωμένη τριμερή ενεργό του μορφή και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου δεσμεύεται στα HSEs των υποκινητών των θερμοεπαγόμενων γονιδίων και επάγει την έκφρασή τους (Εικ. 8,9). Έτσι, αυξάνεται η συγκέντρωση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών στο κύτταρο. Από ένα σημείο και μετά όμως, μόρια των πρωτεϊνών αυτών εισέρχονται στον πυρήνα, αλληλεπιδρούν με τον HSF και αναστέλλουν τη δράση του, μεσολαβώντας στην αποδέσμευσή του από το DNA (Εικ. 9). Με τον τρόπο αυτό ο HSF μεταπίπτει πάλι στην ανενεργό μονομερή μορφή του και η μεταγραφή των θερμοεπαγόμενων γονιδίων σταματά (Morimoto,

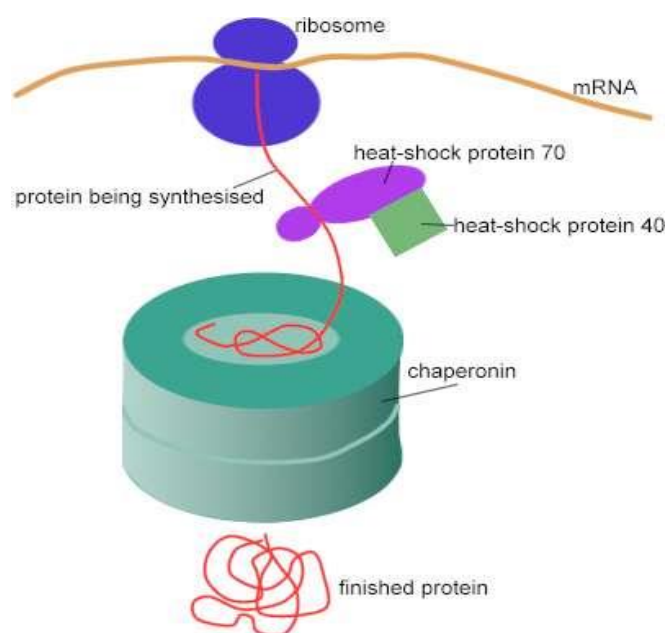
1998). Το γεγονός ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων ειδών (Becker and Craig, 1994), καθώς και το ότι οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες απαντώνται στα κύτταρα κάτω από ποικίλες συνθήκες, υποδηλώνουν τη σημασία των πρωτεϊνών αυτών. Η επαγωγή της έκφρασής τους κάτω από δυσμενείς συνθήκες, οι οποίες προκαλούν αλλοιώσεις (μετουσίωση) στις ανώτερες δομές των πρωτεϊνών, οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες προστατεύουν το κύτταρο από τις τοξικές επιδράσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

3.2. Πρωτεΐνες καταπόνησης ως μοριακοί συνοδοί

Οι πληροφορίες για την τελική τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών εμπεριέχονται μέσα στα γραμμικά πολυπεπίδια που συντίθενται από το mRNA στα ριβοσώματα. Η απόκτηση της τεταρτοταγούς δομής μπορεί να γίνεται χωρίς βοήθεια *in vitro*, όμως στα ζωντανά κύτταρα η κατάσταση είναι πιο πολύπλοκη. Το ενδοκυτταρικό περιβάλλον παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων μακρομορίων. Αυτό έχει ως συνέπεια να ευνοούνται διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, λόγω έκθεσης υδρόφοβων περιοχών και να τίθεται σε κίνδυνο η τελική σωστή διαμόρφωση ενός πολυπεπτιδίου. Προκειμένου τα κύτταρα να αποφύγουν τον κίνδυνο της συσσωμάτωσης και κατακρήμνισης των νέο συντιθέμενων πρωτεϊνών τους, έχουν αναπτύξει ένα σύνθετο σύστημα μοριακών συνοδών, το οποίο βοηθά στην αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων καθώς αυτά βγαίνουν από το ριβόσωμα. Οι μοριακοί συνοδοί δεσμεύονται πάνω στα νέο συντιθέμενα πολυπεπίδια, εμποδίζουν τη συσσωμάτωσή τους και σε μερικές περιπτώσεις βοηθούν ενεργά στην αναδίπλωσή τους (Morimoto, 1998)

Ως μοριακοί συνοδοί (molecular chaperones), ορίστηκαν από τον Hartl (1996), οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται και σταθεροποιούν ασταθείς, υπό άλλες συνθήκες, διαμορφώσεις άλλων πρωτεϊνών. Οι μοριακοί συνοδοί, μέσω ελεγχόμενης δέσμευσης και απελευθέρωσης των υποστρωμάτων τους, διευκολύνουν τη σωστή κατάληξή τους *in vivo*, είτε αυτή είναι η σωστή αναδίπλωσή τους, είτε η συγκρότηση συμπλόκων, είτε η μεταφορά τους σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα, είτε η αποδιάταξή τους. Λίγοι μοριακοί συνοδοί δρουν ως πραγματικοί καταλύτες αυξάνοντας την ταχύτητα-ρυθμό αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Οι περισσότεροι απλά παρέχουν στα υποστρώματά τους την ευκαιρία να αναδιπλωθούν σωστά, με ένα

μηχανισμό που αυξάνει την απόδοση, αλλά όχι το ρυθμό της σωστής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών (Hartl, 1996).



Εικόνα 10. Διάγραμμα το οποίο δείχνει το ρόλο των HSPs και μοριακών συνοδών κατά την πρωτεϊνική αναδίπλωση.

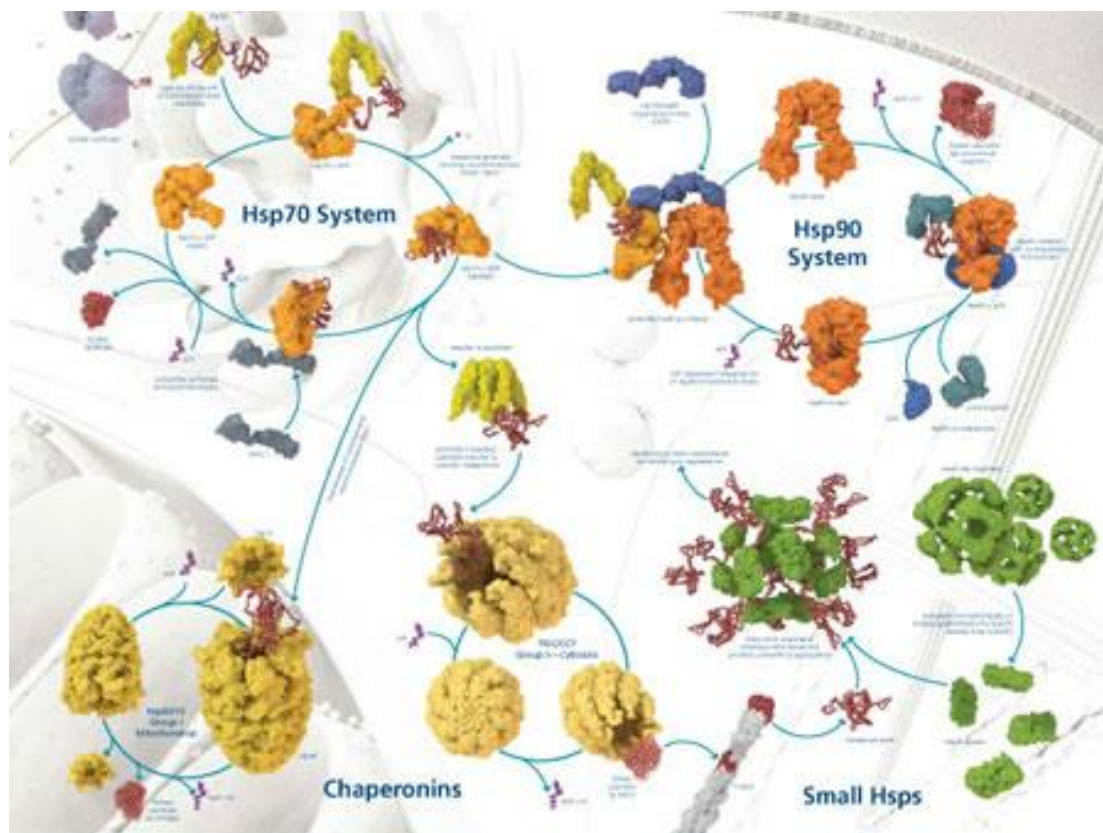
Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες κατατάσσονται στην οικογένεια των μοριακών συνοδών και είναι υπεύθυνες τόσο για τη διατήρηση των ανωτέρων δομών άλλων πρωτεϊνών, όσο και για τη σωστή διαμόρφωσή τους κατά τη βιοσύνθεσή τους και τη μεταφορά τους στα οργανίδια. Η δράση τους ως μοριακοί συνοδοί οφείλεται στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδέονται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών οι οποίες, είτε κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσής τους, είτε λόγω άλλων παραγόντων, βρίσκονται εκτεθειμένες (Ellis and van der Vies, 1991).

Λόγω της έλλειψης συγκεκριμένης ειδικής κυτταρικής λειτουργίας, κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, η οικογένεια των HSP90, διαφέρει από τους υπόλοιπους μοριακούς συνοδούς στο γεγονός ότι έχει ένα λιγότερο ενεργητικό ρόλο, αφού η παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό όλων των μοριακών συνοδών (Welch and Brown, 1996).

3.3. Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες είναι άφθονες στα κύτταρα. Το ποσοστό των πρωτεϊνών αυτών φτάνει έως και 5-10% των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων, ανάλογα με τη στρεσογόνο κατάστασή τους. Εντοπίζονται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και σε διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ταξινόμησή τους βασίζεται στο μοριακό τους βάρος: The Hsp110, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, and small Hsp families (Gething, 1997).

Στα έντομα υπάρχουν τέσσερις κύριες οικογένειες Heat-shock γονιδίων: η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (*sHsp*) μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 20-30 kDa, η οικογένεια *Hsp60* με μοριακό βάρος περίπου 60 kDa, η οικογένεια *Hsp70* με μοριακό βάρος περίπου 70 kDa και η οικογένεια *Hsp90* με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (Denlinger *et al.*, 2001).



Εικόνα 11. Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών.

3.3.1. Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών

Η οικογένεια των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (sHSPs) περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 15-40 kDa. Τα πρώτα μέλη της οικογένειας αυτής ανακαλύφθηκαν στη *D. melanogaster* (Southgate *et al.*, 1983) και από τότε μέχρι σήμερα πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί, από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τον άνθρωπο (De Jong *et al.*, 1998). Το βασικό χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των μελών της οικογένειας αυτής, είναι η ύπαρξη μιας περιοχής μήκους 100 περίπου αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο τους, η οποία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την α -κρυσταλλίνη, αν και υπάρχουν ορισμένα μέλη της οικογένειας στα οποία απουσιάζει τελείως αυτή η περιοχή (Praekelt and Meacock, 1990). Η ομολογία των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών με την α -κρυσταλλίνη αποτελούσε για αρκετά χρόνια αίνιγμα για τους ερευνητές, μέχρι που ανακαλύφθηκε ότι η σύνθεση της κρυσταλλίνης επάγεται από το θερμικό στρες και από άλλους παράγοντες, που επάγουν τη σύνθεση των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (Klemenz *et al.*, 1991).

Όλες οι πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής, με εξαίρεση την Hsp12.6 του *C. elegans* (Leroux *et al.*, 1997), απαντώνται με την μορφή πολυμερών. Τα πολυμερή αυτά συγκροτούνται από 9 ως 40 μονομερή, ανάλογα με τον οργανισμό και έχουν μοριακό βάρος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 149 και 800 kDa (Smulders *et al.*, 1998). Το ακραίο καρβοξυτελικό τμήμα των sHSPs φαίνεται να είναι σημαντικό για την δράση τους ως μοριακοί συνοδοί καθώς μεταλλαγμένες μορφές που στερούνται της περιοχής αυτής παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα. Ο ρόλος του αμινοτελικού τμήματος των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι ξεκάθαρος αλλά πιστεύεται ότι συμμετέχει στον σχηματισμό πολυμερών και στη δέσμευση των υδρόφοβων περιοχών πρωτεϊνών που δεν έχουν την κανονική τους διαμόρφωση (Smulders *et al.*, 1998).

3.3.2. Η οικογένεια HSP70

Η οικογένεια HSP70 αποτελεί την καλύτερα ίσως μελετημένη ομάδα των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών αποτελούν πολυγονιδιακές οικογένειες των οποίων τα διάφορα μέλη εκφράζονται είτε σε φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε συνθήκες στρες. Τα επαγόμενα γονίδια της οικογένειας αυτής έχουν αποτελέσει μοντέλα γονιδιακής ρύθμισης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Wu *et al.*, 2001). Μέλη της οικογένειας

HSP70 έχουν βρεθεί σε όλους τους οργανισμούς και θεωρούνται από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες στη φύση.

3.3.3. Η οικογένεια HSP90

Τα μέλη της οικογένειας αυτής συνιστούν τα πλέον άφθονα και συντηρημένα μόρια των θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά μέλη της οικογένειας είναι η HtpG της *E. coli*, η HSP83 πρωτεΐνη της *D. melanogaster*, η HSP90 του σακχαρομούκητα και η ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη, GRP94 πρωτεΐνη που απαντάται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των θηλαστικών (Bardwell and Craig, 1987; Sorger and Pelham, 1987). Οι μέχρι σήμερα καλά τεκμηριωμένες αλληλεπιδράσεις των μελών της οικογένειας αυτής με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και άλλα ρυθμιστικά μόρια δεν επαρκούν για να εξηγήσουν ούτε την αφθονία τους, αλλά ούτε και την παρουσία τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στους χλωροπλάστες, όπου δεν έχουν ταυτοποιηθεί τα πιθανά υποστρώματά τους.

Στα μέσα της δεκαετίας του '80, διάφορες ερευνητικές ομάδες βρήκαν ότι τα σύμπλοκα των στεροειδών υποδοχέων που προσπαθούσαν να απομονώσουν, περιείχαν μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 90 kDa (Renoir *et al.*, 1984), η οποία λίγο αργότερα βρέθηκε να είναι η θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη HSP90 (Schuh *et al.*, 1985). Η κυτταροπλασματική HSP90, αν και θερμοεπαγόμενη, είναι από τις πλέον άφθονες πρωτεΐνες στα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες και φτάνουν το 1-2% των συνολικών πρωτεϊνών (Morimoto, 1998). Αυτή η αφθονία καθώς και το γεγονός ότι στους περισσότερους οργανισμούς είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητά τους, υποδηλώνουν το σημαντικό βιολογικό ρόλο αυτής της πρωτεΐνης. Εκτός όμως από το κυτταρόπλασμα, όπου η HSP90 βρίσκεται σε δύο ισομορφές, ομόλογες πρωτεΐνες υπάρχουν και σε υποκυτταρικά οργανίδια, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (Grp94/Grp96) (Sorger and Pelham, 1987) και τα μιτοχόνδρια (Trap1 ή Hsp75) (Felts *et al.*, 2000). Στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, έχουν βρεθεί 4 κυτταροπλασματικές ισομορφές της HSP90 και από μία σε ενδοπλασματικό δίκτυο, μιτοχόνδρια και πλαστίδια. Τελευταία, βρέθηκε μία ακόμα κυτταροπλασματική ισομορφή, η HSP90N, σε ινοβλάστες αρουραίου (Grammatikakis *et al.*, 2002).

3.4. Πρωτεΐνες καταπόνησης και ο ρόλος τους στη διάπαυση των εντόμων

Για τα περισσότερα έντομα, η μικρής διάρκειας ημέρα προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης, τη διάπαυση, που εμφανίζει ένα ενδιαφέρον πρότυπο έκφρασης γονιδίων. (Tauber *et al*, 1986; Danks, 1987; Denlinger *et al*, 2005). Ενώ πολλά γονίδια δεν εκφράζονται, ένας αριθμός γονιδίων εκφράζεται (Flanagan *et al.*, 1998). Μεταξύ των γονιδίων τα οποία υπερεκφράζονται κατά τη διάπαυση είναι αρκετά, αλλά όχι όλα, τα γονίδια που κωδικοποιούν θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Rinehart & Denlinger, 2000; Rinehart *et al.*, 2000).

Οι θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες φαίνεται ότι παίζουν ένα καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της διάπαυση των εντόμων (Yocum *et al*, 1998; Rinehart και Denlinger, 2000). Η διάπαυση των εντόμων είναι μια δυναμική διαδικασία που αποτελείται από πολλές διαδοχικές φάσεις. Διάπαυση είναι η ενδογενής και κεντρικά ελεγχόμενη αναστολή που δρομολογεί την αναπτυξιακή διαδικασία προς την άμεση μορφογένεση, με ένα εναλλακτικό πρόγραμμα ανάπτυξης. Η έναρξη της διάπαυσης έπεται συνήθως της έλευσης αντίξοων συνθηκών και το τέλος της, δεν συμπίπτει απαραίτητως με το τέλος των αντιξοοτήτων (Danks, 1987; Kostal, 2006). Η διάπαυση αντιπροσωπεύει μία εναλλακτική οδό εξέλιξης, που προκύπτει από μοναδικά πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης. Τα γονίδια που κωδικοποιούν ορισμένες θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες, όπως είναι οι Hsp23 και Hsp 70, είναι εξαιρετικά υπερεκφραζόμενες κατά διάπαυση, ενώ άλλες, είναι είτε ανεπηρέαστες (Hsc70) είτε υπο-εκφραζόμενες (Hsp90) (Denlinger *et al.*, 2001).

Η λειτουργία της μακροπρόθεσμης αναπτυξιακής αλλαγής που συνδέεται με τη διάπαυση, είναι ασαφής. Οι Yocum *et al.*, (1998) πρότειναν ότι Hsps παραμένουν για μακρά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της διάπαυση και αυτό είναι πολύ ενδιαφέρον, γιατί η παρατεταμένη έκφραση των Hsps, μπορεί να οδηγήσει σε επιβλαβείς επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων της επιβράδυνσης και διακοπής της ανάπτυξης (Feder *et al.*, 1992).

i. Οι μικρές θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες

Η Hsp23 υπερεκφράζεται με την εισαγωγή εντόμων σε διάπαυση. Ούτε ψυχρό, ούτε θερμό σοκ κατά τη διάρκεια της διάπαυσης ανεβάζουν τα επίπεδα της έκφρασης της, δηλαδή η Hsp23 υπερεκφράζεται αναπτυξιακά κατά τη διάρκεια της διάπαυσης (Narberhaus, 2002). Η έκφραση της Hsp23 σε διαφορετικούς ιστούς δεν είναι

ομοιόμορφη κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σημειώνονται στον εγκέφαλο και τα επιδερμικά κύτταρα, και μικρότερα στο λίπος. Μελέτες με κύτταρα της *Drosophila* έδειξαν καλή συσχέτιση μεταξύ μείωσης κυτταρικού κύκλου και έκφρασης των smHSPs. Ένας κυτταρικός κύκλος ελαττώνεται σε καλλιέργεια κυττάρων και διαφέρει από την ελάττωση ανάπτυξης που παρατηρείται σε όλο τον οργανισμό, όταν ο κυτταρικός κύκλος ελαττώνεται στη διάπαυση (Sun and MacRae, 2005).

Υπάρχουν ενδείξεις από μη διαπαυσιακά στάδια αρκετών ειδών εντόμων, όπως είναι η *Drosophila melanogaster*, *Sarcophaga crassipalpis* και *Culicoides sonorensis*, ότι ένα ψυχρό σοκ μπορεί να επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών καταπόνησης. Σ' αυτά τα παραδείγματα, οι πρωτεΐνες καταπόνησης δεν δημιουργούνται κατά τη διάρκεια του ψυχρού σοκ αλλά αμέσως μετά, αφού το έντομο επανέλθει σε πιο κανονική θερμοκρασία (Feder and Hofmann, 1999; Hayward *et al.*, 2004). Ισχύει το ίδιο και για έντομα που μπαίνουν σε διάπαυση; Όπως αναφέραμε ήδη, τα γονίδια *Hsp23* και *Hsp70* επάγονται ισχυρά με την είσοδο στη διάπαυση και το υψηλό επίπεδο της έκφρασης παραμένει σε όλο το στάδιο της διάπαυσης. Αντίθετα, τα *Hsc70* και *Hsp90*, τα δύο θερμοεπαγόμενα γονίδια που χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση στη διάρκεια της διάπαυσης, επάγονται εάν υποστούν ψυχρό σοκ στη διάρκεια της διάπαυσης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχει συγχρονισμός στη απόκριση των πρωτεϊνών καταπόνησης κατά τη διάρκεια της διάπαυσης και της απόκρισης στις χαμηλές θερμοκρασίες. Κύρια γονίδια, όπως τα *Hsp23* και *Hsp70*, εκφράζονται σαν μια λειτουργία του προγράμματος της διάπαυσης και δεν δείχνουν άλλη θερμοκρασιακή ρύθμιση, ενώ άλλα, όπως τα *Hsc70* και *Hsp90* επάγονται στη διάρκεια της διάπαυσης, μόνο αν το έντομο υποστεί ψυχρό σοκ. Η ενεργοποίηση του *Hsp23* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης οδηγεί σε μια αποτίμηση επιπρόσθετων θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών, οι περισσότερες των οποίων είναι υψηλά συντηρημένες και ανήκουν στην οικογένεια 70-kDa. Το επίπεδο έκφρασης αλλάζει ανάλογα με τον ιστό, αλλά και για τις δύο, μεγαλύτερη έκφραση εμφανίζεται στον εγκέφαλο και ακολούθως στην επιδερμίδα, ενώ πολύ μικρή στο λίπος (Yocum *et al.*, 1998; Rinehart and Denlinger, 2000).

Ποιός ακριβώς είναι ο ρόλος των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών κατά τη διάπαυση, δεν είναι ακόμα γνωστό. Προτείνονται δύο λειτουργίες τους. Πρώτον, η παρουσία της προσφέρει ένα προστατευτικό ρόλο απέναντι στο ψύχος για τα

έντομα. Κατά τη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών, στο δύσκολο διάστημα του χειμώνα, οι πρωτεΐνες αυτές βοηθούν στη διάσωση της ακεραιότητας των απαραίτητων πρωτεϊνών, για την κυτταρική λειτουργία στη διάρκεια του χρόνου καταπόνησης. Δεύτερον, η παρουσία τους ίσως βοηθάει την εξασφάλιση της ανάπτυξης. Οι αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι έχουμε χαμηλότερη ανάπτυξη όταν υπάρχουν πρωτεΐνες καταπόνησης. Η παρουσία τους κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, συμβάλλει σε ένα μηχανισμό που θα σταματήσει αποτελεσματικά η ανάπτυξη κατά το χρόνο αυτό (Goto and Kimura, 2004; Tachibana *et al.*, 2005; Sonoda *et al.*, 2006). Οι sHsps ίσως εξασφαλίζουν ένα ψυχρό-προστατευτικό ρόλο. Σαν μοριακοί συνοδοί, οι sHsps υπεισέρχονται στον κύριο μεταβολισμό των ενζύμων ή στη δομή των πρωτεϊνών στη διάρκεια των χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα. Εναλλακτικά, οι sHsps ίσως συμβάλουν άμεσα στη ρύθμιση της διάπαυσης, εξασφαλίζοντας ένα συγκρατημένο κυτταρικό κύκλο, ο οποίος συνδέεται με την έκφραση τους (Feder and Hofmann, 1999; Hayward *et al.*, 2004).

Οι sHsps έχουν μελετηθεί σε έντομα, όπως η *Drosophila triaurana* και *D. melanogaster* (Goto *et al.*, 1998; Goto και Kimura 2004; Ingolia και Craig, 1982; Frydenberg *et al.*, 2003), η σαρκοφάγα μύγα *Sarcophaga crassipalpis* (Yocum *et al.*, 1998), η ενδοπαρασιτική σφήκα, *Venturia canescens* (Reineke, 2005), η *Tigriopus japonicus* (Seo *et al.*, 2006), το σκαθάρι των φύλλων, *Gastrophysa atrocyanea* (Atungulu *et al.*, 2006) και ο μεταξοσκώληκα, *Bombyx mori* (Sakano *et al.*, 2006). Η υπερ-έκφραση των sHsps φαίνεται να είναι κοινή κατά τη διάπαυση σε είδη που αντιπροσωπεύουν ποικίλες κατηγορίες εντόμων, συμπεριλαμβανομένων των Διπτέρων, Λεπιδόπτερων, Κολεόπτερων, Υμενόπτερων και καθώς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (έμβρυο, προνύμφη, νύμφη, ενήλικο) (Rinehart *et al.*, 2007). Σε αντίθεση, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι αυτό δεν είναι κοινό σε όλα τα είδη εντόμων που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα (Goto και Kimura, 2004; Tachibana *et al.*, 2005; Sononda *et al.*, 2006). Παραμένει έτσι το ερώτημα, ποιά είναι η λειτουργία που εξυπηρετούν οι sHsps κατά τη διάρκεια της διάπαυσης;

ii. Η θερμοεπαγόμενη Hsp70

Υπάρχει σύνδεση των πρωτεϊνών καταπόνησης με τη διάπαυση των εντόμων. Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την Hsp70 επάγεται κατά τη διάπαυση. Στη *Drosophila melanogaster*, οι Hsp70 πρωτεΐνες είναι κυρίως υπεύθυνες για την αντοχή του οργανισμού σε ακραίες θερμοκρασίες (40-42°C). Ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες

δεν ανιχνεύεται έκφραση τους, η επαγωγή τους αυξάνει κατά 1000 φορές μετά από θερμική καταπόνηση (Gupta and Golding, 1993; Boorstein *et al.*, 1994). Σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές της *Drosophila*, υπερ-έκφραση του γονιδίου *hsp70* προκαλεί ταχύτερη συσσώρευση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, σε σχέση με τον άγριο τύπο και ταχύτερη προσαρμογή σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης. Αντίθετα, η καταστολή παραγωγής HSP70 πρωτεϊνών με την τεχνική της έκφρασης αντιπληροφοριακού mRNA (anti-sense) σε διαγονιδιακά έντομα, είχε σαν αποτέλεσμα την υπερ-έκφραση των άλλων HSPS πρωτεϊνών στους 37 °C. Το γεγονός αυτό φανερώνει την σπουδαιότητα του ρόλου των HSP70 πρωτεϊνών, στη ρύθμιση της απόκρισης στη θερμική καταπόνηση. Η έκφραση των γονιδίων *hsp70* στους 25 °C, με τη χρήση ετερόλογου προαγωγέα, εξασφαλίζει ανθεκτικότητα μετά από άμεση έκθεση στους 42 °C. Στη συνέχεια όμως παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης της κυτταρικής σειράς. Η παύση αυτή συνοδεύεται από το σχηματισμό κοκκίων, που απομακρύνουν τις HSP70 πρωτεΐνες. Σε κύτταρα αγρίου τύπου της *Drosophila* παρατηρήθηκε η εμφάνιση παρόμοιων κοκκίων 12 ώρες μετά το θερμικό σοκ. Η εμφάνιση αυτών των κοκκίων συνοδεύεται από απώλεια της θερμοανθεκτικότητας. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι θερμοεπαγόμενες HSP70 πρωτεΐνες, παρά το γεγονός ότι είναι απαραίτητες για την επιβίωση του οργανισμού κατά τη διάρκεια της θερμικής καταπόνησης, η επαγωγή τους είναι επιζήμια για την κυτταρική διαίρεση και την ανάπτυξη (Hunt and Calderwood 1990).

Οι HSP70 είναι ιδιαίτερα συντηρημένες πρωτεΐνες. Παρ' όλο που τα γονίδια *hsp70* αναγνωρίστηκαν εξαιτίας της επαγωγής τους από θερμικό σοκ, εντούτοις πολλά μέλη της οικογενείας αυτής εκφράζονται συνέχεια κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Ο εντοπισμός τους σε διάφορα υπο-κυτταρικά διαμερίσματα υπέβαλλε το διαχωρισμό τους σε τρεις ξεχωριστές ομάδες: α. σε αυτές που εντοπίζονται σε κυτταρικά οργανίδια, όπως χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια. β. Σε αυτές που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και υποδιαιρούνται σε δύο υπό-ομάδες: Στις HSP70 πρωτεΐνες, η έκφραση των οποίων επάγεται από διάφορες μορφές καταπόνησης (θερμική καταπόνηση, βαρεία μέταλλα, έκθεση στο κρύο και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων) και στις HSP70 που εκφράζονται συνέχεια σε φυσιολογικές συνθήκες. γ. Σε αυτές που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, δηλαδή στις GRP78 (πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από γλυκόζη) ή τις BiP (πρωτεΐνες που δεσμεύουν άλλες πρωτεΐνες). Η οικογένεια αυτή των HSP70, ανήκει στις πιο συντηρημένες οικογένειες

πρωτεϊνών που είναι γνωστές μέχρι σήμερα. (Kiang and Tsokos, 1998; Hung *et al.*, 1998).

Η σχέση μεταξύ διάπαυσης και Hsp70 έχει μελετηθεί σε διάφορα έντομα. Οι Hsp70 βρέθηκαν να επάγονται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης σε έναν αριθμό ειδών. Στη διάπαυση του ακμαίου στις μύγα, *Sarcophaga crassipalpis* (Rinehart *et al.*, 2000) και στο σκαθάρι της πατάτας *Leptinotarsa decemlineata* (Yocum, 2001). Στη νυμφική διάπαυση της μέλισσας, *Megachile rotundata* (Yocum *et al.*, 2005) και στη *Delia Antiqua* (Chen *et al.*, 2006). Στην προνυμφική διάπαυση του λεπιδόπτερου του ρυζιού *Chilo suppressalis* (Sononda *et al.*, 2006), και στην εμβρυϊκή διάπαυση του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Hwang *et al.*, 2005). Ωστόσο, περιορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει στην έκφραση της Hsc70 κατά τη διάρκεια της διάπαυσης των εντόμων.

iii. Η θερμοεπαγόμενη Hsp90

Η αυξομείωση των Hsp90 σαν απόκριση σε θερμικό σοκ, δεν είναι τόσο ισχυρή όσο για άλλες θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται μία αύξηση 10-15πλάσια σε σχέση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης (Arbona *et al.*, 1993). Οι Hsp90 φαίνεται να έχουν μια συγκεκριμένη λειτουργία κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης από το στρες, που είναι ιδιαίτερα σημαντική για την επανα-ενεργοποίηση της αδρανοποιημένης πρωτεΐνης (Nathan *et al.*, 1997). Τα γονίδια *Hsp90* διακρίνονται από άλλους μοριακούς συνοδούς. Οι περισσότερες είναι γνωστά υποστρώματα μεταγωγή σήματος πρωτεϊνών, με τα κλασικά παραδείγματα να είναι υποδοχείς στεροειδούς ορμόνης και σηματοδότησης κινάσης (Picard *et al.*, 1990; Xu & Lindquist, 1993). Τα γονίδια *Hsp90* αλληλεπιδρούν με υποδοχείς στεροειδούς ορμόνης, για να διευκολύνουν την ενεργοποίηση του υποδοχέα από στεροειδή, και για την πρόληψη της μεταγραφικής ενεργοποίησης, απουσία στεροειδούς (Craig *et al.*, 1993; Hendrick & Hartl, 1993). Επιπλέον, τα γονίδια *hsp90* στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρούν με ένα εύρος co-chaperons πρωτεϊνών, που συγκροτούνται σε ένα πολυ-chaperone σύμπλοκο (Young *et al.*, 2001). Η τελική περιοχή 25 kDa NH₂ της Hsp90 είναι ιδιαίτερα συντηρημένη είναι η θέση δέσμευσης για ATP (Whitesell *et al.*, 1994).

Η συντηρημένη οικογένεια μοριακών συνοδών Hsp90, περιλαμβάνει την Hsp90a και b στον άνθρωπο, Hsp86 και Hsp82 σε ποντικούς, Hsp83 στη *Drosophila* και Hsc82 και Hsp82 σε ζυμομύκητες (Young *et al.*, 2001). Στην *Drosophila melanogaster* και τα περισσότερα άλλα έντομα, οι πρωτεΐνες Hsp90 πρωτεΐνες έχουν μέγεθος περίπου 83 kDa (Blackman & Meselson, 1986).

Σε αντίθεση με τα Hsp90 των σπονδυλωτών, τα γονίδια Hsp90 για όλα τα έντομα που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, παρουσιάζουν ένα μόνο αντίγραφο, εκτός του *Anopheles albimanus*, το οποίο εμφανίζει δύο (Benedict *et al.*, 1996).

Τα γονίδια Hsp90 εμπλέκονται επίσης στην αναπτυξιακή ρύθμιση, όπως είναι η μορφολογική εξέλιξη της αναπαραγωγής στη *Drosophila* (Rutheford & Lindquist, 1998), κατά το στάδιο της διάπαυσης (Dauer) του *Caenorhabditis elegans* (Dalley & Golomb, 1992), και κατά την διάπαυση του *Chilo suppressalis* και *Dellia Antiqua* (Chen *et al.*, 2005; Sononda *et al.*, 2006). Μελέτες στη *D. triauraria* και τη *Lucillia sericata*, δεν έχουν δώσει αποδείξεις για τη συμμετοχή της Hsp90 στη διάπαυση (Goto & Kimura, 2004; Tachibana *et al.*, 2005), ενώ σε μελέτες της *Sarcophaga crassipalpis*, τα μετάγραφα της Hsp90 υποεκφράζονται κατά διάπαυση (Rinehart & Denlinger, 2000). Αυτή η ασυμφωνία πρέπει να διευκρινιστεί με τη χρήση πρόσθετων είδη εντόμων και διαφορετικών μορφών διάπαυσης.

4. ΤΟ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΟ *SESAMIA NONAGRIOIDES*

4.1. Τα έντομα και η σημασία τους

Τα έντομα αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα του ζωικού βασιλείου αριθμώντας περισσότερα από ένα εκατομμύριο είδη, ενώ άγνωστος παραμένει ο συνολικός τους αριθμός αφού πιστεύεται ότι χιλιάδες είδη δεν έχουν ακόμα καταγραφεί και ταξινομηθεί. Αποτελούν ομοταξία των αρθροπόδων και αντιπρόσωποι αυτών απαντώνται σε όλα σχεδόν τα μήκη και πλάτη της γης. Η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί από τα υδάτινα οικοσυστήματα και τα τροπικά δάση, μέχρι τις ξηρότερες έρημους, τους πόλους, ακόμη και σε δεξαμενές πετρελαίου (Grzimek, 1975).

Στα έντομα ανήκουν είδη με τεράστια ετερογένεια, όχι μόνο ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, αλλά και ως προς τη βιολογία τους. Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των εντόμων αποτελεί η ετερογενής μεταμέρεια του σώματός τους, το οποίο χωρίζεται σε κεφαλή, θώρακα και κοιλία. Από αυτή τη χαρακτηριστική τμηματοποίηση του σώματός τους προέρχεται και η ονομασία τους (έντομο = τετμημένο). Ανάλογα με τις μορφολογικές αλλαγές που υφίστανται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα έντομα διακρίνονται σε αμετάβολα, ημιμετάβολα και ολομετάβολα. Στις δύο πρώτες ομάδες ανήκουν έντομα στα οποία η προνύμφη και το ενήλικο άτομο έχουν μικρές διαφορές, ενώ στα ολομετάβολα ανήκουν έντομα τα οποία υφίστανται πλήρη μεταμόρφωση κατά την ανάπτυξή τους. Υπάρχει δηλαδή σαφής διαφοροποίηση των ατόμων κατά τη μετάβαση από προνύμφη σε νύμφη και τελικά στο ενήλικο άτομο.

Αρκετά είδη εντόμων είναι υπεύθυνα για πολλά προβλήματα που αφορούν στην υγεία του ανθρώπου και των ζώων, καθώς και στην αγροτική οικονομία. Παρά την εκτεταμένη χρήση χημικών και εντομοκτόνων, ολοένα και περισσότεροι άνθρωποι υποφέρουν από ασθένειες που μεταδίδονται από έντομα και όλο και μεγαλύτερες είναι οι απώλειες στην παγκόσμια γεωργία λόγω της αύξησης και εξάπλωσης των πληθυσμών των επιβλαβών εντόμων. Είναι απολύτως βέβαιο όμως, ότι χωρίς τα έντομα δε θα μπορούσαμε να υπάρξουμε. Τα έντομα αποτελούν σημαντικό κρίκο κάθε οικοσυστήματος και συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η γονιμοποίηση πολλών φυτών, η αποικοδόμηση οργανικών υλών, ο έλεγχος των πληθυσμών επιβλαβών ασπόνδυλων οργανισμών και η παραγωγή συγκεκριμένων

τροφών (π.χ. μέλι), αλλά και πρώτων υλών (π.χ. μετάξι και βερνίκι), τις οποίες εκμεταλλεύεται ο άνθρωπος. Είναι συνεπώς εμφανές ότι η σημασία των εντόμων στην οικολογία, στην οικονομία αλλά και στην υγεία είναι μεγάλη. Τα έντομα έχουν συγκεντρώσει από παλιά το ενδιαφέρον των επιστημόνων, κυρίως γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα βιολογικών συστημάτων, κατάλληλα για τη μελέτη πολλών βασικών βιολογικών φαινομένων. Το καλύτερα μελετημένο έντομο είναι η *D. melanogaster*, η μελέτη της οποίας έχει συμβάλλει σημαντικά στην πρόοδο της Γενετικής και της Αναπτυξιακής και Μοριακής Βιολογίας. Η μελέτη των βιολογικών συστημάτων στα έντομα βοηθάει όχι μόνο στο να απαντηθούν βασικά ερωτήματα της βιολογίας, αλλά και στην ανάπτυξη βιολογικών μεθόδων ελέγχου των επιβλαβών εντόμων και στη βελτίωση της παραγωγής ή των προϊόντων εκείνων που είναι ωφέλημα για τον άνθρωπο.

4.2. TO ENTOMO *SESAMIA NONAGRIOIDES*

4.2.1. Ταξινόμηση του εντόμου *Sesamia nonagrioides*

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

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

Στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά του εντόμου γίνεται από τον Σ. Καλογερέα (1930) σε κατάλογο εντόμων, τα οποία συνέλεξε κατά το διάστημα 1924-1927 στη Λάρισα. Ενδεχομένως το είδος να υπήρχε προηγουμένως, αφού ο Rebel (1916) αναφέρει ότι το είδος *S. cretica* βρέθηκε στην Κρήτη από τον συλλέκτη Frivaldskys, που από τον Freyer θεωρήθηκε ότι επρόκειτο για το είδος *S. hesperica* Rbr., συνώνυμο του είδους *S. nonagrioides*. Οι Rossi & Turati (1934) αναφέρουν την ύπαρξη του γένους και στην Ελλάδα, χωρίς ωστόσο να καταγράφουν συγκεκριμένες περιοχές που απαντά. Το 1939 ο Ισαακίδης σε κατάλογο εντόμων αναφέρει την ύπαρξη άλλου είδους του ίδιου γένους και συγκεκριμένα την *S. cretica*. Αναφορά του *S. cretica* γίνεται επίσης από τον Πελεκάση το 1962, σε αντίστοιχο κατάλογο εντόμων της περιόδου 1932-1962, χωρίς να αναφέρεται η ύπαρξη του *S. nonagrioides*. Ο Σταυράκης το 1967 ανέφερε ότι ο κυριότερος εχθρός του αραβόσιτου είναι το είδος *S. nonagrioides*, καταγράφοντας ωστόσο και την ύπαρξη του *S. cretica*. Τελευταία στην Ελλάδα δεν έχει αναφερθεί το είδος *S. cretica*. Όλες οι ερευνητικές εργασίες αναφέρονται στο *S. nonagrioides*.



Εικόνα 12. Το έντομο *S. nonagrioides*.

4.2.2. Κύκλος ζωής του εντόμου *S. nonagrioides*

Τα ακμαία του *S. nonagrioides* απελευθερώνονται από τα περιβλήματά τους αργά τον Μάρτιο έως νωρίς τον Μάιο και αποθέτουν τα ωά τους στον κολεό των φύλλων του καλαμποκιού. Οι νεοσχηματισθέντες προνύμφες ανοίγουν στοές στον βλαστό από τον οποίο και τρέφονται μέχρι το 5^ο ή 6^ο προνυμφικό στάδιο. Στο στάδιο αυτό ξεκινά η διαδικασία της μεταβολής τους σε νύμφες. Το είδος αυτό παράγει 2-4 γενεές το χρόνο και όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες το επιτρέψουν (ελάττωση της φωτοπεριόδου τον Αύγουστο), εισέρχονται σε διάπαυση (Eizaguire *et al.*, 1994; Fantinou *et al.*, 1996).



Εικόνα 13. Το θηλυκό μια μέρα μετά τη σύζευξη γεννά 5-500 αυγά. Το στάδιο των αυγών διαρκεί 7 ημέρες.



Εικόνα 14. Η προνύμφη (30-35mm) διανύει 6 προνυμφικά στάδια μέσα στο στέλεχος του ,στο κολεό του φύλλου. Το στάδιο διαρκεί μέχρι 30 ημέρες.



Εικόνα 15. Η νύμφη (20mm) περιβάλλεται από νήματα και απορρίμματα της προνύμφης. Το στάδιο διαρκεί 10 ημέρες.



Εικόνα 16. Το ακμαίο, σπάζοντας τους ιστούς εξέρχεται από τη στοά. Το στάδιο ζωής του ακμαίου είναι 2 ημέρες. Αριστερά: θηλυκό και δεξιά αρσενικό άτομο.

4.2.3. Η διάπαυση του εντόμου *S. nonagrioides*

Η διάπαυση εμφανίζεται στις προνύμφες (προνυμφική διάπαυση) όταν η έκθεση σε μικρή φωτοπερίοδο ξεκινήσει κοντά στο 3^ο προνυμφικό στάδιο. Πολλές φορές η διάπαυση μπορεί να εμφανισθεί και στο στάδιο της νύμφης, όταν η έκθεση σε μικρή φωτοπερίοδο ξεκινήσει μετά το τέταρτο προνυμφικό στάδιο (Eizaguire *et al.*, 1994).

Η σειρά των αναπτυξιακών σταδίων που ακολουθούν όλες προνύμφες, είτε αυτές είναι μεγάλης είτε βραχείας ημέρας, είναι πανομοιότυπη μέχρι το 6^ο προνυμφικό στάδιο (Eizaguire *et al.*, 1994; Fantinou *et al.*, 1996). Αφού έχουν εισέλθει σε διάπαυση, οι προνύμφες συνεχίζουν και τρέφονται από τους βλαστούς του καλαμποκιού, με χαμηλότερους ρυθμούς, ενώ εμφανίζουν κάποιον αριθμό

εκδύσεων, αυξάνοντας με αξιοσημείωτη πρόοδο το βάρος και το μέγεθός τους (Eizaguirre *et al.*, 1994). Στον αγρό οι προνύμφες εμφανίζουν συνήθως 2-4 εκδύσεις, αλλά κάτω υπό εργαστηριακές συνθήκες μπορεί να εμφανίσουν πάνω από 12 (Eizaguirre *et al.*, 2005). Η διάπαυση μπορεί να τερματιστεί οποτεδήποτε, αρκεί το έντομο να μεταφερθεί σε συνθήκες μεγάλης ημέρας (μακρά φωτοπερίοδο). Η διάπαυση στον αγρό μπορεί να συνεχιστεί μέχρι τις αρχές του Φεβρουαρίου, όπου οι προνύμφες είναι έτοιμες να γίνουν νύμφες, ύστερα από την κατάλληλη άνοδο της θερμοκρασίας (Lopez *et al.*, 1995). Οι διαπαύουσες προνύμφες του εντόμου *S. nonagrioides*, εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση των JHs

Η προνυμφική διάπαυση στο είδος *S. nonagrioides* εξαρτάται από τη φωτοπερίοδο. Σε εργαστηριακές συνθήκες, κριτήριο για τη διάπαυση του εντόμου αποτελεί η αποτυχία νύμφωσης σε εύλογο χρονικό διάστημα, το οποίο εξαρτάται από τη θερμοκρασία που απαιτείται για την ανάπτυξη των ατόμων, από την ημέρα εκκόλαψης μέχρι την μεταμόρφωση της προνύμφης σε νύμφη, κάτω από συνθήκες που δεν προκαλούν διάπαυση. Προνύμφες που εκτίθενται σε διάφορες φωτοπεριόδους 24 ωρου κύκλου στους 25°C και αποτυγχάνουν να νυμφωθούν την 60η ημέρα από την εκκόλαψη τους, θεωρείται ότι έχουν εισέλθει σε διάπαυση. Φωτοφάσεις από 6 έως 14 ώρες και σκοτοφάσεις αντίστοιχα από 18 έως 8 ώρες προκαλούν διάπαυση, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό πρόκλησης διάπαυσης (100%) εμφανίζεται όταν οι προνύμφες εκτεθούν σε συνθήκες Φ:Σ, 10:14. Οι προνύμφες που εκτίθενται σε φωτοπερίοδο που προκαλεί διάπαυση (Φ:Σ, 10:14) πραγματοποιούν επιπλέον εκδύσεις, και παρουσιάζουν αυξημένο βάρος κεφαλικής κάψας. Μείωση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με τη φωτοπερίοδο αυξάνει σημαντικά το ποσοστό της διάπαυσης (Fantinou *et al.*, 1996). Φωτεινές διακοπές μιας ή δύο ωρών στη διάρκεια της σκοτόφασης του φωτοπεριοδικού κύκλου Φ:Σ, 10:14, έδειξε ότι η πρόκληση διάπαυσης μπορεί να αποφευχθεί ανάλογα με τη διάρκεια της φωτεινής διακοπής και τη χρονική εφαρμογή της. Η πρόκληση της διάπαυσης στο έντομο αυτό μπορεί να αναιρεθεί με φωτεινές διακοπές μεγάλης σχετικής διάρκειας. Το ποσοστό διάπαυσης είναι μεγαλύτερο όταν οι προνύμφες εκτίθενται σε συνθήκες διάπαυσης στα τελευταία προνυμφικά υποστάδια. Δεν υπάρχει αυστηρά «κρίσιμο» υποστάδιο (ευαίσθητο) για την είσοδο στη διάπαυση του εντόμου αυτού και η επίδραση της φωτοπεριόδου είναι αθροιστική. Η διάπαυση στο έντομο *S. nonagrioides* μπορεί να περατωθεί με αλλαγή της φωτοπεριόδου. Μεταφορά διαπαυόντων ατόμων από μικρή

σε διάρκεια φωτόφαση σε μεγάλη, ολοκληρώνει σε σύντομο χρονικό διάστημα τη διάπαυση και επισπεύδει τη νύμφωση (Fantinou *et al.*,1996).

Στη φύση, η πρόκληση της διάπαυσης επιτυγχάνεται νωρίς τον Αύγουστο και η περάτωση πραγματοποιείται τον Ιανουάριο. Διαπαύουσες στη φύση προνύμφες μεταφερόμενες σε εργαστηριακές συνθήκες σε δύο φωτοπεριοδικές συνθήκες (Φ:Σ, 16:8, 10:14), νυμφώνονται σταδιακά ολοκληρώνοντας τη διάπαυση, χωρίς να εκτεθούν σε ψύχος. Η περάτωση της διάπαυσης είναι βραχύτερη σε προνύμφες που εκτίθενται σε φωτοπερίοδο ανάπτυξης, σε σχέση με εκείνες που εκτίθενται σε φωτοπερίοδο διάπαυσης. Οι μεγάλες ημέρες στη φύση προκαλούν την περάτωση των προνυμφών, αλλά τα έντομα εκδηλώνουν μια κατάσταση μετά διάπαυσης, μέχρι την επαναδραστηριοποίηση τους με την άνοδο της θερμοκρασίας (Fantinou *et al.*,1996).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στα πλαίσια των ενδιαφερόντων του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας είναι η μοριακή μελέτη διάπαυσης των εντόμων. Η διάπαυση είναι μια περίοδος περιορισμού της ανάπτυξης που κατευθύνεται από αλλαγές σε αβιοτικά μηνύματα, τα οποία δείχνουν αλλαγές σε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι ο χειμώνας. Κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, η ανάπτυξη των εντόμων περιορίζεται και συνεπώς πολλά γονίδια δεν εκφράζονται, ενώ κάποια άλλα εκφράζονται. Από γενετική προσέγγιση φαίνεται ότι τα γονίδια που εκφράζονται, σχετίζονται με ωρολογιακούς μηχανισμούς και με αντίσταση στις αντίξοες συνθήκες. Η γνώση των μηχανισμών της διάπαυσης είναι εξαιρετικά σημαντική για τη διαχείριση των πληθυσμών των εντόμων, ιδιαίτερα εκείνων με σημαντική οικονομική σημασία. Επιπλέον, η μελέτη της διάπαυσης μπορεί να δώσει απαντήσεις και σε άλλα ερωτήματα που ενδιαφέρουν το σύγχρονο άνθρωπο, όπως είναι η μακροβιότητα και η παχυσαρκία. Όμως, παρά το εξαιρετικό επιστημονικό ενδιαφέρον της διάπαυσης, η έρευνα της σε μοριακό επίπεδο δεν έχει προχωρήσει ικανοποιητικά. και ο λόγος είναι η έλλειψη κατάλληλων μοντέλων. Η *Drosophila melanogaster*, καθώς και άλλα κλασσικά γενετικά μοντέλα (*C. elegans*, ποντίκι), δεν εμφανίζουν καλούς φαινοτύπους διάπαυσης. Για να μελετήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς της ρύθμισης της διάπαυσης, εστίασαμε σε ένα έντομο με καλή βιολογία και εμφανείς φαινοτύπους διάπαυσης, τη *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera: Noctuidae). Το έντομο αυτό αποτελεί το σπουδαιότερο εχθρό του αραβοσίτου στην Ελλάδα και στις χώρες της Μεσογείου. Χρησιμοποιήσαμε αυτό το είδος, γιατί εμφανίζει κάποια χαρακτηριστικά πολύ χρήσιμα για να απαντήσουν ερωτήματα σχετικά με τη διάπαυση. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:

1. Οι προνύμφες της *S. nonagrioides* εισέρχονται σε προαιρετική διάπαυση, που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη διάρκεια ζωής. Οι προνύμφες τελευταίου σταδίου δεν αναπτύσσονται σε νύμφες κάτω από συνθήκες μικρής ημέρας (10:14, Φ:Σ) και εισέρχονται σε διάπαυση.
2. Η φωτοπερίοδος είναι ο κύριος παράγοντας που ρυθμίζει την εισαγωγή και τερματισμό της διάπαυσης των προνυμφών (φωτοπεριοδική διάπαυση).

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η «Μελέτη θερμοεπαγωγής και βιολογικών ρολογιών στο έντομο *Sesamia nonagrioides*».

Τη μελέτη μας τη χωρίσαμε σε δύο ενότητες:

A. Μελέτη βιολογικών ρολογιών στο έντομο *Sesamia nonagrioides*

Ο στόχος αυτού του μέρους της εργασίας μας είναι η μελέτη της σχέσης ανάμεσα στις λειτουργίες του φωτοπεριοδικού και του κίρκαδικού ρολογιού, στο μεταγωγικό μονοπάτι των φωτοπεριοδικών μηνυμάτων για την εκδήλωση διάπαυσης. Επιλέξαμε ως κατάλληλο έντομο την *S. nonagrioides* για να καταλάβουμε τον μηχανισμό του φωτοπεριοδικού ρολογιού. Για τη μελέτη των βιολογικών ρολογιών έγιναν τα παρακάτω βήματα: **1.** Απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των ωρολογιακών γονιδίων *period (per)*, *timeless (tim)*, *cycle (ccl)* και *cryptochrome (cry)* στο έντομο *S. nonagrioides*. **2.** Μελέτη του κίρκαδικού ρολογιού μέσω της έκφρασης αυτών των γονιδίων σε συνθήκες μεγάλης ημέρας (16:8, Φ:Σ) και σε συνθήκες μικρής ημέρας (10:14, Φ:Σ), για έλεγχο της κίρκαδικότητας. **3.** Μελέτη του φωτοπεριοδισμού, μέσω της μελέτης έκφρασης αυτών των γονιδίων σε συνθήκες φωτοπεριόδου τριήμερου κύκλου (10: 62, Φ:Σ) και τετραήμερου κύκλου (10:14:10:62, Φ:Σ).

B. Μελέτη θερμοεπαγωγής στο έντομο *Sesamia nonagrioides*.

Για το σκοπό αυτό έγινε η μελέτη γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, όπως είναι τα θερμοεπαγόμενα γονίδια (*heat shock genes*). Τα βήματα μας ήταν: **1.** Απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των θερμοεπαγόμενων γονιδίων *Hsp70*, *Hsc70*, *Hsp90* και *smallHsp* στο έντομο *S. nonagrioides*. **2.** Μελέτη της έκφρασης αυτών των γονιδίων σε συνθήκες μεγάλης ημέρας (16:8, Φ:Σ) και θερμικής καταπόνησης (κρύο και ζέστη). **3.** Μελέτη της έκφρασης αυτών των γονιδίων σε συνθήκες μεγάλης ημέρας (16:8, Φ:Σ) και σε συνθήκες μικρής ημέρας (10:14, Φ:Σ).

Με τις δύο αυτές προσεγγίσεις, τα βιολογικά ρολόγια και τη θερμοεπαγωγή σε μοριακό επίπεδο, φωτίσαμε αρκετά το «μαύρο κουτί» της διάπαυσης των εντόμων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.1.1. Εκτροφή του εντόμου στο εργαστήριο

Η αποικία του εντόμου *Sesamia nonagrioides*, τμήμα της οποίας χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό υλικό, προήλθε από συλλογή φυσικού πληθυσμού στην περιοχή της Κωπαΐδας, το Σεπτέμβριο του 2007. Τα έντομα στο εργαστήριο διατηρούνταν σε συνθήκες θερμοκρασίας $25 \pm 1^\circ\text{C}$, φωτοπεριόδου 16 ώρες φωτόφαση-8 ώρες σκοτόφαση και σχετικής υγρασίας 60-70%. Τα έντομα που επρόκειτο να εισέλθουν σε διάπαυση διατηρούνταν σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας αλλά σε φωτοπερίοδο βραχείας ημέρας δηλαδή 10 ώρες φωτόφαση και 14 ώρες σκοτόφαση.

Τα τέλεια του εντόμου της εργαστηριακής εκτροφής διατηρούνταν σε ξύλινα κλουβιά. Σε κάθε κλουβί τοποθετούνται 15 περίπου ζευγάρια εντόμων και μικρά φυτά καλαμποκιού 20-25 cm, τα οποία είχαν το κάτω μέρος τους νερό. Στα φύλλα των τελευταίων τα θηλυκά άτομα εναπόθεταν τα ωά τους. Το νερό προσφερόταν στα τέλεια με οδοντιατρικά τεμάχια βάμβακος που είχαν τοποθετηθεί σε μικρά ποτήρια με νερό σε κάθε κλουβί. Η συλλογή των ωών γινόταν καθημερινά από τα φυτά. Τα ωά απολυμαίνονταν με εμβάπτιση σε διάλυμα 2% εμπορικού σκευάσματος χλωρίνης για 5 min. Κατόπιν γινόταν έκπλυσή τους με τοποθέτησή τους επί 5 min σε νερό. Η επώαση των ωών γινόταν σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm, πάνω σε διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με προπιονικό οξύ 3% για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Με την εκκόλαψη οι νεαρές προνύμφες τοποθετούνταν σε πλαστικά διαφανή κουτιά σε ομάδες 20-30 ατόμων πάνω σε θρεπτικό τεχνητό υπόστρωμα (Tsitsipis, 1984). Μια φορά την εβδομάδα οι προνύμφες μεταφέρονταν σε καθαρά κουτιά με νέο τεχνητό υπόστρωμα. Στις συνθήκες αυτές η διάρκεια ζωής των τέλειων ήταν 10 περίπου ημέρες, η επώαση των ωών πραγματοποιούνταν σε 6-7 ημέρες, η προνυμφική ζωή είχε διάρκεια 30-40 ημέρες και η νυμφική διάρκεια ήταν 10 περίπου ημέρες.

2.1.2. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ

2.1.2.1. Πειράματα Βιολογικών ρολογιών

i. Πειράματα μελέτης κερκαδικότητας

Τα έντομα (προνύμφες) στο εργαστήριο διατηρούνταν σε συνθήκες θερμοκρασίας $25 \pm 1^\circ\text{C}$, σχετικής υγρασίας 60-70% και φωτοπεριόδου 16 ώρες φωτόφαση-8 ώρες σκοτόφαση (16L: 8D). Τα έντομα που επρόκειτο να εισέλθουν σε διάπαυση διατηρούνταν σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας αλλά σε φωτοπερίοδο βραχείας ημέρας δηλαδή 10 ώρες φωτόφαση και 14 ώρες σκοτόφαση (10L: 14D).

ii. Πειράματα μελέτης φωτοπεριοδισμού

Τα έντομα (προνύμφες) στο εργαστήριο διατηρούνταν σε συνθήκες θερμοκρασίας $25 \pm 1^\circ\text{C}$, σχετικής υγρασίας 60-70% και φωτοπεριόδου:

1. Πείραμα 1ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε συνεχές φώς.
2. Πείραμα 2ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε συνεχές σκοτάδι.
3. Πείραμα 3ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε τριήμερους κύκλους φωτοπεριόδου **10L:62D (72 h)**.
4. Πείραμα 4ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε τριήμερους κύκλους φωτοπεριόδου **10L:58D: 4L (72 h)**.
5. Πείραμα 5ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε κύκλους φωτοπεριόδου LD:12:36.
6. Πείραμα 6ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε κύκλους φωτοπεριόδου LD:12:48.
7. Πείραμα 7ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε κύκλους φωτοπεριόδου LD:12:68.
8. Πείραμα 8ο. Οι προνύμφες παρέμειναν σε τετραήμερους κύκλους φωτοπεριόδου **L10:14D: 10L: 62D (96 h)**

Σε κάθε πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνταν **100 προνύμφες** του εντόμου και έγιναν τρεις επαναλήψεις για το καθένα. Για την πραγματοποίηση των φωτοπεριόδων πέραν του 24ώρου, χρησιμοποίησε ρολόγια εβδομαδιαίου κύκλου, για να πετύχουμε τους επιθυμητούς κύκλους φως: σκοτάδι. Σε όλες τις περιπτώσεις των πειραμάτων έγιναν τριήμερες δειγματοληψίες στις **60** ημέρες μετά την εκκόλαψη, σε περίπτωση που παρέμεναν προνύμφες (δηλαδή οι προνύμφες είχαν μπει σε διάπαυση).

2.1.2.2. Πειράματα θερμοεπαγωγής

Τα έντομα (προνύμφες) στο εργαστήριο διατηρούνταν σε συνθήκες θερμοκρασίας $25 \pm 1^\circ\text{C}$, σχετικής υγρασίας 60-70% και φωτοπερίοδο 16 ώρες φωτόφαση-8 ώρες σκοτόφαση (16L: 8D). Τα έντομα που επρόκειτο να εισέλθουν σε διάπαυση διατηρούνταν σε ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας αλλά σε φωτοπερίοδο βραχείας ημέρας δηλαδή 10 ώρες φωτόφαση και 14 ώρες σκοτόφαση (10L: 14D).

Στην εργασία μας, η οντογένεση που περιλαμβάνει διάπαυση μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις κύριες φάσεις: (1) Προ- διάπαυση (Pre-diapause): οι προνύμφες αναπτύσσονται μέχρι το 6th αναπτυξιακό στάδιο (instar). (2) Βαθεία διάπαυση (Deep-diapause): κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης, οι προνύμφες της *S. nonagrioides* υφίστανται υπεράριθμες εκδύσεις (supernumerary moults) και αυξάνει το σωματικό τους βάρος μέχρι και το 9th instar. (3) Μετά-διάπαυση (Post-diapause): Κατά την μετά-διάπαυση ανάπτυξη, οι προνύμφες παραμένουν κάτω από μια μετά διαπαυσιακή κατάσταση. Το σωματικό τους βάρος ελαττώνεται, εξακολουθούν όμως να εμφανίζουν εκδύσεις και σταδιακά αρχίζει η νύμφωση. Οι προνύμφες της *S. nonagrioides* κάτω από συνθήκες μικρής ημέρας (SD conditions) εμφανίζουν ~13 instars (Gkouvitsas *et al.*, 2008).

Εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικοί θερμοκρασιακοί χειρισμοί: (i) Προνύμφες κάτω από LD ή SD τοποθετήθηκαν σε ένα polystyrene tube και βυθίστηκαν σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 40°C για 15–60 min. (ii) Προνύμφες κάτω από LD εκτέθηκαν σε -5°C , 0°C , 5°C , 10°C , ή 17°C , για 1 h. Οι προνύμφες *S. nonagrioides* που είχαν υποστεί θερμικό ή ψυχρό shock παρέμειναν μετά το χειρισμό σε θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο LD.

2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από λεπιδόπτερα έντομα

Διαλύματα:

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

8 M CH₃COOK: 78.52 g CH₃COOK σε 100 ml ddH₂O,

0.7 M SDS: 20.2 g SDS σε 100 ml ddH₂O,

0.5 M EDTA pH=8.00: 186.1 g disodium EDTA 2H₂O σε 800 ml ddH₂O, pH=8.0 με προσθήκη NaOH pellets (20 g NaOH).

Διαδικασία:

50 mg ιστού προστίθενται σε eppendorf 1.5 ml και συμπληρώνονται με 300 μl EB, 50 μl 0.7 M SDS (20.2 % w/v),

Ομογενοποιούνται με πλαστικό γουδί και επωάζονται στους 65°C για 10 min,

Προστίθενται 80 μl 8 M CH₃COOK και το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 min,

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 20 min στους 4°C,

Το υπερκείμενο προστίθεται σε νέο eppendorf 1.5 ml και συμπληρώνεται με 0.6 όγκους ισοπροπανόλης,

Το μίγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά φυγοκεντρείται για 5 min στις 13.000 rpm,

Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 70 % v/v αιθανόλη,

Η αιθανόλη αφαιρείται, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε 30 μl ddH₂O.

2.2.2 Phenol/Chloroform treatment DNA και RNA δειγμάτων

Για 400 μl δείγματος:

Πρόσθεση 400 μl φαινόλης έντονη ανακίνηση, φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf 1.5 ml και προστίθεται ένας όγκος φαινόλη/χλωροφόρμιο (πχ. για 400 μl δείγματος: 200 μl phenol:200 μl chloroform),

Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου,

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf 1.5 ml, ογκομετρείται και προστίθεται ένας όγκος χλωροφόρμιο,

Φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου,

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf 1.5 ml, ογκομετρείται και προστίθεται 1/10 του όγκου του CH_3COONa 3 M pH=5.2, 2.5 όγκοι 100 % v/v αιθανόλη και αν πρόκειται για RNA αφήνεται O/N στους -20°C και φυγοκεντρείται την επομένη στις 13.000 rpm για 30 min στους 4°C ενώ εάν πρόκειται για DNA φυγοκεντρείται άμεσα στις 13.000 rpm για 30 min στους 4°C ,

Τα ιζήματα αφού αφαιρεθεί η αιθανόλη και αφεθούν να στεγνώσουν επαναδιαλύονται σε 15-30 μl ddH₂O.

2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης εκχυλισμάτων DNA/RNA με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας

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

Σε γενικές γραμμές η διαδικασία μπορεί να περιγραφεί ως εξής :

500 μl ddH₂O φωτομετρούνται στα 260 nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται,

Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 240 και 280 nm και καταγράφονται οι Abs,

5 μl δείγματος διαλύεται σε 495 μl ddH₂O και τοποθετείται σε κυψελίδα χαλαζία,

Ακολουθεί φωτομέτρηση με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) στα 260, 240 και 280 nm,

Από τις τιμές που θα προκύψουν αφαιρούνται οι απορροφήσεις του νερού στα αντίστοιχα μήκη κύματος,

Ακολουθεί η εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του δείγματος,

Η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων (1 cm κυψελίδα) στο δείγμα υπολογίζεται από τον τύπο:

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

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

Dilution factor είναι η αναλογία του τελικού όγκου στην κυψελίδα προς τον όγκο του δείγματος που διαλύθηκε για να γίνει η φωτομέτρηση. Η συνήθης πρακτική διάλυσης 5 μl δείγματος σε 495 μl ddH₂O δίνει έναν dilution factor της τάξης του 100.

2.2.4 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό εντόμων/ βακτηριακά κύτταρα με χρήση του φαινολικού αντιδραστηρίου (TRIzol)

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

Οι ιστοί/κύτταρα ζυγίζονται και τοποθετούνται στον πάγο για 5 min,

Απαραίτητη ποσότητα ιστού/κυττάρων και αντιδραστηρίου TRIzol τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml σε αναλογία 50 mg ιστού: 1000 μl TRIzol,

Ακολουθεί ομογενοποίηση με χρήση πλαστικού γουδιού,

Στο eppendorf με τον ομογενοποιημένο ιστό προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία 200 μl χλωροφόρμιο: 1000 μl TRIzol,

Ακολουθεί έντονη ανακίνηση και το eppendorf τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά,

Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm στους 4°C για 20 min,

Ακολούθως γίνεται μεταφορά της υδάτινης φάσης σε καινούριο eppendorf 1.5 ml και σε αυτό προστίθεται ισοπροπυλική αλκοόλη σε αναλογία 500 μl ισοπροπυλική αλκοόλη: 1000 μl TRIzol,

Το μίγμα τοποθετείται στους -20°C για 60 min,

Αμέσως μετά το πέρας των 60 min ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 20 min στους 4°C,

Το περιεχόμενο του eppendorf απομακρύνεται ενώ στο εναπομείναν ίζημα προστίθενται 800 μl αιθανόλης 100 % v/v,

Ακολουθεί ανάδευση με μηχανήμα Vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13.000 rpm στους 4°C,

Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης απομακρύνεται η αλκοόλη και το eppendorf αφήνεται να στεγνώσει στον πάγο,

Τέλος γίνεται επαναδιάλυση των RNAs με προσθήκη 15-30 μl δις-αποσταγμένου/αποστειρωμένου νερού και αποθήκευση στους -80°C.

2.2.5 DNase Treatment RNA δειγμάτων που περιέχουν DNA

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα των πειραμάτων όπου θα χρησιμοποιηθούν τα εκχυλισμένα RNAs, απαραίτητη είναι η καταστροφή των εναπομεινάντων στο εκχύλισμα υπολειμμάτων DNA με το ένζυμο RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Το ένζυμο αυτό είναι μία DNaseI (ενδονουκλεάση) και διασπά μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA παράγοντας 3'-OH ολιγονουκλεοτίδια. 1 unit της RQ1 RNase-Free DNase καταστρέφει εντελώς 1 μg γενωματικού DNA λ φάγου εντός 10 min στους 37° C σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 40 mM Tris HCl, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ και 10 mM CaCl₂.

Για 25 µg RNA:

Σε eppendorf 1.5 ml προστίθενται 5 µl 10x DNase buffer [400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO₄ και 10 mM CaCl₂],

Προσθήκη 5 µl DNase (1U/µl) (40 units),

1 µl RNase inhibitor (40U) (1 unit αναστέλλει το 50% της δραστηριότητας 5 ng RNase),

ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 50 µl,

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 60 min,

Αύξηση του όγκου στα 400 µl με προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας ddH₂O (350 µl),

Phenol/Chloroform treatment.

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

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

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

Αποδιάταξη RNA

Σε PCR tube, προστίθενται 3 µl (500 µg/ml) από 10 µM OligodT₁₂₋₁₈, 1.5 µg ολικό RNA, 5 µl dNTPs 10 mM, ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 12 µl,

Το δείγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 min και στην συνέχεια τοποθετείται αμέσως στον πάγο.

Παρασκευή cDNA

Προστίθενται 4 μl από 5x First Stand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 σε θερμοκρασία δωματίου, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2) και 2 μl από 0.1 M DTT,

Για την παρεμπόδιση των RNασών προστίθεται 1 μl από το ένζυμο RNase OUT [40 units/ μl , (Cat. No. 10777-019)],

Τέλος προστίθεται 1 μl (200 units) από το ένζυμο Superscript II RT και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 20 μl ,

Γίνεται επώαση σε συσκευή PCR για 60 min στους 42°C και για 15 min στους 70°C για την παύση της αντίδρασης,

Το προϊόν της RT για να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε αντιδράσεις PCR πρέπει να διαλυθεί με ddH₂O σε τελικό όγκο 50 μl .

2.2.7 Παρασκευή dNTPs mix

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

I. Για τις αντιδράσεις PCR η αναγκαία συγκέντρωση των dNTPs σε 50 μL όγκο αντίδρασης ήταν 0,2 mM και γι' αυτό κρατείτο dNTPs mix stock συγκέντρωσης 2 mM.

Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται ως εξής :

Από εμπορικό stock συγκέντρωσης 100 mM προστίθεται σε eppendorf (1,5 ml Vol), 4 μL dATPs, 4 μL dCTPs , 4 μL dGTPs, 4 μL dTTPs και 184 μL δις αποσταγμένο/αποστειρωμένο νερό σε τελικό όγκο 200 μL .

II. Για τις αντιδράσεις ανάστροφης μεταγραφής των mRNAs σε cDNA με το ένζυμο Reverse Transcriptase κρατείτο dNTPs mix stock συγκέντρωσης 10 mM.

Η διαδικασία παρασκευής του περιγράφεται ως εξής:

Από εμπορικό stock συγκέντρωσης 100 mM προστίθενται σε eppendorf (1,5 ml Vol), 10μL dATPs, 10μL dCTPs, 10μL dGTPs, 10μL dTTPs και 60μL δις αποσταγμένο/αποστειρωμένο νερό σε τελικό όγκο 100μL.

2.2.8 Σχεδιασμός/παρασκευή εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σχεδιάστηκαν βάσει των εξής χαρακτηριστικών:

Το μέγεθός τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 17-28 bp.

Η περιεκτικότητα σε G και C πρέπει να αντιστοιχεί στο 50-60% του συνολικού αριθμού των νουκλεοτιδίων του εκκινητή.

Το 3' άκρο των εκκινητών θα πρέπει να είναι G ή C ή GC ή CG.

Η θερμοκρασία υβριδισμού θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55-80° C.

Η αυτο-συμπληρωματικότητα των εκκινητών, δηλαδή η δημιουργία δευτεροταγούς δομής θα πρέπει να αποφεύγεται.

Η ύπαρξη τριών ή περισσότερων καταλοίπων G ή C στα 3' άκρα των εκκινητών μπορεί να προκαλέσει μη επιθυμητό υβριδισμό σε αλληλουχίες υψηλής περιεκτικότητας G ή C.

σχεδιασμός των εκκινητών σε γενικές γραμμές περιελάμβανε τα εξής στάδια:

Εντοπίζεται πάνω στο γονιδίωμα η επιθυμητή προς ενίσχυση ακολουθία.

Επιλέγονται οι αντίστοιχοι της ακολουθίας εκκινητές.

Γίνεται ανάλυση των επιλεγμένων εκκινητών με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής Primer Select της εταιρείας DNA Star. Το πρόγραμμα αυτό εξετάζει διάφορα σενάρια δημιουργίας διμερών μεταξύ εμπρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών, δευτεροταγούς δομής στον ίδιο τον εκκινητή ενώ υπολογίζει και την θερμοκρασία υβριδισμού των. Έτσι δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να επιλέξει τον θερμοδυναμικά σταθερότερο εκκινητή αποτρέποντας την δημιουργία προβλημάτων κατά τον πολυμερισμό.

Αφού επιλεγθούν εκκινητές που πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις οι αλληλουχίες τους στέλνονται σε κατάλληλη εταιρεία σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Η εταιρεία επιστρέφει τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές σε λυοφιλοποιημένη (αφυδατωμένη) μορφή.

Στο εργαστήριο οι εκκινητές διαλύονται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας δις αποσταγμένου/αποστειρωμένου νερού σε τελική συγκέντρωση 100μM. Οι ενυδατωμένοι εκκινητές διατηρούνται στους -20° C.

Για τις διάφορες αντιδράσεις διατηρείται primer stock τελικής συγκέντρωσης 10μM ύστερα από μίξη σε eppendorf tube (1,5ml Vol) 10μL από το εμπορικό σκεύασμα του εκκινητή με 90μL ddH₂O.

Μια λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων, οι θερμοκρασίες υβριδισμού των καθώς και οι ονομασίες τους παρατίθενται στον πίνακα 1 και 2.

2.2.9 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)/ Ημιποσοτικό και ποσοτικό RT-PCR

PCR

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

Σε γενικές γραμμές οι αντιδράσεις PCR περιλαμβάνουν επανάληψη ίδιων κύκλων σε διάφορους χρόνους που εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των μορίων που πρόκειται να ενισχυθούν. Σε όλες τις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν στην εργασία αυτή δηλαδή για την απομόνωση του 5',3' και κεντρικού τμήματος του cDNA του γονιδίου της εστεράσης της ορμόνης νεότητας χρησιμοποιήθηκε το εξής σχήμα πολυμερισμού:

1 x	Αποδιάταξη του DNA για 2 min στους 94° C
35 x	Αποδιάταξη στους 94° C για 30'' Υβριδισμός στο Tm των εκκινητών για 30'' Επιμήκυνση στους 72° C για 30-60''
1 x	Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10 min
	Παραμονή στους 10° C

Ημιποσοτικό PCR

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

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται τη θερμοκρασία τήξης (T_m) του εκκινητή. Η τελευταία με την σειρά της εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και υπολογίζεται από τον θεωρητικό τύπο: $T_m = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times (\text{αριθμός G's και C's στον εκκινητή} - 16.4)/N$ όπου N είναι ο αριθμός βάσεων του εκκινητή.

1 x	Αποδιάταξη του DNA για 2 min στους 94° C
23-29 x	Αποδιάταξη στους 94° C για 30'' Υβριδισμός στο Tm των εκκινητών για 30'' Επιμήκυνση στους 72° C για 30''
1 x	Τελική επιμήκυνση στους 72° C για 10 min
	Παραμονή στους 10°C

Σε καθημερινή βάση όμως για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας υβριδισμού των διαφόρων αντιδράσεων χρησιμοποιείτο κατάλληλο πρόγραμμα βιοπληροφορικής από

την εταιρεία βιοτεχνολογίας MWG (www.mwg-biotech.com/). Οι αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση cDNA τμημάτων γίνονται σε τελικό όγκο 50μL. Τα συστατικά προστίθενται σε eppendorf microcentrifuge PCR tube και ήταν τα εξής:

1. 5μL DyNAzyme EXT Buffer (10X) σε τελική συγκέντρωση 1X που περιέχει και 1.5 mM Mg²⁺.
2. 5μL από 2 mM dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0,2mM.
3. 1,5μL (10μM) από κάθε εκκινητή (εμπρόσθιο/οπίσθιο) σε τελική συγκέντρωση 0,3 μM.
4. 3μL μήτρας cDNA
5. 1μL από το ένζυμο DyNAzyme EXT πολυμεράση (1unit/μL) σε τελική συγκέντρωση 1Unit.
6. Δις αποσταγμένο/αποστειρωμένο νερό μέχρις τελικού όγκου των 50 μL.
7. Τα συστατικά αναμιγνύονται με την βοήθεια Vortex και φυγοκεντρώνονται για λίγα δευτερόλεπτα στις 13000rpm.
8. Αφού ολοκληρωθούν οι αντιδράσεις αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης ή/και τοποθετούνται σε καταψύκτη -20° C.

QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, Ποσοτική Αντίδραση Πολυμεράσης)

Η ποσοτική PCR είναι μια μέθοδος ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης που χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τελευταία λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της μεθόδου. Μια μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεταγραφών πραγματικού χρόνου χρησιμοποιεί τη SYBR Green, μια χρωστική η οποία προσδέεται μη ειδικά σε δίκλωνο DNA (ds DNA). Το Master Mix που χρησιμοποιείται στην αντίδραση περιέχει τη SureStartR Taq DNA polymerase, μια hot start DNA πολυμεράση. Η αύξηση στο φθορισμό αποδίδεται με γραμμικό τρόπο, καθώς το προϊόν της PCR αυξάνεται μετά από έναν αριθμό κύκλων. Η χρωστική SYBR Green έχει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA. Έχει μέγιστο διέγερσης στα 497 nm και μέγιστο εκπομπής στα 520 nm. Πριν προσδεθεί στο DNA εκπέμπει λίγο φθορισμό. Ωστόσο, όταν προσδεθεί σε δίκλωνο DNA ο φθορισμός αυξάνεται σημαντικά, γεγονός που καθιστά εύκολη την ανίχνευση του συσσωρευμένου προϊόντος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Κατά την αποδιάταξη, το DNA γίνεται μονόκλωνο. Στο στάδιο αυτό η SYBR Green είναι ελεύθερη στο διάλυμα και εκπέμπει λίγο φθορισμό. Κατά το στάδιο της ανασύνδεσης, οι εκκινητές

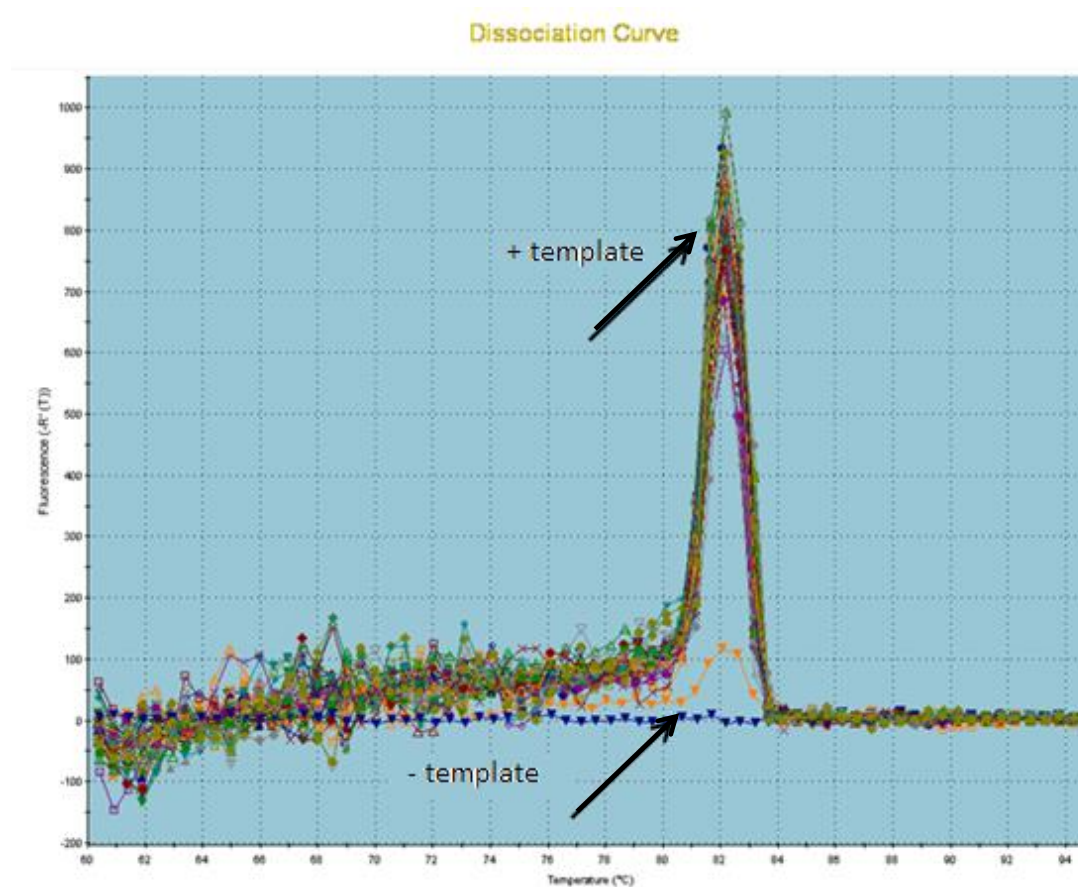
υβριδοποιούνται με την αλληλουχία στόχο σχηματίζοντας δίκλωνο DNA στο οποίο η SYBR Green μπορεί να προσδεθεί. Στο στάδιο της επέκτασης, περισσότερο DNA γίνεται δίκλωνο και ακόμα μεγαλύτερη ποσότητα της SYBR Green προσδέεται. Ο κύκλος της PCR στον οποίο αυξάνεται ο φθορισμός πάνω από έναν ουδό εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του στόχου που υπήρχε στην αντίδραση PCR. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το σήμα μπορεί να προέρχεται από μη ειδικό δίκλωνο DNA (π.χ. διμερή εκκινητών και ψευδή προϊόντα PCR).

Η μέθοδος καλείται Real- Time PCR (PCR πραγματικού χρόνου), γιατί δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού, άρα και του προϊόντος της αντίδρασης, σε κάθε κύκλο, μέσω μιας καμπύλης ενίσχυσης (amplification plot), η οποία δείχνει την αλλαγή στο φθορισμό ανά κύκλο. Η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του αρχικού αριθμού αντιγράφων. Οι ποσοτικοί υπολογισμοί που βασίζονται σε τιμές φθορισμού του τελευταίου κύκλου της αντίδρασης δεν είναι ακριβείς, καθώς οι τιμές αυτές επηρεάζονται πολύ από διάφορους περιοριστικούς παράγοντες, από μικρές διαφορές στα συστατικά της αντίδρασης και από παραμέτρους του μηχανήματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση των αρχικών αντιγράφων στην ανάλυση της Real-Time βασίζεται στον κατώφλιο κύκλο (Ct, threshold cycle).

Για να εξασφαλιστεί ότι η ενίσχυση αυτή είναι πραγματική και οφείλεται στην παρουσία υποστρώματος και όχι στην αύξηση φθορισμού λόγω σχηματισμού διμερών εκκινητών (primer-dimer) ή μη ειδικών προϊόντων, αναλύεται το θερμικό προφίλ των προϊόντων με την καμπύλη διαχωρισμού (dissociation curve). Στην καμπύλη διαχωρισμού τα δείγματα της PCR υποβάλλονται σε μια σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας από 55°C σε 95°C: οι μετρήσεις φθορισμού λαμβάνονται σε κάθε αύξηση της θερμοκρασίας.

Μετά την ολοκλήρωση του σταδίου διαχωρισμού, ο φθορισμός αναπαρίσταται γραφικά ως προς τη θερμοκρασία. Για θέματα διευκόλυνσης στο προφίλ διαχωρισμού χρησιμοποιείται η πρώτη παράγωγος της θερμοκρασίας, π.χ. $R'(T)$ ή $-Rn'(T)$. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνει, τα προϊόντα της ενίσχυσης αποδιατάσσονται ανάλογα με τη σύνθεσή τους. Αν κατά το στάδιο της ενίσχυσης σχηματιστούν διμερή εκκινητών ή μη ειδικά προϊόντα, αυτά θα αποδιαταχθούν σε γενικότερα χαμηλότερη θερμοκρασία (T_m), σε σχέση με τα επιθυμητά προϊόντα. Η

αποδιάταξη των προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την κατακόρυφη μείωση του φθορισμού, η οποία οφείλεται στον αποχωρισμό της SYBR Green. Το γράφημα διαχωρισμού στην **Εικόνα 2.1** δείχνει δύο κορυφές φθορισμού: μία της αντίδρασης – template (χωρίς υπόστρωμα) περίπου στους 75°C (η οποία αντιστοιχεί σε διμερή εκκινητών) και η άλλη της αντίδρασης +template (με υπόστρωμα) περίπου στους 83°C (η οποία αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν). Με αυτό τον τρόπο, η καμπύλη διαχωρισμού γίνεται πολύ χρήσιμο εργαλείο στη μετάφραση των δεδομένων φθορισμού. Τα δεδομένα από την καμπύλη διαχωρισμού μπορούν να φανούν χρήσιμα και για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών του πειράματος.



Εικόνα 2. 1. Καμπύλη διαχωρισμού (dissociation curve) των προϊόντων σε αντίδραση με υπόστρωμα και χωρίς υπόστρωμα (φθορισμός σε σχέση με τη θερμοκρασία). Στην ανάλυση αυτή η κορυφή του φθορισμού της καμπύλης αντιστοιχεί στο προϊόν της αντίδρασης (περίπου 83⁰ C), το οποίο ξεχωρίζει από την κορυφή που οφείλεται στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (περίπου 75⁰ C).

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις ίδιες αντιδράσεις έτσι ώστε για κάθε δείγμα να υπάρχουν 3 μετρήσεις (triplicates) για κάθε γονίδιο. Η αντίδραση έγινε σε

όγκο 15μl και αποτελούνταν από: 2x SYBR Green qPCR Buffer, 0,4mM Forward primer, 0,4mM Reverse Primer, 1μl cDNA (1μl cDNA να μετρώνται 75ng αρχικού RNA) και H₂O. Η αντίδραση έγινε στο μηχάνημα MX3000P (Stratagene).

Το θερμικό προφίλ για τις αντιδράσεις των γονιδίων clock (*SnoPer*, *SnoTim*, *SnoCyc*, *SnoCry*) ήταν ίδιο

10' στους 95°C } 1 κύκλος
20'' στους 95°C }
30'' στους 55°C } 35 κύκλοι
30'' στους 72°C
1' στους 95 °C }
30'' στους 60°C } 1 κύκλος
30'' στους 95°C

Το θερμικό προφίλ για τις αντιδράσεις των γονιδίων *Hsp* (*Sno19.5*, *Sno20.8*, *Sno70C*, *Sno70P*, *Sno83*) ήταν ίδιο

10' στους 95°C } 1 κύκλος
20'' στους 95°C }
30'' στους 57°C } 35 κύκλοι
30'' στους 72°C
1' στους 95 °C }
30'' στους 60°C } 1 κύκλος
30'' στους 95°C

2.2.10 Ηλεκτροφόρηση DNA/RNA σε πηκτή αγαρόζης

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ανάλυση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος προς το μέγεθος των μορίων. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων γίνονται ορατά με τη βοήθεια μίας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των

βάσεων. Η χρωστική αυτή ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο και έχει την ιδιότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Συνήθως ποικίλλει από 0.8 % ως 2 % w/v αγαρόζη.

Διαδικασία:

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης x % w/v διαλύονται x gr αγαρόζης σε 100x ml ddH₂O που περιέχει 50x TAE σε συγκέντρωση 1x,

Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι πλήρους διάλυσης της αγαρόζης και ομογενοποίησής της,

Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005 % v/v,

Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο καλούπι και σε ειδικές θέσεις που φέρει τοποθετούνται οι ειδικές χτένες διαμόρφωσης των οπών,

Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί στο ειδικό καλούπι σε θερμοκρασία δωματίου,

Τα προς ανάλυση δείγματα αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής (6x loading dye),

Μετά την πήξη του μίγματος η κτένα απομακρύνεται και το καλούπι πήξης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης,

Η τελευταία πληρώνεται με κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (2 % v/v 50x TAE, 0.005 % v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε ddH₂O),

Τα δείγματα (με την χρωστική) τοποθετούνται στις οπές της πηκτής σε όγκους ανάλογους του μεγέθους των οπών,

Για να αναγνωρίζεται το μέγεθος των αναλυόμενων πολυνουκλεοτιδίων προστίθεται μοριακός δείκτης. Σε όλα τα πειράματα της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης GeneRuler™ DNA Ladder Mix της εταιρείας Fermentas,

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

Ρυθμιστικό διάλυμα 50xTAE:

Σε ογκομετρικό σωλήνα 1000 ml προστίθενται 24.2 g (w/v) Tris-base, 100 ml 0.5 M EDTA pH=8.0, 57 ml CH₃COOH και ddH₂O μέχρι την συμπλήρωση όγκου 1000 ml,

Το διάλυμα αποχύνεται σε κατάλληλο δοχείο αποθήκευσης για περαιτέρω χρήση.

Βρωμιούχο αιθίδιο:

Παρασκευάζεται επιθυμητό σε όγκο διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 5 mg EtBr/ml dH₂O,

Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμο μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης:

2 % v/v 50x TAE, 0.005 % v/v βρωμιούχο αιθίδιο σε τελικό όγκο 1000 ml ddH₂O,

10x loading dye: Σε πλαστικό falcon 10 ml προστίθενται 2.5 % w/v μπλε της βρωμοφαινόλης (BPB), 2.5 % w/v κυανού του ξυλενίου (FF) και ddH₂O μέχρι συμπλήρωσης του επιθυμητού όγκου. Για 10 ml 10x loading dye προστίθενται 0.25 g Bromophenol blue και 0.25 g Xylene cyanol σε 10 ml ddH₂O,

6x loading dye: Για την υποβοήθηση της τοποθέτησης των δειγμάτων DNA στις οπές της πηκτής αгарόζης χρησιμοποιείται 6x loading dye που περιέχει 50 % w/v σουκρόζη. 5 g Sucrose διαλύονται σε 1 ml 10x loading dye και προστίθεται ddH₂O μέχρι συμπλήρωσης των 10 ml.

2.2.11 Απομόνωση DNA από πηκτή αгарόζης

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

Η πηκτή αгарόζης τοποθετείται σε UV Lamp,

Ύστερα από την κάλυψη με ειδικό προστατευτικό, η λάμπα ανάβει και εντοπίζεται η επιθυμητή ζώνη,

Η επιθυμητή ζώνη αφαιρείται με τη βοήθεια κοπιδιού,

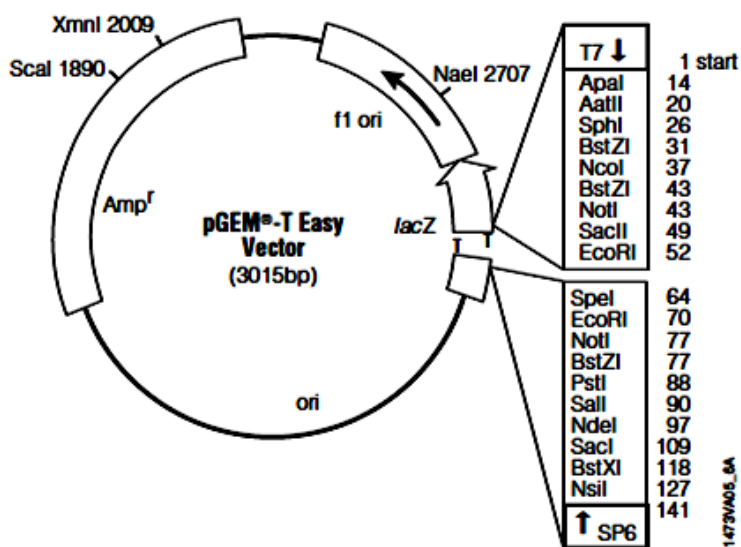
Το αφαιρεμένο τμήμα της πηκτής τοποθετείται σε φιαλίδιο eppendorf 1.5 ml,

Το τελευταίο τοποθετείται στους -80°C για 15 min,

Ακολουθεί απομόνωση του DNA με το εμπορικό kit της QIAGEN, QIAquick Gel Extraction Kit.

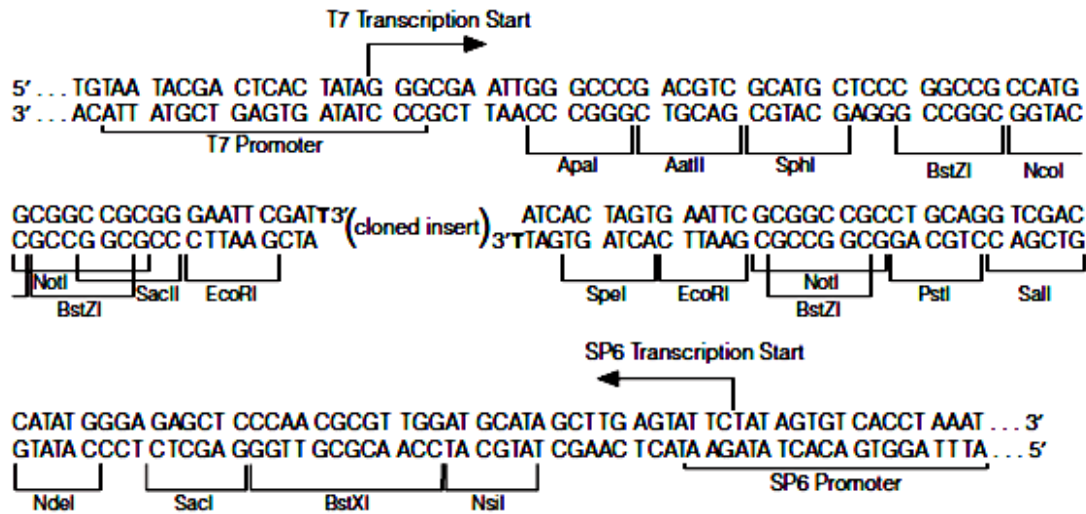
2.2.12 Αλληλούχηση κλωνοποιημένων ενθέτων και ο pGEM-T Easy vector

Για την αλληλούχηση ενισχυμένων με PCR τμημάτων DNA χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας της εταιρείας Promega με την ονομασία pGEM-T Easy Vector. Ο φορέας αυτός έχει μέγεθος 3.015 bp (Εικ. 2.2). Φέρει το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη ενώ παρέχει την δυνατότητα επιλογής κυανών-λευκών αποικιών αφού διαθέτει το γονίδιο LacZ που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Το χημικό ανάλογο IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside) αποτελεί μεταγραφικό ενισχυτή του LacZ. Η περιοχή κλωνοποίησης έχει ελεύθερες 3' θυμίνες και είναι τμήμα του LacZ. Εκατέρωθεν της κασέτας κλωνοποίησης βρίσκονται οι προαγωγείς T7 και SP6 της RNA πολυμεράσης καθώς και αλληλουχίες αναγνώρισης από ένα ευρύ φάσμα ενδονουκλεασών περιορισμού (Εικ. 2.3.). Ο φορέας παρέχεται σε γραμμική μορφή από την εταιρεία παραγωγής του (Promega) και λιγοποιείται με τα PCR προϊόντα μέσω συμπληρωματικότητας A-T. Το κλωνοποιημένο DNA τμήμα εξάγεται με την χρήση ενζύμων περιορισμού. Η αλληλούχηση των κλωνοποιημένων στον pGEM-T Easy Vector ενθέτων γίνεται από την εταιρεία Macrogen με χρήση T7 και SP6 εκκινητών ή και εκκινητών οι οποίοι υβριδίζουν σε γνωστές περιοχές της αλληλουχίας που πρόκειται να αλληλουχηθεί σε περιπτώσεις όπου το ένθετο είναι μεγαλύτερο από 1.6 kb. Για κάθε κατεύθυνση είναι δυνατή η αλληλούχηση 800 bp.



Εικόνα 2.2. Η χαρτογράφηση του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T Easy όπως αυτή παρέχεται από την εταιρεία παραγωγής του, Promega.

pGEM[®]-T Easy Vector



Εικόνα 2.3. Η αλληλουχία της περιοχής κλωνοποίησης του pGEM-T Easy φορέα. Στην πάνω πλευρά βρίσκεται η αλληλουχία πρόσδεσης της T7 RNA πολυμεράσης. Στην κάτω πλευρά βρίσκεται η αλληλουχία πρόσδεσης της SP6 RNA πολυμεράσης.

2.2.13 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA με A/T συμπληρωματικότητα/ Λιγοποίηση

Κλωνοποίηση τμημάτων DNA με A/T συμπληρωματικότητα

Η κλωνοποίηση τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T easy βασίζεται στην ιδιότητα της T4 DNA λιγάσης να αναγνωρίζει και να συνδέει τμήματα με συμπληρωματικά (5' ή 3' προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T easy από το εμπορικό του stock είναι γραμμικός και φέρει κατάλοιπα θυμίνης στα 3' άκρα του. Η αλυσιδωτή ενίσχυση των cDNA και gDNA με το ένζυμο DyNAzyme EXT πολυμεράση έχει ως αποτέλεσμα την πρόσθεση 3' μη συμπληρωματικής αδενίνης στα πολυμερισμένα μόρια. Ο φορέας και τα πολυμερισμένα DNA τμήματα λιγοποιούνται με συμπληρωματικότητα A-T. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης λαμβάνει χώρα στα 10 μl. Από το εμπορικό stock η συγκέντρωση του γραμμικού pGEM-T easy vector είναι 50 ng/μl. Η συγκέντρωση (σε ng) του ενθέτου που πρέπει να προστεθεί στην αντίδραση ώστε αυτή να είναι επιτυχής δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

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

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

Σε φιαλίδιο eppendorf 1.5 ml προστίθενται:

25 ng φορέα δηλαδή 0.5 μl από το εμπορικό stock,

Ανάλογη του τελικού όγκου ρυθμιστικό διάλυμα. 1 μl από 10x Ligation buffer (300 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT και 10 mM ATP) ή 5 μl από το 2x Ligation buffer (60 mM Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP και 10 % PEG) σε τελική συγκέντρωση 1x,

Κατάλληλη ποσότητα του προς κλωνοποίηση DNA τμήματος η συγκέντρωση και η ποσότητα του οποίου υπολογίζεται από τον προηγούμενο μαθηματικό τύπο,

1 μl T4 DNA λιγάσης (0.1U/μl, NE Biolabs),

ddH₂O (εάν αυτό είναι αναγκαίο) μέχρις ότου να συμπληρωθούν τα 10 μl,

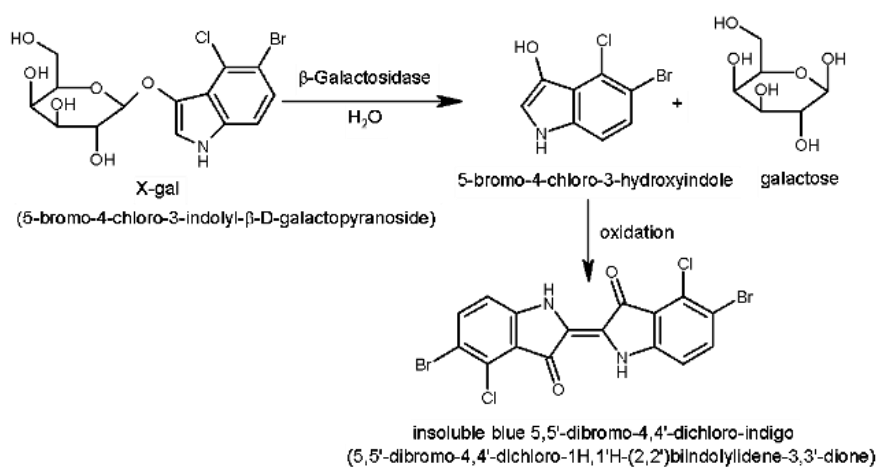
Το δείγμα ή αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (16°C) για 1 ώρα (fast reaction) ή καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας στους 4°C .

Λιγοποίηση

Αντίδραση σύνδεσης (ligation) του πλασμιδιακού φορέα τα κατάλληλα inserts γίνεται χρησιμοποιώντας τη DNA λιγάση T4 (EL0011, Fermentas) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρείας (10x : 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7.8 στους 25 °C). Η αντίδραση σύνδεσης διεξάγεται στους 16 °C για περίπου 16 ώρες (overnight) και περιέχει: 5 units λιγάσης T4, 2 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x, 1 mM ATP (όπου κρίνεται αυτό αναγκαίο), πλασμιδιακό φορέα και DNA του insert σε αναλογία 1:3. Γίνεται προσθήκη νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20 μl.

2.2.14 Μετασχηματισμός και παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* (Dh5A)

Για την κλωνοποίηση των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιείται το βακτηριακό στέλεχος του *Escherichia coli* με την κωδική ονομασία DH5a. Χαρακτηριστικά του στελέχους αυτού όπως η υψηλή ικανότητα μετασχηματισμού ($>2 \times 10^6$ μετασχηματισμένα βακτήρια/μg πλασμιδιακού DNA) και η έλλειψη από το χρωμόσωμά τους της lacZ περιοχής (Δ (lacZ)M15, καρβόξυ τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης) το καθιστά αναγκαίο εργαλείο για όλες τις πειραματικές διαδικασίες κλωνοποίησης. Ειδικότερα για το τελευταίο χαρακτηριστικό τα DH5a καθίστανται ορατά όταν φέρουν πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (LacZ gene). Όταν τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει X-gal και IPTG χρωματίζονται αναλόγως του αν φέρουν ή όχι το κλωνοποιημένο ένθετο. Όταν φέρουν το ένθετο (θετική αντίδραση) παραμένουν λευκά αφού το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ gene) διακόπτεται και δεν μπορεί να μεταφραστεί σε λειτουργική β-γαλακτοσιδάση. Από την άλλη πλευρά, όταν δεν φέρουν το ένθετο (αρνητική αντίδραση) οι βακτηριακές αποικίες DH5a αποκτούν μία κυανή χροιά αποτέλεσμα της μετάφρασης του γονιδίου (LacZ gene) σε λειτουργική β-γαλακτοσιδάση και της διάσπασης του X-gal (Εικ. 2.4.).



Εικόνα 2.4. Η χημική αντίδραση διάσπασης της X-gal σε γαλακτόζη και 5-βρώμο-4-χλώρο-3-υδροξυινδόλιο. Δύο μόρια 5-βρώμο-4-χλώρο-3-υδροξυινδολίου συμπυκνώνονται και προσδίδουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα στις αποικίες που κωδικοποιούν λειτουργική β-γαλακτοσιδάση.

Διαλύματα

CaCl₂ 100 mM: 2.205 g CaCl₂ διαλύονται σε 100 ml ddH₂O.

1 M Tris-HCl pH=8.0: 24.228 g Tris(Trizma®), διαλύονται σε 100 ml ddH₂O και ρυθμίζεται το pH στο 8.00. Στην συνέχεια προστίθεται ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 200 ml.

25 mM CaCl₂/10 mM Tris-HCl pH=8.00: 75 ml CaCl₂ 100 mM και 3 ml 1 M Tris-HCl pH=8.00 αναμιγνύονται και προστίθενται 222 ml ddH₂O.

75 mM CaCl₂/10 mM Tris-HCl pH=8.00, 15 %γλυκερόλη: 37.5 ml CaCl₂ 100 mM και 0.5 ml 1 M Tris-HCl pH=8.0 αναμιγνύονται και προστίθενται 4.4 ml ddH₂O και 7.6 ml 99 % γλυκερόλη.

Διαδικασία: Μία ημέρα πριν αποστειρώνονται τα διαλύματα 25 mM CaCl₂, 75 mM CaCl₂, τα Sorval tubes, οι πιπέτες, τα PCR tubes, τα tips που θα χρησιμοποιηθούν και τοποθετούνται στους 4°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Η διαδικασία παρασκευής δεκτικών βακτηριακών κυττάρων συνοψίζεται στα εξής:

Από το εμπορικό stock μη δεκτικά βακτήρια DH5a επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσονται στους 37°C για 12 ώρες,

Μετά το πέρας των 12 ωρών επιλέγεται μοναδιαία αποικία η οποία αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB για 12 ώρες στους 37°C,

2 ml από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρονται σε κωνική φιάλη 1000 ml που περιέχει 200 ml υγρό LB,

Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C σε σημείο οπτικής πυκνότητας ίσο με O.D₅₅₀=0.5 (2 hr περίπου από την στιγμή εμβολιασμού). Μετά από την πρώτη ώρα της καλλιέργειας γίνεται μία πρώτη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 550 nm και μετά ακολουθούν και άλλες κάθε μισή ώρα μέχρις ότου επιτευχθεί η επιθυμητή οπτική πυκνότητα. Σαν τυφλό χρησιμοποιείται υγρό LB,

Μόλις επιτευχθεί η απαραίτητη οπτική πυκνότητα τα κύτταρα τοποθετούνται στο πάγο για 10 min,

Μετά το πέρας των 10 min, τα κύτταρα μεταφέρονται σε Sorval tubes και κατακρημνίζονται για 5 min στις 4.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C. (Η Sorval θα πρέπει να έχει προψυχθεί στους 8°C για 10 min στις 1.000 rpm),

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο αφαιρείται και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 100 ml παγωμένου CaCl_2 25 mM (μισός όγκος) με ήπια ανάδευση στον πάγο ή με αναρρόφηση του υπερκείμενου των κυττάρων με γυάλινη πιπέτα,

Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 4.500 rpm σε θερμοκρασία 4°C,

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο αφαιρείται και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 13.3 ml 75 mM παγωμένου CaCl_2 (1/15 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας), που περιέχει 15 % αποστειρωμένη γλυκερόλη,

Το μίγμα, αναμιγνύεται και μοιράζεται ανά 200 μl σε PCR tubes,

Ακολουθεί άμεση κατάψυξη με υγρό άζωτο και διατήρηση των δεκτικών κυττάρων, στους -80°C.

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

200 μl από Glycerol stock δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH5a τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml,

Στο τελευταίο προστίθενται 10-50 ng πλασμιδιακού DNA,

Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στον πάγο για 30 min,

Στην συνέχεια τα βακτηριακά κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ ύστερα από τοποθέτηση τους στους 42°C για 2 λεπτά,

Λίγο πριν το πέρας των 2 λεπτών προστίθεται στο μίγμα 1 ml από υγρό θρεπτικό μέσο LB και στην συνέχεια τοποθετείται στους 37°C για 1 ώρα, αναδεύοντας με το χέρι κάθε 15 λεπτά,

Μετά το πέρας της μίας ώρας το μίγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 rpm,

Στην συνέχεια αποχύνονται τα 3/5 του υπερκείμενου ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται στα υπόλοιπα 2/5.

Στερεή καλλιέργεια και επιλογή μετασχηματισμένων *E. coli* κυττάρων

Στερεοποιημένο με άγαρ θρεπτικό διάλυμα LB/amp σε τρυβλία petri αφήνεται να στεγνώσει στους 37° C,

Αφού στεγνώσει προστίθενται σε αυτό 30 μl X-gal (20 mg/ml) και 6 μl IPTG (200 mg/ml) τα οποία στην συνέχεια απλώνονται σε όλη την ακτίνα του μέσου με την βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου,

Το τρυβλίο αφήνεται να στεγνώσει στους 37°C,

Αφού στεγνώσει τα μετασχηματισμένα δεκτικά κύτταρα, (τελευταίο στάδιο προηγούμενης παραγράφου), αποχύνονται στο τρυβλίο petri και επιστρώνονται με την βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου,

Τα τρυβλία επωάζονται για 12-16 ώρες σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C.

Υγρή καλλιέργεια μοναδιαίων αποικιών, μετασχηματισμένων *E. coli*

Με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα επιλέγεται μοναδιαία αποικία από στερεή καλλιέργεια LB/ amp/ X-gal/ IPTG, μετασχηματισμένων DH5a κυττάρων,

Σε θρεπτικό διάλυμα με 4 ml υγρό LB προστίθενται 4 μl Amp (100 mg/ml) και τοποθετείται η οδοντογλυφίδα,

Η καλλιέργεια τοποθετείται σε αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 12 ώρες.

Διαλύματα ανάπτυξης βακτηρίων

Θρεπτικό μέσο LB: 0.5 % (w/v) Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Πεπτόνη. Για στερεό LB προστίθεται και 1.4 % (w/v) άγαρ.

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside): 200 mg/ml σε dH₂O (stock). Φυλάσσεται στους -20°C.

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (BRL): 20 mg/ml σε διμεθυλ-φορμαμίδιο (DMFO, stock). Αποθηκεύεται στους -20°C.

Kanamycin: 50 mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C.

Gentamicin: 50 mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20°C.

Ampicillin: 100 mg/ml σε ddH₂O. Φυλάσσεται στους -20⁰C.

Tetracycline: 10 ή 15 mg/ml σε 100 % v/v Ethanol. Φυλάσσεται στους -20⁰C σε σκοτεινό φιαλίδιο erpendorf.

Αποθήκευση βακτηριακών κυττάρων

600 μl από υγρή καλλιέργεια *E.coli* μεταφέρεται σε φιαλίδιο erpendorf,

Προσθήκη 400 μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 99%,

Το μίγμα αναμειγνύεται και ψύχεται σε υγρό άζωτο.

Αποθήκευση στους -80⁰C.

2.2.15 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli*

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης

Απαραίτητα διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα P1: 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 και 100 μg/ml RNάση,

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης P2: 0.2N NaOH, 1 % (w/v) SDS,

Ρυθμιστικό διάλυμα P3(3M/5M CH₃COOK): 60 ml 5 M οξικού καλίου pH 4.8-5.2 αναμιγνύονται με 11.5 ml οξικού οξέος και 28.5 ml ddH₂O,

RNάση: Διάλυμα RNάσης-A 10 mg/ml σε 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 15 mM NaCl. Βρασμός του διαλύματος για 15 min. Διακοπή για 20 min και επανάληψη βρασμού (καταστροφή υπολειμμάτων DNAσών). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20⁰C.

Διαδικασία

Το P3 τοποθετείται στον πάγο 10 min πριν ξεκινήσει η διαδικασία,

1.5 ml υγρής καλλιέργειας μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf,

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 13.000 rpm,

Αποχύνεται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος P1,

Ακολουθεί προσθήκη 200 μl από το διάλυμα λύσης P2 και ελαφρά ανακίνηση μέχρις ότου το μίγμα αποκτήσει ομοιογενές χρώμα,

Ακολουθεί προσθήκη 200 μl διαλύματος P3 και ελαφρά ανακίνηση μέχρις ότου το μίγμα αποκτήσει λευκό χρώμα,

Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15 min στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου,

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο eppendorf,

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 13.000 rpm,

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο eppendorf,

Προστίθενται δύο όγκοι του υπερκείμενου αιθανόλης 100 % v/v,

Ακολουθεί ανάμιξη και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου,

Στην συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου,

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και αφού στεγνώσει το ίζημα διαλύεται σε 30-50 μl δις αποσταγμένο/αποστειρωμένο νερό.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (QIAGEN)

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

2.2.16 Πέψη νουκλεϊκών οξέων με ενδονουκλεάσες περιορισμού

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

Σε φιαλίδιο erppendorf προστίθενται κατάλληλος όγκος ddH₂O, 1/10 του όγκου 10x του κατάλληλου κατά περίσταση ρυθμιστικού διαλύματος, το DNA και τέλος το ένζυμο περιορισμού,

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

2.2.17. Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών και φυλογενετική ανάλυση

Οι ομόλογες πρωτεΐνες αναζητούνται στην βάση δεδομένων Blast (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο (blastp) ή μέσω της μηχανής αναζήτησης Flybase Blast Service (<http://flybase.org/blast/>). Η στοίχιση των πρωτεϊνικών και νουκλεοτιδικών ακολουθιών έγινε με τον αλγόριθμο Align W που παρέχεται από το λογισμικό βιοπληροφορικής, Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 software (MEGA 5, Tamura., 2011) χρησιμοποιώντας την μήτρα blosum 62 scoring matrix (Henikoff *et al.*, 1992). Τα φυλογενετικά δένδρα κατασκευάστηκαν με το λογισμικό MEGA 5 (Tamura, 2011) χρησιμοποιώντας την μέθοδο neighbor-joining (Saitou *et al.*, 1987). Η στατιστική επαλήθευση έγινε με την μέθοδο του Bootstrapping (Felsenstein, 1985) χρησιμοποιώντας 1.000 επαναλήψεις.

2.2.18 Southern Hybridization.

Απομόνωση γενωματικού DNA από ολόκληρο έντομο: Η επιθυμητή συγκέντρωση που θα φορτωθεί στο gel για την μεταφορά είναι 15 μg.

Πέψη Γενωματικού DNA:

Τα 15 µg DNA τοποθετούνται σε eppendorf 1.5 ml και προστίθενται 5 µl από το 10X buffer του κάθε ενζύμου περιορισμού, 8 µl RNase, 5 µl BSA εάν απαιτείται, 2.5 µl του ενζύμου περιορισμού και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 48.5 µl. Το μίγμα τοποθετείται στους 37°C O/N. Την επόμενη ημέρα προστίθεται 1.5 µl από το ένζυμο περιορισμού και επωάζεται στους 37°C για 1^{1/2} με δύο ώρες επιπλέον.

Ηλεκτροφόρηση:

50 µl των αντιδράσεων περιορισμού, φορτώνονται μαζί με 1.5 µl 6X loading dye σε 0.7% v/v gel αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται O/N στα 15-20V ή 10-12 ώρες στα 30V. Προστίθεται και marker.

Το στύπωμα υβριδοποιήθηκε με ένα σημασμένο με διγοξιγενίνη (digoxigenin-UTP Chemiluminescent Probe) χρησιμοποιώντας το σύστημα DIG High Prime labeling system (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Ένα κομμάτι DNA 587 βάσεων κλωνοποιήθηκε σε pGEM t Easy Vector που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής. Υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 60 °C χρησιμοποιώντας 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M Na[P] pH 7.2 and 7% SDS. Οι μεμβράνες πλύθηκαν 2 φορές στους 60 °C με 5% SDS, 40 mM Na[P] and 1 mM EDTA, και τρεις φορές στους 50 °C με 1% SDS, 40 mM Na[P] και 1 mM EDTA. Η διαδικασία της ανίχνευσης έγινε χρησιμοποιώντας το DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

2.3 Απομονώσεις cDNA/ Έκφραση γονιδίων με Ημιποσοτικό και Real Time PCR

2.3.1 Απομόνωση του cDNA της *SnoHSP19.5*

Ως μήτρα για την απομόνωση της *SnoHSP19.5* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40°C για 60 λεπτά). Εκφυλισμένοι εκκινητές (Sn19.5 Forward/Sn19.5 Reverse, Πίνακας 2) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 µM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε

εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της SnHSP19.5, σχεδιάστηκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn19.5 3F1, Sn19.5 3F2, Sn19.5 3F3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnHSP83. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι Sn19.5 3F1/ T17Xho, στην δεύτερη οι Sn19.5 3F2/ T17Xho και στην τρίτη οι Sn19.5 3F3/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn19.5 3F1/ T17Xho με εκκινητές τους Sn19.5 3F2/ T17Xho και τους Sn19.5 3F3/ T17Xho και με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn19.5 3F2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn19.5 3F3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της SnHSP19.5, σχεδιαστήκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn19.5 5R1, Sn19.5 5R2, Sn19.5 5R3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnHSP19.5. Ο εκκινητής Sn19.5 5R1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαυσών προνυμφών (5^{ov} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40° C για 60 λεπτά). Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι Sn19.5 5R2 και Sn19.5 5R3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο oligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο Sn19.5 5R1 εκκινητή

poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους Sn819.5 5R2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 54°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn19.5 5R2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn19.5 5R3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.2 Απομόνωση του cDNA του *SnoHSP20.8*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoHSP20.8* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαυσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40°C για 60 λεπτά). Εκφυλισμένοι εκκινητές (Sn20.8 Forward/Sn20.8 Reverse, Πίνακας 2) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της *SnoHSP20.8*, σχεδιάστηκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn20.8 3F1, Sn20.8 3F2, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της *SnoHSP20.8*. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι Sn20.8 3F1/ T17Xho και στην

δεύτερη οι Sn20.8 3F2/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn20.8 3F1/ T17Xho με εκκινητές τους Sn20.8 3F2/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της *SnoHSP20.8*, σχεδιαστήκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn20.8 5R1, Sn20.8 5R2, Sn20.8 5R3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της *SnoHSP83*. Ο εκκινητής Sn20.8 5R1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40° C για 60 λεπτά). Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι Sn20.8 5R2 και Sn20.8 5R3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο Sn20.8 5R1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους Sn20.8 5R2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 54°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn20.8 5R2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn20.8 5R3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.3 Απομόνωση του cDNA του *SnoHSP83*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoHSP83* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40°C για 60 λεπτά). Εκφυλισμένοι εκκινητές (Sn83 Forward/Sn83 Reverse, Πίνακας 2) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim,

Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτική αγαρόζη 1% w/v και αλληλουχίστηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της *SnoHSP83*, σχεδιάστηκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn83 3F1, Sn83 3F2, Sn83 3F3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της *SnoHSP83*. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι Sn83 3F1/ T17Xho, στην δεύτερη οι Sn83 3F2/ T17Xho και στην τρίτη οι Sn83 3F3/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn83 3F1/ T17Xho με εκκινητές τους Sn83 3F2/ T17Xho και τους Sn83 3F3/ T17Xho και με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn83 3F2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn83 3F3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζη 1% w/v και αλληλουχίστηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της *SnoHSP83*, σχεδιαστήκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn83 5R1, Sn83 5R2, Sn83 5R3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος του *SnoHSP83*. Ο εκκινητής Sn83 5R1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαυσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40° C για 60 λεπτά). Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι Sn83 5R2 και Sn83 5R3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο Sn83 5R1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους Sn83 5R2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης

αποτελούνταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 54°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn83 5R2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn83 5R3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.4 Απομόνωση του cDNA του *SnoHSP70*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoHSP70* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40°C για 60 λεπτά). Εκφυλισμένοι εκκινητές (Sn70P Forward/Sn70P Reverse, Πίνακας 2) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της *SnoHSP70*, σχεδιάστηκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn70P 3F1, Sn70P 3F2, Sn70P 3F3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της *SnoHSP70*. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούνταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 52°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι Sn70P 3F1/ T17Xho, στην δεύτερη οι Sn70P 3F2/ T17Xho και στην τρίτη οι Sn70P 3F3/ T17Xho. Για να

εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70P 3F1/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70P 3F2/ T17Xho και τους Sn70P 3F3/ T17Xho και με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70P 3F2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70P 3F3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της SnoHSP70, σχεδιαστήκαν τέσσερις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (Sn70P 5R1, Sn70P 5R2, Sn70P 5R3, Sn70P 5R4, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoHSP70. Ο εκκινητής Sn70P 5R1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμικό σοκ (40° C για 60 λεπτά). Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι Sn70P 5R2 και Sn70P 5R3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο Sn70P 5R1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους Sn70P 5R2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 54°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70P 5R2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70P 5R3/ T17Xho και Sn70P 5R4/ T17Xho και με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70P 5R3/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70P 3R4/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.5 Απομόνωση του cDNA του *SnoHSC70*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoHSP70* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 χωρίς να εκτεθούν σε θερμικό σοκ. Εκφυλισμένοι εκκινητές (Sn70C Forward/Sn70C Reverse, Πίνακας 2) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η

ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μ M από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50 μ l αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 54°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της SnoHSC70, σχεδιάστηκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5 \rightarrow 3 (Sn70C 3F1, Sn70C 3F2, Sn70C 3F3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoHSC70. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι Sn70C 3F1/ T17Xho, στην δεύτερη οι Sn70C 3F2/ T17Xho και στην τρίτη οι Sn70C 3F3/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70C 3F1/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70C 3F2/ T17Xho και τους Sn70C 3F3/ T17Xho και με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70C 3F2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70C 3F3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της SnoHSC70, σχεδιαστήκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5 \rightarrow 3 (Sn70C 5R1, Sn70C 5R2, Sn70C 5R3, Πίνακας 2) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoHSP70. Ο εκκινητής Sn70C 5R1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαυσών προνυμφών (5^{ov} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8. Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι Sn70C 5R2 και Sn70C 5R3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση

με μήτρα το υβριδισμένο Sn70C 5R1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους Sn70C 5R2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούσαν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης Sn70C 5R2/ T17Xho με εκκινητές τους Sn70C 5R3/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.6 Απομόνωση του cDNA του *SnoPer*

Ως μήτρα για την απομόνωση της *SnoPer* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25°C. Εκφυλισμένοι εκκινητές (Per Forward/Per Reverse, Πίνακας 1) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity, Roche, Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της *SnoPer*, σχεδιάστηκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (3Per Forward 1, 3Per Forward 2, Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος του *SnoPer*. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούσαν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7

λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι 3Per Forward 1/ T17Xho, στην δεύτερη οι 3Per Forward 2/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 3Per Forward 1/ T17Xho με εκκινητές τους 3Per Forward 2/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της SnoPer, σχεδιαστήκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (5Per Reverse 1 και 5Per Reverse 2, Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoPer. Ο εκκινητής 5Per Reverse 1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαυσών προνυμφών (5^{ov} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25°C. Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Ο 5Per Reverse 2 χρησιμοποιήθηκε ως reverse εκκινητής για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο 5Per Reverse 1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους 5Per Reverse 2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.7 Απομόνωση του cDNA του *SnoTim*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoTim* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαυσών προνυμφών (5^{ov} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25°C. Εκφυλισμένοι εκκινητές (Tim Forward/ Tim Reverse, Πίνακας 1) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά,

ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτή αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της SnoTim, σχεδιάστηκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (3 Tim Forward 1, 3Tim Forward 2, Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoTim. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι 3Tim Forward 1/ T17Xho, στην δεύτερη οι 3Tim Forward 2/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 3Tim Forward 1/ T17Xho με εκκινητές τους 3Tim Forward 2/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της SnoTim, σχεδιαστήκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (5Tim Reverse 1 και 5Tim Reverse 2, Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoTim. Ο εκκινητής 5Tim Reverse 1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαυουσών προνυμφών (5⁰⁰ σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25°C. Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Ο 5 Tim Reverse 2 χρησιμοποιήθηκε ως reverse εκκινητής για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο 5Tim Reverse 1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους 5Tim Reverse 2/ T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.8 Απομόνωση του cDNA του *SnoCry*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoCry* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25°C. Εκφυλισμένοι εκκινητές (Cry Forward/ Cry Reverse, Πίνακας 1) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της *SnoCry*, σχεδιάστηκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (3 Cry Forward 1, 3Cry Forward 2, Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της *SnoCry*. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο OligodT (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι 3Cry Forward 1/ T17Xho, στην δεύτερη οι 3Cry Forward 2/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 3Cry Forward 1/ T17Xho με εκκινητές τους 3Cry Forward 2/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτική αгарόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της *SnoCry*, σχεδιαστήκαν τρεις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (5 Cry Reverse 1, 5 Cry Reverse 2, 5 Cry Reverse 3 Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της *SnoCry*. Ο εκκινητής 5 Cry Reverse 1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη

διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8. Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι 5 Cry Reverse 2 και 5 Cry Reverse 3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο OligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο 5 Cry Reverse 1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους 5 CryReverse2/T17Xho και 5Cry Reverse 3/T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 5CryReverse2/T17Xho με εκκινητές τους 5Cry Reverse 3/T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.9 Απομόνωση του cDNA του *SnoCyc*

Ως μήτρα για την απομόνωση του *SnoCyc* χρησιμοποιήθηκε cDNA παρασκευασμένο από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8 που είχαν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25°C. Εκφυλισμένοι εκκινητές (Cyc Forward/ Cyc Reverse, Πίνακας 1) σχεδιάστηκαν έχοντας ως βάση συγγενικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αρκετών Λεπιδοπτέρων. Η ποσότητα του cDNA που αντιστοιχεί σε 200 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα μαζί με 200 μM από κάθε dNTP, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 2 U DNA πολυμεράσης (Expand High Fidelity - , Roche , Mannheim, Γερμανία) σε τελικό όγκο 50μl αντιδράσεως. Η ενίσχυση επιτεύχθηκε σε ένα Peltier θερμικό ανακυκλωτή (Μοντέλο PTC- 200 , MJ Research). Μετά από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, ακολούθησαν 35 κύκλοι στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και 1 κύκλος τελικής επιμήκυνσης στους 72 ° C για 7 λεπτά. Το PCR προϊόν αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκε. Για την απομόνωση του 3' άκρου του cDNA της *SnoCyc*, σχεδιάστηκαν δυο εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (3 Cyc Forward 1, 3Cyc Forward 2, Πίνακας 1) με βάση την

αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της SnoCyc. Οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ευθείς (forward) σε τρεις αντιδράσεις 3 RACEPCR ενώ ως οπίσθιος (reverse) εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ο oligodt (T17Xho, Πίνακας 2). Λόγω του ότι οι θερμοκρασίες υβριδισμού ήταν ίδιες και για τις τρεις αντιδράσεις, το πρόγραμμα PCR ήταν κοινό και αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 55°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι 3Cyc Forward 1/ T17Xho, στην δεύτερη οι 3Cyc Forward 2/ T17Xho. Για να εξακριβωθεί η εγκυρότητα του προηγούμενου σταδίου έγινε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 3CycForward 1/ T17Xho με εκκινητές τους 3CycForward 2/ T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν. Για την απομόνωση του 5' άκρου του cDNA της SnoCyc, σχεδιαστήκαν τέσσερις εκκινητές με κατεύθυνση 5→3 (5 Cyc Reverse 1, 5 Cyc Reverse 2, 5 Cyc Reverse 3, 5 Cyc Reverse 4 Πίνακας 1) με βάση την αλληλουχία του απομονωμένου κεντρικού τμήματος της Sno Cyc. Ο εκκινητής 5 Cyc Reverse 1 χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή cDNA από RNA ιστού μη διαπαουσών προνυμφών (5^{ου} σταδίου) ανεπτυγμένων σε συνθήκες LD 16:8. Το cDNA που πρόεκυψε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την σύνθεση 3' poly-A ουράς (tail-PCR). Οι 5 Cyc Reverse 2 και 5 Cyc Reverse 3 χρησιμοποιήθηκαν ως reverse εκκινητές για την ενίσχυση των poly-A cDNA, ενώ ο oligodT εκκινητής χρησιμοποιήθηκε ως forward. Πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση με μήτρα το υβριδισμένο 5 Cry Reverse 1 εκκινητή poly-A cDNA, χρησιμοποιώντας τους 5 CryReverse2/T17Xho και 5Cry Reverse 3/T17Xho ως reverse/forward αντίστοιχα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης αποτελούταν από ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94 ° C για 2 λεπτά, 35 κύκλους στους (94°C για 30 δευτ., 56°C για 30 δευτ., και 74°C για 45 δευτερόλεπτα) και από 1 κύκλο για τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7 λεπτά. Ακολούθησε Nested PCR (σε συνθήκες PCR ίδιες με αυτές παραπάνω) με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 5 CryReverse2/T17Xho με εκκινητές τους 5 CryReverse3/T17Xho και 5 CryReverse4/T17Xho και με μήτρα αραιώσεις 1:1000 και 1:10000 της αντίδρασης 5 CryReverse3/T17Xho με εκκινητές τους 5 CryReverse4/T17Xho. Τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και αλληλουχήθηκαν.

2.3.10 Ημιοσοτικό PCR για *SnoHsp19.5*

Για την μελέτη έκφρασης του *SnoHsp20.8* σχεδιαστήκαν 2 εκκινητές, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn19.5RT-For και Sn19.5RT-Rev αντίστοιχα (Πίνακας 2), οι οποίοι ενίσχυαν ένα τμήμα 200 βάσεων. Για σύγκριση των επίπεδων μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία SnRT TubF/Sn RT Tub R αντίστοιχα. Από όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση RNA και στη συνέχεια παρασκευή cDNA με τον T17Xho OligodT εκκινητή (Πίνακας 2). Για να υπάρχει συγκρισιμότητα στα αποτελέσματα του ημιποσοτικού PCR, πριν γίνει η Παρασκευή των cDNA, όλα τα δείγματα των RNA, ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις, ομαλοποιήθηκαν έτσι ώστε να έχουν την ίδια περίπου μεταξύ τους συγκέντρωση. Η ομαλοποίηση έγινε βάσει των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης. Το σχήμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR ήταν το εξής:

2' στους 94°C } 1 κύκλος
30'' στους 94°C }
30'' στους 55°C } 25 κύκλοι
30'' στους 72°C }
10' στους 72°C } 1 κύκλος

2.3.11 Ημιποσοτικό PCR για *SnoHsp20.8*

Για την μελέτη έκφρασης του *SnoHsp20.8* σχεδιαστήκαν 2 εκκινητές, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn20.8RT-For και Sn20.8RT-Rev αντίστοιχα (Πίνακας 2), οι οποίοι ενίσχυαν ένα τμήμα 200 βάσεων. Για σύγκριση των επίπεδων μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn RT TubF/Sn RT Tub R αντίστοιχα. Από όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση RNA και στη συνέχεια παρασκευή cDNA με τον T17Xho OligodT εκκινητή (Πίνακας 2). Για να υπάρχει συγκρισιμότητα στα αποτελέσματα του ημιποσοτικού PCR, πριν γίνει η Παρασκευή των cDNA, όλα τα δείγματα των RNA, ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις, ομαλοποιήθηκαν έτσι ώστε να έχουν την ίδια περίπου μεταξύ τους συγκέντρωση. Η ομαλοποίηση έγινε βάσει των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης.

Το σχήμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR ήταν το εξής:

2' στους 94°C } 1 κύκλος
30'' στους 94°C }
30'' στους 55°C } 23 κύκλοι
30'' στους 72°C }
10' στους 72°C } 1 κύκλος

2.3.12 Ημιποσοτικό PCR για *Sno Hsc70*

Για την μελέτη έκφρασης του *SnoHsc70* σχεδιαστήκαν 2 εκκινητές, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn70CRT-For και Sn70CRT-Rev αντίστοιχα (Πινάκας 2), οι οποίοι ενίσχυαν ένα τμήμα 200 βάσεων. Για σύγκριση των επίπεδων μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn RT TubF/Sn RT Tub R αντίστοιχα. Από όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση RNA και στη συνέχεια παρασκευή cDNA με τον T17Xho OligodT εκκινητή (Πινάκας 2). Για να υπάρχει συγκρισιμότητα στα αποτελέσματα του ημιποσοτικού PCR, πριν γίνει η Παρασκευή των cDNA, όλα τα δείγματα των RNA, ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις, ομαλοποιήθηκαν έτσι ώστε να έχουν την ίδια περίπου μεταξύ τους συγκέντρωση. Η ομαλοποίηση έγινε βάσει των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης. Το σχήμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR ήταν το εξής:

2' στους 94°C } 1 κύκλος
30'' στους 94°C }
30'' στους 55°C } 22 κύκλοι
30'' στους 72°C }
10' στους 72°C } 1 κύκλος

2.3.13 Ημιποσοτικό PCR για *SnoHsp70*

Για την μελέτη έκφρασης του *SnoHsp70* σχεδιαστήκαν 2 εκκινητές, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn70PRT-For και Sn70PRT-Rev αντίστοιχα (Πινάκας 2), οι οποίοι ενίσχυαν ένα τμήμα 200 βάσεων. Για σύγκριση των επίπεδων

μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn RT TubF/Sn RT Tub R αντίστοιχα. Από όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση RNA και στη συνέχεια παρασκευή cDNA με τον T17Xho OligodT εκκινητή (Πίνακας 2). Για να υπάρχει συγκρισιμότητα στα αποτελέσματα του ημιποσοτικού PCR, πριν γίνει η Παρασκευή των cDNA, όλα τα δείγματα των RNA, ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις, ομαλοποιήθηκαν έτσι ώστε να έχουν την ίδια περίπου μεταξύ τους συγκέντρωση. Η ομαλοποίηση έγινε βάσει των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης. Το σχήμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR ήταν το εξής:

2' στους 94°C	}	1 κύκλος
30'' στους 94°C	}	25 κύκλοι
30'' στους 55°C		
30'' στους 72°C		
10' στους 72°C	}	1 κύκλος

2.3.14 Ημιποσοτικό PCR για *SnoHsp83*

Για την μελέτη έκφρασης του *SnoHsp83* σχεδιαστήκαν 2 εκκινητές, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn83PRT-For και Sn83PRT-Rev αντίστοιχα (Πίνακας 2), οι οποίοι ενίσχυαν ένα τμήμα 200 βάσεων. Για σύγκριση των επίπεδων μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που ενίσχυαν ένα μικρό τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης, ένας forward και ένας reverse με την ονομασία Sn RT TubF/Sn RT Tub R αντίστοιχα. Από όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση RNA και στη συνέχεια παρασκευή cDNA με τον T17Xho OligodT εκκινητή (Πίνακας 2). Για να υπάρχει συγκρισιμότητα στα αποτελέσματα του ημιποσοτικού PCR, πριν γίνει η Παρασκευή των cDNA, όλα τα δείγματα των RNA, ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις, ομαλοποιήθηκαν έτσι ώστε να έχουν την ίδια περίπου μεταξύ τους συγκέντρωση. Η ομαλοποίηση έγινε βάσει των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης. Το σχήμα πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ημιποσοτικού PCR ήταν το εξής:

2' στους 94°C	}	1 κύκλος
30'' στους 94°C	}	

30'' στους 55°C 24 κύκλοι

30'' στους 72°C

10' στους 72°C } 1 κύκλος

2.3.15. Ποσοτικό RT-PCR για *SnoPer*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoPer* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του *SnoPer* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Per RT Forward/Per RT Reverse (Πίνακας 1, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του *SnoPer* κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης.

2.3.16. Ποσοτικό RT-PCR για *SnoCyc*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoCyc* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του *SnoCyc* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Cycle RT Forward/Cycle RT Reverse (Πίνακας 1, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του *SnoCyc* κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης.

2.3.17 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoCry*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoCry* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής

περιοχής του SnoCry χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Cry RT Forward/Cry RT Reverse (Πινάκας 1, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του SnoCry κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης.

2.3.18 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoTim*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoTim* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του SnoTim χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Tim RT Forward/Tim RT Reverse (Πινάκας 1, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του SnoTim κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης.

2.3.19 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoHsp19.5*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoHsp19.5* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του SnoHsp19.5 χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Sn19.5RT-For/Sn19.5RT-Rev (Πινάκας 2, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του SnoHsp19.5 κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης

2.3.20 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoHsp20.8*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoHsp20.8* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του *SnoHsp20.8* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Sn20.8RT-For/Sn20.8RT-Rev (Πίνακας 2, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του *SnoHsp20.8* κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης

2.3.21 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoHsc70*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoHsc70* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του *SnoHsp70C* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Sn70CRT-For/Sn70CRT-Rev (Πίνακας 2, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του *Sno70C* κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β-τουμπουλίνης

2.3.22 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoHsp70*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoHsp70* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του *SnoHsp70P* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Sn70PRT-For/Sn70PRT-Rev (Πίνακας 2, ή τμήμα του γονιδίου της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα

δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του *Sno70P* κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β -τουμπουλίνης

2.3.23 Ποσοτικό RT-PCR για *SnoHsp83*

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του *SnoHsp83* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SYBR Green Brilliant (Stratagene). Τα πλασμίδια μάρτυρες κατασκευάστηκαν κλωνοποιώντας στον φορέα pGEM-T easy ένα τμήμα της κωδικής περιοχής του *SnoHsp83* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Sn83PRT-For/Sn83PRT-Rev (Πινάκας 2, ή τμήμα του γονιδίου της β -τουμπουλίνης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές SnRT-TubF/SnRT-TubR (Πίνακας 2). Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα προκειμένου να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες. Οι αντιδράσεις έγιναν στην συσκευή Stratagene Mx3000P. Κάθε ένα δείγμα αναλύθηκε σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Η ποσότητα των επιπέδων έκφρασης του *Sno83* κανονικοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα έκφρασης της β -τουμπουλίνης

Πίνακας 1. Ακολουθίες των Primers που χρησιμοποιήθηκαν για τα clock γονίδια

Oligonucleotides	Sequence (5'→3')
Degenerate PCR	
Per forward:	AA(A/G)GA(C/T)ATGTGGAT(C/T)GG(A/C/G)AG(A/G)TC
Per reverse:	TCTTG(A/G)GG(C/T)AG(A/G)TA(C/G)CCCAGGTA
Cry forward:	CT(C/G)ACCTACCA(A/G)ATGTTC(C/T)TGCA
Cry reverse:	A(C/T)ACCCACATCCA(G/A)TT(A/G)CC(A/G)GC
Tim forward:	CATTTCTT(C/T)TGGCT(C/G)GT(C/T)AC(C/T)TA
Tim reverse:	AT(A/C)AGATC(A/G)GACCA(A/G)TCATCGCA
Cycle forward:	AA(A/G)GACGT(C/G)GCCAA(C/G)GT(A/G)AAGGA
Cycle reverse:	TG(C/T)TGA(C/T)TGAAGAC(G/T)GCGTC(C/T)TG
RACE PCR	
3' – Per Forward 1:	GCGTTTATGCCGTTCTTACTCAA
3' – Per Forward 2:	ATACAGGCTACACCCTTTTATTCC
3' – Cry Forward 1:	AACTACGGACAGATGAGTGGCAA
3' – Cry Forward 2:	AACACTCTGGCTGTCGTGGGAA
3' – Tim Forward 1:	ATGTACCAGTACGGGTTGCTGC
3' – Tim Forward 2:	AGTTTGATCACCTTGTTGCAGCC
3' – Cyc Forward 1:	ATATGTTCCGCGAGCCAGAGTTG
3' – Cyc Forward 2:	CAGGCTACAGACGCATTTCAAG
5' – Per Reverse 1:	GCTGGGGATTTAACTTTTTCTGG
5' – Per Reverse 2:	GTGCACGAAGTCGATGAAGGAC
5' – Tim Reverse 1:	CTCCGCAGTCAAGTACGACAAGA
5' – Tim Reverse 2:	CCGAGCTAACATTCTCCAAGTCA

5' – Cry Reverse 1:	TAAGGAAGAACGCCACAGTGTTGC
5' – Cry Reverse 2:	TGATGCACCTCACGGAATAGGTCC
5' – Cry Reverse 3:	ATCTGTTTAAGCGCAGTGGTCTC
5' – Cyc Reverse 1:	CTTCAGTGGCAGCATGGTCTTAG
5' – Cyc Reverse 2:	ACTTGATGCGGCAGAAGAAAGAG
5' – Cyc Reverse 3:	TGGGCTCAGTTTCTTCCTTGATG
5' – Cyc Reverse 2:	AAGATGAACTTGCCGTCTGGAGTA

Real-time PCR assays

Per RT forward:	TGTGGTTGTAGAGGAGGTAAGGA
Per RT reverse:	GGTCAGCTCAGGAGTACATACGA
Tim RT forward:	GTCTCATATCACTCCCTTACACA
Tim RT reverse:	TCCTACGATATGTCCGCAAGTA
Cycle RT forward:	GGAGATGCAACGGCTTATAGAG
Cycle RT reverse:	ACGTACGTTTTGGTTGAAGACTG
Cry RT forward:	AGAGCGTGCGTCCTGTATAATAG
Cry RT reverse:	CCGTAAGTCATTACTCGTTGAGC
<i>Sn</i> RT-TubF	GAGCAGTTCACCGCTATGTTC
<i>Sn</i> RT-TubR	GGTGTGAGTGCTTTAGTTGTCC

Πίνακας 2. Ακολουθίες των Primers που χρησιμοποιήθηκαν για τα HSPs γονίδια

Oligonucleotides	Sequence (5'→3')
Degenerate PCR	
<i>Sn20.8</i> Forward	GACTACT(A/T)CAGACC(A/C)TGGAGACA
<i>Sn20.8</i> Reverse	CTCTG(A/G)TCCTTGATCTCCTTGCG
<i>Sn19.5</i> Forward	GACGT(CT)CA(CT)TTC(GT)CGCC(GT)GA
<i>Sn19.5</i> Reverse	GA(AT)ATGAA(GT)CC(AG)TGCTCGTCCT
<i>Sn70C</i> Forward	AACACNRTCTTYGATGCCAARCG
<i>Sn70C</i> Reverse	TTGTCCTTRGACATKGSWCGYTC
<i>Sn70P</i> Forward	AGGGYATYGACTTCTACACGCG
<i>Sn70P</i> Reverse	CCSGTGCTGTTCTCCTTGGC
<i>Sn 83</i> Forward:	CTACAAGTCCCTTACCAATGACTG
<i>Sn 83</i> Reverse:	CCTTCATGATACGCTCCATG
3'RACE PCR	
<i>Sn20.8</i> 3F 1	CCTGAAGAGATTTCCGGTGAAGAC
<i>Sn20.8</i> 3F 2	CCAGAAGCCTTAAAGGGAGAGAG
<i>Sn19.5</i> 3F 1	GTTTCCTTTCCCGGCAGTTTAC

<i>Sn19.5</i> 3F 2	TGTGTACCAGAGTCGGTGGGAATC
<i>Sn19.5</i> 3F 3	CTAGGAAGGTGCCTCTTGCTG
<i>Sn70C</i> 3F 1	AAGTGCAGAAGCTCCTTCAAGAC
<i>Sn70C</i> 3F 2	ACTCAAACCTTTACCACCTGCTC
<i>Sn70C</i> 3F 3	TGTCGAGAAATCGACTAACAAGG
<i>Sn70P</i> 3F 1	TAGACAAGAGCTCCATCCATGA
<i>Sn70P</i> 3F 2	CTCCATCCATGACGTTGTA
<i>Sn70P</i> 3F 3	GAGCAGCACTCTAAGATCCAAG
<i>Sn83</i> 3F 1	GGCAAGACTCTTGTCTCTGT
<i>Sn83</i> 3F 2	TATGGCGACTTCTACAAGTC
<i>Sn83</i> 3F 3	CATGGAGCGTATCATGAAGG
T17XHO	GTCGACCTCGAGT ₁₇

5'RACE PCR

<i>Sn20.8</i> 5R 1	GTGCTCGTCCTTCTTCTCCTCA
<i>Sn20.8</i> 5R 2	GTCTTCACCGAAATCTTTCAGG
<i>Sn20.8</i> 5R 3	GAGCCCAGATCTTTAGCAGCAG
<i>Sn19.5</i> 5R 1	CTGAACAGCAAGAGGCACCTTC
<i>Sn19.5</i> 5R 2	CAGCTTAGATTCCACCGACTCTG
<i>Sn19.5</i> 5R 3	ACTCTGGTACACAGCCTTCTGG
<i>Sn19.5</i> 5R 4	GTAAACTGCCGGGAAAGGAAAC
<i>Sn70C</i> 5R 1	GATTTCAATGCTAGCCTGTGTG
<i>Sn70C</i> 5R 2	TCCCAGCAGTGGACTTTACTTC
<i>Sn70C</i> 5R 3	GTTCTCCACTACCCTTCTTGCA
<i>Sn70P</i> 5R 1	TGGTTGGTTGTCAGAGTAGGTG
<i>Sn70P</i> 5R 2	CTTGGATCTTAGAGTGCTGCTC
<i>Sn70P</i> 5R 3	GAGTACAACGTCATGGATGGAG
<i>Sn70P</i> 5R 4	TCATGGATGGAGCTCTTGTCTA
<i>Sn83</i> 5R 1	GGGATAAGGTCTTCACAGTTGTC
<i>Sn83</i> 5R 2	CTCTGCGGACATACAGTTTGATG

<i>Sn83</i> 5R 3	GCACAAACAATAGTGCTCTGAAC
Real Time PCR assays	
<i>Sn20.8</i> RT-For	GGCTACATCAGTCGGCAGTTC
<i>Sn20.8</i> RT-Rev	CTCTCTCCCTTTAAGGCTTCTG
<i>Sn19.5</i> RT-For	ACCAGAGTCGGTGGAATCTAAG
<i>Sn19.5</i> RT-Rev	GCACTAGATCACATCGCTTCAC
<i>Sn70CRT</i> -For	AAGGAGCTGGAAGGAATCTG
<i>Sn70CRT</i> -Rev	GCATGCTGTATAATCTGTTGGA
<i>Sn70PRT</i> -For	GGCTGAGAAGGACGAGTATGAG
<i>Sn70PRT</i> -Rev	CAATATGGAAATGCAAGTCTGG
<i>Sn 83</i> RT-For	GTGCATGCTTCCCGTATCTAC
<i>Sn 83</i> RT-Rev	CCATTACAACATGGCAAACCTGA
<i>SnRT</i> -TubF	GAGCAGTTCACCGCTATGTTC
<i>SnRT</i> -TubR	GGTGTGAGTGCTTTAGTTGTCC

ΜΕΡΟΣ Α

Μελέτη βιολογικών ρολογιών στο έντομο *Sesamia nonagrioides*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. Μελέτη κερκαδικών ρολογιών

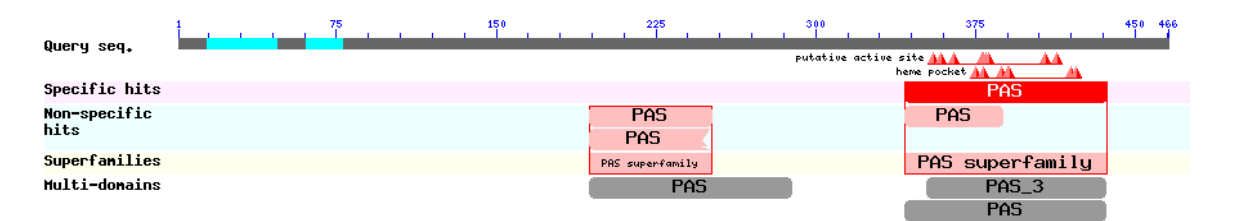
Για να μελετήσουμε το κερκαδικό ρολόι της *S. nonagrioides*, απομονώσαμε τα ωρολογιακά γονίδια *per*, *tim*, *cyc* και *cry* και στη συνέχεια μελετήσαμε την έκφραση τους σε ημερήσιο κύκλο και φωτοπερίοδο μεγάλης (16L:8D) και μικρής (10L:14D) ημέρας. Από την ανάλυση αυτή θα ελέγξουμε αν υπάρχει κερκαδικότητα στα γονίδια αυτά στο έντομο *S. nonagrioides*.

I. Αλληλούχιση και μελέτη έκφρασης των γονιδίων *per*, *tim*, *cyc* και *cry* στο έντομο *S. nonagrioides*

1. Το γονίδιο *per*

1.1. Αλληλούχιση του *per*

Από κεφάλια προνυμφών της *S. nonagrioides*, που εκτράφηκαν σε συνθήκες 16L:8D, απομονώθηκε ένα cDNA 1630 bp (partial) ομόλογο του *per*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 469 αμινοξέων (GenBank accession number, DQ198860). Το γονίδιο το ονομάσαμε *Snooper*. Η αλληλουχία από το 3'-RACE PCR προϊόν περιείχε το start codon και 30 UTRs αλλά δεν βρέθηκε polyadenylation signal. Η ακολουθία μας περιείχε πενταπεπτίδιο GTQEK (232–236) στην PAS περιοχή και DKGKL (780–784) στην C terminal περιοχή (εικ. 2). Η ανάλυση της αλληλούχισης αποκάλυψε ότι η επικράτεια PAS (PER-ARNT-SIM, Huang *et al.*, 1993), PAC (RAS- associated C-terminal, Zhulin *et al.*, 1997), το nuclear localization signal (NLS, nuclear localization signal, Saez and Young, 1996) και η επικράτεια CLD (cytoplasmic localization domain, Saez and Young, 1996) είναι συντηρημένα στην *S. nonagrioides* (Εικ. 2). Οι επικράτειες TIS (TIM interaction sites) οι οποίες απαιτούνται για την πρόσδεση της TIM πρωτεΐνης (Saez and Young 1996) ήταν επίσης υψηλά συντηρημένες στην SnoPER (Εικ. 1, Πιν. 1).



Εικ. 1. Αμινοξική ακολουθία του *per* από το NCBI protein BLAST.

Πίνακας 1. Αμινοξικές ομοιότητες (%) των συντηρημένων τμημάτων της πρωτεΐνης SnoPER της *S. nonagrioides* και άλλων εντόμων.

Αμινοξικές ομοιότητες (%) των συντηρημένων τμημάτων της πρωτεΐνης SnoPER							
	PAS 1	PAS 2	NLS	CLD	TIS 1	TIS 2	PAC
<i>S.exigua</i>	91%	82%	92%	82%	94%	82%	82%
<i>M.brassicae</i>	94%	87%	82%	87%	95%	87%	87%
<i>B. mori</i>	94%	90%	84%	85%	92%	84%	91%
<i>A. pernyi</i>	96%	84%	86%	87%	95%	87%	97%
<i>D.melanogaster</i>	81%	65%	76%	71%	75%	77%	84%

```

gctggggattaactttttctggagagctaaacattaaaaaggggatcgattaagatcta 60
cgctccctagtgtaaacggctttagaataaatgcaacatgggacaaattagacgattcagaa 120
                                     M D K L D D S E 8
aacaatgcaaagatttcagattctgcatactccaacagttgcagcaacagtcagtcagaa 180
N N A K I S D S A Y S N S C S N S Q S R 28
aggagccatagttccaagttccacacattccggaagccattccagtgaggcagcagtggtat 240
R S H S S K S T H S G S H S S G S S G Y 48
                                     NLS
tgtggaaaaccttcaacttctgggaagcagcaacaacctactgcccccaaaaaagacaaa 300
C G K P S T S G S S N N L L P P K K D K 68
gaaccaaagcaaaagaaacttcaaccccagattgagactttggttcccgatgtggttga 360
E P K Q K K L Q P Q I E T L V P D V V V 88
gaggaggttaaggacgctgagccattgcctacttttgagggcccctaaagaagagaagcta 420
E E V R T P E P L P T F E A P K E E K L 108
gatgttgaccgactctaccactgtgcatgcacagacagaaaaatgggtgtgagaacatg 480
D V D P T L P P V H A Q T E N G V E N M 128
gtcgtatgtactcctgagctgaccaccttgaaagatgaggtgggttccaacaacttattg 540
V V C T P E L T T L K D E V V S N N L L 148
caggttaaccctgcagctagctttccgctcgggtcggcctccccaaacttcttatgcatg 600
Q V N P A A S F P S G R P P Q T S Y C D 168
gtacaaagtaagcgataccaagagattagccgctacgagatgctgtgtgagagttccgaa 660
V Q S K R Y Q E I S R Y E M R C E S S E 188
← TIS 1 →
caattgctgtgtaaggacggattttcatgctaattctctatgcacgatggcgtcgtcatg 720
Q L R C K D G F S C V I S M H D G V V M 208
tacgccacatcaaccttggcgaccactcttgggttccccaaagacatgtggatcggaagg 780
Y A T S T L A T T L G F P K D M W I G R 228
tccttcatcgacttctgagcaccgaagggaaccgagcaccttcttctcaaataccat 840
S F I D F V H P R D R S T F A S Q I T N 248
ggtttagctgtcccgaataattgtaaatggtagccagaaaaagttaaatccccagcctaac 900
G L A V P K I V N G T P E K V K S P A N 268
tcgggtgcgaccatggtttggcgacacagcggatcgaggcttacaaccggcttcgggt 960
S V S T M V C R I R R Y R G L T T G F G 288
gtcaaaagaagagtgctggcgtttatgcttactcaaattgaccttcaaaaatatt 1020
V K E R V L A F M P F L L K L T F K N I 308
agcgtgaaagggtaaaagtgtacttggtcatacaggctacacccttttattccgcc 1080
S D E E G K V I Y L V I Q A T P F Y S A 328
tttaaacaccgaatgaaatgtaacaaggcagtgccgtttgtgataagacatgaggcc 1140
F K T P N E M V T R A V P F V I R H A A 348
aacgggtcacatagtagtgcgtggaccctcaatctgtaccgtacctgggttatctgcccaa 1200
N G H I E Y V D P Q S V P Y L G Y L P Q 368
gatcgttgcgataaagacgtattgtcactctaccaccctgaagatctccagtatctgcgc 1260
D L A D K D V L S L Y H P E D L Q Y L R 388
← TIS 2 ← CLD
acgggtgatgatacaaatgtcaagaagaaggcatgcccgaataatctaaaccttacaggatg 1320
T V Y D T I V K E E G M P K S K P Y R M 408
gttacacaaaatggcgattatgttcgctagagactgagtggtcgtcgtttattaaccgg 1380
V T Q N G D Y V R L E T E W S S F I N P 428
tgggtctaaagaactggagtttgcattggcaacatattcattctagaggggtcccacaaat 1440
W S K K L E F V I G K H I I L E G P T N 448
ccagacgtgtttcaaccttcggaccaaaaaagctcaaaagaactctctgaggccgatgaa 1500
P D V F Q P S D Q K S S K K L S E A D E 468
aaataaagcaaagatgctaaaaaagaaacataattcgggcaatgaatgagggtctcactaa 1560
K 469
gccagcagaattagctaagcagcagatgactaagcgtgaaaaaaaaaaaaaaaaaactcg 1620
aggtcgaca 1629

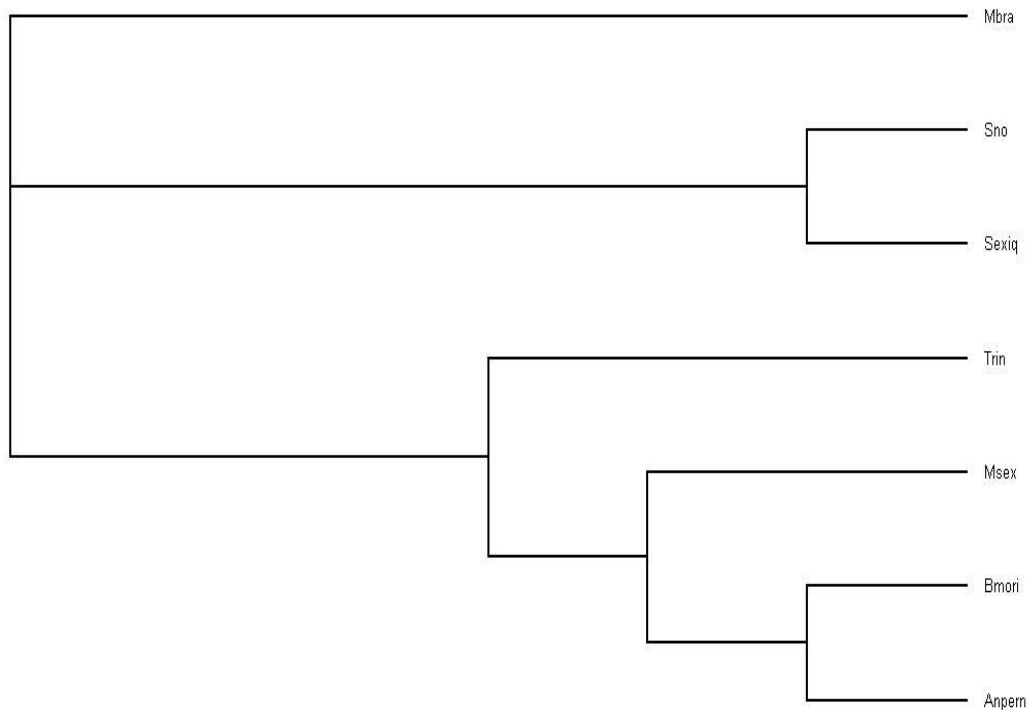
```

Εικόνα 2. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου *Snoper*. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο εμφανίζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης. Σημειώνονται μοτίβα του *period* που αντιστοιχούν σε λειτουργικές περιοχές της *D. melanogaster*. **NLS** (Nuclear Localization Signal): παρουσιάζεται μέσα σε περίγραμμα, **TIS** (Tim Interaction Sites, TIS 1 και TIS 2): παρουσιάζονται με τα αντίστοιχα βέλη, **PAS** (PER-ARNT-SIM) domains: παρουσιάζονται στα σκιασμένα γκρι κομμάτια, **CLD** (Cytoplasmic Localization Domain): παρουσιάζεται με το αντίστοιχο βέλος, **PAC** (PAS-Associated C-terminal) domain: παρουσιάζεται μέσα σε περίγραμμα στο σκιασμένο κομμάτι των PAS domains.

1.2. Σύγκριση ακολουθιών PER και φυλογενετική ανάλυση

Συγκρίνοντας την αμινοξική ακολουθία της SnoPER (NCBI, BLASTP) αποκαλύφθηκε ότι έχει σημαντική ομολογία με τις PER ακολουθίες που ταυτοποιήθηκαν από άλλα είδη εντόμων, όπως *Spodoptera exigua* (AEJ38224, 82%), *M. brassicae* (AAS49924, 84% identity), *A. pernyi* (AAK11644, 80% identity), *B. mori* (N BAD93177, 72 % identity) και *D. plexippus* (AA048719, 62% identity).

Κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δένδρο που βασίστηκε στις PERs διαφόρων εντόμων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο neighbour-joining. Το αποτέλεσμα της φυλογενετικής ανάλυσης συμφωνεί με τη δομή και διανομή των PERs. Η SnoPER βρίσκεται στην ίδια ομάδα με άλλα λεπιδόπτερα.



Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο (Bootstrap Neighbour-Joining Tree) που δημιουργήθηκε από την αντιστοίχιση των SnoPER ακολουθιών με γνώστες PERs πρωτεϊνικές ακολουθίες, μέσω της χρήσης του προγράμματος βιοπληροφορικής (CLUSTALX v1.8). Οι συντομογραφίες (σε παρένθεση) αυτών των πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι οι εξής: *S. nonagrioides* (Sno), *Mamestra brassicae*: (Mbr), *Bombyx mori*: (Bmo), *Spodoptera exigua* (Sexiq), *Trichoplusia ni* (Tni), *Manduca sexta* (Mse), *Antheraea pernyi* (Aperm).

1.3. Μελέτη έκφρασης του γονιδίου *Snoper* κάτω από φωτοπεριόδους LD16:8 και LD10:14

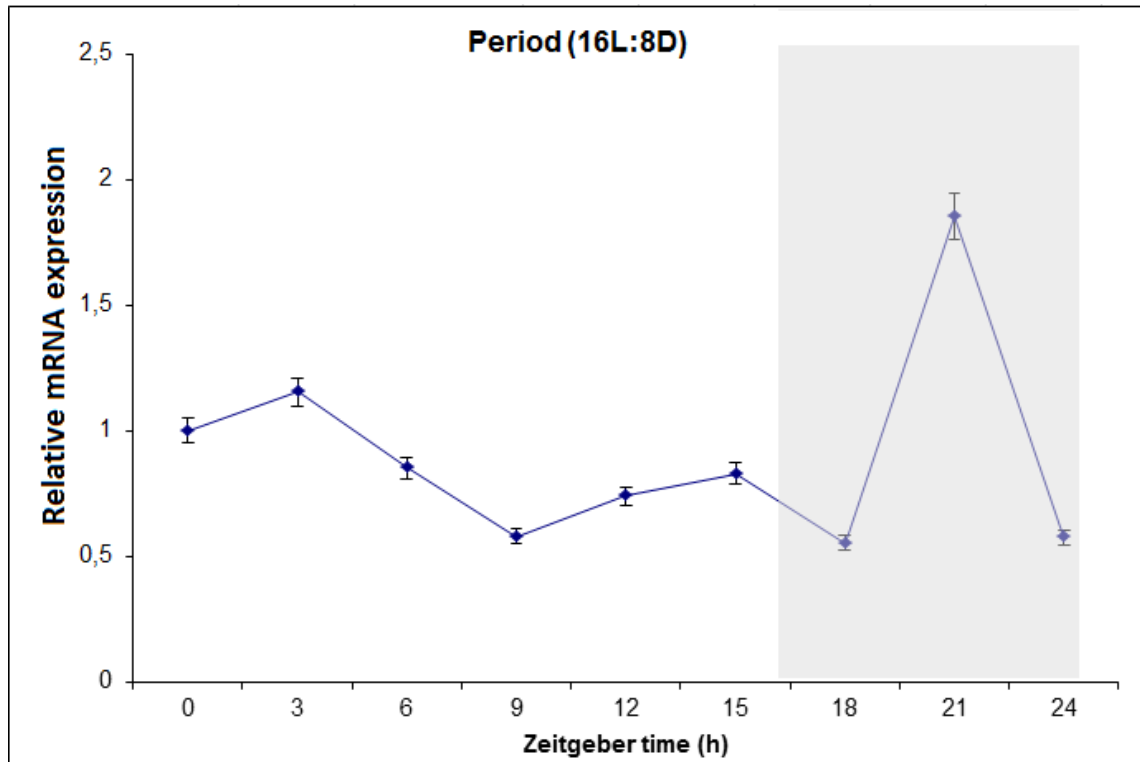
Για να εξετάσουμε εάν τα *Snoper* μετάγραφα ταλαντεύονται στη διάρκεια του εικοσιτετράωρου κύκλου, εξετάσαμε τα επίπεδα των mRNA σε κεφάλια προνυμφών κάτω από φωτοπεριόδους LD16:8 (κανονική ανάπτυξη) και LD10:14 (διάπαυση) με την τεχνική του Real-Time PCR. Οι προνύμφες συλλέχτηκαν μέσα σε ένα εικοσιτετράωρο κατά τις χρονικές στιγμές:

ZT 0, ZT3, ZT 6, ZT 9, ZT 12, ZT 15, ZT 18, ZT 21 και ZT24.

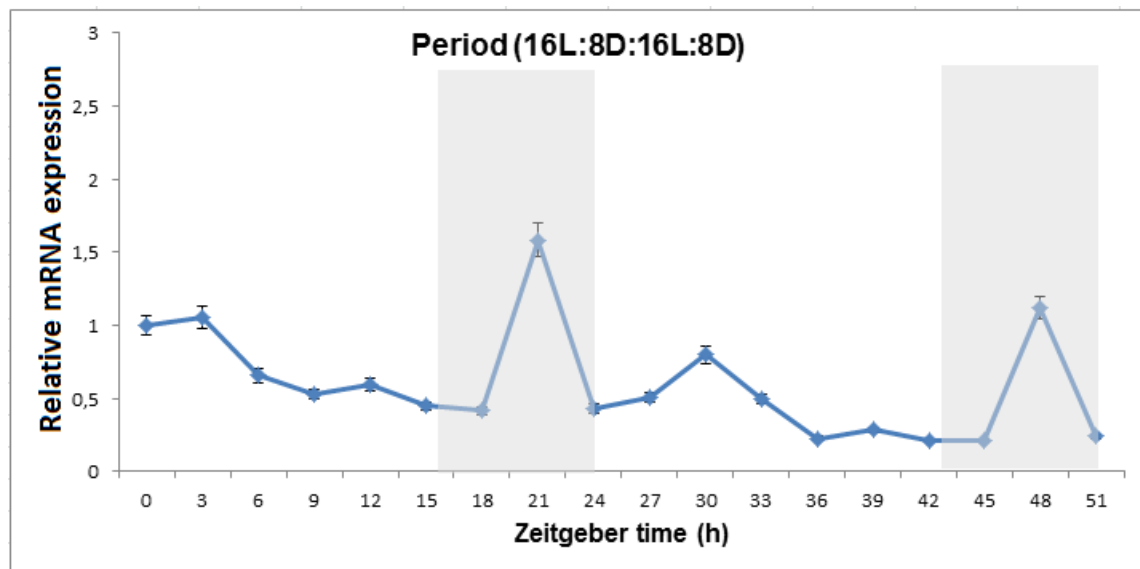
Zeitgeber time (ZT) 0: Είναι ο χρόνος έναρξης του φωτός.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 4, ένας καθαρά 24ωρος ρυθμός των *per* mRNA επιπέδων εμφανίστηκε κάτω από 16L:8D, 25 °C: Η έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η έκφραση του *Snoper* (Εικ. 4) ήταν ρυθμική και η ακρόφαση συνέβαινε στο ZT21, νωρίς τη νύχτα κάτω LD16:8. Παρόμοια αποτελέσματα ταλάντωσης εμφανίστηκαν και σε τριήμερες παρατηρήσεις (Εικ. 5). Δηλαδή υπάρχει επαναληψιμότητα της ταλάντωσης σε καθημερινή βάση.

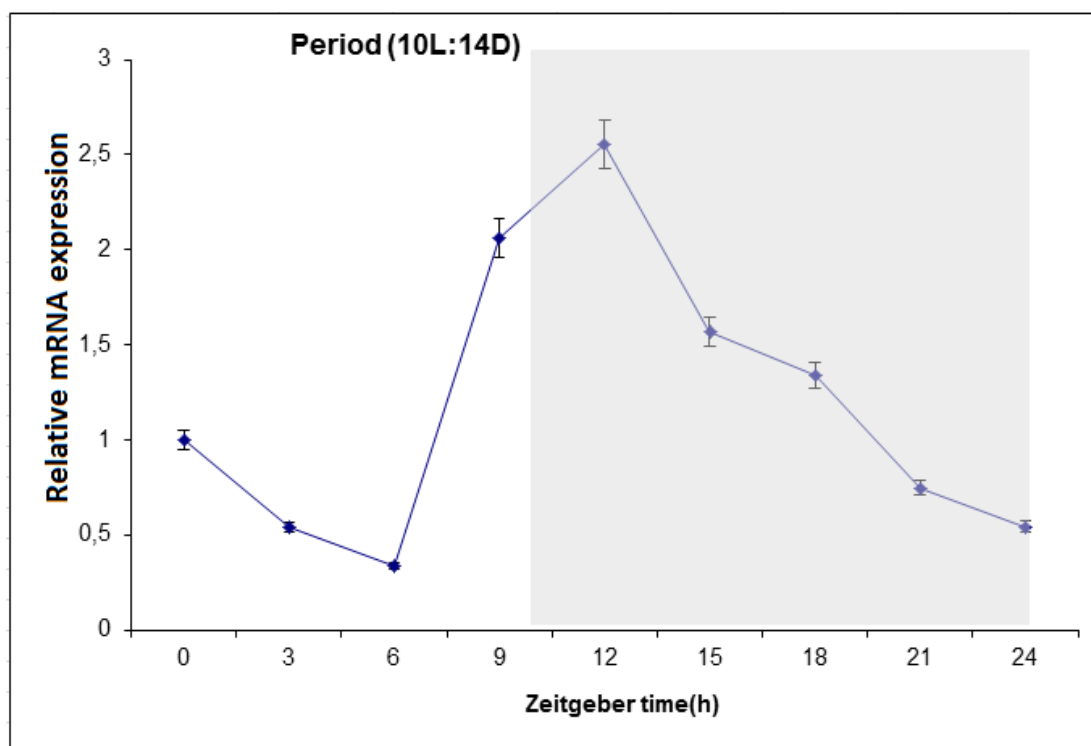
Κάτω από LD10:14 τα επίπεδα έκφρασης του *Snoper* είχαν ταλάντωση και το *peak* ήταν στις ZT12 (0–2 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης) (Εικ. 6). Τα επίπεδα έκφρασης του *Snoper* κάτω από LD16:8 στο ZT21 και κάτω από LD10:14 στο ZT12 ήταν στατιστικά σημαντικά (*Snoper* LD10:14, Tukey-test, $p < 0,05$; *Snoper* LD16:8, Tukey-test, $p < 0,5$). Κάτω από 16L:8D στους 25 °C, το πλάτος ταλάντωσης ήταν όμοιο με αυτό του 10L:14D, αλλά το *peak* άλλαξε στο ZT 21 (5 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης). Παρόμοια αποτελέσματα ταλάντωσης κάτω από LD10:14 εμφανίστηκαν και σε τριήμερες παρατηρήσεις (Εικ.7). Δηλαδή υπάρχει επαναληψιμότητα της ταλάντωσης σε καθημερινή βάση.



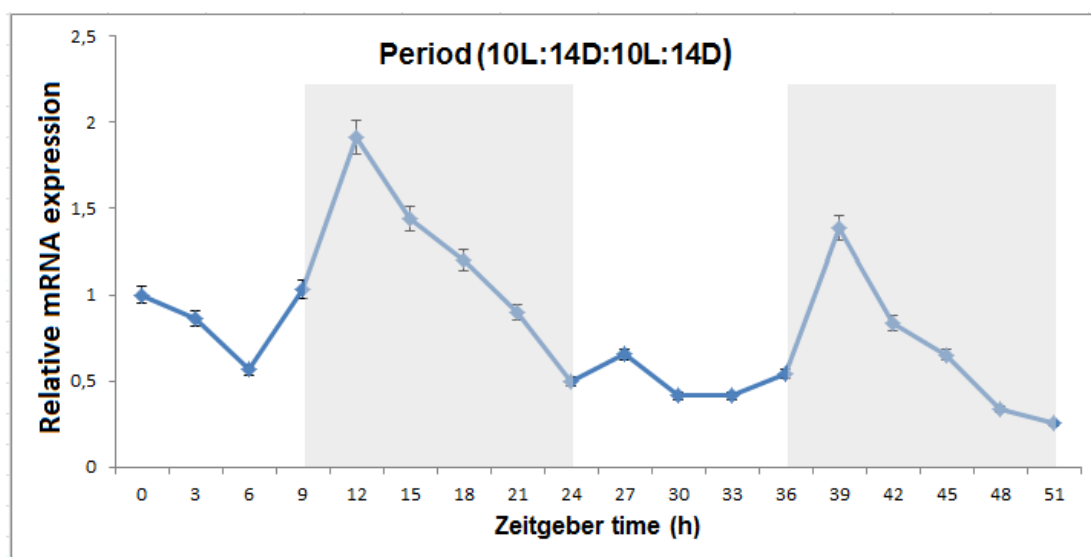
Εικ. 4. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snoper* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 5. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snoper* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.



Εικ. 6. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snoper* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 7. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snoper* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.

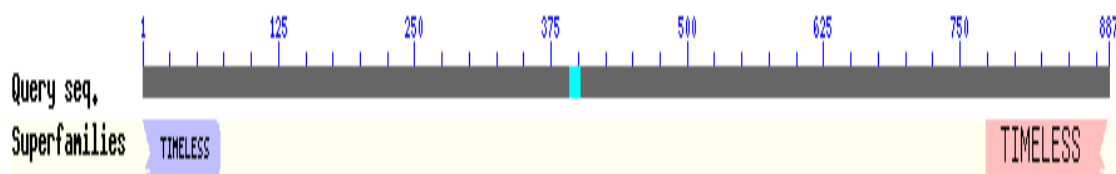
2. Το γονίδιο *timeless*

2.1. Η αλληλούχιση του *timeless*

Από κεφάλια προνυμφών της *S. nonagrioides*, που εκτράφηκαν σε συνθήκες 16L:8D, απομονώθηκε ένα cDNA 2803 bp (partial) ομόλογο του *Tim*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 778 αμινοξέων (GenBank accession number, DQ305401). Το γονίδιο το ονομάσαμε *SnoTim* (Εικ. 8). Η TIM πρωτεΐνη της *D. melanogaster* περιέχει τις περιοχές NLS, PER interaction site (PIS) και CLD (Saez and Young, 1996). Η παραγόμενη αμινοξική ακολουθία της SnoTIM δείχνει υψηλή ομοιότητα με την DmTIM, αλλά δεν δείχνει καμιά ομοιότητα με την DmTIM2 (Benna *et al.*, 2000). Οι περισσότερες από τις λειτουργικές περιοχές στην SnoTIM είναι υψηλά συντηρημένες. Η NLS έδειξε υψηλή ομοιότητα, 72% με την DmTIM και 83% με την ApTIM. Σε σχέση με την *D. melanogaster*, η PIS στην SnoTIM είχαν 67% και 42% ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο και το επίπεδο συντήρησης ήταν όμοιο με τη συντήρηση της TIS του PER (Πίν. 2).

Πίνακας 2. Αμινοξικές ομοιότητες (%) μεταξύ των επικρατειών των TIM στην *S. nonagrioides*, *D. melanogaster*, *B. mori* και *A. pernyi*.

Αμινοξικές ομοιότητες (%) των συντηρημένων τμημάτων της πρωτεΐνης TIM της <i>S. nonagrioides</i>			
	NLS	PIS 1	PIS 2
<i>B. mori</i>	83%	79%	77%
<i>A. pernyi</i>	83%	76%	76%
<i>D. melanogaster</i>	72%	67%	42%



Εικ. 8. Αμινοξική ακολουθία του TIM από το NCBI protein BLAST.

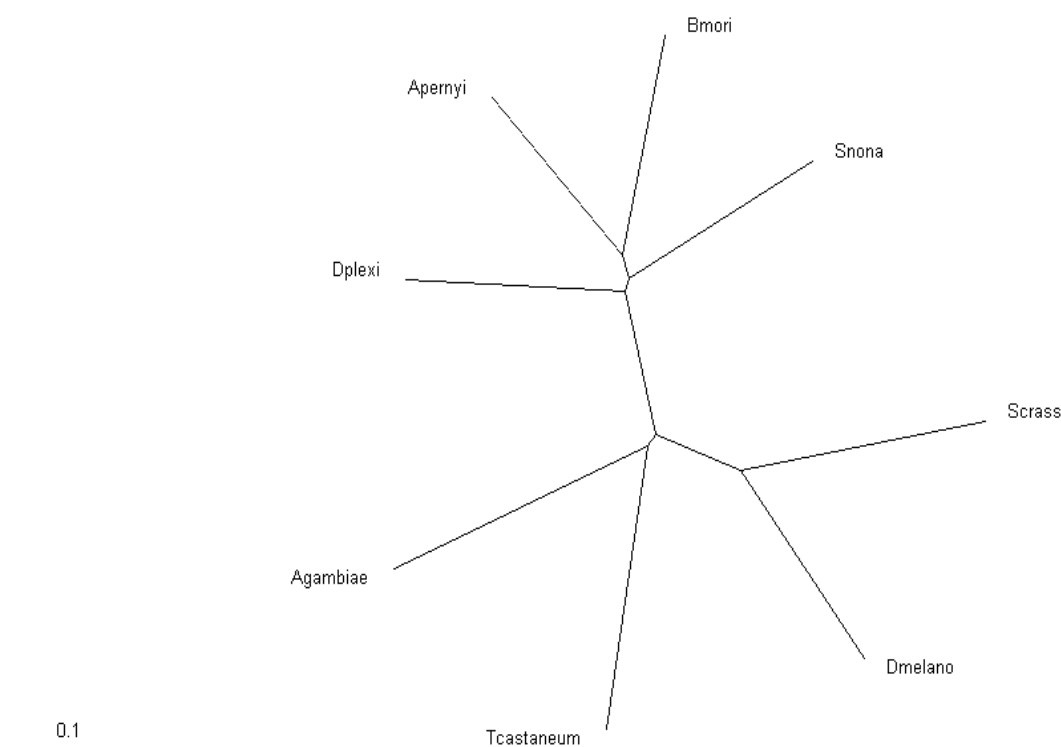
ggttttttatatttttcttcagaataaaatgggagcgttaacaaatgggttcaactaatagca 60
L L Y K D Q H V V T L H K L L N V W I E 26
M V Q L I A 6
tgttatatacaagaccacacatgttggttactctgcataaaacttctcaatgtgtggattgaa 120
gcctctttatgCGAAGgttcaaaaaataatgagagtaatacttctccaccagatagaggt 180
A S L C E S S K N N E S N T S P D R G 46
tgtgactcttcaccaatgtgtactactgaaacggcagctcagattcatcaaacactgggtggc 240
C D S S P M C T T E P T S D S S N T G G 66
agcggcaagagtaacgatgatccacaattctgaaaataaggattgggacgcgctcctctcag 300
S G K S N D D H N S E N K D W D A S S Q 86
atgaacaacaccagtgagaatggtaatgcaccattccgggacacctggacaaaaagagtcc 360
M N N T S E N G N A P F R T P G Q K E S 106
tatacgggatgacaaaaataactcattggaaaattccgcaataatatagtgcaactccgat 420
Y T D D K N N S L E I S D N N I V H S D 126
aatgggacagctatgtcttgagtagtgggcgaacagcttaaccgaaacaacatgaccac 480
N G T A M S C S S G E Q S N R N N H D H 146
tcttctggcaacatagaaaaccacccctgtgatttctgaaacatctgatgCGgttatggc 540
S S G N I E N H P V I S E T S D C G Y G 166
← PIS 1
acacaaatagaaaatcaggagtctatttctacatcaagcaatgaggatgacttaccgtca 600
T O I E N O E S I S T S S N E D D L F S 186
aagaacctgtccatcagaagcgcataaacctaaagcagaggggtgaataccaagggtgCGc 660
K K K P V H Q K P K Q R V N T K V R 206
gtgcaacccaagggtgtctccatgcaacggaagcgaaaaaaaatggcaagagagggc 720
V Q H Q G V S M H E R K R K K I A K R G 226
aaatctaacatacctaactcaaggattatcgcaacaacacctacagatgatgacatt 780
K S N I P N V Q G L S H N T P T D D I 246
gctaatgtcttaaaagagtaacactgtggatttctctgaaagatataacttgttagtc 840
A N V L L K E E Y T V D F L L K G Y N L L V 266
cagacgcttccataaccataactatcctaattcatttagaaaatagacacgctcgcacttc 900
Q T L H N Q I L S N L H L E I D T S H F 286
ttctggctgtcacttactctgaagtctcgcgacgcaaatcgaactgacttggagaaat 960
F W L V T Y F L K F A T Q I E L D L E N 306
gttatgctgctcctgtctatcgatatctgtcgtacttgcactcggaggagtgactta 1020
V S S V L S I D I L S Y L T A E G V N L 326
tgttaacaatttgaaactggccataaaactcgatggtaataattaaagcctaaacgtaag 1080
C E Q F E L A I K L D G N N L K P N V R 346
cgacttcaatttgggttactgtctataagggaaatagtacaagctatagatggtacaaa 1140
R L H L V V T A I R E I V Q A I D V Y K 366
aaagcttccacacactatgccacgaggataaaagcgccttctcaagttacaacttaaaatg 1200
K L P H L C H E D K D A L L K L Q L K M 386
← PIS 2
tgtgagaccgaagactcagatcacttcttctgctgctattgCGctcattacaactcCGaag 1260
C E T E E L R S L L V L L L R H Y N P K 406
tatcatcgaacaataatctacaggtatgcatagttacaaccacatattgctgatgttc 1320
Y H S K Q Y L Q D V I V T N H I L L M F 426
ttggacagtgcaatgaagtgtcCGgaatacaaaagggtccacgaatagcttgcataatc 1380
L D S A M K L P E Y K G S T N M L D H I 446
agacaatttctacatctgaaaataatgtaccagtagcggtgtctgctggaggactcCGc 1440
R Q F A T S E I M Y Q Y G L L L E D Y A 466
gctaacggagaggttctgcaacgactgtatattacactgatgcacatgtggggggagag 1500
A N G E F V N D C I F T L M H V G G E 486
cttgacagtttgatcacctgtctccagccaaagatttgaagacatttaacttccatttgg 1560
L D S L I T L F Q P K I L K T F T S I W 506
aagtcaagatttgagatttctgacagattggtccgatcttattgagtagtgataaatact 1620
K S E F E I C D D W S D L I E Y V I N T 526
ttcaacaaaaccctctctacaagatcagcgaacgttcgtattgaaactgagaat 1680
F L C K K P Q S L T A Q S T A N V R I E T E N 546
ttcgatgatcacagattggtaacaaagcccgactcagctccagtgacacaaaccacccg 1740
F D D I T M V P K P T V S P V T Q T T P 566
gccaaactgagggcagactgacagaaactctgactgtagtgtaactgtaactcctcc 1800
A N N E A E T A E R S A D C S V N C T S 586
aaaggaaggacggaagcaggtgggtcggaagatgaaatctcgtattggaattggaattat 1860
K G R T E T R W S E D E I S L L N W N Y 606
→
atgcagtgtagtgctctacactgacgtaacggcgaaatcatcagcgtgtataacgaagat 1920
M Q C S A L P D V I G E I I T L Y N E D 626
ggtatcgtttaaactcagagatctgttaattcaggagctttatacagagaatttgataaac 1980
G I V K S R D S V I Q E L Y T Q N L I N 646
caggaagattacaataaatatgtgaaaggagaaccgacagggatatacaaacgttacag 2040
Q E D Y N K Y V K G E T D R D I K T V Q 666
gttatgaaagaaatgagagataatgaaatgaatgaatggtgtgaaacagctaaccgaagat 2100
V M K E M R D N E I N K L C E Q L T Q D 686
ggaaagctcaagtttttagattgggtgcaaaaagattattagaaaactgttttgctaaa 2160
G K S K F L D W V Q K V L L E T C F A K 706
atatacgttgataaatatccagaaaagcgaagtggttataccacagatgaaatgaa 2220
I Y V D K L S R K S E S G Y T T D E N E 726
acaaaatgaacacactgaagaaatcgaatgatttacaatatattgtcccgggtctcatat 2280
T K L S T L K K S N D L H I L S P V S Y 746
cactcccttcacataatggaatgggttcttcgaagtcacacaaattcatagcacatttagc 2340
H S L H I M E W V L R S P Q I H S T F S 766
aaccttggattcccgcatccagatggatcactgtaacgaaactgcaatgctgctttg 2400
N L G F P H P D G Y H V N E N C N A A L 786
gagacaattcttcacaacattcctaacaagataaaacttgcggacatcctagtaggag 2460
E T I L H N I L T E D K Y L R T Y R R S 806
attagcttggcaaaaatatacaagaaagatctagtaccactgttaattcacgcaagaa 2520
I S F G Q N I K K D L V P L L I H A K E 826
gatgcaacgatagagctgttaattcgaataactagtaaaatttgacaattccaatagagtg 2580
D A T I E L L I R I L V N L T I P I E C 846
ttgctatctgtagacataattctagaaatgatttggaaagacatacagatattgaaata 2640
L L S V D I I S R N D F G R H T I F E I 866
aataacttggcttctccacaaagtagctttcagcaccagcgtgtaactaaaagtg 2700
N N L L S T K V A F T D Q R A T K K W 886
taatagactttttaagaaaaatgtggacagcaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcagaggtcga 2760
ca 2762

Εικ. 9. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου *SnoTim* (partial). Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των 886 κωδικονίων εμφανίζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης. Σημειώνονται μοτίβα του *tim* που αντιστοιχούν σε λειτουργικές περιοχές της *D. melanogaster*. NLS (σκιασμένο), PER interaction domain (PIS-1), PIS-2.

2.2. Σύγκριση ακολουθιών TIM και φυλογενετική ανάλυση

Συγκρίνοντας την αμινοξική ακολουθία της SnoTIM (NCBI, BLASTP) αποκαλύφθηκε ότι έχει σημαντική ομολογία με τις TIM ακολουθίες που ταυτοποιήθηκαν από άλλα είδη εντόμων, όπως *Spodoptera exigua* (AEJ38224, 82%), *M. brassicae* (AAS49924, 84% identity), *A. pernyi* (AAK11644, 80% identity), *B. mori* (N BAD93177, 62 % identity) and *D. plexippus* (AA048719, 62% identity).

Κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δένδρο (Εικ. 10) που βασίστηκε στις TIMs διαφόρων εντόμων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο neighbour-joining. Το αποτέλεσμα της φυλογενετικής ανάλυσης συμφωνούν με τη δομή και διανομή των TIMs. Η SnoTIM βρίσκεται στην ίδια ομάδα με άλλα λεπιδόπτερα.



Εικόνα 10. Φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα (Bootstrap Neighbour-Joining Tree) που δημιουργήθηκε από την αντιστοίχιση των SnoTIM ακολουθιών με γνώστες TIMs πρωτεϊνικές ακολουθίες, μέσω της χρήσης του προγράμματος βιο-πληροφορικής (CLUSTALX v1.8).

2.3. Μελέτη έκφρασης του γονιδίου *Snotim* κάτω από φωτοπεριόδους

LD16:8 και LD10:14

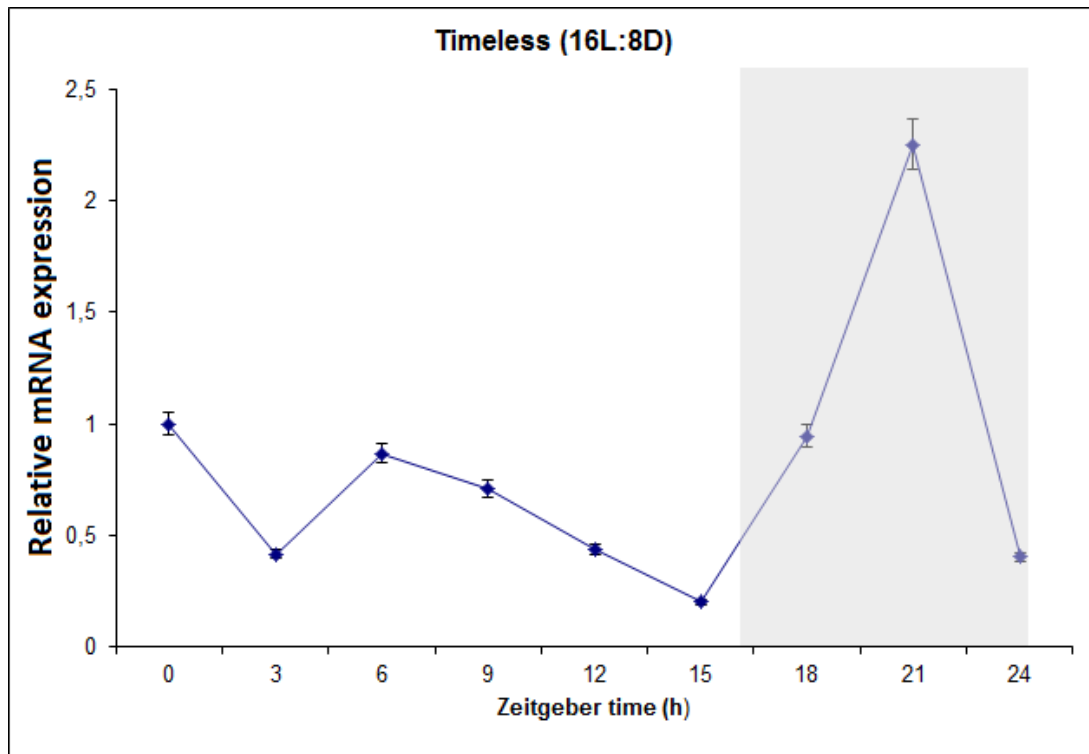
Για να εξετάσουμε εάν τα *Snotim* μετάγραφα ταλαντεύονται στη διάρκεια του εικοσιτετράωρου κύκλου, εξετάσαμε τα επίπεδα των mRNA σε κεφάλια προνυμφών κάτω από φωτοπεριόδους LD16:8 (κανονική ανάπτυξη) και LD10:14 (διάπαυση) με την τεχνική του Real-Time PCR. Οι προνύμφες συλλέχτηκαν μέσα σε ένα εικοσιτετράωρο κατά τις χρονικές στιγμές:

ZT 0, ZT3, ZT 6, ZT 9, ZT 12, ZT 15, ZT 18, ZT 21 και ZT24.

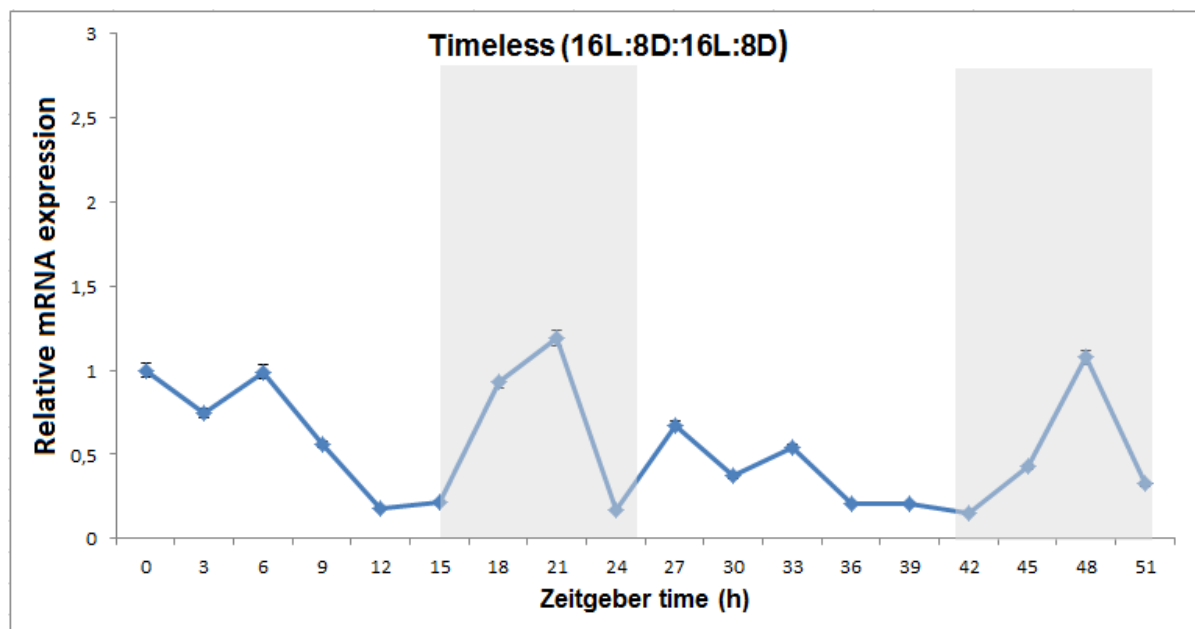
ZT 0 Zeitgeber time (ZT) 0: Είναι ο χρόνος έναρξης του φωτός.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η έκφραση του *Snotim* ήταν ρυθμική και η ακρόφαση συνέβαινε νωρίς τη νύχτα κάτω από LD10:14 και LD16:8. Κάτω από 16L:8D (Εικ. 11) στους 25 °C, το πλάτος ταλάντωσης ήταν όμοιο με αυτό του 10L:14D (Εικ. 13) αλλά το peak άλλαξε στο ZT 21 (5 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης). Παρόμοια αποτελέσματα ταλάντωσης κάτω από LD10:14 και LD16:8 (Εικ. 12, 14) εμφανίστηκαν και σε διήμερες παρατηρήσεις. Δηλαδή υπάρχει επαναληψιμότητα της ταλάντωσης σε καθημερινή βάση, τόσο σε συνθήκες μεγάλης ημέρας όσο και μικρής.

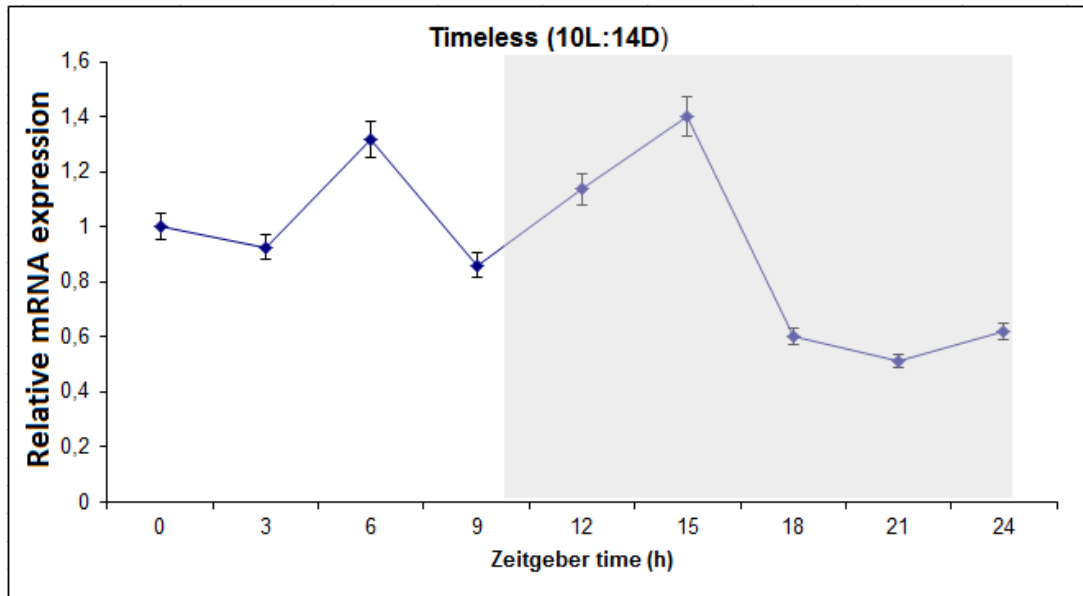
Τα επίπεδα έκφρασης του *Snotim* στο ZT15 κάτω LD10:14 και στο ZT21 κάτω από LD16:8 ήταν στατιστικά σημαντικά (*Snotim* LD10:14, Tukey-test, $p <$, $p < 0,01$; *Snotim* LD16:8, Tukey-test, $p < 0,05$). Η ταλάντωση του *tim* mRNA σε φωτοπερίοδο LD10:14, εμφανίζει ένα peak στο ZT 15 (0–5 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης). Στα αποτελέσματα μας, το πλάτος του *tim* mRNA ήταν σταθερά μετριασμένο κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας. Στη *Drosophila*, το peak των *per* και *tim* mRNAs δεν επηρεάζεται από τη φωτοπερίοδο.



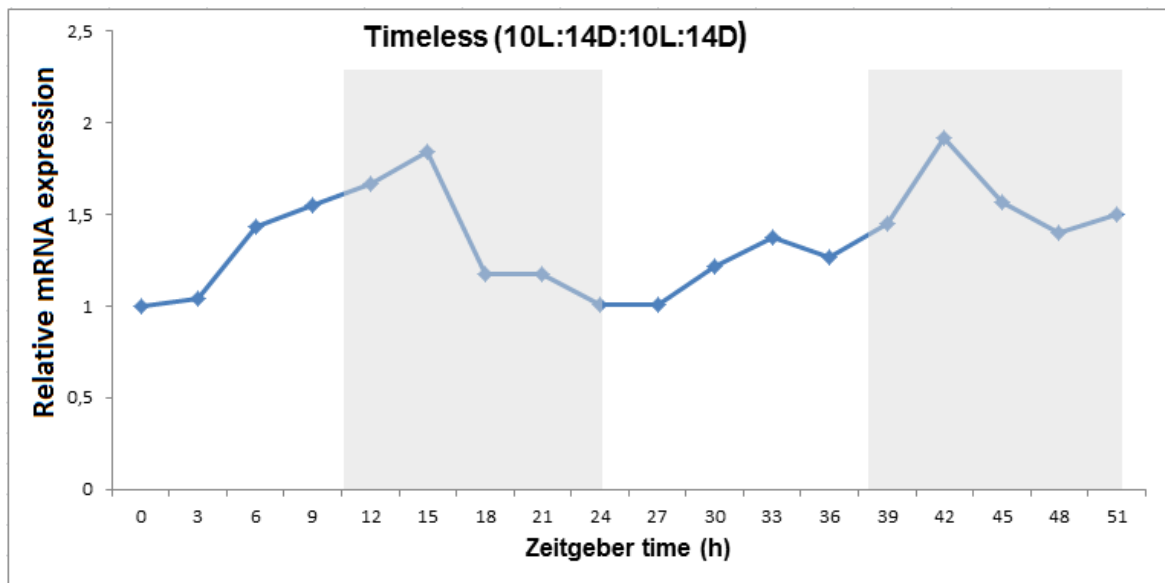
Εικ. 11. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snotim* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 12. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snotim* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία σε διάρκεια 2 ημερών.



Εικ. 13. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snotim* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



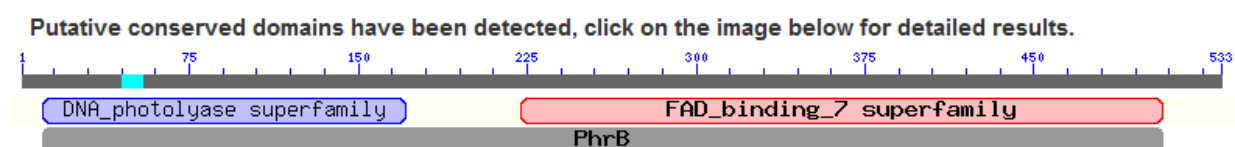
Εικ. 14. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snotim* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.

3. Το γονίδιο *cry*

3.1. Κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του *Snocry1* και *Snocry2*

Για να μελετήσουμε το μοριακό μηχανισμό του κερκαδικού ρολογιού της *S. nonagrioides*, από κεφάλια προνυμφών της κλωνοποιήσαμε δύο cDNA, που χαρακτηρίστηκαν ως *Snocry1* και *Snocry2*. Το *Snocry1* cDNA (GENBANK accession number: DQ243706) έχει μέγεθος 1836 bp, ενώ το *Snocry2* cDNA (GENBANK accession number: DQ243705) και έχει μέγεθος 741 bp. Το *Snocry1* είναι όμοιο με το *cry1* της *D. melanogaster* και *Antheraea pernyi*.

Το *Snocry1* περιέχει μια 5'-terminal untranslated region (UTR) από 103 bp, μια 3'-terminal UTR από 73 bp με μια poly (A) ουρά, και ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) από 1584 bp, που κωδικοποιεί ένα πολυπεπίδιο 528 αμινοξικών καταλοίπων (Εικ. 16). Η μοριακή μάζα της προβλεπόμενης πρωτεΐνης SnoCRY1 ήταν 59.6 kDa, και το υπολογισμένο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 8.33. Επιπλέον, υπάρχουν κάποιες θέσεις μετα-μεταγραφικής τροποποίησης (post-translational modification sites), περιλαμβάνοντας τρεις θέσεις φωσφορυλίωσης πρωτεΐνης κινάσης C, δέκα θέσεις φωσφορυλίωσης καζεΐνης κινάσης II, μια θέση φωσφορυλίωσης τυροσίνης κινάσης και τέσσερις θέσεις N-myristoylation sites (Εικ. 16).



Εικ. 15. Αμινοξική ακολουθία του CRY1 από το NCBI protein BLAST.

```

gtcgacctcgagttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt 60
tgaggacgcattcctctctcaaacaccagcgacacgttccttcgttttggaggaagcccgat 120
ttgaaatccaacaagtttggtggataaccggttccccgtaacaatggttgggggaagtatc 180
M V G G S I 6
DNA Photolyase Domain
ctttggttcaaaaacggggtgogcccgcatgacaacccctctttacattctgggctaaaa 240
L W F K N G V R P H D N P S L H S G L K 26
aaaaaagggttcccctcttccccatatttatcttccaaggagaaaactgggggacaaag 300
K K G V P L F P I F I F Q G E T G G T K 46
gggggoggtacaatcgatgggggatcttctggaagctcttgatgacctggacaaccog 360
G G G A G Y N R M G D L L E A L D D L D N P 66
ctaaagaagcatggggccgactaatcctgttgaaaggaaagcccaatggcctgttcaaa 420
L K K H G G R L I L L K G K P N G L F K 86
aaactttgggaggaattcggcatccgtaagctctgcttccaacaaaatgggagccagtg 480
K L W E E F G I R K L C F Q Q K W E P V 106
gggggogctcgcgacaaccogcgtcaaaagtgctgcaaggaatcggcgcggtctgcaag 540
G G A R D N R V K S A C K E I G A V C K 126
gaatatgtgtccccctttatgggagcccgaccocggccttaaagctaaccggggggtac 600
E Y V S P P L W E P D P G L K A N G G I 146
ccccctgacctacaaaatggtcttgcataccgtagogactattgggggatccccoggg 660
P P L T Y Q M F L H T V A T I G D P P R 166
gogggoggggaaatcgaactccccgggagtgcaagttgggagctctgcccggacagcttctac 720
A G G E I D S P G V K F G S L P D S F Y 186
caagaatttacgggctttgataagactccaaaccogaagacctaaggcgtgttccttgag 780
Q E F T G F D K T P K P E D L G V F L E 206
FAD Binding Domain
aacgaggacgtcccgaagatccgctgggtggggcggcagaccactgcgcttaaacagatg 840
N E D V P K I R W V G G E T T A L K Q M 226
cagcaacggcttgccgtcaagtagcagacaccttctgaggggctcactacttgcgacacac 900
Q Q R L A V K Y E T F L R G S Y L P T H 246
ggtaaccgggacttattgggacgtcccatatcattgagtcgggccctgcgcttttggatgt 960
G N P D L L G R P I S L S P A L R F G C 266
ctctccgtcaggagacttctgctggtcagtagcaggacactattccgtgaggtgcatcagggg 286
L S V R S F C V S V Q D L F R E V H G 306
cgccctcgctacccaatccgcttctcattttataaacaggccagttaatttggcgtgagtat 1080
R L A T Q S A S H F I T G Q L I W R E Y 306
ttctacacgatgagcgtgaacaaccctaactacggacagatgagtggaaccctatctgt 1140
F Y T M S V N N P N Y G Q M S G N P I C 326
ttggatattccctggaagaaccocgggagatgagttgcagagatgggtcgaaggccgc 1200
L D I P W K N P E G D E L Q R W V E G R 346
accggtttcccattcgttagacgcggccatgcgccaacttcgaacagaaggctggctgcac 1260
T G F P F V D A A M R Q L R T E G W L H 366
cacgtggcccgaacactgtggcgcttctccttactcgcggaacactctggctgctggtg 1320
H V A R N T V A F F L T R G T L W L S W 386
gaacacggactgaaccatttctcaagtagcgttagtgctgactggtcagtgctggcc 1380
E H G L N H F L K Y L L D A D W S V C A 406
ggcaactggatgtgggtatcgtcctcagcgttcgaagcactcctggactcaggcgagtg 1440
G N W M W V S S S A F E A L L D S G E C 426
gcctgccccgtagcggctgggacagcactggaccggcgagtagcgtgagggcgtac 1500
A C P V R L G F L D P S G E Y V R R Y 446
gtgcccggagctgacgcgtatgcctgtggaatacatttatgaaccatggaaggcacctatc 1560
V P E L T R M P V E Y I Y E P W K A P I 466
gacgtacaagagcgtgctcctgtataataggcaaggattaccccgccccgggtggtaac 1620
D V Q E R A S C I I G K D Y P A P V V N 486
catctggctcgtgcacagaggaacaagaatgctatgaaggaactgctcatattttacaa 1680
H L V A A Q R N K N A M K E L R H I L Q 506
aaggctcctccccattgctgcccctcctcagaagacgaaatccggcaattcatgtggctc 1740
K A P P H C C P S S E D E I R Q F M W L 526
aacgagttaatgacttacggaagtagaagccttatgggttaggtgaatgtcaaggtaagaaa 1800
N E * 528
aaaaaaaaaaaaaaaaaactcgaggtcgaca 1835

```

Εικ. 16. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου *SnoCry1*. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των 533 κωδικονίων εμφανίζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **tga**: κωδικόνιο λήξης; **ataaaa**: σημείο πολλαδενυλίωσης. Σημειώνονται λειτουργικά μοτίβα του *cryptochrome* αντίστοιχα με αυτά της *D. melanogaster*. **DNA Photolyase Domain** (γκρι χρώμα), **FAD (Flavin-Adenine Dinucleotide) binding domain of DNA photolyase**.

3.2. Σύγκριση ακολουθιών CRY και φυλογενετική ανάλυση

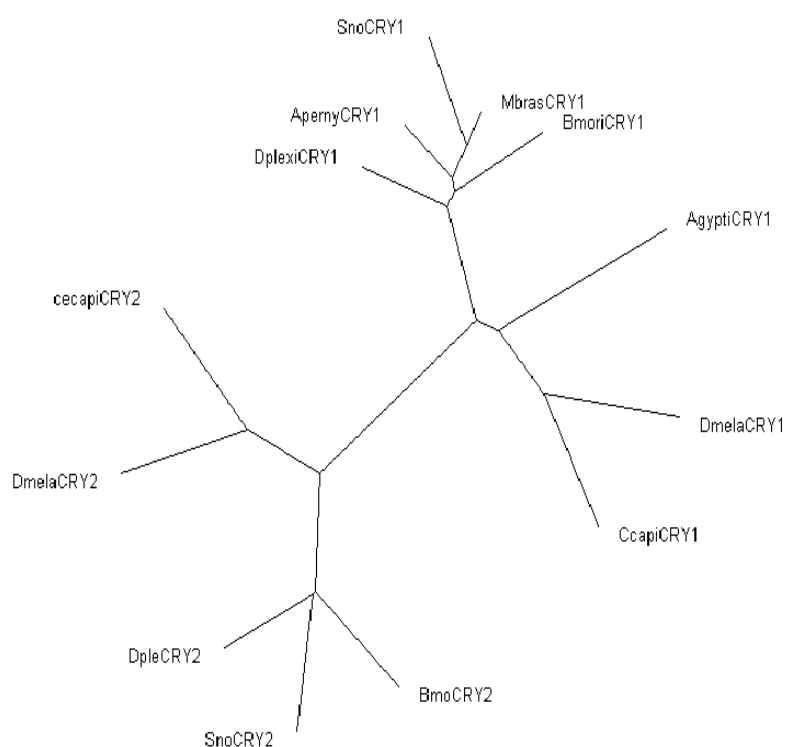
Συγκρίνοντας την αμινοξική ακολουθία της SnoCRY1 (NCBI, BLASTP) αποκαλύφθηκε ότι έχει σημαντική ομολογία με τις CRY1 ακολουθίες που ταυτοποιήθηκαν από άλλα είδη εντόμων, όπως *S.littoralis* (ABQ65680.1, 86% identity), *M. brassicae* (AAY23345.1, 86% identity), *A. pernyi* (AAK11644.1, 80% identity), *B. mori* (NP_001182628.1, 78% identity) and *D. plexippus* (AAX58599.1, 75% identity). Πολλαπλή στοίχιση απεκάλυψε ότι η N-terminus της πρωτεΐνης έδειξε υψηλότερη συντήρηση στην ανάλυση των SnoCRY1 ακολουθιών, ενώ οι C-terminal είχαν μικρότερα επίπεδα συντήρησης. Οι συντηρημένες περιοχές της SnoCRY1 περιέχουν επικράτειες DNA φωτολυάσης (photolyase domains) και επτά επικράτειες πρόσδεσης FAD (FAD binding) οι οποίες είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ διαφόρων CRYs (Εικ. 16).

Κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δένδρο που βασίστηκε στις CRYs διαφόρων εντόμων, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο neighbour-joining. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι CRYs των εντόμων μπορεί να ταξινομηθούν σε δύο υποοικογένειες. Η SnoCRY1 και SnoCRY2 ανήκουν στις CRY1 και CRY2 υποοικογένειες, αναλογικά (Εικ. 17). Το αποτέλεσμα της φυλογενετικής ανάλυσης συμφωνεί με τη δομή και διανομή των CRYs.

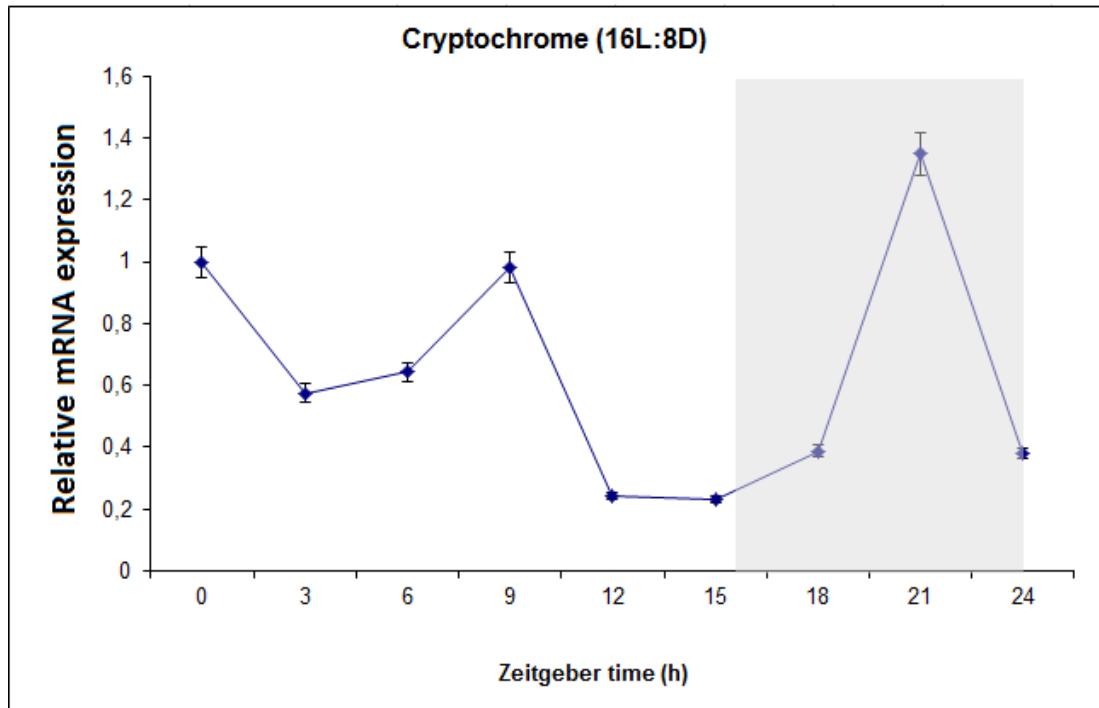
3.3. Μελέτη έκφρασης *Snocry1* κάτω από φωτοπερίόδους LD16:8 and LD10:14

Για να καθορίσουμε εάν τα μετάγραφα των *Snocry1* ταλαντεύουν με κερκαδικό ρυθμό, εξετάσαμε την έκφραση του γονιδίου της *S. nonagrioides*, κάτω από δύο διαφορετικές φωτοπεριόδους, 16L8D και 10L14D. Ένας καθαρά 24ωρος ρυθμός των *Cry* mRNA επιπέδων εμφανίστηκε κάτω από 16L8D, 25 °C (εικ. 18). Η έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Όπως φαίνεται στην εικ. 18, το επίπεδο έκφρασης του *Snocry1* κάτω από 16L8D συνθήκες εμφάνισε σημαντική διαφορά μεταξύ διαφορετικών χρονικών σημείων, εμφανίζοντας peak στο ZT21 και χαμηλότερο σημείο στο ZT12 (Tukey-test, $P < 0.01$). Η ταλάντωση του *Cry* mRNA εμφάνισε ένα peak στο ZT 21 (5 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης). Κάτω από 16L8D στους 25 °C, το πλάτος ταλάντωσης του *cry* mRNA ήταν όμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στη *Drosophila*. Ένας καθαρά 24ωρος ρυθμός των *Cry* mRNA επιπέδων εμφανίστηκε κάτω από 10L14D, 25 °C (Εικ. 20). Η

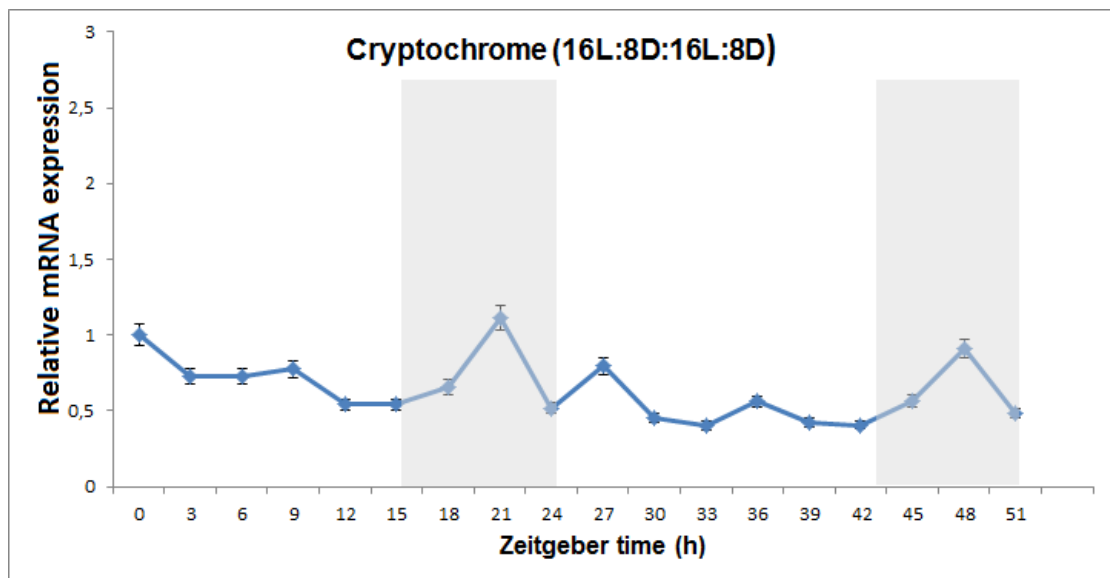
έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Η ταλάντωση του *Cry* mRNA εμφανίζει ένα peak στο ZT 12 (2 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης). Όπως φαίνεται στην εικ. 20, το επίπεδο έκφρασης του *Snocry1* κάτω από 10L14D συνθήκες εμφάνισε σημαντική διαφορά μεταξύ διαφορετικών χρονικών σημείων, εμφανίζοντας peak στο ZT12 και χαμηλότερο σημείο στο ZT24 (Tukey-test, $P < 0.05$). Παρόμοια αποτελέσματα ταλάντωσης κάτω από LD16:8 και LD10:14 (Εικ. 19, 21) εμφανίστηκαν και σε διήμερες παρατηρήσεις. Δηλαδή υπάρχει επαναληψιμότητα της ταλάντωσης σε καθημερινή βάση, τόσο σε συνθήκες μεγάλης ημέρας όσο και μικρής.



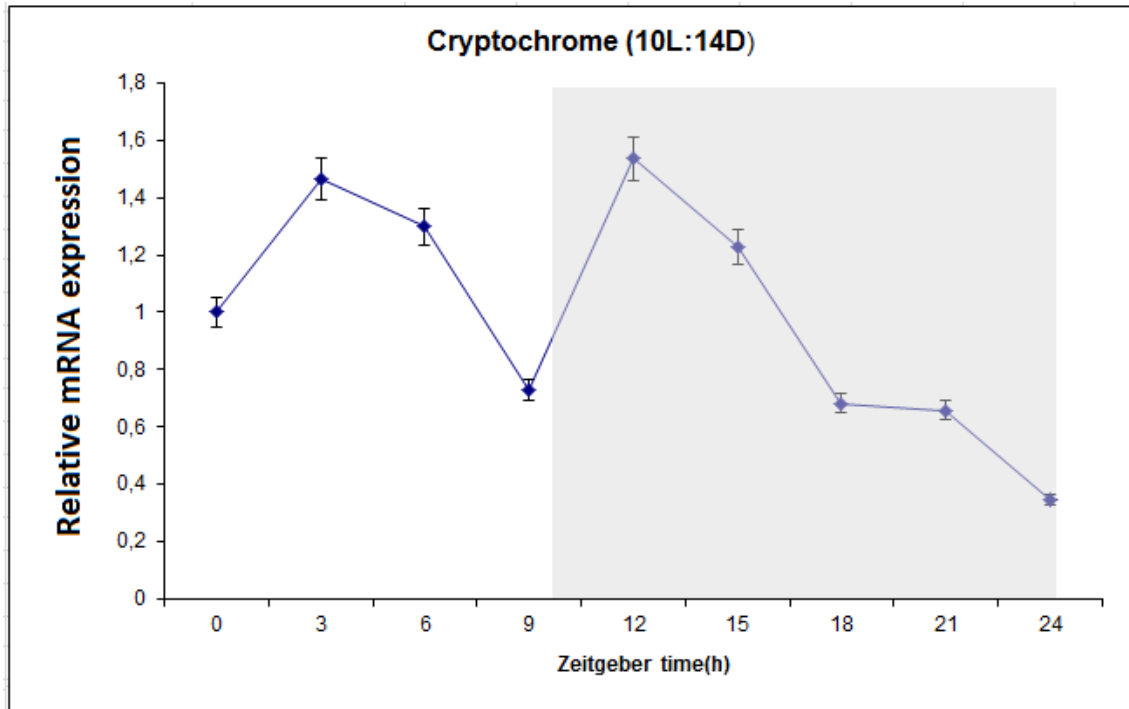
Εικόνα 17. Φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα (Bootstrap Neighbour-Joining Tree) που δημιουργήθηκε από την αντιστοίχιση των SnoCRY1 και SnoCRY2 ακολουθιών με γνώστες CRYs πρωτεϊνικές ακολουθίες, μέσω της χρήσης του προγράμματος βιο-πληροφορικής (CLUSTALX v1.8). Οι συντομογραφίες (σε παρένθεση) αυτών των πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι οι εξής: *Mamestra brassicae*: (Mbr); *Bombyx mori*: (Bmo); *S. littoralis* (ABQ65680.1, *M. brassicae* (AAY23345.1), *A. pernyi* (AAK11644.1.), *B. mori* (NP_001182628.1) και *D. plexippus* (AAX58599.1).



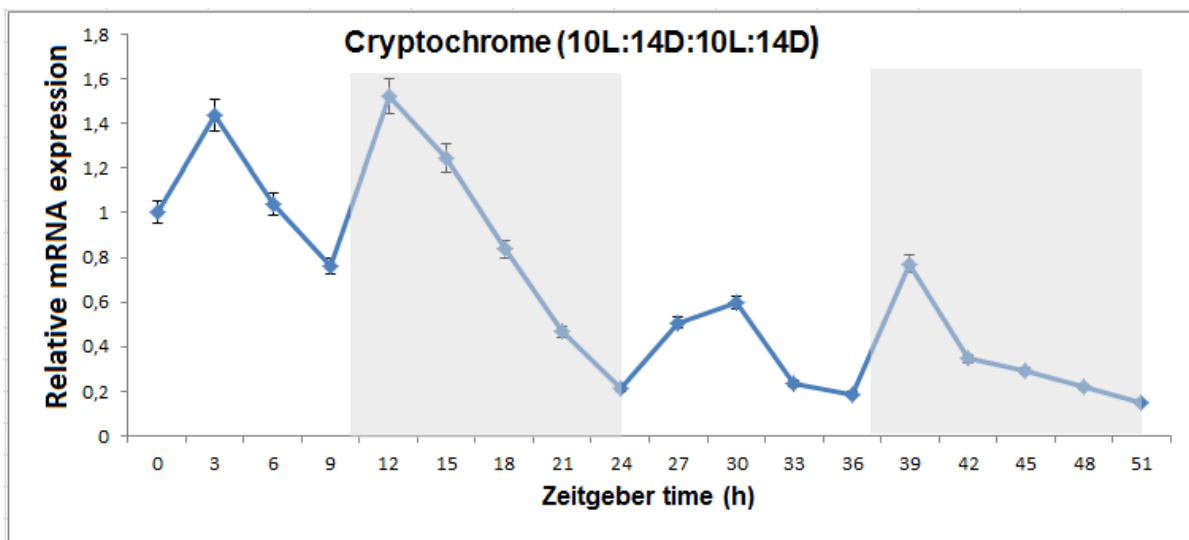
Εικ. 18. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocry1* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 19. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocry1* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.



Εικ. 20. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocry1* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 21. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocry1* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.

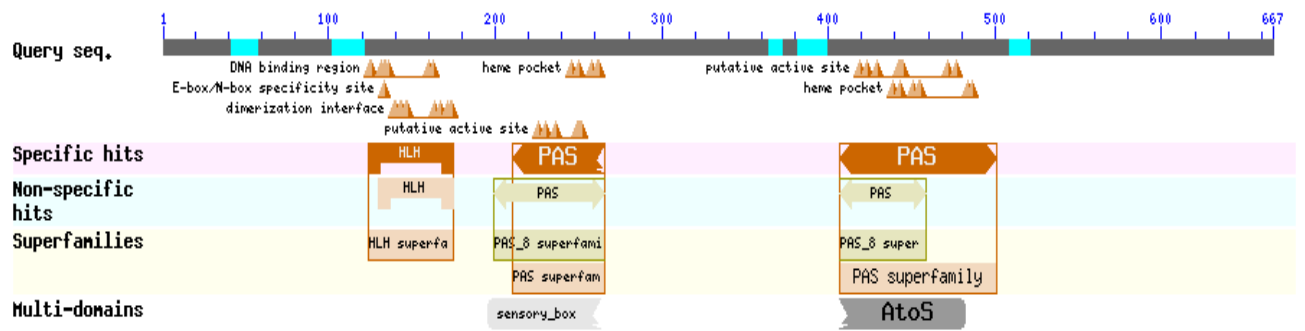
4. Το γονίδιο *cycle*

4.1. Κλωνοποίηση και αλληλούχιση του γονιδίου *cycle*

Για να μελετήσουμε το μοριακό μηχανισμό του κερκαδικού ρολογιού, απομονώσαμε cDNA κλώνους από τα *cycle* ομόλογα της *S. nonagrioides* με primers που κατασκευάστηκαν βασισμένοι στη συντηρημένη αμινοξική ακολουθία από σπονδυλωτά και έντομα και με τη στρατηγική 5' και 3'RACE. Το *Cyc* cDNA της *S. nonagrioides* (*SnoCyc*, GenBank/EMBL/DDBJ Accession no. DQ305400, Εικ. 22) αποτελείται από 2412 bp νουκλεοτιδίων με 5' - και 3' - αμετάφραστες περιοχές (UTR) των 216 bp και 192 bp, αναλογικά. Το *SnoCyc*, προβλέπεται να κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 667 αμινοξέων. Η ολική δομή του *SnoCyc* φαίνεται στην εικόνα 23.

Οι αλληλουχίσεις των συντηρημένων περιοχών των *SnoCYC* συγκρίθηκαν με εκείνα άλλων εντόμων. Η *SnoCYC* περιέχει μία βασική έλικα-βρόχο- έλικα (basic helix-loop-helix (bHLH) περιοχή για πρόσδεση στο DNA (Darlington *et al.*, 1998), μια PAS-A και PAS-B περιοχές διμερισμού, οι οποίες εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και μεσολαβούν στην πρόσδεση στο ετεροδιμερή partner CLK (Darlington *et al.*, 1998). Ένα BLAST στις βάσεις δεδομένων έδειξε αμινοξική ομοιότητα 52–68% μεταξύ άλλων γνωστών πρωτεϊνών εντόμων. Μεταξύ των λειτουργικών μοτίβων (Πίν. 3), η PAS-A έχει ομοιότητα of 76–91%, ενώ η bHLH και PAS-B έχουν υψηλή ομοιότητα 90–93% και 61–94%, αναλογικά, με άλλα είδη εντόμων, γεγονός που δείχνει το συντηρημένο λειτουργικό τους ρόλο (Πίν. 3). Είναι ενδιαφέρον ότι, όπως στα πιο γνωστά *CYC* των εντόμων, αλλά όχι στη *D. melanogaster* *CYC* (*DmCYC*), η C terminal της *SnoCYC* έχει μια *BMAL1* C-τερματική περιοχή (*BCTR*, Εικ. 23), η οποία δείχνει δυνατότητα μεταγραφικής δραστηριότητας *in vitro* (Chang and Reppert, 2003). Η επικράτεια *BCTR* έχει επίσης υψηλή ομοιότητα (69–82% identity) με άλλα γνωστά *CYC* εντόμων (Πίν. 3).

Κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δένδρο με ακολουθίες άλλων γνωστών *CYC* από διάφορα είδη εντόμων και απεκάλυψε τη στενή σχέση μεταξύ *S. nonagrioides* και άλλων λεπιδοπτέρων (Εικ. 24).



Εικ. 22. Αμινοξική ακολουθία του CYCLE από το NCBI protein BLAST.

Πίνακας 3. Αμινοξικές ομοιότητες (%) μεταξύ των επικρατειών των CYC στην *S. nonagrioides*, *D. melanogaster*, *B. Mori*, *D. plexippus* και *A. pernyi*.

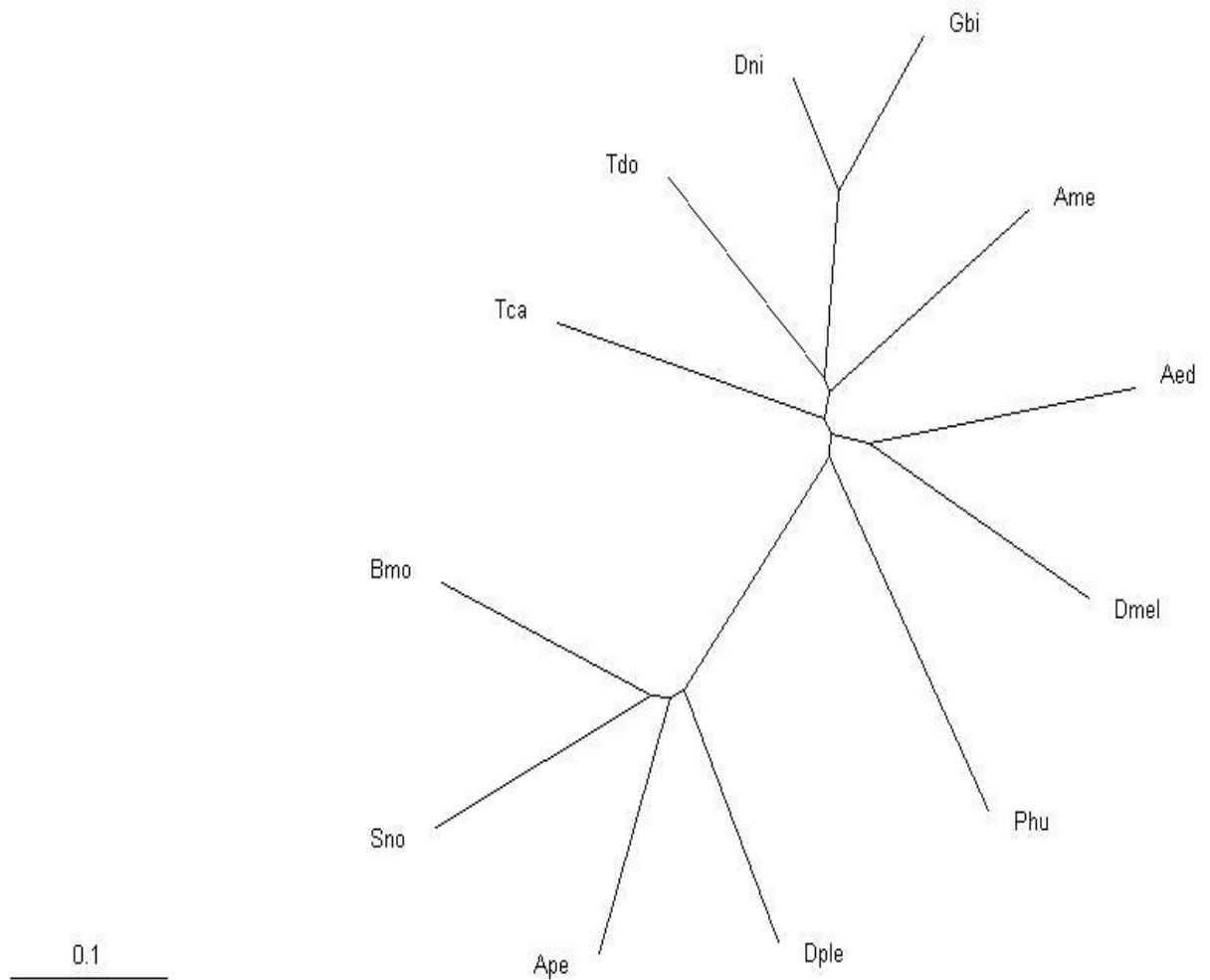
Αμινοξικές ομοιότητες (%) των συντηρημένων τμημάτων της πρωτεΐνης SnoCYC				
	bHLH	PAS A	PAS B	BCTR
<i>B. mori</i>	93%	91%	94%	82%
<i>D. plexippus</i>	87%	80%	88%	79%
<i>A. pernyi</i>	96%	87%	77%	82%
<i>D. melanogaster</i>	90%	76%	61%	69%


```

gaacaagtatTTTTTccatcacttcgtgtgtcagttttaattatataaaaattttgattcg 60
gcttttgaagtgggtgtttaaagtccagttatattataaacttacttataaaaacttttctgtg 120
tttgggtgatactttctcaagttgttaaccagttgtgtgataataatccgacgaatta 180
ttaagttcttgaagtttccatgcttcatatcaagaaatggcgagatttttccaacgagcct 240
M A D F S N E P 8
aaaacttcacagtgtagaccaggcgagcgcgagcggcaccggcgtagcagctaacagcg 300
K T S Q C D Q A S A S A A P A Y E L T A 28
ggcggcgagtagcgtgctgagtcgctggcagcttagcgcacgcgagcagatccgccc 360
G G G G A C A E S P G T L A H A Q H P P 48
cccatgcagcagtcctcgcaccaccatgaccacgcgaagagaaaaacttcacagctcgc 420
P M Q Q S S H H H D P R K R K T S Q Y S 68
gagagttatgatgtgtcagctgagctgctgactgggtgtaccgcccggctccaatgcat 480
E S Y D V S S C D A A L G V P P A P M H 88
gtggcagccagcgcacacgcgaagagaaagccgtcttcttacggtacggccagcgcgtac 540
V A A S A T R K R K P S S Y G T A S A Y 108
gatgatgatggcagcagcggcagcgcctccaccggcaccctgcccgaagaagaaacaaaac 600
D D D G D D G T R S T R T L P D K K Q N 128
catagcagatagagaagcatcgcgcgcataggatgaacacgtacatctcggagctaaagc 660
H S E I E K H R R D R M N T Y I S E L S 148
gccatgatcccagatgtgcccgcgaatggcgcgcaagctggacaagctgacagctactgccc 720
A M I P M C G A M A R K L D K L T V L R 168
atggccgtgcagcacatcgcgcacagtagcggggcgcgagctcccgcgtgcccgtgagcgcg 780
M A V Q H M R T V R G A Q S A C P L S A 188
cgccccagaccggccttctcgtcggagcgcgagctgaaccagctcgtcctgcatggggca 840
R P R P A F L S E R E L N Q L V L H A A 208
caagactccttctgctggtgggtggcctgcgaccggcggcggcctgctctacgtctccacg 900
Q D S F L L V V G C D R G R L L Y V S T 228
tctgtcaagcagatactactctacagatcagagcaggttgctagggcagagcctgttcgat 960
S V K Q I L L Y D Q S E L L G Q S L F D 248
atcctgcatccaaaagcagtgccaaagtgaaggagcagctgtcctcatcccactcagc 1020
I L H P K D V A K A V K E Q L S S S H L A 268
ccgcccagagcagctcatcgatgctaagaccatgctgccactgaagacggacgtccagacg 1080
P R E T L I D A K T M L P L K T D V Q T 288
agcgcgtcgggctgtgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1140
S A S R L C P G A R R S F F C R I K Y K 308
gcagcgcagaaaaccagtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1200
A A P E T Q S E P A P I K E E T E P S V 328
aaagcgcgcaagaagaccaaagcagaagaagtattgctcgtacaatgcaccggatacctg 1260
K P R K K T N E K K Y C V V Q C T G Y L 348
aagtcgtggggcccgggcggagctgctggaggcggggcccgctctgaagcggcggcagcagc 1320
K S W A P A E L S E A G P S E A A D D S 368
gacgcaagcagcagctgtcttgcttgggtcgtcggccggcggcgtatgccgggtctggcgcct 1380
D A S S M S C L V L V G R A M P G L A P 388
cagccccacaaaccggcgtcgtcaccagtcaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1440
Q P P Q P P L A S A P V T R Q L Q Y V S 408
cgacatactccagcggcaagttcactcttctcgtcgaatcaaaagagtcactctggcggcggc 1500
R H T P D G K F I F V D Q R V T L A L G 428
ttcctaccgcaagagttgttgggcacatcgtgtacgaatattgttcggcggcggcggcggcggc 1560
F L P Q E L L G T S L Y E Y V R E P E L 448
ggcggagtagcgcgctcacaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1620
G V A R A H K A A L L R R E P L R T P 468
atctacaccttctcgtgtaaaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1680
I Y T F R R K D G S L A R L Q T H F K P 488
ttcaggaacccttgacaaaagcagtgaggctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1740
F R N C P W T K D V E C L V A N N T V V S 508
gacgcccagaaagcagcaccagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1800
D A Q K D D Q A D D A H A S Y D M Y K Q 528
aaagctgctgacgtggagatgcaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1860
K A A D V E M Q R L I E S Q V E S H K I 548
ggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 1920
G S A I A E E A L R S S S V E F V P E L 568
tccgcccagcctgctcaggacgcagctctcaaccaaaacgcttatataactatctagt 1980
S A D L L Q D A V F N Q N V R Y I L S S 588
gggcctcgaagtgcccggagtagcagctgctaacaattgcacgtgcaaaaacatcgta 2040
G P R S A R V L A R A K Q L H V Q N I V 608
aatatgagcgtcggcggagtttccactgctgatttctatacatcaatttacatgtgggaa 2100
N M S V A G V S T A D F Y T S I Y M W K 628
tcacgcaaacaggtttaaagcagtagaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 2160
S R N R F N D E A A M A V I M S L L E A 648
tagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc 2220
D A G L K I K S L N F S G L P W P L P * 667
tgtcactcactttcacaattcactggtagaacctaatttaaaactctccctacactgccc 2280
ctgcttacccttccgtctacgtgctacgttaccgttaataactcacaagaacctactct 2340
agcttgttcaatgacaccgactaccaaagtgttgacactgttttaataaattgttccatc 2400
gcaaaaaaaaaa 2412

```

Εικ. 23. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του *SnoCycle*. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των 667 κωδικονίων εμφανίζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **tga**: κωδικόνιο λήξης; **aataa**: σημείο πολυαδενυλίωσης. Σημειώνονται λειτουργικά μοτίβα του CYCLE αντίστοιχα με αυτά της *D. melanogaster*: **bHLH** domain (basic Helix-Loop-Helix domain) παρουσιάζεται μέσα σε περίγραμμα, τα 2 **PAS domains** (PER-ARNT-SIM) domains, **PAS-A** και **PAS-B** παρουσιάζονται στα σκιασμένα γκρι κομμάτια, και το **BCTR** (BMAL C –Terminal Region) παρουσιάζεται μέσα σε περίγραμμα.

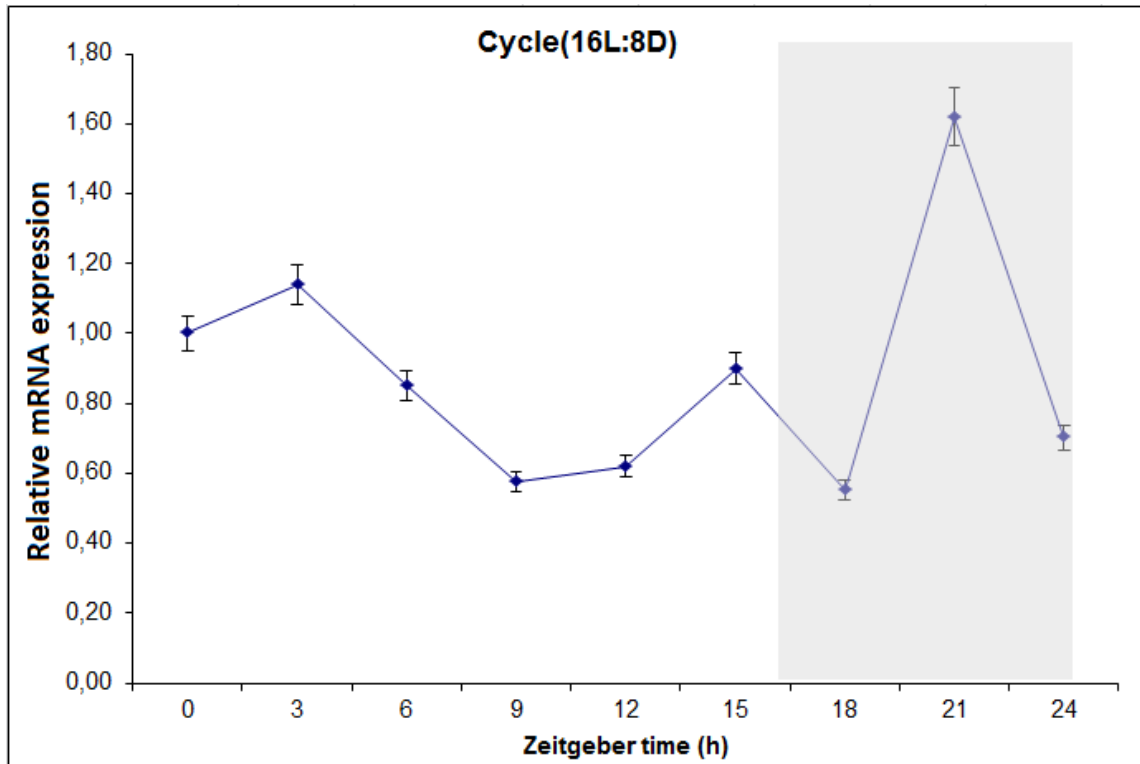


Εικόνα 24. Φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα (Bootstrap Neighbour-Joining Tree) που δημιουργήθηκε από την αντιστοίχιση των SnoCYCLE ακολουθιών με γνώστες CYCLE πρωτεϊνικές ακολουθίες, μέσω της χρήσης του προγράμματος BLAST. Οι αριθμοί της GenBank καταχώρησης και οι συντομογραφίες (σε παρένθεση) αυτών των πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι οι εξής: *Bombyx mori* (BAB20632, Bmo), *Antheraea pernyi* (Ape, AAR14937), *Danaus plexippus* (Dple, AAR13012), *Tribolium castaneum* (Tca, NP001107795), *Apis mellifera* (Ame, XP00112441), *Aedes aegyptii* (Aed. AEX32872), *Thermobia domestica* (Tdo, BAJ16354), *D. melanogaster* (Dmel, AAAR15677).

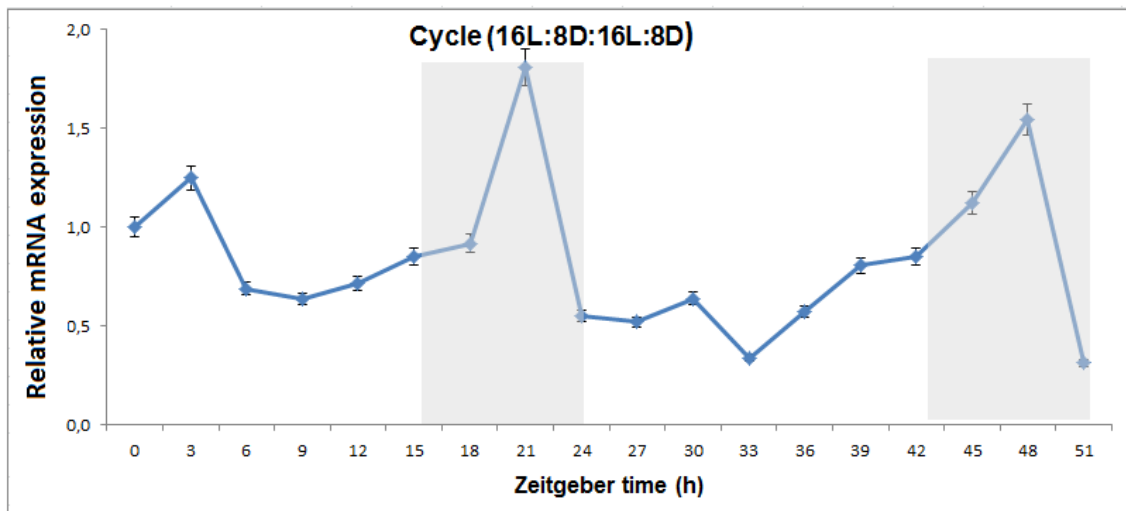
4.2. Μελέτη έκφρασης *Snocyc* κάτω από φωτοπεριόδους LD16:8 και LD10:14

Για να καθορίσουμε πότε τα μετάγραφα του *Snocyc* ταλαντεύονται με κιρκαδικό τρόπο, εξετάσαμε τα επίπεδα του *Snocyc* mRNAs στη *S. nonagrioides* κάτω από συνθήκες LD16:8 και LD10:14 εφαρμόζοντας Real Time PCR. Η έκφραση του *Snocyc* mRNA εμφάνισε κύκλο με ένα peak στη διάρκεια της ημέρας (ANOVA, $p < 0.05$, Εικ. 25). Η τιμή peak στο ZT21 (5 h αφού κλείσει το φως) ήταν περίπου 2 φορές υψηλότερη από το ενδιάμεσο επίπεδο και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (Tukey-test, $p < 0.05$). Ανάλογα αποτελέσματα εμφανίστηκαν και σε διήμερη παρατήρηση (Εικ. 26). Δηλαδή υπάρχει καθημερινή επανάληψη.

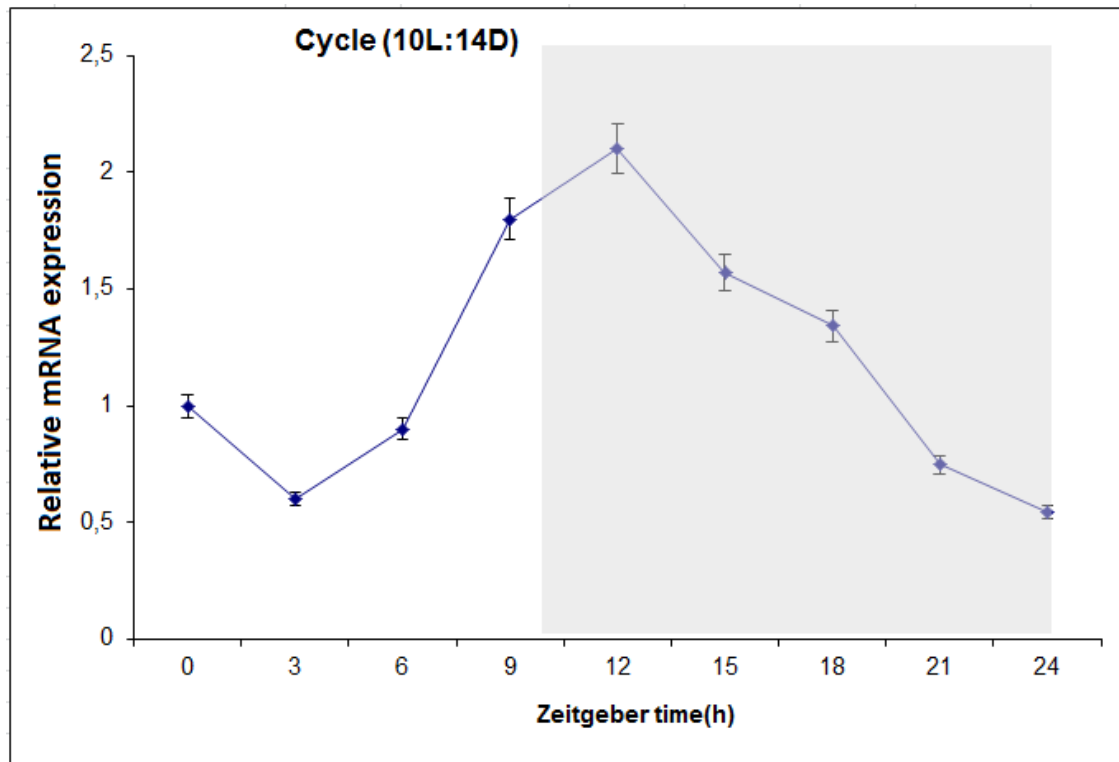
Ένας καθαρά 24ωρος ρυθμός των *Snocycle* mRNA επιπέδων εμφανίστηκε κάτω από 10L14D, 25 °C (εικ. 27). Η έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Η ταλάντωση του *Snocycle* mRNA εμφανίζει ένα peak στο ZT 12 (2 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης). Παρόμοια αποτελέσματα ταλάντωσης κάτω από LD10:14 (Εικ. 28) εμφανίστηκαν και σε διήμερες παρατηρήσεις. Δηλαδή υπάρχει επαναληψιμότητα της ταλάντωσης σε καθημερινή βάση, τόσο σε συνθήκες μεγάλης ημέρας όσο και μικρής.



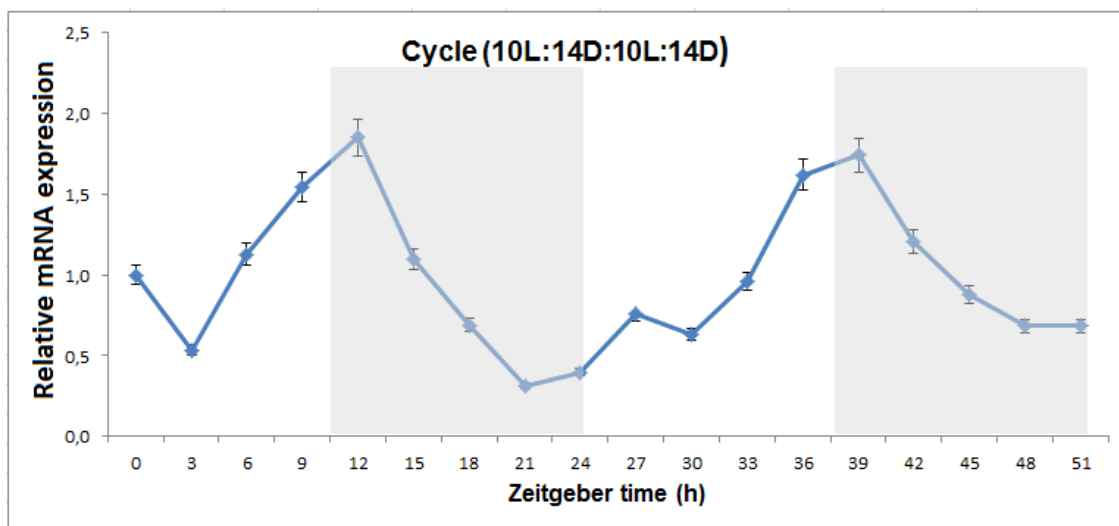
Εικ. 25. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocycle* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



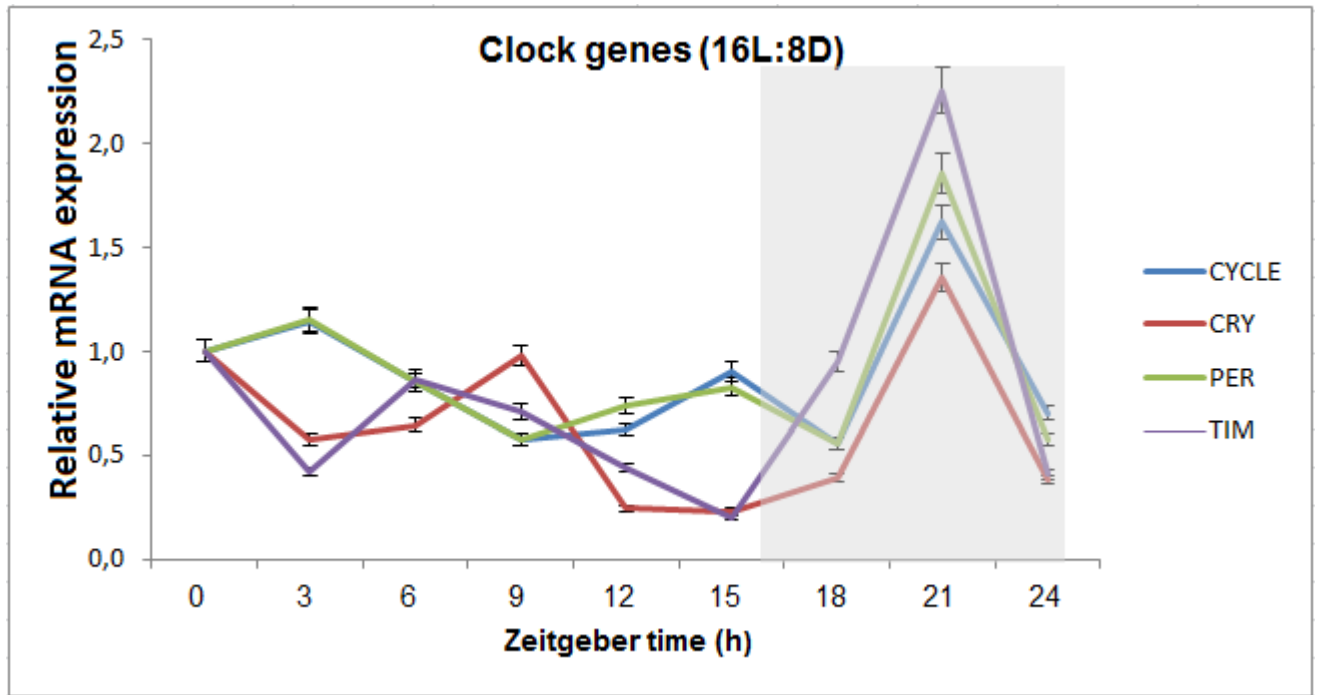
Εικ. 26. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocycle* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.



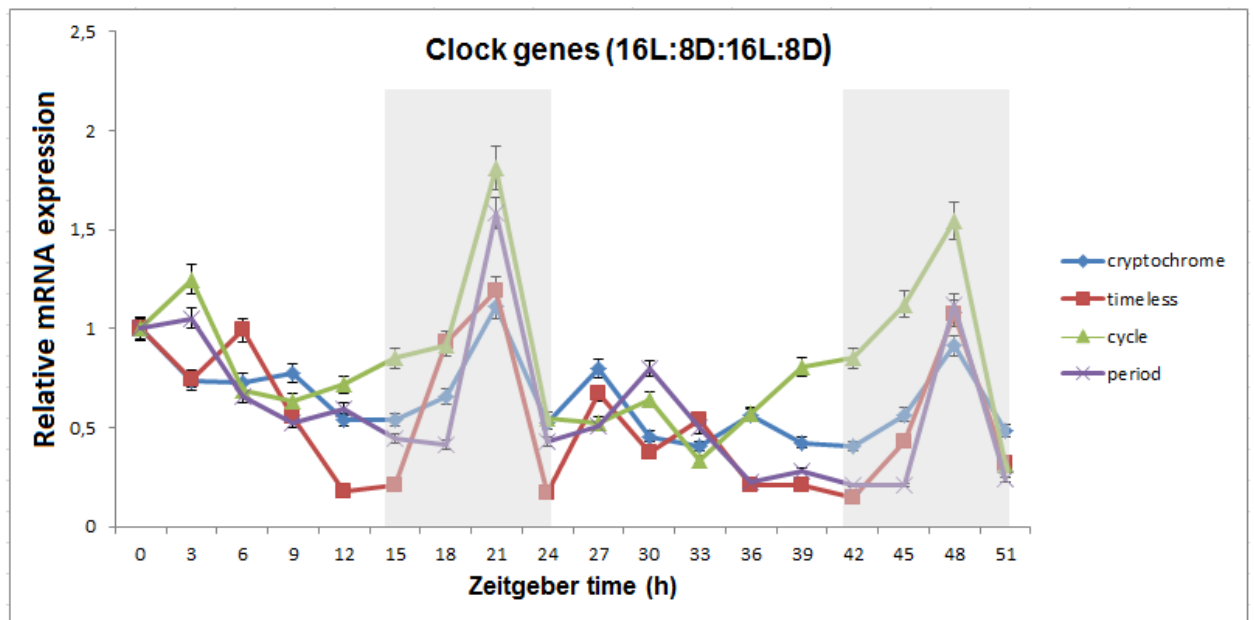
Εικ. 27. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocycle* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 28. Ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocycle* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.



Εικ. 29. Ανάλυση χρονικής έκφρασης των *Snoper*, *Snotim*, *Snocyc* και *Snocry* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 30. Ανάλυση χρονικής έκφρασης των *Snoper*, *Snotim*, *Snocycle* και *SnoCry* (LD16:8). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.

B. ΜΕΛΕΤΗ ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ ΡΟΛΟΓΙΩΝ

I. Χρονική έκφραση των ωρολογιακών γονιδίων κάτω από φωτοπερίόδους που εισάγουν διάπαυση: (LD10:14), (LD10:62) και (L10:14D: 10L: 62D)

Η επιλογή ενός κατάλληλου μοντέλου εντόμου, φαίνεται να είναι το κλειδί για να καταλάβουμε τον μηχανισμό του φωτοπεριοδικού ρολογιού των εντόμων. Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι η μελέτη της σχέσης ανάμεσα στις λειτουργίες του φωτοπεριοδικού και του κερκαδικού ρολογιού, στο μεταγωγικό μονοπάτι των φωτοπεριοδικών μηνυμάτων για την εκδήλωση προαιρετικής διάπαυσης. Ως μοντέλο χρησιμοποιήθηκε το έντομο *S. nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), που εμφανίζει φωτοπεριοδική προαιρετική διάπαυση στο στάδιο της προνύμφης.

Στα έντομα η εποχιακή απόκριση βασίζεται στη μετακίνηση του μήκους ημέρας ή νύχτας και ίσως χρησιμοποιούν ένα κερκαδικό ταλαντωτή. Σημασία όμως φαίνεται να έχει η διάρκεια και όχι ένα χρονικό σημείο έναρξης του κύκλου. Για αυτό το λόγο εφαρμόσαμε πειράματα για τον έλεγχο της κερκαδικής ρυθμικότητας στο φωτοπεριοδισμό.

Δύο τύποι πειραμάτων επέκτασης του κύκλου «φως-σκότος» χρησιμοποιούνται:

1. **Τα πειράματα Bunsow:** Επέκταση του σκότους σε κύκλους 48 ή 72 h (π.χ. LD 12:36, LD:12:60) με «νύχτες» που συστηματικά διακόπτονται από μικρούς φωτεινούς παλμούς (Nunes & Saunders, 1999).

2. **Πειράματα Nanda-Hammer:** Η μικρή φωτόφαση (π.χ. 12 h) διπλασιάζεται με μια μεταβλητή σκοτεινή φάση και φωτοπερίοδο που κυμαίνεται από 18-80 h (π.χ. LD:12:6 έως LD:12:68). Τέτοια πειράματα διακρίνουν πολλαπλά γεγονότα μετρήσεων «μήκους νύχτας» (ένα ρολόι τύπου ταλαντωτή-oscillator-) από ένα απλό γεγονός (ένα ρολόι τύπου κλεψύδρας- hour glass) (Nunes & Saunders, 1999). Ένα ρολόι τύπου «ταλαντωτής- oscillator» αλλάζει ένδειξη αυτόματα σε μεγαλύτερη περίοδο σκότους, ενώ ένα τύπου «κλεψύδρα- hour glass», «μετράει» την επέκταση της σκοτεινής φάσης σαν μια «απλή μεγάλη νύχτα» και απαιτείται η επόμενη φάση φωτός για να αλλάξει ένδειξη. Επειδή θέλουμε εισαγωγή σε διάπαυση, εφαρμόσαμε Πειράματα Nanda-Hammer. Τέτοια πειράματα γίνονται για εισαγωγή στη διάπαυση. Η φωτόφαση

διατηρείται σταθερή και η σκοτόφαση σταδιακά εκτείνεται. Εάν η φωτοπεριοδική καμπύλη απόκρισης επιδεικνύει περιοδικά peaks περίπου 24h χωριστά, τέτοιες θετικές απηγήσεις θεωρούνται ενδείξεις βιολογικού ρολογιού, ενώ απουσία περιοδικής απόκρισης είναι ένδειξη για κλεψύδρα (hourglass).

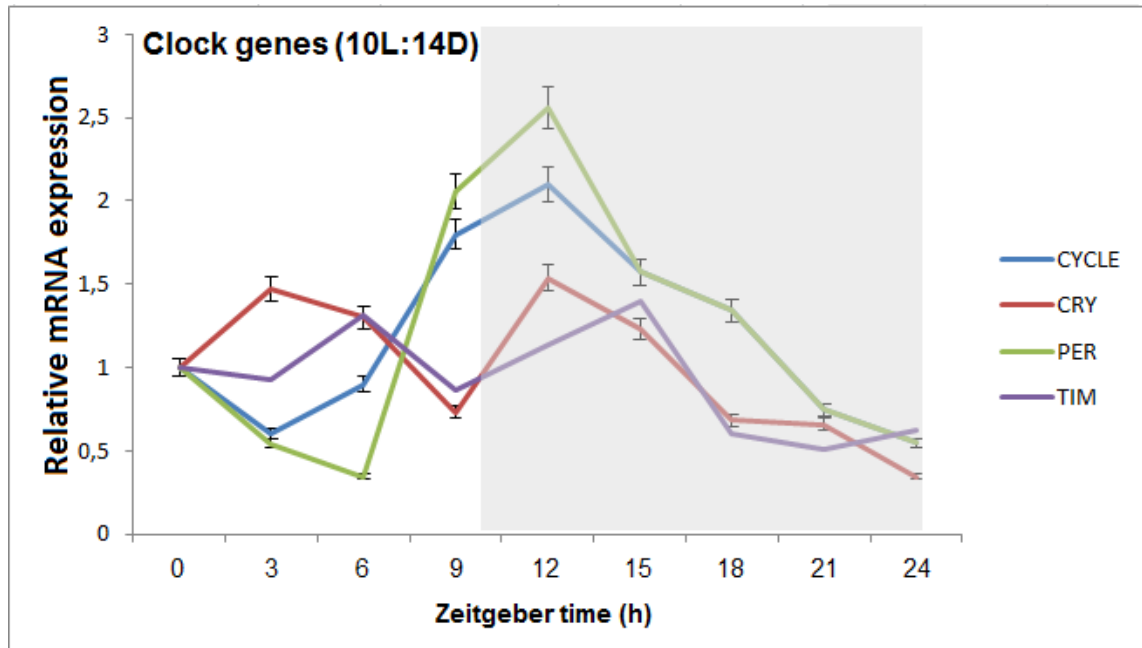
Εφαρμόστηκε σειρά πειραμάτων διαφορετικών φωτοπεριόδων σε ημερήσιο κύκλο (24 ώρες), τριήμερο κύκλο (72 ώρες) και τετραήμερο κύκλο (96 ώρες). Σε όλες τις περιπτώσεις πετύχαμε εισαγωγή των προνυμφών σε διάπαυση. Μελετήθηκαν 3 διαφορετικοί συνδυασμοί φωτοπεριόδων:

1. **LD10:14** (24ωρος κύκλος)
2. **(LD10:62)** (72ωρος κύκλος)
3. **(L10:14D: 10L: 62D)** (96ωρος κύκλος)

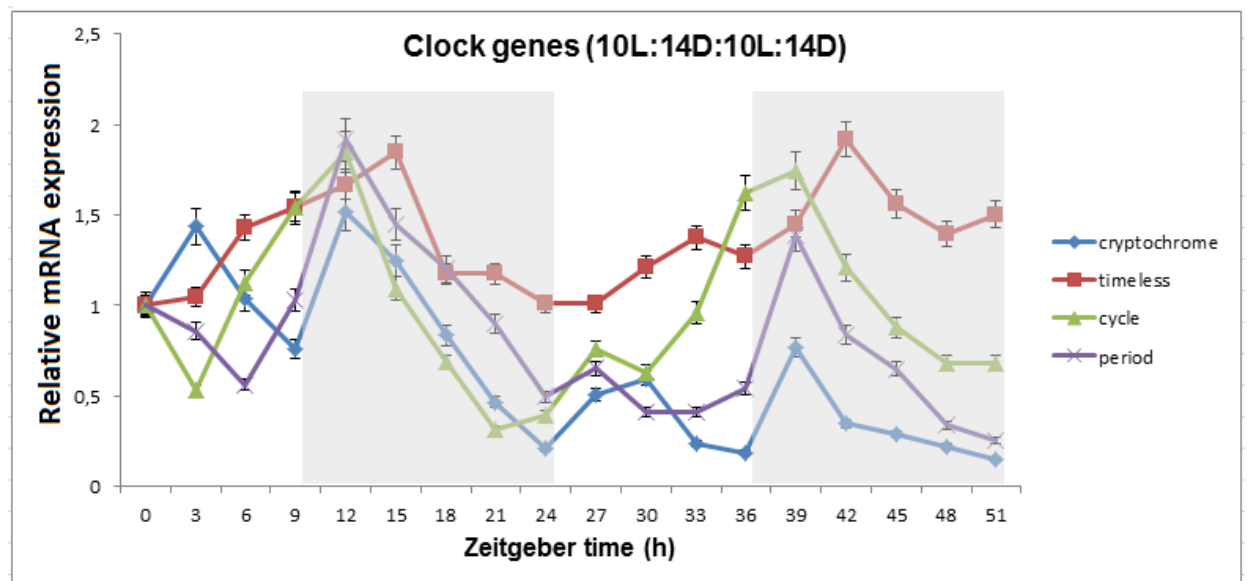
Σε κάθε πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνταν **100 προνύμφες** του εντόμου και έγιναν τρεις επαναλήψεις για το καθένα. Για την πραγματοποίηση των φωτοπεριόδων πέραν του 24ώρου, χρησιμοποιήσαμε ρολόγια εβδομαδιαίου κύκλου, για να πετύχουμε τους επιθυμητούς κύκλους φως: σκοτάδι. Σε όλες τις περιπτώσεις των πειραμάτων έγιναν τριήμερες δειγματοληψίες ανά **8** ώρες, στις **60** ημέρες μετά την εκκόλαψη. Έγινε μελέτη έκφρασης σε συνθήκες διαφορετικών φωτοπεριόδων, σε κεφάλια προνυμφών. Έγινε απομόνωση RNA και DNase treatment και ακολούθησε ανάλυση με την τεχνική του REAL TIME PCR για τα τέσσερα γονίδια *period (per)*, *cycle (cyc)*, *cryptochrome (cry)* και *timeless (tim)*.

1. Φωτοπερίοδος (LD10:14)

Στις εικόνες 1 και 2 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μελέτης χρονικής έκφρασης των γονιδίων *Sno_{per}*, *Sno_{tim}*, *Sno_{cycle}* και *Sno_{Cry}* σε συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:14. Σε συνθήκες LD10:14, 25 °C εμφανίστηκε ένας καθαρά 24ωρος ρυθμός των *Sno_{per}*, *Sno_{tim}*, *Sno_{cry}* και *Sno_{cycle}* mRNA επιπέδων. Η έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Τρία γονίδια, τα *Sno_{per}*, *Sno_{cycle}* και *Sno_{Cry}* εμφανίζουν peak την ίδια ώρα της σκοτόφασης, στο ZT12 (Εικ. 1), ενώ το *Sno_{tim}* διαφέρει και εμφανίζει peak τρεις ώρες αργότερα, στο ZT15.

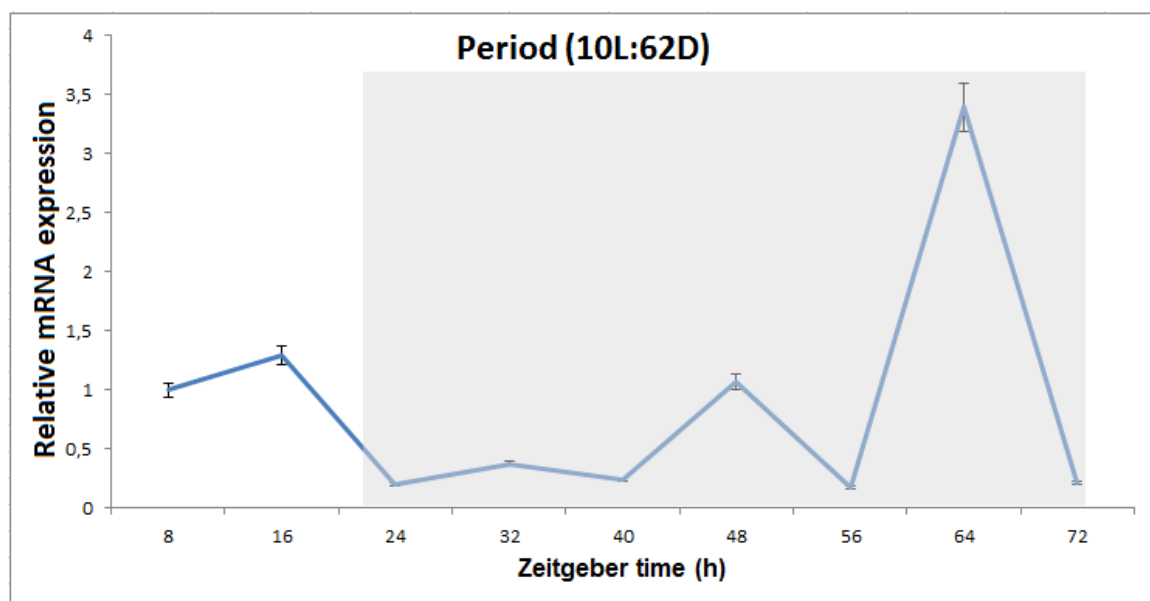


Εικ. 1. Ανάλυση χρονικής έκφρασης των *SnoCry*, *SnoCyc*, *SnoTim* και *SnoPer* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.

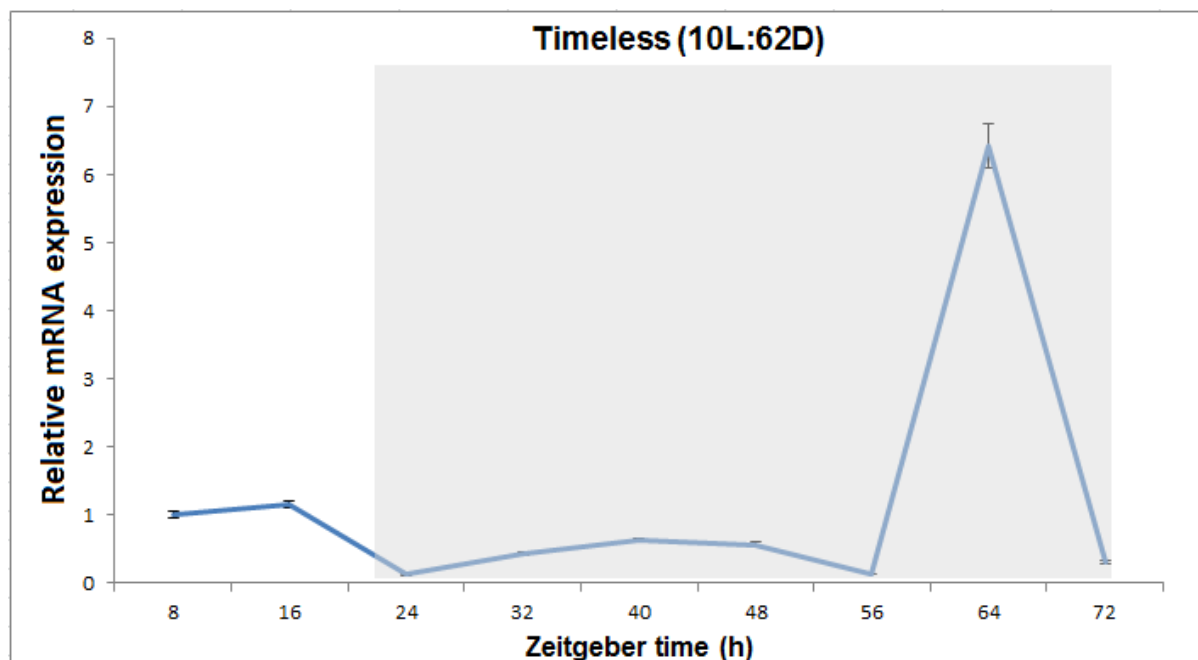


Εικ. 2. Ανάλυση χρονικής έκφρασης των *SnoCry*, *SnoCyc*, *SnoTim* και *SnoPer* (LD10:14). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση. Συνεχής δειγματοληψία για 2 ημέρες.

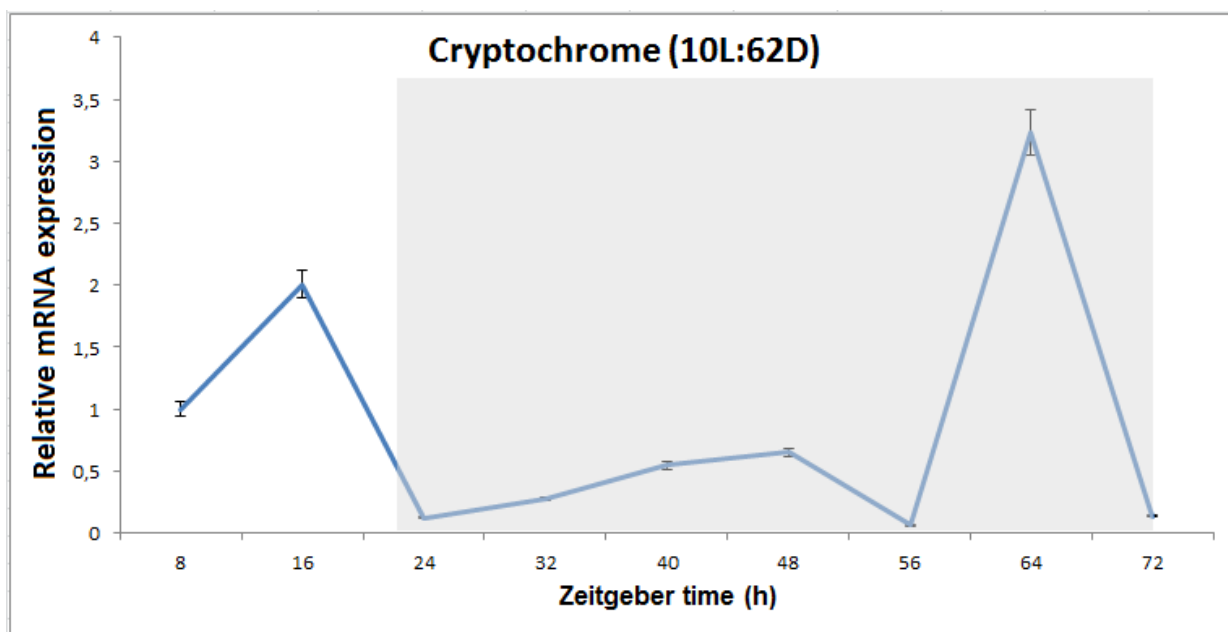
2. Φωτοπερίοδος (LD10:62)



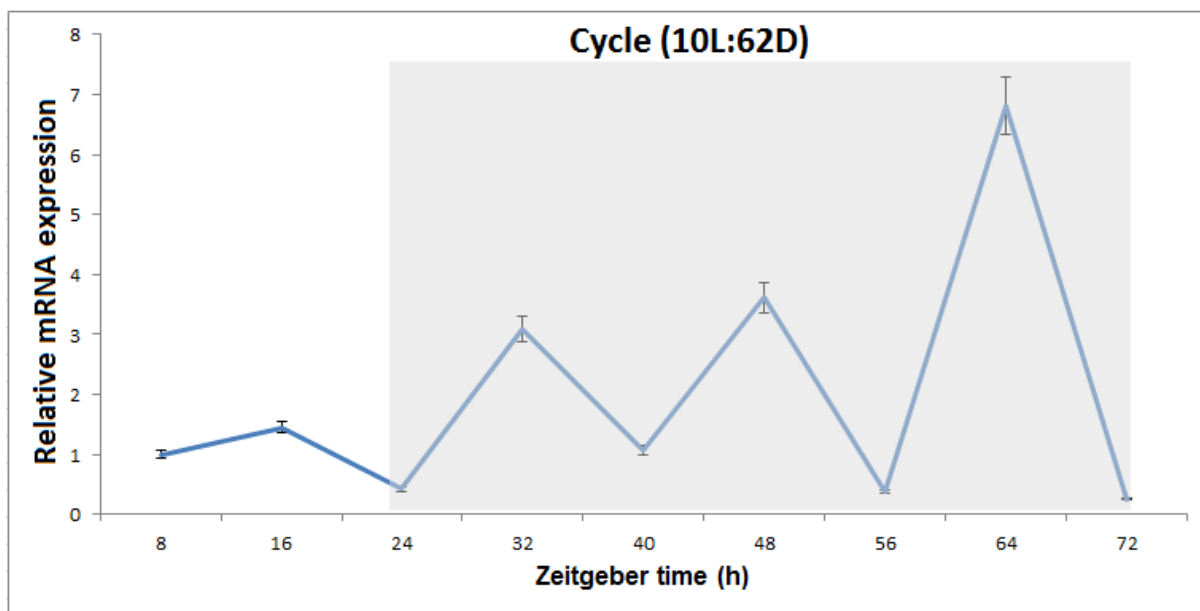
Εικ. 3. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Snoper* (LD10:62). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



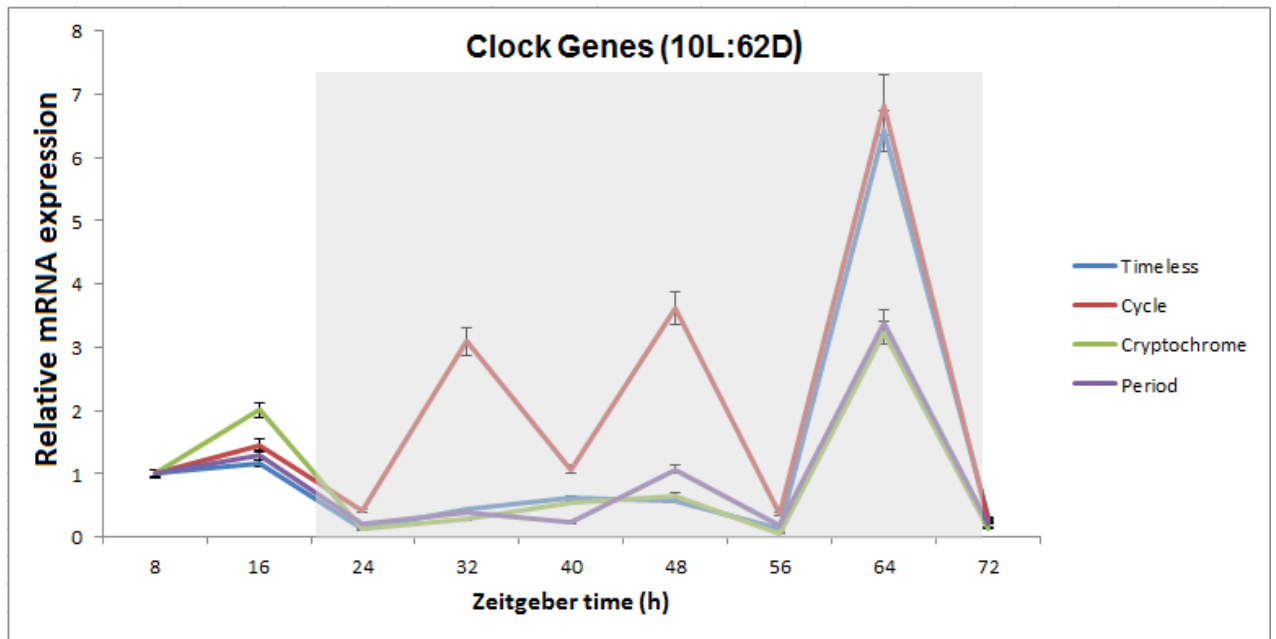
Εικ. 4. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Snotim* (LD10:62). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 5. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Shocry* (LD10:62). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 6. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Shocycle* (LD10:62). Η σκιασμένη περιοχή δείχνει τη σκοτόφαση.



Εικ. 7. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *SnoPer*, *SnoTim*, *SnoCry* και *Snocycle* (LD10:62). Οι σκιασμένες περιοχές δείχνουν τη σκοτόφαση

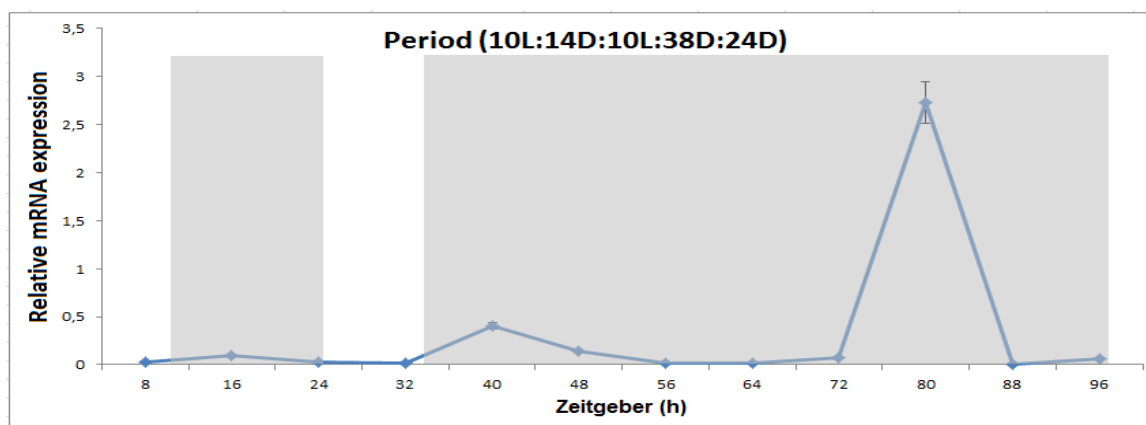
Στην εικ. 3 φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *SnoPer*, σε συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:62 (Τριήμερος κύκλος). Το *SnoPer*, την 1η ημέρα (24 ώρες) εμφανίζει κिरκαδικότητα η οποία το επόμενο 24ωρο σκότους (όπου υπάρχει η υποκειμενική ημέρα), διατηρείται. Στη συνέχεια, το 3ο 24ωρο σκότους, η κिरκαδικότητα επαναλαμβάνεται με μέγιστα στην αρχή της υποκειμενικής νύχτας, όπως συμβαίνει στον κανονικό κिरκαδικό ρυθμό. Στην εικ. 4 φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *SnoTim*, σε συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:62 (Τριήμερος κύκλος). Το *SnoTim*, την 1η ημέρα (24 ώρες) εμφανίζει κिरκαδικότητα, η οποία το επόμενο 24ωρο σκότους (όπου υπάρχει η υποκειμενική ημέρα), εξαφανίζεται και εμφανίζεται το 3ο 24ωρο σκότους, με μέγιστα στην αρχή της υποκειμενικής νύχτας, όπως συμβαίνει στον κανονικό κिरκαδικό ρυθμό. Στην εικ. 5 φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *SnoCry*, σε συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:62 (Τριήμερος κύκλος). Το *SnoCry*, την 1η ημέρα (24 ώρες) εμφανίζει κिरκαδικότητα, η οποία το επόμενο 24ωρο σκότους (όπου υπάρχει η υποκειμενική ημέρα), εξαφανίζεται και εμφανίζεται το 3ο 24ωρο σκότους, με μέγιστα στην αρχή της υποκειμενικής νύχτας, όπως συμβαίνει στον κανονικό κिरκαδικό ρυθμό. Στην εικ. 6 φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocycle*, σε συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:62 (Τριήμερος

κύκλος). Το *Snocycle*, την 1η ημέρα (24 ώρες) εμφανίζει κιρκαδικότητα η οποία το επόμενο 24ωρο σκότους (όπου υπάρχει η υποκειμενική ημέρα), διατηρείται. Στη συνέχεια, το 3ο 24ωρο σκότους, η κιρκαδικότητα επαναλαμβάνεται με μέγιστα στην αρχή της υποκειμενικής νύχτας, όπως συμβαίνει στον κανονικό κιρκαδικό ρυθμό

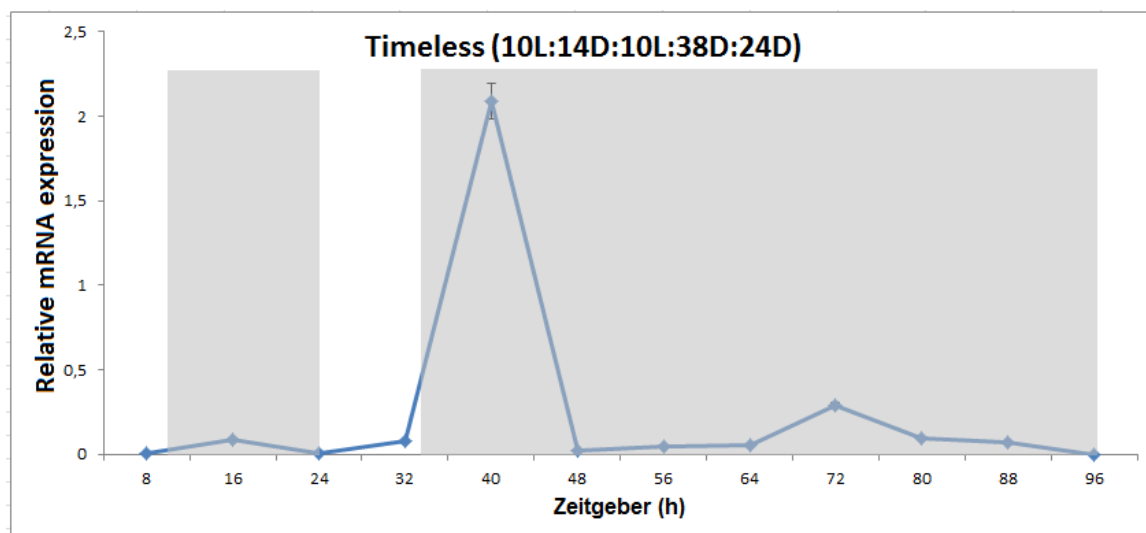
Στην εικόνα 7 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μελέτης χρονικής έκφρασης των γονιδίων *Snooper*, *Snotim*, *Snocycle* και *SnoCry* σε συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:62 (Τριήμερος κύκλος). Σε συνθήκες LD10:62, 25 °C εμφανίστηκε μειωμένη ταλάντωση των *Snotim* και *Snocry* mRNA επιπέδων, ενώ το *Snooper* και *Snocycle* εμφανίζουν κιρκαδικότητα, με μεγαλύτερη αυτή του *Snocycle*. Φαίνεται καθαρά ότι υπάρχει ταλάντωση κιρκαδικού τύπου για το *Snocycle*, ενώ τα άλλα τρία γονίδια εμφανίζονται σαν σκοτοπεριοδικά. Τα τέσσερα γονίδια εμφανίζουν peak την ίδια ώρα της σκοτόφασης, στο ZT64 (Εικ. 7), 8 ώρες πριν την έναρξη του φωτός, του επόμενου τριήμερου κύκλου.

Από τη μεγέθυνση της διάρκειας του σκότους, φάνηκε ότι επηρεάστηκαν τα μέγιστα, όπου για όλα τα γονίδια συμβαίνουν στην ίδια ώρα, στο τέλος της σκοτεινής φάσης. Παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα δείχνουν ένα ρολόι τύπου ταλαντωτή-oscillator. Ένα ρολόι τύπου «ταλαντωτής- oscillator» αλλάζει ένδειξη αυτόματα σε μεγαλύτερη περίοδο σκότους.

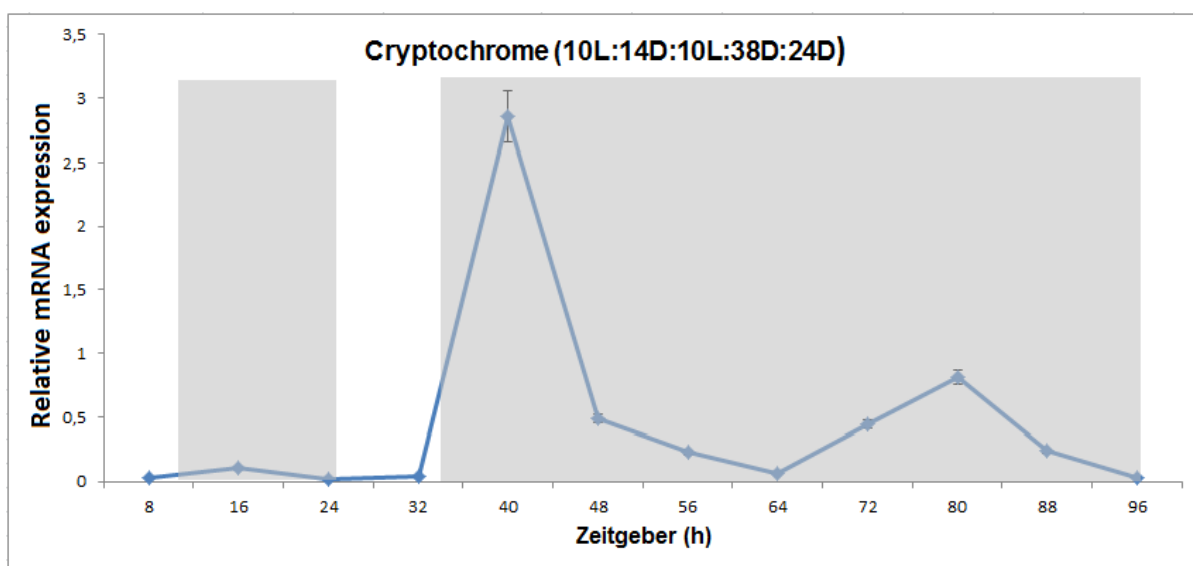
3. Φωτοπερίοδος (L10:14D: 10L: 62D)



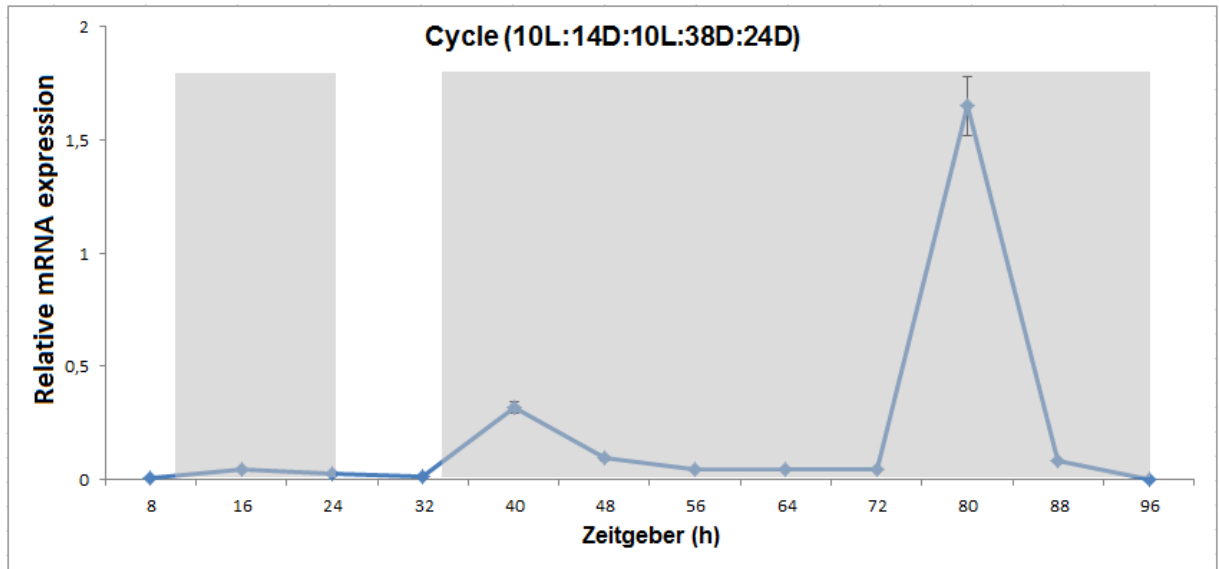
Εικ. 8. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Snooper* (L10:14D10L:62D). Η σκιασμένες περιοχές δείχνουν τη σκοτόφαση



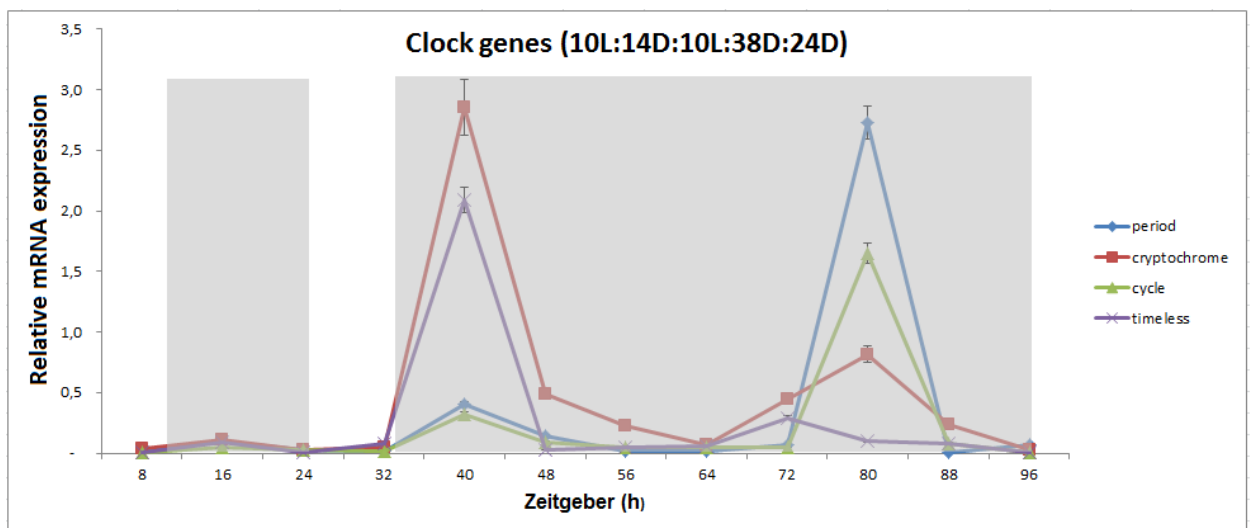
Εικ. 9. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Snotim* (L10:14D:10L:62D). Η σκιασμένες περιοχές δείχνουν τη σκοτόφαση



Εικ. 10. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Snocry* (L10:14D:10L:62D). Η σκιασμένες περιοχές δείχνουν τη σκοτόφαση.



Εικ. 11. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *Snocycle* (L10:14D:10L:62D). Η σκιασμένες περιοχές δείχνουν τη σκοτόφωση.



Εικ. 12. Ανάλυση χρονικής έκφρασης του *SnoPer*, *SnoTim*, *SnoCry* και *Snocycle* (L10:14D: 10L: 62D). Οι σκιασμένες περιοχές δείχνουν τη σκοτόφωση.

Στην Εικ. 8. φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *SnoPer* σε συνθήκες φωτοπεριόδου (L10:14D10L:62D) (τετραήμερος κύκλος). Σε συνθήκες L10:14D:10L:62D, δηλαδή όταν προστέθηκε ένας 24η κύκλος 10L:14D στον προηγούμενο τριήμερο κύκλο 10L:62D, εμφανίστηκε μια καρδιακή ταλάντωση των *SnoPer* την πρώτη ημέρα και μια άλλη καρδιακή ταλάντωση τη δεύτερη ημέρα, με μέγιστα στις 40 ώρες, δηλ. 8 ώρες πριν το τέλος της σκοτόφασης της «υποκειμενικής» νύχτας. Την τρίτο σκοτεινό 24ωρο η ταλάντωση του *SnoPer* χάθηκε και εμφανίστηκε πάλι το τέταρτο σκοτεινό 24ωρο, με μέγιστα στις 80 ώρες, δηλ. στην αρχή της σκοτεινής περιόδου της «υποκειμενικής» νύχτας.

Στην Εικ. 9. φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *SnoTim* σε συνθήκες φωτοπεριόδου (L10:14D10L:62D) (τετραήμερος κύκλος). Εμφανίστηκε μια καρδιακή ταλάντωση των *SnoTim* την πρώτη ημέρα και μια άλλη καρδιακή ταλάντωση τη δεύτερη ημέρα, με μέγιστα στις 40 ώρες, δηλ. 8 ώρες πριν το τέλος της σκοτόφασης της υποκειμενικής νύχτας. Την επόμενα σκοτεινό 24ωρα η ταλάντωση του *SnoTim* χάθηκε.

Στην Εικ. 10 φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *SnoCry* σε συνθήκες φωτοπεριόδου (L10:14D10L:62D) (τετραήμερος κύκλος). Εμφανίστηκε μια καρδιακή ταλάντωση των *SnoCry* την πρώτη ημέρα και μια άλλη καρδιακή ταλάντωση τη δεύτερη ημέρα, με μέγιστα στις 40 ώρες, δηλ. 8 ώρες πριν το τέλος της σκοτόφασης της υποκειμενικής νύχτας. Την επόμενα σκοτεινό 24ωρα η ταλάντωση του *SnoCry* συνεχίστηκε.

Στην Εικ. 11 φαίνεται η ανάλυση της χρονικής έκφρασης του *Snocycle* σε συνθήκες φωτοπεριόδου (L10:14D10L:62D) (τετραήμερος κύκλος). Εμφανίστηκε μια καρδιακή ταλάντωση των *Snocycle* την πρώτη ημέρα και μια άλλη καρδιακή ταλάντωση τη δεύτερη ημέρα, με μέγιστα στις 40 ώρες, δηλ. 8 ώρες πριν το τέλος της σκοτόφασης της «υποκειμενικής νύχτας». Την τρίτο σκοτεινό 24ωρο η ταλάντωση του *Snocycle* χάθηκε και εμφανίστηκε πάλι το τέταρτο σκοτεινό 24ωρο, με μέγιστα στις 80 ώρες, δηλ. στην αρχή της σκοτεινής περιόδου της υποκειμενικής νύχτας.

Στην εικόνα 12 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μελέτης χρονικής έκφρασης των γονιδίων *SnoPer*, *Snotim*, *Snocycle* και *SnoCry* σε συνθήκες φωτοπεριόδου L10:14D:10L:62D (Τετραήμερος κύκλος). Σε συνθήκες L10:14D:10L:62D, 25 °C εμφανίστηκε μια ταλάντωση των *SnoPer*, *Snotim*, *Snocry* και

Snocycle mRNA επιπέδων. Τα γονίδια *Snotim* και *SnoCry* εμφανίζουν peak στο ZT40, 8 ώρες μετά την έναρξη του σκότους της του δεύτερου κύκλου, δηλαδή στο μέσον της δεύτερης «υποκειμενικής νύχτας». Τα γονίδια *SnoPer* και *Snocycle* εμφανίζουν peak στο ZT80, 16 ώρες δηλ. στην αρχή της σκοτεινής περιόδου της υποκειμενικής νύχτας. Το pattern της σκοτεινής φάσης εμφανίζει δύο καθαρές μορφές. Στην πρώτη, και τα τέσσερα γονίδια εμφανίζουν μέγιστα στις 40 ώρες, όπου το *SnoPer* και *Snocycle* είναι πολύ χαμηλά (0.5), ενώ τα *SnoTim*, *SnoCry* πολύ υψηλά, στο 2.0 και 3.0. Στη δεύτερη, τρία γονίδια, τα *SnoPer*, *SnoCry* και *Snocycle*, εμφανίζουν μέγιστα στις 80 ώρες, όπου το *SnoPer* και *Snocycle* είναι πολύ υψηλά στο 2.0 και 3.0, ενώ το *SnoCry* πολύ χαμηλά, στο 1.0.

Σε σχέση με τον τριήμερο κύκλο (10L: 62D), παρατηρούμε ότι η προσθήκη ενός 24 ωρου κύκλου, επηρεάζει τα γονίδια *Snotim* και *SnoCry* και αλλάζει την εικόνα έκφρασης τους. Για τα γονίδια *SnoPer* και *Snocycle* παρατηρούμε ότι δεν αλλάζει η εικόνα έκφρασης. Στη φωτοπερίοδο (LD10:62) (τριήμερος κύκλος) είδαμε ένα peak στο τέλος της σκοτόφασης. Στη φωτοπερίοδο (L10:14D:10L: 62D) (τετραήμερος κύκλος) (μια φωτοπερίοδος παραπάνω από την προηγούμενη) είδαμε πάλι ένα peak. Για τα γονίδια *SnoPer* και *Snocycle* το peak η κορυφή συμπίπτει με το peak LD10:62. Αυτό μας δείχνει ότι η φωτεινή επίδραση που προσθέσαμε δεν τα επηρέασε και είναι μια ένδειξη ότι η κερκαδικότητα και η φωτοπεριοδικότητα ρυθμίζονται από τα ίδια γονίδια. Αυτό το γεγονός ίσως δείχνει ότι έχουμε 2 μηχανισμούς, που λειτουργούν όμως με τα ίδια clock γονίδια. Σε σχέση με τα *Snotim* και *SnoCry*, των οποίων αλλάζει η εικόνα έκφρασης, φαίνεται ότι έχουμε αποσύζευξη των συστατικών (γονιδίων) του μηχανισμού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A .Το κिरκαδικό ρολόι της *S. nonagrioides*

Η παρούσα εργασία διεξήγαγε μια δομική ανάλυση και μια ανάλυση έκφρασης για τα γονίδια *period* και *timeless* στην *S. nonagrioides*. Αυτά τα αποτελέσματα παρέχουν τη βάση για περαιτέρω φυσιολογικές και βιοχημικές μελέτες για τους διακριτούς ρόλους των ωρολογιακών γονιδίων. Αρκετά ενδιαφέροντα ερωτήματα σχετικά με τα ωρολογιακά γονίδια της *S. nonagrioides* παραμένουν: βιοχημική αλληλεπίδραση των ωρολογιακών πρωτεϊνών και της φωτοπεριοδικής ανταπόκρισης των περιφερικών ρολογιών και ταυτοποίηση των κिरκαδικών στοιχείων εξόδου. Πιθανή εμπλοκή των κिरκαδικών μορίων στο φωτοπεριοδικό ρολόι έχει αναφερθεί (Goto *et al.*, 2010). Απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα προετοιμάζουν το δρόμο για μια μοριακή ανάλυση των φωτοπεριοδικών ρολογιών, που παραμένει βιολογικά μυστήριο.

Τα γονίδια *SnoPER* και *SnoTIM* και ο ρόλος τους στο κिरκαδικό ρολόι

Απομονώσαμε τα *per* και *tim* ωρολογιακά γονίδια από το έντομο *S. nonagrioides*. Τα δύο clock γονίδια είναι βασικά στοιχεία του κिरκαδικού βρόχου ανατροφοδότησης και έχουν εκτενώς μελετηθεί στη *D. melanogaster* (Williams and Sehgal, 2001). Δομικά, οι SnoPER και SnoTIM πρωτεΐνες κατέχουν κοινές ομολογίες με άλλα είδη εντόμων. Η PAS επικράτεια και μια TG επανάληψη είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της PER πρωτεΐνης. Αυτές έχουν βρεθεί σε ένα εύρος ειδών, από τη *D. melanogaster* έως τη *Neurospora crassa*, και η ανάλυση αυτών των περιοχών δείχνει την εξελικτική αρχή των κिरκαδικών ρολογιών (Williams and Sehgal, 2001). Ιδιαίτερα υψηλά συντηρημένες περιοχές, οι PAS, PAC, NLS, CLD και TIS στην PER μεταξύ της *S. nonagrioides* και άλλων λεπιδοπτέρων (π.χ. *B. mori*), προτείνει ότι στην *S. nonagrioides* ο κिरκαδικός μηχανισμός λειτουργεί με όμοιο τρόπο, όπως στη *Drosophila* και σε άλλα λεπιδόπτερα.

Η TIM πρωτεΐνη κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην επαναλειτουργία του κिरκαδικού ρολογιού στη *D. melanogaster*. Φωτεινά σήματα πυροδοτούν αποδόμηση της TIM (Suri *et al.*, 1998). Σε σχέση με τα σήματα φωτός, η TIM φωσφορυλώνεται σε κατάλοιπα τυροσύνης, γίνεται ουμπικουιτοποίηση και αποδομείται μέσω

πρωτεοσώματος (Naidoo *et al.*, 1999). Αυτή η απόκριση εμφανίζεται να συνδέεται μέσω της CRY, η οποία προσδένει στην TIM κατά ένα φωτοεξαρτώμενο τρόπο (Naidoo *et al.*, 1999). Η TIM της *S. nonagrioides* έχει μια συνολική συντήρηση όμοια με αυτή της PER (Πίνακας 2). Όλες οι γνωστές λειτουργικές περιοχές της TIM είναι υψηλά συντηρημένες. Η PIS της TIM έχει το ίδιο επίπεδο συντήρησης με την TIS της PER. Αφού η αλληλεπίδραση μεταξύ της PER και TIM είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι του ωρολογιακού μηχανισμού, πρέπει να υπάρχει εξελικτική πίεση στις συντηρημένες θέσεις. Ομοίως, με τη dPER πρωτεΐνη, η dTIM βρίσκεται στον πυρήνα κατά τα μεσάνυχτα (Saez and Young, 1996), παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή τους. Οι NLS της SnoPER και της SnoTIM μοιάζουν πολύ με αυτές άλλων λεπιδοπτέρων (π.χ. *A. pernyi*), αλλά ο βαθμός ομολογίας είναι πολύ μικρότερος από αυτόν της *D. melanogaster* (Πίνακας 1 και 2). Αυτό πιθανόν να είναι η αιτία που οι PERs των λεπιδοπτέρων δεν εμφανίζουν μαζική πυρηνική μετακίνηση. Πάντως, οι PER και TIM των εντόμων ίσως είναι συντηρημένες με μηχανισμούς των κερκαδικών αναδρομών (feedback). Στη *D. Melanogaster*, το σύμπλοκο PER–TIM μετατοπίζεται στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα, για να λειτουργήσει σαν μεταγραφικός διαμεσολαβητής στη διάρκεια της νύχτας, (Saez and Young, 1996). Για να καθοριστεί αν η κερκαδική ρύθμιση είναι μοναδική στα Lepidoptera ή παρατηρείται ένας ανάδρομος βρόχος (feedback loop), στην περίπτωση της *S. nonagrioides*, απαιτούνται επιπλέον μοριακοί και βιοχημικοί έλεγχοι.

Σε σχέση με την έκφραση των *Snooper* και *Snotim* σε κεφάλια προνυμφών της *S. nonagrioides*, σε συνθήκες μεγάλης ημέρας LD16:8 παρατηρήσαμε μια ταλάντωση (Εικ. 4, 5), και η εικόνα της έκφρασης ταιριάζει με το σύγχρονο μοντέλο του μοριακού κερκαδικού μηχανισμού. Τα επίπεδα των *per* και *tim* mRNAs ήταν χαμηλά κατά τη φωτόφαση, αλλά αυξάνονταν όταν έσβηνε το φως. Ενώ η ταλάντωση των *per* και *tim* ήταν ισχυρή στη *D. melanogaster*, το πλάτος του ρυθμού των *Snooper* και *Snotim* σε κεφάλια προνυμφών της *S. nonagrioides* ήταν περίπου 2 φορές (2-fold). Αυτό συνεπάγεται τη σπουδαιότητα της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης, αφού τα *Snooper* και *Snotim* περιέχουν υψηλό αριθμό αμινοξέων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα φωσφορυλίωσης. Μια αλλαγή στη φάση ρυθμού των *per* και *tim* mRNA κάτω από διαφορετικές φωτοπεριόδους έχει αναφερθεί στη *Drosophila* (Majercak *et al.*, 1999) και στη *Sarcophaga* (Goto and Denlinger, 2002).

Σε συνθήκες μικρής ημέρας (συνθήκες φωτοπεριόδου LD10:14) τα αποτελέσματα της χρονικής έκφρασης *Snoper* εμφάνισαν έναν καθαρά 24ωρο ρυθμό ταλάντωσης. Η έκφραση καταστέλλονταν κατά τη φωτόφαση και επάγονταν κατά τη σκοτόφαση. Τα *Snoper* εμφανίζουν το ίδιο μέγεθος peak, άλλη ώρα της σκοτόφασης, στο ZT12 (Εικ. 6), 9 ώρες νωρίτερα από τις συνθήκες μεγάλης ημέρας.

Η εικόνα της ταλάντωσης του *Snoper* mRNA σε συνθήκες LD10:14 ταιριάζει με αυτή του ανοσοενεργοποιημένου PER σε νευρώνες του εγκεφάλου του *B. mori* κάτω από συνθήκες LD12:12 (Sehadova *et al*, 2004). Αυτό προτείνει ότι υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ του mRNA και του πρωτεϊνικού επιπέδου της PER στην *S. nonagrioides*, το οποίο δεν ισχύει στη *D. melanogaster* (Williams and Sehgal, 2001). Αυτή η αλλαγή φάσης που παρατηρείται στην *S. nonagrioides*, ίσως δείχνει ότι ο μηδενισμός του μοριακού ταλαντωτή μέσω αποδόμησης της TIM από το φως που παρατηρείται στη *D. melanogaster*, συμβαίνει επίσης στην *S. nonagrioides*. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι το πλάτος ταλάντωσης των *Snoper* και *Snotim* δεν επηρεάζονται από το μήκος της ημέρας. Στο έντομο *S. crassipalpis* η έκφραση του *tim* ήταν άκαμπτη κάτω από μεγάλη ημέρα (Goto and Denlinger, 2002). Σε χάμστερ (hamster), το πλάτος ταλάντωσης και η εικόνα έκφρασης των clock γονιδίων επίσης επηρεάζονταν ισχυρά (Johnston *et al.*, 2005)

Το γονίδιο *Snocry* και ο ρόλος του στο κिरκαδικό ρολόι

Πολλοί οργανισμοί εμφανίζουν κिरκαδικούς ρυθμούς που ρυθμίζονται από το κिरκαδικό ρολόι και ο φωτοϋποδοχέας είναι απαραίτητος για την το συγχρονισμό του ρολογιού στους κύκλους φωτός-σκότους (Tomiooka and Matsumoto 2010). Οι φωτεινές εισροές εξαρτώνται από τη λειτουργία της πρωτεΐνης CRY. Δύο τύποι *cry* γονιδίων έχουν βρεθεί στα έντομα: ο *Drosophila*-type *cry* (*cry-d*) και ο mammalian-type *cry* (*cry-m*). Αυτά τα γονίδια είναι όμοια στην νουκλεοτιδική και αμινοξική τους ακολουθία, αλλά παράλογα και προφανώς διακριτά μέσω φυλογενετικής ανάλυσης (Rubin *et al.* 2006). Η CRY-d λειτουργεί ως φωτοϋποδοχέας του κυανού φωτός. Η CRY-m λειτουργεί ως ο κύριος μεταγραφικός παρεμποδιστής (transcriptional repressor), αλλά όχι ως κिरκαδικός φωτοϋποδοχέας (Tomiooka and Matsumoto, 2010). Στην παρούσα μελέτη απομονώσαμε δύο *cry* γονίδια από την *S. nonagrioides*. Οι αμινοξικές ακολουθίες των *cry* γονιδίων έδειξαν αξιοσημείωτη ομοιότητα με αυτές των εντόμων, και οι επικράτειες που είναι σημαντικές για το κिरκαδικό ρολόι

είναι υψηλά συντηρημένες. Το φυλογενετικό δένδρο στη μελέτη μας έδειξε ότι τα *Snocry1* και *Snocry2* ανήκουν στην οικογένεια των *cry-d* και *cry-m*, αναλογικά. Προηγούμενες μελέτες μεταξύ των σημαντικότερων εντόμων έδειξαν δύο τύπους *cry* γονιδίων, όμως άλλα είδη εντόμων έχουν ένα μόνο τύπο (Tomiooka and Matsumoto, 2010). Η ανακάλυψη ύπαρξης δύο τύπων *cry* γονιδίων στα νυκτόβια (moths) και στις πεταλούδες, προτείνει ότι ο ωρολογιακός μηχανισμός των Λεπιδοπτέρων εντόμων διαφέρει από αυτόν της *D. melanogaster*. Αυτό το αποτέλεσμα συνεπάγεται ότι ο μοριακός μηχανισμός του κερκαδικού ρολογιού, ο οποίος έχει προταθεί για τη *Drosophila*, δεν είναι κατάλληλος για όλα τα έντομα. Η C-terminal περιοχή του CRY παρουσιάζει μια φωτολυτική δραστηριότητα, λόγω της ύπαρξης των DNA-Photolyase και FAD-binding συντηρημένων περιοχών (Merlin *et al.*, 2006). Οι Busza *et al.* (2004) βρήκαν ότι η φωτολυτικής ομολογίας χρειάζεται για την υποδοχή του φωτός και τη φωτομεταφορά (phototransduction), ενώ η C-terminal περιοχή ρυθμίζει τη σταθερότητα της CRY κατά την αλληλεπίδραση CRY-TIM και την κερκαδική φωτοευαισθησία. Η δομική συντήρηση της DNA φωτολυάσης και της FAD binding περιοχής μεταξύ διαφορετικών CRYs, ίσως δείχνει κοινά χαρακτηριστικά του μηχανισμού, ιδιαίτερα κατά την φωτουποδοχή (Merlin *et al.*, 2006).

Η στοίχιση της SnoCRY1 και SnoCRY2 έδειξε υψηλή ομοιότητα με άλλες ταυτοποιημένες CRYs. Όπως φαίνεται στο φυλογενετικό δένδρο (Εικ.17), οι ακολουθίες CRYs της *S. nonagrioides* διαχωρίστηκαν σε δύο διαφορετικούς κλάδους με τις CRY1 και CRY2 άλλων εντόμων. Η SnoCRY1, σε ένα κλάδο μαζί με τα άλλα λεπιδόπτερα, είναι πλησιέστερη στην *A. pernyi* και *M. brassicae*.

Η έκφραση του *cry1* για την κερκαδικότητα, μελετήθηκε σε κεφάλια προνυμφών της *S. nonagrioides*. Είναι γνωστό ότι το κεφάλι υποστηρίζει το ρολοί και τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το κερκαδικό ρολοί εκφράζεται. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα μετάγραφα του *Snocry1* επάγονται από το φως και η ταλάντωση στο φως ήταν όμοια με την ταλάντωση στο σκοτάδι. Σε άλλες μελέτες, οι Merlin *et al.*, (2006) βρήκαν ότι η *cry1* εκφράζεται στο νυκτόβιο *Spodoptera littoralis*, εμφανίζοντας μέγιστα 6 ώρες μετά την έναρξη της φωτόφασης και μετά ελαττώνονταν στο ελάχιστο 3 έως 8 h μετά την έναρξη της σκοτόφασης. Οι Egan *et al.*, (1999) βρήκαν ότι στη *Drosophila* το *cry* ήταν αφθονότερο κατά τη διάρκεια της ημέρας παρά της νύχτας, και όμοια φαινόμενα παρατηρήθηκαν σε κοτόπουλα (Nagy and Csernus 2007).

Το γονίδιο *Snocycle* και ο ρόλος του στο κερκαδικό ρολόι

Απομονώσαμε και χαρακτηρίσαμε cDNA που κωδικοποιεί το *CYCLE* γονίδιο, ομόλογο του BMAL1, στη *S. nonagrioides*. Ένα διακριτό χαρακτηριστικό του *cycle* γονιδίου είναι η παρουσία αρκετών λειτουργικών περιοχών στην αμινοξική του ακολουθία.. Αυτές είναι η bHLH περιοχή, η οποία είναι η περιοχή πρόσδεσης στο DNA και οι περιοχές PAS A και PAS B, που λειτουργούν σαν πρωτεΐνες διμερισμού. Η SnoCYC έχει bHLH-PAS επικράτειες (domains) και αυτές είναι συντηρημένες, καθώς θεωρούνται χαρακτηριστικό γνώρισμα των προϊόντων των ωρολογιακών γονιδίων. Η παραγόμενη αμινοξική ακολουθία της SnoCYC, δείχνει εντυπωσιακή ομοιότητα με άλλους BMAL1 μεταγραφικούς παράγοντες και έχει υψηλή ομολογία με την dCYCLE, ιδιαίτερα στην bHLH-PAS περιοχή. Πάντως, η SnoCYC κωδικοποιεί 588 αμινοξέα, συγκριτικά με την dCYCLE που κωδικοποιεί 400, όμως μοιάζει σε μέγεθος με αυτό των σπονδυλωτών (Εικ. 23).

Σε κεφάλια προνυμφών της *S. nonagrioides*, τα επίπεδα των *SnoCyc* μεταγραφών ήταν χαμηλότερα κατά την ημέρα ((ZT 3) και εμφάνιζαν peak κατά τη νύχτα (ZT 21). Τα αποτελέσματα δεν δείχνουν ομοιότητα με αυτά της *Drosophila*, όπου τα επίπεδα μεταγραφής της *cycle* είναι σταθερά κατά την ημέρα. (Rutila *et al.*, 1998). Τα αποτελέσματα μας για τη SnoCYC δείχνουν παρόμοια λειτουργία με αυτή της BmCYC στο *B. mori* όπου τα dCYC-CLK ετεροδιμερή προσδένονται στα *per* και *tim* E-boxes και ενεργοποιούν τη μεταγραφή τους (όπως και στη *Drosophila*).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, τα ωρολογιακά γονίδια *Snoper*, *Snotim*, *Snocry* και *SnoCyc* στις χρονικές μελέτες σε *S. nonagrioides* προνύμφες, έδειξαν μια καθαρή κερκαδική ταλάντωση και μια φωτοπεριοδική ανταπόκριση. Κάτω από συνθήκες μεγάλης ημέρας και τα τέσσερα γονίδια κάτω δείχνουν χαμηλότερη έκφραση την ημέρα και υψηλότερη τη νύχτα. Σε συνθήκες μικρής ημέρας και τα τέσσερα γονίδια έδειξαν επίσης μια καθαρή κερκαδική ταλάντωση και μια φωτοπεριοδική ανταπόκριση, με μετατόπιση της κορύφωσης στο σκοτάδι, κατά 1-5 ώρες, σε σχέση με τις συνθήκες μεγάλης ημέρας.

B. Το φωτοπεριοδικό ρολόι της *S. nonagrioides*

Στον τριήμερο κύκλο φωτοπεριοδισμού 10L: 62D, οι προνύμφες της *S. nonagrioides* εισήλθαν σε διάπαυση και το pattern της έκφρασης των ωρολογιακών γονιδίων εμφάνισε κिरκαδικότητα μέσα στα πλαίσια της «υποκειμενικής ημέρας» και «υποκειμενικής νύχτας» του 1ου και 2ου εικοσιτετραώρου, ενώ το τρίτο εικοσιτετράωρο τα μέγιστα και των τριών γονιδίων εμφανίστηκαν την ίδια ώρα, στην αρχή της σκοτεινής φάσης, με διαφορές στην ποσότητα έκφρασης τους.

Στον τετραήμερο κύκλο φωτοπεριοδισμού, όταν είχαμε 62 ώρες σκοτάδι, όταν παρεμβλήθηκαν 10 ώρες σκότους στην διάρκεια της φωτεινής περιόδου, άλλαξε το pattern της έκφρασης των γονιδίων. Η μακρά περίοδος σκότους (62 ώρες) προκάλεσε διάπαυση, όμως οι 10 ώρες σκότους προκάλεσαν «διαχωρισμό» δύο μηχανισμών. Τα γονίδια *tim* και *cry* λειτούργησαν με «κίρκαδικό» τρόπο και εμφάνισαν μέγιστα ανάλογα με αυτά που εμφανίζονται σε συνθήκες 10L: 14D, ενώ τα γονίδια *per* και *cycle* λειτούργησαν με τρόπο φωτοπεριοδικό και εμφάνισαν pattern της έκφρασης όμοιο με αυτό του τριήμερου κύκλου 10L: 14D.

Οι Ikeno *et al.*, (2010) απεκάλυψαν ότι τα κίρκαδικά γονίδια είναι κρίσιμα όχι μόνο για ημερήσιους ρυθμούς, αλλά επίσης και για την φωτοπεριοδική διάπαυση του *Riptortus pedestris*. Μέσω RNA interference (RNAi) κατευθυνόμενο εναντίον των *period* και *cycle* γονιδίων, είχαν αντίθετη επίδραση στη φωτοπεριοδική διάπαυση. Προτείνουν ότι το κίρκαδικό ρολόι, στο οποίο τα γονίδια *per* και *cyc* λειτουργούν σαν αντίθετοι ρυθμιστές (opposing regulators), είναι ευαίσθητοι όχι μόνο σε ημερήσιους κύκλους αλλά και σε εποχιακά αναπτυξιακά γεγονότα. Έτσι, τα κίρκαδικά ρολόγια είναι κρίσιμα όχι μόνο για ημερήσιους ρυθμούς αλλά και για εποχιακή προσαρμογή. Αν και είναι πιθανόν αυτά τα γονίδια να ρυθμίζουν διακριτές επιδράσεις των *per* και *cyc* RNAi σε κίρκαδικούς ρυθμούς και φωτοπεριοδική διάπαυση, προτείνουν ότι το κίρκαδικό ρολόι εμπλέκεται στο φωτοπεριοδισμό.

Στα φυτά, το κίρκαδικό ρολόι ρυθμίζει τη φωτοπεριοδική απόκριση. Η συμμετοχή του κίρκαδικού ρολογιού στη φωτοπεριοδική απόκριση διευκρινίστηκε με την ανάλυση των επιδράσεων που ασκούν στην άνθηση, φωτεινές παρεμβολές κατά τη διάρκεια της σκοτεινής περιόδου. Έτσι, η σόγια που θεωρείται φυτό μικρής ημέρας (SDP) ανθίζει όταν για κάποιους κύκλους 24ώρου τοποθετηθεί συνεχόμενα

σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού. Αυτό συμβαίνει γιατί μόλις τα φυτά βρεθούν μόνιμα σε σκοτάδι, τότε προφανώς σε διάρκεια οι νύχτες υπερβαίνουν το κρίσιμο όριο των SDP με αποτέλεσμα την επαγωγή της άνθησης. Παρόλα αυτά, όταν κατά τη διάρκεια αυτής της παρατεταμένης σκοτεινής περιόδου παρεμβληθεί ένα φωτεινό σήμα τη χρονική στιγμή που το κερκαδικό ρολόι βρίσκεται στην νυχτερινή φάση (υποκείμενη νύχτα), τότε το φυτό δεν ανθίζει. Αντίθετα, όταν ο ίδιος χειρισμός πραγματοποιηθεί τη χρονική στιγμή που το κερκαδικό ρολόι βρίσκεται στην υποκειμενική μέρα, τότε η σόγια ανθίζει φυσιολογικά. Επομένως, κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης σκοτεινής περιόδου, το κερκαδικό ρολόι ρυθμίζει εάν τα φυτά θα αντιδράσουν σε κάποια φωτεινή παρεμβολή ή όχι (Park *et al.*, 1999 ; Niwa *et al.*, 2009).

Στην περίπτωση της *S. nonagrioides*, η παρεμβολή «σκοτεινής» παρεμβολής προκάλεσε αποδέσμευση 2 μηχανισμών. Επειδή τα μέγιστα δύο γονιδίων, των *per* και *cyc* παρέμεινα ίδια (συμπίπτουν) με αυτά του τριήμερου κύκλου, μετά την παρεμβολή μιας ημέρας πριν το παρατεταμένο σκοτάδι των 62 ωρών, είναι ένδειξη ότι υπάρχουν δύο μηχανισμοί. Για τα γονίδια *tim* και *cycle* η κορυφή μετακινήθηκε και αυτό δείχνει ότι αυτά τα γονίδια ελέγχονται από τον ίδιο μηχανισμό, που είναι κερκαδικός.

Η ιδέα ταλαντωτών που συμμετέχουν στην μέτρηση του φωτοπεριοδικού χρόνου, βασισμένων στο κερκαδικό ρολόι, από την πρώτη της παρουσίαση από τον Bunning το 1936, βρήκε υποστήριξη μέσα από μελέτες σε μύκητες (Roennenberg *et al.*, 2010), φυτά (Putterril *et al.*, 2010), πουλιά (Bentley, 2010) και θηλαστικά (Krigsfield and Bittman, 2010). Μέχρι σήμερα όμως, δεν έχει υπάρξει ομοφωνία ως προς τη μέτρηση του φωτοπεριοδικού χρόνου στην επιστήμη των εντόμων (Saunders, 2010 a,b). Παρ' όλη την μακρόχρονη προσπάθεια και τις συσσωρευμένες πληροφορίες, παραμένει δύσκολο να σχηματισθεί μία συμπερασματική και ευρέως αποδεκτή θεωρία. Οι διαφωνίες εντείνονται από πολυπλοκότητες σε όλα τα επίπεδα: μόρια και κύτταρα (ποικίλες γονιδιακές δομές, γονιδιακές αλληλεπιδράσεις και ανατροφοδοτήσεις μέσα στο κυτταρικό ρολόι, γονιδιακές πλειοτροπικές επιδράσεις), κυτταρικά δίκτυα και ιστοί (πολλαπλά εισαγωγικά μονοπάτια στο κερκαδικό ρολόι και στο φωτοπεριοδικό ημερολόγιο, ευέλικτες σχέσεις ανάμεσα στους ωρολογιακούς νευρώνες, συνεργασία των κεντρικών και περιφερειακών ταλαντωτών) οργανισμοί και είδη (εποχιακή φαινοτυπική πλαστικότητα στην αρχιτεκτονική και

λειτουργικότητα των συστημάτων συγχρονισμού, ποικιλία των λύσεων σε διαφορετικά είδη) (Emerson *et al.*, 2009).

Συνοπτικά, ο φωτοπεριοδισμός των εντόμων ελέγχεται από ένα **φωτοπεριοδικό ρολόι** και ένα **μετρητή**, που βρίσκονται σε άγνωστες δομές του εγκεφάλου και λαμβάνει πολλαπλά εισαγωγικά μηνύματα από ελάχιστα χαρακτηρισμένους φωτούποδοχείς. Η λειτουργική αρχή του φωτοπεριοδικού ρολογιού, βασίζεται πιθανόν σε ενιαίο κίρκαδικό ταλαντωτή που πυροδοτείται από το κύκλο ημερησίου φωτός και μετράει το μήκος της νύχτας (σκοτόφαση).

Οι σύγχρονες γνώμες για την σχέση ανάμεσα στα δύο συστήματα συγχρονισμού στο κίρκαδικό ρολόι και το φωτοπεριοδικό ρολόι, μπορούν να διαιρεθούν σε 3 μεγάλες κατηγορίες:

(Α) Η Ανεξαρτησία. Προβλέπει ότι τα δύο συστήματα διαχωρίζονται και είναι λειτουργικά ανεξάρτητα. Το γνωστό κίρκαδικό σύστημα βηματοδότη διέπει καθημερινά ρυθμούς συμπεριφοράς, ενώ μια υποθετική κλεψύδρα, με βάση το φωτοπεριοδικό σύστημα, ελέγχει τον αναπτυξιακό διακόπτη.

(Β) Η Συνεργασία. Υποθέτει ότι τα δύο συστήματα, κίρκαδικό ρολόι και το φωτοπεριοδικό ρολόι, διαχωρίζονται φυσικά (αν και μπορούν να επικαλύπτονται εν μέρει), αλλά λειτουργούν σε στενή συνεργασία. Τα φώτα εισόδου που οδηγούν προς τα δύο συστήματα, είναι ως επί το πλείστον ανεξάρτητα. Διαφορετικά υποσύνολα νευρώνων ταλαντώσεως οδηγούν στο κίρκαδικό ρολόι και τις φωτοπεριοδικές λειτουργίες. Αμφότερα τα συστήματα, εντούτοις, βασίζονται σε μοριακούς ωρολογιακούς μηχανισμούς των γονιδίων του κίρκαδικού ρολογιού.

(C) Η Ενότητα. Θεωρεί ότι υπάρχει μόνο ένα σύστημα, με διπλές λειτουργίες. Το κίρκαδικό ρολόι του συστήματος είναι επαρκές, για την εξασφάλιση τόσο των καθημερινών ρυθμών όσο και φωτοπεριοδικών ανταποκρίσεων (π.χ. διάπαυση των εντόμων). Οι φωτοπεριοδικές δραστηριότητες του συστήματος, βασίζονται σε εποχιακή πλαστικότητα στα γονίδια έκφρασης του κίρκαδικού ρολογιού, που λειτουργεί άριστα και κυρίως, στη σύνδεση μεταξύ των διαφόρων υποσύνολων των κυττάρων του ρολογιού.

Τα μοριακά αποτελέσματα των πειραμάτων μας στην εργασία αυτή, σε σχέση με τη φωτοπεριοδικότητα των εντόμων, σε προνύμφες του εντόμου *S. nonagrioides*,

οι οποίες σε διαφορετικές φωτοπεριόδους εισήλθαν σε διάπαυση, έδειξαν ότι για τα γονίδια *SnoPer*, *Snotim*, *Snocry1* και *SnoCyc*:

1. Η αλλαγή φωτοπεριόδου επηρεάζει άμεσα την mRNA έκφραση των ωρολογιακών γονιδίων (Εικ. 1, 2).

2. Η φωτοπεριοδική καμπύλη απόκρισης στα πειράματα Nanda-Hammer (Εικ. 3-7) επιδεικνύει περιοδικά peaks περίπου σε χωριστά 24h. Αυτές οι θετικές απηχήσεις θεωρούνται ενδείξεις βιολογικού κερκαδικού ρολογιού.

Από τη μεγέθυνση της διάρκειας του σκότους, φάνηκε ότι επηρεάστηκαν τα μέγιστα, τα οποία για όλα τα γονίδια συμβαίνουν στην ίδια ώρα, στο τέλος της σκοτεινής φάσης.

3. Τα αποτελέσματα απόκρισης στα πειράματα Nanda-Hammer (Εικ. 3-7) δείχνουν ένα ρολόι τύπου ταλαντωτή-oscillator. Ένα ρολόι τύπου «ταλαντωτής- oscillator» αλλάζει ένδειξη αυτόματα σε μεγαλύτερη περίοδο σκότους.

4. Στη φωτοπερίοδο (LD10:62) (τριήμερος κύκλος) (Εικ. 3-7) είδαμε ένα peak στο τέλος της σκοτόφασης, για όλα τα γονίδια. Σε φωτοπερίοδο (L10:14D:10L:62D)(τετραήμερος κύκλος) (Εικ. 8-12) είδαμε ότι για τα γονίδια *SnoPer* και *Snocycle* το peak συμπίπτει με το peak LD10:62. Αυτό μας δείχνει ότι η φωτεινή επίδραση που προσθέσαμε δεν τα επηρέασε και είναι μια ένδειξη ότι η κερκαδικότητα και η φωτοπεριοδικότητα ρυθμίζονται από τα ίδια γονίδια. Έτσι, τα κερκαδικά ρολόγια είναι κρίσιμα όχι μόνο για ημερήσιους ρυθμούς αλλά και για εποχιακή προσαρμογή.

5. Σε σχέση με τα *Snotim* και *SnoCry*, των οποίων αλλάζει η εικόνα έκφρασης, φαίνεται ότι έχουμε αποσύζευξη των συστατικών (γονιδίων) του μηχανισμού.

Αυτά τα γεγονότα ίσως δείχνουν ότι έχουμε 2 μηχανισμούς, που λειτουργούν όμως με τα ίδια clock γονίδια.

ΜΕΡΟΣ Β

Μελέτη θερμοεπαγωγής στο έντομο *S.nonagrioides*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Τα γονίδια *Hsp19.5* και *SnoHsp20.8*

1.1 Νουκλεοτιδικές και προβλεπόμενες αμινοξικές αλληλουχίες

Τα μήκη των cDNA για τα γονίδια *Hsp19.5* και *Hsp20.8* είναι 787 και 768 νουκλεοτίδια, αντιστοίχως (Εικ. 1 και 2). Το cDNA της *Hsp19.5* (Εικ. 1) χαρακτηρίζεται από ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο 522 bp, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 174 αμινοξέων με *pI* 5.97 και μέγεθος 19.5 kDa. Υπάρχει μια 5' - αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR) 144 bp που προηγείται του κωδικονίου έναρξης (ATG). Το σημείο πολυαδενυλίωσης (AATAAA) παρουσιάζεται στο νουκλεοτίδιο 740. Αυτό το γονίδιο έχει καταχωρηθεί σε GenBank με αριθμό κατάθεσης EU668902. Συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών με τα προγράμματα NCBI GenBank και PROSITE έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει μια μεγάλη ομοιότητα με τη μικρή πρωτεΐνη θερμικού σοκ της οικογένειας *Hsp20*. Συνεπώς, αυτή η πρωτεΐνη της *S. nonagrioides* θα αναφέρεται ως *SnoHsp19.5*. Μέσω της χρήσης και της ανάλυσης με το πρόγραμμα PROSITE (Falquet *et al.*, 2002), διαπιστώθηκε ότι η *SnoHsp19.5* έχει ένα μοτίβο δευτεροταγούς τροποποίησης, που εμπεριέχει μια θέση φωσφορυλίωσης από την κινάση της καζεΐνης II (Εικ. 1). Μέσω της χρήσης του προγράμματος GOR4 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin>) (Garnier *et al.*, 1996), οι δευτεροταγείς δομές της *SnoHsp19.5* παρουσιάστηκαν σε σχέση με τις ανάλογες προβλεπόμενες αμινοξικές ακολουθίες και έδειξαν ότι: κατά 14,94% ότι έχει εκτεταμένη δομή, κατά 27,01% μια α-έλικα περιοχή και κατά 58,05% διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος.

```

gatcagttcaaattgaacaagcgagtgcgaaacaagtgcaaagcgattcggagaatTTTT 60
ctgtaatcaacctacgatttgcctgagatcttacaaattctacgaggttttgaagctatc 120
cagtgaataactaatctaagaaaaatgtctctgctaccattggtgttgactacgagttg 180
                                M S L L P L L F D Y E L 12
agccgtccccgcctcatggaacagcagttcggcttggggctgacaccggaagaccttctc 240
S R P R L M E Q Q F G L G L T P E D L L 32
catggtgccggacctttgatgagcagggagtactatagaccctggcgccacctcgcagca 300
H V A G P L M S R E Y Y R P W R H L A A 52
gctgcccgtgacgtcggctccagcatcaagtctgacaaagacaagttccaagtgaaccta 360
A A R D V G S S I K S D K D K F Q V N L 72
gacgtgcagcattccacccccggaagaaatcagcgtgaagactgccgatggatacatagtc 420
D V Q H S T P E E I S V K T A D G Y I V 92
gtcgaaggtaaacacgaggaggagaaggaccagcatggtttcatttcccggcagtttacc 480
V E G K H E E E K D Q H G F I S R Q F T 112
                                Sn19.5 RT-For →
cgccgctacgctttaccagaaggctgtgtaccagagtcggtggaatctaagctgtcttct 540
R R Y A L P E G C V P E S V E S K L S S 132
gacggcgttttgacagtgacggccccctagggaagggtgcctcttgctgttcaggggtgagcgc 600
D G V L T V T A P R K V P L A V Q G E R 152
aacattcccatcacgactggaccagtgcgcaaggaggtgaaagatcaggccaacgggt 660
N I P I T Q T G P V R K E V K D Q A N G 172
                                ← Sn19.5 RT-Rev
gacaagtgaagcgatgtgatctagtgcttttagtcattcctctcgatgttctctttgtcta 720
D K * 174
agactgattgttttaagctaaataaatacttacttgatttttaaatttaaaaaaaaaaaaa 780
aaaaaaa 787

```

Εικ. 1. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου της *SnoHsp19.5* του εντόμου *S. nonagrioides*. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των 174 κωδικονίων εμφανίζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **tga**: κωδικόνιο λήξης; **aataaa**: σημείο πολυαδενυλίωσης. Το τμήμα που εσωκλείεται σε κουτί είναι τα άλφα κρυσταλλικό τμήμα. Η θέση φωσφορυλίωσης από την κινάση της καζεΐνης II (27-30 TPED) είναι υπογραμμισμένη.

```

tcaagtgacaagagaaccacaagcgcctttcaaagcgcattcaagcgcatttctcagcaactt 60
ttagaaagaagaaagtttatattattgtacaagatgctctctgttaccatatttgttcgac 120
                                     M S L L P Y L F D 9
gatttcggttttccaccgccttgcgcctgatgaatcagcacttccgggttggcactaaca 180
D F G F H R P R R L M N Q H F G L A L T 29
cctgaagacctcctctctgttgcctgctggaccttgcctgacgagtgaaactacagacct 240
P E D L L S V A A G P L L T S E Y Y R P 49
tggagacacgctcgcagctgctgctaaagatctgggctccagcatcaagactgatggagat 300
W R H V A A A A K D L G S S I K T D G D 69
aagcttcaaattaacttggatgtacagcagtttgcgcctgaagagatttcggtgaagacg 360
K L Q I N L D V Q Q F A P E E I S V K T 89
gtcgatgggtacattgtggtggaaggcaaacatgaggagaagaaggacgagcacggctac 420
V D G Y I V V E G K H E E K K D E H G Y 109
atcagtcggcagttcgtgcaaggtacgcattgcccagcggcgtggaacccgagtcctgtg 480
I S R Q F V R R Y A L P D G V E P E S V 129
gagtcacgcctctcgtctgacgggtgctgaccgtcacggcgcctaggaagctgccagaa 540
E S R L S S D G V L T V T A P R K L P E 149
gccttaaaggagagaggaaggtgcccatcgcgcagactggaccggttcgcaaggagatc 600
A L K G E R K V P I A Q T G P V R K E I 169
aaggatcagagcaatggaaccgaagaaaacaaggaaaaggaaaagaagtaaaatgtctaa 660
K D Q S N G T E E N K E K E K K * 185
tttgttttagtttagttttgttaaaccggtgctgttttaaattgtttcttgggccaagtcca 720
gactgattgtttttgttttaataaagttacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 768

```

Εικ. 2. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου της *SnoHsp20.8* του εντόμου *S. nonagrioides*. Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο των 185 κωδικονίων εμφανίζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **taa**: κωδικόνιο λήξης; **aataaa**: σημείο πολυαδενυλίωσης. Το τμήμα που εσωκλείεται σε κουτί είναι τα άλφα κρυσταλλικό τμήμα. Η θέση της N – γλυκοσυλίωσης (174-177 NGTE) και η θέση φωσφορυλίωσης από την κινάση της καζεΐνης II (29-32 TPED), (66-69 TDGD) είναι υπογραμμισμένες.

Συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών τόσο με τα προγράμματα NCBI GenBank και PROSITE έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει μια μεγάλη ομοιότητα με τις μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (sHsp) τύπου α-κρυσταλλίνες. Συνεπώς, αυτή η πρωτεΐνη της *S nonagrioides* θα αναφέρεται ως SnoHsp20.8. Το άλφα κρυσταλλικό τμήμα της SnoHsp20.8 αποτελείται από 84 αμινοξέα, στις θέσεις 62-145, που παρουσιάζονται στην εικ. 2. Μέσω της χρήσης του προγράμματος PROSITE (Falquet *et al.*, 2002), διαπιστώθηκε ότι SnoHsp20.8 έχει αρκετά μοτίβα δευτεροταγούς τροποποίησης, που

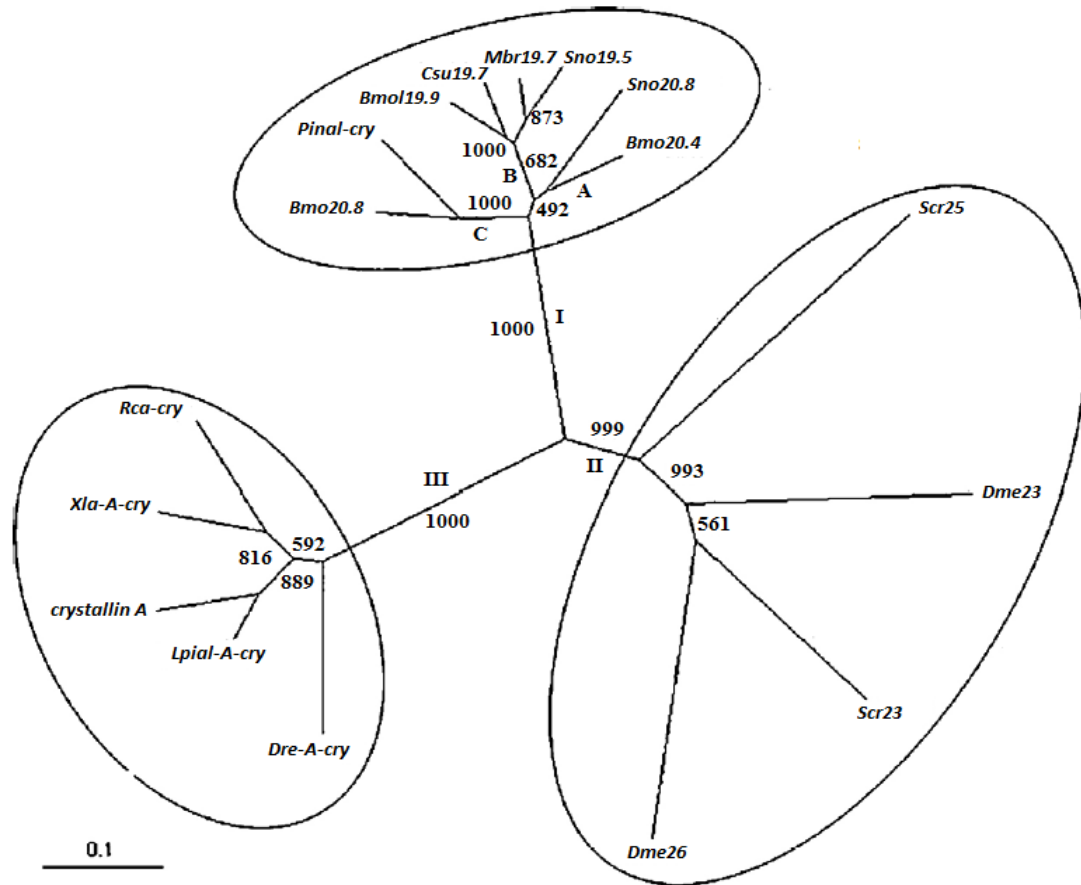
εμπεριέχουν μια θέση της N – γλυκοσυλίωσης και δυο θέσεις φωσφορυλίωσης από την κινάση της καζεΐνης II (Εικ. 2). Μέσω της χρήσης του προγράμματος GOR4 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin>) (Garnier *et al.*, 1996), οι δευτεροταγείς δομές του SnoHsp19.5 παρουσιάστηκαν σε σχέση με τις ανάλογες προβλεπόμενες αμινοξικές ακολουθίες και έδειξαν ότι: κατά 14,59% έχει εκτεταμένη δομή, κατά 29,73% μια α-έλικα περιοχή και κατά 55,68% διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος.

1. 2. Συγκρίσεις αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Για να ανακτήσουμε πρωτεϊνικές αλληλουχίες παρόμοιες με εκείνες των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8*, αναζητήθηκαν σχετικές βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* επέδειξαν υψηλό βαθμό ομοιότητας με εκείνες των άλλων εντόμων που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ομοιότητα αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ SnoHsp19.5 / SnoHsp20.8 και sHsp πρωτεϊνών άλλων εντόμων

Sequence name	Insect	GenBank acces.	Sequence Identity (%)	
			<i>Hsp19.5</i>	<i>Hsp20.8</i>
<i>Hsp19.5</i>	<i>S. nonagrioides</i>	EU668902	-	75
<i>hsp20.8</i>	<i>S. nonagrioides</i>	AB118968	75	-
<i>hsp20.4</i>	<i>Bombyx mori</i>	AF315318	79	83
<i>hsp19.9</i>	<i>B. Mori</i>	BAD74195	84	79
<i>hsp19.7</i>	<i>Chilo suppressalis</i>	BAE94664	85	78
<i>hsp19.7</i>	<i>Mamestra brassicae</i>	BAF03558	90	77
<i>Hsp2</i>	<i>Lonomia oblique</i>	AAV91361	75	74
<i>hsp20.8</i>	<i>B. mori</i>	AF315317	71	72
<i>hsp21.5</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>	AAZ14790	69	70
<i>acr25</i>	<i>Plodia interpunctella</i>	AAC36146	68	69
<i>hsp19.8</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>	AAZ14792	73	67



Εικ. 3. Φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα (Bootstrap Neighbour-Joining Tree) που δημιουργήθηκε από την αντιστοίχιση των SnoHsp19.5 and SnoHsp20.8 ακολουθιών με γνώστες sHsps πρωτεϊνικές ακολουθίες, μέσω της χρήσης του προγράμματος βιοπληροφορικής (CLUSTALX v1.8). Οι τιμές Bootstrap για τους κλάδους, φαίνονται στην εικόνα (1000 επαναλήψεις). Οι αριθμοί της GenBank καταχώρησης και οι συντομογραφίες (σε παρένθεση) αυτών των πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι οι εξής: *Mamestra brassicae*: heat shock protein 19.7, BAF03558 (Mbr19.7); *Bombyx mori*: heat shock protein 20.8, AF315317 (Bmo20.8); *Plodia interpunctella*: alpha-crystallin cognate protein 25, AAC36146 (Pinal-cry); *Sarcophaga crassipalpis*: 25 kDa small heat shock, AB206941 (Scr25) and 23 kDa small heat shock, AAC63387 (Scr23); *Drosophyla melanogaster*: 23 kDa heat shock protein of 523999 (Dme23) and 26 kDa heat shock protein, CAA27526 (Dme26); *Rana catesbeiana*: A-crystallin a-chain, Q91311 (Rca-cry); *Xenopus laevis*: alpha A crystalline, BAA76897 (Xla-A-cry); *Latus ridibunds*: crystalline alpha A, 1010303 (crystalline A); *Lygodactylus picturatus*: alpha A-crystallin, CAF02103 (Lpial-A-cry); *Danio rerio*: crystalline alpha A, NP6944482 (Dre-A-cry).

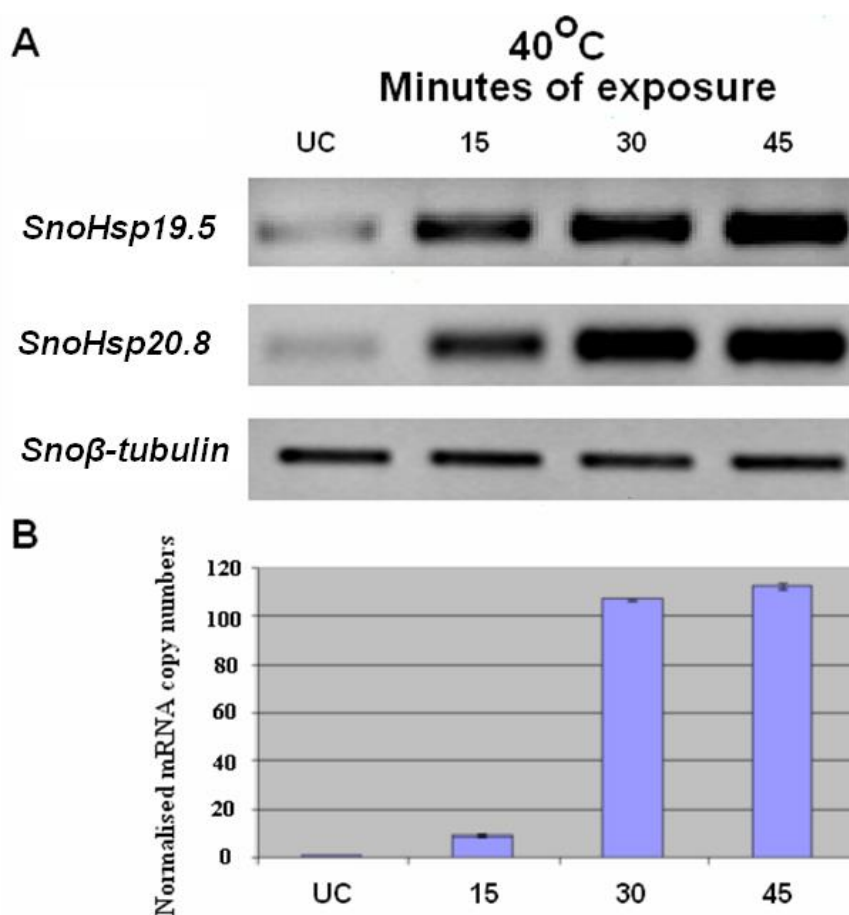
Για την *SnoHsp19.5*, η υψηλότερη αμινοξική ομοιότητα (90%) παρατηρήθηκε με το γονίδιο *Hsp19.7* της *Mamestra brassicae*. Η *SnoHsp20.8* έχει 83% ομοιότητα με το γονίδιο *Hsp20.4* του *B. mori*. Τα δύο γονίδια, *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* είναι κατά 75% όμοια μεταξύ τους. Η σύγκριση αυτή δείχνει επίσης ότι όλα τα γονίδια έχουν ένα άλφα κρυσταλλικό τμήμα και μια θέση N – γλυκοσυλίωσης (James *et al.*, 1994). Η N-τερματική υδρόφοβη θέση συσσωματώσεως είναι παρούσα στις *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* (Εικ. 1 και 2), όπως έχει βρεθεί και σε άλλα λεπιδόπτερα. Στην *S. nonagrioides*, ο αριθμός των Cys υπολειμμάτων διαφοροποιούν τις δύο sHsps, όπως ακριβώς και στις sHsps του *B. mori* (Sakano *et al.*, 2006). Η *SnoHsp19.5* έχει Cys 0,6%, ενώ η *SnoHsp20.8* δεν έχει Cys υπολείμματα.

Για να αναδείξουμε τη σχέση των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με συγγενή γονίδια άλλων εντομών, προχωρήσαμε σε μια φυλογενετική ανάλυση με συλλογή αμινοξικών αλληλουχιών από διάφορες sHsps και α-κρυσταλλίνες. Όπως φαίνεται στην Εικ. 3, το δέντρο χωρίστηκε σε τρεις κλάδους. Οι κλάδοι I και II αποτελούνται από τις οικογένειες γονιδίων *Hsp20* και *Hsp27* αντίστοιχα, ενώ ο κλάδος III περιέχει γονίδια της α- κρυσταλλίνης. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι ο κλάδος I, που ανήκει το γονίδιο της *Hsp20* οικογένειας, διαχωρίζεται περαιτέρω σε τρεις ομάδες. Η πρώτη (A) περιέχει τις *SnoHsp20.8* και *B. mori Hsp20.4*, η δεύτερη (B) περιέχει την *SnoHsp19.5* και την *B. mori Hsp19.9*, και η τρίτη (C) περιέχει την *B. mori Hsp20.8*.

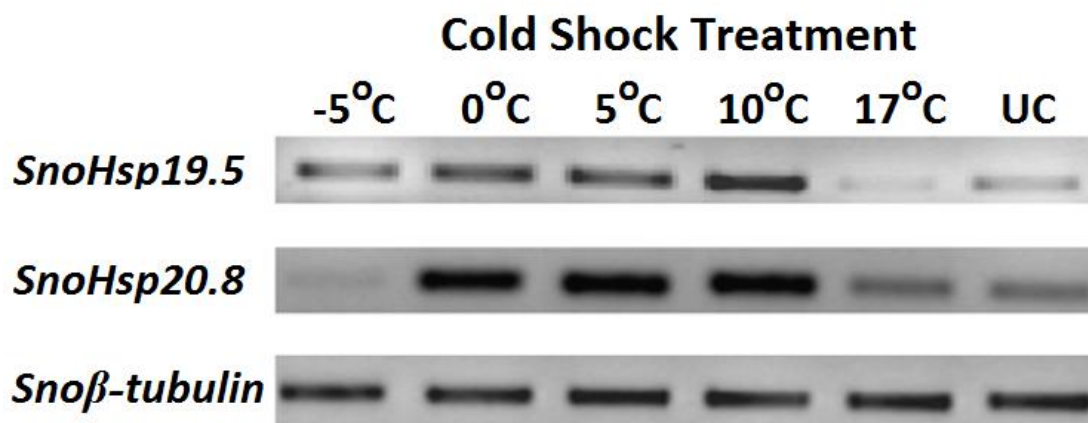
1.3. Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων μετά από θερμικό και ψυχρό στρες

Για να διερευνηθεί αν το περιβαλλοντικό στρες, όπως υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8*, μη διαπαύουσες προνύμφες του εντόμου *S. nonagrioides* εκτέθηκαν σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών θερμοκρασιών. Τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* σε μη-διαπαύουσες προνύμφες αυξήθηκαν δραματικά μετά την έναρξη του θερμικού σοκ στους 40° C (Εικ. 4). Τα γονίδια *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* είναι ιδιαίτερος θερμοεπαγόμενα γονίδια και ανταποκρίθηκαν γρήγορα στο θερμικό στρες. Παρατηρήθηκε 10-πλάσια αύξηση στην συσσώρευση mRNA εντός 15 λεπτών από την έκθεση σε θερμική καταπόνηση, υποδεικνύοντας ότι η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης εκδηλώνεται μέσα σε λίγα λεπτά μετά από την έκθεση στο θερμικό σοκ. Μια 10-πλάσια αύξηση παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ 15

και 30 λεπτών στους 40° C, δείχνοντας ότι η γονιδιακή έκφραση παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Περαιτέρω έκθεση σε θερμικό στρες (40° C) δεν είχε σχεδόν καθόλου πρόσθετο αποτέλεσμα, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση mRNA και των δύο γονιδίων έφθασε στα μέγιστα επίπεδα της, εντός των 30 λεπτών. Το ψυχρό στρες επηρέασε επίσης την έκφραση του *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* (Εικ. 5). Σε μη-διαπαυουσες προνύμφες, δεν υπήρχε επαγωγή της έκφρασης γονιδίου όταν το RNA απομονώθηκε από προνύμφες αμέσως μετά το ψυχρό στρες. Ωστόσο, η επαγωγή και των δύο γονιδίων ήταν εμφανής μετά την ανάκαμψη τους: για 1 ώρα στους 25° C μετά από 1 ώρα σε ψυχρό σοκ στους -5, 0, 5 ή 10° C για το *SnoHsp19.5* και 0, 5 ή 10° C για το *SnoHsp20.8*.



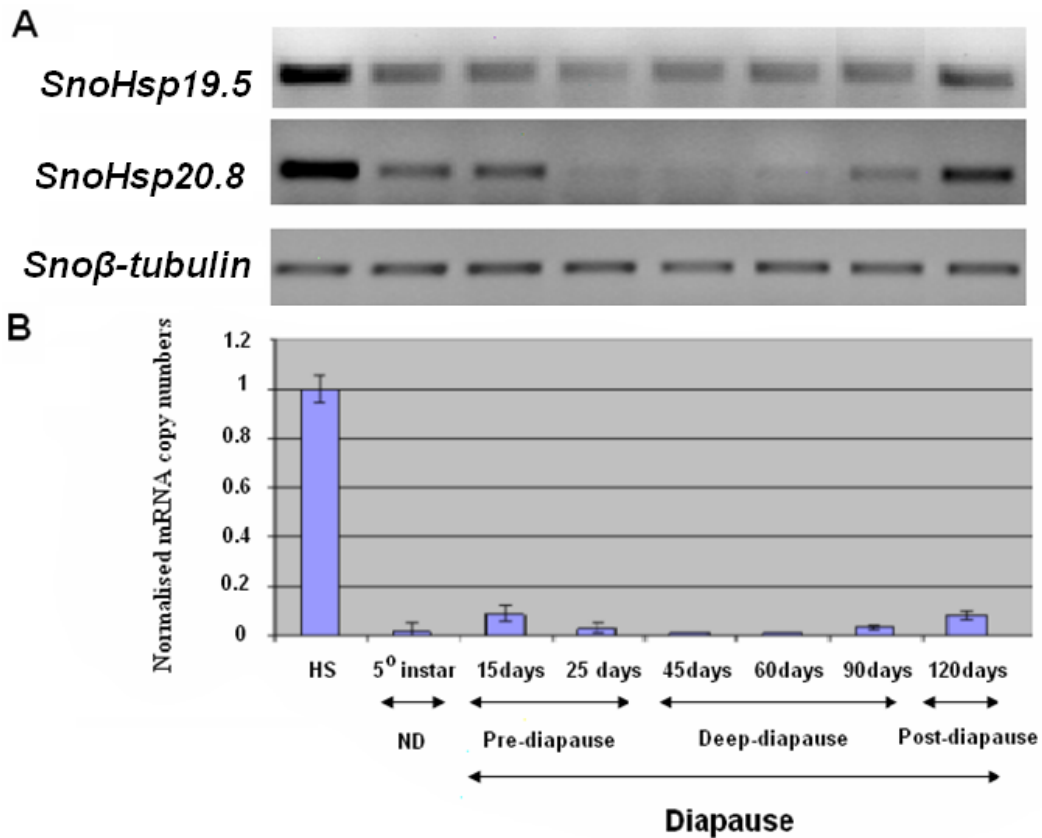
Εικ. 4. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από θερμικό στρες σε μη διαπαυουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι δειγματοληψίες έγιναν σε 15,30 και 45 λεπτά μετά το θερμικό στρες στους 40° C. **UC: μάρτυρας.** Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*.



Εικ. 5. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από ψυχρό στρες σε μη-διαπαουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι μη-διαπαουσες προνύμφες εκτέθηκαν σε ψυχρό στρες για 1 ώρα σε θερμοκρασίες -5°C, 0°C, 5°C, 10°C and 17°C και μετά μεταφέρθηκαν για 1 ώρα σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι (LD 16:8) στους 25°C. UC: μάρτυρας. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ-Tub*.

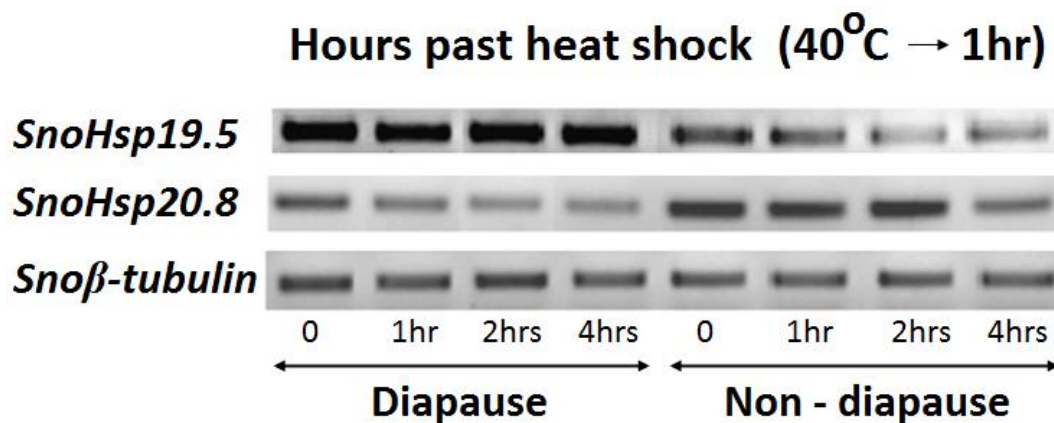
1.4. Έκφραση των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης

Για να διερευνήσουμε τα πρότυπα έκφρασης των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, απομονώθηκε RNA από 5^o αναπτυξιακό στάδιο (5th instar) διαπαουσών και μη διαπαουσών προνυμφών και αναλύθηκε με ημι-ποσοτικό RT-PCR (Εικ. 6). Στους 25^o C, μια μη στρεσογόνα θερμοκρασία, η παρουσία των mRNAs που κωδικοποιούν τις sHsps συνδέεται με το σύνολο της περιόδου της διάπαυσης. Όπως φαίνεται στην Εικ. 6, η έκφραση του mRNA του *SnoHsp19.5* ήταν αισθητή από την περίοδο της προ-διάπαυσης (15 ημέρες από την εκκόλαψη) μέχρι την περίοδο της μετά-διάπαυσης (120 ημέρες από την εκκόλαψη). Τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp20.8* αυξάνονται στην περίοδο της προ-διάπαυσης, καταστέλλονται κατά τη διάρκεια της βαθιάς προνυμφικής διάπαυσης και αυξάνονται πάλι στο στάδιο της μετά-διάπαυσης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα γονίδια *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* έχουν διαφορετική ρύθμιση κατά τη διάρκεια της διάπαυσης.



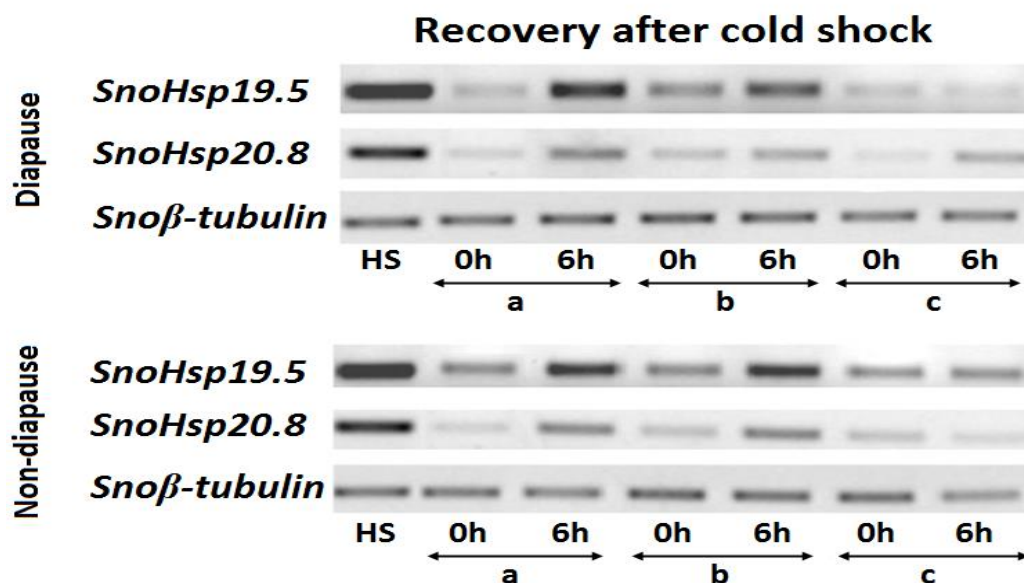
Εικ. 6. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από ψυχρό στρες σε μη-διαπαουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση) και σε διαπαουσες προνύμφες που έχουν εκτραφεί σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C και LD 10:14 στους 25°C, αντίστοιχα. **HS:** μη-διαπαουσα προνύμφη που έχει εκτεθεί σε θερμικό στρες στους 40oC για 15 λεπτά. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*.

Για να ορίσουμε το λεπτομερές μεταγραφικό προφίλ των δύο γονιδίων κατά τη διάρκεια της διάπαυση και της μη διάπαυσης, υποβάλλαμε την έκφραση τους για 1 ώρα στους 40° C (Εικ. 7). Αμφότερα τα γονίδια ήταν ταχέως εκφραζόμενα σε παρόμοια επίπεδα (Εικ. 7). Ωστόσο, σε συνθήκες μη-διάπαυσης, τα *SnoHsp20.8* μεταγραφήματα παρέμειναν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό,τι τα *SnoHsp19.5* mRNAs. Το φαινόμενο αυτό αντιστρέφεται όταν οι προνύμφες ήταν σε διάπαυση. Τα μεταγραφήματα των *SnoHsp19.5* παρέμειναν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό,τι τα *SnoHsp20.8* mRNAs, υποδεικνύοντας ότι το πρώτο γονίδιο μπορεί να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην διάπαυση.



Εικ. 7. Ανάλυση των μεταγραφικών επίπεδων των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από θερμικό στρες σε διαπαουσες προνύμφες (50 ημέρες από την επώαση) και σε μη-διαπαουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε θερμικό στρες στους 40°C για 1 ώρα και μετά μεταφέρθηκαν σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Οι μη-διαπαουσες και διαπαουσες προνύμφες έχουν εκτραφεί σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C (μη διάπαυση) και φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 10:14 στους 25°C (διάπαυση), αντιστοίχως. Οι αριθμοί δείχνουν τις ώρες μετά την επιστροφή των προνυμφών σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*.

Επιπλέον, εξετάσαμε τις επιδράσεις του ψυχρού στρες (-5° C για 15, 30 ή 60 λεπτά) στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* σε διαπαουσες και μη-διαπαουσες προνύμφες (Εικ. 8), όπου παρατηρήσαμε υψηλότερα επίπεδα των μεταγραφημάτων μετά από 6 ώρες ανάκτησης. Παρατηρήσαμε μια προφανή επαγωγή / mRNA συσσώρευση εντός 60 λεπτών μετά την ανάκτηση σε 25° C, όταν διαπαύουσες ή μη διαπαύουσες προνύμφες δέχτηκαν ψυχρό στρες για 15 ή 30 λεπτά. Ωστόσο, όταν οι προνύμφες δέχτηκαν ψυχρό στρες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (60 λεπτά) στους 5° C, δεν παρατηρήθηκε προφανής επαγωγή / mRNA συσσώρευσης 6 ώρες μετά την ανάκτηση, με εξαίρεση το γονίδιο *SnoHsp20.8* στις διαπαύουσες προνύμφες (Εικ. 8).



Εικ. 8. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από ψυχρό στρες σε διαπαύουσες προνύμφες (50 ημέρες από την επώαση) και σε μη-διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε ψυχρό στρες στους -5°C για: (a) 15 λεπτά, (b) 30 λεπτά και (c) 60 λεπτά και μετά μεταφέρθηκαν φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Οι αριθμοί δείχνουν τις ώρες μετά την επιστροφή των προνυμφών στους 25°C. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ-Tub*.

2. Τα γονίδια *SnoHsc70* και *SnoHsp70*

2. 1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός των *Hsc/Hsp70* cDNA

Πραγματοποιήθηκε RT-PCR για να κλωνοποιηθεί το κομμάτι του DNA που αντιστοιχεί στα γονίδια *Hsc/Hsp70*. Τα ενισχυμένα κομμάτια απομονώθηκαν και οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες έχουν προσδιορισθεί. Μια πλήρους μήκους cDNA αλληλουχία (Εικ. 1) μήκους 2166 bp αλληλουχήθηκε, η οποία περιέχει ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) που καλύπτει τα νουκλεοτίδια 104-2065 και παράγει μια υποθετική πρωτεΐνη 653 αμινοξέων, με σχετικό μοριακό βάρος 71,5 kDa και pI 5.38. Υπάρχει επίσης μια 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή 103 bp, που προηγείται του κωδικονίου έναρξης (ATG). Το σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA) παρατηρείται στα νουκλεοτίδια 2134-2139, 12 νουκλεοτίδια πριν από την poly (A) ουρά. Συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών με τα προγράμματα NCBI GENBANK και PROSITE έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη ανήκει στην κατηγορία κυτοσολικής Hsc70 kDa πρωτεΐνης. Συνεπώς, αυτή η πρωτεΐνη της *S. nonagrioides* θα αναφέρεται ως *SnoHsc70*. Η cDNA αλληλουχία κατατέθηκε στην GENBANK με αριθμό προσχώρησης DQ004584.

Η δεύτερη ολοκληρωμένη cDNA αλληλουχία (Εικ. 2) είναι μήκους 2318 bp και περιέχει ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) που καλύπτει τα νουκλεοτίδια 132-2090, παράγοντας μία πρωτεΐνη 633 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 70,2 kDa και pI 5.76. Υπάρχει μια 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή 131 bp, που προηγείται του κωδικονίου έναρξης (ATG). Παρατηρείται ένα σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA) στα νουκλεοτίδια 2272 - 2277, 23 νουκλεοτίδια πριν από την poly (A) ουρά. Συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών με τα προγράμματα NCBI GENBANK και PROSITE έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι μία πρωτεΐνη Hsp70. Συνεπώς, αυτή η πρωτεΐνη της *S. nonagrioides* θα αναφέρεται ως *SnoHsp70*. Η cDNA αλληλουχία κατατέθηκε σε GENBANK με αριθμό προσχώρησης EU430480.


```

tattgacttgggtactgtcgacctcgagtttttttttttttttttttttttggcaggttactcta 61
cgagtttaagtcaacgactgagatagttatagaaaatcaaaaaatggcagcaaaaagccccc 121
M A A K A P 6
gctgtaggtattgacttgggtaccacttactcgtgctgggagttttccagcatggtaaa 181
A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K 26
gtggagatcatcgcaaatgaccagggcaacaggaccacgcoccatatgtagcgttcacc 241
V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T 46
gacaccgagcgttcatcgagatgcccgaagaaccaggtggcagatgaacccaacaac 301
D T E R L I G D A A K N Q V A M N P N N 66
acaattttcgatgccaacgtctcatcgagcgaatcgaagatgctactgtacaagct 361
T I F D A K R L I G R K F E D A T V Q A 86
gacatgaagcactggcccttcgaggtgtcagtgatgggtggcaagcacaagatcaaggtt 421
D M K H W P F E V V S D G G K P K I K V 106
gcatacaagggatgaagataaaaccttctccctgaggaagttagctcaatgggtgctcaca 481
A Y K G E D K T F F P E E V S S M V L T 126
aaaaatgaaggaaactggcagggcacaacttggcaaaaacgggtgcagaatgcagtaatacaca 541
K M K E T A E A Y L G K T V Q N A V I T 146
gtccagcgtacttcaatgactcacagagacaagcccaaaaagatgcaggtaccatctct 601
V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T I S 166
ggtttgaatgttctccgtattatcaatgaaccaactgctgctgagattgcatacggcctt 661
G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L 186
gacaagaagggtagtggagaacaaatgactgattttcgtatctcggcggcggtaccttt 721
D K K G S G E R N V L I F D L G G G T F 206
gatgtgtccatcctgaccatcgaggatgggtatcttcgaagtaaagtcactgctgggtgac 781
D V S I L T I E D G I F E V K S T A G D 226
acacatttgggaggagacttcgacaacccgcatggccaaccatttggcagggagttc 841
T H L G G E D F D N R M V N H F V Q E F 246
aagaggaaatacaaaaaggacctgtgaccaacaagggcccttaggcgattgcccact 901
K R K Y K K D L A T N K R A L R R L R T 266
gcttgcgaaagggcgaagagaactctcctcgtccacacaggttagcattgaaatcgac 961
A C E R A K R T L S S S T Q A S I E I D 286
tctctgttcgagggatcgacttctacacgtccattaccagggctcgttttcgaggaactg 1021
S L F E G I D F Y T S I T R A R F E E L 306
aacgccgatctgttttagatccaccatggagcctgtggagaagtcctccgtgatgogaag 1081
N A D L F R S T M E P V E K S L R D A K 326
atggacaaatctcaaatccacgatatcgtacttggtagtggttctactcgtattcccaaa 1141
M D K S Q I H D I V L V G G S T R I P K 346
gtgcagaagctccttcaagacttcttaaatggcaaggagcttaacaaaatccatcaacc 1201
V Q K L L Q D F F N G K E L N K S I N P 366
gacgagggcgttagcttatgggtgcgcgctccagggcggccatttggcagggtagacaagtct 1261
D E A V A Y G A A V Q A A I L H G D K S 386
gaagaggtacaggatctgctgctgctgacrtgactccgctgtcactcgggtatcgaacc 1321
E E V Q D L L L D X T P L S L G I E T 406
gcccgtgggtcatgaccacccttatcaagcgcaaacaccaccattcccacaagcagact 1381
A G G V M T T L I K R N T T I P T K Q T 426
caaacctttaccactgctctgacaaccagcctggagtactcattcaggtgttcgagggc 1441
Q T F T T C S D N Q P G V L I Q V F E G 446
gagcgcgccatgaccaaggataacaatttactcggaagtttgagctgaccggcattcct 1501
E R A M T K D N N L L G K F E L T G I P 466
cccgcgcgcgtggcgtacctcaaatgaaagtcacctcgcacatcgacgctaacggcatt 1561
P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I 486
cttaacgtgtctgctgctcgagaatcgactaacaaggagagaacaagattaccatcaccaac 1621
L N V S A V E K S T N K E N K I T I T N 506
gacaagggcgtcttcaaggaggagattgagcgcagtggtcaacgaggctgagaataac 1681
D K G R L S K E E I E R M V N E A E K Y 526
aggactgaggatgagaagcagaaggagacgatccaggctaagaacgctctggaatcttac 1741
R T E D E K Q K E T I Q A K N A L E S Y 546
tgcttcaacatgaagtcacaatggaggatgagaagctcaaggacaaaatctcagactct 1801
C F N M K S T M E D E K L K D K I S D S 566
gacaaaacagactatcctggacaagtgcaacgacaccatcaaatggctggactccaatcgg 1861
D K Q T I L D K C N D T I K W L D S N R 586
ctggctgataaggaagaatacagacacaagcagaaggagctggaaggaatctgcaaccct 1921
L A D K E E Y E H K Q K E L E G I C N P 606
attatcaccagaatgtaccagggagcaggtggtatgcccggcggtatgcccgggtggcatg 1981
I I T K M Y Q G A G G M P G G M P G G M 626
cccggcttccctggcggcgtcccccggcgtggaggcgtgctccctcgggtggcgggtgcccgc 2041
P G F P G G A P G A G G A A S G G G A G 646
cctaccatcgaagaggtcgattaaacattccaacagattatacagcatgcttttactgat 2101
P T I E E V D *
atctcagtttcaactacagtacagtatctccaaataatgaatgaaactgaaaaaaaaa 2161
aaaaa 2166

```

Εικ. 1. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου *SnoHsc70* του εντόμου *S. nonagrioides*. Το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο παρουσιάζεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία, με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **taa**: κωδικόνιο λήξης; σημείο πολυαδενυλίωσης **aaataaa**: Τρεις signatures στις θέσεις 10-17, 198-211 και 335-349 περιγράφονται με έντονη γραφή. Το τμήμα που εσωκλείεται σε κουτί (132-139) είναι η θέση πρόσδεσης ATP-GTP; το κυταροπλασματικό Hsp70 καρβοξυλικό άκρο στην θέση (650-653) περιγράφεται με έντονη γραφή.

```

attcagtatattgaaaatacaaaacaagcgaagagaactgtaggagcggtaataactaccgaaaa 62
gtttccatacaagtgatttaccatcgagtttactacaagttttgtaataagaagaatata 122
taagtgaaaatgcccagccatcggaattgatcttggctactacatctcgtgctgagtg 182
M P A I G I D L G T T Y S C V G V 17
tggcagcagcgggaatgtggagatcatcgccaacgaccaaggcaaccgaccactccatca 242
W Q H G N V E I I A N D Q G N R T T P S 37
tatgtcgggttccagacactgaaaggctcatcggggatgctgctaagaaccagggtcgcc 302
Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A 57
ctcaaccocaaacacacagtggtttgatgccaagcgactcatcgccgcaaatcgcagc 362
L N P N N T V F D A K R L I G R K F D D 77
ccgaaaatatacaagacatgcgcaactggcccttcagaattgtcaatgactcggc 422
P K I K Q D M Q H W P F R I V N D C G K A 97
cctaagatacaagtcgacttcaaggcgaaaagaaaatgtttgcaccgggaagaaatcagc 482
P K I Q V D F K G E K K M F A P E E I S 117
agcattgactgacgaaaatgaaggagactgctgaagcatacctcggcaccacagtgccg 542
S M V L T K M K E T A E A Y L G T T V R 137
gacgcagtcacacagtcaccagcttacttcaacgactcacagcgacaggctaccaaggac 602
D A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D 157
gctgggtccatcgaggactgaacgtgctgaggatcatcaacgagccaacagcagcggcc 662
A G A I A G L N V L R I I N E P T A A A 177
ctcgcgtatggtctggataagaacctaaaggcgaacgcaatgtactcatcttcgacttg 722
L A Y G L D K N L K G E R N V L I F D L 197
ggtgggtggcagtttgatgtctccctcctgactatcgacgaaggcgctctatttgaagta 782
G G G T F D V S I L T I D E G A L F E V 217
agggcgactgctggcgacacacacctggcggtgaggacttcgataaacaggctcgtcaac 842
R A T A G D T H L G G E D F D N R L V N 237
ttcctcggcagcagtgatcaagcgcaagtacaagaaggatttgcgaaacaattcggcgtgcc 902
F L A D E F K R K Y K K D L R N N S R A 257
ctacgcagactcgtacgcagctgagcgcgctaaacgcacattatcatcaagcacagaa 962
L R R L R T A A E R A K R T L S S S T E 277
gcaacgctcagatcgacgcagctgacgaaggcagcacttctacacgcgaatctcctcgt 1022
A T I E I D A L Y E G I D F Y T R I S R 297
gctcgttccgaagagctgaacgcagacactgttccgcgccacttggatccagttgaaaag 1082
A R F E E L N A D L F R G T L D P V E K 317
gctcctaagatgctaaactagacaagagctccatccatgacgttgtactcgtcggcgcc 1142
R A P K D A K L D K S S I H D V V L V G G 337
tccactcgcacccccaaattcagagcagtggttcagaactacttctgtggcaacaattg 1202
S T R I P K I Q S M L Q N Y F C G K Q L 357
aactgtctatcaaccggacgagcagtcgcctacgggtcggcagtgcaacgagctata 1262
N L S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I 377
ctgagcggtagcagcactcctcaagcagctgctggttggtagcgtggtcctcctcgt 1322
L S G E Q H S K I Q D V L L V D V A P L 397
tccactcggcattgaaacagcggcgctcatgacccaaatcgttgaacgcaacgctagg 1382
S L G I E T A G G V M T K I V E R N A R 417
ataccctcaagcagtcacaaacgttccaccctactctgacaaccaaccagcagtcacc 1442
I P C K Q S Q T F T T Y S D N Q P A V T 437
attcaagtgtagcagggcgagcagcagctatgacgaaggataacaacctactcggcggcctt 1502
I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G R F 457
gacctgactggtataaccaccagcgcctcgggagtagccgaaaattgacgtcaccttcgac 1562
D L T G I P P A P R G V P K I D V T F D 477
ttggatgcaaacggcactcctcaacgtatccgcaaaagaaaacagcaccggccacagcaag 1622
L D A N G I L N V S A K E N S T G H S K 497
aacattgtcataaagaatgacaaggcggcctctcacaggcagagatagatcggatgcta 1682
N I V I K N D K G R L S Q A E I D R M L 517
tcggaagcggagcagatcaaaagaagaggacgaacgcacaacgagagaggggtgacagttcgc 1742
S E A E R Y K E E D E R Q R E R V T V R 537
aaccagttcagactcctacgtcttcagtgtaaaacagcgtggatgaagctggtagcaag 1802
N Q F E S Y V F S V K Q A L D E A G D K 557
ttgagcgaacaagacaagcaggaagcgcgaagcaagtgccgtagaagcgtgaagtggtt 1862
L S E Q D K Q E A R S K C D E A L K W L 577
gacaacaacacgctggctgagaaggacagtagtagcataaattgaaagaactacagcgt 1922
D N N T L A E K D E Y E H K L K E L Q R 597
actgctcaccatcatgagcaagatgcaaggagcggcgctcgtcgtgctgagggtagcaag 1982
T C S P I M S K M H G A G A A R A A G A G 617
caacagcagtagcagcagtagcaaaaggccaccggttgaagaagtagcactaaaaccactt 2042
Q Q Y S Q Y K G P T V E E V D * 633
tagagaaagttccttctaattatagatttctcgtgtaaatattagacttgatctctagtc 2102
ctccagacttgcaatttccatattgtgaaagcattgtaaatatgacctagattttaaattta 2162
aattattgttaatttaagttactatgatcatgtgctgaaaaataaaacatgacc 2222
aaagataaactgtatttttaagttgttagaaaagatcatgtgctgtaaaataaaatagac 2282
tattatgtttttttatgaaaaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaa 2318

```

Εικ. 2. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου της *SnoHsp70* του εντόμου *S. nonagrioides*. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης παριστάνεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **taa**: κωδικόνιο λήξης; σημείο πολυαδενυλίωσης **aataaa**: Τρεις υπογραφές (signatures) στις θέσεις 6-13, 194-207 και 332-346 περιγράφονται με έντονη γραφή. Το τμήμα που εσωκλείεται σε κουτί (128-135) είναι η θέση πρόσδεσης ATP-GTP; το κυταροπλασματικό Hsp70 καρβοξυλικό άκρο στην θέση (629-632) περιγράφεται με έντονη γραφή.

2. 2. Ιδιότητες των πρωτεϊνικών ακολουθιών

Χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων και αναζήτησης INTERPROSITE και την πρωτοβάθμια βιβλιογραφία ανακαλύψαμε τρία συντηρημένα σημεία ταυτοποίησης της οικογενείας Hsp 70 στις πρωτεΐνες SnoHsc /Hsp70 (Σχ. 1A, B): IDLGTTYS στις θέσεις 10-17 και 6-13, αντίστοιχα; IFDLGGGTFDVSIL στις θέσεις 198-211 και 194-207, αντίστοιχα; IVLVGGSTRIPKVQK στις θέσεις 335-349 και VVLVGGSTRIPKIQS στις θέσεις 332-346. Μια περιοχή πρόσδεσης ATP / GTP (AEAYLGKT) βρίσκεται στο N-τελικό άκρο στις θέσεις αμινοξέων 132-139 και EAYLGTT στις 128-135 (Εικ. 1A). Η COOH-τερματική ακολουθία αμινοξέων Glu-Glu-Val-Asp (EEVD) εντοπίστηκε στο C-τελικό άκρο των SnoHsc/Hsp70 (Εικ.1A, B).

2. 3. Συγκρίσεις αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Για να ανακτήσουμε πρωτεϊνικές αλληλουχίες παρόμοιες με εκείνες των SnoHsc / Hsp70, σχετικές βάσεις δεδομένων ερευνήθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Η υψηλότερη ομοιότητα αμινοξέων της SnoHsc70 (98%) παρατηρήθηκε με την hsc70 του *Manduca sexta*, *Bombyx mori* και *Mamestra brassicae* (Πίνακας 1). Για την SnoHsp70 η υψηλότερη ομοιότητα αμινοξέων του (88%) παρατηρήθηκε με *B. mori* και κατά 87% με *M. brassicae* και *Antheraea yamamai*. Μία σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών που κωδικοποιούν τις SnoHsc / Hsp 70 με εκείνες των άλλων επιλεγμένων εντόμων των Hsp 70/Hsc70 οικογενειών παρουσιάζεται στην Εικ. 2. Συμφώνως με τον Chen *et al.*, (2006), στα έντομα, τα μέλη της Hsp70 οικογένειας είναι ελαφρώς μικρότερα σε μήκος και μικρότερα σε μοριακή μάζα σε σχέση με τα μέλη της hsc70 οικογένειας. Οι διαφορές μήκους και μάζας οφείλονται κυρίως σε δύο μη-συντηρημένες περιοχές, οι οποίες είναι ελαφρώς μικρότερες στις Hsp 70 πρωτεΐνες. Τα μήκη των Hsp 70 πρωτεϊνικών ακολουθιών κυμαίνεται από 633 αα. (*S. nonagrioides*) σε 640 αα. (*B. mori*), καθιστώντας τα ελαφρώς μικρότερα από εκείνες των hsc70, που κυμαίνονται από 649 αα. (*B. mori*) σε 653 αα. (*S. nonagrioides*) (Εικ. 2). Για να κατανοήσουμε τις εξελικτικές σχέσεις των SnoHsc / Hsp70 με άλλες σχετικές πρωτεΐνες, πραγματοποιήσαμε μια φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες από διαφορετικά είδη, όπως φαίνεται στις εικόνες 3,4.

Πίνακας 1. Ομοιότητα αμινοξικών ακολουθιών μεταξύ *Hsc70/Hsp70* γονιδίων της *S. nonagrioides* με άλλα μέλη των *Hsc70/Hsp70* οικογενειών

Species (genes)	<i>Hsc/Hsp70</i> family	Accession number	Amino identity (%)
<i>Bombyx mori</i>	<i>Hsc70</i>	BAB92074	98
<i>Manduca sexta</i>	<i>Hsc70</i>	AAF09496	98
<i>Mamestra brassicae</i>	<i>Hsc70</i>	BAF03556	98
<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Hsc70</i>	AAB06239	97
<i>Chilo suppressalis</i>	<i>Hsc70</i>	BAE44308	97
<i>Lonomia obliqua</i>	<i>Hsc70</i>	AAV91465	97
<i>Plutella xylostella</i>	<i>Hsc70</i>	BAE48743	93
<i>Bombyx mori</i>	<i>Hsp70</i>	BAF69068	88
<i>Mamestra brassicae</i>	<i>Hsp70</i>	BAF03555	87
<i>Plutella xylostella</i>	<i>Hsp70</i>	BAF95560	85
<i>Manduca sexta</i>	<i>Hsp70</i>	AAO65964	84
<i>Antheraea yamamai</i>	<i>Hsp70</i>	BAD18974	87
<i>Omphisa fuscidentalis</i>	<i>Hsp70</i>	ABP93405	85
<i>Rhagoletis pomonella</i>	<i>Hsp70</i>	ABL06948	82

```

SnoC : --MAAKAPAVGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 119
MbraC : MAATKAPAVGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 120
MsexC : --MAKAPAVGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 118
BmorC : --MAKAPAVGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 118
MbraP : ----MPAIGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 115
MsexP : ----MPAIGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 115
BmorP : ----MPAIGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 115
SnoP : ----MPAIGIDLGTTCYCVGVQHGKRVVEIANDQGNRTTPSYVAFDTDERLIGDAARNQVAMPNNTIFDAKRLIGRKFDDATWADMHWPFVWSDGPKKIRVAYKGGDKRFBPEE : 115

SnoC : VSSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 238
MbraC : VSSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 239
MsexC : VSSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 237
BmorC : VSSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 237
MbraP : ISSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 235
MsexP : ISSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 235
BmorP : ISSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 235
SnoP : ISSMVLTRMKETAAYLGRKIVQNAVITVPAYFNDSQROATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRKSGSERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG--IFEVRSITAGDTHLGGEDFDNRM : 235

SnoC : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 358
MbraC : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 359
MsexC : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 357
BmorC : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 357
MbraP : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 355
MsexP : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 355
BmorP : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 355
SnoP : VNEFVEEFKRYKYLKIDLRNRRALRRRLRTAERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELADLFRSFLPVERAKKADAKMDSIHDVVLVGGSTRIPKVKQLLQDFNCRK : 355

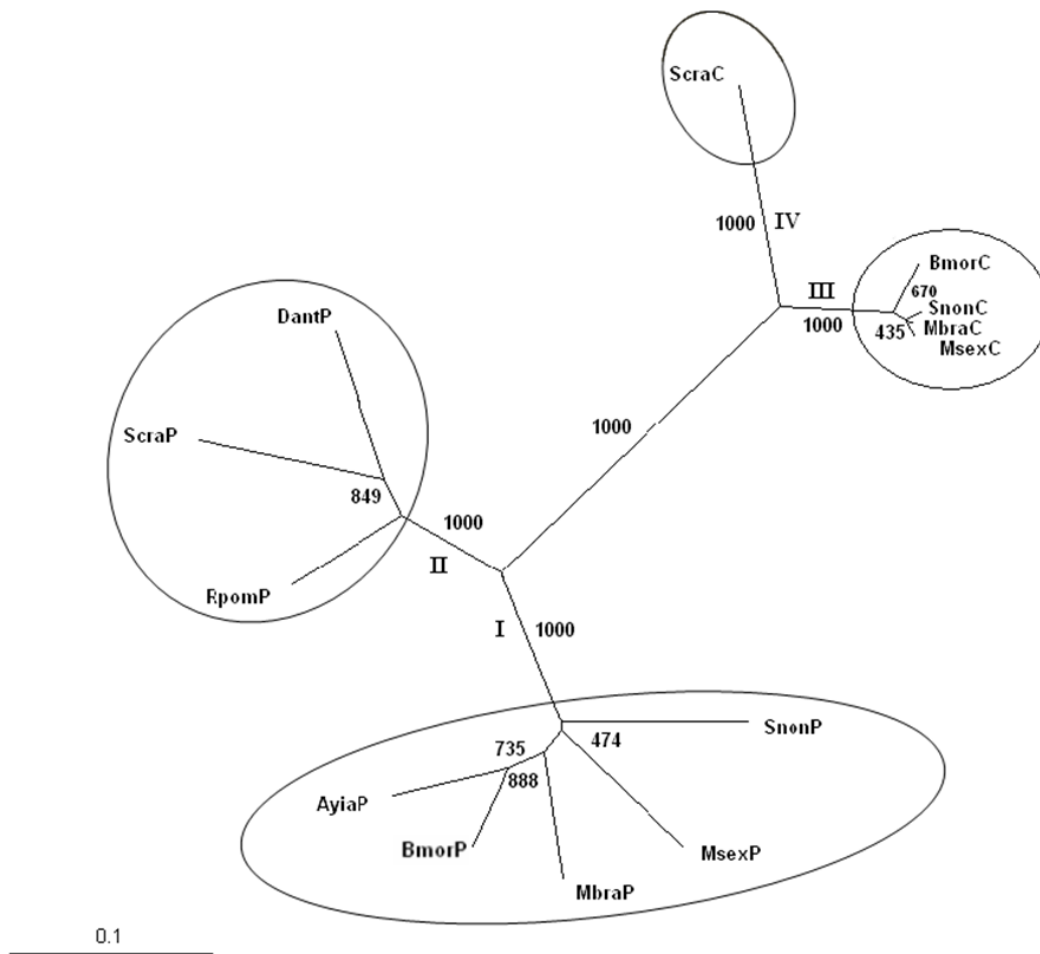
SnoC : ELMRSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 478
MbraC : ELMRSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 479
MsexC : ELMRSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 477
BmorC : ELMRSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 477
MbraP : KLNLSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 475
MsexP : KLNLSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 475
BmorP : KLNLSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 475
SnoP : QLNLSINPDEAVAYGAARVQAAILHEQDKSEEVODLLLDVPLSLGIETAGGVMNRLIRRNITLIPKQOTFTTYSNDNQPAVTIQVYEGGERAMTKDNNLLGRBELTGIPPAARGVREIEVIT : 475

SnoC : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 598
MbraC : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 599
MsexC : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 597
BmorC : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 597
MbraP : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 595
MsexP : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 593
BmorP : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 593
SnoP : FDIDANGILNVSARENSSTGSKNIVIRNDKGRLSQAEIRMLSEAEERYEEDERKQRQVARNQHELVFVSVQAALDEAG--DKLSQDARSARSACAEALRWLDNNTLAEQDVEYEHKIK : 593

SnoC : ELEGICNPITIKRYQAGGMPGGMPGMPFEGGAPGAGGAAG--GGAPFIEEVD : 653
MbraC : ELEGICNPITIKRYQAGGMPGGMPGMPFEGGAPGAGGAAGP--GGAPFIEEVD : 654
MsexC : ELEGICNPITIKRYQAGGMPGGMPGMPFEGGAPGAGGAAPG--GGAPFIEEVD : 652
BmorC : ELEGICNPITIKRYQAGGMPGGMPGMPFEGGAPGAGGAAPGAGGAPFIEEVD : 649
MbraP : DVQRVCSFVPMRMEGAGA-----GPGMGGGEG--NHQQN---GSPNVEEVD : 638
MsexP : DLQRVCSFVPMRMEGG-----AGAGAGGGQ---QHGRG---GSPNVEEVD : 633
BmorP : DVQRVCSFVPMRMEGAGP-----GPGMGGGEGGYQQARS---GSPNVEEVD : 640
SnoP : ELQRTCSFVPMRMEGAGAR-----AGAGQQ-----QYSQY---KSPNVEEVD : 633

```

Εικ. 3. Πολλαπλή αλληλούχηση των αμινοξικών ακολουθιών των *Hsc70/Hsp70* της *S. nonagrioides* με άλλες *Hsc70* (με C ως ένδειξη) και *Hsp70* (με P ως ένδειξη). Ταυτόσημα ή όμοια αμινοξέα σημειώνονται ως μαύρα ή γκρί. Συντημήσεις: SnoC = *S. nonagrioides* *Hsc70*; MbraC= *Mamestra brassicae* *Hsc70*; MsexC= *Manduca sexta* *Hsc70*; BmorC= *Bombyx mori* *Hsc70*; MbraP= *M. brassicae* *Hsp70*; MsexP= *M. sexta* *Hsp70*; BmorP= *B. mori* *Hsp70*; SnoP = *S. nonagrioides* *Hsp70*.

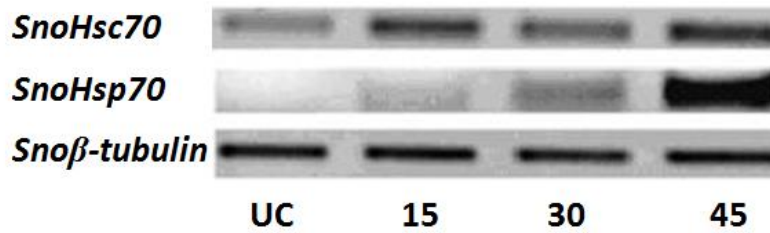
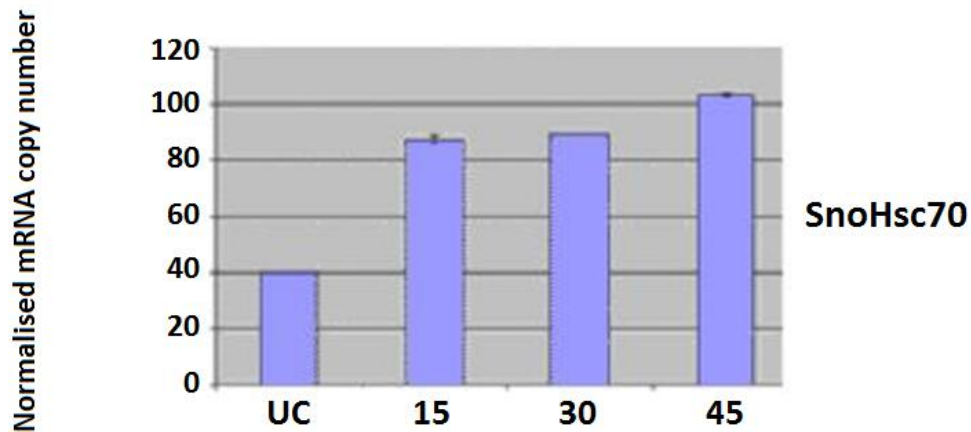
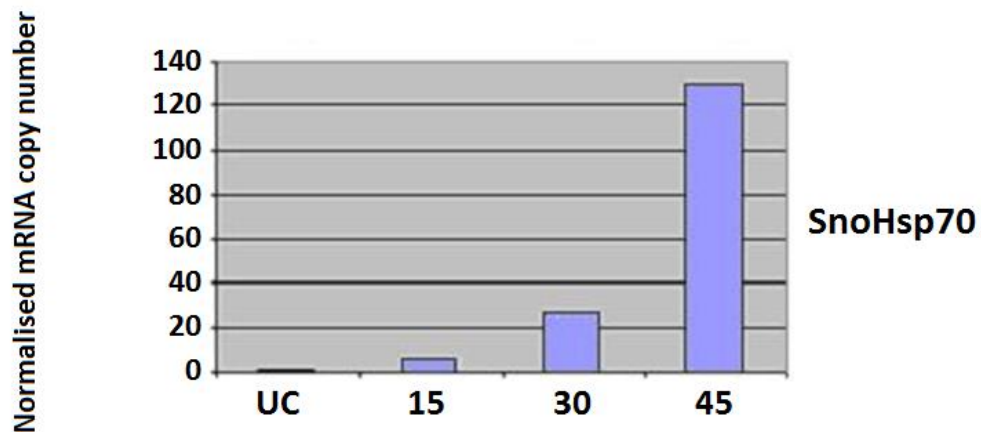


Εικ. 4. Φυλογενετικό δέντρο (Bootstrap Neighbor-Joining Tree, χωρίς ρίζα) που δημιουργήθηκε από την αντιστοίχιση των SnoHsc70/SnoHsp70 ακολουθιών με αντίστοιχες γνώστες πρωτεϊνικές ακολουθίες άλλων ειδών μέσω της χρήσης του προγράμματος βιο-πληροφορικής (CLUSTALX v1.8) Οι τιμές Bootstrap για κλάδους φαίνονται στην εικόνα (1000 επαναλήψεις). Οι αριθμοί της GenBank καταχώρησης και οι συντομογραφίες (σε παρένθεση) αυτών των πρωτεϊνικών που περιγράφονται και στον πίνακα 1, είναι οι εξής: RpomP = *Rhagoletis pomonella* Hsp70 (EF103584); ScraP = *Sarcophaga crassipalpis* Hsp70 (AF107338); DantP = *Delia antiqua* Hsp70 (DQ017057); ScraP = *Sarcophaga crassipalpis* Hsc70 (AF107339).

Για να πραγματοποιήσουμε αυτή την ανάλυση, χρησιμοποιήσαμε 13 πρωτεϊνικές ακολουθίες από τις βάσεις δεδομένων. Από αυτές, 8 ανήκουν σε Hsp70 και 5 ανήκουν σε τάξεις hsc70 πρωτεΐνης. Το δέντρο διαχωρίστηκε σε τέσσερις κλάδους (Εικ. 4). Κλάδοι I και II είναι η Hsp70 ομάδες. Ο κλάδος I περιλαμβάνει τα λεπιδόπτερα, συμπεριλαμβανομένων της SnoHsp70, και ο κλάδος II περιλαμβάνει τα δίπτερα. Οι άλλοι κλάδοι (III και IV) είναι οι hsc70 συστοιχίες, οι οποίες διαχωρίζουν με σαφήνεια τα λεπιδόπτερα- συμπεριλαμβάνοντας την SnoHsc70 (III), από τα δίπτερα (IV). Τα στοιχεία αυτά μας παρέχουν περαιτέρω πιστοποίηση ότι η Hsc/Hsp70 πρωτεΐνες παρουσιάζουν καλή φυλογενετική ανάλυση σε επίπεδα ταξινόμησης.

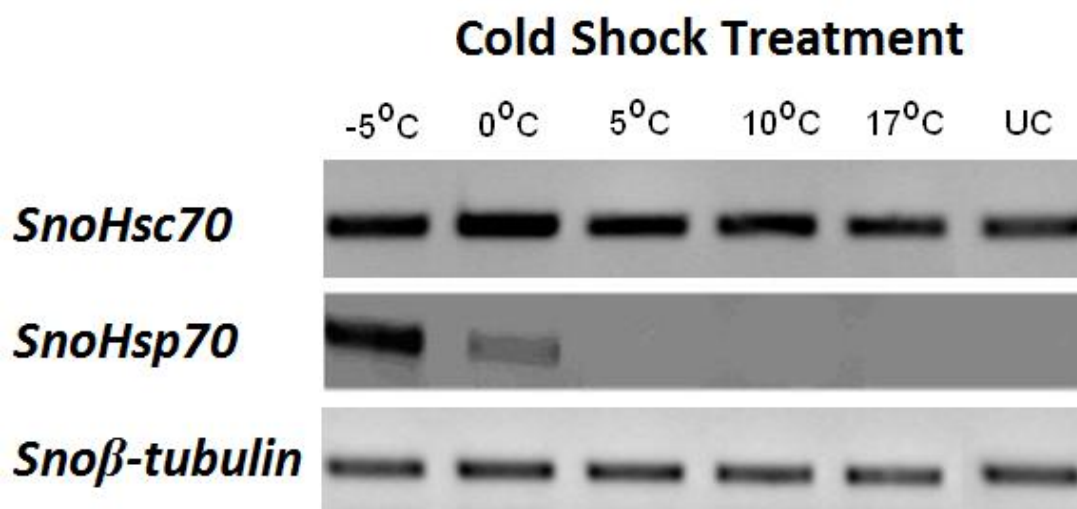
2.4. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων SnoHsc70/SnoHsp70 μετά από θερμικό ή ψυχρό στρες

Για να διερευνηθεί αν διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων *SnoHsc/Hsp70*, διαπαύουσες και μη-διαπαύουσες προνύμφες του *S. nonagrioides* εκτέθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες. Τα *SnoHsc/Hsp70* μεταγραφήματα ενισχύθηκαν από ημι-ποσοτική RT-PCR και εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας Real- Time PCR. Τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsc70* σε μη-διαπαύουσες προνύμφες αυξήθηκαν μετά την έναρξη του θερμικού σοκ (Εικόνα 5A, B). Η έκθεση τους σε θερμικό σοκ 40° C για 45 λεπτά οδήγησε σε 2 με 2,5 φορές αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων τους. Αυτή η αύξηση ήταν εμφανής όταν τα έντομα επώαστηκαν για 15 λεπτά σε θερμικό στρες. Μεγαλύτερη έκθεση σε στρες δεν είχε σχεδόν καμία επιπλέον επίδραση. Αυτό μας δείχνει ότι το γονίδιο SnoHsc70 έφτασε σχεδόν τα ανώτατα όρια της έκφρασης εντός 15 λεπτών. Η έκθεση τους σε θερμικό σοκ 40° για 45 λεπτά οδήγησε σε 130-πλάσια αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του *SnoHsp70*. Υπήρξε μια 10-πλάσια αύξηση στην συσσώρευση mRNA εντός 15 λεπτών μετά την έκθεση σε θερμικό στρες και μια 30-πλάσια αύξηση μετά από 30 λεπτά. Περαιτέρω έκθεση σε στρες (45 λεπτά) οδήγησε στο μέγιστο επίπεδο της επαγωγής του γονιδίου. Αυτά τα αποτελέσματα σαφώς δείχνουν ότι αυτό το γονίδιο είναι ένα *bona fide* *θέρμο-επαγόμενο γονίδιο*. Υπήρχε μια εμφανής και ταχεία επαγωγή του γονιδίου μέσα σε λίγα λεπτά μετά το θερμικό στρες. Αν και η έκθεση των προνυμφών σε χαμηλές θερμοκρασίες είχε μια

A**B****C**

Εικ. 5. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* σε μη διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση), μετά από θερμικό στρες στους 40°C για 15,30 και 40 λεπτά. **UC: μάρτυρας.** 5(a). Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* με τη μέθοδο RT-PCR. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*. 5(b) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* με τη μέθοδο PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR). Ο σχετικός αριθμός των αντιγράφων mRNA των μεταγραφημάτων *SnoHsc70/SnoHsp70* φαίνεται σε σχέση με τον αριθμό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *Snoβ- Tub* για κάθε cDNA δείγμα. Το Τυπικό σφάλμα μέσου φαίνεται στις μπάρες του excel.

μέτρια επίδραση επί της έκφρασης του *SnoHsc70* και *SnoHsp70*, η έκφραση άλλαξε ριζικά (Εικ. 6). Όλες οι χαμηλές θερμοκρασίες είχαν ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του *SnoHsp70*. Ωστόσο, όταν έγινε ανάκτηση των προνυμφών σε κανονικές θερμοκρασίες, υπήρχε προφανής επαγωγή μετά την έκθεση τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (-5 ή 0 ° C). Συνεπώς η επαγωγή ήταν εμφανής όταν η απόλυτη διαφορά της θερμοκρασίας ήταν αρκετά υψηλή, υποδεικνύοντας ότι αυτό το γονίδιο είναι θερμό επαγόμενο.

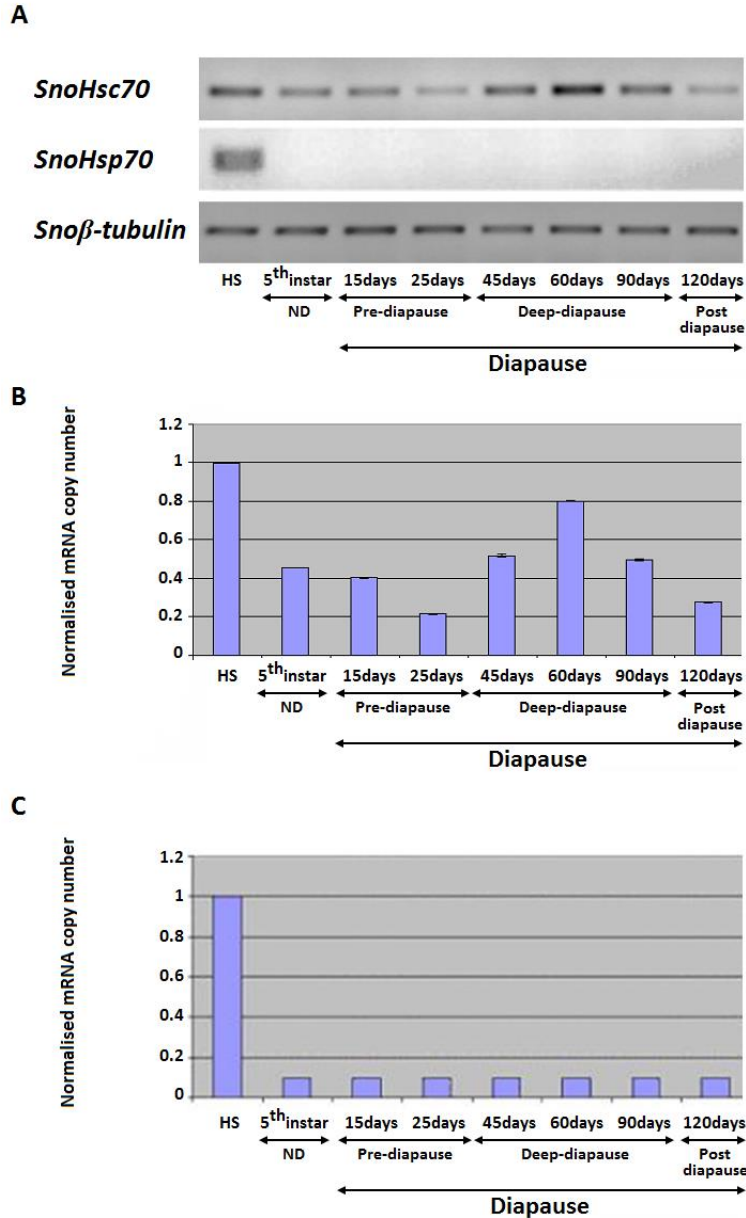


Εικ. 6. Ανάλυση των μεταγραφικών επίπεδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από ψυχρό στρες σε μη-διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση. Οι μη-διαπαύουσες προνύμφες εκτέθηκαν σε ψυχρό στρες για 1 ώρα σε θερμοκρασίες -5°C, 0°C, 5°C, 10°C and 17°C και μετά μεταφέρθηκαν για 1 ώρα σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι (LD 16:8) στους 25°C. **UC: μάρτυρας** Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub.*

2.5. Έκφραση των *SnoHsc/Hsp70* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης

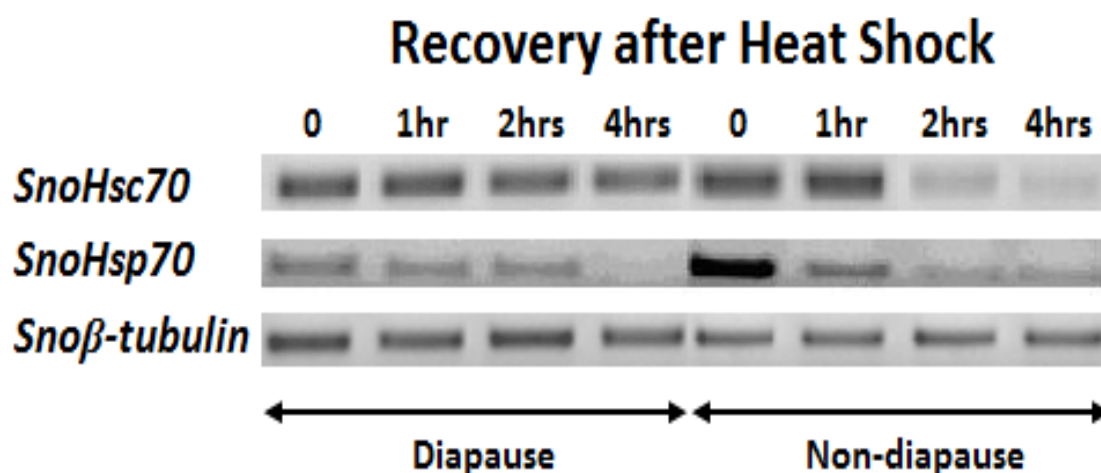
Για να διερευνήσουμε τα πρότυπα έκφρασης των *SnoHsc/Hsp70* γονιδίων και να συσχετίσουμε την έκφραση τους με τις συνθήκες διάπαυση, RNA απομονώθηκε από το 5^o αναπτυξιακό στάδιο (5th instar) διαπαυουσών και μη διαπαυουσών προνυμφών και αναλύθηκε με ημι-ποσοτικό RT-PCR και Real-Time PCR . Στους 25

° C, μια μη στρεσογόνα θερμοκρασία, τα μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp70* ήταν σταθερά χαμηλά και δεν υπήρχε σχεδόν καμία διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ως συνάρτηση του αναπτυξιακού στάδιο των μη διαπαουσών προνυμφών αλλά και κατά τη διάρκεια της διάπαυσης (Εικ. 7A,B C). Σε αντίθεση, η έκφραση *SnoHsc70* γονίδιο αυξάνεται κατά τη βαθιά διάπαυση προνυμφών (45-75 ημέρες μετά την εκκόλαψη). Το *SnoHsc70* έδειξε συστατική έκφραση στη προ-διάπαυση περίοδο (15 ημέρες και 25 ημέρες από την εκκόλαψη) και κατά τη μετά διάπαυση περίοδο (120 ημέρες από την εκκόλαψη). Σε αυτά τα στάδια, τα επίπεδα έκφρασης ήταν παρόμοια με τα επίπεδα που παρατηρούνται σε μη-διαπαύουσες (5th instar) προνύμφες (Εικ. 7A, B). Τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης αυξήθηκαν σε βαθιά διάπαυση, δείχνοντας μια βαθμιαία αύξηση, με αιχμή τις 60 ημερών προνύμφες και στη συνέχεια σταδιακή μείωση. Υπήρχε μια εμφανής διπλάσια αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του *hsc70* σε σύγκριση με τα mRNAs της *SnoHsc70* σε (5th instar) προνύμφες. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα μεταγραφής *SnoHsc70* διέφεραν όλη τη διάρκεια της διάπαυσης. Σε αντίθεση, το πρότυπο της συσσώρευσης *SnoHsp70* μεταγραφήματος παρέμεινε παρόμοιο σε όλα τα στάδια της διάπαυσης. Για να προσδιορίσουμε αν τα γονίδια *SnoHsc/Hsp70* ανταποκρίνονται στα θερμικά στρες κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, διαπαύουσες προνύμφες (50 ημέρες μετά την εκκόλαψη) μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 40 ° C για 1 ώρα (Εικ. 8). Δοκιμάσαμε περαιτέρω τις επιπτώσεις μετά την ανάρρωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα επίπεδα των μεταγραφημάτων του *SnoHsp70* ήταν διαφορετικά μεταξύ διαπαουσών και μη-διαπαουσών προνυμφών. Τα υψηλότερα επίπεδα από τη συσσώρευση mRNA ήταν εμφανή σε μη-διαπαύουσες προνύμφες. Σε μη-διαπαύουσες προνύμφες, τα υψηλά επίπεδα των μεταγραφημάτων *SnoHsp70* ήταν εμφανή αμέσως μετά το θερμικό σοκ. Ωστόσο, η μετέπειτα μείωση στη συσσώρευση mRNA ήταν ταχεία (1 ώρα). Ακόμη περισσότερο, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης ελαττώνονται σταδιακά σε διάστημα 4 h, φθάνοντας σε επίπεδα που ανιχνεύθηκαν σε μη-διαπαύουσες προνύμφες. Σε διαπαύουσες προνύμφες, η αύξηση των επιπέδων έκφρασης ήταν ελάχιστη; τα μεταγραφήματα παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα 2 ώρες μετά την ανάκαμψη, αλλά ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, σχεδόν μη αναγνώσιμα, σε 4 ώρες (Εικ. 8). Σε διαπαύουσες προνύμφες, τα επίπεδα των μεταγραφημάτων του *SnoHsc70* ήταν παρόμοια μετά την ανάκτηση (0, 1, 2, 4 ώρες).



Εικ. 7. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* σε μη διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση) και διαπαύουσες προνύμφες σε συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C και LD 10:14 στους 25°C αντιστοίχως. **HS:** μη διαπαύουσες προνύμφες (5th instar–25 ημέρες από την επώαση), μετά από θερμικό στρες στους 40°C για 15 λεπτά. **7(a)** Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* με τη μέθοδο RT-PCR. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ-Tub*. **7(b)** Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* με τη μέθοδο PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR). Ο σχετικός αριθμός των αντιγράφων mRNA των μεταγραφημάτων *SnoHsc70/SnoHsp70* φαίνεται σε σχέση με τον αριθμό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *Snoβ-Tub* για κάθε cDNA δείγμα. Το Τυπικό σφάλμα μέσου φαίνεται στις μπάρες του excel.

Σε μη-διαπαύουσες προνύμφες, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *SnoHsc70* ήταν υψηλά σε 0 και 1 ώρα μετά την έκθεση σε θερμικό σοκ, αλλά στη συνέχεια μειώθηκαν ταχέως (Εικ. 8). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το *SnoHsc70* γονίδιο ανταποκρίνεται στο θερμικό σοκ διαφορετικά στα δύο στάδια που δοκιμάστηκαν. Ενώ το *SnoHsc70* γονίδιο ανταποκρίνεται σε θερμικό στρες σε μη διαπαύουσες προνύμφες, δεν ανταποκρίνεται σε βαθιά διάπαυση, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση του ρυθμίζεται επίσης από τις συνθήκες διάπαυση / μη-διάπαυση.



Εικ. 8. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *SnoHsc70/SnoHsp70* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από θερμικό στρες σε διαπαύουσες προνύμφες (50 ημέρες από την επώαση) και σε μη- διαπαύουσες προνύμφες(5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε θερμικό στρες στους 40°C για 1 ώρα και μεταφέρθηκαν σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Οι μη- διαπαύουσες και διαπαύουσες προνύμφες έχουν εκτραφεί σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C (μη διάπαυση) και φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 10:14 στους 25°C (διάπαυση), αντιστοίχως. Οι αριθμοί δείχνουν τις ώρες μετά την επιστροφή των προνυμφών σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ-Tub.*

3. Το γονίδιο *SnoHsp83*

3.1. Η *Hsp83* cDNA ακολουθία της *S. nonagrioides*

Η κλωνοποίηση και ανάλυση της αλληλουχίας του ενισχυμένου cDNA με τους εκφυλισμένους εκκινητές έδωσε ένα προϊόν μεγέθους 910 bp. Με βάση αυτή την ακολουθία, σχεδιάσαμε ειδικούς εκκινητές με σκοπό την ενίσχυση τόσο του 5' όσο και του 3' άκρου του cDNA. Το πλήρες μήκος του cDNA του *Hsp83 S.nonagrioides*, που αποτελείται τόσο από την αλληλουχία σηματοδότη όσο και από τα 5' και 3' άκρα, είναι 2481 bp και περιέχει ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο κωδικοποιεί ένα μια πρωτεΐνη 717 αμινοξέων με προβλεπόμενο μοριακό βάρος 82,6 kDa. Το κωδικόνιο έναρξης εντοπίζεται στη θέση 173. Η αλληλουχία γύρω από αυτό μεθειονίνη είναι παρόμοια με αυτή της *Drosophila* ([C / A] AA [A / C] AUG) (Cavener, 1987). Παρατηρούμε επίσης μια 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR) μήκους 173 bp και μια 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) που περιέχει το σημείο πολυαδενυλίωσης (AATAAA), το οποίο βρίσκεται 18 νουκλεοτίδια πριν την έναρξη της πολυ (A) ουράς. Το κωδικόνιο τερματισμού (TAA) βρίσκεται στο νουκλεοτίδιο 2325. Το cDNA και η σχετική πρωτεϊνική αλληλουχία κατατέθηκαν στη GenBank με αριθμούς κατάθεσης DQ198859 και ABA54273, αντιστοίχως (Εικ. 1).

Τα πέντε συντηρημένα τμήματα που παρουσιάζονται στις αλληλουχίες των *Hsp90* οικογενειών γνωστών ευκαρυωτικών (Gupta, 1995), παρουσιάζονται και στην αλληλουχία της *S. nonagrioides*. Η τελική αμινοξική αλληλουχία MEEVD που αποτελεί τον πυρήνα της *Hsp90* επιφάνειας αλληλεπίδρασης για τα πρωτεϊνικά μοτίβα επαναλήψεων με μήκος πεπτιδικής αλυσίδας 34 αμινοξικών κατάλοιπων των *Hsp90* συν- τσαπερονίων (Ramsey *et al*, 2000.; Scheufler *et al.*, 2000) είναι αρκετά συντηρημένη και παρόμοια με την οικογένεια του *Hsp70* γονιδίου. Μια αναζήτηση, μέσω του BLAST προγράμματος (Altschul *et al.*, 1997), έδειξε υψηλή ομολογία με τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες της οικογένειας *Hsp90*, υποδεικνύοντας ότι το απομονωμένο cDNA κομμάτι κωδικοποιεί μια *Hsp90* πρωτεΐνη της *S. nonagrioides*, η οποία ονομάστηκε *SnoHsp83* με βάση την ονοματολογία της *Drosophila*.

```

                tgatttaattcaagaaaagc      20
gaagtgagagatcattcgatccacgcgatcttataaacacgtgtattaaaaaccgcg      80
ctagtcaagtcgagaagttctatacagtgctt agttt gcaagttt attt gaattactt      140
gagttattat tttt ataat aagtgaaacagtc aaaaatgcccgaagaaatgcagaccgatgtc      200
                M P E E M Q T D V      9
gcgagggtggagaccttcgccttccaggcggagatcgcccagctcatgtccctgatcatc      260
A E V E T F A F Q A E I A Q L M S L I I      29
aacacattctactccaaacaagagatcttctcctcgcgaggttgatctccaactcttcagac      320
N T F Y S N K E I F L R E L I S N S S D      49
gccttggacaagatccggtatgagtcactcaccgatccatcaaaactggacagtgccaag      380
A L D K I R Y E S L T D P S K L D S G K      69
gagctgtacatcaagatcatccccacaagagcgaaggtacactcactcttattgatacc      440
E L Y I K I I P N K S E G T L T L I D T      89
ggtatcggatgacaaaaggctgacctcgtgaacaactcttggtagccatcgctaagtctgga      500
G I G M T K A D L V N N L G T I A K S G      109
acaaaggcattcatggagctcttcaggcaggcctgatcagcagtgatcggtcagttc      560
T K A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F      129
gggtgtgggtttctactcttgcctacctgctcgctgacggcgtgacagttcactcaagcac      620
G V G F Y S C Y L V A D R V T V H S K H      149
aatgacgaacagtagctatggagctctctcgcggcggctcgttcacgggtgcgccc      680
N D D E Q Y V W E S S A G G S F T V R P      169
gaccatggggagcccttggccggctgacaaaagatcgttctacacattaaggaagacctc      740
D H G E P L G R G T K I V L H I K E D L      189
acagagatcttgaagagcacaatacaagatcgtgaaagaagcactctcagttcata      800
T E Y L E E H K I K D I V K K H S Q F I      209
ggctaccccatcaaaactgatggtggagaaggaacgcgagaaggagcttccggacgatgag      860
Y P I K L M V E K E R E K E L S D D E      229
gctgaggaggagaagaaggagatgagaaggatgaagacaagcctaagatcgaggatgtg      920
A E E E K K E D E K D E D K P K I E D V      249
ggagaagatgacgaggaagataagaaaagcaagaaaagaaagaaagcattcaagagaag      980
G E D D E E D K K D K K K K K T I K E K      269
tacatgaagatgaggagctgaacaagaccacccatctggaccgcaatgctgatgac      1040
Y T C E D E E L N K T K P I W T R N A D D      289
attacagaggagtagtgccgacttctacaagctcccttaccatgactgggaagatcat      1100
I T Q E E E Y G D F Y K S L T N D W E D H      309
cttgatgtcaagcactctctgttgaaggtcaattggagttcagagcactattgtttgtg      1160
L A V T K H F S V E G Q L E F R A L L F V      329
ccccagagctcccttgcgatctgttgaaaaacaaaagcgcaagaacaactcaaaactg      1220
P R R A P F D L F F E N K K R K N N I K L      349
tatgtccgagagtggtcatctggacaactgtgaagaccttaccagaaatccctgaac      1280
Y V R R V F I M D N C E D L I P E Y L N      369
ttcatcaaggggtgctcgacagtgaggatctgcccctcaacatctctcgtgagatgctc      1340
F I K G V V D S E D L P L N I S R E M L      389
caacagaacaagatccttaaagtaatcaggaagaacttggtaaagaatgcttggagctc      1400
Q N K I L K V I R K N L V K K C L E L      409
ttcgaagaattggctgaagacaagagaactacaagaagtagtactatgaacagttcagcaag      1460
F E E L A E D K E N Y K K Y Y E Q F S K      429
aacctgaagcttggcatccatgaagactctcagaataggtccaaactagctgatttgcctc      1520
N L K L G I H E D S Q N R S K L A D L L      449
cgctaccacacatcagcctctggagatgaggcatgctccctcaaggagtagcacttccgc      1580
R Y H T S A S G D E A C S L K E Y T S R      469
atgaaggagaaccagaagcacatttactacatcactggtgagaaccgtagccaggttgc      1640
M K E N Q K H I Y Y I T G E N R D Q V A      489
aaccttcatgttggagcagtagtcaagaagcgtggctatgaagttgtgtagatgacggaa      1700
N S S F V E R V K R G Y E V Y M T E      509
cccatgacagtagtagttagcagagtagggagtagtagtggcaagactcttgcctct      1760
P I D E Y V V Q Q M R E Y D G K T L V S      529
gtcacaaaggaggtctggaactccctgaggatgaggagaagagaagaaactgtaggaa      1820
V T K E G L E L P E D E E E K K K R E E      549
gacaaagtcagaatttgaacacctctgcaaggtcatgaagaacatcctagacaacaaagtt      1880
D K V K F E N L C K V M K N I L D N K V      569
gagaaggttgttgtgctaacctctggttgagtcacctgctgcatgtcacagcacag      1940
E K V V V S N R L V E S P C C I V T A Q      589
tatggttggctgccaacatggagcgtatcatgaaggctcaggctctccgtgacacatcg      2000
Y G W S A N M E R I M K A Q A L R D T S      609
accatgggttaccatggcagccaagaagcaccttgagatcaaccctgatcattccattgtt      2060
T M G Y M A A K K H L E I N P D H S I V      629
gaaaccctgagggcagaaggcaggctgatagaacgacaaggctgtgaaggacctcgtc      2120
E T L R Q K A E A D K N D K A V K D L V      649
atcctgctgatgagactgctctgctgctgcttggcttggctcttgatgaacccagtg      2180
I L L Y E T A L L S S G F A L D E P Q V      669
catgcttccctgactaccgcatgacaaactgggtcttggcatagatgaggatgaacct      2240
H A S R I Y R M I K L G L G I D E D E P      689
atccaggtcgaagagggcgaacgctggagatgtccccactagagggtgatgctgatgat      2300
I Q V E E A N A G D V P P L E G D A D D      709
gcgtcccccatggaggaagttgatataattctcaaatctcagtttgcattgtaatgg      2360
A S R M E E V D *      717
tgttttagattgtatcgtgaagttat tttgtgcaactggtgtacagccaaagactgattta      2420
gttcaaatccattattcaaaataaatggtaatattaacaaattaaaaaaaaaaaaaaaa      2480
a      2481

```

Εικ. 1. Η προβλεπόμενη νουκλεοτιδική και αμινοξική ακολουθία του cDNA του γονιδίου *Sno Hsp83* του εντόμου *S. nonagrioides*. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης παριστάνεται κάτω από την νουκλεοτιδική ακολουθία με ένα αμινοξικό γράμμα το καθένα. **atg**: κωδικόνιο έναρξης; **taa**: κωδικόνιο λήξης; σημείο πολυαδενυλίωσης **aataaa**. Πέντε υψηλα συντηρημένα τμήματα τα οποία χαρακτηρίζουν όλα τα μέλη της οικογένειας *Hsp90* (Gupta, 1995) και το C-terminal pentapeptide MEEVD σημειώνονται.

Όπως όλα τα γνωστά κυτοσολικά μέλη της οικογένειας Hsp90 (Gupta, 1995), η SnoHsp83 αποτελείται από δύο εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές, τη N-τελική (aa 11-230) και μεσαία (aa 259 -615) περιοχή, που χωρίζονται από μια μεταβλητή έντονα φορτισμένη περιοχή (aa 231-258), και μια λιγότερο συντηρημένη C-τελική περιοχή (aa 615-717).

Για να ανακτήσουμε πρωτεϊνικές αλληλουχίες παρόμοιες με εκείνες της SnoHsp83, αναζητήσαμε τις σχετικές βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Η υψηλότερη ομολογία αμινοξέων της SnoHsp83 (99% και 98%) παρατηρήθηκε με την Hsp90 της *Mamestra brassicae* (BAF03554) και την Hsp83 του *Spodoptera frugiperda* (AAG44630), αντιστοίχως. Ευθυγραμμίσαμε τη SnoHsp83 αμινοξική αλληλουχία με εκείνες των *S. frugiperda*, *Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata*, *Locusta migratoria* και *Apis mellifera* (Εικ. 2). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, παρόλο που υπάρχουν πολλές συντηρημένες περιοχές στις Hsp90 αλληλουχίες των εντόμων, υπάρχουν τρεις αμινοξικές περιοχές (Εικ. 2) οι οποίες διαφέρουν σημαντικά. Η πρώτη μεταβλητή περιοχή (aa 1-12 στη SnoHsp83 αλληλουχία) βρίσκεται στο N-τελικό άκρο, η δεύτερη (aa 220-260 στην ακολουθία SnoHsp83) είναι η εκτεταμένη μεταβλητή περιοχή που ορίστηκε από τους Chen *et al.*, (2006) και η τρίτη (aa 686-712 στην SnoHsp83 αλληλουχία) βρίσκεται πριν το συντηρημένο MEEVD πεπτίδιο.

Για να κατανοήσουμε τις εξελικτικές σχέσεις των SnoHsp83 με άλλα σχετικά γονίδια, προχωρήσαμε σε μια φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας γονίδια από διάφορα είδη όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Τα ονόματα, τα είδη και οι αριθμοί καταχώρησης αυτών των αλληλουχιών παρουσιάζονται στην λεζάντα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα Λεπιδόπτερα είναι καλά διαχωρισμένα από τα Δίπτερα, τα Ημίπτερα, τα Υμενόπτερα και τα Ορθόπτερα. Τα Noctuidae *S. nonagrioides*, *Mamestra brassicae* και *Spodoptera frugiperda*, ήταν συγκεντρωμένα στην ίδια ομάδα και διαχωρίζονται από το άλλα λεπιδόπτερα.

```

I * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120 *
Sno : MPEEMQTVAEITTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF : 130
Sfr : MPEEMQTVAEITTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF : 130
Lmi : -----MQDAAEITTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF : 125
Ame : MSTEMETKAEITTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF : 130
Lme : -----MPEEMQTVAEITTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF : 123
Cca : -----MPEEMQTVAEITTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF : 123
      EVETTFAPQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISSDALKRIRVESLTDPSKLDGKELYIKLIIPKSEDTLTLIDTIGIMTKDLVNNLGTIAKSGTRAFMEALQAGADISMIQGGF

140 * 160 * 180 * 200 * 220 * 240 * II * 260 *
Sno : VGFYSYLVDARVTVSKHNDDQYVWESSAGGSFTVRRHGDELGRGTKIILIKELIIVLEEBKIRIRVRRHSQFIGYPIKLMVEKEFDELSDAEABCFRRKDEKDEK---EDDPKIEDVVELDEED : 256
Sfr : VGFYSYLVDARVTVSKHNDDQYVWESSAGGSFTVRRHGDELGRGTKIILIKELIIVLEEBKIRIRVRRHSQFIGYPIKLMVEKEFDELSDAEABCFRRKDEKDEK---EDDPKIEDVVELDEED : 256
Lmi : VGFYSYLVDARVTVSKHNDDQYVWESSAGGSFTVRRHGDELGRGTKIILIKELIIVLEEBKIRIRVRRHSQFIGYPIKLMVEKEFDELSDAEABCFRRKDEKDEK---EDDPKIEDVVELDEED : 254
Ame : VGFYSYLVDARVTVSKHNDDQYVWESSAGGSFTVRRHGDELGRGTKIILIKELIIVLEEBKIRIRVRRHSQFIGYPIKLMVEKEFDELSDAEABCFRRKDEKDEK---EDDPKIEDVVELDEED : 256
Lme : VGFYSYLVDARVTVSKHNDDQYVWESSAGGSFTVRRHGDELGRGTKIILIKELIIVLEEBKIRIRVRRHSQFIGYPIKLMVEKEFDELSDAEABCFRRKDEKDEK---EDDPKIEDVVELDEED : 253
Cca : VGFYSYLVDARVTVSKHNDDQYVWESSAGGSFTVRRHGDELGRGTKIILIKELIIVLEEBKIRIRVRRHSQFIGYPIKLMVEKEFDELSDAEABCFRRKDEKDEK---EDDPKIEDVVELDEED : 252
      VGFYS YL6AD4VTV SKHNDDQYVWESSAGGSFT64 D EpLGRGTRIVL 6KED t 5LEP K6ReIV RNSQFIGYPIKLV2RER KE69 dEae ekke PRIDVgE1

280 * 300 * 320 * 340 * 360 * 380 *
Sno : KKK---KKKRTIKRYEIDEELNKTPIWTRNDDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRPFDLFENKRRNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFKGVVDSDELPLNI : 384
Sfr : KKK---KKKRTIKRYEIDEELNKTPIWTRNDDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRPFDLFENKRRNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFKGVVDSDELPLNI : 384
Lmi : SQEKK---KKKRTIKRYEIDEELNKTPIWTRNDDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRPFDLFENKRRNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFKGVVDSDELPLNI : 384
Ame : EPEGR---KKKRTIKRYEIDEELNKTPIWTRNDDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRPFDLFENKRRNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFKGVVDSDELPLNI : 386
Lme : KKKKD---KKKRTIKRYEIDEELNKTPIWTRNDDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRPFDLFENKRRNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFKGVVDSDELPLNI : 383
Cca : K---KKKRTIKRYEIDEELNKTPIWTRNDDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFVPRRPFDLFENKRRNNIKLYVRRVFMDCNELIPEYLNFKGVVDSDELPLNI : 381
      d kKKKRT6KRYEIDEELNKTPIWTRN DDISQEEYGFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLF6P4R PFDLFEN K44NNIKLYVRRVFMDCNE LIPEYLNFKGVVDSDELPLNI

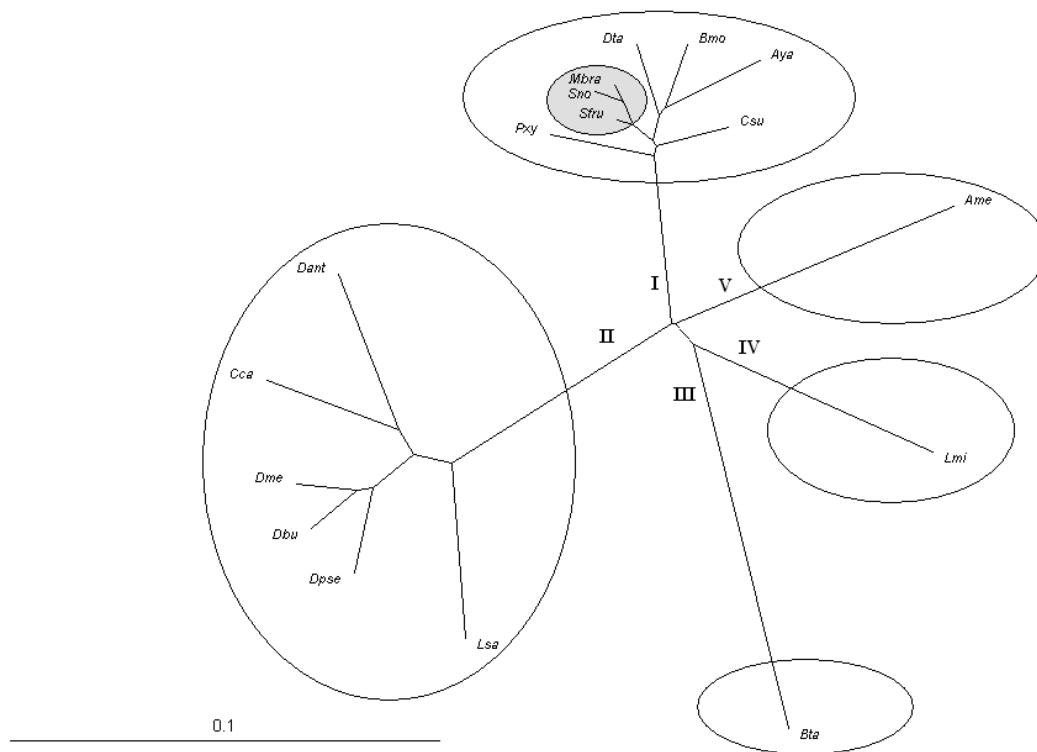
400 * 420 * 440 * 460 * 480 * 500 * 520 *
Sno : SREMLQKNKLVIRKRLVKKRMEIIEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NRKLDLIRNFRSSGSDAASLADYSRMKNGKHIVFTGEBNFCYNSFVERVVRGFEVYVWTEPEIDY : 514
Sfr : SREMLQKNKLVIRKRLVKKRMEIIEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NRKLDLIRNFRSSGSDAASLADYSRMKNGKHIVFTGEBNFCYNSFVERVVRGFEVYVWTEPEIDY : 514
Lmi : SREMLQKNKLVIRKRLVKKRMEIIEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NRKLDLIRNFRSSGSDAASLADYSRMKNGKHIVFTGEBNFCYNSFVERVVRGFEVYVWTEPEIDY : 514
Ame : SREMLQKNKLVIRKRLVKKRMEIIEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NRKLDLIRNFRSSGSDAASLADYSRMKNGKHIVFTGEBNFCYNSFVERVVRGFEVYVWTEPEIDY : 516
Lme : SREMLQKNKLVIRKRLVKKRMEIIEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NRKLDLIRNFRSSGSDAASLADYSRMKNGKHIVFTGEBNFCYNSFVERVVRGFEVYVWTEPEIDY : 513
Cca : SREMLQKNKLVIRKRLVKKRMEIIEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NRKLDLIRNFRSSGSDAASLADYSRMKNGKHIVFTGEBNFCYNSFVERVVRGFEVYVWTEPEIDY : 511
      SREMLQKNKLVIRKRLVKKR MEI IEETEDENYKKFYQFKNMLKLVGHEDS NR KL D LRS TSASGD GSL Yv RMRNGRH6V5ITGE 4QCV NS FVERVK RG5EVGVWTEPEIDY

540 * 560 * 580 * 600 * 620 * 640 *
Sno : VVCCMKREYGRGILSVITKEGLEPEDEBEKKKREEDRKFPELCKVMNILLNKVEKVVVSNRLVSPCCIVTACYGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPDEIIVETLCKAERDKNDRA : 644
Sfr : VVCCMKREYGRGILSVITKEGLEPEDEBEKKKREEDRKFPELCKVMNILLNKVEKVVVSNRLVSPCCIVTACYGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPDEIIVETLCKAERDKNDRA : 644
Lmi : VVCCMKREYGRGILSVITKEGLEPEDEBEKKKREEDRKFPELCKVMNILLNKVEKVVVSNRLVSPCCIVTACYGWTANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPDEIIVETLCKAERDKNDRA : 644
Ame : VVCCMKREYGRGILSVITKEGLEPEDEBEKKKREEDRKFPELCKVMNILLNKVEKVVVSNRLVSPCCIVTACYGWTANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPDEIIVETLCKAERDKNDRA : 646
Lme : VVCCMKREYGRGILSVITKEGLEPEDEBEKKKREEDRKFPELCKVMNILLNKVEKVVVSNRLVSPCCIVTACYGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPDEIIVETLCKAERDKNDRA : 643
Cca : VVCCMKREYGRGILSVITKEGLEPEDEBEKKKREEDRKFPELCKVMNILLNKVEKVVVSNRLVSPCCIVTACYGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPDEIIVETLCKAERDKNDRA : 641
      V6Q 64E5 GK LsvITKEGLEIPEDE BEKKKREEDR K5E LCK6MK ILDnKVEKVVVSNRLV SPCCIVT ACYGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMARRKLEINPdh 66ETL2KA DKNDRA

660 * 680 * 700 * 720 * III *
Sno : VKDLVLLFETLLSSGFTLDPQVHAsRIYRMIKLGLGIDEDEITGVESA-NAGVDPEEGADDSMEEVD : 717
Sfr : VKDLVLLFETLLSSGFTLDPQVHAsRIYRMIKLGLGIDEDEITGVESA-SAGVDPEEGADDSMEEVD : 717
Lmi : VKDLVLLFETLLSSGFTLDPQVHAsRIYRMIKLGLGIDEDEITQAEEERVDAPMPEEGADDSMEEVD : 718
Ame : VKDLVLLFETLLSSGFTLDPQVHAsRIYRMIKLGLGIDEDE--SVPEEQTEEDPEEGADDSMEEVD : 718
Lme : VKDLVLLFETLLSSGFTLDPQVHAsRIYRMIKLGLGIDEDE--NTDDAQAGADDSVDTTDSMEEVD : 717
Cca : VKDLVLLFETLLSSGFTLDPQVHAsRIYRMIKLGLGIDEDE--NATEDTQSGGADDSVDTTDSMEEVD : 715
      VKDLVLL5ETaLLSSGFT Ld PQVHAsRIYRMIKLGLGIDE Ep pPL D DaS MEEVD

```

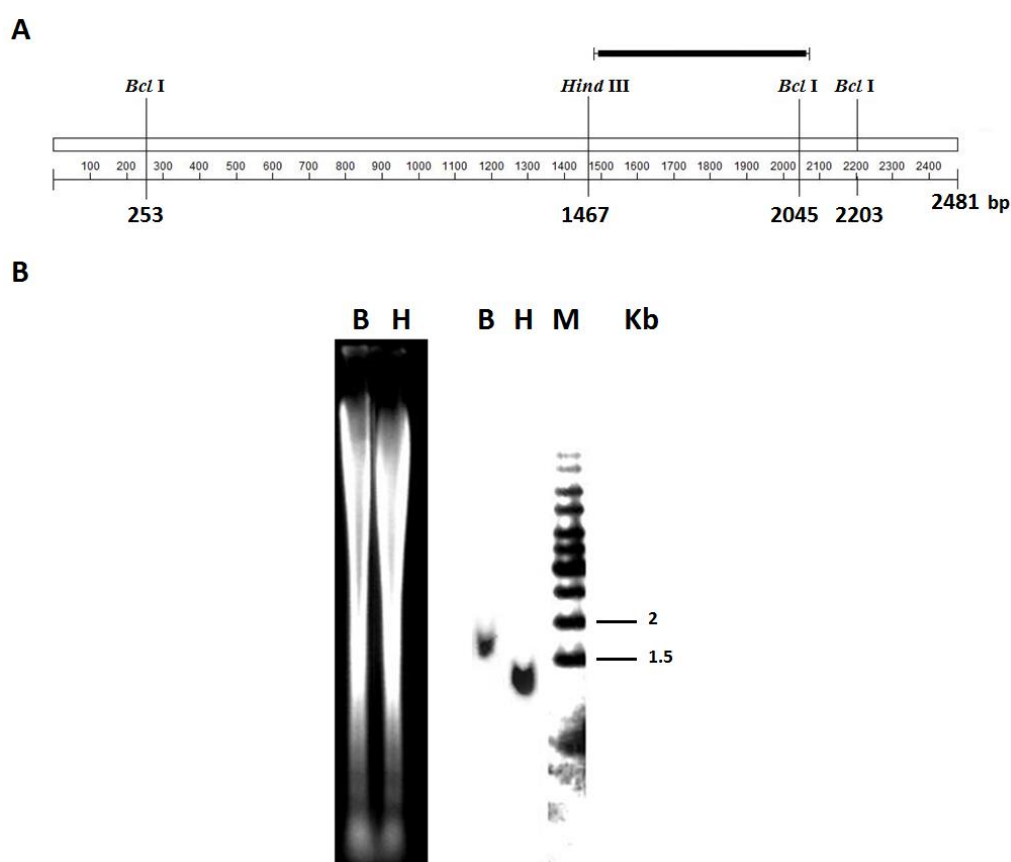
Εικόνα 2. Πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών ακολουθιών της Hsp83 της *S. nonagrioides* με άλλες αμινοξικές ακολουθίες Hsp90 εντόμων. Ταυτόσημα ή όμοια αμινοξέα σημειώνονται ως μαύρα ή γκρι. Τρεις μη συντηρημένες κυριαρχίες (I, II, III) των Hsp90 πρωτεϊνών σημειώνονται. Συντμήσεις: Sno= *S. nonagrioides* Hsp83; Sfr= *S. frugiperda* Hsp83 (AAG44630); Dme= *Drosophila melanogaster* Hsp83 (NP523899); Cca = *Ceratitis capitata* Hsp83 (CAJ28987); (Lmi)= *Locusta migratoria* (AAS45246); (Ame)= *Apis mellifera* (XP623939).



Εικόνα 3. Φυλογενετική ανάλυση των Hsp90 ακολουθιών. Ένα un-rooted neighbor-joining δένδρο λατασκευάστηκε με Hsp90 αμινοξικές ακολουθίες από 17 είδη εντόμων. Bootstrap values (1000 replicates) σημειώνονται. Τα πλήρη ονόματα των ειδών στις συντμίσεις είναι: *S. nonagrioides* (Sno) (DQ198859); *Mamestra brassicae* (Mbra) (BAF03554); *Spodoptera frugiperda* (Sfr) (AAG44630); *Chilo suppressalis* (Csu) (AB206477); *Bombyx mori* (Bmo) (NP001036876); *Plutella xylostella* (Pxy) (BAE48742); *Antheraea yamamai* (Aya) (BAD15163); *Dendrolimus tabulaeformis* (Dta) (ABN09628); *Drosophila buzzatii* (Dbu) (ABK34943); *Liriomyza sativae* (Lsa) (AAW49253); *Ceratitis capitata* (Cca) (CAJ28987); *Drosophila pseudoobscura* (Dpse) (XP001353471); *Delia antiqua* (Dant) (CAI64494); *Drosophila melanogaster* (Dme) (NP523899); *Locusta migratoria* (Lmi) (AAS45246); *Apis mellifera* (Ame) (XP623939), *Bemisia tabaci* (Bta). (AAZ17403).

3.2. Γονιδιωματική ανάλυση

Η ανάλυση στυπώματος κατά Southern φαίνεται στην εικ. 4. Η πέψη με το *HindIII* είχε ως αποτέλεσμα μια ζώνη (band) υβριδισμού μεγέθους 1,3 kb. Το ενζυμο *BclI* κόβει μέσα στην αλληλουχία του ιχνηλάτη. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος (περίπου 500 bp) του ιχνηλάτη υβριδίζεται με το DNA θραύσμα, ενώ το δεύτερο τμήμα του ιχνηλάτη (περίπου 50 bp), είναι πάρα πολύ μικρό, με αποτέλεσμα να μην δίνει κάποιο σήμα υβριδισμού μεγέθους περίπου 1,8 kb (Εικ. 4). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το γονίδιο *SnoHsp83* υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα.



Εικόνα 4. Απόδειξη ύπαρξης ενός μοναδικού αντιγράφου του γονιδίου *Hsp83* στο γονιδίωμα του εντόμου *S.nonagrioides*. (A). Περιοριστικός χάρτης του γονιδίου *Hsp83* cDNA. Η μπάρα πάνω από το cDNA υποδεικνύει το κομμάτι των 587bp που χρησιμοποιήθηκε σαν ιχνηλάτης για την γονιδιωματική ανάλυση κατά Southern blot. (B) Γενωματικό DNA που απομονώθηκε από μη- διαπαύουσες προνύμφες πέμπτου προνυμφικού σταδίου υπέστη πέψη με ενζυμο περιορισμού *Hind III* (H) and *BclI* (B) και υποβλήθηκε σε ανάλυση κατά Southern blot, χρησιμοποιώντας σαν ιχνηλάτη το κομμάτι των 587bp από το cDNA της *Hsp83* που φαίνεται στην εικόνα. Τα μεγέθη των DNA markers φαίνονται δεξιά στο αυτοραδιόγραμμα.

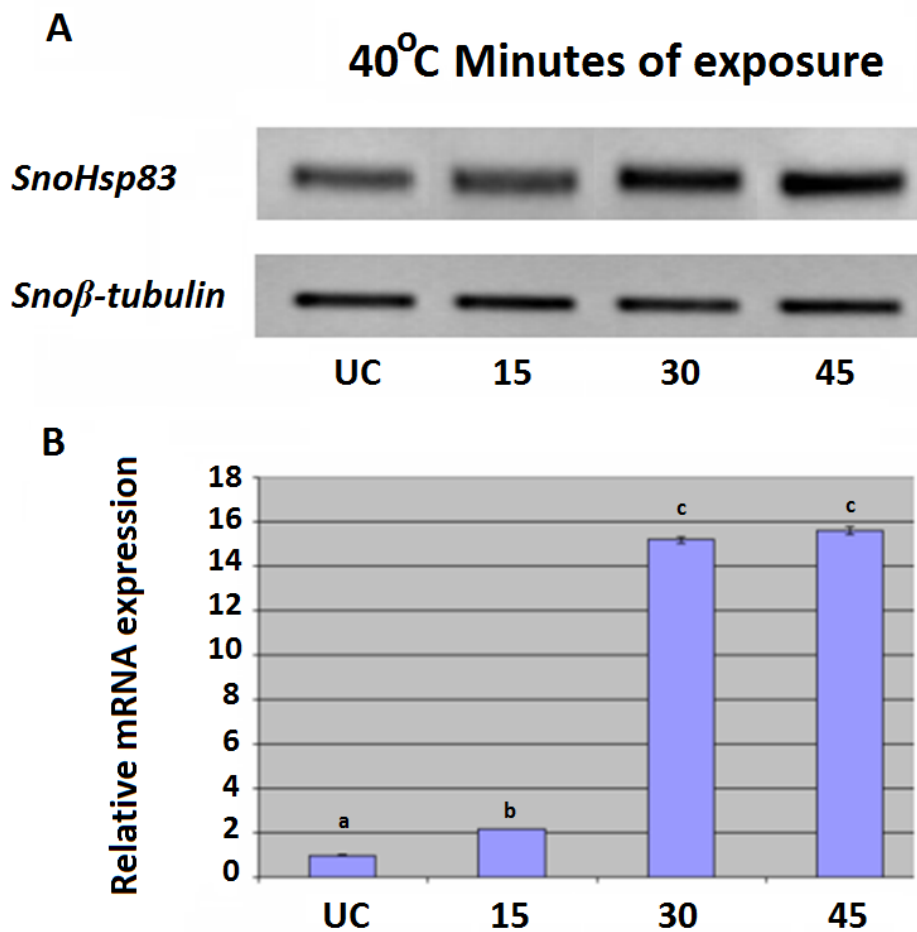
3.3. Μελέτη απόκρισης του γονιδίου *Hsp83* σε θερμικό στρες

Μελετήσαμε την έκφραση των μεταγραφικών επίπεδων του γονιδίου *SnoHsp83* σε διαφορετικές συνθήκες θερμικού στρες σε διαπαύουσες και μη διαπαύουσες προνύμφες της *S. nonagrioides*. Τα *SnoHsp83* μεταγραφήματα ενισχύθηκαν με ημι-ποσοτικό RT-PCR και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας Real-Time PCR. Ολικό RNA από 25 ημερών ηλικίας προνύμφες που υποβλήθηκαν σε διάφορες επεξεργασίες θερμικού στρες αναλύθηκαν, χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών που σχεδιαστήκαν στο 3' άκρο της κωδικής και μη κωδικής περιοχής (3' UTR) του γονιδίου.

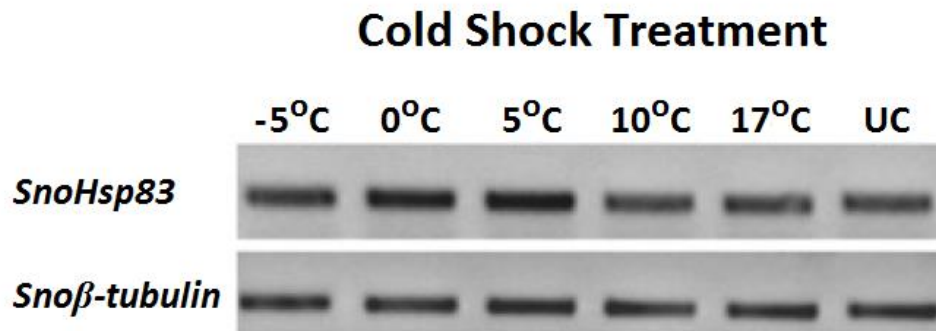
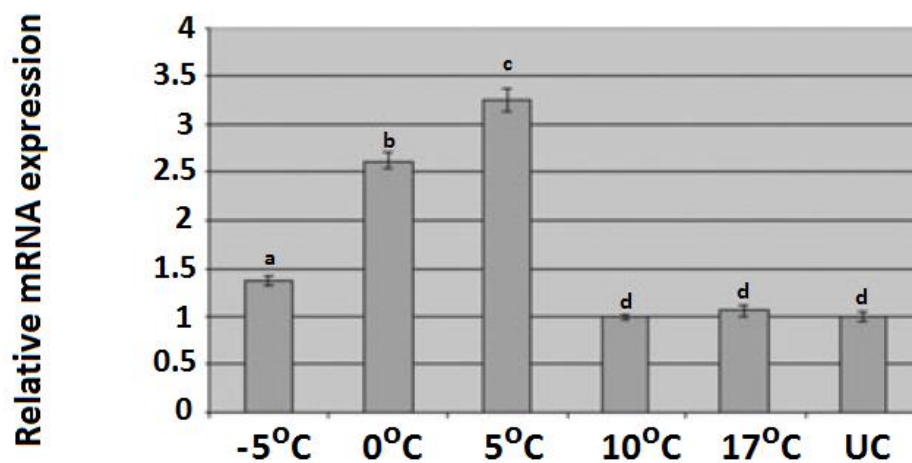
Η έκφραση του *SnoHsp83* ήταν συστατική υπό μη στρεσογόνες συνθήκες, αλλά γρήγορα αυξήθηκε μετά το θερμικό στρες. Όταν οι προνύμφες του 5^{ου} αναπτυξιακού σταδίου (5th instar) εκτέθηκαν στους 40°C, τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SnoHsp83* άρχισαν ταχέως να υπερ-εκφράζονται (Εικ. 5A, B). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονιστεί ότι το *SnoHsp83* είναι ένα ιδιαίτερα θερμοεπαγωγίμο γονίδιο που αποκρίνεται γρήγορα σε συνθήκες στρες. Παρατηρήθηκε διπλάσια αύξηση στην συσσώρευση mRNA εντός των πρώτων 15 λεπτών και μια 15-πλάσια αύξηση μεταξύ 15 έως 30 λεπτών, από την έκθεση σε θερμική καταπόνηση υποδεικνύοντας ότι η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης εκδηλώνεται μέσα σε λίγα λεπτά μετά από την έκθεση στο θερμικό σοκ.

Περαιτέρω έκθεση σε θερμικό στρες (40° C) δεν είχε σχεδόν καθόλου πρόσθετο αποτέλεσμα, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση mRNA του *SnoHsp83* γονιδίου έφθασε στα μέγιστα επίπεδα της, εντός των 30 λεπτών. Ψυχρό στρες επηρέασε επίσης την έκφραση του *SnoHsp83* (Εικ. 6).

Σε μη- διαπαύουσες προνύμφες, όπου το RNA απομονώθηκε και μελετήθηκε από προνύμφες αμέσως μετά από ψυχρό στρες, δεν παρουσιάστηκε επαγωγή της έκφρασης του *SnoHsp83* γονιδίου. Η επαγωγή ήταν εμφανής μόνον μετά την ανάρρωση 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αφού πρώτα οι προνύμφες είχαν εκτεθεί επί 1 ώρα στους -5, 0, 5 ° C.



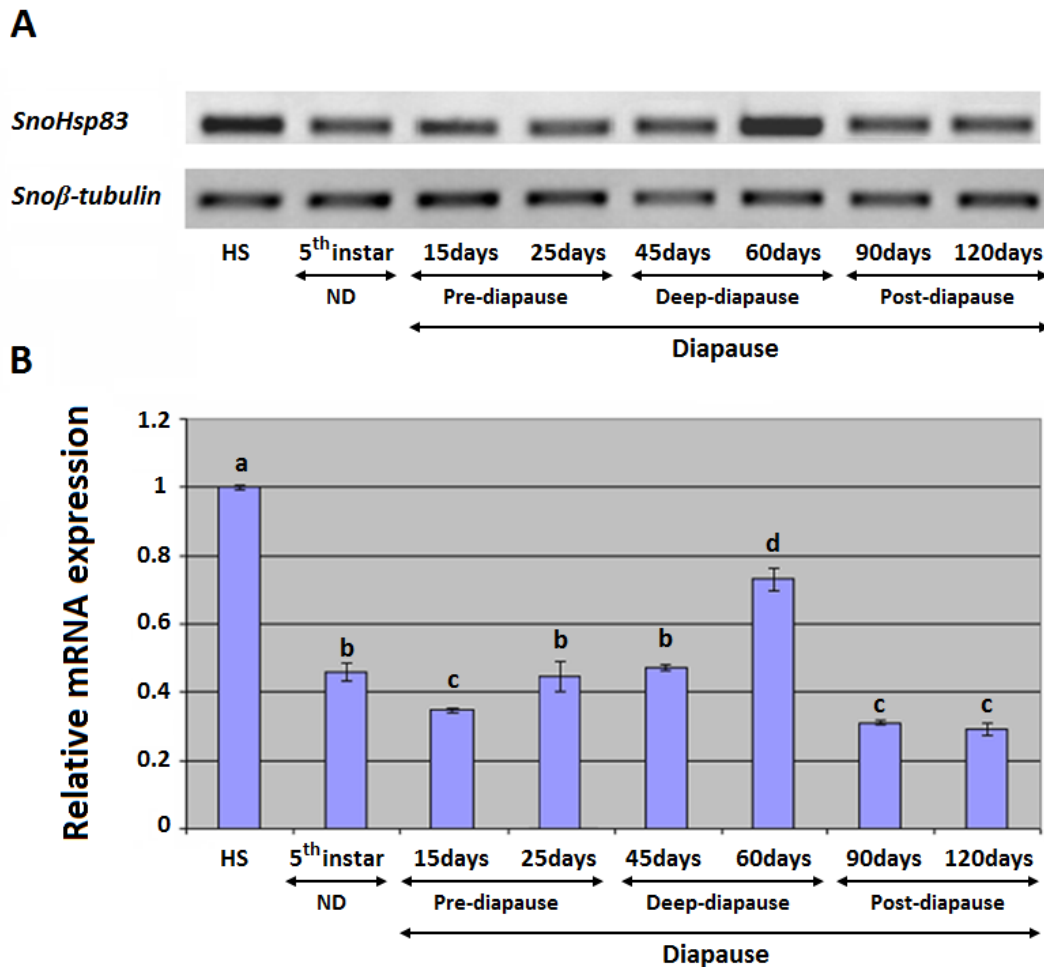
Εικ. 5. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* σε μη διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση), μετά από θερμικό στρες στους 40°C για 15,30 και 40 λεπτά. (UC) μάρτυρας. (a). Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο RT-PCR. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*. (b) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR). Ο σχετικός αριθμός των αντιγράφων mRNA των μεταγραφημάτων *SnoHsp83* φαίνεται σε σχέση με τον αριθμό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *Snoβ- Tub* για κάθε cDNA δείγμα. Κάθε μπάρα έχει τη μέση τιμή ± SEM των έξι επαναλήψεων. Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων του Duncan ($P < 0.05$) (οι μπάρες που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά).

A**B**

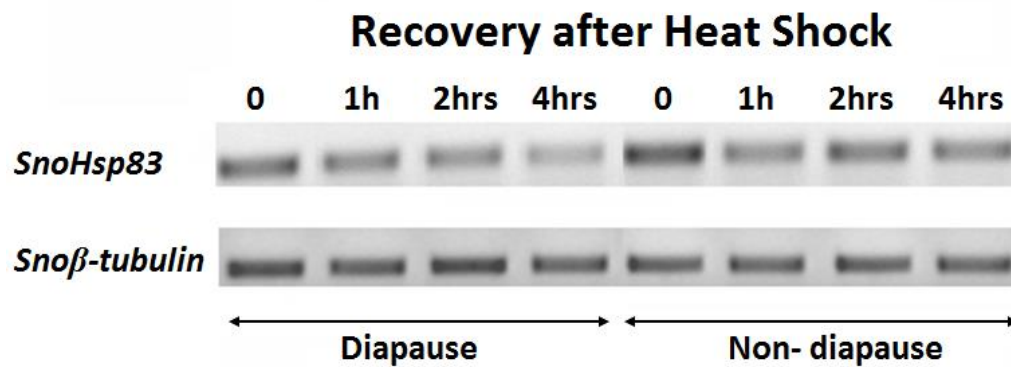
Εικ. 6. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83*, μετά από ψυχρό στρες σε μη- διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση. Οι μη- διαπαύουσες προνύμφες εκτέθηκαν σε ψυχρό στρες για 1 ώρα σε θερμοκρασίες -5°C, 0°C, 5°C, 10°C and 17°C και μετά μεταφέρθηκαν για 1 ώρα σε φωτοπεριδικές συνθήκες φως/σκοτάδι (LD 16:8) στους 25°C. **UC: μάρτυρας.** (A) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο RT-PCR. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*. (B) Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR). Ο σχετικός αριθμός των αντιγράφων mRNA των μεταγραφημάτων *SnoHsp83* φαίνεται σε σχέση με τον αριθμό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *Snoβ- Tub* για κάθε cDNA δείγμα. Κάθε μπάρα έχει τη μέση τιμή ± SEM των έξι επαναλήψεων. Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων του Duncan ($P < 0.05$) (οι μπάρες που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά).

3.4. Μελέτη έκφρασης *SnoHsp83* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης

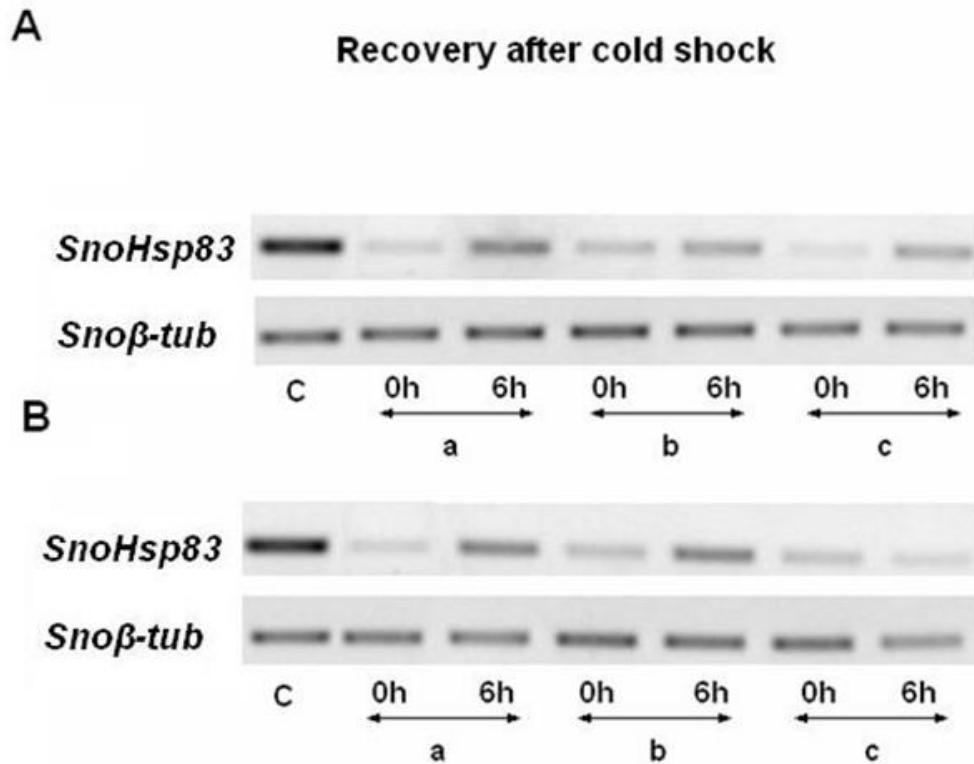
Το *SnoHsp83* έδειξε συστατική έκφραση στα στάδια της προ-διάπαυσης (15 ημέρες και 25 ημέρες μετά την εκκόλαψη) και της μετά-διάπαυσης (90 ημέρες και 120 ημέρες μετά την εκκόλαψη). Σε αυτά τα στάδια, τα επίπεδα της έκφρασης ήταν παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν σε μη διαπαύουσες προνύμφες 5^{ου} αναπτυξιακού σταδίου (5th instar) (Εικ. 7A, B). Η συσσώρευση των μεταγραφικών επιπέδων αυξήθηκε κατά την περίοδο της βαθιάς-διάπαυσης, παρουσιάζοντας μια βαθμιαία αύξηση και ένα μέγιστο επίπεδο έκφρασης στις προνύμφες 60 ημερών ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μια βαθμιαία μείωση. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια διπλάσια αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp83* κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης σε σύγκριση με τα επίπεδα των mRNAs του *SnoHsp83* παρούσα σε προνύμφες 5^{ου} αναπτυξιακού σταδίου (5th instar). Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μεταγραφικά επίπεδα του *SnoHsp83* διαφέρουν καθ 'όλη τη διάρκεια της διάπαυσης.



Εικ. 7. Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* σε μη διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση) (ND) και διαπαύουσες προνύμφες σε συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C και LD 10:14 στους 25°C, αντιστοίχως. **HS:** μη διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση), μετά από θερμικό στρες στους 40°C για 15 λεπτά. **7(a)** Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο RT-PCR. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ-Tub*. **7(b)** Ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο PCR σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR). Ο σχετικός αριθμός των αντιγράφων mRNA των μεταγραφημάτων *SnoHsp83* φαίνεται σε σχέση με τον αριθμό των μεταγραφημάτων του γονιδίου *Snoβ-Tub* για κάθε cDNA δείγμα. Κάθε μπάρα έχει τη μέση τιμή ± SEM των έξι επαναλήψεων. Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ANOVA ακολουθούμενη από ελέγχους πολλαπλών συγκρίσεων του Duncan ($P < 0.05$) (οι μπάρες που σημαίνονται με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά).



Εικ. 8. Ανάλυση των μεταγραφικών επίπεδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από θερμικό στρες σε διαπαύουσες προνύμφες (50 ημέρες από την επώαση) και σε μη- διαπαύουσες προνύμφες (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε θερμικό στρες στους 40°C για 1 ώρα και μετά μεταφέρθηκαν σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Οι μη- διαπαύουσες και διαπαύουσες προνύμφες έχουν εκτραφεί σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C (μη διάπαυση) και φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 10:14 στους 25°C (διάπαυση), αντιστοίχως. Οι αριθμοί δείχνουν τις ώρες μετά την επιστροφή των προνυμφών σε φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ-Tub*.



Εικ. 9. Ανάλυση των μεταγραφικών επίπεδων του γονιδίου *SnoHsp83* με τη μέθοδο RT-PCR, μετά από ψυχρό στρες σε διαπαύουσες προνύμφες (**A**) (50 ημέρες από την επώαση) και σε μη- διαπαύουσες προνύμφες (**B**) (5th instar – 25 ημέρες από την επώαση). Οι προνύμφες εκτέθηκαν σε ψυχρό στρες στους -5°C για: (a) 15 λεπτά, (b) 30 λεπτά και (c) 60 λεπτά και μετά μεταφέρθηκαν φωτοπεριοδικές συνθήκες φως/σκοτάδι LD 16:8 στους 25°C. Οι αριθμοί δείχνουν τις ώρες μετά την επιστροφή των προνυμφών στους 25°C. Ως control χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο *Snoβ- Tub*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γονίδια *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8*

Στην παρούσα μελέτη, δύο νέα μέλη της α-κρυσταλλίνης/sHsp οικογένειας, οι *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8*, απομονώθηκαν και μελετήθηκαν στο στέλεχος του σκώληκα του αραβοσίτου *S. nonagrioides*. Οι cDNA αλληλουχίες περιέχουν ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν 174 και 185 αμινοξέα, αντίστοιχα. Οι προβλεπόμενες αμινοξικές ακολουθίες για τα *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με άλλες sHsp αλληλουχίες από σπονδυλωτά, έντομα, καθώς και πρωτεΐνες α-κρυσταλλίνης από φακούς σπονδυλωτών. Έχει αναφερθεί ότι οι οικογένειες των μικρών πρωτεϊνών θερμικού στρες δείχνουν το μεγαλύτερο βαθμό διαφοροποίησης σε σχέση με τις υπόλοιπες οικογένειες πρωτεϊνών θερμικού στρες (Denlinger *et al.*, 2001). Μέσω της σύγκρισης των αμινοξικών αλληλουχιών των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* με sHsps αμινοξικές αλληλουχίες άλλων λεπιδόπττερων, παρατηρήσαμε μια απόκλιση στην ομολογία που κυμαίνεται από 68 έως 90% (*SnoHsp19.5*) και 67 έως 83% (*SnoHsp19.5*). Στο Neighbor-Joining δένδρογραμμα η πρωτεΐνη *SnoHsp19.5* τοποθετείται και συνδέεται πιο στενά με την πρωτεΐνη *Hsp19.5* του *M. brassicae* ενώ η πρωτεΐνη *SnoHsp20.8* τοποθετείται και συνδέεται πιο στενά με την πρωτεΐνη στο *Hsp20.4* του *B. mori*.

Οι πρωτεΐνες *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* περιέχουν δύο εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές που συναντώνται και στις πρωτεΐνες α-κρυσταλλίνης. Οι αμινοξικές περιοχές, 59-142 aa (*SnoHsp19.5*) και 62-145 aa (*SnoHsp20.8*) αντιπροσωπεύουν μια C-τελική περιοχή που εμπλέκεται στην προστατευτική λειτουργία των πρωτεϊνών α-κρυσταλλίνης και μικρών Hsps (Ingolia and Craig, 1982; James *et al.*, 1994). Τα αμινοξικά κατάλοιπα της *SnoHsp19.5* 15-23 aa και της *SnoHsp20.8* 17-25 aa ήταν εξαιρετικά συντηρημένα με την υδρόφοβη περιοχή/θέση P(R)RLMQ(N)QHFG στο N-τελικό άκρο των πρωτεϊνών α-κρυσταλλίνης. Αυτή η υδρόφοβη περιοχή είναι σημαντική για τη συσσωμάτωση και το σχηματισμό των μεγάλων συμπλόκων α-κρυσταλλίνης που βρίσκονται στο φακό των σπονδυλωτών (James *et al.*, 1994). Η παρουσία αυτών των δύο συντηρημένων περιοχών και η συνολική αμινοξική ομοιότητα με αυτήν των πρωτεϊνών α-κρυσταλλίνης

επιβεβαιώνει τον υποστηρίζει τον χαρακτηρισμό μας ότι οι *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών α-κρυσταλλίνης/ sHsp.

Παρατηρήσαμε ότι τα μεταγραφήματα των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* ήταν σε χαμηλά επίπεδα σε μη-διαπαύουσες προνύμφες που μεγαλώνουν στους 25° C, ενώ η έκφραση και των δυο γονιδίων επάγεται σημαντικά μετά από έκθεση σε θερμικό στρες στους 40° C. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση αυτών των γονιδίων επάγεται γρήγορα μέσα σε 15 λεπτά, ενώ τα ανώτατα επίπεδα της συσσώρευσης μεταγραφημάτων ανιχνεύθηκαν σε 30 λεπτά κάτω από συνθήκες στρες. Η RT-PCR ανάλυση μας έδειξε ότι η έκφραση των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* παρουσιάζει αύξηση όταν οι προνύμφες ανακτηθήκαν μετά από έκθεση σε ψυχρό στρες. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί επίσης ότι δεν υπήρχε σχεδόν καμία επαγωγή της έκφρασης του *SnoHsp20.8*, ενώ υπήρχε μία ήπια επαγωγή της έκφρασης του *SnoHsp19.5* μετά από έκθεση σε ψυχρό στρες στους 5° C. Αυτή ήταν η πρώτη ένδειξη ότι, ακόμη και αν τα δύο γονίδια ανταποκρίνονται σχεδόν πανομοιότυπα υπό θερμικό στρες, υπάρχει μια απόκλιση στην επαγωγή της έκφρασης τους όταν προνύμφες απομακρύνονται από τους 5° C και μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου. Ωστόσο, η έκφραση του γονιδίου *SnoHsp20.8* επάγεται εξαιρετικά όταν εκτίθεται σε σύντηκε στρες στους 0° C, 5° C και 10° C. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι η δύο γονίδια αντιδρούν διαφορετικά όταν οι προνύμφες εκτίθονταν σε ψυχρό στρες για ένα μικρό χρονικό διάστημα και στη συνέχεια επιστρέφουν σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν σαφώς ότι τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο σε απόκριση προς τη διάπαυση. Σε διαπαύουσες προνύμφες του εντόμου *S. nonagrioides*, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp19.5* ήταν σταθερά σε όλη την διάρκεια της διάπαυσης, ενώ τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp20.8* παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις. Τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp20.8* ήταν σχετικά υψηλά κατά τις περιόδους έναρξης και λήξης της διάπαυσης. Αυτό μοτίβο συσσώρευσης καθορίζει με σαφήνεια τα πρώτα στάδια της διάπαυσης καθώς και την κορύφωση της διαδικασίας της διάπαυσης. Η κατανόησή μας για το πώς τελειώνει διάπαυση εξακολουθεί να είναι πολύ ελλιπής. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η διάπαυση μπορεί να καταλήξει σε αυθόρμητο τερματισμό και άμεση επανεκκίνησης της ανάπτυξης, σε πολλά έντομα και ακάρεα τα οποία είναι υπό σταθερές εργαστηριακές συνθήκες, όπως στη διάπαυση του *S. nonagrioides* (Fantinou *et al*,

1998.; Kostal, 2006). Η αύξηση στο επίπεδο έκφρασης του *SnoHsp20.8* μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης μοριακού τερματισμού της διάπαυση στη *S. nonagrioides*. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα δύο γονίδια μπορεί να έχουν διακριτούς ρόλους στην έναρξη, συνέχιση και τερματισμό της δυναμικής διαδικασίας της διάπαυσης.

Τα μεταγραφήματα του *SnoHsp19.5* παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα μετά την έκθεση σε θερμικό στρες κατά την διάρκεια της διάπαυσης. Σε αντίθεση, τα μεταγραφήματα του *SnoHsp20.8* παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα μετά από έκθεση σε θερμικό στρες κατά την διάρκεια της διάπαυσης, αλλά παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα μετά από έκθεση σε θερμικό στρες σε μη- διαπαύουσες προνύμφες. Αυτή η σαφής διάκριση στην συσσώρευση mRNA των δύο γονιδίων σε διαπαύουσες και μη διαπαύουσες προνύμφες θα μπορούσε να υποδείξει τους διακριτούς ρόλους που έχουν αυτά τα δύο γονίδια κατά τη διαδικασία της διάπαυσης και της ανάπτυξης. Τα μέλη των μικρών Hsps οικογενειών επάγονται κατά τη διάρκεια της περιόδου νάρκης σε αρκετούς οργανισμούς που δεν κατηγοριοποιούνται σαν έντομα (Bonato *et al*, 1987; Pla *et al*, 1998; Cherkasova *et al*, 2000). Ένας πιθανός ρόλος των μικρών θερμό-επαγόμενων πρωτεϊνών στη διάπαυση, είναι η συμμετοχή τους στη ρύθμιση και στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Tammariello και Denlinger, 1998). Ο Denlinger (Denlinger *et al.*, 2001) πρότεινε ότι οι μικρές Hsps εμπλέκονται στην προστασία οργανισμών έναντι χαμηλών θερμοκρασιών καταπόνησης και στη ρύθμιση της διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός ότι sHsps επάγονται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης σε μία ποικιλία εντόμων, που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια διάπαυσης, δείχνει ότι sHsps είναι βασικοί παίκτες στην διαχείριση πολλών εντόμων.

Στο έντομο *S. crassipalpis*, η έκφραση του sHsps (Hsp23) επάγεται κατά τη διάρκεια της διάπαυσης και αυτό συμβαίνει μόνο και μόνο επειδή η νύμφη εισέρχεται διάπαυση χωρίς να σχετίζεται με την έκθεση της σε θερμικό στρες. (Rinehart *et al.*, 2007). Ο Rinehart (2007) προτείνει ότι επαγωγή της έκφρασης του sHsps κατά τη διάρκεια της διάπαυσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας, που συμβάλλει στην αντοχή στο κρύο κατά την περίοδο της διαχείμασης των εντόμων. Αυτή η μελέτη θεωρεί ότι η επαγωγή του sHsps παρέχει μια "back-up" εγγύηση ότι ο μηχανισμός ανάπτυξης θα διακοπεί κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή στην έκφραση των sHsp γονιδίων σε απόκριση προς τη διάπαυση στα έντομα *D. triauraria* (Goto *et al*, 1998; Goto και Kimura, 2004),

Lymantria dispar (Yocum *et al.*, 1991; Denlinger *et al.*, 1992), *Lucilia sericata* (Tachibana *et al.*, 2005) και *Chilo suppressalis* (Sonoda *et al.*, 2006).

Παρατηρούμε ότι μερικά sHsps επάγονται ενώ άλλα καταστέλλονται. Για την ερώτηση γιατί υπάρχουν τόσα πολλά sHsps, φαίνεται ότι στο έντομο *S. nonagrioides*, τα *SnoHsp19.5* και *SnoHsp20.8* έχουν ειδικές λειτουργίες. Επίσης πιο πιθανό είναι , οι διαφορετικές sHsps να αλληλεπιδρούν διαφορετικά με ειδικές ομάδες πρωτεϊνών (Sun και MacRae, 2005). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι αυτά τα δύο γονίδια συμβάλλουν στην διάπαυση και στην αντίδραση στο ψυχρό στρες με ελαφρώς διαφορετικούς τρόπους. Το γονίδιο *SnoHsp19.5* εκφράζεται συνεχώς σε απόκριση προς διάπαυση, ενώ η έκφραση του *SnoHsp20.8* γονιδίου καταστέλλεται σε βαθιά διάπαυση και επάγεται στο τερματισμό της διάπαυσης. Επομένως, μια ανάλυση των sHsps μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της διάπαυσης στα έντομα.

Τα γονίδια *SnoHsp70* και *SnoHsc70*

Σε αυτή τη μελέτη, η συστολική και η θερμο-επαγόμενη πρωτεΐνη σοκ, *SnoHsc70* και *SnoHsp70* αντίστοιχα, απομονώθηκαν, και τα επίπεδά της έκφρασης τους εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια της διάπαυσης στο έντομο *S. nonagrioides*. Τα μεταγραφήματα του *SnoHsp70* ήταν ανιχνεύσιμα σε μη διαπαύουσες προνύμφες του *S. nonagrioides*, ενώ εκείνα των *SnoHsc70* ήταν ισχυρός. Η έκφραση και των δύο γονιδίων επάγεται από το θερμικό στρες. Ωστόσο, υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της επαγωγής της έκφρασης των δύο γονιδίων. Το *SnoHsc70* επάχθηκε περίπου 2-φορές, ενώ *SnoHsp70* επάχθηκε περισσότερο από 100-φορες. Η επαγωγή των *SnoHsp70* παρατηρείται όταν οι προνύμφες μεταφέρθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία (-5 ° C) και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Έκθεση σε συνθήκες ψυχρού στρες δεν επηρέασε την έκφραση του *SnoHsc70*. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα δύο γονίδια αποκρίνονται διαφορετικά όταν οι προνύμφες εκτεθούν σε συνθήκες στρες.

Τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp70* είναι συνήθως ανιχνεύσιμα ή σταθερά εκφραζόμενα σε χαμηλά επίπεδα σε κανονικές (μη-διαπαύουσες) συνθήκες, αλλά επάγονται μετά από θερμική καταπόνηση σε μία ποικιλία ειδών εντόμων (Goto *et al.*, 1998; Rinehart *et al.*, 2000; Tachibana *et al.*, 2005).

Αυτή η μελέτη έδειξε ότι αυτά τα δύο μέλη της οικογένειας των 70 kDa θερμό-επαγόμενων πρωτεϊνών στρες, εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο κατά τη διάρκεια της διάπαυσης στο *S. nonagrioides*. Τα μεταγραφήματα του *SnoHsp70* ήταν σταθερά χαμηλά, σχεδόν μη ανιχνεύσιμα, σε όλα τα στάδια.

Συσσωρευμένα δεδομένα από διαφορετικά είδη έχουν οδηγήσει σε αντιφατικά συμπεράσματα. Η έκφραση του *Hsp70* δεν επάγεται σαν απόκριση στην διάπαυση στη *Drosophila triauraria* και στη *Lucilia sericata* (Goto *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 2005), ενώ επάγεται ελαφρώς στα διαπαυουσα ενήλικα άτομα του σκαθαριού της πατάτας του Κολοράντο *Leptinotarsa decemlineata* (Yocum, 2001) και εκφράζεται μόνο στο πρώτο ενήλικο στάδιο της διαπαυουσας προνύμφης της πεταλούδας των τσιγγάνων *Lymantria dispar* μετά από έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία (Yocum *et al.*, 1991). Αντιθέτως, σε έναν αριθμό άλλων ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *S. crassipalpis* (Rinehart *et al.*, 2000), *L. decemlineata* (Yocum, 2001), *M. rotundata* (Yocum *et al.*, 2005), *D. antiqua* (Chen *et al.*, 2006), *C. suppressalis* (Sonoda *et al.*, 2006) και *B. mori* (Hwang *et al.*, 2005) τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των *Hsp70* αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, ακόμη και χωρίς θερμική καταπόνηση, και η έκφρασή τους παρέμεινε σε όλη την διάπαυση. Ο Rinehart *et al.* (2007) αναφέρει πέντε πρόσθετα είδη στα οποία τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των *Hsp70* αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της διάπαυσης (δύο δίπτερα και τρία λεπιδοπτερα με ποικίλα προγράμματα διάπαυσης: η υποχρεωτική εμβρυϊκή διάπαυση του *L. dispar*, η προαιρετική διάπαυση των προνυμφών *Ostrinia nubilalis*, και η προαιρετική διάπαυση της νύμφης *M. sexta*). *Hsp* υπερ-ρύθμιση φαίνεται να είναι πιο συχνή προνυμφών σε διάπαυση από ότι σε ενήλικες (αναπαραγωγική) σε διάπαυση. Η προς τα άνω ρύθμιση είναι πολύ πιο μετριοπαθής και από ότι φαίνεται, στην διάπαυση συμβαίνουν σε προνυμφικά στάδια. Είναι επίσης προφανές ότι τα ίδια *Hsps* δεν συμμετέχουν σταθερά σε κάθε είδος διάπαυσης (Rinehart *et al.*, 2007).

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η *SnoHsc70* επάγεται κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυση. Μόνο λίγες μελέτες σε διάπαυση των εντόμων έχουν αναφερθεί στην *Hsc70*. Στο *S. crassipalpis*, τα μετάγραφα του *Hsc70* δεν έδειξαν καμία διαφορά καθ'όλη τη διάρκεια της διάπαυση και παρέμειναν το ίδιο σε διαπαύουσες και μη διαπαύουσες (Rinehart *et al.*, 2000), και στη *M. sexta*, η *Hsc70* είναι ένα φυσιολογικό μέρος της, τόσο στη διάπαυση όσο και μετά τη διάπαυση (Yocum *et al.*, 2005). Συνεπώς, διάφορα μέλη της οικογένειας των γονιδίων *Hsp70* αντιδρούν

διαφορετικά στη διάρκεια της ανάπτυξης ή των ειδικών σταδίων της διάπαυσης. Δεδομένου ότι στα περισσότερα έντομα παρατηρείται ένας αριθμός μελών Hsp70, τα αντιφατικά αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί σε διαφορετικά είδη μπορεί να είναι η συνέπεια των διαφόρων μελών που εξετάζονται στις αντίστοιχες μελέτες. Η απάντηση στο θερμικό στρες ήταν διαφορετική για το *SnoHsp70*, όταν οι προνύμφες ήταν σε διάπαυση ή μη διαπαύουσες συνθήκες.

Υπό τις συνθήκες διάπαυσης, η επαγωγή της έκφρασης του *SnoHsp70* ήταν μέτρια, υποδεικνύοντας ότι η φυσιολογική κατάσταση στις προνύμφες, είναι προϋπόθεση ακόμη και για τη καλή λειτουργία στα γονίδια Hsp. Σε μη διαπαύουσες συνθήκες, η έκφραση του *SnoHsc70* επάγεται, ενώ σε συνθήκες διάπαυσης το γονίδιο δεν επάγεται περαιτέρω σε απόκριση στο θερμικό στρες. Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει ότι οι η ρύθμιση της έκφρασης του *SnoHsc70* επηρεάζεται πολύ από τους αναπτυξιακούς παράγοντες. Αυτή η διαπίστωση, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε κανονικές συνθήκες βαθιάς διάπαυσης, υποδεικνύουν ότι το *SnoHsc70* μπορεί να διαδραματίσει έναν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της διάπαυσης του εντόμου *S. nonagrioides*, πιθανότατα βοηθώντας την χαμηλή αλλά ζωτική σημασίας πρωτεϊνική διάρθρωση κατά τη διάρκεια του συγκεκριμένου αναπτυξιακού σταδίου. Ενδεχομένως, τα μεταγραφήματα του *SnoHsc70* να ελέγχονται ορμονικά κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης. Η προνυμφική διάπαυση χαρακτηρίζεται από ορισμένα ενδοκρινικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία και η έντονη δραστηριότητα της σημαντικής ορμόνης νεότητας (JH) (Yin & Chippendale, 1979). Σύμφωνα με τους Eizaguirre *et al.*(1994), η JH παίζει ρόλο στη διατήρηση της διάπαυσης στο έντομο *S. nonagrioides*.

Στην παρουσία της ορμόνης νεότητας JH, οι ιστοί των εντόμων διατηρούν το αναπτυξιακό τους status quo, όταν εκτίθενται σε εκδυστεροειδή (οι ορμόνες έκδυσης), ενώ σε περίπτωση απουσίας της ορμόνης νεότητας JH, οι ιστοί αλλάζουν τη δέσμευσή τους στην επόμενη φάση μεταμόρφωσης κατά την έκθεση σε εκδυστεροειδή (Nijhout H.F, 1994). Στο έντομο *M. sexta*, το νευροπεπτίδιο της προθωρακικοτρόπου ορμόνης (PTTH) διεγείρει μια ταχεία αύξηση της εκδυστεροειδούς ορμονικής σύνθεσης που συνοδεύεται από ένα ευρύτερο φάσμα αυξήσεων της πρωτεϊνική σύνθεσης, συμπεριλαμβανομένης και αυτής της συστατικά εκφραζόμενης οικογένειας θερμο-επαγόμενων πρωτεϊνών (hsc70) (Rybczynski & Gilbert, 2000). Σε αυτά τα είδη, τα πρωτεϊνικά και mRNA δεδομένα δείχνουν ότι το

Hsc70 θα μπορούσε να εμπλακεί σε έναν ανάδρομο βρόχο ρύθμισης της συναρμολόγησης του υποδοχέα του συμπλόκου εκδυσόνης. Το *SnoHsc70* θα μπορούσε ενδεχομένως να εμπλέκεται σε ένα βρόχο ρύθμισης του υποδοχέα του συμπλόκου εκδυσόνης, όπως στο έντομο *M. sexta*. Η ανάλυση της λειτουργίας του *Hsc70* στη διαδικασία της παραγωγής εκδυστεροϊδών ή και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες θα απαιτήσει την ανάπτυξη των συστημάτων μοντέλων στα οποία τα επίπεδα του *Hsc70* θα μπορούν να είναι εύκολα διαχειρίσιμα σε μια ποικιλία συνθηκών.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ για το *S. nonagrioides*, αλλά και για άλλα παραδείγματα από την βιβλιογραφία, καταδεικνύουν σαφώς ότι η ρύθμιση της έκφρασης σε απόκριση σε θερμικό στρες δεν είναι μια απλή on / off αντίδραση και διαδικασία, αλλά είναι εξαιρετικά συντονισμένη με τις αναπτυξιακές και περιβαλλοντικές συνθήκες. Η διαφορετικότητα στην έκφραση του *SnoHsc70* και του *SnoHsp70* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης και σε απόκριση σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες υποδηλώνει ότι το κάθε μέλος της θερμο-επαγόμενης οικογένειας πρωτεϊνών στρες 70 kDa μπορεί κάλλιστα να έχει διαφορετικό ρόλο στη διάπαυση του εντόμου *S. nonagrioides*.

Το γονίδιο *SnoHsp83*

Στην παρούσα μελέτη, ένα μέλος της οικογένειας *Hsp90* απομονώθηκε και μελετήθηκε στο έντομο *S. nonagrioides* (*SnoHsp83*). Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του *SnoHsp83* έδειξε ομολογία με γνωστές αλληλουχίες μελών της οικογένειας *Hsp90*. Επιπλέον, στο άκρο της αμινοξικής ακολουθίας του *SnoHsp83* παρατηρούμε το πενταπεπτίδιο MEEVD το οποίο χαρακτηρίζει όλες τις κυτοσολικές *Hsp90* πρωτεΐνες (Gupta, 1995). Τα πέντε συντηρημένα αμινοξικά τμήματα που ορίζουν μια οικογένεια *Hsp90* πρωτεΐνης (Gupta, 1995) παρατηρήθηκαν στην αλληλουχία του εντόμου *S. nonagrioides*, καθώς και άλλες σημαντικές δομικές και λειτουργικές περιοχές που συναντάμε συνήθως σε πρωτεΐνες *Hsp90* (Buchner, 1999, Caplan, 1999, Chen *et al*, 2006). Επίσης, τρεις μεταβλητές περιοχές που χαρακτηρίστηκαν από τον Chen *et al*. (2006) βρέθηκαν στην αλληλουχία του *SnoHsp83*. Μετά το μεταβλητό N-άκρο παρατηρείται μια υψηλά συντηρημένη ATP και geldanamycin αμινοξική περιοχή πρόσδεσης (aa 13-219). Κοντά στο C-τελικό

άκρο, η περιοχή που περιλαμβάνεται μεταξύ των 630 και 690 aa είναι εξαιρετικά συντηρημένη, και περιέχει μία θέση διμερισμού, απαραίτητη για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, μία θέση για αναδίπλωση πρωτεϊνών bHLH (Shue & Kohtz, 1994) και μια καλά διατηρημένη ακολουθία συναίνεσης -LXXLL- (Aa 647-651), η οποία έχει αποδειχτεί ότι προσδένεται σε πυρηνικούς υποδοχείς. (Torchia *et al.*, 1997). Οι Scheufler *et al.*, (2000) έχουν δείξει ότι η EEVD αλληλουχία της Hsp70 οικογένειας αναγνωρίζεται από τα TPR τμήματα της HOP, μια Hsp70/Hsp90 πρωτεΐνη οργάνωσης που μεσολαβεί τη σύνδεση των Hsp70 και Hsp90 σε ένα πολυτσαπερόνιο σύμπλοκο.

Πραγματοποιήσαμε μια φυλογενετική ανάλυση με ολοκληρωμένες αλληλουχίες *Hsp90* γονιδίων από πέντε συνομοταξίες εντόμων. Τα Δίπτερα και τα Λεπιδοπτερα διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά το ένα από το άλλο όπως καθώς και από τα Υμενόπτερα, Ημίπτερα και Ορθόπτερα (Landais *et al.*, 2001). Επιπλέον, τα νυχτόβια (Noctuidae) *S. nonagrioides*, *M. brassicae* και *S. frugiperda*, ήταν συγκεντρωμένα στην ίδια ομάδα. Στα λεπιδόπτερα έντομα όπως ο *Bombyx mori* και η *S. frugiperda*, το *Hsp90* γονίδιο υπάρχει σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα (Landais *et al.*, 2001). Ομοίως, τα αποτελέσματα μας από τις γονιδιωματικές αναλύσεις κατά Southern έδειξαν ότι το *SnoHsp83* κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο στο έντομο *S. nonagrioides*.

Σε μη- διαπαύουσες προνύμφες του εντόμου *S. nonagrioides*, τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp83* ήταν αυξημένα όταν τα έντομα εξετέθησαν σε μία υψηλή θερμοκρασία (40 ° C). Η συνολική αύξηση στα επίπεδα των μεταγραφικών επιπέδων του *SnoHsp83* κυμαίνεται μεταξύ 2 έως 15-φορές, με βάση την Real Time PCR ανάλυση. Επίσης, η έκθεση σε θερμοκρασίες -5, 0, ή 5 ° C προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του *SnoHsp83* μετά την ανάκτηση. Το πρότυπο έκφρασης που παρατηρήθηκε σαν απόκριση στο ψυχρό στρες διέφερε σημαντικά από αυτό που προκαλείται από θερμικό στρες. Το πρότυπο αυτό έχει αναφερθεί στο παρελθόν για τα μεταγραφήματα *SnoHsp20.8* και *SnoHsp70* του εντόμου *S. nonagrioides*, (Gkouvitsas *et al.*, 2008, 2009) άλλα και για τα *Hsp90* στη *Drosophila* και στην *S. crassipalpis* (Rinehart & Denlinger, 2000), Τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης δεν αυξάνονται κατά τη διάρκεια του στρες κάθε αυτού, αλλά μόνο μετά την περίοδο αποκατάστασης στο 25° C. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι τα μεταγραφήματα του *SnoHsp83* παραμένουν σε ένα χαμηλό επίπεδο σε μη- διαπαύουσες προνύμφες του *S.*

nonagrioides, ενώ αυξάνονται κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης, με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του *SnoHsc70* (Gkounitsas *et al.*, 2009).

Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία, φαίνεται ότι η αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του *Hsp90* κατά την προετοιμασία ή απόκριση στη διάπαυση, δεν είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό σε διαπαύουσα έντομα. Στο έντομο *S. crassipalpis*, η *Hsp90* υπο-εκφράζεται κατά τη διάρκεια της νυμφικής διάπαυσης (Rinehart & Denlinger, 2000), στη πράσινη μύγα, *Lucilia sericata*, και στο έντομο *D. triauraria* η έκφραση του *Hsp90* δεν ρυθμίζεται και δεν επηρεάζεται καθόλου σε απόκριση στη διάπαυση (Goto & Kimura, 2004; Tachibana *et al.*, 2005). Η αύξηση της έκφρασης του *Hsp83* στο έντομο *S. nonagrioides* στη φάση της βαθιάς διάπαυσης είναι ανάλογη με τα μοτίβα έκφρασης που παρατηρήθηκαν στο έντομο τρυπητή μίσχου ρυζιού, *Chilo suppressalis*, και στο σκουλήκι κρεμμυδιού, *Delia antiqua* (Chen *et al.*, 2005, Sonoda *et al.*, 2006).

Κατά τη διάρκεια της διάπαυσης, η έκφραση του *Hsp90* θα μπορούσε να ρυθμιστεί με εκδυστεροειδή. Στο έντομο *D. melanogaster* η παρουσία εκδυστεροειδών οδηγεί σε αύξηση στην έκφραση των *Hsp90* (Thomas & Lengyel, 1986) ενώ επίσης είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι το γονίδιο αυτό είναι κρίσιμο για τη δημιουργία λειτουργικών υποδοχέων εκδυσόνης (Arbeitman & Hogness, 2000). Στο σκουλήκι *C. elegans*, οι προνύμφες dauer είναι εμπλουτισμένες με μεταγραφήματα του *Hsp90* γονιδίου και τα προϊόντα τους θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με στεροειδείς υποδοχείς ορμονών (Dalley & Golomb, 1992). Οι τιμές των εκδυστεροειδών αυξάνονται πριν από κάθε προνυμφικό στάδιο στο *S. nonagrioides* και παρατηρείται μια μεγίστη αύξηση στο πέρασμα από το 8^ο στο 9^ο instar (Eizaguirre *et al.*, 2007), που είναι 60 ημέρες από το χρόνο συλλογής (Fantinou *et al.*, 1996). Επειδή οι προνύμφες του *S. nonagrioides* συνεχίζουν τις εκδύσεις σε επιπλέον του κανονικού αριθμού κατά τη διάπαυση, η φυσιολογική τους κατάσταση αλλάζει κυκλικά. Η εικόνα της έκφρασης της *SnoHsp83* έδειξε μια περιοδικότητα η οποία μπορεί να σχετίζεται με τις υπεράριθμες εκδύσεις κατά τη διάπαυση ή τις κυκλικές αλλαγές στον τίτλο των εκδυστεροειδών. Η αύξηση της έκφρασης του *SnoHsp83*, καθώς και εκείνης του *SnoHsc70* που έχει μελετηθεί προηγουμένως (Gkounitsas *et al.*, 2009), θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό μοριακό δείκτη για το σκώληκα του αραβοσίτου κατά τη διάρκεια της διάπαυσης. Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι και τα δύο γονίδια εμφανίζουν ένα παρόμοιο μοτίβο έκφρασης, όταν οι προνύμφες είναι κάτω από

συνθήκες διάπαυσης. Το *SnoHsc70* και το *SnoHsp83* θα μπορούσε ενδεχομένως να εμπλέκονται σε έναν ανάδρομο βρόχο ρύθμισης της συναρμολόγησης του υποδοχέα του συμπλόκου της εκδυσόνης (Gkounitsas *et al.*, 2009) και σύμφωνα με αυτή την πιθανότητα να έχουμε επαγωγή των δύο γονιδίων στη φάση της βαθειάς διάπαυσης του *S. nonagrioides*, όταν συμβαίνουν οι επιπλέον εκδύσεις στις προνύμφες.

Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να υποδεικνύουν ότι τα μετάγραφα του *Hsp90* ρυθμίζονται σε άμεση σχέση με τα αναπτυξιακά στάδια των διαπαουσών προνυμφών του *S. nonagrioides*, δηλαδή παρουσίασαν αύξηση πριν από την είσοδο στο 9^ο αναπτυξιακό στάδιου, γεγονός που υποδηλώνει ότι εμπλέκονται σε μια αναπτυξιακή διαδικασία που λαμβάνει χώρα μεταξύ δύο εκδύσεων. Μια πιο εκτεταμένη έρευνα είναι απαραίτητη για να διευκρινιστεί πώς η έκφραση του *SnoHsp83* αλλάζει μεταξύ δύο εκδύσεων, προκειμένου να ρίξουμε φως στη διάπαυση σε μοριακό επίπεδο. Η ρύθμιση και η λειτουργία των διαφόρων Hsp οικογενειών κατά τη διάρκεια της διάπαυσης στο *S. nonagrioides*, θα μπορούσε να μας δώσουν μια εικόνα των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην διάπαυση του είδους αυτού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A. Τα βιολογικά ρολόγια στο έντομο *Sesamia nonagrioides*

1. Το λεπιδόπτερο *Sesamia nonagrioides* αποτελεί ένα κατάλληλο οργανισμό για τη μελέτη των βιολογικών ρολογιών στα έντομα.
2. Το βιολογικό ρολόι της *S. nonagrioides* είναι τύπου ταλαντωτής (oscillator).
3. Τα ωρολογιακά γονίδια *Snooper*, *Snotim*, *Snocry* και *Snocyc* της *S. nonagrioides* έδειξαν καθαρή κίρκαδική ταλάντωση και φωτοπεριοδική ανταπόκριση.
4. Η κίρκαδικότητα και η φωτοπεριοδικότητα ρυθμίζονται από τα ίδια γονίδια. Το κίρκαδικό ρολόι της *S. nonagrioides* είναι κρίσιμο όχι μόνο για ημερήσιους ρυθμούς αλλά και για την εποχιακή προσαρμογή.
5. Στη *S. nonagrioides* τα δύο συστήματα (κίρκαδικό και φωτοπεριοδικό) διαχωρίζονται φυσικά αλλά λειτουργούν σε στενή συνεργασία. Έχουμε δύο μηχανισμούς, που λειτουργούν όμως με τα ίδια ωρολογιακά γονίδια.

B. Μελέτη θερμοεπαγωγής στο έντομο *Sesamia nonagrioides*

1. Τα θερμοεπαγόμενα γονίδια *SnoHsp19.5*, *SnoHsp20.8*, *SnoHsc70* και *SnoHsp83* της *S. nonagrioides*, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της διάπαυσης στα έντομα.
2. Οι sHsps πρωτεΐνες συμβάλλουν στη ρύθμιση της διάπαυσης και στην αντίσταση στο κρύο. Το γονίδιο *SnoHsp19.5* εκφράζεται συνεχώς στη διάρκεια της διάπαυσης ενώ το γονίδιο *SnoHsp20.8* επάγεται και σηματοδοτεί τον τερματισμό της διάπαυσης.
3. Διάφορα μέλη της οικογένειας των γονιδίων Hsp70 αντιδρούν διαφορετικά στη διάρκεια της ανάπτυξης ή των ειδικών σταδίων της διάπαυσης του εντόμου. Τα μεταγραφήματα του γονιδίου *SnoHsp70* ήταν μη ανιχνεύσιμα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου ενώ το *SnoHsc70* επάγεται κατά τη διάρκεια της βαθιάς διάπαυσης.

4. Η ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης του *SnoHsp83* και του *SnoHsc70* κατά τη διάρκεια της διάπαυσης *S. nonagrioides* αποτελεί σημαντικούς μοριακούς δείκτες.
5. Η ρύθμιση και η λειτουργία των διαφόρων Hsp οικογενειών κατά τη διάρκεια της διάπαυσης στο έντομο *S. nonagrioides* μας δίνει μια εικόνα των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην διάπαυση του είδους αυτού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allada, R., White, N.E., So, Wv., Hall, J.C., Rosbach, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93, 791–804.
- Altartatz, M., Applebaum, Sh.W., Richard, D.S., Gilbert, L.I., Segal, D. (1991). Regulation of juvenile hormone synthesis in wild-type and apterous mutant *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 81, 205-216.).
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Xhang, J., Zhang, Z, Miller, W.and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D.,Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H., Takahashi, J.S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655–667.
- Andrewartha, H.G., 1952. Diapause in relation to the ecology of insects. *Biological Reviews* 27, 50–107.
- Arbeitman and Hogness, 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* 101(1): 67-77
- Arbona, M., de Frutos, R. and Tanguay, R.M. (1993) Transcriptional and translational study of the *Drosophila subobscura hsp83* gene in normal and heat-shock conditions. *Genome* 36, 694–700.
- Atungulu, E., Tanaka, H., Fujita, K., Yamamoto, K., Sakata, M., Sato, E., Hara, M., Yamashita, T., Suzuki, K.(2006). A Double Chaperone Function of the sHsp Genes against Heat-Based Environmental Adversity in the Soil-Dwelling Leaf Beetles. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 75, 15-22.
- Bardwell J. C. A., Craig E. A. (1987). Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5177–5181
- Bargiello, T.A., Jackson, F.R., Young, M.W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 312, 752–754.

- Beck, S.D. (1962). Temperature effects on insects: relation to periodism. Proceedings of the North Central Branch, Entomological Society of America 17, 18–19.
- Beck, S. D. 1980. Insect photoperiodism. 2d ed. Academic Press, New York.
- Becker J, Craig EA. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219(1-2):11-23.
- Benedict, M.Q., Levine, B.J., Ke, Z.X., Cockburn, A.F. and Seawright, J.A. (1996) Precise limitation of concerted evolution to ORFs in mosquito *Hsp82* genes. *Insect Mol Biol* 5, 73–79.
- Benna C, Scannapieco P, Piccin A, Sandrelli F, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Valle G, Costa R. 2000. A second timeless gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian tim. *Curr Biol*. Jul 13;10(14):512-3.
- Bentley, G.E. (2010). Photoperiodism and reproduction in birds. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), *Photoperiodism. The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, pp. 420–445.
- Bharadwaj S , Ali A , Ovsenek N . 1999. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol*.19 (12): 8033-41.
- Blackman, R.K. and Meselson, M. (1986) Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila hsp82* gene. *J Mol Biol* 188, 499–515.
- Bonato, M.C., Silva, A.M., Gomes, S.L., Maia, J.C., Juliani, M.H. (1987). Differential expression of heat-shock proteins and spontaneous synthesis of HSP70 during the life cycle of *Blastocladiella emersonii*. *European Journal Biochemistry* 163, 211–220.
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T. And Craig, E.A. (1994) Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 38, 1–17.
- Buchner, J. (1999) Hsp90 – a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 24,136–141.

- Bunning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der Photoperiodischen Reaktion. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft* 53, 590–607.
- Bunning, E. (1960). Circadian rhythms and time measurement in photoperiodism. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 25, 249–256.
- Bunning, E., (1969). Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochemistry and Photobiology* 9, 219–228.
- Busza, A., Emery-Le, M., Rosbash, M., Emery, P. (2004). Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science* 304(5676): 1503-1506
- Caplan, A.J. (1999) HSP90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol* 9, 262-268.
- Cavener, D.R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res* 15, 1353–1361.
- Chang DC, Reppert SM (2003). A novel C-terminal domain of *Drosophila* PERIOD inhibits dCLOCK:CYCLE-mediated transcription. *Curr Biol* 13:758 –762.
- Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A., Ishikawa, Y. (2005). The expression of the *HSP90* gene in response to winter and summer diapauses and thermal-stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *Insect Molecular Biology* 14, 697-702.
- Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A. and Ishikawa, Y. (2006) Cloning and characterization of the *Hsp70* gene, and its expression in response to diapauses and thermal stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *J. Bioch.. Mol. Biol.* 39, 749-758.
- Cherkasova, V., Ayyadevara, S., Egilmez, N., Shmookler, Reis, R. (2000). Diverse *Caenorhabditis elegans* genes that are upregulated in dauer larvae also show elevated transcript levels in long-lived, aged, or starved adults. *Journal of Molecular Biology* 300, 433–448.
- Craig, E.A., Ingolia, T.D. and Manseau, L.J. (1983) Expression of *Drosophila* heat-shock cognate genes during heat shock and development. *Dev. Biol.* 99, 418-426.
- Craig, E. A., Gambill, B.D. and Nelson R. J. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 57, 402-414.

- Curtin, K.D., Huang, Z.J., Rosbach, M., (1995). Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron* 14, 365–372.
- Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., (2003). *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112, 329– 341.
- Dalley, B.K. and Golomb, M. (1992) Gene expression in the *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental regulation of *hsp90* and other genes. *Dev Biol* 151, 80–90.
- Danks HV. (1987). *Insect Dormancy: An ecological Perspective* (Biological Survey, Ottawa, Canada).
- Danks, H.V., (2005). How similar are daily and seasonal biological clocks? *Journal of Insect Physiology* 51, 609–619.
- Darlington, D.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T.D.L., Weitz, C.J., Takahashi, J.S., Kay, A., (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280, 1599–1603.
- De Jong, I.C., Ekkel, E.D., Van de Burgwal, J.A., Lambooi, E., Korte, S.M., Ruis, M.A.W., Koolhaas, J.M., Blokhuis, H.J. 1998. Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs. *Physiol. Behav.* 64: 303-310.
- Denlinger, D.L., (1972). Induction and termination of pupal diapause in *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 142, 11–24.
- Denlinger, D. L., (1985). Hormonal control of diapause. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, eds. Kerkut G. A. and Gilbert L. I., Vol.8, pp 353–412. Pergamon, Oxford.
- Denlinger, D.L., Lee, R.E., Yocum GD, Kukal, O. (1992). Role of chilling in the acquisition of cold tolerance and the capacitation to express stress proteins in diapausing pharate larvae of the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 21, 271-280.
- Denlinger, D.L.(2000). Molecular regulation of insect diapause. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (Eds.), *Environmental Stressors and Gene Responses*. Elsevier, Amsterdam, pp. 259–275.

- Denlinger, D.L., Rinehart JP, Yocum GD. (2001). Stress proteins: a role in insect diapause? In: *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*. Ed. by Denlinger, D.L., Giebultowicz, J., Saunders, D.S., Elsevier, Amsterdam, 155–171.
- Denlinger, D.L. (2002). Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47, 93-122.
- Denlinger, D.L., Yocum, G.D. and Rinehar, J.P. (2005) Hormonal control of diapause. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 3. Gilbert, L.I., Iatrou, K., and Danks, H.V., 1987. *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods), Monograph series No. 1, p. 439.
- Denlinger, D.L., Yocum, G.D., Rinehart, J.P., (2005). Hormonal control of diapause. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science Endocrinology*, vol. 3. Elsevier, Amsterdam, pp. 615–650.
- Dolezel, D., Zdechovanova, L., Sauman, I., Hodkova, M. (2008). Endocrine-dependent expression of circadian clock genes in insects. *Cellular and Molecular Life Science* 65, 964–969.
- Dubruille, R., Emery, P., (2008). A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. *Molecular Neurobiology* 38, 129–145.
- Dunlap, J.C., (1996). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annual Review of Genetics* 30, 579–601.
- Dunlap, J.C., (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271–290.
- Edey, I., Zwiebel, L.J., Dembinska, M.E., Rosbach, M., (1994). Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 2260–2264.
- Egan, E.S., Franklin, T.M., Hilderbrand-Chae, M.J., McNeil, G.P., Roberts, M.A., Schroeder, A.J., Zhang, X., Jackson, F.R. (1999). An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *J. Neurosci.* 19(10): 3665-3673
- Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation, *EMBO Journal* 16, 221–229.

- Eizaguirre, M., Lopez, C., Asin, L. and Albajes, R. (1994) Thermoperiodism, photoperiodism and sensitive stage in the diapause induction of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect. Physiol.* 40, 113-119.
- Eizaguirre M, Schafellner C, López C, Sehnal F. (2005). Relationship between an increase of juvenile hormone titer in early instars and the induction of diapause in fully grown larvae of *Sesamia nonagrioides*. *J Insect Physiol.* 51(10):1127-34
- Eizaguirre, M López C, Schafellner, C., Sehnal F. (2007) Effects of ecdysteroid agonist RH-2485 reveal interactions between ecdysteroids and juvenile hormones in the development of *Sesamia nonagrioides*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* Volume 65, Issue 2, pages 74–84,
- Ellis RJ, van der Vies SM. (1991). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:321-47.
- Emerson, K.J., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., (2009). Complications of complexity: integrating environmental, genetic and hormonal control of insect diapause. *Trends in Genetics* 25, 217–225.
- Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Forster, C., Emery-Le, M., Hall, J.C., Rosbach, M., (2000). *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26, 493–504.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K., Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research* 30, 235–238.
- Fantinou, A.A., Karandinos, M.G., Tsitsipis, J.A. (1995). Diapause induction in the *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) effect of photoperiod and temperature. *Environmental Entomology* 24, 1458-1466.
- Fantinou, A.A., Tsitsipis, J.A. and Karandinos, M.G. (1996) Effects of short- and long-day photoperiods on growth and development of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environm. Entomol.* 25, 1337-1343.
- Fantinou, Tsitsipis, J.A., A.A., Karandinos, M.G. (1998). Diapause termination in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. *Environmental Entomology* 27, 53-58.

- Feder, J.H., Rossi, J.M., Solomon, N., Linquist, S. (1992). The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Development* 6, 1402-1413.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243-282.
- Feige U, Polla BS. (1994). Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia.* 50(11-12):979-86.
- Felsenstein, J. (2001). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6alpha. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fernandes M., O'Brien T., Lis J.T.Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopolis C.(1994) Structure and regulation of heat shock gene promoters. in *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), pp 375–393
- Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79, 425-49.
- Flanagan, R.D., Tammariello, S.P., Joplin, K.H., Cirka-Ireland, R.A., Yocum, G.D., Denlinger, G.D. (1998) Diapause specific expression in pupae of the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5616-5620.
- Frohman, M.A. (1990). RACE: Rapid amplification of cDNA ends. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J.. Academic Press, London, pp 28-38.
- Frydenberg J, Hoffmann A, Loeschke V. (2003). DNA sequence variation and latitudinal associations in hsp23, hsp26, and hsp27 from natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol.*12:2025-2032.
- Galichet, P.F. (1982) Hibernation d'une population de *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lep. : Noctuidae) en France Meridionale. *Agronomie (Paris)*. 2, 561-566.

- Garnier, J., Gibrat, J.F., Robson, B. (1996). GOR secondary structure prediction method version IV. In *Methods in Enzymology*. Ed. R.F. Doolittle, vol 266, 540-533.
- Gekakis, N., Saez, L., Delahaye-Brown, A.M., Myers, M.P., Sehgal, A., Young, M.W., Weitz, C.J., (1995). Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* 270, 811–815.
- Gething M.J. ed. (1997). *Guidebook to Molecular Chaperones and protein-Folding Catalysts*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
- Gibbs, D., 1975. Reversal of pupal diapause in *Sarcophaga argyrostoma* by temperature shifts after puparium formation. *Journal of Insect Physiology* 21, 1179–1186.
- Giebultowicz, J.M., (1999). Insect circadian clocks: is it all in their heads? *Journal of Insect Physiology* 45, 791–800.
- Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D. and Kourti, A. (2008). Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.). *J Insect Physiol* 54, 1503-1510.
- Gkouvitsas, T., Kontogiannatos D. and Kourti, A. (2009). Cognate Hsp70 gene is induced during deep diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Mol Biol* 14, 697-702.
- Gkouvitsas, T., Kontogiannatos, D., Kourti, A. (2009). Expression of the *Hsp83* gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Insect Mol. Biol.* 18, 759-768.
- Goryshin, N.I., Tyshchenko, G.F., (1970). Thermostability of the process of perception of photoperiodic information in the moth *Acronycta rumicis* (Lepidoptera Noctuidae). *Doklady Akademii Nauk SSSR* 193, 458–461
- Goto, S.G., Yoshida, K.M., Kimura, M.T. (1998). Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology* 44, 1009–1015.

- Goto, S.G., Kimura, M.T. (2004). Heat-shock-responsive genes are not involved in the adult diapause of *Drosophila triauraria*. *Gene* 326, 117–122.
- Goto, S.S, Denlinger, D.L., (2002). Short-day and long-day expression patterns of genes involved in the flesh fly clock mechanism: period, timeless, cycle and cryptochrome. *Journal of Insect Physiology* 48, 803–816.
- Goto, S.S., Shiga, S., Numata, H., (2010). Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), *Photoperiodism. The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, pp. 258–286.
- Grammatikakis, N., (2002). The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J. Biol. Chem.* 277(10):8312–8320.
- Grzimek (1975). *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*, Volume 7, Birds I. by Bernhard (ed).
- Gupta, R.S. and Golding, G.B. (1993). Evolution of Hsp70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 37, 573–582.
- Gupta, R.S. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* 12, 1063–1073.
- Hall, J.C., (2000). Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Current Opinions in Neurobiology* 10, 456–466.
- Hall, J.C., (2003). *Genetics and Molecular Biology of Rhythms in Drosophila and other Insects*. Academic Press, San Diego, p. 286.
- Hardie, J., (1990). The photoperiodic counter quantitative day-length effects and scotophase timing in the vetch aphid *Megoura viciae*. *Journal of Insect Physiology* 36, 939–949.
- Hardin, P.E., Hall, J.C., Rosbach, M., (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343, 536–540.
- Hartl, F.U.(1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996 Jun 13;381(6583):571-9.

- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperons in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1266.
- Hasegawa, K., Shimizu, I., (1987). In vivo and in vitro photoperiodic induction of diapause using isolated brain-suboesophageal ganglion complexes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 33, 959–966.
- Hayward, S.A.L., Rinehart, J.P., Denlinger, D.L. (2004). Desiccation and rehydration elicit distinct heat shock protein transcript responses in flesh fly pupae. *Journal of Experimental biology* 207, 963-971.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. (1993) Molecular Chaperone Functions of Heat-Shock Proteins. *An Rev Bioch* 62, 349-384.
- Hilal, A. (1977). Mise en evidence d' un etat diapause vraie chez *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera-Noctuidae). *C. R. Acad. Sci. Ser. D. Paris* 285, 365-367.
- Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*. 1993;364:259–262
- Hung, J.J., Cheng, T.J., Chang, M.D., Chen, K.D., Huang, H.L. and Lai, Y.K. (1998). Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L rat brain tumor cells. *J Cell Biochem*. 71, 21-35.
- Hunt, C. and Calderwood, S. (1990). Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell lines. *Gene* 87, 199-204.
- Hwang, J.S., Go, H.J., Goo, T.W., Yun, E.Y., Choi, K.H., Seong, S.I., Lee, S.M., Lee, B.H., Kim, I., Taehoon Chun, T. and Kang, S.W. (2005). The analysis of differentially expressed novel transcripts in diapausing and diapause-activated eggs of *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59, 197-201.
- Ikeno, T., S. Tanaka, H. Numata, S. Goto (2010). Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biology*, 8:116
- Ingolia, T.D., Craig, F.A. (1982). Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian α -crystallin. *Proceedings of National Academic Science USA* 79, 2360-2364.

- Ireland, R.C., Berger, E.M. (1982). Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins stimulated by 20-hydroxyecdysone in a cultured *Drosophila* cell line. *Proceedings of National Academic Science USA* 79, 855–859.
- James, M., Crabbe, M.J.C., Goode, D. (1994). α -Crystallin: chaperoning and aggregation. *Biochemistry Journal* 297, 653-654.
- Johnston JD, Ebling FJ, Hazlerigg DG. (2005). Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci.*(11):2967-74.
- Joplin, K.H., Denlinger, D.L. (1990). Developmental and tissue specific control of the heat shock induced 70 kDa related proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology* 36, 239.
- Karouna-Renier, N.K., Yang, W.J. and Ranga, R.K. (2003) Cloning and characterization of a 70 kDa heat shock cognate gene (*HSC70*) from two species of *Chironomus*. *Insect. Mol. Biol.* 12, 19–26.
- Katschinski D.M.(2004). On Heat and Cells and Proteins. *News Physiol. Sci.* 19,11-15
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80, 183–201.
- Klemenz R, Frohli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A. (1991). Alpha B-crystalline is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(9):3652-6.
- Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S., Young, M.W., (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I epsilon. *Cell* 94, 97–107.
- Konopka, R.J., Benzer, S., (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 68, 2112–2116.
- Kostal, V., (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52, 113–127.
- Kostal V.(2011). Insect photoperiodic calendar and circadian clock: Independence, cooperation, or unity? *Journal of Insect Physiology* 57 (2011) 538–556

- Kourti, A. (2006). Mitochondrial DNA Restriction Map and Cytochrome c Oxidase Subunits I and II Sequence Divergence of Corn Stalk Borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochem Genet* 44, 321-32.
- Κούρτη Άννα (2013). Γονίδια και περιβάλλον. Σημειώσεις μαθήματος, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Kregel, K.C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92, 2177–2186.
- Krigsfield, L.J., Bittman, E.L., (2010). Photoperiodism and reproduction in mammals Photoperiodism. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), *The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, pp. 503–542.
- Kuczynski, R.S., Hong, K.C., Garcia-Ojalvo, J., Lee, K.H., (2007). PERIOD–TIMELESS interval timer may require an additional feedback loop. *PLoS Computational Biology* 3, e154.
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L., Lindquist, S. (1986). An ancient developmental induction heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231, 1154–1157.
- Landais, I., Pommet, J., Mita, K., Nohata, J., Gimenez, S., Fournier, P., Devauchelle, G., Duonor-Cerutti, M. and Ogliastro, M. (2001). Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera, *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Gene* 271, 223–231.
- Lees, A.D., (1950). Diapause and photoperiodism in the fruit tree red spider mite (*Metatetranychus ulmi* Koch.). *Nature* 166, 784.
- Lees, A.D., (1953). The significance of the light and dark phase in the photoperiodic control of diapause in *Metatetranychus ulmi* Koch. *Annals of Applied Biology* 40, 487–497.
- Lees, A.D., (1955). *The Physiology of Diapause in Arthropods*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 151.
- Lees, A.D., (1973). Photoperiodic time measurement in the aphid *Megoura viciae*. *Journal of Insect Physiology* 19, 2279–2316.

- Lee, C., Bae, K., Edery, I., (1999). PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK–CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Molecular and Cell Biology* 19, 5316–5325.
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J. (2006). Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Chemosphere* 65, 1074-81.
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP (1997a) Structure function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* 272, 24646-24656.
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP (1997b) Structure function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* 272, 24646- 24656.
- Lewis, R.D., Saunders, D.S., (1987). A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock I. Description of the model based on a feedback control system. *Journal of Theoretical Biology* 128, 47–59.
- Lim, C., Chung, B.Y., Pitman, J.L., McGill, J.J., Pradhan, S., Lee, J., Keegan, K.P., Choe, J., Allada, J., (2007). Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Current Biology* 17, 1082–1089.
- Linquist, S. (1986). The heat shock response. *Ann. Review Biochem.* 55, 1151–1191.
- MacRae, T.H., (2000). Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Molecular Life Science* 57, 899–913.
- MacRae, T.H., (2010). Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 2405–2424.
- Mahroof, R., Zhu, K.Y., Neven, L., Subramanyam, B. and Bai, J. (2005). Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol.* A 141, 247–256.
- Majercak, J., Sidote, D., Hardin, P.E., Edery, I. (1999). How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* 24(1): 219-230.

- Mason, P.J., Hall, L., Gauz, J. (1984). The expression of heat shock genes during normal development in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 194, 73-78.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3, 100-105.
- Merlin C, François MC, Queguiner I, Maïbèche-Coisné M, Jacquin-Joly E. 2006. Evidence for a putative antennal clock in *Mamestra brassicae*: molecular cloning and characterization of two clock genes--period and cryptochrome-- in antennae. *Insect Mol Biol.*(2):137-45.
- Morimoto RI. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12(24):3788-96.
- Myers, M.P., Wager-Smith, K., Wesley, C.S., Young, M.W., Sehgal, A., (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science* 270, 805–808.
- Nagy AD1, Csernus VJ. (2007). The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides.* (9):1767-74.
- Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M., Sehgal, A. (1999). A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* 285(5434): 1737-1741
- Narberhaus,F.(2002). Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 64-93.
- Nathan, D.F., M.H. Vos, and S. Lindquist (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 12949–12956.
- Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), (2010). Photoperiodism. The Biological Calendar. Oxford University Press, Oxford, p. 581.
- Nijhout, H.F. (1994). Genes on the wing. *Science* 265: 44-45.
- Nijhout, H.F., (2003). Development and evolution of adaptive polyphenism. *Evolution and Development* 5, 9–18.

- Niwa Y., T. Yamashino, T. Mizuno (2009). The Circadian Clock Regulates the Photoperiodic Response of Hypocotyl Elongation through a Coincidence Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 50(4): 838–854 (2009).
- Nover, L. And Scharf, K.D. (1997). Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol. Life Sci.* 53: 80-103.
- Numata, H., Shiga, S., Morita, A., (1997). Photoperiodic receptors in arthropods. *Zoological Science* 14, 187–197.
- Nunes MV and Saunders D . (1999). Photoperiodic time measurement in insects: A review of clock models. *J Biol Rhythms* 14:84-104.
- Nunes, M., Veerman, A., (1984). Light-break experiments and photoperiodic time measurement in the spider mite, *Tetranychus ulmi*. *Journal of Insect Physiology* 30, 891–897.
- Ousley, A., Zafarullah, K., Chen, Y., Emerson, M., Hickman, L., Sehgal, A. (1998). Conserved regions of the timeless (tim) clock gene in *Drosophila* analyzed through phylogenetic and functional studies. *Genetics* 148(2): 815-825.
- Park, D.H., Somers D. E., Y. S. Kim, Y. H. Choy, H. K. Lim, M. S. Soh, H. J. Kim, S. A. Kay, H. G. Nam (1999). Control of Circadian Rhythms and Photoperiodic Flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* Gene. *Science* 3, 1999: Vol. 285 no. 5433 pp. 1579-1582.
- Park, J., Helfrich-Forster, H., Lee, C., Liu, G., Rosbach, M.L., Hall, J.C., (2000). Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 3608–3613.
- Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance – degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev. Genet.* 27, 437–496.
- Pavelka, J., Shimada, K., Kostal, V., (2003). TIMELESS: a link between fly's circadian and photoperiodic clocks? *European Journal of Entomology* 100, 255–265.

- Pelham HR , Bienz M. 1982. A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *EMBO J.* 1 (11): 1473-7.
- Perisic O, Xiao H, Lis JT. 1989. Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell.* 59(5):797-806.
- Peschel, N., Chen, K.F., Szabo, G., Stanewsky, R., (2009). Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors Cryptochrome, Jetlag, and Timeless. *Current Biology* 19, 241–247.
- Picard, D., Khursheed B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S. and Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature* 348, 166 – 168.
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59, 1640–1648.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. and Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15, 1118-1131
- Pittendrigh, C.S., (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 64, 275–307.
- Pla, M., Huguet, G., Verdaguer, D., Puigderrajols, P., Llompart, B., Nadal, A., Molinas, M. (1998). Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. *Plant Science* 139, 49–57.
- Praekelt UM and Meacock PA (1990) HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet* 223(1):97-106
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 111–133.
- Putteril, J., Stockum, C., Warman, G., 2010. Photoperiodic flowering in the long-day. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), *Photoperiodism. The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, pp. 9–37.

- Qin, W., Tyshenko, M.G., Wu, B.S., Walker, V.K., Robertson, R.M. (2003). Cloning and characterization of a member of the hsp70 gene family from *Locusta migratoria*, a highly thermotolerant insect. *Cell Stress Chaperones* 8, 144-152.
- Ramsey, A.J., Russell, L.C, Whitt, S.R. and Chinkers, M. (2000). Over-lapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90. *J Biol Chem* 275, 17857-17862.
- Reineke A. Identification and expression of a small heat shock protein in two lines of the endoparasitic wasp *Venturia canescens*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;141:60–69
- Renoir, J M , J Mester, T Buchou, M G Catelli, P Tuohimaa, N Binart, I Joab, C Radanyi and E E Baulieu. (1984). Purification by affinity chromatography and immunological characterization of a 110kDa component of the chick oviduct progesterone receptor.
- Richier, B., Michard-Vanhee, C., Lamoroux, A., Papin, C., Rouyer, F., (2008). The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *Journal of Biological Rhythms* 23, 103–116.
- Rinehart, J.P. and Denlinger, D.L. (2000). Heat -shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsible to thermal stress. *Insect Mol Biol* 9, 641-645.
- Rinehart, J.P, Yocum, G.D., Denlinger, D.L. (2000). Developmental upregulation of inducible hsp70 transcript, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 515–521.
- Rinehart, J.P., Li, A., Yocum, G.D., Robich, R.M. and Denlinger, D.L. (2007). Up-regulation of heat shock proteins is essential for col survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad .Sci. USA* 104, 1130-7.
- Ritossa F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*.18:571–573.

- Roennenberg, T., Radic, T., Godel, M., Merrow, M., (2010). Seasonality and photoperiodism in Fungi. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), Photoperiodism. The Biological Calendar. Oxford University Press, Oxford, pp. 134–163.
- Rosato, E., Tauber, E., Kyriacou, C.P., (2006). Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *European Journal of Human Genetics* 14, 729–738.
- Rubin, D.M., Mehta, A.D., Zhu, J., Shoham, S., Chen, X., Wells, Q.R. and Palter, K.B. (1993). Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* Hsc70 genes. *Gene* 128, 155-163.
- Rutheford, S.L. and Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396, 336-342.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbach, M., Hall, J.C., (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805–814.
- Rybczynski R1, Gilbert LI. (2000). cDNA cloning and expression of a hormone-regulated heat shock protein (hsc 70) from the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30(7):579-89.
- Saez, L., Young, M.W., (1996). Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron* 17, 911–920.
- Sakano, D., Li, B., Xia, Q., Yamamoto, K. (2006). Genes encoding small heat shock proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosc. Biotechno. Biochem.* 70, 2443-2450.
- Sauman I, Tsai T, Roca AL, Reppert SM. (1996). Period protein is necessary for circadian control of egg hatching behavior in the silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron*.
- Saunders, D.S., (1971). The temperature-compensated photoperiodic clock “programming” development and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga argyrostoma*. *Journal of insect Physiology* 17, 801–812.
- Saunders DS. (1973). Thermoperiodic control of diapause in an insect: theory of internal coincidence. *Science*. 181(4097):358-60.

- Saunders, D.S., (2002). *Insect Clocks*, 3rd ed. Elsevier Science, Amsterdam, p. 560.
- Saunders, D.S., Lewis, R.D., Warman, G.R., (2004). Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. *Physiological Entomology* 29, 1–15.
- Saunders, D.S., (2005). Erwin Bunning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *Journal of Insect Physiology* 51, 599–608.
- Saunders, D.S. (2007). Photoperiodism in insects and other animals. In: Bjorn, L.O. (Ed.), *Photobiology: The Science of Life and Light*. 2nd ed. Springer, New York, pp. 389–416.
- Saunders, D.S., (2009). Circadian rhythms and the evolution of photoperiodic timing in insects. *Physiological Entomology* 34, 301–308.
- Saunders, D.S., (2010a). Photoperiodism in insects: migration and diapause responses. *Photoperiodism*. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), *The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, pp. 218–257.
- Saunders, D.S., (2010b). Controversial aspects of photoperiodism in insects and mites. *Journal of Insect Physiology* 56, 1491–1502.
- Sawyer, L.A., Sandrelli, F., Pasetto, C., Peixoto, A.A., Rosato, E., Costa, R., Kyriacou, C.P., (2006). The period gene *Thr-Gly* polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. *Genetics* 174, 465–480.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenlov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. and Moarefi, I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the HSP70-HSP90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210.
- Schmidt, P.S., Paaby, A.B., (2008). Reproductive diapause and life-history clines in North American populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 62, 1204–1215.
- Schuh S. et al. (1985) *J Biol Chem*. 260 (26): 14292-14296.
- Sehadová, Elitza P. Frantisek Sehnal , Makio Takeda.(2004). Distribution of Circadian Clock-Related Proteins in the Cephalic Nervous System of the Silkworm, *Bombyx Mori* *J Biol Rhythms* December 19: 466-482,

- Seo, J.S., Lee, Y.-M., Park, H.G., Lee, J.-S., 2006b. The intertidal copepod *Tigriopus japonicus* small heat shock protein 20 gene (Hsp20) enhances thermotolerance of transformed *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 901–908.
- Shopland, L.S., Lis, J.T. (1996). HSF recruitment and loss at most *Drosophila* heat shock loci is coordinated and depends on proximal promoter sequences. *Chromosoma* 105(3): 158--171
- Shue, G., and Kohtz, D.S. (1994). Structural and functional aspects of basic helix-loop-helix protein folding by heta-shock protein 90. *J Biol Chem* 269, 2707-2711.
- Simon, J.A., Lis, J.T. (1987). A germline transformation analysis reveals flexibility in the organization of heat shock consensus elements. *Nucleic Acids Res.* 15. 2971--2988.
- Smulders, R. H. P. P., M. A. M. van Boekel, and W. W. de Jong. (1998). Mutations and modifications support a ‘pitted-flexiball’ model for α -crystallin. *Int. J. Biol. Macromol.* 22:187–196.
- Sononda S., Fukumoto K., Izumi Y., Yoshida H., and Tsumuki H. (2006). Cloning of heat shock protein genes (hsp90 and hsc70) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker. *Arc Insect Bioch Physiol* 63, 36-47.
- Sonoda, S., Ashfaq, M. and Tsumuki, H. (2006). Cloning and nucleotide sequencing of three heat shock genes (hsp90, hsc70, and hsp19.5) from diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and their expression in relation to developmental stage and temperature. *Arc. Insect Bioch. Physiol.* 62, 80-90.
- Sonoda, S., Fukumoto, K., Izumi, Y., Ashfaq, M., Yoshida, H., Tsumuki, H. (2006). A small HSP gene is not responsible for diapause and cold tolerance acquisition in *Chilo suppressalis*. *Journal of Applied Entomology* 130, 309-313.
- Sorger PK, Pelham HR. 1987. The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J Mol Biol.* Mar 20;194(2):341-4.
- Southgate, R., Ayme, A., Voellmy, R. (1983). Nucleotide sequence analysis of the *Drosophila* small heat shock gene cluster at locus 67B. *J. Mol. Biol.* 165: 35-57

- Southwood, T.R.E., (1962). Migration of terrestrial arthropods in relation to habit. *Biological Reviews* 37, 171–214.
- Spyliotopoulos, A., Gkouvitsas, T., Fantinou and A., Kourti, A. (2007). Expression of a cDNA encoding a member of the hexamerin storage proteins from the moth *Sesamia nonagrioides* (Lef.) during diapause. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 44–54.
- Stanewsky, R., Piccin, A., Rosato, E., Zordan, M., Costa, R., Kyriacou, C.P., (2007). A molecular basis for natural selection at the timeless locus in *Drosophila melanogaster*. *Science* 316, 1898–1900.
- Sun Y, MacRae TH. (2005a). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*; 62:2460–2476.
- Sun Y, MacRae TH. (2005b). The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J.*272:2613
- Sun Y, MacRae TH. (2005c). Characterization of novel sequence motifs within amino- and carboxy-terminal extensions of p26, a small heat shock protein from *Artemia franciscana*. *FEBS J.*272:5230
- Suri, V., Qian, Z., Hall, J.C., Rosbash, M. (1998). Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 21(1): 225--234.
- Tachibana, S.I., Numata, H. and Goto, S.G. (2005). Gene expression of heat-shock proteins (*Hsp23*, *Hsp70* and *Hsp90*) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *J Insect Physiol* 51, 641–647.
- Tammariello, S.P., Denlinger, D.L. (1998). G₀/G₁ cell cycle arrest in the brain of *Sarcophaga crassipalpis* during pupal diapause and the expression pattern of the cell cycle regulator, proliferating cell nuclear antigen. *Insect Biochemical Molecular Biology* 28, 83–89.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A. and Masaki, S. (1986). Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press, New York.
- Tauber, E., Zordan, M., Sandrelli, F., Pegoraro, M., Osterwalder, N., Breda, C., Daga, A., Selmin, A., Monger, K., Benna, C., Rosato, E., Kyriacou, C.P., Costa, R., (2007). Natural selection favors a newly derived timeless allele in *Drosophila melanogaster*. *Science* 316, 1895–1898.

- Thiele, H.-U., (1977). Differences in measurement of daylength and photoperiodism in two stocks from sub-arctic and temperate climates in the carabid beetle, *Pterostichus nigrita* F. *Oecologia* 30, 349–365.
- Thomas SR, Lengyel JA. Ecdysteroid-regulated heat-shock gene expression during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Biol.* 1986 (2):434-8.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 85: 389-398.
- Tomioka K1, Matsumoto A. (2010). A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol Life Sci.*67(9):1397-406.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-684.
- Tsitsipis, J.A. (1984). Rearing the corn borer *Sesamia nonagrioides* on artificial media in the laboratory. In Proceedings, XVII International Congress of Entomology, 16-26 August, Hamburg, Abstracts, p. 316.
- Vafopoulou, X., Steel, C.G.H., (2009). Circadian organization of the endocrine system. In: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Development*. Elsevier, Oxford, pp. 395–458.
- Vazquez, J., Farkas, G., Gaszner, M., Udvardy, A., Muller, M., Hagstrom, K., Gyurkovics, H., Sipos, L., Gausz, J., Galloni, M., Hogga, I., Karch, F., Schedl, P. (1993). Genetic and molecular analysis of chromatin domains. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 45-54.
- Veleri, S., Brandes, C., Helfrich-Förster, C., Hall, J.C., Stanewsky, R., (2003). A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Current Biology* 13, 1758–1767.
- Veerman, A.,(2001). Photoperiodic time measurement in insects and mites: a critical evaluation of the oscillator-clock hypothesis. *Journal of Insect Physiology* 47, 1097–1109.

- Veerman, A., Veenendaal, R.L., (2003). Experimental evidence for a non-clock role of the circadian system in a spider mite photoperiodism. *Journal of Insect Physiology* 49, 727–732.
- Walter, S., Buchner, J. (2002). Molecular chaperons-cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 1098-1113.
- Weber, J. A., D. J. Taxman, Q. Lu, and D. S. Gilmour. 1997. Molecular architecture of the hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region. *Mol. Cell Biol.* 17:3799–3808.
- Whitesell, L, Mimnaugh , E.G., De Costa, B., Myers, C.E., and Neckers, L.M.. (1994). inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in onogenic transformation. *Proc nat acad Sci USA* 91, 8324-8328.
- Waarman, G.R., Newcomb, R.D., Lewis, R.D., Evans, C.W., (2000). Analysis of the circadian clock gene period in the sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Genetical Research* 75, 257–267.
- Weeks, A.R., Mckechnie, S.W., Hoffman, A.A., (2006). In search of clinal variation in the period and clock timing genes in Australian *Drosophila melanogaster* populations. *Journal of Evolutionary Biology* 19, 551–557.
- Welch, W. J., and Brown, C. R. (1996). Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chap.* 1, 109–115.
- Wijnen, H., Young, M.W., (2006). Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annual Review of Genetics* 40, 409–448.
- Williams, C.M., (1969). Photoperiodism and the endocrine aspects of insect diapause. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 23, 285–300.
- Williams JA, Sehgal A. (2001). Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol.*;63:729-55.
- Williams, K.D., Busto, M., Suster, M.L., So, A.K.-C., Ben-Shahar, Y., Leever, S.J., Sokolowski, M.B., (2006). Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapause due to the insulin-regulated PI3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 15911–15915.
- Williams, K.D., Schmidt, P.S., Sokolowski, M.B., 2010. Photoperiodism in insects: molecular basis and consequences of diapause. In: Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.), *Photoperidism. The Biological Calendar*. Oxford University Press, Oxford, pp. 287–317.

- Wu T, Ma J, and Chen S. et al. 2001. Association of plasma antibodies against the inducible Hsp70 with hypertension and harsh working conditions. *Cell Stress Chaperones*. 6:394–401.
- Wu, Q., Brown, M.R., (2006). Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annual Review of Entomology* 51, 1–24.
- Xiao, H. and Lis, J.T. 1988. Germline transformation used to define key features of the heat shock response element. *Science*. 1988; 239: 1139–1142
- Xu Y, and Lindquist, S. (1993). Heat-shock proteins 90 governs the activity of pp60^{v-src} kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7074-7078.
- Yamashita, O., (1996). Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology* 42, 669–679.
- Yiangou, M, Tsapogas, P., Nikolaidis, N. and Scouras, Z.G. (1997). Heat-shock gene expression during recovery after transient cold shock in *Drosophila auraria* (Diptera: Drosophilidae). *Cytobios* 92, 91-98.
- Yin, C.M., Chippendale, G.M. (1979). Diapause of the southwestern corn borer, *Diatrea grandiosella*: further evidence showing juvenile hormone to be the regulator. *J Insect Physiol* 25, 513–523.
- Yocum, G.D, Joplin, K.H, Denlinger, D.L.(1991). Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18, 239–249.
- Yocum, G.D., Joplin, K.H., Denlinger, D.L. (1998). Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 677-682.
- Yocum, G.D. (2001). Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology* 47, 1139–1145.
- Yocum, G.D., Kemp, W.P., Bosch, J. and Knoblett, J.N.(2005). Temporal variation in overwintering gene expression and respiration in the solitary bee *Megachile rotundata*. *J. Insect. Physiol.* 51, 621-9.

- Young, J. C., Moarefi, I. and Hartl, F.U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154, 267-273.
- Yocum, G.D, Rinehart, J.P., Chirumamilla-Chapara, A., Larson, M.L., (2009). Characterization of gene expression patterns during the initiation and maintenance phases of diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology* 55, 32–39.
- Yoshii, T., Wulbeck, C., Sehadova', H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., Helfrich-Forster, C., (2009). The neuropeptide Pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *The Journal of Neuroscience* 25, 2597–2610.
- Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Reddy, P., Konopka, R.J., Kyriacou, C.P., Rosbash, M., Hall, J.C., (1984). P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39, 369–376.
- Zhao, Z., Zera, A.J., (2004). The hemolymph JH titer exhibits a large-amplitude, morph-dependent, daily cycle in the wing-polymorphic cricket *Gryllus firmus*. *Journal of Insect Physiology* 49, 137–148.
- Zhulin IB, Taylor BL, Dixon R. (1997). PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci.* 331-3

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟ
SCIENCE CITATION INDEX**

1. Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A (2008). Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef). J. Insect Physiol., 54(12):1503-10.

2. Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A. (2009). "Cognate Hsp70 gene is induced during deep larval diapause in the moth *Sesamia nonagrioides*" Insect Mol. Biol. 18 (20 253-264).

3. Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A. (2009). Expression of the Hsp83 gene in response to diapause and thermal stress in the moth *Sesamia nonagrioides*. Insect Mol. Biol. 18 (6), 759-768.