ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ευδοξία Γ. Κακάνη
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΤΟΠΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ Bactrocera oleae

ΛΑΡΙΣΑ 2009

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΤΟΠΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *Bactrocera oleae*

Ευδοξία Γ. Κακάνη
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

ΛΑΡΙΣΑ 2009

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

- **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)
Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος
Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Κομητοπούλου Αικατερίνη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κουρέτας Δημήτριος
Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος
Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαββάκης Χαράλαμπος
Καθηγητής
Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Βασικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σκούρας Ζαχαρίας
Καθηγητής
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος
Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Λένε ότι:

"αν ασχολείσαι με το αντικείμενο που σου αρέσει και αγαπάς,

τότε είσαι ο πιο ευτυχισμένος άνθρωπος"

Κι εγώ όλο αυτό "το διάστημα της έρευνας" ήμουν *ευτυχισμένη*!

Φυσικά σε αυτό συνέβαλλε κατά κύριο λόγο ο επιβλέποντας Επίκουρος Καθηγητής Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος. Τον ευχαριστώ που με "σύστησε" στον κόσμο της έρευνας που με παρότρυνε να την αγαπήσω και που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτήν. Τον ευχαριστώ που όλο αυτό το διάστημα ήταν πάντα εκεί! Ελπίζω να απόλαυσε το "ταξίδι" όσο κι εγώ!

Ένα ευχαριστώ επίσης στους Καθηγητές Κουρέτα Δημήτριο, Μαμούρη Ζήση και στον Επίκουρο Καθηγητή Σταθόπουλο Κωνσταντίνο για τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αλλά και όλης της πορείας μου στο χώρο της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Ευχαριστώ ακόμη τους Καθηγητές Σκούρα Ζαχαρία και Σαββάκη Χαράλαμπο καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κομητοπούλου Αικατερίνη για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή και για την κριτική αποτίμηση της διατριβής.

Je voudrais aussi remercier Professeur Dr. Jean Massoulié, qui m' a donné l' occasion de travailler dans le laboratoire de Neurobiologie de l' Ecole Normale Supérieure à Paris. Je me sens très heureuse d' avoir eu le privilège et l' honneur d' avoir accès aux conseils et aux instructions d' un des chercheurs les plus importants dans le domaine de les cholinesterases. Je voudrais aussi particulièrement remercier Dr. Suzanne Bon, qui n' a pas cessé de me donner des conseils (et me les donne toujours) aussi bien dans le laboratoire que sur des sujets personnels. Ensuite, je ne pourrais pas oublier de remercier Dr. Nouredinne Hiba et Lian Dong de leur amitié et leur collaboration exceptionnelle.

"C'*est le temps que tu* as perdu *pour ta rose*
qui fait ta rose si importante"

Πολλές ευχαριστίες οφείλω και στους συναδέλφους Τσουμάνη Κωνσταντίνα και Ζυγουρίδη Νίκο καθώς και στον Αυγουστίνο Αντώνη για την κάθε φύσης βοήθεια και στήριξη τους. Για να ευδοκιμήσει μία προσπάθεια θα πρέπει να υπάρχει και το κατάλληλο περιβάλλον και αυτοί το δημιουργούσαν. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη ΦΙΛΗ Κωνσταντίνα Τσουμάνη. Ελπίζω να μη ξεχάσει τα εργαστηριακά μας καλοκαιρινά βράδια με *North* και *επιστήμη*!

Η προσπάθεια όμως αυτή δε θα μπορούσε να είναι μοναχική. Ευχαριστώ όλους εκείνους που αποτέλεσαν το άλας της ζωής μου και έκαναν την καθημερινότητα πιο ευχάριστη, είτε από μακριά είτε από κοντά. Ευχαριστώ την Ειρήνη, τη Δόμνα, τη Ντέμη που αφιέρωναν ατελείωτες τηλεφωνικές ώρες στήριξης και ενθάρρυνσης. Ευχαριστώ τη Ζαχαρούλα, την Κωνσταντίνα, τη Ματίνα για τα βράδια χαλάρωσης με επιτραπέζιο και κουβεντούλα. Στις δικές μου στιγμές αδυναμίας, αυτοί ήταν εκεί!

Η πραγματοποίηση της διατριβής όμως σίγουρα θα ήταν αδύνατη χωρίς την ουσιαστική, ηθική και υλική, βοήθεια της οικογενείας μου. Η στήριξη τους σε όλα τα επίπεδα έκανε πάντα πιο εύκολο το ξεπέρασμα των δυσκολιών. Γι αυτούς δεν υπάρχουν αρκετά λόγια ευχαριστιών, ελπίζω η χαρά από το τελευταίο αυτό βήμα των σπουδών μου να αντισταθμίσει τις δικές τους προσπάθειες και θυσίες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Στην οικογένεια μου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ... 3

1.1. Η Ελιά στο παρελθόν ... 3

1.2. Η Ελιά σήμερα ... 4

2. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ... 6

2.1. Προέλευση ... 6

2.2 Μορφολογία ... 6

2.3 Βιολογικός κύκλος ... 7

3. ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΖΗΜΙΑ ... 8

4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ... 9

4.1 Χημικές μέθοδοι ... 9

4.2 Μη χημικές μέθοδοι ... 10

5. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ... 12

5.1 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας ... 12

5.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας ... 13

6. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΟΙ (ΟΡ) ΕΣΤΕΡΕΣ ... 17

6.1 Ιστορική αναδρομή ... 17

6.2 Δομή ΟΡ εστέρων ... 17

6.3 Μηχανισμός αναστολής AChE ... 18

6.4 Μεταβολική αποδόμηση ΟΡ εστέρων ... 18

7. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ ... 19

7.1 Η ανακάλυψη του ενζύμου ... 19

7.2 *In vivo* σύνθεση ... 19

7.3 Ενζυμικές μορφές ... 20

7.4 Στερεοχημική δομή ... 20

7.5 Καταλυτική δράση ... 21

8. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ... 22

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

9. ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΤΟΠΟΥ *ACE* ΤΗΣ *Drosophila melanogaster* 24

10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΟΡ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ 25

11. ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ 26

ΣΚΟΠΟΣ 28

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΜΕΘΟΔΟΙ 31

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ 31

1.1 Εκτροφή εντόμου 31

1.1.1 Καλλιέργεια του εντόμου Bactrocera oleae 31

1.1.2 Ενήλικα άτομα 31

1.1.3 Συλλογή αυγών 32

1.1.4 Προνυμφικό στάδιο 32

1.1.5 Νυμφικό στάδιο 32

1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων 32

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 32

2.1 Απομόνωση DNA 29

2.1.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα Bactrocera oleae (Fly preps) 33

2.1.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα Bactrocera oleae *με χρήση του Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega)* 33

2.2 Απομόνωση RNA 34

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα άτομα Bactrocera oleae *με χρήση του Absolutely RNA® Miniprep kit (Stratagene)* 34

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 35

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση 35

2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση του Invisorb® Spin Plasmid Mini Two kit (Invitek) 36

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

3. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 37
3.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο 37
3.2 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη 37
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊνικών οξέων 38
3.3.1 Με χρήση φασματοφωτόμετρου 38
3.3.2 Μέσω ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 38
3.4 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες 38
3.5 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση του Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega) 39
4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ 40
4.1 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων 40
4.2 Προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα για κλωνοποίηση 41
4.2.1 Συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα 41
4.2.2 Φορέας T- άκρων 41
4.3 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA 42
4.4 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων 43
4.4.1α Παρασκευή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο 43
4.4.1β Μετασχηματισμός με χημική μέθοδο 44
4.4.2α Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση 44
4.4.2β Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση 45
5. ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ 45
5.1 Βακτηριοφάγος λ-DASH®II (Stratagene) 46
5.2 Ανάπτυξη βακτηριοφάγου λ, απομόνωση και εξαγωγή DNA 47
5.2.1 Προετοιμασία/ανάπτυξη βακτηρίων ξενιστών του βακτηριοφάγου λ (plating cells) 47
5.2.2 Επίστρωση βακτηριοφάγων λ σε τρυβλίο 47
5.2.3 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ 48
5.2.4 Απομόνωση βακτηριοφάγου λ – εξαγωγή DNA 48
5.2.4α Παρασκευή εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ 48
5.2.4β Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ 49
5.2.4γ Εξαγωγή DNA βακτηριοφάγου λ 49
5.3 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης 49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

5.4 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο 50
5.5 Δημιουργία κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης..... 50
6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) 51
6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για γονιδιακή ενίσχυση (DNA) 51
6.2 5΄ RACE PCR (Rapid amplification of cDNA ends) 53
6.2.1 Σύνθεση μονόκλωνου cDNA με χρήση του AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) 53
6.2.2 Προσθήκη dATP στο 3΄ άκρο του cDNA 54
6.3 PCR ΜΕΓΑΛΟΥ ΜΗΚΟΥΣ (Long PCR) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ Long PCR Enzyme Mix (Fermentas) 54
6.4 ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ PCR (Inverse PCR) 55
7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ 56
7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης..... 56
7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου..... 57
7.2.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 57
7.2.2 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο..... 58
7.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 58
7.3.1 Παρασκευή οριζόντιου πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 58
7.3.2 Χρώση ακετυλοχολινεστεράσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τη μέθοδο Karnovsky..... 59

8. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ..... 60
8.1 Σήμανση ανιχνευτών 60
8.1.1 Σήμανση του ανιχνευτή με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών με τη χρήση HexaLabelTM DNA Labelling kit (Fermentas) 60
8.1.2 In vitro μεταγραφή – σήμανση RNA ανιχνευτών..... 61
8.2 Southern υβριδοποίηση – Διαλογή βιβλιοθήκης..... 61
8.2.1 Μεταφορά σε νάυλον μεμβράνη 61
8.2.2 Μεταφορά των πλακών των βακτηριοφάγων λ σε νάυλον μεμβράνη..... 63

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

8.3 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνες 63
8.4 Ανίχνευση σήματος 64
9. In vitro ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ 65
9.1 Μεταλλαξιγένεση με χρήση PCR 65
9.2 Μεταλλαξιγένεση με τη μέθοδο Kunkel 66
9.2.1 Δημιουργία μονόκλωνου DNA 66
9.2.2 Φωσφορυλίωση του εκκινητή που φέρει τη μετάλλαξη 67
9.2.3 Μεταλλαξιγένεση 68
10. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 68
10.1 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων 68
10.1.1 Διαμόλυνση με DEAE-δεξτράνη 69
10.1.2 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καλλιέργεια κυττάρων 69
10.2 Κατεργασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με PIPLC 70
10.3 Κλασματοποίηση μορφών ακετυλοχολινεστεράσης σε βαθμίδωση πυκνότητας σουκρόζης 70
10.4 Προσδιορισμός δραστικότητας ακετυλοχολινεστεράσης με τη χρωμομετρική μέθοδο Ellman 70
10.5 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών- Μέθοδος Bradford 71
11. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *in silico* 71
11.1 Ανάκτηση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων GenBank 71
11.2 Σύγκριση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών 72
11.3 Στοίχιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και κατασκευή εξελικτικών δέντρων 72
11.4 Επεξεργασία αλληλουχιών DNA με το πρόγραμμα Omiga 2.0 72
11.5 Επεξεργασία πρωτεϊνικών αλληλουχιών 72
11.6 Στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS 72
11.7 Πληθυσμιακή ανάλυση με το πρόγραμμα PopGene 73

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΥΛΙΚΑ

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ 75

1.1 Εκτροφή εντόμου 75

1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων 75

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 76

2.1 Απομόνωση DNA 76

2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 76

4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ 76

4.4 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων 76

5. ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ 76

6. PCR 76

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ 77

8. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ 77

9. *In vitro* ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ 77

10. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 77

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ 81

1.1 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης 81

1.1.1 Απευθείας διαλογή 81

1.1.2 Διαλογή προεπιλεγμένων μέσω PCR κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης 82

1.2 Απομόνωση αμινοτελικού τμήματος γονιδίου με εφαρμογή 5΄ RACE-PCR και διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης 83

1.3 Δομική ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων 84

1.4 Ενίσχυση γονιδιωματικών τμημάτων της ακετυλοχολινεστεράσης μέσω PCR μεγάλου μήκους (Long PCR) και ανάστροφης PCR (Inverse PCR) 86

2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ 87

3. *IN SILICO* ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ 93

4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Δ3Q 99

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

4.1 Γενετική συσχέτιση της Δ3Q με την ανθεκτικότητα 101
4.2 Ατομικές διασταυρώσεις 104
4.3 Ανάλυση της εξάπλωσης της μετάλλαξης Δ3Q στη λεκάνη της Μεσογείου 105
4.4 Βιοχημική συσχέτιση της Δ3Q με την ανθεκτικότητα 106
5. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 106
5.1 GPI - άγκυρα 107
5.2 *In vivo* μελέτη της παρουσίας ή μη GPI άγκυρας 108
5.2.1 Ανάλυση ύπαρξης GPI άγκυρας με ηλεκτροφόρηση 108
5.2.2 Ανάλυση ύπαρξης GPI άγκυρας με καθίζηση 110
5.3 Έκφραση και ανάλυση της πρωτεΐνης που φέρει τη μετάλλαξη Δ3Q 111
5.3.1 Ανάλυση ύπαρξης GPI άγκυρας στην εκφραζόμενη πρωτεΐνη με ηλεκτροφόρηση 112
5.3.2 Κινητική των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων 113

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΤΗΣ AChE ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ 119
2. ΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ ΤΗΣ AChE 121
3. Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Δ3Q 123
4. Η ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ Δ3Q 124
5. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Δ3Q 124
ΕΠΙΛΟΓΟΣ 129

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το έντομο *Bactrocerae oleae*, ο κοινός δάκος της ελιάς, αποτελεί το πιο επιβλαβές έντομο της ελαιοκαλλιέργειας, δεδομένου ότι προκαλεί τεράστιες καταστροφές στην ελαιοπαραγωγή. Ο έλεγχος της προσβολής του δάκου περιλαμβάνει την εφαρμογή χημικών εντομοκτόνων και κυρίως οργανοφωσφορικών (OP). Η αλόγιστη, όμως, χρήση των εντομοκτόνων, πέρα από τις καταστροφικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, έχει οδηγήσει στη δημιουργία και εξάπλωση της ανθεκτικότητας του δάκου σε αυτά. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν αφενός η κατανόηση του μεγέθους της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου και αφετέρου η κατανόηση της γενετικής της βάσης.

Βασικός γενετικός τόπος που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα των εντόμων στα OP εντομοκτόνα είναι το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης. Στο πρώτο σκέλος της διατριβής, μελετήθηκε η μοριακή οργάνωση του γονιδιακού της τόπου στο δάκο. Μέσω αλλεπάλληλων διαλογών γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου και αντιδράσεων PCR προσδιορίστηκε η οργάνωση των εξονίων και ιντρονίων της AChE, η οποία παρουσίασε παρόμοια δομή με το αντίστοιχο γονίδιο της *D. melanogaster*. Το γονίδιο εκτείνεται σε περιοχή τουλάχιστον 75 kb και οργανώνεται σε δέκα εξόνια. Επιπλέον, η *in silico* ανάλυση του ενζύμου αποκάλυψε ότι διατηρεί όλα τα κύρια χαρακτηριστικά της AChE των εντόμων, καταδεικνύοντας την υψηλή συντήρησή του.

Η ανθεκτικότητα του δάκου στα OP είχε ήδη συσχετιστεί με την ύπαρξη δύο σημειακών μεταλλάξεων που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο της AChE και προκαλούν 16 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από εκείνη του εργαστηριακού πληθυσμού. Η κατανόηση του μεγέθους της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας βασίστηκε στην ανάλυση φυσικών πληθυσμών δάκου ως προς την ύπαρξη των δύο αυτών μεταλλάξεων. Οι δύο μεταλλάξεις βρέθηκαν σε ομοζυγωτία στο συντριπτικό ποσοστό των ατόμων που εξετάστηκαν, αλλά όχι ως συνάρτηση του επιπέδου της ανθεκτικότητάς τους. Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν νέες μεταλλάξεις που πιθανώς να συνεισέφεραν στα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας, πραγματοποιήθηκε PCR ενίσχυση των εξονίων της AChE και καθορίστηκε η DNA αλληλουχία τους σε άτομα υψηλής ανθεκτικότητας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε μια μικρή έλλειψη τριών γλουταμινών στο εξόνιο X του ενζύμου (BoaceΔ642-644 ή Δ3Q). Δημιουργήθηκαν τρία διαφορετικά μοριακά διαγνωστικά τεστ για την ανίχνευση της μετάλλαξης αυτής και η ανάλυση φυσικών πληθυσμών του δάκου από την Ελλάδα και την Κύπρο κατέδειξε τη συσχέτισή με υψηλές δόσεις OP εντομοκτόνων. Μάλιστα, η εξάπλωσή της στο Μεσογειακό χώρο σχετίζεται με τη χρήση OP εντομοκτόνων. Επιπλέον, βιοχημικές αναλύσεις σε ξεχωριστά άτομα έδειξαν ότι η αναστολή του Δ3Q ενζύμου από εντομοκτόνο είναι πολύ μικρότερη από ότι στο ένζυμο αγρίου τύπου.

Είναι η πρώτη περιγραφή μετάλλαξης εκτός ενεργού κέντρου της AChE που σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Η πιθανότητα να εμπλέκεται η μετάλλαξη αυτή στο αγκυροβόλημα της πρωτεΐνης στη μεμβράνη του νευρικού κυττάρου μέσω GPI άγκυρας ελέγχθηκε με έκφραση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (wt), της μεταλλαγμένης (Δ3Q) και μίας υποθετικής πρωτεΐνης που περιέχει έλλειψη πέντε διαδοχικών γλουταμινών (Δ5Q) σε ευκαρυωτικό σύστημα κυττάρων. Ο προσδιορισμός των βιοχημικών παραμέτρων των αγρίου τύπου, Δ3Q και Δ5Q κατασκευών καθώς και η ανάλυσή τους ως προς την ικανότητα προσθήκης GPI άγκυρας κατέδειξε ότι η μετάλλαξη Δ3Q επηρεάζει τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ενζύμου (GPI αγκυροβόληση, σταθερότητα/ αποικοδόμηση πρωτεΐνης). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν έναν εντελώς νέο μηχανισμό ανθεκτικότητας ως προς τα OP εντομοκτόνα, κατά τον οποίο η βελτιωμένη προσθήκη GPI άγκυρας στο μεταλλαγμένο ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση περισσοτέρων ενεργών μορίων ενζύμου στη συναπτική σχισμή και ως εκ τούτου τη μειωμένη ευαισθησία στο εντομοκτόνο. Τέλος, αλλεπάλληλες αποτυχημένες προσπάθειες δημιουργίας ομοζυγωτικών ως προς τη μετάλλαξη εργαστηριακών στελεχών, καθώς και η μειωμένη ικανότητα ολοκλήρωσης των αναπτυξιακών σταδίων απογόνων διασταυρώσεων ετεροζυγωτικών ατόμων συνάδει με την ιδέα μιας μετάλλαξης με υψηλό γενετικό κόστος (fitness cost).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is among the most important agricultural pests, causing severe economic damage in olive cultivation. The control of the fly is based mainly on the use of organophosphate (OP) insecticides. Apart from the damaging effects that insecticides may have in the environment, their intensive and non-prudent use has also resulted in the development and spread of insecticide resistance in natural insect populations. The aim of the present dissertation was, firstly, the study of OP resistance spread of *B. oleae* populations and, secondly, the comprehension of the molecular genetic basis of resistance.

The primary genetic locus that is involved in OP resistance is the acetylcholinesterase (*Ace*) gene. In the first part of the thesis, the organization of the *Ace* locus of *B. oleae* is studied. A series of genomic library screening and PCR reactions determined the intron-exon organization of the *B. oleae Ace* locus, which was proved to be very similar to that of *Drosophila melanogaster*. The *B. oleae* acetylcholinesterase gene is comprised of ten exons, stretched in an area of over 75 kb of DNA. Furthermore, *in silico* analysis of the enzyme demonstrated that it maintains the post-modifications of AChE of insects, indicating the high degree of conservation of this genetic locus.

OP-resistance in the olive fly was previously shown to be associated with two mutations in the catalytic site of the *Ace* gene. These mutations conferred a 16-fold resistance in natural olive fly populations as compared to laboratory reared ones. The frequency of these mutations was monitored in *Bactrocera oleae* individuals of increasing resistance. Despite the difference in resistance among the individuals, there was no significant frequency variation and no correlation between mutation frequencies and resistance level. Consequently, there must be other contributing factors, such as other mutations, to the variation of resistance. The presence of additional mutations in the *Ace* gene was investigated in highly resistant insects. Most of mutations that were isolated yielded nothing but silent nucleotide substitutions. However, a short deletion of three glutamines in the carboxyl-terminal domain of the protein (termed BoaceΔ642-644 or Δ3Q) demonstrated particular curiosity. Three diagnostic tests were developed for monitoring the mutation. The analysis of wild olive fly populations showed a significant correlation between mutation frequency, resistance level and OP use. Moreover, biochemical assays on individual flies showed that the remaining activity of Δ3Q enzyme was higher than the wild type enzyme.

This is the first description of a mutation localized outside the catalytic gorge of AChE with possible involvement in insecticide resistance. It is speculated to affect the GPI-anchoring efficiency or the stability of the protein. In order to investigate the putative role of Δ3Q, the wild type and the mutant enzymes were expressed in COS cells, together with a mutant in which all five consecutive glutamines were experimentally deleted (Δ5Q). The study and biochemical characterization of the three constructs (wt, Δ3Q, Δ5Q), as well as their ability to GPI anchor addition, indicated that the Δ3Q mutation affects the post-translational modifications of AChE (GPI anchoring, stability/degradation). This suggests an entirely new mechanism of insecticide resistance to OPs, in which a more efficient GPI modification of the enzyme may result in more anchored molecules in the synaptic cleft than the wild-type fly and, therefore, a reduced sensitivity to the insecticide. Finally, the absence of homozygote ($\Delta3Q^{-/-}$) individuals in genetic crosses of heterozygotes ($\Delta3Q^{-/+}$) advocates for a high fitness cost of the Δ3Q mutation.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

1.1 Η Ελιά στο παρελθόν

Η φυσιογνωμία των λαών και των κοινωνιών πλάθεται, εκτός των άλλων, και μέσα από το διάλογό τους με το φυσικό χώρο που τους περιβάλλει. Τόσο για τους Έλληνες όσο και για τους υπόλοιπους Μεσογειακούς λαούς, αν υπάρχει ένα χαρακτηριστικό της οικείας σ' αυτούς φύσης, ένα καρποφόρο δέντρο που να επέδρασε και να επιδρά όχι μόνο στην κοινωνική και οικονομική τους πραγματικότητα αλλά και στο πεδίο της λατρευτικής πρακτικής, των δοξασιών και των εθίμων, την πρώτη θέση κατέχει αναμφισβήτητα η ελιά (Εικόνα 1-1). Πού, όμως, συναντάται η ελιά στο χθες ή στο σήμερα; Στους ελαιώνες της Μεσογείου και τα παραδοσιακά ελαιοτριβεία ή στους αρχαίους συναρπαστικούς μύθους που διηγούνται γενναία κατορθώματα; Η μελέτη της ιστορίας της ελιάς αναμφίβολα αποτελεί ένα μαγευτικό ταξίδι γνώσης στο χώρο, το χρόνο και τις αισθήσεις.

Εικόνα 1-1: "Αν αποσυνδέσεις την Ελλάδα, θα βρεις ότι αποτελείται από μια ελιά, ένα αμπέλι και ένα καράβι, που σημαίνει, ότι με αυτά τα τρία μπορείς να την ξαναφτιάξεις" (Οδυσσέας Ελύτης).

Η ιστορία της ελιάς ανάγεται σε χρόνια προ της οργανωμένης ζωής του ανθρώπου στη γη. Η καταγωγή του δέντρου, σύμφωνα με τη μελέτη του De Candolle "Origin of Cultivated Plants" (1882), εντοπίζεται στη Μικρά Ασία και χρονικά χάνεται στο βάθος των χιλιετηρίδων (4000 π.Χ.). Τα όρια του γεωγραφικού εντοπισμού του, ωστόσο, δεν περιορίζονται στην περιοχή. Η πολιτιστική και οικονομική σημασία της ελιάς αποτέλεσαν στοιχεία ώθησης της μεταφοράς της από τη Συρία και την Παλαιστίνη στην Ανατολική Μεσόγειο και την Ελλάδα.

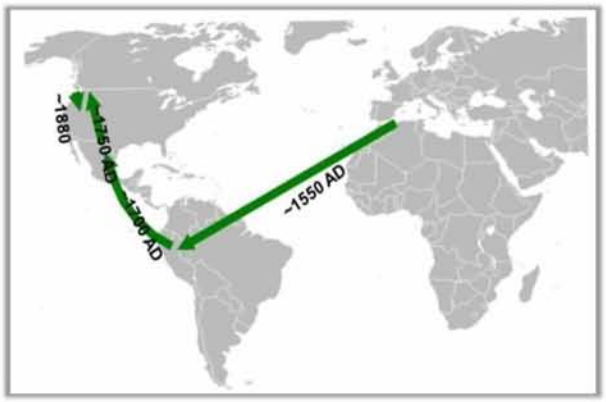
Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια της ελιάς αναπτύχθηκε περίπου το 3000 π.Χ., λαμβάνοντας υψηλή θέση στην εμπορικοοικονομική ανάπτυξη των τοπικών κοινωνιών και σίγουρα στον πολιτισμό, την υγεία και την απλή καθημερινότητα. Το δέντρο της ελιάς, όπως αναφέρει ο μύθος, ήταν το ιερό δέντρο της θεάς Αθηνάς και το δώρο της στους κατοίκους της πόλης της Αθήνας, οι οποίοι σε ένδειξη ευγνωμοσύνης έδωσαν το όνομά της στην πόλη τους (Εικόνα 1-2). Στην αρχαία Ελλάδα, ένα κλωνάρι ελιάς ήταν το έπαθλο για τους νικητές των ολυμπιακών αγώνων, συμβολίζοντας την ειρήνη, τη σοφία, την ταπεινότητα και την ευγενή άμιλλα.

Εικόνα 1-2: Μυστική τελετουργία μπροστά στην ελιά που φύτεψε στο βράχο της Ακρόπολης η θεά Αθηνά. Στο κέντρο εικονίζεται η θεά, αριστερά εικονίζεται ο Κέρκοπας, ο οποίος κρατάει ένα μικρό αρνί για τη θυσία και δεξιά μια γυναίκα, η Ζευξίππη, η οποία κρατάει τα όπλα της θεάς.

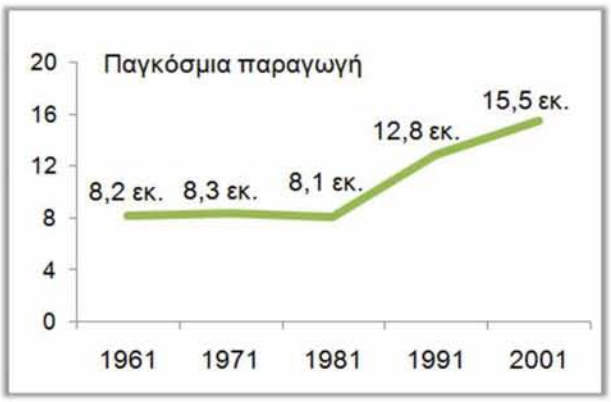
Κατά την περίοδο της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, οι εμπορικοί δρόμοι και οι επαφές μεταξύ των λαών δημιούργησαν τις απαραίτητες προϋποθέσεις για τη διάδοση της ελιάς στην υπόλοιπη Μεσόγειο (νότιες ακτές Γαλλίας, ανατολικές ακτές Ισπανίας, Πορτογαλία, Βόρεια Αφρική). Μεταγενέστερα, το 16ο αιώνα μ.Χ., οι Ευρωπαίοι (Ισπανοί και Πορτογάλοι) μετέφεραν την ελιά στις χώρες του Νέου Κόσμου, όπου αναπτύχθηκε συστηματικά. Η καλλιέργειά της από το Περού και τη Χιλή σύντομα πέρασε στο Μεξικό ώστε να φτάσει μέχρι τα τέλη του 18ο αιώνα και στην Καλιφόρνια (Εικόνα 1-3).

Σήμερα, η διεθνής πλέον και επιστημονικά τεκμηριωμένη αναγνώριση της συνεισφοράς του ελαιολάδου στην υγιεινή διατροφή αλλά και η υψηλή διατροφική του αξία καθιστούν ιδιαιτέρως ευοίωνο το παρόν και το μέλλον της ελαιοκαλλιέργειας. Η διάδοση της ελιάς εκτός των Μεσογειακών συνόρων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 1-3: Η διάδοση της ελιάς στην Καλιφόρνια.



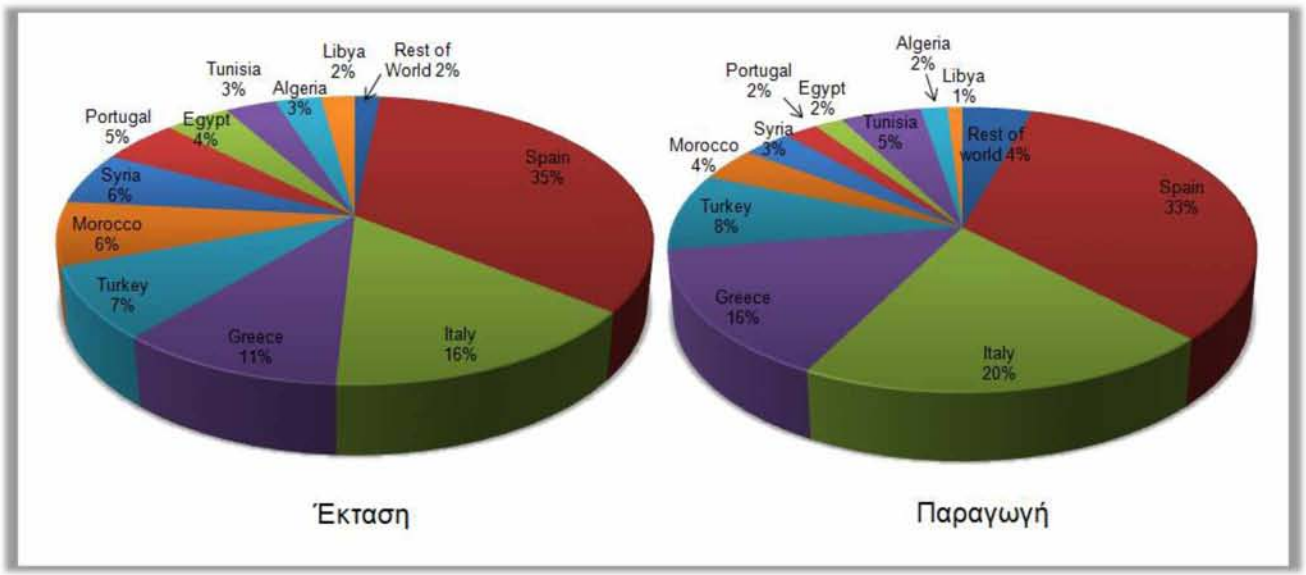
Εικόνα 1-5: Παγκόσμια παραγωγή ελαιόκαρπου (σε τόνους) από το 1961 έως σήμερα.

συνεχίζεται έως τη σύγχρονη εποχή, έτσι ώστε να ευδοκιμούν καλλιέργειές της σε περιοχές τόσο μακρινές από την προέλευσή της όπως η νότια Αφρική, η Αυστραλία και η Ιαπωνία (Alarcón de la Lastra et al., 2001).

1.2 Η Ελιά σήμερα

Σήμερα, στη σκιά των μεγάλων παραδόσεων και των μύθων, ένα μέρος της οικονομίας της Ελλάδας και της Μεσογείου συνεχίζει να στηρίζεται στην ελιά. Η παγκόσμια ελαιοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε έκταση 80 εκ. στρεμμάτων, δύο τρίτα από τα οποία αναπτύσσονται ως μονοκαλλιέργεια. Η Μεσογειακή λεκάνη, η οποία διαθέτει άριστες εδαφοκλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς, καλύπτει το 98% της καλλιεργήσιμης έκτασης από το οποίο 65% συναντάται στις ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου. Η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα αποτελούν τις κύριες ελαιοπαραγωγικές χώρες, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 70% της παγκόσμιας παραγωγής (Εικόνα 1-4) (FAO, 2007).

Η παραγωγή ελαιών και ελαιολάδου έχει διπλασιαστεί τα τελευταία 50 χρόνια (Kiritsakis & Min, 1989) (Εικόνα 1-5). Η παγκόσμια παραγωγή ελαιοκάρπου υπολογίζεται περίπου 17 εκ. τόνοι από τους οποίους 90% χρησιμοποιούνται για την παραγωγή



Εικόνα 1-4 : Ποσοστό (%) καλλιεργούμενης έκτασης και παραγωγής ελαιόκαρπου στη λεκάνη της Μεσογείου σε σχέση με τη συνολική παγκόσμια έκταση και παραγωγή, αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ελαιολάδου ενώ το υπόλοιπο 10% για επιτραπέζιες βρώσιμες ελιές. Η Ευρωπαϊκή Ένωση θεωρείται ως η μεγαλύτερη εξαγωγική περιοχή ελαιολάδου στον κόσμο καθώς συνεισφέρει σε ποσοστό ίσο περίπου με το 80% της παγκόσμιας παραγωγής (FAO, 2007).

Σήμερα, στην Ελλάδα καλλιεργούνται 150 εκ. περίπου ελαιόδεντρα σε όλα σχεδόν τα διαμερίσματά της ή, με μια άλλη θεώρηση, σε κάθε Έλληνα πολίτη αντιστοιχούν 15 ελαιόδεντρα (ΕΣΥΕ, 2005). Η Κρήτη, η Πελοπόννησος και η Μυτιλήνη είναι οι περιοχές όπου η ελιά αποτελεί την κύρια καλλιέργεια. Η Ελλάδα είναι η τρίτη μεγαλύτερη παραγωγός εδώδιμων ελαιών και ελαιόλαδου παγκοσμίως με ετήσια παραγωγή 2.4 εκ. τόνων (ΕΣΥΕ, 2007) και κατέχοντας το 16% της διεθνούς αγοράς ελαιολάδου. Όσον αφορά στην κατά κεφαλή κατανάλωση ελαίων και ελαιολάδου, όμως, κατέχει την πρώτη θέση, με μέσο όρο κατανάλωσης 12 και 15 κιλά ανά κεφαλή το χρόνο, αντίστοιχα (FAO, 2003). Το ελαιόλαδο αποτελεί εθνικό προϊόν μεγάλης οικονομικής και κοινωνικής σπουδαιότητας, αντιπροσωπεύοντας το 12.5% της ακαθάριστης φυτικής παραγωγής της χώρας και το 46.5% του ακαθάριστου γεωργικού εισοδήματος. Περίπου 450,000 αγροτικές οικογένειες ασχολούνται με την παραγωγή ελαιολάδου ως αρχική ή δευτερεύουσα πηγή εισοδήματος (88,117 ετήσιες μονάδες εργασίας οικογενειακού εργατικού δυναμικού, ΕΣΥΕ 2005).

Η ελαιοκαλλιέργεια διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών όπου έχει αναπτυχθεί, γιατί δεν αξιοποιεί μόνο εκτάσεις που είναι ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες, αλλά συμβάλλει και στην αποτροπή της διάβρωσης περιοχών με οξυμένο το φαινόμενο της ερημοποίησης. Παράλληλα, αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα ανάπτυξης περιοχών με σοβαρά προβλήματα απασχόλησης και συνοχής καθώς είναι ένα από τα λίγα είδη των δενδρωδών καλλιεργειών που αναπτύσσεται τόσο σε πεδινές όσο και σε ορεινές περιοχές (Εικόνα 1-6). Οι ελαιώνες που βρίσκονται γύρω από τη Μεσόγειο θεωρούνται το μεγαλύτερο δάσος της περιοχής, ενώ ακόμα ένας μεγάλος αριθμός ελαιώνων ανήκει σε μικροκαλλιεργητές, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο εποχική εργασία και ικανοποιητικό εισόδημα.

ΕΙΔΟΣ	ΟΜΑΔΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ	2004			
		Κανονικοί δενδρώνες		Συνολικός αριθμός δέντρων	Παραγωγή
		Εκτάσεις	Αριθμός δένδρων		
ΕΛΙΕΣ					
Βρώσιμες	ΣΥΝΟΛΟ	7,941,599	136,694,137	155,983,589	259,185
Για ελαιοποίηση					1,944,834
Βρώσιμες	ΠΕΔΙΝΕΣ	3,126,170	55,339,815	62,318,757	123,62
Για ελαιοποίηση					957,268
Βρώσιμες	ΗΜΙΟΡΕΙΝΕΣ	2,901,762	50,424,884	57,622,129	105,97
Για ελαιοποίηση					652,176
Βρώσιμες	ΟΡΕΙΝΕΣ	1,913,667	30,929,438	36,042,703	29,595
Για ελαιοποίηση					335,39

ΕΙΔΟΣ	ΟΜΑΔΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ	2005			
		Κανονικοί δενδρώνες		Συνολικός αριθμός δέντρων	Παραγωγή
		Εκτάσεις	Αριθμός δένδρων		
ΕΛΙΕΣ					
Βρώσιμες	ΣΥΝΟΛΟ	7,970,293	137,092,899	155,960,870	320,995
Για ελαιοποίηση					2,339,731
Βρώσιμες	ΠΕΔΙΝΕΣ	3,124,906	55,338,693	62,293,513	156,694
Για ελαιοποίηση					1,102,607
Βρώσιμες	ΗΜΙΟΡΕΙΝΕΣ	2,915,890	50,741,764	57,551,241	118,449
Για ελαιοποίηση					794,056
Βρώσιμες	ΟΡΕΙΝΕΣ	1,929,497	31,012,442	36,116,116	45,852
Για ελαιοποίηση					443,086

Εικόνα 1-6: Η ελαιοκαλλιέργεια κατά ομάδες πεδινών, ημιορεινών, και ορεινών κοινοτήτων στην Ελλάδα. Έτη 2004, 2005. Η έκταση αντιστοιχεί σε στρέμματα και η παραγωγή σε τόνους (Πηγή ΕΣΥΕ).

Η ευρωστία και η παραγωγικότητα του ελαιόδεντρου, όμως, μπορούν να διαταραχθούν από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών που προσβάλλουν το φυτό ή από τη δράση παρασίτων και εντόμων. Οι ασθένειες έχουν προέλευση κυρίως μυκητολογική, ενώ η μόνη βακτηριακή πάθηση είναι ο καρκίνος της ελιάς. Η φυτοφάγος πανίδα (εντομοπανίδα) που συναντάται στους ελαιώνες είναι εξαιρετικά πλούσια, αφού η καλλιέργεια είναι πολύ παλαιά, προσαρμοσμένη στα μεσογειακά οικοσυστήματα και δεν υφίσταται έντονες καλλιεργητικές επεμβάσεις. Ο Arambourg (1975) αναφέρει 52 φυτοφάγα είδη σε τέσσερις ελαιοκομικές ζώνες στη λεκάνη της Μεσογείου, 37 από τα οποία συναντώνται στην Ελλάδα και η παρουσία τους μπορεί να αποτελέσει δυναμικό ή οικονομικό κίνδυνο. Οι κυριότεροι εχθροί κατά σειρά σπουδαιότητας είναι ο δάκος (*Bactrocera oleae)*, ο οποίος προσβάλλει τους καρπούς, ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*), ο οποίος προκαλεί ζημίες στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*), ο οποίος προσβάλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση καρπών και πτώση τους, και η μαργαρόνια (*Palpita unionalis*), η οποία προσβάλει τα φύλλα (Τζανακάκης, 1995).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

2. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

2.1 Προέλευση

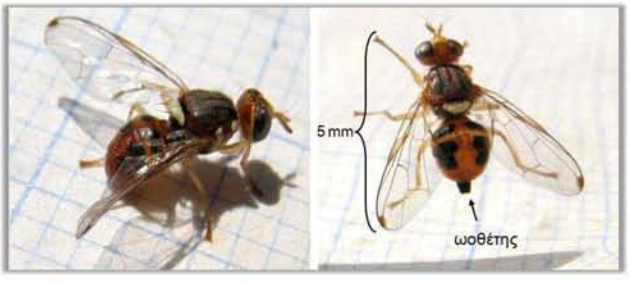
Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Drew, 1989; Raspi & Viggiani, 2008) [στο παρελθόν *Dacus oleae* (Gmelin)], αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και ιδιαίτερα καταστρεπτικά γεωργικά, έντομα, προκαλώντας την πιο διαδεδομένη οικονομική ζημία στις καλλιέργειες της ελιάς. Οι απώλειες που προκαλεί το έντομο ανέρχονται σε περίπου 15% της συγκομιδής ελαιών, ιδιαίτερα στις Μεσογειακές χώρες (Montiel-Bueno & Jones, 2002).

Ο δάκος είναι έντομο της παλαιοτροπικής περιοχής. Η εξάπλωσή του ανά τον κόσμο συμπίπτει εξελικτικά με αυτή του ξενιστή του, καθώς αποτελεί έντομο μονοφάγο. Δηλαδή, η προνύμφη αναπτύσσεται αποκλειστικά στους καρπούς των ευγενών ποικιλιών της ευρωπαϊκής ελιάς (*Olea europea*) καθώς και της άγριας *Olea silvestris*. Η πρώτη καταγραφή του δάκου αναφέρεται τον 3^{ο} αιώνα π.Χ. στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου όπου συναντάται και σήμερα. Ο βοτανολόγος Θεόφραστος (371-216 π.Χ.) κάνει λόγο στο βιβλίο του «Περί φυτών αιτιών» (5,10.1), το πρώτο βιβλίο γεωργικής εντομολογίας, για την ύπαρξη προνυμφών στο καρπό της ελιάς (του πυρηνοτρήτη και πιθανώς του δάκου) “τά δέ ἐλάας, ἐάν μέν ὑπό τό δέρμα γένωνται ὠφελούσι”, θεωρώντας όμως αυτές ωφέλιμες. Ακόμη, ο Π. Γεννάδιος στο δημοσίευμα του “Ασθένεια της ελαίας” στο περιοδικό που εξέδιδε «Ελληνική Γεωργία» (1896) είναι ο πρώτος που αναφέρει πολύτιμες για την εποχή εκείνη πληροφορίες για το δάκο. Οι πληθυσμοί του δάκου εντοπίζονται τόσο σε περιοχές με εκτεταμένη καλλιέργεια ήμερων ελαιόδεντρων, όσο και σε περιοχές με γηγενείς άγριες ποικιλίες. Η παρουσία του εντόμου είναι εντονότατη στη λεκάνη της Μεσογείου, τη Βόρειο Αφρική, τα Κανάρια Νησιά και τη Μέση Ανατολή, ενώ πρόσφατα εντοπίστηκε (1998) και στη πολιτεία της Καλιφόρνια των Η.Π.Α. (Rice, 2000). Είναι μάλιστα αποδεκτό μεταξύ των ερευνητών πως το έντομο μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε περιοχή του κόσμου φύονται ελιές, άγριες ή ήμερες.

2.2 Μορφολογία

Ο δάκος της ελιάς ανήκει στην οικογένεια Tephritidae της τάξης των Διπτέρων, μέλη της οποίας είναι επίσης η μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*), η μύγα των κερασιών (*Rhagoletis cerasi*), η μύγα των μήλων (*Rhagoletis pomonella*) και πολλά άλλα έντομα (Romoser et al., 1998). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" ("fruit flies"), δηλαδή τις μύγες εκείνες που εναποθέτουν τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους αναπτύσσονται μέσα σε αυτά καθιστώντας τα μη εμπορεύσιμα.

Η μύγα της ελιάς είναι ένα από τα μικρότερα σε μέγεθος είδη στο γένος. Το ενήλικο θηλυκό έχει περίπου 5 mm μήκος και έκταση φτερών 10 mm. Η κεφαλή παρουσιάζει ανοιχτό καστανό χρώμα και οι σύνθετοι οφθαλμοί πρασινωπές μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας χαρακτηρίζεται από μαύρο χρώμα με μία αργυροειδή ραχιαία επιφάνεια κατά μήκος της οποίας υπάρχουν τρεις στενές παράλληλες μαύρες ταινίες. Η κοιλία, η οποία συνήθως παρουσιάζεται καστανόχρωμη, καταλήγει στις θηλυκές μύγες στον ωοθέτη, ενώ στις αρσενικές το τελικό της τμήμα είναι αμβλύ. Ο ωοθέτης έχει το βασικό του τμήμα μαύρο και μήκος 1 mm. Οι βραχίονες και μία περιοχή εκατέρωθεν της βάσης των πτερύγων εμφανίζονται κίτρινοι, ενώ οι πτέρυγες είναι συνήθως υαλώδεις και ιριδίζοντες με μια μικρή χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στις άκρες τους. Οι αλτήρες παρουσιάζουν λευκό χρωματισμό ενώ τα πόδια κιτρινο-κόκκινο (Εικόνα 1-7).



Εικόνα 1-7: Μορφολογικά χαρακτηριστικά δάκου.

Όσον αφορά στα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια, το αυγό είναι ένας ελλειψοειδής, επιμήκης σχηματισμός με λευκό χρώμα και με μήκος και διάμετρο 0.7 mm και 0.2 mm, αντίστοιχα, ενώ η προνύμφη είναι υπόλευκη με μορφή άποδης

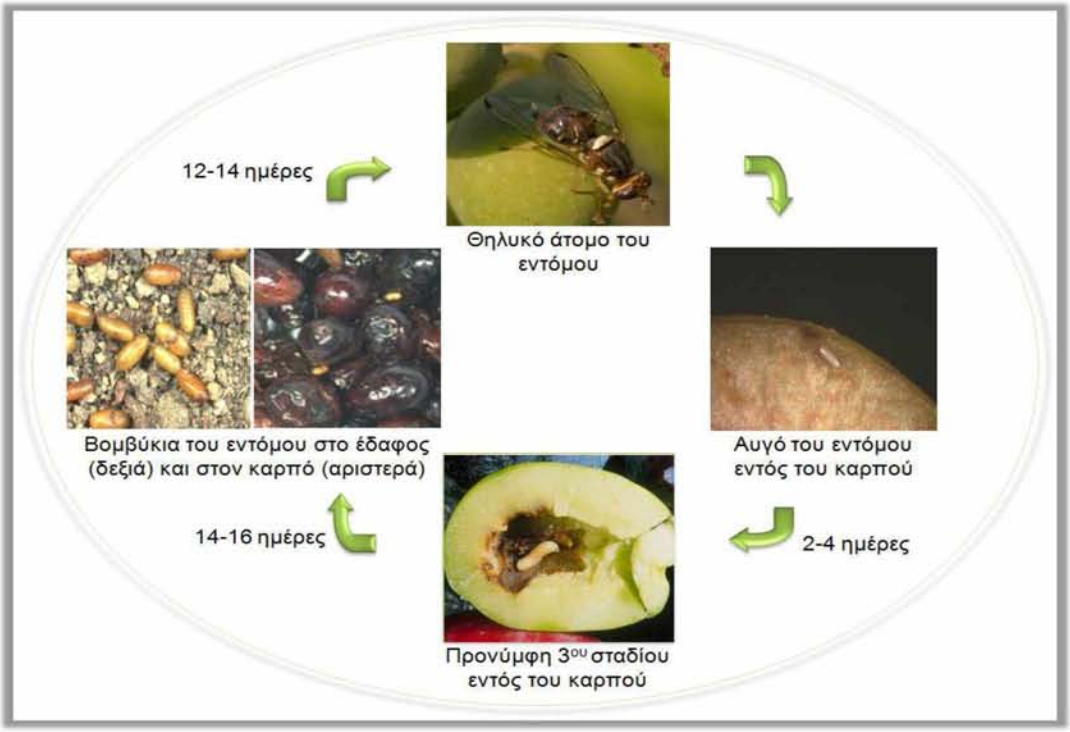
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

κάμπιας μήκους 7 mm. Τέλος, το βομβύκιο είναι ωοειδές, με χρώμα που ποικίλει από κίτρινο έως καστανό και με μήκος 4-5 mm (Εικόνα 1-8) (Katsoyannos, 1992).

Εικόνα 1-8: Προνύμφη (αριστερά) και βομβύκιο δάκου (δεξιά).

2.3 Βιολογικός κύκλος

Ο δάκος είναι έντομο ολομετάβολο, δηλαδή το στάδιο του αυγού ακολουθούν τρία προνυμφικά στάδια, μετά το τέλος των οποίων επιτελείται η πρώτη μεταμόρφωση σε νύμφη (βομβύκιο, pupa), και τέλος, με τη δεύτερη μεταμόρφωση προκύπτει το ενήλικο. Χαρακτηρίζεται, επίσης, ως έντομο πολυκυκλικό, δηλαδή έχει την ικανότητα να συμπληρώνει περισσότερους από ένα βιολογικούς κύκλους ανά έτος. Μάλιστα, σε περιοχές όπου οι συνθήκες είναι ευνοϊκές οι γενεές μπορούν να διαδέχονται η μία την άλλη χωρίς διακοπή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Θερμοκρασίες υψηλότερες των 32°C και χαμηλότερες των 8°C συνιστούν περιοριστικό παράγοντα για την ομαλή ανάπτυξη του εντόμου, ενώ αυτή (ανάπτυξη) ευνοείται ιδιαίτερα σε περιόδους με εύρος θερμοκρασιών από 23°C έως 29°C και σχετικής υγρασίας από 60% έως 80% (Manikas, 1974). Στην περιοχή της Μεσογείου εμφανίζονται από δύο έως πέντε γενεές ετησίως. Ο πληθυσμός του εντόμου κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όπου υπάρχει μειωμένη διαθεσιμότητα καρπών και χαμηλές θερμοκρασίες, αντιπροσωπεύεται κυρίως από νύμφες στο έδαφος, κάτω από στρώματα χώματος και φύλλων. Σε μικρότερο βαθμό υπάρχουν και διαχειμάζοντα ενήλικα άτομα ή νύμφες στον καρπό, τα οποία μπορεί να επιβιώσουν ως την ερχόμενη άνοιξη εάν οι συνθήκες το επιτρέψουν. Η έξοδος των ακμαίων από διαχειμάζοντες νύμφες πραγματοποιείται κυρίως το Μάρτιο και τον Απρίλιο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και τη θερμοκρασία της κάθε περιοχής. Τα θηλυκά αυτής της γενιάς, η οποία χαρακτηρίζεται ως η πρώτη, εναποθέτουν τα αυγά στο εσωτερικό των καρπών



Εικόνα 1-8: Βιολογικός κύκλος του δάκου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Εικόνα 1-9: Εναπόθεση αυγών από θηλυκό άτομο. Χαρακτηριστική είναι η κλίση του ωοθέτη καθώς εισέρχεται στον καρπό.

που έχουν εναπομείνει στα δέντρα από την προηγούμενη περίοδο ή διατηρούνται έως ότου ο καρπός της καινούργιας συγκομιδής χαρακτηριστεί δεκτικός για ωοτοκία (πήξη του πυρήνα). Το θηλυκό πριν την ωοτοκία ανιχνεύει την επιφάνεια του καρπού, επιλέγει το κατάλληλο σημείο και με κλίση της κοιλίας του περίπου 60° διατρυπά τον καρπό με τον ωοθέτη του και δημιουργεί χαρακτηριστικό τριγωνικό νύγμα, όπου εναποθέτει ένα αυγό (Εικόνα 1-9). Το θηλυκό κατά την ωοαπόθεση ρυθμίζει την πυκνότητα των αυγών, σημαδεύοντας αποτρεπτικά τον καρπό με τους χυμούς που εκκρίνονται από την πληγή-νύγμα. Κάθε θηλυκό έχει τη δυνατότητα εναπόθεσης έως 12 αυγών ημερησίως και έως 50 - 400 αυγών (σε ισάριθμους καρπούς) καθ' όλη την αναπαραγωγική του περίοδο. Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες τρέφονται από το μεσοκάρπιο της ελιάς διανοίγοντας στοές και βομβυκιώνονται σε μία περιοχή ακριβώς κάτω από το επικάρπιο. Η νύμφωση μέσα στον καρπό παρατηρείται κυρίως την καλοκαιρινή περίοδο, ενώ αντίθετα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου οι προνύμφες 3^{ου} σταδίου επιλέγουν να βομβυκιωθούν στο έδαφος. Η δεύτερη γενιά εμφανίζεται στα μέσα του καλοκαιριού. Κατά τη διάρκεια αυτής της εποχής, εάν επικρατούν κατάλληλες κλιματολογικές συνθήκες, το έντομο μπορεί να ολοκληρώσει μία γενιά σε διάστημα 28-34 ημερών. Ο χρόνος εκκόλαψης των αυγών κυμαίνεται μεταξύ 2 έως 4 ημερών, η ανάπτυξη των προνυμφών απαιτεί διάστημα 14 έως 16 ημερών, ενώ τα ακμαία εξέρχονται από τα βομβύκια σε 12 έως 14 ημέρες. Αναλυτικά, ο κύκλος ζωής του εντόμου παρουσιάζεται στην Εικόνα 1-8. Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της τροφής, τα ακμαία είναι δυνατόν να επιβιώσουν από 2 έως 6 μήνες. Η μεγαλύτερη πυκνότητα του εντόμου συνήθως παρουσιάζεται στις αρχές της φθινοπωρινής περιόδου ενώ η τελευταία γενιά του έτους καταγράφεται το Δεκέμβριο. Οι δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες της περιόδου αυτής ωθούν τα άτομα να διαχειμάσουν στο έδαφος υπό τη μορφή νύμφης, έτσι ώστε να αποτελέσουν την απαρχή της γενιάς της άνοιξης και να συνεχίσουν τον βιολογικό κύκλο του εντόμου (Rice, 2000). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αλλαγή του υποστρώματος της νύμφωσης εκτός του ότι προστατεύει τις προνύμφες από πτηνά που τρέφονται με τους ώριμους, πλέον, καρπούς (Kapatos & Fletcher, 1984) αποτελεί επίσης και μία εξελικτική προσαρμογή απέναντι στη συγκομιδή του καρπού της ελιάς που πραγματοποιείται προς τα τέλη του φθινοπώρου. Το ερέθισμα για τη μετακίνηση δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Πιστεύεται όμως ότι αποτελεί συνάρτηση της αλλαγής της φωτοπεριόδου και της χημικής σύστασης του καρπού.

Ο ετήσιος κύκλος του εντόμου, συνεπώς, είναι δυνατό να παρουσιάσει ανόμοια δραστηριότητα και εξέλιξη μεταξύ περιοχών με διαφορετικό κλιματολογικό προφίλ, δικαιολογώντας το διαφορετικό αριθμό γενεών που προκύπτουν μεταξύ αυτών των περιοχών. Παρόλο που τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου είναι συγκεκριμένα, η διάρκεια ολοκλήρωσής τους και κατ' επέκταση η διάρκεια του βιολογικού κύκλου ποικίλλει ανάλογα με την επικρατούσα θερμοκρασία και την ατμοσφαιρική υγρασία.

3. ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΖΗΜΙΑ

Η προσβολή των ελαιόδεντρων από πληθυσμούς του δάκου ποικίλλει αισθητά από έτος σε έτος και από περιοχή σε περιοχή. Το έντομο είναι ικανό να προκαλέσει τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές απώλειες.

Κατά τη διαδικασία της ωοτοκίας, τα ενήλικα θηλυκά άτομα προκαλούν οπές στο επικάρπιο μέσω του ωοθέτη. Τα νύγματα που δημιουργούνται - πρώτη ένδειξη εισβολής εντόμου - υποβαθμίζουν την εμπορική αξία της επιτραπέζιας και της ελαιοποιήσιμης ελιάς καθώς αποτελούν εναρκτήρια σημεία δευτερογενών μολύνσεων από μικροοργανισμούς και μύκητες (Εικόνα 1-10). Οι προσβεβλημένες ελιές αναγνωρίζονται μετά την πάροδο μόλις 4-5 ωρών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Εικόνα 1-10: Προσβεβλημένες ακατάλληλες προς βρώση ελιές.

από την εναπόθεση του αυγού. Η είσοδος των μυκήτων συνοδεύεται από την ανάπτυξη σήψεων ("ξεροβούλα", "σαποβούλα" από το μύκητα *Macrophoma dalmatica*), οι οποίες αλλοιώνουν την εμφάνιση της επιτραπέζιας ελιάς, καθιστώντας την μη εμπορεύσιμη. Επιπλέον, είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε πρόωρη πτώση του καρπού σε περιόδους που η περιεκτικότητά του σε λάδι είναι ακόμη μικρή. Η μεγαλύτερη όμως ζημία στην ελαιοπαραγωγή πραγματοποιείται στο προνυμφικό στάδιο του εντόμου. Οι προνύμφες οι οποίες εκκολάπτονται και αναπτύσσονται αποκλειστικά εντός του καρπού χρησιμοποιούν ως μοναδική διατροφική πηγή τους ιστούς του μεσοκαρπίου. Κάθε προνύμφη για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή της καταναλώνει από το 1/5 ως το 1/4 του μεσοκαρπίου ενός μέσου μεγέθους καρπού. Αποτέλεσμα της ανάπτυξής αυτής είναι η δημιουργία στοών στο εσωτερικό του καρπού και η απώλεια βάρους, η οποία μπορεί να φθάσει το 30% της συγκομιδής.

Ποιοτική υποβάθμιση επίσης υπάρχει λόγω της ρύπανσης από τα περιττώματα της προνύμφης και της σήψης από την είσοδο των βακτηρίων και των μυκήτων. Η αποσύνθεση της ελιάς οδηγεί σε αύξηση του επιπέδου των ελευθέρων λιπαρών οξέων του λαδιού (Muik et al., 2003), με αποτέλεσμα το λάδι που προέρχεται από προσβεβλημένες ελιές να χαρακτηρίζεται υποβαθμισμένης ποιότητας με αυξημένη οξύτητα (από 7^{o} - 8^{o} μέχρι 15^{o}-20^{o} στις σοβαρές περιπτώσεις) και οσμή χώματος (Neuenschwander & Michelakis, 1978). Ο περιορισμός της παραγωγής του ελαιοκάρπου από το δάκο θυμίζει τον "νόμο του ελαχίστου" του Justus von Liebig, ιδρυτή της γεωργικής χημείας. Τελικά, ο γεωργός συγκομίζει ό,τι του αφήνουν τα έντομα και τα άλλα φυτοπαράσιτα από την παραγωγή του.

4. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

4.1 Χημικές μέθοδοι

Η εξάλειψη των επιβλαβών εντόμων αποτελεί θέμα ενασχόλησης των ανθρώπων από την απαρχή της συστηματικής καλλιέργειας της γης. Η πρώτη εντομολογική καταπολέμηση καταγράφεται το 2,500 π.Χ., καθώς οι Σουμέριοι χρησιμοποίησαν θείο για την προστασία των καλλιεργειών τους. Η επανάσταση όμως στην παρασιτολογική καταπολέμηση επήλθε μετά το πέρας του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου με την εργαστηριακή σύνθεση χημικών ενώσεων με εντομοκτόνο δράση, αρχικά χλωριωμένων (DDT) και αργότερα οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

Το φθοροποιό έργο του δάκου στην ελιά είναι γνωστό από την αρχαιότητα (Πλίνιος 23-79 μ.Χ., έργο: Φυσική Ιστορία "Naturalis Historia"). Εντούτοις, η πρώτη προσπάθεια καταπολέμησης του εντόμου σημειώθηκε μόλις τον 18^{o} αιώνα, όπου προτάθηκε η πρώιμη συλλογή και σύνθλιψη του προσβεβλημένου ελαιοκάρπου ώστε να καταστραφούν οι πληθυσμοί εντός του καρπού και να μειωθούν οι ζημίες των επόμενων χρόνων. Η πρόταση δεν έτυχε αποδοχής διότι αποδείχθηκε ατελέσφορη και ανεφάρμοστη στην πράξη και σύντομα αντικαταστάθηκε από τη χρήση σακχαρούχων δολωμάτων τα οποία περιείχαν δηλητήριο [(Isnard, 1789) από Κοσμίδης, 1995]. Παράμετροι της μεθόδου, όπως η έκταση της εφαρμογής των δολωμάτων, το είδος του δηλητηρίου και της σακχαρούχου ουσίας καθώς και η μέθοδος χρησιμοποίησης του δολώματος, μελετήθηκαν εκτεταμένα [(Rozier, 1790; Gandofli, 1793; Portelli, 1854; Bonnafaux, 1859) από Κοσμίδης, 1995]. Ωστόσο, σημαντική πρόοδος καταγράφηκε το 1885 όταν ο Comes υποστήριξε για πρώτη φορά ότι κανένα μέτρο καταπολέμησης δε θα αποδειχθεί ωφέλιμο στην πράξη εφόσον δεν εφαρμόζεται συγχρόνως και στους ελαιώνες των παρακείμενων περιοχών. Λίγο αργότερα, το 1901, ο Reale διατύπωσε την ιδέα της διαβροχής των ελαιοδέντρων με δακοκτόνο υγρό (Κοσμίδης, 1995).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Στην Ελλάδα οι πρακτικές οδηγίες για την καταπολέμηση του δάκου, όπως εκδόθηκαν από το Υπουργείο Εθνικής Οικονομίας το 1913, συνιστούσαν τη χρησιμοποίηση σακχαρούχου πολτού με προσθήκη δηλητηρίου. Το μείγμα περιείχε 70 οκάδες μελάσσας, 2 οκάδες αρσενικώδες νάτριο και 80 έως 100 οκάδες νερό. Η πρώτη καταπολέμηση του δάκου με πολτό πραγματοποιήθηκε στα Φιλιατρά το 1914, ενώ από το 1920 έως το 1936 η αντιμετώπιση πραγματοποιούταν με την εκτέλεση 3 ή 4 συνολικά διαβροχών (4 διαβροχές: χρόνος έναρξης το πρώτο δεκαήμερο του Ιουνίου και επανάληψη κάθε μήνα). Από το 1937 άρχισε και στην Ελλάδα η χρησιμοποίηση παγίδων για την παρακολούθηση της πορείας του δακοπληθυσμού στις διάφορες περιοχές. Στο τέλος της δεκαετίας του 1950, η διαπίστωση της ισχυρής ελκυστικής δράσης των υδρολυμένων πρωτεϊνών στο δάκο (Orfanidis et al., 1958) μετατόπισε το ενδιαφέρον για την καταπολέμηση του εντόμου στη χρησιμοποίηση δολωμάτων που συνδυάζουν ορισμένα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα με υδρολυμένες πρωτεΐνες, αντικαθιστώντας εξ ολοκλήρου το μέχρι τότε χρησιμοποιούμενο αρσενικομελασσούχο πολτό (Ορφανίδης & Σουλτανόπουλος, 1962).

Η καταπολέμηση του δάκου στη σύγχρονη ελαιοκομική πράξη πραγματοποιείται κυρίως με την εφαρμογή δύο μεθόδων χημικών επεμβάσεων, την κατασταλτική και την προληπτική, υπό τη μορφή ψεκασμών. Η κατασταλτική μέθοδος (ψεκασμοί καλύψεως) εφαρμόζεται εναντίον των προνυμφών που βρίσκονται στους καρπούς και απαιτεί τη χρησιμοποίηση εντομοκτόνων διασυστηματικής δράσης (Roessler, 1989) με επικρατέστερα το fenthion και το dimethoate λόγω της χαμηλής υπολειμματικότητάς τους στο λάδι (Cabras, 1997). Αντίθετα, η προληπτική μέθοδος στοχεύει στη μείωση των πληθυσμών του ακμαίου και βασίζεται στην αρχή του τοπικού δολωματικού ψεκασμού χρησιμοποιώντας ως δόλωμα μία υδρολυμένη πρωτεΐνη στην οποία προστίθεται ένα κλασσικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο. Της εφαρμογής των μεθόδων αυτών προηγείται η παρακολούθηση των πληθυσμών του εντόμου. Αυτό επιτυγχάνεται με δειγματοληψίες καρπών και με συλλήψεις σε τροφικές παγίδες τύπου Mc Phail (Εικόνα 1-11) ή χρωματικές παγίδες, οι οποίες εκμεταλλεύονται την προτίμηση του εντόμου στο κίτρινο χρώμα (μήκη κύματος 500 - 520 nm) (Delrio et al., 1979; Prokopy et al., 1975). Η οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας για μία χώρα και η επιθυμία για αποτελεσματικότερο συντονισμό μπορούν να θέσουν τα μέτρα καταπολέμησης του εντόμου υπό κρατικό έλεγχο. Η δακοκτονία στην Ελλάδα βρίσκεται στον τομέα ευθύνης των Τμημάτων Φυτοπροστασίας των Διευθύνσεων Γεωργίας των κατά τόπους Νομαρχιών και η καταπολέμηση πραγματοποιείται εφόσον η πυκνότητα του εντόμου παρατηρηθεί αυξημένη (3-5 έντομα ανά παγίδα ανά πενθήμερο ή/και >2% προσβολή του καρπού).

4.2 Μη χημικές μέθοδοι

Ωστόσο, η χημική καταπολέμηση αμφισβητείται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Η παρατεταμένη και αλόγιστη εφαρμογή των εντομοκτόνων και άλλων χημικών μέσων δημιουργεί σοβαρά οικολογικά και τοξικολογικά προβλήματα, λόγω του ότι οι χημικές ενώσεις είναι δύσκολα βιοαποικοδομήσιμες με αποτέλεσμα να εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και να βιομεγεθύνονται προς την κορυφή της τροφικής αλυσίδας. Η μόλυνση του εδάφους και των υδάτων, η μόλυνση των ζωικών οργανισμών και κυρίως οι αρνητικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία (Denholm & Rowland, 1992) συνιστούν την αναγκαιότητα ανάπτυξης φιλικότερων προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου. Η παρουσία χημικών καταλοίπων στα προϊόντα και το περιβάλλον της ελιάς δε συμβαδίζει με την εικόνα ενός ωφέλιμου και ποιοτικού προϊόντος.

Η μαζική σύλληψη ακμαίων του δάκου με τη χρήση δακοπαγίδων μπορεί να μετατραπεί σε απότελεσματικό μεσο καταπολέμησής τους (Vossen et al, 2005). Η χρήση τους συνδυάζεται με την αξιοποίηση διαφόρων ερεθισμάτων και ουσιών με στόχο την

Εικόνα 1-11: Δακοπαγίδα McPhail.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

προσέλκυση, την παγίδευση και τελικά τη θανάτωση του εντόμου. Τα ερεθίσματα μπορεί να είναι είτε οπτικά και τροφικά προσελκυστικά, είτε ουσίες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του εντόμου όπως η σεξουαλική φερομόνη. Η αποτελεσματικότητα των τελευταίων αυξάνεται σε καιρούς αναπαραγωγής (Montiel-Bueno & Jones, 2002), ενώ των πρώτων εάν επικαλύπτονται με κολλώδη υλικά (Economopoulos et al, 1986). Όπως αναφέρθηκε, οι πρώτες προσπάθειες ελέγχου των πληθυσμών του δάκου μέσω προσέλκυσης και θανάτωσης σε παγίδες πραγματοποιήθηκαν τη δεκαετία του ΄50 (Orphanidis, 1958), ενώ αργότερα ο προσδιορισμός των φερομονών του δάκου (Baker et al., 1980; Mazomenos & Haniotakis, 1981; 1985) επέτρεψε τη χρησιμοποίησή τους ως εργαλείο προσέλκυσης (Mazomenos et al., 1983; Haniotakis et al., 1987; 1991). Γενικότερα, χρησιμοποιούνται οι συνδυασμοί των παραπάνω παγίδων ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η καταπολέμηση (Katsoyannos, 1992).

Επίσης, μέσα στα πλαίσια ανεύρεσης ασφαλέστερων μεθόδων, η τεχνική στείρωσης των εντόμων αποκτά μεγάλη σημασία (SIT, Sterile Insect Technique). Η τεχνική συνίσταται στη μαζική παραγωγή ατόμων, στη στείρωσή τους με εφαρμογή ακτινοβολίας γ και στην απελευθέρωσή τους στον αγρό με ελεγχόμενο τρόπο. Στόχος είναι η μείωση του αριθμού των γόνιμων διασταυρώσεων στους φυσικούς πληθυσμούς και η επακόλουθη μείωση του φυσικού πληθυσμού. Η σύζευξη μεταξύ στείρου αρσενικού και ακμαίου θηλυκού του φυσικού πληθυσμού οδηγεί σε στείρα ωοτοκία. Ακόμη και αν προκύψουν κάποια άτομα, αυτά πεθαίνουν πρόωρα πριν ολοκληρώσουν την ανάπτυξή τους λόγω δομικών αλλαγών των χρωμοσωμάτων των γαμετών από την ακτινοβόληση (Economopoulos, 1972; Robinson, 2002). Η επιτυχία της μεθόδου είναι συνάρτηση κυρίως του αριθμού των στειρωθέντων εντόμων που εξαπολύεται σε μία περιοχή. Δηλαδή, ο αριθμός των στειρωθέντων ατόμων που εξαπολύονται πρέπει να είναι τέτοιος ώστε η πιθανότητα σύζευξης ενός θηλυκού αγρίου τύπου με ένα στείρο αρσενικό να είναι πολύ μεγαλύτερη από την πιθανότητα σύζευξης του θηλυκού με ένα “άγριο” αρσενικό.

Η πρώτη επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε το 1955 για την καταπολέμηση του εντόμου *Cochliomyia hominivorax* (σαρκοφάγος μύγα), που προσβάλλει τα βοοειδή, στο νησί Curacao των Ολλανδικών Αντιλλών και στη Δυτική Φλώριδα των Η.Π.Α. (Baumhover et al., 1955). Ο πληθυσμός της μύγας μειώθηκε δραστικά και οι προσβολές ελαττώθηκαν στο ελάχιστο δυνατό. Τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην καταπολέμηση εντόμων οικονομικής σημασίας, όπως της μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata* (Hendrichs et al., 1983) και της μύγας του πεπονιού *Bactrocera cucurbitae* (Steiner et al., 1965; Ito & Koyama, 1982).

Η μέθοδος της SIT εφαρμόστηκε και στην καταπολέμηση του δάκου τη δεκαετία του ΄70, χωρίς όμως επιτυχία (Economopoulos, 1977). Η αποτυχία αποδόθηκε σε διαφορές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά των στείρων εργαστηριακών ατόμων που απελευθερώθηκαν σε σχέση με τα άτομα των φυσικών πληθυσμών και κυρίως στον κακό συγχρονισμό στη συμπεριφορά σύζευξης. Πρώτον, λοιπόν, τα εργαστηριακά άτομα ήταν σεξουαλικώς ώριμα και συζευγνύονταν σε ηλικία 2 έως 3 ημερών, ενώ τα άτομα του φυσικού πληθυσμού συζευγνύονταν για πρώτη φορά σε ηλικία 4 έως 6 ημερών (Economopoulos et al., 1971). Δεύτερον, τα εργαστηριακά άτομα ήταν πρόθυμα να συζευχθούν τις 4 τελευταίες ώρες της φωτόφασης, ενώ τα άτομα του φυσικού πληθυσμού συζευγνύονταν τις τελευταίες 2 ώρες της φωτόφασης (Zervas & Economopoulos, 1982). Και, τρίτον, τα εργαστηριακά άτομα συζευγνύονταν λιγότερες φορές σε σύγκριση με τα άτομα του φυσικού πληθυσμού (Economopoulos, 1972). Η προσπάθεια εγκαταλείφθηκε λόγω της απουσίας βασικών μοριακών και γενετικών δεδομένων που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην επίλυση παρόμοιων προβλημάτων. Γενικά, η ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης των εντόμων με σκοπό την εξάλειψη ή τον περιορισμό του αριθμού των χημικών επεμβάσεων προϋποθέτει τη γνώση της βιολογίας, οικολογίας και φυσιολογίας τους.

Τελευταία, ολοένα και περισσότερο έδαφος κερδίζει η τάση για ολοκληρωμένη καταπολέμηση των παρασίτων (IPM, Integrated Pest Managment).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Ο όρος αυτός προσδιορίζει ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης των εχθρών των καλλιεργειών, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση του περιβάλλοντος και τη δυναμική του πληθυσμού των εχθρών, χρησιμοποιώντας όλες τις κατάλληλες τεχνικές και μεθόδους με ένα όσο το δυνατόν αρμονικότερο τρόπο. Στόχος δεν είναι τόσο η εξάλειψη του πληθυσμού εχθρού αλλά η διατήρηση του πληθυσμού εχθρού σε επίπεδο κάτω από αυτό που προκαλεί οικονομική ζημία. Η ολοκληρωμένη καταπολέμηση περιλαμβάνει συνδυασμό μέσων, όπως βιολογικό έλεγχο με φυσικούς εχθρούς, καλλιεργητικές μεθόδους, χρησιμοποίηση ανθεκτικών φυτών ξενιστών, μηχανική προστασία και χημική εκλεκτική καταπολέμηση, ώστε να συνεισφέρουν σε ένα ασφαλές, αποτελεσματικό, μόνιμο και οικονομικά αποδεκτό σύστημα προστασίας των καλλιεργειών. Η ιδέα μιας "ολοκληρωμένης καταπολέμησης" άρχισε να κατακτά έδαφος στα χρόνια της δεκαετίας του '60 και ιδιαίτερα στο συμπόσιο του FAO στη Ρώμη (1965, "Integrated Pest Control") όπου πολλές ανακοινώσεις αναφέρονταν στις μεθόδους συνδυασμένης καταπολέμησης (Smith & Reynolds, 1967; Van den Bosch, 1967). Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας επιχειρήθηκε να περιοριστεί ο δάκος σε ανεκτή πυκνότητα πληθυσμού με τη χρησιμοποίηση του παρασιτικού υμενόπτερου Braconidae *Opius concolor*, το οποίο εναποθέτει τα αυγά του στο εσωτερικό των προνυμφών του ξενιστή (Manikas & Tsiroyannis, 1983). Έκτοτε, νέες περιβαλλοντικές θεωρήσεις δίνονται στη συνετή χρήση διαφόρων μεθόδων για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εχθρών της ελαιοκαλλιέργειας.

5. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

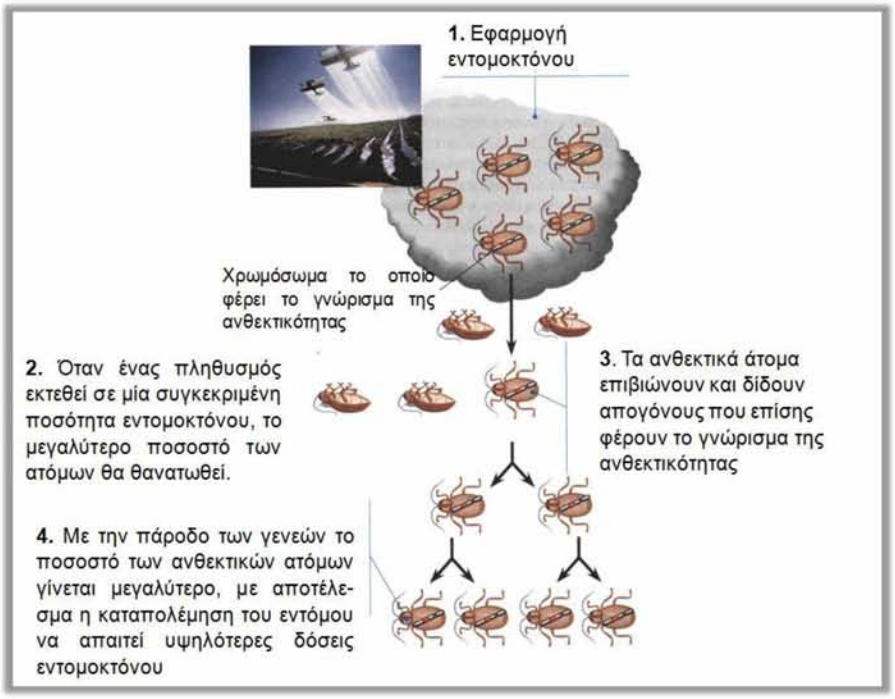
5.1 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας

Η ικανότητα των συμβατικών εντομοκτόνων να θανατώνουν άμεσα τα επιβλαβή έντομα δημιούργησε την ψευδαίσθηση ότι μπορούσαν να οδηγήσουν στην οριστική εξάλειψή τους και τη μόνιμη λύση στα προβλήματα των γεωργικών καλλιεργειών. Δυστυχώς όμως από την πορεία διαφάνηκε ότι τα έντομα αντέδρασαν και σχετικά γρήγορα τελειοποίησαν τους μηχανισμούς άμυνάς τους. Σήμερα, κοινωνία και περιβάλλον έχουν αρχίσει να καταβάλλουν ένα ιδιαίτερα υψηλό τίμημα εξαιτίας αυτής της προσέγγισης. Η υπερβολική και σε πολλές περιπτώσεις ακατάλληλη χρήση τους στη γεωργία οδήγησε στην ταχεία αύξηση της εξάπλωσης ανθεκτικών πληθυσμών εντόμων σε εντομοκτόνα. Έτσι, η λαμπρότητα της σύγχρονης γεωργικής φαρμακολογίας αμαυρώθηκε από την ανάδυση στελεχών εντόμων που εμφανίζουν μια τροποποιημένη παράταξη άμυνας ενάντια στα εντομοκτόνα. Γεγονός που συνάδει με το σύνολο της εξελικτικής ιστορίας των ζωντανών οργανισμών, η οποία αφορά στην προσαρμογή τους στο περιβάλλον.

Η ιστορία της ανθεκτικότητας των εντόμων αριθμεί σχεδόν 100 χρόνια, από την περίοδο δηλαδή που ο A.L. Melander πρώτος αναρωτήθηκε εάν "μπορούν τα έντομα να καταστούν ανθεκτικά σε ψεκασμούς". Ο Melander κατέγραψε και τεκμηρίωσε την ανθεκτικότητα της ψώρας του San Jose *Quadrispidiotus perniciosus* (Comstock) σε φρούτα τα οποία είχαν κατεργαστεί με ασβεστόνερο με θειάφι (lime sulphur) στη πολιτεία της Ουάσινγκτον των Η.Π.Α. (Melander, 1914). Την πρώτη αυτή έκθεση ακολούθησαν αρκετές περιπτώσεις ανθεκτικότητας ιδιαίτερα μετά την ανακάλυψη των συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων, έτσι ώστε σήμερα οι καταγεγραμμένες αναφορές ανθεκτικότητας και ανθεκτικών εντόμων να ανέρχονται σε 7,747 και 553, αντίστοιχα (Whalon et al., 2008). Περίπου το 40% αυτών των ειδών είναι παράσιτα υγειονομικού και κτηνιατρικού ενδιαφέροντος ενώ το υπόλοιπο 60% αφορά σε έντομα γεωργικών καλλιεργειών (Georgiou, 1990).

Η ανθεκτικότητα ορίζεται ως η ικανότητα ορισμένων ατόμων να επιβιώνουν της εφαρμογής μιας συγκεκριμένης δόσης τοξικής ουσίας, η οποία αποδεικνύεται θανατηφόρα για την πλειοψηφία των ατόμων σε έναν κανονικό (ευαίσθητο) πληθυσμό (Εικόνα 1-12). Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται μέσω της επιλογής γενετικών χαρακτηριστικών τα οποία προϋπάρχουν φυσιολογικά σε έναν πληθυσμό εντόμων-παρασίτων και όχι μέσω της δημιουργίας νέων γνωρισμάτων. Αποτελεί δηλαδή ένα προ-προσαρμοστικό (pre-adaptive) φαινόμενο και όχι επακόλουθο μεταλλαξιγέννεσης. Σε κάθε πληθυσμό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 1-12: Ανάπτυξη ανθεκτικότητας φυσικών πληθυσμών εντόμων σε εντομοκτόνα.

υπάρχει μια φυσιολογική κατανομή της αντίδρασής του σε ένα ερέθισμα. Έτσι, όταν ένας πληθυσμός εκτεθεί σε μία συγκεκριμένη ποσότητα εντομοκτόνου, το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων θα θανατωθεί, ενώ θα υπάρξουν κάποια άτομα που θα κατορθώσουν να επιβιώσουν λόγω γνωρισμάτων ανθεκτικότητας που φέρουν γενετικά. Τα άτομα αυτά αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού και αποκαλούνται ανθεκτικά. Εν συνεχεία, οι απόγονοι των ανθεκτικών αυτών ατόμων θα φέρουν το γενετικό προφίλ των γονέων τους, ενώ πολλοί από αυτούς θα κληρονομήσουν το χαρακτηριστικό που προσδίδει ανθεκτικότητα. Με την πάροδο των γενεών το ποσοστό των ανθεκτικών ατόμων θα γίνεται όλο και μεγαλύτερο, με αποτέλεσμα σε σύντομο χρονικό διάστημα ολόκληρος ο πληθυσμός να ανέχεται και να απαιτεί για την καταπολέμησή του υψηλότερες δόσεις εντομοκτόνου.

Ο ρυθμός ανάπτυξης της ανθεκτικότητας σε ένα εντομοκτόνο είναι συνάρτηση διάφορων παραγόντων, όπως του ποσοστού αναπαραγωγής (αριθμός γενεών ετησίως), της γενετικής μεταβλητότητας και της ροής γονιδίων στο φυσικό πληθυσμό (ύπαρξη και διάδοση του γνωρίσματος της ανθεκτικότητας), της μετανάστευσης (εισαγωγή ευαίσθητων ατόμων) και των στρατηγικών καταπολέμησης παρασίτων (ποσοστό, συγχρονισμός και αριθμός εφαρμογών εντομοκτόνου).

5.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Κλασσικά, έχουν καταγραφεί τέσσερις μηχανισμοί ανθεκτικότητας οι οποίοι αφορούν: 1) την αλλαγή συμπεριφοράς των εντόμων ώστε να μειώνουν ή να αποφεύγουν την έκθεση τους σε τοξικές ουσίες (ηθολογική ανθεκτικότητα), 2) τη μειωμένη διείσδυση των εντομοκτόνων μέσω του εξωσκελετού (μειωμένη διεισδυτικότητα), 3) την αυξημένη ικανότητα των εντόμων να αποικοδομούν τις ξενοβιοτικές ενώσεις (ανθεκτικότητα μεταβολισμού) και 4) τη δομική μεταβολή των στόχων που δρουν τα εντομοκτόνα μέσα στο έντομο (αλλαγή στόχου δράσης).

1) *Ηθολογική ανθεκτικότητα.* Με την εναπόθεση του εντομοκτόνου στην επιφάνεια των φύλλων το έντομο βρίσκεται μπροστά σε διαφορετικό περιβάλλον στο οποίο πρέπει να προσαρμοστεί και σε διάφορες καταστάσεις τις οποίες πρέπει να αντιμετωπίσει. Υπάρχουν αναφορές όπου το έντομο έμφυτα (inherently) αποφεύγει την επαφή με το εντομοκτόνο. Ο "μηχανισμός" αυτός συνήθως αποκαλείται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

"ηθολογική ανθεκτικότητα" (behavioral resistance). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανακάλυψη του συμπλέγματος του κουνουπιού της ελονοσίας *Anopheles maculipennis* στη βάση της διαφορετικής συμπεριφοράς των υποειδών ως προς την ανοχή τους στο DDT. Συγκεκριμένα, ο εσωτερικός ψεκασμός των τοίχων με DDT μείωσε τον ενδόφιλο πληθυσμό των κουνουπιών. Η αρχική ερμηνεία του φαινομένου αποδόθηκε στην αλλαγή της συμπεριφοράς του ενδόφιλου πληθυσμού, ο οποίος απέφευγε την επαφή με τους ψεκασμένους τοίχους. Στην πραγματικότητα, όμως, υπήρχε μείωση του ενδόφιλου υποείδους του συμπλέγματος, ενώ ο εξώφιλος υπο-πληθυσμός διέφευγε τον εντομολογικό έλεγχο (Coluzzi, 1992).

2) *Μειωμένη διεισδυτικότητα.* Η δράση του εντομοκτόνου εξαρτάται από την ικανότητά του να διεισδύσει τον πολύ ανθεκτικό εξωσκελετό του εντόμου και να προσεγγίσει το στόχο του. Η μειωμένη διεισδυτικότητα σπάνια αναφέρεται ως μοναδικός μηχανισμός ανθεκτικότητας. Αντίθετα τις περισσότερες φορές εμφανίζεται ως παράγοντας καθυστέρησης ο οποίος επιτρέπει στους μηχανισμούς αποτοξίνωσης του εντόμου να αντιμετωπίσουν ευκολότερα και αποτελεσματικότερα το εντομοκτόνο (Price, 1991).

Εντούτοις, μοριακή ανάλυση έχει πραγματοποιηθεί μόνο για τους εξής μηχανισμούς:

3) *Μεταβολική ανθεκτικότητα*. Μετά την είσοδό του στον οργανισμό και κατά την πορεία του προς το στόχο του, το εντομοκτόνο εκτίθεται σε ποικίλες μεταβολικές αντιδράσεις που όλοι οι οργανισμοί εξέλιξαν ώστε να αποτοξινώνουν ξενοβιοτικές ουσίες. Μεταβολική ανθεκτικότητα ορίζεται ως το σύνολο των βιοχημικών διαδικασιών που έχουν αναπτύξει οι οργανισμοί για τη μετατροπή των ξενοβιοτικών ουσιών σε διάφορους υδρόφιλους μεταβολίτες, γεγονός που διευκολύνει την απέκκρισή τους. Η μεταβολική αποτοξίνωση θεωρείται συχνά ως η κύρια οδός για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Οι κυριότερες ενζυμικές αντιδράσεις που καθιστούν τα εντομοκτόνα περισσότερο υδρόφιλα και λιγότερο τοξικά είναι οι εξής: α) υδρόλυση με εστεράσες, β) αντιδράσεις όπου συμμετέχει το κυτόχρωμα P-450 και γ) αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).

Αναλυτικότερα:

α) Εστεράσες: Οι εστεράσες καταλύουν την αντίδραση προσθήκης ενός μορίου νερού σε έναν εστέρα, σχηματίζοντας το αντίστοιχο οξύ και αλκοόλη. Η ανθεκτικότητα που αποδίδεται στο μεταβολισμό των εστερασών οφείλεται κυρίως σε υπερέκφραση των γονιδίων τους, είτε ως αποτέλεσμα αλλαγής της γονιδιακής ρύθμισης είτε μετά από πολλαπλασιασμό του γονιδίου (Hemingway, 2000). Η γονιδιακή ρύθμιση μπορεί να μεταβληθεί από μεταλλάξεις που σημειώνονται στις ρυθμιστικές αλληλουχίες ανοδικά του γονιδίου και οδηγούν σε αυξημένη αντιγραφή του καθώς και από μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυξημένη μετάφραση. Αντίθετα, τα επιπλέον αντίγραφα των γονιδίων των εστερασών προκύπτουν από πολλαπλασιασμό του γονιδιακού τόπου της εστεράσης. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα ανθεκτικότητας βασισμένη σε εστεράσες αποτελεί η ανθεκτικότητα των αφίδων, η οποία αποδίδεται στην καρβοξυλεστεράση E4 (Needham & Sawacki, 1971; Devonshire, 1986). Η E4 αποτελεί εστεράση τύπου Β, η οποία έχει χαρακτηριστικά καρβοξυλεστεράσης και προσδίδει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά (OPs), καρβαμιδικά (CBs) και πυρεθροειδή (PYs) εντομοκτόνα λόγω της αυξημένης έκφρασής της μέσω των πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου. Πέρα από τις ποσοτικές αλλαγές των εστερασών υπάρχουν και αναφορές συσχέτισης ανθεκτικότητας και ποιοτικής αλλαγής της δομής του γονιδίου. Συγκεκριμένα, έχει απομονωθεί μετάλλαξη στην περιοχή του λειτουργικού γονιδίου η οποία μετατρέπει την υδρολυτική ιδιότητα της εστεράσης σε υδρολάση εντομοκτόνου. Τα ανθεκτικά έντομα, δηλαδή, παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα υδρόλυσης καρβοξυλεστερικών υποστρωμάτων αλλά αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης οργανοφωσφορικών υποστρωμάτων (Newcomb, 1997).

β) Κυτόχρωμα P-450: Το κυτοχρωμικό σύστημα P-450 εμφανίζεται ως ένα σύμπλοκο μεμβρανικών ενζύμων και συμπαραγόντων, το οποίο λειτουργεί ως σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, χρησιμοποιώντας ατμοσφαιρικό οξυγόνο για οξειδωτικό και NADPH ως τον προτιμώμενο δότη ηλεκτρονίων. Έτσι, το μισό από το μοριακό οξυγόνο ενσωματώνεται στο υπόστρωμα και το άλλο μισό στο νερό, με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

αποτέλεσμα υδροφιλικές ομάδες να εισάγονται στα λιπόφιλα αρχικώς υποστρώματα-εντομοκτόνα. Το κυτόχρωμα P-450 αποτελεί μέλος μιας πολυάριθμης υπεροικογένειας ισοενζύμων (Scott et al., 1998). Αυξημένη έκφραση (συνήθως από αυξημένη μεταγραφή παρά γονιδιακό πολλαπλασιασμό) και μεταλλαγμένες μορφές του P-450 έχουν εμπλακεί σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας (Oppenoorth, 1985). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της υπερέκφρασης του P-450 στη *Drosophila melanogaster* η οποία αποδίδεται στην ένθεση του μεταθετού στοιχείου *Accord* στο γονίδιο *cyp6g1*, ένα από τα 90 γονίδια που κωδικοποιούν P-450 ένζυμα (Daborn et al., 2002). Η ένθεση του στοιχείου Accord εντοπίστηκε στο 5΄ άκρο του γονίδιου, στην περιοχή δηλαδή που υπάρχουν ρυθμιστικά στοιχεία που επηρεάζουν τη μεταγραφή, προκαλώντας την αύξησή της.

γ) S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης: Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο γλυκίνης, γλουταμικού οξύ και κυστεΐνης, το οποίο μπορεί να συνδέεται με ενώσεις που παρουσιάζουν αντιδρόν ηλεκτροφιλικό κέντρο. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τις τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GST), οι οποίες συνδέουν τη σουλφιδριλική ομάδα (-SH) της γλουταθειόνης με την ηλεκτροφιλική ομάδα της ξενοβιοτικής ομάδας προς σχηματισμό υδατοδιαλυτού και λιγότερου τοξικού προϊόντος. Η ανθεκτικότητα η οποία αποδίδεται στο μεταβολισμό των GSTs οφείλεται κυρίως σε αύξηση του ποσού του ενζύμου λόγω αυξημένης μεταγραφής (Enayati et al., 2005). Παράδειγμα ανθεκτικότητας στο οποίο εμπλέκεται η GST αποτελεί η ανθεκτικότητα της οικιακής μύγας σε OPs τα οποία παρουσίασαν GST με υψηλότερη Vmax έως και 20 φορές σε σύγκριση με τα ευαίσθητα (Motoyama et al., 1980).

4) *Αλλαγή στόχου.* Συχνά στόχοι των εντομοκτόνων αποτελούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στη περίπτωση αυτή ο μηχανισμός ανθεκτικότητας αφορά στην τροποποίηση της δομής του στόχου μέσω μεταλλαγών των αμινοξέων, με τρόπο που να μειώνεται η ευαισθησία του ως προς το εντομοκτόνο. Ο μηχανισμός είναι γνωστός ως απευαισθητοποίηση του στόχου δράσης. Στόχοι δράσης των εντομοκτόνων αποτελούν: α) τα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+, β) η ακετυλοχολινεστεράση, γ) οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης και δ) οι υποδοχείς GABA και γλουταμικού.

Αναλυτικότερα:

α) Τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+: Τα κανάλια Na^+ αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη φάση της ταχείας αύξησης των δυναμικών δράσης και απαραίτητες για την ηλεκτρική μεταβίβαση σήματος. Τα εντομοκτόνα τα οποία δρουν σε αυτά είναι το DDT και τα πυρεθροειδή, προκαλώντας μείωση του ρυθμού απενεργοποίησής τους. Η ανθεκτικότητα που αποδίδεται στα τασεο-εξαρτώμενα κανάλια Na^+ παρουσιάζει μία μετάλλαξη σε περιοχή της πρωτεΐνης που συμμετέχει στο σχηματισμό του δίαυλου του καναλιού (Dong, 2007).

β) Ακετυλοχολινεστεράση: Ο φυσιολογικός ρόλος της ακετυλοχολινεστεράσης συνίσταται στην υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, του κύριου νευροδιαβιβαστή των νευρικών συνάψεων. Τα εντομοκτόνα που δρουν σε αυτήν είναι τα οργανοφωσφορικά και καρβαδιμικά, προκαλώντας αναστολή της υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης. Η ανθεκτικότητα που σχετίζεται με το ένζυμο αποδίδεται στην απευαισθητοποίησή του λόγω μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγή της δομής του, ώστε το εντομοκτόνο να μην έχει πρόσβαση στο ενεργό κέντρο (πρώτη αναφορά: Smissaert, 1964).

γ) Υποδοχείς ακετυλοχολίνης: Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης εντοπίζονται στο μετασυναπτικό νευρικό κύτταρο και αποτελούν ομο- ή ετεροπενταμερείς διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν ιοντικά κανάλια και συμβάλλουν στη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Τα εντομοκτόνα που έχουν ως στόχο αυτούς τους υποδοχείς είναι τα νεονικοτινοειδή και η μακροκυκλική λακτόνη spinosad. Η ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα οφείλεται σε μετάλλαξη η οποία μειώνει σημαντικά την πρόσδεση του εντομοκτόνου (Liu et al., 2005), ενώ η ανθεκτικότητα στο spinosad δεν έχει ακόμη πλήρως διαλευκανθεί (Scott, 2008).

δ) Υποδοχείς GABA-γλουταμικού: Οι υποδοχείς GABA και γλουταμικού αποτελούν κανάλια Cl^-, τα οποία επιτρέπουν την εισροή αρνητικά φορτισμένων ιόντων Cl^- μέσα στο κύτταρο, αναστέλλοντας με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

αυτόν τον τρόπο τη δράση των νευρώνων. Εντομοκτόνα που στοχεύουν στους υποδοχείς GABA αποτελούν, για παράδειγμα, τα dieldrin και fipronil τα οποία οδηγούν σε υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος, ενώ τα εντομοκτόνα που δρουν στους υποδοχείς του γλουταμικού (avermectins, milbemycins) προκαλούν αναστολή των φυσιολογικών διεργασιών και παράλυση. Η ανθεκτικότητα προς αυτά τα εντομοκτόνα έχει αποδοθεί σε μετάλλαξη που εντοπίζεται σε περιοχή της δεύτερης διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό του καναλιού και αποτρέπει τη σύνδεση του εντομοκτόνου (Buckingham et al., 2005).

ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΗ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ

Η χολινεργική μεταβίβαση αποτελεί σημαντική διαδικασία σε ένα εύρος νευρικών διεργασιών σε όλους τους οργανισμούς. Το χολινεργικό σύστημα περιλαμβάνει την ακετυλοχολίνη (ACh), η οποία αποτελεί το νευροδιαβιβαστή και ρυθμίζει τη μεταβίβαση του σήματος, το βιοσυνθετικό της ένζυμο, την ακετυλτρανσφεράση της χολίνης, το αποδομητικό της ένζυμο, την ακετυλχολινεστεράση και, τέλος, τους υποδοχείς της ACh.

Η μοριακή βιολογία της χολινεργικής σύναψης αρχίζει με τη σύνθεση της ACh, αρχικά υποστρώματα της οποίας αποτελούν η χολίνη και η γλυκόζη. Η χολίνη εισάγεται στο νευρώνα, ενώ από το μεταβολισμό της γλυκόζης παράγεται ως προϊόν το ακετυλοσυνένζυμο Α (ακετυλ-CoA). Στη συνέχεια, η ACh συντίθεται από τη χολίνη και το ακετυλ-CoA με τη δράση του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης, αποθηκεύεται σε κυστίδια στη νευρική προσυναπτική απόληξη (Katz & Miledi, 1972; 1979) και απελευθερώνεται μετά την εκπόλωση της απόληξης. Η διεργασία αυτή απαιτεί την παρουσία ασβεστίου: το δυναμικό δράσης που φθάνει στην απόληξη του προσυναπτικού νευρώνα πυροδοτεί το άνοιγμα δυναμο-εξαρτώμενων καναλιών Ca^{+2}, με αποτέλεσμα ιόντα Ca^{+2} να εισρέουν στο κυτοσόλιο και να ενεργοποιούν την απελευθέρωση των κυστιδίων με εξωκύτωση στη συναπτική σχισμή (Breer & Knipper, 1984; Augustine et al., 1991). Η ACh, η οποία διαχέεται ταχύτατα κατά μήκος της συναπτικής σχισμής (Land et al., 1984), συνδέεται στους μετασυναπτικούς υποδοχείς, επιτρέποντας ιόντα Na^{+} και K^{+} να διαχυθούν στη μεμβράνη και να εκπολώσουν το κύτταρο, ώστε να συνεχιστεί η μεταβίβαση του σήματος (Satelle, 1980; Harrow, 1982; Satelle, 1985). Η αποδόμηση της ACh πραγματοποιείται με υδρόλυση από την ακετυλοχολινεστεράση, παράγοντας οξικό οξύ και χολίνη. Η χολίνη επαναπροσλαμβάνεται στο προσυναπτικό κύτταρο για την εκ νέου σύνθεση της ACh.

Στα έντομα η ακετυλοχολίνη αποτελεί τον κύριο νευροδιαβιβαστή του κεντρικού νευρικού συστήματος (Pitman, 1971; Gerschenfeld, 1973) και περιορίζεται σε αυτό. Παρότι στα θηλαστικά η ακετυλοχολίνη εντοπίζεται στις νευρικές και νευρομυϊκές συνάψεις, στα έντομα έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχει χολινεργικό σύστημα στις νευρομυϊκές συνάψεις αλλά η διέγερση και η αναστολή των μυών ρυθμίζεται από το γλουταμικό και το GABA, αντίστοιχα (Pitman, 1971). Έχει επιπλέον αποδειχθεί ότι η ACh εμφανίζεται σε υψηλότερα επίπεδα στον εγκέφαλο των εντόμων σε σύγκριση με περιοχές του εγκεφάλου σπονδυλωτών (Restifo & White, 1990; Buchner, 1991).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

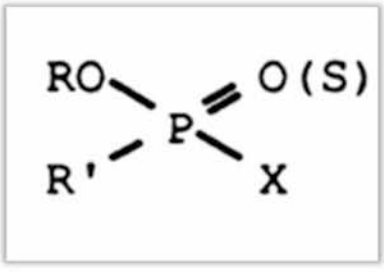
6. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΟΙ (ΟΡ) ΕΣΤΕΡΕΣ

6.1 Ιστορική αναδρομή

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα καταναλωτικών, γεωργικών, κτηνοτροφικών και βιομηχανικών διεργασιών και προϊόντων, περιλαμβάνοντας εντομοκτόνα (μαλαθείο, παραθείο, διαζινόνη, φενθείο), νευροτοξικές ουσίες (σόμαν, σαρίν, ταμπούν, VX), οφθαλμικές ουσίες (echothiophate, isoflurophate), αντιαιμοφιλικά (trichlorfon). Η πρώτη σύνθεση πραγματοποιήθηκε στις αρχές του 1800 όταν ο Jean Louis Lassaigne προκάλεσε την αντίδραση μεταξύ αλκοόλης και φωσφορικού οξέος. Εκατό χρόνια αργότερα ο Michaelis στη Γερμανία και ο Arbusov στη Ρωσία παρουσίασαν τη σύνθεση ενός μεγάλου αριθμού οργανοφωσφορικών ενώσεων. Η τοξικότητα των ουσιών αυτών, όμως, προσδιορίστηκε αρκετά χρόνια αργοτέρα. Το 1932, ο χημικός Willy Lange και ο μαθητής του Gerde von Krueger κατέγραψαν τα τοξικά αποτελέσματα οργανοφωσφορικών εστέρων στον εαυτό τους ως "ένα αίσθημα πίεσης στο λάρυγγα και δυσκολία στην αναπνοή ακολουθούμενα από διαταραχή στη συνείδηση και θολή όραση" (Gupta, 2006). Το 1937, ο Schrader (χημικός της Bayer AG, Γερμανία) χαρακτήρισε και τις εντομοκτόνες ιδιότητές τους. Εντούτοις, ο γερμανικός στρατός απέτρεψε τη χρήση των οργανοφωσφορικών ενώσεων ως εντομοκτόνα και ανέπτυξε αντ' αυτών ένα οπλοστάσιο χημικών ουσιών. Σε ένα μόνο εργοστάσιο στο Dührenfurth παρήχθησαν 12,000 τόνοι ταμπούν και 600 τόνοι σαρίν (Holmstedt, 1963). Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις επανεισήχθησαν στην παγκόσμια αγορά για χρήση ως φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα μόνο μετά το τέλος του Δευτέρου Παγκόσμιου Πολέμου. Σήμερα, οι οργανοφωσφορικοί εστέρες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες εντομοκτόνων αριθμώντας 150 διαφορετικά σκευάσματα τα οποία χρησιμοποιούνται για την προστασία γεωργικών και κτηνοτροφικών παρασίτων (Eto, 1974; Worthing, 1987; Ware, 2000; Tomlin, 2003). Τα OPs παρασιτοκτόνα εισήχθησαν στην καταπολέμηση των εντόμων ως αντικαταστάτες των οργανοχλωριωμένων. Η χρήση των οργανοχλωριωμένων απαγορεύτηκε το 1970 λόγω της τάσης που παρουσίασε το DDT και οι μεταβολίτες του να συσσωρεύονται στο οικοσύστημα, προκαλώντας προβλήματα στον άνθρωπο και στο περιβάλλον (Woodwell, 1967). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσε η μείωση των πληθυσμών αρπακτικών πουλιών. Έρευνες έδειξαν πως το DDT και οι μεταβολίτες του επιδρούσαν αρνητικά στο αναπαραγωγικό σύστημα, στην ικανότητα μεταβολισμού του ασβεστίου και στην εναπόθεσή του στο κέλυφος των αυγών των αρπακτικών πουλιών με αποτέλεσμα την ξαφνική και σημαντική μείωση του πάχους του. Συνηθισμένη συνέπεια ήταν το σπάσιμο των αυγών, κάτω από το βάρος του αρπακτικού που προσπαθούσε να τα επωάσει (Carson, 1962).

6.2 Δομή ΟΡ εστέρων

Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες που χρησιμοποιούνται κυρίως στη γεωργική φαρμακολογία είναι κατά πλειοψηφία οργανικά παράγωγα φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος ή θειώδη ανάλογα στα οποία το άτομο φωσφόρου έχει υποκατασταθεί πλήρως. Αποτελούνται από 2 αλκυλ-υποκαταστάσεις (R, R΄) και μία τρίτη ομάδα (X) πιο ευμετάβλητη στην υδρόλυση που αποκαλείται "αποχωρούσα ομάδα" (leaving group) (Εικόνα 1-13). Η ομάδα R μπορεί να είναι μεθύλ- ή αιθύλ- ομάδα, ενώ η ομάδα R' μπορεί να είναι μεθοξύ-, αιθοξύ-, αιθύλ-, φαινύλ- ή άμινο-ομάδα. Η δομή των εντομοκτόνων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία στην ομάδα X. Η ικανότητά της να αποδεσμεύει το άτομο φωσφόρου εξαρτάται από τη χημική της δομή και από τις υπόλοιπες ομάδες που συνδέονται στο φώσφορο. Εντομοκτόνα τα οποία παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα περιέχουν ως ομάδα X μία ηλεκτροαρνητική ομάδα ή μία ομάδα που περιέχει ηλεκτροαρνητικό υποκαταστάτη, οδηγώντας σε μια ένωση με δραστικό (reactive) ή ασταθή (labile) P-X δεσμό (Fukuto, 1990).



Εικόνα 1-13: Γενική δομή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

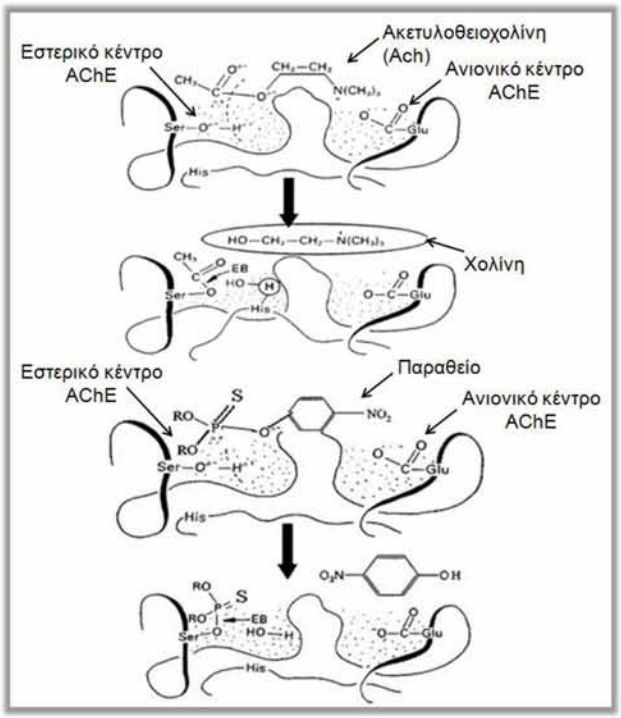
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Τα θειώδη εντομοκτόνα τα οποία προκύπτουν με αντικατάσταση του διπλού δεσμού του οξυγόνου με θείο (P=S) δεν παρουσιάζουν την ίδια ισχυρή δράση με τα εντομοκτόνα που φέρουν P=O λόγω της χαμηλότερης ηλεκτροαρνητικότας και της χαμηλής δραστικότητας (reactivity) του ατόμου θείου σε σχέση με το οξυγόνο. Η τοξικότητα των εντομοκτόνων αυτών οφείλεται στον P=O εστέρα που προκύπτει από τη μεταβολική οξείδωση του P=S στο αντίστοιχο "όξον" (oxon) (Gage, 1953; Dauterman, 1971).

6.3 Μηχανισμός αναστολής AChE

Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες ανήκουν στην ομάδα των αντιχολινεστερασικών ενώσεων, των ενώσεων δηλαδή που αναστέλλουν την ενζυμική υδρόλυση χολινεργικών νευροδιαβιβαστών. Η αναστολή και τοξικότητα των ενεργών οργανοφωσφορικών εστέρων οφείλεται σε ένα κοινό δυναμικό μηχανισμό, ο οποίος συνίσταται στη φωσφορυλίωση του ενζύμου της ακετυλχολινεστέρασης (AChE), προκαλώντας τη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης, υπερδιέγερση των χολινεργικών υποδοχέων και τελικώς σημάδια χολινεργικής τοξικότητας (Moretto, 1998; Vale, 1998). Η αναστολή της AChE από έναν οργανοφωσφορικό εστέρα λαμβάνει χώρα μέσω μια χημικής αντίδρασης στην οποία η υδροξυλική ομάδα της σερίνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου φωσφορυλιώνεται κατά τρόπο ανάλογο της ακετυλίωσης της AChE (Aldridge, 1952; Cohen, 1963; Wilson, 1960). Με τον τρόπο αυτό το -OH της σερίνης καθίσταται μη ικανό να συμμετάσχει στην υδρόλυση της ACh. Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο είναι υψηλά σταθερό και σε ορισμένες περιπτώσεις, ανάλογα με τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες στο άτομο του φώσφορου, αναστέλλεται αμετάκλητα, σε αντίθεση με το ακετυλιωμένο ένζυμο το οποίο γρήγορα διασπάται για να δώσει οξικό οξύ και το αναγεννημένο ένζυμο (Aldridge, 1950). Οι ρυθμοί επανενεργοποίησης του ενζύμου διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό και εξαρτώνται από τη δομή του OP, την κυτταρική θέση και τη μορφή του ενζύμου.

Η αντίδραση της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Εικόνα 1-14). Αρχικά, ο φώσφορος (της φωσφορυλομάδας)



Εικόνα 1-14: Επάνω : Σύνδεση της ACh στο ενεργό κέντρο της AChE. Κάτω: Μηχανισμός αναστολής της AChE από το παραθείο (OP εντομοκτόνο).

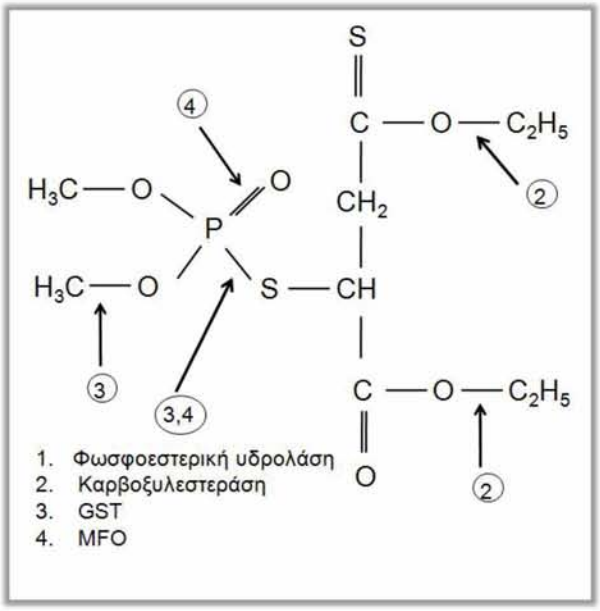
των οργανοφωσφορικών εστέρων καθίσταται ηλεκτρονιόφιλος ένεκα της επαγωγικής έλξης ηλεκτρονίων από το οξυγόνο P=O, με αποτέλεσμα στη συνέχεια το ελλιπές σε ηλεκτρόνια κέντρο που δημιουργείται να διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή του –OH της σερίνης του ενζύμου στο άτομο φωσφόρου με ταυτόχρονη εκδίωξη της ομάδας X. Η χημική ενεργοποίηση του φωσφόρου είναι πρωταρχικής σημασίας για την αντιακετυλχολινεστερική δράση, καθώς και οι στερεοχημικές ιδιότητες ενός οργανοφωσφορικού εστέρα. Οι Hansch και Deutch (1966) κατέδειξαν ότι όσο πιο ογκώδης είναι η R-αλκυλομάδα ενός οργανοφωσφορικού τόσο μικρότερη είναι η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης που προκαλεί.

6.4 Μεταβολική αποδόμηση OP εστέρων

Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες αποτελούν τριτοταγείς εστέρες κι επομένως καθίστανται ευαίσθητοι σε υδρολυτική αποδόμηση. Η αποτοξίνωση μιας οργανοφωσφορικής ένωσης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους διότι αποκοπή οποιουδήποτε δεσμού μεταξύ του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

φωσφόρου και των υπολοίπων ομάδων οδηγεί σε αποδόμηση (Εικόνα 1-15). Οι εστεράσες, για παράδειγμα, οι οποίες αναφέρονται και ως υδρολάσες ή φωσφοεστερικές υδρολάσες, έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τους οργανοφωσφορικούς εστέρες (Eto, 1974; Dauterman, 1971).



Εικόνα 1-15: Αποικοδόμηση του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου, μαλαθείον. Πιθανές θέσεις δράσης των ενζύμων αποτοξίνωσης.

7. ΑΚΕΤΥΛΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ

7.1 Η ανακάλυψη του ενζύμου

Η ακετυλοχολινεστεράση έχει μελετηθεί για πολλούς και ποικίλους λόγους για σχεδόν έναν αιώνα τώρα - ως ένζυμο, ως θεραπευτικό μέσο, ως στόχος εντομοκτόνων και νευροτοξικών ουσιών, ως δείκτης χολινεργικών νευρώνων και αλληλεπίδρασης μεταξύ κυττάρων (ανασκόπηση: Inestrosa & Perelman, 1989; Taylor, 1991; Massoulié et al., 1993; Rotundo & Fambrough, 1994; Legay, 2000). Η πρώτη αναφορά του ενζύμου καταγράφεται το 1914 όταν ο Dale παρατήρησε ότι ο ορός παρουσιάζει δράση εστεράσης, υποθέτοντας την ύπαρξη ενός μορίου υπεύθυνου για τον τερματισμό της νευρικής ώσης στις χολινεργικές συνάψεις (Quinn,1987; Soreq & Zakut, 1990; Taylor 1990). Η πρώτη περιγραφή του ενζύμου χρονολογείται το 1938 από τον Nachmansohn. Στις τέσσερις δεκαετίες που ακολούθησαν οι μελέτες προσδιόρισαν τα κεντρικά χαρακτηριστικά του μηχανισμού δράσης του ενζύμου και έθεσαν τα θεμέλια για την κατανόηση της λειτουργίας των αναστολέων του σε μοριακό επίπεδο (Nachmansohn, 1955; Nachmansohn & Neumann, 1975). Μεταγενέστερες έρευνες παρουσίασαν ένα μεγάλο αριθμό ενζυμικά ενεργών μορφών, οι οποίες διέφεραν στη διαλυτότητα σε υψηλά και χαμηλά ιοντικά διαλύματα, στις αλληλεπιδράσεις με αποδιατακτικές ουσίες και στην ικανότητα να διαχωρίζονται σε χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση και καθίζηση. Σύντομα έγινε φανερό ότι οι διαφορές στο μέγεθος απεικόνιζαν τις διαφορετικές μορφές του ενζύμου. Σήμερα είναι γνωστό ότι η ακετυλοχολινεστεράση υπάρχει ως μονομερές, διμερές ή τετραμερές μιας κοινής καταλυτικής υπομονάδας και ως ένα, δύο ή τρία τετραμερή που συνδέονται με μία ουρά που φέρει τρεις αλυσίδες κολαγόνου (ColQ) (Massoulié & Bon, 1982; Massoulié et al., 1993).

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE, acetylcholine hydrolase, EC 3.1.1.7) αποτελεί ένζυμο κλειδί του νευρικού συστήματος. Ο ρόλος της συνίσταται στην υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh), συμμετέχοντας στη ρύθμιση και την έκταση της διάρκειας των αλληλεπιδράσεών της με τους μετασυναπτικούς της υποδοχείς (Rosenberry, 1975; Toutant, 1989). Η ακετυλοχολινεστεράση συναντάται σε όλους τους σπονδυλωτούς και ασπόνδυλους οργανισμούς. Τα σπονδυλωτά παρουσιάζουν μόνο ένα γονίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για όλες τις μορφές της AChE (Sikorav 1987; Rotundo 1988) μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος (Sikorav, 1988; Soreq, 1990; Maulet et al., 1990; Li et al., 1991; 1993a; 1993b; Ekstrom et al., 1993), Στα έντομα έχει καταγραφεί η παρουσία περισσοτέρων του ενός γονιδίων (Bourguet et al., 1996; Tomita et al., 2000; Li & Han, 2002) με την τάξη όμως των ανώτερων Δπτέρων να παρουσιάζει μόνο ένα (Hall & Spierer, 1986; Vontas et al., 2002; Hsu et al., 2004).

7.2 *In vivo* σύνθεση

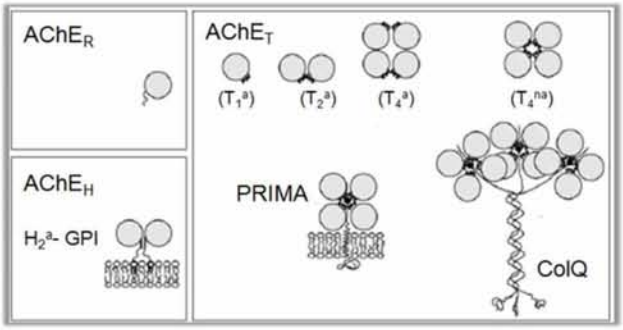
Η σύνθεση της ακετυλοχολινεστεράσης λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (RER) από όπου στη συνέχεια μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω της συσκευής Golgi. Η AChE οδηγείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

αμινοτελικής σηματοδοτικής αλληλουχίας (Soreq et al., 1990). Εκεί γλυκοσυλιώνεται και σχηματίζει διμερή ή τετραμερή (Rotundo, 1984; 1988; Rotundo et al., 1989). Τα ολιγομερή στη συνέχεια οδηγούνται στη συσκευή Golgi (Rotundo, 1984), ενώ τα μη πολυμερισμένα μόρια παραμένουν ως σφαιρικά μονομερή που παρακρατούνται μέσω του σήματος κράτησης στο κυτταρόπλασμα (Velan et al., 1991) ώστε να αποικοδομηθούν (Rotundo & Fambrough, 1980). Η AChE υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi πριν μεταφερθεί στην κυτταρική επιφάνεια του κυττάρου (Rotundo 1984; 1988; Rotundo et al., 1989). Η σύνθεση του ενζύμου πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, στο ρυθμό περίπου του 20% επί του συνολικού κυτταρικού περιεχομένου ενεργών ενζύμων ανά ώρα. Η μεταφορά του από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην πλασματική μεμβράνη απαιτεί περίπου 2.5 ώρες (Rotundo & Fambrough, 1980).

7.3 Ενζυμικές μορφές

Η ακετυλοχολινεστεράση συναντάται στους ανώτερους οργανισμούς σε διάφορες μορφές, οι οποίες καθορίζονται από τα εξόνια τα οποία κωδικοποιούν την καρβοξυτελική περιοχή. Τα μετάγραφα της ακετυλοχολινεστεράσης, ανάλογα με τη δομή που παρουσιάζει η κωδικοποιημένη καρβοξυτελική περιοχή, μπορούν να διακριθούν σε R, H, T ή S μετάγραφα (Εικόνα 1-16).



Εικόνα 1-16: Μορφές ακετυλοχολινεστεράσης.

R μετάγραφα ("read through"): το "R" μετάγραφο περιλαμβάνει στην αλληλουχία εκτός από τα εξόνια και το ιντρόνιο το οποίο ακολουθεί το τελευταίο εξόνιο της καταλυτικής περιοχής. Η παρουσία τους έχει καταγραφεί στο *Torpedo* (Sikorav et al., 1988) και σε τρωκτικά (Li et al., 1991; 1993; Legay et al., 1995).

H μετάγραφα ("hydrophobic"): το "H" μετάγραφο παρουσιάζει ένα καρβοξυτελικό πεπτίδιο, το οποίο περιέχει συνήθως μία ή δύο κυστεΐνες που επιτρέπουν το σχηματισμό διμερών μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Το πεπτίδιο αυτό ακολουθείται από μία υδρόφοβη περιοχή, η οποία απομακρύνεται από το ένζυμο και στη θέση του προστίθεται μία γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτολική άγκυρα (GPI anchor) (Futerman et al., 1985; Silman & Futerman, 1987). Η "H" μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης απαντάται στη *Drosophila* και τα νηματοειδή (Arpagaus et al., 1992) καθώς και σε ορισμένα σπονδυλωτά (Inestrosa et al., 1988) και θηλαστικά (Legay et al., 1993).

T μετάγραφα ("tailed"): το "T" μετάγραφο παρουσιάζει ένα καρβοξυτελικό πεπτίδιο το οποίο περιέχει μια σειρά συντηρημένων αρωματικών καταλοίπων και μία κυστεΐνη υπεύθυνη για το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Το "T" πεπτίδιο θεωρείται ότι οργανώνεται ως μία αμφιφιλική α-έλικα, έτσι ώστε οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες να σχηματίζουν ένα εκτεθιμένο υδρόφοβο σύμπλεγμα (Massoulié et al., 1993). Η δομή αυτή συμμετέχει στο σχηματισμό διμερών και τετραμερών, καθώς και στην ένωση των τετραμερών με μια ουρά που φέρει τρεις αλυσίδες κολλαγόνου (ColQ).

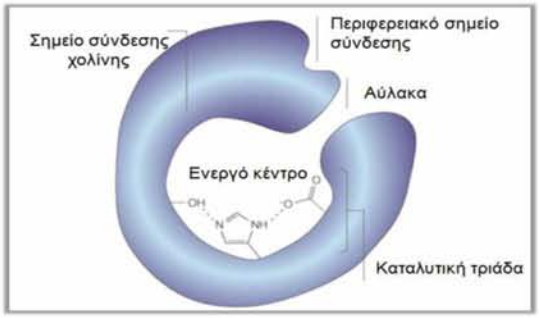
S μετάγραφα ("soluble" or "snake"): το "S" μετάγραφο παρουσιάζει ένα μικρό υδρόφιλο πεπτίδιο, μέρος του οποίου αποκόπτεται μόλις εκκριθεί από το κύτταρο, δημιουργώντας διαλυτά μονομερή της ακετυλοχολινεστεράσης. Το μετάγραφο αυτό συναντάται μόνο σε ορισμένα δηλητηριώδη φίδια της οικογένειας elapidae (Frobert et al., 1997; Cousin et al., 1996; 1998), αποτελώντας ίσως μία ένδειξη της παρουσίας της AChE στο δηλητήριο.

7.4 Στερεοχημική δομή

Η AChE ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών, ομάδα που ορίζεται από κοινή δομική ομολογία περιλαμβάνοντας χολινεστεράσες, καρβοξυλεστεράσες και λιπάσες (Liao & Remington, 1990;

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Holmquist, 2000). Η ομάδα αυτή παρουσιάζει κυλινδρική δομή που αποτελείται από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα. Η καταλυτική τριάδα του ενζύμου περιέχει ένα κατάλοιπο σερίνης και ιστιδίνης (Ser200 και His440), ενώ αντίθετα με το συνηθισμένο κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asp) των πρωτεασών σερίνης, το τρίτο κατάλοιπο της τριάδας είναι η γλουταμίνη (Glu327). Το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της δομής της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελεί μία βαθιά και στενή αύλακα περίπου 20 Å, η οποία εισχωρεί μέσα στο ένζυμο και πλαταίνει κοντά στη βάση του (Sussman et al., 1991). Η αύλακα περιέχει την καταλυτική τριάδα και σχηματίζει το θυλάκιο σύνδεσης για την ακετυλοχολίνη. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι 14 αρωματικά κατάλοιπα αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό της επιφάνειας της αύλακας. Τα αρωματικά αυτά κατάλοιπα και οι αλληλουχίες που τα πλαισιώνουν είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ των ειδών (MacPhee-Quigley, 1985; Gibney, 1988). Ο μεγάλος αριθμός των αρωματικών καταλοίπων στο ενεργό κέντρο ίσως σχετίζεται με την ύπαρξη ποικίλων περιφερειακών σημείων πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης (Rosenberry,1975; Cohen et al., 1989), καθώς και με την καθοδήγηση της ακετυλοχολίνης από τη περιφέρεια στο κέντρο (Rosenberry & Neumann, 1977). Ο αρωματικός αυτός μηχανισμός καθοδήγησης εξηγεί τον υψηλό βαθμό σύνδεσης του υποστρώματος και τη γρήγορη απομάκρυνση (clearance) της χολίνης από το ενεργό κέντρο. Επιπλέον, στην είσοδο της αύλακας εντοπίζεται μια περιφερειακή ανιονική θέση (PAS "peripheral anionic site") η οποία συνίσταται από πέντε κατάλοιπα, ενώ η ίδια αύλακα πλαισιώνεται από δέκα όξινα κατάλοιπα σχηματίζοντας το λεγόμενο "δακτυλιοειδή ηλεκτροστατικό μοτίβο" (Εικόνα 1-17) (Felder et al., 1997).



Εικόνα 1-17: Βασικά χαρακτηριστικά της δομής της AChE.

7.5 Καταλυτική δράση

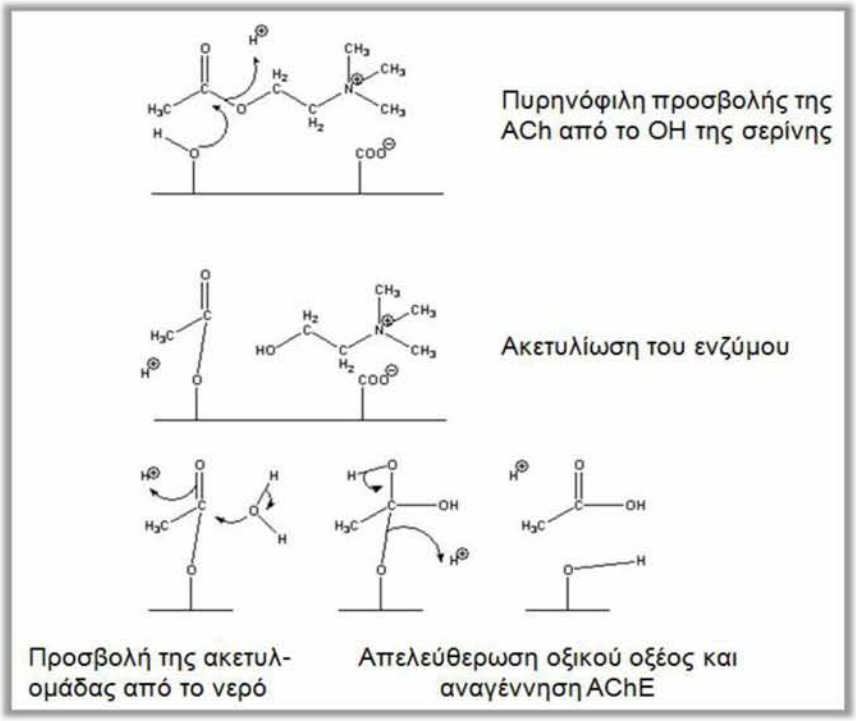
Η υδρόλυση της ACh από την AChE παρουσιάζει τα στοιχεία μιας οξινο-βασικής καταλυόμενης αντίδρασης, περιλαμβάνοντας επιπλέον αντιδράσεις ακυλίωσης και απακυλίωσης. Το δραστικό τμήμα της ακετυλοχολινεστεράσης εντοπίζεται στο πεπτιδικό τμήμα γλυκινο – ασπαρτυλο – σερινο – γλυκίνη, το οποίο απαρτίζεται από δύο διαφορετικές δραστικές θέσεις: α) την εστερική θέση που θεωρείται ότι είναι η υδροξυλομάδα της σερίνης, ενεργοποιημένη από τη γειτονική ιμιδαζολική ομάδα της ιστιδίνης και αφορά την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου και β) την αρνητικά φορτισμένη ανιονική θέση, η οποία σχετίζεται με την ειδίκευση του ενζύμου (Wilson & Bergmann, 1950a; 1950b). Το αρνητικό φορτίο του ανιονικού τμήματος αποδίδεται στο καρβοξυλικό ανιόν του ασπαρτικού ή γλουταμικού οξέος. Η εστερική θέση βρίσκεται 5 Å μακριά της ανιονικής, καταλύοντας την υδρόλυση του εστερικού δεσμού του υποστρώματος, ενώ η ανιονική έλκει εκτός της ACh και άλλους κατιονικούς αναστολείς. Οι δυνάμεις, οι οποίες συμβάλλουν κυρίως στη σύνδεση του ενζύμου (E) και του υποστρώματος (S) είναι: α) δυνάμεις Coulomb, μεταξύ της θετικά φορτισμένης ομάδας του υποστρώματος και την ανιονικής θέσης, β) δυνάμεις Van der Waal's, μεταξύ της μεθυλικής και μεθυλενικών ομάδων της ACh και της μη φορτισμένης επιφάνειας της δραστικής ομάδας και γ) ασθενής ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της βασικής ομάδας της εστερικής θέσης και του ηλεκτρονιοφιλικού καρβονυλικού άνθρακα του εστέρα (Ravin et al., 1951). Η AChE στη πραγματικότητα είναι ένα υψηλά πολύπλοκο ένζυμο φέροντας, εκτός του εστερικού και ανιονικού τμήματος, και έναν αριθμό περιφερειακών τμημάτων και υδρόφοβων περιοχών (Rosenberry, 1975).

Κατά την είσοδό της στην αύλακα, η ACh προσδένεται παροδικά στην περιφερειακή ανιονική θέση (PAS) (Szegletes at al., 1999) επάγοντας πιθανόν δομικές αλλαγές, ώστε να διευκολύνει το πέρασμά της στην αύλακα (Kitz et al., 1970). Εφόσον εισέλθει στην αύλακα, οι αρωματικές ομάδες που την πλαισιώνουν οδηγούν την ακετυλοχολίνη από την επιφάνεια της πρωτεΐνης στο ενεργό κέντρο. Η ACh μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου μέσω της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ του θετικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

φορτισμένου ατόμου αζώτου της ACh και της αρνητικά φορτισμένης ανιονικής θέσης, η οποία συνδέει την χολίνη και προσανατολίζει τον εστέρα προς τη θέση ακυλίωσης. Η βασική ιμιδαζολική ομάδα της ιστιδίνης καταλύει την ακετυλίωση της υδροξυλικής ομάδας της σερίνης στο εστερικό σημείο και την ομάδα υδροξυλίου ΑΗ της τυροσίνης (tyrosine hydroxyl), οδηγώντας στο ακετυλιωμένο ένζυμο ΕΑ. Η απακετυλίωση λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα οδηγώντας στην ελεύθερη μορφή του ενζύμου (Ε) μέσα σε msec (Εικόνα 1-18).

Όπως προαναφέρθηκε, η ακετυλοχολινεστεράση στα έντομα περιορίζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αφού το υπόστρωμά της, η ακετυλοχολίνη (και γενικότερα η χολινεργική μεταβίβαση στην οποία συμμετέχει) εντοπίζεται μόνο στις νευρικές συνάψεις. Η κύρια μορφή της απαντά σε ένα γλυκοσυλιωμένο διμερές που συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας GPI άγκυρας με κάθε μονάδα της να αποτελείται από δυο περιοχές: μια μεγάλη περιοχή περίπου 500 αμινοξικών καταλοίπων υπεύθυνη για την κατάλυση και ένα μικρό καρβοξυτελικό άκρο μήκους λιγότερο των 50 αμινοξέων υπεύθυνο για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στη μετασυναπτική μεμβράνη.



Εικόνα 1-18: Μοριακός μηχανισμός υδρόλυσης της ACh.

8. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η πλειονότητα των πρωτεϊνών σε έναν οργανισμό (τουλάχιστον το 80% των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών) καθώς μεταφράζονται και προτού καταστούν λειτουργικές υφίστανται χημικές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές αποκαλούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στη δημιουργία της ετερογένειας των πρωτεϊνών, ώστε πανομοιότυπες πρωτεΐνες να παρουσιάζουν διαφορετική κυτταρική λειτουργία σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προκαλούν ομοιοπολικές διαφοροποιήσεις στο σκελετό και τις πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών, ώστε να ρυθμίσουν με τον τρόπο αυτό τη λειτουργία τους και να καθορίσουν τη δραστική τους κατάσταση, τον κυτταρικό εντοπισμό τους καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες. Οι γνωστές και μελετημένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της AChE είναι:

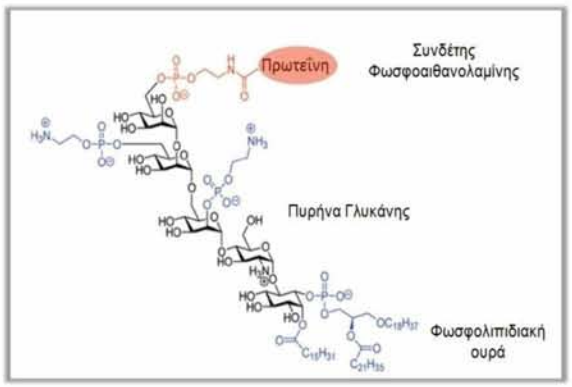
1. Μοριακές μορφές: Η ακετυλοχολινεστεράση αποτελείται από δύο τμήματα, την καταλυτική περιοχή και ένα υδρόφοβο καρβοξυτελικό άκρο. Η δομή του καρβοξυτελικού αυτού πεπτιδίου δεν επηρεάζει τη δραστικότητα του ενζύμου αλλά καθίσταται σημαντική για τη δημιουργία των διάφορων μορφών του ενζύμου καθώς και για άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η γλυκοσυλίωση, η προσθήκη GPI άγκυρας, η αλληλεπίδραση με άλλες δομικές πρωτεΐνες και μεμβρανικά λιπίδια, καθορίζοντας γενικότερα την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και το σχηματισμό λειτουργικά ενεργών ενζύμων (Coussen, 1995). Οι διμερείς και τετραμερείς μορφές του ενζύμου προκύπτουν από τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των κυστεϊνών του καρβοξυτελικού πεπτιδίου των υπομονάδων.

2. Γλυκοσυλίωση: Η γλυκοσυλίωση αποτελεί μία τροποποίηση που προσφέρει σταθερότητα ή/και πρόσθετες ιδιότητες στις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

πρωτεΐνες. Συνήθως, προσθέτονται σάκχαρα στη σερίνη ή στη θρεονίνη (O-γλυκοσυλίωση) ή στην ασπαραγίνη (N-γλυκοσυλίωση). Έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια της AChE φέρουν ποικίλο αριθμό από υδρογονοανθρακικά κατάλοιπα προσκολλημένα στο πυρήνα της πρωτεΐνης μέσω της ασπαραγίνης. Μάλιστα, ο αριθμός και χαρακτήρας αυτών των καταλοίπων ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών μορφών του ενζύμου. Η σωστή γλυκοσυλίωση αποτελεί σημαντική διαδικασία. Για παράδειγμα, συγκέντρωση μοριακών μορφών AChE με αλλαγμένο γλυκοσυλιακό προφίλ παρατηρήθηκε σε ασθενείς με Alzheimer (Saez-Valero, 1999).

3. GPI-άγκυρα: Όπως προαναφέρθηκε στη *Drosophila*, τα νηματοειδή και σε διάφορα σπονδυλωτά, το καρβοξυτελικό άκρο της AChE αντικαθίσταται από GPI άγκυρα που συμμετέχει στην αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στη μετασυναπτική μεμβράνη και στη δημιουργία της "H" μορφής. Η δομή της GPI άγκυρας φαίνεται στην Εικόνα 1-19.



Εικόνα 1-19: Δομή GPI άγκυρας. Η δομή GPI αποτελείται από μία ομάδα φωσφοαιθανολαμίνης με την οποία συνδέεται στην πρωτεΐνη, από έναν πυρήνα γλυκάνης και μία φωσφολιπιδιακή ουρά.

Το σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) της καρβοξυτελικής περιοχής του ενζύμου καθορίζει την προσθήκη της GPI άγκυρας σε ένα συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο, στη θέση αποκοπής και τροποποίησης (κατάλοιπο-ω). Το σηματοδοτικό πεπτίδο σήματος περιέχει μια περιοχή (spacer) με υδροφιλικά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία διαχωρίζουν το ω-κατάλοιπο από το υδροφοβικό καρβοξυτελικό τμήμα. Απαλείψεις και ενθέσεις στην περιοχή αυτή της ανθρώπινης AChE κατέδειξαν ότι το μήκος της είναι σημαντικό για την αποτελεσματική προσθήκη GPI άγκυρας (Bucht, 1999). Επίσης, στις AChEs εντοπίζεται μια περιοχή πλούσια σε αργινίνη και προλίνη μεταξύ του ω-καταλοίπου και της υδροφοβικής περιοχής της σηματοδοτικής αλληλουχίας, η οποία πιθανώς προωθεί την προσκόλληση της GPI άγκυρας. Οι προϋποθέσεις για ικανοποιητική προσθήκη GPI μορίων απαιτούν το κατάλοιπο δέκτης του GPI να είναι η Gly και να ακολουθούν μικρά αμινοξέα (-Gly-Glu-Ala-). Γενικότερα η θέση ω περιορίζεται σε κατάλοιπα Ala, Gly, Ser, Asp, Asn ή Cys, η ω+1 μπορεί να είναι οποιοδήποτε εκτός από Pro και Trp, ενώ η ω+2 είναι Gly, Ala και περιστασιακά Ser (Udenfriend & Kodukula, 1995; Moran & Caras, 1994).

4. Φωσφορυλίωση: Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων και κατά συνέπεια της δομής τους. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται κυρίως σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Η αλληλουχία της AChE περιέχει πολλά σήματα φωσφορυλίωσης (Soreq & Zakut, 1993) που ίσως έχουν προστατευτικό χαρακτήρα. Επειδή η AChE *in vivo* εκτίθεται σε ένα αριθμό φυσικών και φαρμακολογικών ενώσεων καθώς και σε εντομοκτόνα τα οποία οδηγούν σε καταστολή της υδρολυτικής δραστικότητας του ενζύμου, η *in vivo* φωσφορυλίωσή του ίσως να κατέχει το ρόλο ενός προστατευτικού αντιδραστικού μηχανισμού ενάντια σε βλάβες της χολινεργικής διαβίβασης (Soreq & Zakut, 1993; Grisaru, 1999).

5. Αλλοστερικές τροποποιήσεις: Οι αλλοστερικές τροποποιήσεις του μορίου της AChE είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της καταλυτικής δραστικότητάς του. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής του ενζύμου έδειξε ότι το ενεργό του κέντρο έχει το σχήμα μιας βαθιάς και στενής καταλυτικής αύλακας (Sussman et al., 1991), η οποία είναι προσβάσιμη μόνο από ορισμένους τύπους μορίων. Το ενεργό κέντρο μπορεί να ρυθμιστεί μέσω των περιφερειακών σημείων πρόσδεσης. Οι αναστολείς του ενζύμου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

μπορούν να δράσουν και στα δύο αυτά σημεία. Για παράδειγμα, αναστολείς που συνδέονται σε περιφερειακά σημεία είναι δυνατόν να μπλοκάρουν την είσοδο του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, παρεμποδίζοντας την καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου. Έχει προταθεί ότι η σύνδεση στην περιφέρεια του μορίου επάγει αλλοστερική τροποποίηση του προσανατολισμού της Trp84, η οποία λειτουργεί ως το σημείο πρόσδεσης της χολίνης (Ordentlich et al., 1995).

9. ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΤΟΠΟΥ *ACE* ΤΗΣ *Drosophila melanogaster*

Η ακετυλοχολινεστεράση έχει απομονωθεί από ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών, περιλαμβάνοντας θηλαστικά, πουλιά, ψάρια, ερπετά και έντομα. Στη *Drosophila melanogaster* το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης χαρτογραφήθηκε το 1976 σε μια μικρή περιοχή του χρωμοσώματος 3, 87E1-5 (Hall & Kankel, 1976) και κλωνοποιήθηκε 7 χρόνια αργότερα (Bender et al., 1983) ώστε να ακολουθήσει ο προσδιορισμός της βασικής δομής και αλληλουχίας του το 1986 (Hall & Spierer, 1986), βάσει της ομοιότητας που παρουσιάζει με το γονίδιο της AChE του *Torpedo californica*.

Όπως σε κάθε έντομο, η AChE στη *Drosophila* συναντάται στο κεντρικό νευρικό σύστημα με τη μορφή ενός γλυκοσυλιωμένου διμερούς, το οποίο προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας GPI άγκυρας (Fournier et al., 1988a; Haas et al., 1988). Το κάθε μονομερές αποτελείται από δύο πολυπεπτίδια μεγέθους 16,000 και 55,000 M_r, τα οποία προέρχονται από ένα πρόδρομο μόριο (precursor) που κωδικοποιείται από το γονιδιακό τόπο της ακετυλχολινεστεράσης (Gnagey et al., 1987; Toutant et al., 1988; Fournier et al., 1988a; 1988b). Συγκεκριμένα, το πολυπεπτίδιο των 16,000 M_r προέρχεται από το αμινο-τελικό άκρο του πρόδρομου μορίου ενώ το πολυπεπτίδιο των 55,000 M_r προκύπτει από το καρβοξυτελικό άκρο. Το πρόδρομο πολυπεπτίδιο χαρακτηρίζεται από ένα υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο, μία υδρόφιλη αλληλουχία 41 αμινοξέων καθώς και μία υδρόφοβη αλληλουχία στο καρβοξυτελικό άκρο. Το υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο λειτουργεί ως σηματοδοτική αλληλουχία, το υδρόφιλο πεπτίδιο των 41 αμινοξέων ευθύνεται για το διαχωρισμό των δύο υπομονάδων (δεν απαντάται στα γονίδια των σπονδυλωτών), ενώ το υδρόφοβο καρβοξυτελικό πεπτίδιο καθορίζει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης και αντικαθίσταται από GPI άγκυρα (Hall & Spierer, 1986; Fournier et al., 1988b). Η ύπαρξη της σηματοδοτικής αλληλουχίας επιβεβαιώθηκε με μερική αλληλούχιση του ώριμου ενζύμου (Gnagey et al., 1987) και είναι λογικό να απαντάται στην ακετυλοχολινεστεράση εφόσον αποτελεί εκκριτική πρωτεΐνη (Hall & Spierer, 1986).

Ο γονιδιακός τόπος της ακετυλοχολινεστεράσης (Ace) στη *Drosophila* εκτείνεται σε μήκος περίπου 34 kb, από όπου προκύπτει ένα ώριμο μετάγραφο των 4.3 kb ή των 4.5 kb συμπεριλαμβανομένης και της πολυ-Α ουράς. Η οργάνωση του γονιδίου παρουσιάζει δέκα εξόνια (I-X) και εννιά ιντρόνια (1-9), με το μέγεθός τους να κυμαίνεται από 139 έως 845 και 118 έως 11,648 bp, αντίστοιχα. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στη μέση του εξονίου II, ενώ το πρώτο εξόνιο δεν περιέχει κωδικές αλληλουχίες. Η κατάλυση πραγματοποιείται κυρίως από τα εξόνια III-VI, όπου συναντάται η καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου, ενώ τα εξόνια II και VII-IX συμμετέχουν έμμεσα στη διαμόρφωση της αύλακας. Τέλος, το εξόνιο X εμφανίζεται υπεύθυνο για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, κωδικοποιώ-ντας ένα υδρόφοβο πεπτίδιο το οποίο ανταλλάσσεται μερικώς με τη GPI άγκυρα που είναι παρούσα στο καρβοξυτελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης (Hall & Spierer, 1986; Fournier et al., 1988b). Όσον αφορά στα ιντρόνια, όλα τα ζευγάρια δότη-δέκτη συνολικά υπακούουν τον κανόνα GT-AG (Breathnach et al., 1978) και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με τη αλληλουχία του σημείου ματίσματος του Mount (1982). Επίσης, όλα τα ιντρόνια, εκτός του δεύτερου, συμφωνούν με την προτεινόμενη αλληλουχία της θέσης διακλάδωσης C/T,T,N,A,N των Keller & Noon (1985).

Η ακετυλοχολινεστεράση αντιπροσωπεύει περίπου το 0.01% της ολικής πρωτεΐνης στις μύγες (Nagoshi & Gelbart, 1987; Fournier et al., 1987; Gnagey et al., 1987) και παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλο χρόνο ημιζωής (40-50 h). Δεν παρουσιάζει εναλλακτικό μάτισμα, όπως συμβαίνει στην ακετυλοχολινεστεράση των σπονδυλωτών (Sikorav

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

et al., 1987; 1988; Schumacher et al., 1988). Τα παρατηρούμενα ισοένζυμα προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μέσω πρωτεασών και λιπασών από ένα μόνο μοριακό τύπο (Fournier et al., 1987; 1988a).

10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΟΡ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Όπως προαναφέρθηκε, η ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχει συνδεθεί είτε με ποσοτικές είτε με ποιοτικές αλλαγές του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (Fournier et al., 1992; Charpentier & Fournier, 2001). Ο κύριος όμως μηχανισμός ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά είναι οι ποιοτικές τροποποιήσεις του ενζύμου.

Η πρώτη περιγραφή ακετυλοχολινεστεράσης με μειωμένη ευαισθησία σε εντομοκτόνα πραγματοποιήθηκε σε έντομα της οικογένειας των Tetranychidae (Smissaert, 1964). Από την αναφορά αυτή και μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 30 είδη ανθεκτικά σε οργανοφωσφορικά λόγω τροποποιήσεων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστε-ράσης (Fournier & Mutero, 1994; Fournier, 2005; Oakeshott et al., 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η τροποποίηση του ενζύμου είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων αμινοξικών καταλοίπων τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου, καταδεικνύοντας συγκεκριμέ-νες θέσεις φωσφορυλίωσής του από τα εντομοκτόνα (Mutero et al., 1994). Τα αμινοξέα που αντικαθιστούν τα αντίστοιχα του αγρίου τύπου είναι συνήθως πιο ογκώδη. Το αποτέλεσμα τέτοιων αλλαγών είναι η στερεοχημική μεταβολή ή τη μεταβολή του προσανατολισμού των καταλοίπων του ενεργού κέντρου έτσι ώστε να συμπιέζεται η αύλακα του ενζύμου, επηρεάζοντας την είσοδο και τη σύνδεση των εντομοκτόνων στο ενεργό κέντρο (Harel et al., 2000). Τέτοιου είδους μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στη *Drosophila melanogaster* (Fournier et al., 1992; Mutero et al., 1994), σε αρκετά είδη κουνουπιών (Vaughan et al., 1997; Weil et al., 2004), στην οικιακή μύγα *Musca domestica* (Williamson et al., 1992; Feyereisen, 1995; Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001), στην αφίδα του βαμβακιού *Aphis gossypii* (Andrews et al., 2004; Toda et al., 2004), όπως και σε είδη ημιπτέρων (Javed et al., 2003). Η μόνη καταγεγραμμένη μετάλλαξη εκτός της καταλυτικής περιοχής του ενζύμου είναι αυτή του δορυφόρου της πατάτας *Leptinotarsa decemlineata*, στην οποία η ανθεκτικότητα εικάζεται ότι συνδέεται με μία γενική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης (Zhu et al., 1996). Σε πολλές περιπτώσεις έχει καταγραφεί η ύπαρξη πολλών μεταλλάξεων στο ίδιο ένζυμο. Ο συνδυασμός αυτών των μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανθεκτικότητας (Menozzi et al., 2004; Mutero et al., 1994; Walsh et al., 2001), η οποία προκύπτει όχι τόσο από την προσθετική δράση των επιμέρους μεταλλάξεων αλλά από το γεγονός ότι κατά τη στερεοδιαμόρφωση του ενζύμου αυτές δεν παρουσιάζονται τελείως ανεξάρτητες μεταξύ τους αλλά βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο.

Οι κυριότερες μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικές ενώσεις περιγράφονται πιο κάτω (Fournier, 2005). Οι μεταλλάξεις παρουσιάζονται σύμφωνα με την θέσεις τους στην ώριμη πρωτεΐνη του *Torpedo californica* ώστε να είναι δυνατή η σύγκρισή τους. Η αρίθμηση ως προς την πρόδρομη πρωτεΐνη τοποθετείται σε αγκύλες.

Θέση 78

Η μετάλλαξη F139L, δηλαδή η μετατροπή της F στη θέση 139 σε L, έχει βρεθεί σε πληθυσμούς *Aphis gossypii* (*o-Ace*) (Li & Han, 2004), ενώ η μετάλλαξη F115[115]S έχει βρεθεί σε στέλεχος της *Drosophila* (Menozzi et al., 2004; Mutero et al., 1994). Η έκφραση της μετάλλαξης αυτής σε ανασυνδυασμένα ένζυμα των *Drosophila melanogaster, Lucilia cuprina* και *Aedes aegypti* έχει δείξει ότι σχετίζεται με ανθεκτικότητα (Chen et al., 2001; Vaughan et al., 1997; Mutero et al., 1994).

Θέση 119

Το αμινοξύ που βρίσκεται σε αυτή τη θέση εντοπίζεται στην οξυανιονική οπή (oxyanion hole). Η μετάλλαξη G[247]S έχει περιγραφεί σε πληθυσμούς των *Culex pipiens*, *Anopheles gambiae* και *Anopheles albimanus (p-Ace)* (Weil et al., 2003; Weil et al., 2004), ενώ η αντίστροφη μετάλλαξη S[228]G έχει περιγραφεί στο *Tetranychus urticae (*Anazawa et al., 2003).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Θέση 129

Η μετάλλαξη I161[199]V έχει βρεθεί σε πληθυσμούς της *Drosophila* (Mutero et al., 1994) και έχει εκφραστεί σε ανασυνδυασμένα ένζυμα στη *Lucilia cuprina* και *Drosophila melanogaster* και αποδείχθηκε ότι παρέχει χαμηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (Chen et al., 2001; Menozzi et al., 2004).

Θέση 151

Η μετάλλαξη V180[260]L έχει προσδιοριστεί σε στελέχη της οικιακής μύγας *M. domestica* και η έκφρασή της *in vitro* έδειξε ότι παρέχει περιορισμένη απευαισθητοποίηση στα εντομοκτόνα (Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001).

Θέση 227

Η γλυκίνη στη θέση 227 είναι υψηλά διατηρημένη μεταξύ της οικογένειας των ακετυλοχολινεστερασών. Η μετάλλαξη G265[303]A έχει βρεθεί σε πληθυσμούς της *Drosophila* (Mutero et al., 1994) και η μετάλλαξη G262[342]A/V σε ανθεκτικά στελέχη της *M. domestica* (Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001). Η μετάλλαξη αυξάνει την υδρόλυση του υποστρώματος και αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη που προσδίδει ανθεκτικότητα σε πληθυσμούς της δροσόφιλας (Menozzi et al., 2004; Shi et al., 2004).

Θέση 290

Στη θέση αυτή βρίσκεται συνήθως μία φαινυλανίνη η οποία ανήκει στα αρωματικά αμινοξέα που πλαισιώνουν το θύλακα ακυλίου (acyl pocket) (Harel et al., 2000). Οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί σε πληθυσμούς *Drosophila* και σε ανθεκτικά στελέχη της *M. domestica* είναι αντίστοιχα η F330[368]Y (Fournier et al., 1992) και F327Y (Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001).

Θέση 328

Η μετάλλαξη G365[445]A έχει βρεθεί σε ανθεκτικούς πληθυσμούς της οικιακής μύγας (Walsh et al., 2001) ενώ η μετάλλαξη G368[406]A σε πληθυσμούς της *Drosophila* (Menozzi et al., 2004).

Η ανάλυση της επίδρασης των τεσσάρων πιο διαδεδομένων μεταλλάξεων στο ένζυμο της *D. melanogaster* στην κινητική της υδρόλυσης του υποστρώματος έδειξε ότι αυτές κυρίως επηρεάζουν το ρυθμό απακετύλιωσης. Αντίθετα, η σύνδεση του υποστρώματος στην επιφάνεια της αύλακας, η ολίσθηση του προς το ενεργό κέντρο και η ακετυλίωση επηρεάζονται πολύ λίγο (Shi et al., 2004). Αυτό συνάδει με το γεγονός ότι η απακετυλίωση αποτελεί το περιοριστικό στάδιο στην υδρόλυση του υποστρώματος στα έντομα, όμως, είναι πιθανό η ανάλυση μεταλλάξεων να παρέχει παραδείγματα άλλων τροποποιήσεων.

11. ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Έρευνες στη δεκαετία του '70 κατέληγαν στο συμπέρασμα ότι ποσοτικές παρά ποιοτικές αλλαγές στο ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης σχετίζονταν με την ανθεκτικότητα του δάκου στο εντομοκτόνο dimethoate (Tsakas & Krimbas, 1970; Krimbas & Tsakas, 1971; Tsakas, 1977). Ως κύρια αιτία θεωρήθηκε πιθανός διπλασιασμός του γονιδίου. Τρεις δεκαετίες αργότερα αποδείχθηκε ότι ποιοτικές αλλαγές του ενζύμου ήταν υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και συγκεκριμένα δύο μεταλλάξεις η I214V και η G488S (Vontas et al., 2001; 2002).

Το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης στο δάκο παρουσιάζει ένα ανοιχτό πλαίσιο 2022 bp, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 673 αμινοξέων, παρουσιάζοντας 79% ομοιότητα με την πρωτεΐνη της *D. melanogaster* των 649 αμινοξέων (Vontas et al., 2002).

Μετάλλαξη I214V

Είναι η πρώτη μετάλλαξη η οποία εντοπίστηκε σε ένα ανθεκτικό στέλεχος του δάκου από την Αττική (Vontas et al., 2002). Προκύπτει από μεταλλαγή του ATA κωδικονίου στη θέση 642 σε GTA και οδηγεί σε αντικατάσταση μιας ισολευκίνης σε βαλίνη. Η μετάλλαξη αυτή I214V είναι ισοδύναμη με την I199V της δροσόφιλας, η οποία εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας χαμηλών επιπέδων (Mutero et al., 1994). Ο ρόλος της μετάλλαξης έχει μελετηθεί με λεπτομέρεια στη δροσόφιλα. Η τρισδιάσταση δομή του ενζύμου αποκάλυψε ότι η ισολευκίνη της θέσης 199 εντοπίζεται στη βάση της αύλακας του ενεργού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

αύλακα και αλληλεπιδρά με την τρυπτοφάνη 121. Η τρυπτοφάνη 121 συμμετέχει στην ανιονική θέση, η οποία αναγνωρίζει και συνδέει την τριμεθυλαμμωνική ομάδα [-N(CH_3)$_3$] της ακετυλοχολίνης ή της ομάδας X (leaving group) του εντομοκτόνου (Harel et al., 2000). Η υποκατάσταση της ισολευκίνης από τη βαλίνη αλλάζει την κινητικότητα της τρυπτοφάνης 121, αυξάνοντας την ελευθερία της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της πρόσβασης των μορίων του εντομοκτόνου στο καταλυτικό κατάλοιπο της σερίνης και οδηγεί στη μείωση του ρυθμού της απακετυλίωσης. Η μεταλλαγμένη ακετυλοχολινεστεράση αναστέλλεται λιγότερο, μειώνοντας τη φωσφορυλίωση και οδηγώντας στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Παρόλο που η βαλίνη είναι μικρότερη από την ισολευκίνη και μειώνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, η ακετυλοχολίνη μπορεί να συνδέεται ακόμη ικανοποιητικά στη σερίνη με αποτέλεσμα να μην διακόπτεται η χολινεργική μεταβίβαση (Shi et al., 2004). Ένας παρόμοιος ρόλος εικάζεται για τη μετάλλαξη του δάκου.

Μετάλλαξη G488S

Η μετάλλαξη αυτή προσδιορίστηκε στο ίδιο ανθεκτικό στέλεχος της Αττικής όπως και η I214V και σε συνδυασμό μαζί της προσφέρει 16 φορές μεγαλύτερη ανθεκτικότητα (Vontas et al., 2002). Η γλυκίνη στη θέση 488 στο ένζυμο του δάκου είναι υψηλά συντηρημένο κατάλοιπο μεταξύ των ειδών, καταδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτεΐνη, δομικό ή/και λειτουργικό. Το κατάλοιπο αυτό είναι ισοδύναμο με το G474 της δροσόφιλας (Sussman et al., 1991; Mutero et al., 1994). Παρά το γεγονός ότι οι υποκαταστάσεις συντηρημένων αμινοξέων μεταξύ των ειδών είναι συνήθως υπεύθυνες για ανθεκτικότητα λόγω τροποποίησης του στόχου (ffrench-Constant et al., 1998), η μετάλλαξη G488S έχει καταγραφεί μόνο στο *Bactrocera oleae* και στο *Bactrocera dorsalis* (Vontas et al., 2002; Hsu et al., 2006) και προκύπτει από μεταλλαγή του κωδικονίου GGS σε AGC. Η ανάλυση της μετάλλαξης βασιζόμενη στο μοντέλο της δροσοφιλας (Harel et al., 2000) έδειξε ότι η ανθεκτικότητα προκύπτει από στερεοχημική παρεμπόδιση που προκύπτει από τη μετάλλαξη. Η G488S βρίσκεται στην έλικα κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην περιοχή αυτή τα α-άτομα του άνθρακα των αμινοξέων είναι πολύ μικρά (3.5 Å). Συνεπώς, η οποιαδήποτε αλλαγή αμινοξέος η οποία θα προκαλέσει αλλαγή στην πλευρική αλυσίδα θα οδηγήσει σε εκτόπιση της έλικας. Η αντικατάσταση της γλυκίνης από τη σερίνη, ένα πιο ογκώδες αμινοξύ, είναι πιθανόν να επηρεάζει τη διευθέτηση της γειτονικής γλουταμίνης που συμμετέχει στην καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου. Ο διαφορετικός αυτός προσανατολισμός της γλουταμίνης ενισχύει την πυρηνόφιλη προσβολή του νερού στην καρβονυλική ομάδα της φωσφορυλιωμένης σερίνης (Vontas et al., 2002). Ο ίδιος ρόλος προτάθηκε και για τη μετάλλαξη G365A της οικιακής μύγας *Musca domestica* (Walsh et al., 2001).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΣΚΟΠΟΣ

Η ακετυλοχολινεστεράση μελετάται εδώ και δεκαετίες, αλλά ακόμη και σήμερα συνεχίζει να προσφέρει συναρπαστικά και θεμελιώδη ερωτήματα γύρω από θέματα όπως η συντήρηση και οργάνωση του γονιδιακού της τόπου μεταξύ των οργανισμών, η εξέλιξη, η δράση, η βιοσύνθεση, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της, ο ρόλος και η συμμετοχή της σε ασθένειες ή/και στην ανθεκτικότητα.

Η μελέτη του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης στο έντομο *Bactrocera oleae* υπαγορεύτηκε από την ανάγκη διερεύνησης του ρόλου του γονιδίου στην πίεση επιλογής των εντομοκτόνων και την εμφανιζόμενη ανθεκτικότητα των πληθυσμών του εντόμου. Έτσι, η βασική κατεύθυνση της παρούσας μελέτης πάνω στην οποία έγινε η οργάνωση και ο χρονικός προγραμματισμός της, ήταν να παρέχει κατά το δυνατόν ολοκληρωμένα στοιχεία για τη δομή και την οργάνωση του γονιδίου στο δάκο αλλά και την εξέλιξη αυτού στο βασίλειο των εντόμων, συμπληρώνοντας ένα σημαντικό κρίκο στην εικόνα που υπάρχει σήμερα για την ακετυλοχολινεστεράση. Παράλληλα, η απομόνωση και ανάλυση του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου θα συνεισφέρει σε επιπλέον γενετικές πληροφορίες για την αύξηση των μέχρι πρότινος ελλιπών γνώσεων σχετικών με τη γενετική και μοριακή βάση του εντόμου. Σημαντικό βήμα επίσης θα αποτελέσει και στην προσέγγιση του υποκινητή. Γενικά, λίγα είναι γνωστά για τη γονιδιακή ρύθμιση της ακετυλοχολινεστεράσης των εντόμων και ακόμη λιγότερα για τους υποκινητές του δάκου. Ο υποκινητής θα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ρύθμιση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης των εντόμων καθώς και τον προσδιορισμό των στοιχείων εκείνων που είναι απαραίτητα για την κατασκευή ενός ανθεκτικού γονιδίου το οποίο μπορεί να φανεί χρήσιμο ως ένας δείκτης επιλογής ανθεκτικών ατόμων κατά τη προσπάθεια του γενετικού μετασχηματισμού του εντόμου.

Εκτός από την μοριακή οργάνωση της ακετυλοχολινεστεράσης, η ανακάλυψη μιας νέας μετάλλαξης έθεσε στο στόχαστρο της παρούσας μελέτης και ένα πιο ειδικό θέμα, τη διερεύνηση του ρόλου της. Η νέα μετάλλαξη αναλύθηκε ως προς τη συσχέτισή της με την ανθεκτικότητα, τη λειτουργία της και γενικότερα ως προς το πλεονέκτημα που προσφέρει στην ανταπόκριση του εντόμου στα εντομοκτόνα. Τέλος, ειδικό μέρος του κεφαλαίου της νέας μετάλλαξης αποτέλεσε η γενετική ανάλυση της μέσω ατομικών διασταυρώσεων του εντόμου, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση της σε επίπεδο οργανισμού.

.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

1.1 Εκτροφή εντόμου

1.1.1 Καλλιέργεια του εντόμου Bactrocera oleae

Στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε το ολομετάβολο Δίπτερο έντομο *Bactrocera oleae*. Ο εργαστηριακός πληθυσμός προέρχεται από την αποικία του Εργαστηρίου Εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" με κωδικό ΑΤ (από τα αρχικά της Αγίας Τριάδας Ευβοίας, περιοχή όπου συλλέχθηκε ο φυσικός πληθυσμός) που εγκαθυδρίθηκε στο εντομοτροφείο πριν από περίπου 40 χρόνια. Η εκτροφή του εντόμου διατηρείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 23°C ± 2°C, σχετικής υγρασίας 65% ± 5°C και φωτοπερίοδο 12:12 (φώς:σκοτάδι).

1.1.2 Ενήλικα άτομα

Τα ενήλικα άτομα του πληθυσμού (~ 200 άτομα) διατηρούνται σε κλουβί διαστάσεων τουλάχιστον 30 cm x 30 cm x 30 cm (7-8 άτομα /lt, Hagen et al., 1963), το υλικό του οποίου μπορεί να είναι είτε ξύλο, είτε πλαστικό είτε πλεξιγκλάς. Στις δύο πλευρές του κλουβιού υπάρχουν οπές καλυμμένες με εντομοστεγές δίχτυ για να επιτρέπεται ο αερισμός. Το κλουβί θα πρέπει να προσφέρει στο έντομο ελεύθερο χώρο κίνησης καθώς και θέσεις μειωμένου φωτισμού, διότι ο δάκος δεν προτιμά το συνωστισμό και τη συνεχή έκθεση σε φως. Η εναπόθεση των αυγών πραγματοποιείται σε υπόστρωμα ωοτοκίας, δηλαδή κώνο κατασκευασμένο από οργαντίνα. Ο κώνος εμβαπτίζεται σε μείγμα παραφίνης, ώστε να δημιουργηθεί ένα λεπτό στρώμα το οποίο τα θηλυκά μπορούν να διαπεράσουν με τον ωοθέτη τους (Economopoulos & Tzanakakis, 1967). Ο κώνος διαπερνά το κλουβί με τρόπο που να επιτρέπει την συλλογή των αυγών (Εικόνα 2-1), ενώ στην κορυφή του υπάρχει νωπός σπόγγος για τη διατήρηση ικανοποιητικής υγρασίας στο εσωτερικό για όσο διάστημα τα αυγά παραμένουν σε αυτόν. Η τροφή των ενήλικων ατόμων είναι στερεή και παρέχεται σε τρυβλίο petri Ø30 mm, ενώ το απαραίτητο νερό προσλαμβάνεται απομυζώντας νωπό σπογγώδες υλικό (wettex). Αν και τα ενήλικα άτομα μπορούν να επιβιώσουν ικανοποιητικά όταν τους παρέχεται νερό και σουκρόζη, εντούτοις η ωοπαραγωγή τους είναι σημαντικά μεγαλύτερη όταν χορηγείται και πηγή αμινοξέων (Tsiropoulos, 1977).

Εικόνα 2-1: Κλουβί εκτροφής δάκου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1.1.3 Συλλογή αυγών

Τα ενήλικα άτομα είναι ώριμα για αναπαραγωγή περίπου την τέταρτη ημέρα της ζωής τους, ενώ η καλύτερη περίοδος συλλογής των αυγών καταγράφεται από την έβδομη έως τη δέκατη πέμπτη ημέρα. Τα θηλυκά άτομα μιμούμενα τη φύση, όπου τρυπούν τον καρπό για να εναποθέσουν τα αυγά, διαπερνούν το συνθετικό ύφασμα του κώνου με τον ωοθέτη τους και αφήνουν τα αυγά στο εσωτερικό του κώνου. Η συλλογή των αυγών πραγματοποιείται ανά δεύτερη ημέρα με dH_2O, το οποίο συμπαρασύρει τα αυγά από την κορυφή στη βάση του κώνου, όπου συλλέγονται και τοποθετούνται σε διηθητικό χαρτί εμβαπτισμένο σε διάλυμα προπιονικού οξέος 0.3%. Τα αυγά παραμένουν για 48 ώρες στο διάλυμα και διατηρούνται σε σχετική υγρασία 90% μέχρι να εκκολαφθούν. Το προπιονικό οξύ χρησιμοποιείται ως αντιμυκητιακός παράγοντας. Η επώαση των αυγών σε αυτό κρίνεται απαραίτητη διότι τα συντηρητικά και η υψηλή οξύτητα της τροφής των προνυμφών μπορεί να προκαλέσουν το θάνατο.

1.1.4 Προνυμφικό στάδιο

Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες μεταφέρονται σε τροφή προνυμφών και διατηρούνται εκεί ωσότου νυμφωθούν (~ 8 ημέρες) σε θερμοκρασία 24 °C.

1.1.5 Νυμφικό στάδιο

Οι νύμφες συλλέγονται και τοποθετούνται σε τρυβλία petri μέχρι να ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση τους σε ενήλικα άτομα. Μόλις τα ενήλικα άτομα εκκολαφθούν, συλλέγονται και τοποθετούνται σε κλουβί, ώστε να συνεχιστεί η καλλιέργεια. Σε εργαστηριακές συνθήκες, ο κύκλος ολοκληρώνεται περίπου σε 30 ημέρες. Η εκκόλαψη των ενήλικων ατόμων μπορεί να καθυστερήσει με διατήρηση των νυμφών σε θάλαμο θερμοκρασίας 16°C.

1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων

Η καλλιέργεια βακτηρίων αποσκοπεί στην ανάπτυξη μεγάλου αριθμού γενετικά πανομοιότυπων κυττάρων–κλώνων, τα οποία μετέπειτα θα χρησιμοποιηθούν σε συγκεκριμένες τεχνικές της μοριακής βιολογίας ή της βιοτεχνολογίας. Η καλλιέργεια των βακτηρίων απαιτεί την παροχή θρεπτικού υλικού σε αυτά, ώστε να αναπτυχθούν. Το επιλεγμένο μέσο για την καλλιέργεια αποτελεί ένα υπόστρωμα υγρό (σε σωλήνες) ή στερεό (σε τρυβλία petri), το οποίο μπορεί να παρέχει σε ένα μικροοργανισμό όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη του. Τα θρεπτικά συστατικά πρέπει να εξασφαλίζουν πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου, αμινοξέα και διάφορα μεταλλικά ιόντα. Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται για χρονικό διάστημα το οποίο ποικίλλει ανάλογα με το ρυθμό διαίρεσης του κάθε βακτηρίου (12 έως 76 ώρες) και σε συγκεκριμένες φυσικοχημικές συνθήκες (οξυγόνο, θερμοκρασία, pH) που εξαρτώνται επίσης από τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά του βακτηρίου. Πολλές φορές το θρεπτικό μέσο περιέχει επίσης αντιβιοτικό, ώστε να εξασφαλίζεται η ανάπτυξη μόνο του επιθυμητού στελέχους.

1. Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου επιστρώνεται σε τρυβλίο petri που περιέχει στερεό θρεπτικό υλικό, το επιθυμητό βακτηριακό στέλεχος από stock γλυκερόλης και επωάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 12-16 ώρες.
2. Μοναδική βακτηριακή αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο και ενοφθαλμίζεται σε σωλήνα καλλιέργειας, ο οποίος περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο και ακολουθεί επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία υπό ανάδευση (220 rpm) για 12-16 ώρες.

Σημείωση

✓ Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών στην καλλιέργεια.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων από βιολογικό υλικό απαιτεί τη λύση των κυττάρων, την απενεργοποίηση των κυτταρικών νουκλεασών και το διαχωρισμό του επιθυμητού νουκλεϊκού οξέος από τα κυτταρικά υπολείμματα. Η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται είτε με μηχανική διάρρηξη είτε με εφαρμογή χημικών ή ενζύμων, πρέπει να είναι αφενός ισχυρή ώστε να τμηματοποιήσει το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

βιολογικό υλικό και αφετέρου ήπια ώστε να διατηρηθεί ακέραιο το επιθυμητό νουκλεϊνικό οξύ. Η απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών πραγματοποιείται με χρήση ισχυρών χαοτροπικών αλάτων, ενώ η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων επιτυγχάνεται με φιλτράρισμα ή κατακρήμνιση.

2.1 Απομόνωση DNA

2.1.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα Bactrocera oleae *(Fly preps)*

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται, αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που προτείνεται από τον Ashburner (1989). Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου σε διάλυμα, το οποίο περιέχει: α. σουκρόζη και NaCl για τη διατήρηση της οσμωτικότητας, (ώστε να μη γίνει απότομη ρήξη των μεμβρανών), β. SDS για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων στη θερμοκρασία των 65°C, γ. ρυθμιστικό διάλυμα Tris, για τη διατήρηση του pH σε ουδέτερη περιοχή και δ. EDTA για τη παρεμπόδιση της δράσης νουκλεασών, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα (Ca^{+2}, Mg^{+2}). Η κατακρήμνιση των κυτταρικών υπολειμμάτων και μέρος των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης οξικού καλίου. Η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με εκχύλιση φαινόλης/χλωροφορμίου, ενώ η συγκέντρωση του DNA με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

1. Ένα ενήλικο άτομο δάκου τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf, το οποίο περιέχει Διάλυμα Ομογενοποίησης (100 μl).
2. Το έντομο ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου και το ομογενοποίημα επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 30 λεπτά.
3. Προστίθεται Διαλύμα Οξικού καλίου (CH_3COOK) σε τελική συγκέντρωση 1 M, ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.
4. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 15 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
5. Το διάλυμα εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη.
6. Το ίζημα αναδιαλύεται σε Ρυθμιστικό Διάλυμα TE (100 μl) και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C για σύντομο και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αντίστοιχα.

Σημειώσεις

- ✓ Η αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C δε συνίσταται όταν απαιτείται η διατήρηση μεγαλομοριακού DNA.
- ✓ Η διάσπαση του μεγαλομοριακού DNA μπορεί να προκληθεί από τη παρουσία ενδοκυτταρικών ενδονουκλεασών, την αλλαγή του pH καθώς και από μηχανικές δράσεις. Όσο πιο ισχυρές είναι οι μέθοδοι καθαρισμού τόσο μικρότερο είναι το μέσο μήκος των τμημάτων DNA που λαμβάνονται.
- ✓ Η διαλυτοποίηση του ιζήματος DNA μπορεί να διευκολυνθεί με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες ή σε θερμοκρασία 65°C για μία ώρα.

2.1.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα Bactrocera oleae *με χρήση του Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega).*

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιείται με παραλλαγή του πρωτοκόλλου που δίδεται στο εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων, την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών παρουσία αλάτων και τη συγκέντρωση του DNA με κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη.

1. Ένα ενήλικο άτομο δάκου τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf, το οποίο περιέχει Διάλυμα Λύσης Πυρήνων (400 μl, Nuclei Lysis Solution) διατηρημένο σε πάγο.
2. Το έντομο ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου και το ομογενοποίημα επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 25 λεπτά.
3. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται Διάλυμα Κατακρήμνισης Πρωτεϊνών (135 μl, Protein Precipitation Solution) και ύστερα από ισχυρή ανάδευση επωάζεται σε πάγο για 5 λεπτά.
4. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

5. Προστίθεται ισοπροπανόλη (400 μl) και μετά από ήπια ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 λεπτά.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθεται στο ίζημα παγωμένη αιθανόλη 70% (500 μl) και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 2 λεπτά.
7. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το ίζημα ενυδατώνεται με τη προσθήκη Διαλύματος Ενυδάτωσης DNA (100 μl, DNA Rehydration solution) και επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 1 ώρα.
9. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C.

2.2 Απομόνωση RNA

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα άτομα Bactrocera oleae *με χρήση του Absolutely RNA® Miniprep kit (Stratagene).*

Ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο περιέχει περίπου 10^{-5} μg RNA από το οποίο το 80-85% είναι ριβοσωμικό, ένα ποσοστό ~15% είναι tRNA και μικρό πυρηνικό RNA και μόνο το 1-5% είναι αγγελιοφόρο mRNA. Το RNA είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη δράση των ριβονου-κλεασών. Η απομόνωση ανέπαφου RNA απαιτεί την προσθήκη στο διάλυμα ομογενοποίησης ισχυρών χαοτροπικών παραγόντων όπως η ισοθειοκυανική γουανιδίνη, η οποία απελευθερώνει το RNA από τη σύνδεση του με τις ριβοπρωτεΐνες και παράλληλα απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες.

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας και περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου σε διάλυμα λύσης, το οποίο περιέχει: α. ισοθειοκυανική γουανιδίνη και β. β-μερκαπτοαιθανόλη (ισχυρός αναγωγικός παράγοντας), η οποία απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες, διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση, ενώ το RNA διαχωρίζεται από τις πρωτεΐνες με την επιλεκτική του πρόσδεση σε στήλη πυριτίου υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος. Η αποτελεσματικότερη απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιείται με εφαρμογή δεοξυρι-βονουκλεάσης (DNase I).

1. Ένα ενήλικο άτομο δάκου τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf, το οποίο περιέχει Διαλύμα Λύσης (200 μl, Lysis Buffer) και β-μερκαπτοαιθανόλη 14.2 M (1.4 μl, β-ΜΕ).
2. Το έντομο ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου και το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε στήλη (Prefilter Spin Cup), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής (Receptable tube).
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 λεπτά, απόρριψη της στήλης και προσθήκη στο έκλουσμα ίσου όγκου αιθανόλης 70%.
4. Το μείγμα αναδεύεται ήπια, μεταφέρεται σε στήλη σύνδεσης RNA (RNA Binding Spin Cup), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 λεπτό.
5. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη. Προστίθεται 1Χ Διάλυμα Πλύσης χαμηλής ιοντικής ισχύος (600 μl, 1X Low-Salt Wash Buffer) στη στήλη και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 λεπτό.
6. Το έκλουσμα απορρίπτεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 2 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.
7. Προστίθεται Διάλυμα DNάσης I (50 μl DNase Digestion Buffer + 5 μl DNase I) στη στήλη και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά.
8. Προστίθεται 1Χ Διάλυμα Πλύσης υψηλής ιοντικής ισχύος (600 μl, 1X High-Salt Wash Buffer) στη στήλη και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 λεπτό.
9. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής, προστίθεται στη στήλη 1Χ Διαλύματος Πλύσης χαμηλής ιοντικής ισχύος (600 μl) και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 λεπτό.
10. Ακολουθεί απομάκρυνση του εκλούσματος από το σωλήνα συλλογής, προσθήκη στη στήλη 1Χ Διαλύματος Πλύσης χαμηλής ιοντικής ισχύος (300 μl) και φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.

11. Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προστίθεται Διάλυμα Έκλουσης (50 μl, Elution Solution), το οποίο έχει προθερμανθεί σε θερμοκρασία 60°C.

12. Ακολουθεί επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά ώστε να ενυδατωθεί και πραγματοποιείται έκλουση του RNA με φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 2 λεπτά.

13. Το RNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C και -80°C για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα, αντίστοιχα.

Σημειώσεις
- ✓ Τα ενήλικα άτομα δάκου που χρησιμοποιούνται καταψύχονται σε θερμοκρασία -20°C, ενώ είναι ακόμη ζωντανά, ώστε να αποφευχθεί η μετά θάνατον αποικοδόμηση του RNA.
- ✓ Όλος ο εξοπλισμός που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί (έμβολα, ακροφύσια, σωληνάκια τύπου eppendorf) υφίστανται κατεργασία με διάλυμα DEPC, το οποίο αδρανοποιεί τις RNάσες.
- ✓ Η χρήση των γαντιών καθ' όλη τη διάρκεια κρίνεται απαραίτητη διότι τα λίπη των δαχτύλων αποτελούν πηγή RNάσων.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

2.3.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Η πλήρης και αποτελεσματική απομόνωση ενός λειτουργικού μακρομορίου από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει: α. την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, β. τη λύση των κυττάρων και γ. την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, και απαιτεί : α. την αποτελεσματική αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος, β. την τήρηση συνθηκών οι οποίες είτε αναστέλλουν είτε καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά την λύση των βακτηριακών κυττάρων και γ. το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Το πρωτόκολλο που ακολουθεί αποτελεί τροποποίηση των μεθόδων των Birnboim & Doly (1979) και Ish-Horowicz & Burke (1981). Η διαδικασία συνίσταται στη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων και την αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του κυτταρικού τους τοιχώματος, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών και το σχηματισμό αδιάλυτου ιζήματος όταν πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση με οξικό κάλιο. Η αναδιάλυση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται παρουσία Tris για τη διατήρηση του pH, EDTA για την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση της δράσης νουκλεασών και γλυκόζης για τη διατήρηση της οσμωτικότητας. Το SDS (θειικό δωδεκύλιο) διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της μεμβράνης, ενώ το NaOH καταστρέφει τους δεσμούς H^+ και Van der Waals της δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών. Η υψηλή συγκέντρωση των αλάτων καθιστά το KDS αδιάλυτο και οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και τα υπολείμματα του κυττάρου κατακρημνίζονται σε σύμπλοκα αλάτων-απορρυπαντικών. Η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA και του βακτηριακού RNA παραμένει διαλυτή και μπορεί να συλλεχθεί ύστερα από φυγοκέντρηση του υπερκειμένου, εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το πλασμιδιακό DNA απαλλάσσεται από το βακτηριακό RNA με αναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει RNάση A (RNase A).

1. Βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

2. Ποσότητα της βακτηριάκης καλλιέργειας (1.5 ml) μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και φυγοκεντρείται σε 3,000 g για 3 λεπτά.

3. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται και το σωληνάκι τύπου eppendorf αναστρέφεται για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα θρεπτικού μέσου.

4. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύεται σε παγωμένο Διάλυμα I (100 μl) με ισχυρή ανάδευση και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

5. Προστίθεται πρόσφατα παρασκευασμένο Διάλυμα II (200 μl), ακολουθώντας ήπια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ανάδευση και επώαση σε πάγο για λιγότερο από 5 λεπτά.

6. Προστίθεται παγωμένο Διάλυμα III (150 μl) και μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα επωάζεται σε πάγο για 6-8 λεπτά.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12,000 g για 10 λεπτά και συλλογή του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
8. Το διάλυμα εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη.
9. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε Ρυθμιστικό Διάλυμα ΤΕ (100 μl), το οποίο περιέχει RNάση A (RNase A) σε συγκέντρωση 20 μg/ml.
10. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C.

Σημειώσεις

- ✓ Η απόδοση της μεθόδου για πλασμίδια πολλαπλών αντιγράφων (high copy number) κυμαίνεται από 3 έως 5 μg DNA / 1 ml αρχικής καλλιέργειας.
- ✓ Η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο μπορεί να παραληφθεί εάν το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιείται μόνο για κατάτμηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες με σκοπό τη χαρτογράφηση ή την απομόνωση του κλωνοποιημένου ενθέματος.
- ✓ Στη περίπτωση όπου απαιτείται η ανάλυση της πρωτοδιάταξης του κλώνου η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο πραγματοποιείται μετά την επαναδιάλυση του ιζήματος σε ΤΕ/RNάση και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH_2O.

2.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση του Invisorb® Spin Plasmid Mini Two kit (Invitek)

Η μέθοδος συνίσταται στο συνδυασμό της αλκαλικής λύσης για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και της επιλεκτικής πρόσδεσής του σε ειδική στήλη, η σύσταση της οποίας δεν δίνεται. Η απομόνωση πραγματοποιείται σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας.

1. Βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Ποσότητα της βακτηριάκης καλλιέργειας (1.5 ml) μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 λεπτό.
3. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το σωληνάκι τύπου eppendorf αναστρέφεται για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα θρεπτικού μέσου.
4. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύεται σε Διάλυμα A (250 μl) με ισχυρή ανάδευση και προστίθεται Διάλυμα B (250 μl), ακολουθώντας ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για λιγότερο από 5 λεπτά.
5. Προστίθεται Διάλυμα C (250 μl) και μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 λεπτά.
6. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη (Spin Filter), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής (Receiver Tube) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και φυγοκέντρηση σε 10,000 g για 1 λεπτό.
7. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη. Προστίθεται Διάλυμα Πλύσης (750 μl, Wash Solution) στη στήλη και φυγοκεντρείται σε 10,000 g για 1 λεπτό.
8. Το έκλουσμα απορρίπτεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 3 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη του Διαλύματος Πλύσης.
9. Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προστίθεται Διάλυμα Έκλουσης (100 μl, Elution Solution), το οποίο έχει προθερμανθεί σε θερμοκρασία 60°C.
10. Ακολουθεί επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά ώστε να ενυδατωθεί και πραγματοποιείται έκλουση του DNA με φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 1-2 λεπτά.
11. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C

Σημείωση

- ✓ Το απομονωμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για κατάτμηση με περιοριστικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ενδονουκλεάσες με σκοπό τη χαρτογράφηση ή την απομόνωση του κλωνοποιημένου ενθέματος καθώς και για ανάλυση της πρωτοδιάταξης του.

3. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Η διαδικασία πραγματοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊνικών οξέων, λόγω της ιδιότητας της φαινόλης να αποδιατάσσει και να διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊνικά οξέα. Τα νουκλεϊνικά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία, μετά από φυγοκέντρηση, σχηματίζει την άνω φάση λόγω της μικρότερης πυκνότητάς της. Η παρουσία του χλωροφορμίου διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (0.5 V /0.5 V) και ακολουθεί ανάδευση έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική.
3. Η υδατική φάση, στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊνικά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1 V), και αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 λεπτά.
4. Ακολουθεί μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf και επανάληψη της εκχύλισης με χλωροφόρμιο.
5. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf και το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Σημειώσεις

- ✓ Εάν η φαινόλη δεν είναι εξισορροπημένη σε pH 7.8-8.0 τα νουκλεϊνικά οξέα τείνουν να συγκεντρώνονται στην οργανική φάση. Υπό όξινες συνθήκες η εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο προκαλεί τη συγκέντρωση του RNA στην υδατική φάση, ενώ του DNA και των πρωτεϊνών στη οργανική.
- ✓ Σε περίπτωση που η υδατική φάση παρουσιάζει αυξημένη πυκνότητα λόγω αλάτων (>0.5 M) ή σουκρόζης (>10%), θα σχηματίσει την κάτω φάση. Η προσθήκη της υδροξυκινολίνης αποσκοπεί στη σίγουρη αναγνώριση της οργανικής φάσης.
- ✓ Για να επιτευχθεί η μέγιστη ανάκτηση των νουκλεϊνικών οξέων, η οργανική φάση και μεσόφαση του βήματος III μετά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης μπορεί να επανα-εκχυλιστεί με προσθήκη ίσου όγκου ddH_2O. Μετά τη φυγοκέντρηση η δεύτερη αυτή υδατική φάση προστίθεται στη πρώτη.
- ✓ Η ανάμειξη της οργανικής και υδατικής φάσης πραγματοποιείται με ισχυρή ανάδευση (vortex) όταν απομονώνονται μόρια DNA μικρού μεγέθους (<10 kb) και με ήπια ανακίνηση όταν απομονώνονται μόρια DNA μέτριου μεγέθους (10-30 kb). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το μεγαλο-μοριακό DNA (>30 kb) όπου η ανάμειξη των δύο φάσεων πραγματοποιείται με περιστροφή σε 20 rpm, ώστε αυτό να μην τμηματοποιηθεί.

3.2 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται συνήθως για συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση νουκλεϊνικών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊνικά οξέα και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na^+, τα οποία συνδέονται σε αυτές. Με τον τρόπο αυτό μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών καταλοίπων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλλει στη θερμοκρασία όπου χρησιμοποιείται για να σχηματιστεί το ίζημα, στον τύπο και τη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρησης.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται Διάλυμα Οξικού νατρίου (CH_3COONa) τελικής συγκέντρωσης 0.3 M και περίπου διπλάσιος όγκος (2 -2.5 V) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

2. Το μείγμα, ύστερα από ισχυρή ανάδευση, τοποθετείται σε θερμοκρασία -80°C για 15 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 20 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται μισός όγκος αιθανόλης 70% (0.5 V), ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε υδατικό διάλυμα.

Σημειώσεις

- ✓ Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι αδιάλυτα σε διαλύματα αιθανόλης και διαλυτά σε διαλύματα αλάτων.
- ✓ Η κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη απαιτεί λιγότερο όγκο και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, γεγονός που ελαχιστοποιεί την ταυτόχρονη κατακρήμνιση αλάτων που μπορούν να εμποδίσουν τη χρήση των νουκλεϊνικων οξέων σε άλλες εφαρμογές.
- ✓ Η κατακρήμνιση νουκλεϊνικών οξέων μικρού μεγέθους (<100 nt) μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη $MgCl_2$ σε τελική συγκέντρωση 0.01 M.
- ✓ Η κατακρήμνιση μικρής ποσότητας νουκλεϊνικών οξέων μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη φορέων συγκατακρήμνισης (όπως γλυκογόνο, tRNA ζύμης, γραμμικό πολυακρυλαμίδιο). Οι φορείς αυτοί είναι αδιάλυτοι σε διαλύματα αιθανόλης και κατά τη φυγοκέντρηση δημιουργούν ίζημα το οποίο παγιδεύει τα νουκλεϊνικά οξέα.

3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊνικών οξέων

3.3.1 Με χρήση φασματοφωτόμετρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά σε μήκος κύματος 260 nm. Τιμή οπτικής πυκνότητας 1 (OD=1), αντιστοιχεί σε συγκέντρωση περίπου 50 μg/ml για δίκλωνο DNA, 40 μg/ml για μονόκλωνο DNA ή RNA και ~20 μg/ml για μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος των τιμών OD στα 260 προς 280 nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος OD_{260}/OD_{280} κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0 ενώ όταν το διάλυμα περιέχει πρωτεΐνες ή φαινόλη, η τιμή αυτή είναι σημαντικά μικρότερη.

3.3.2 Μέσω ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο ηλεκτροφορητικός ποσοτικός προσδιορισμός του DNA ενδείκνυται σε περιπτώσεις είτε χαμηλής συγκέντρωσης είτε μη καθαρότητας των προς ανάλυση διαλυμάτων. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με την ένωση βρωμιούχο αιθιδίο, τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή και η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Έτσι, σύγκριση του φθορισμού που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder), παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας του προς ανάλυση διαλύματος. Η εκτίμηση πραγματοποιείται είτε εμπειρικά είτε με ποσοτική σύγκριση σε προγράμματα επεξεργασίας εικόνας στον HY. Με αυτόν τον τρόπο κατά ελάχιστο 10 ng DNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% που περιέχει 0.5 gr βρωμιούχο αιθίδιο/ 1 ml διαλύματος.

Σημείωση

- ✓ Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορεί επίσης να εκτιμηθεί η ποιότητα του DNA, εάν δηλαδή αυτό είναι μεγαλομοριακό ή όχι.

3.4 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες απομονώνονται από βακτήρια, στα οποία ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να παρέχουν προστασία έναντι της εισβολής βακτηριοφάγων. Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3΄ σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Με τον τρόπο αυτό και ανάλογα με την αλληλουχία που αναγνωρίζουν δημιουργούνται τμή-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ματα DNA με τυφλά ή προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα. Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία επώασης και τη σύσταση του διαλύματος επώασης. Το διάλυμα επώασης καθορίζει την ιοντική ισχύ του περιβάλλοντος, στο οποίο θα δράσει το ένζυμο και μπορεί να είναι υψηλή, μέση ή χαμηλή. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος καθορίζεται κυρίως από ιόντα Mg^{+2} και Na^{+} που περιέχονται σε αυτό. Οι σουλφιδρυλικοί παράγοντες όπως η β-μερκαπταιθανόλη και διθειοθρεϊτόλη (που επίσης περιέχει το διάλυμα επώασης) αποσκοπούν στην αναστολή της δράσης νουκλεασών που ενδεχομένως υπάρχουν. Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεί συνάρτηση της ενεργότητάς του και της ποσότητας και μεγέθους του προς κατάτμηση DNA.

1. Σε σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθενται διαδοχικά το DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) του ενζύμου, η κατάλληλη ποσότητα ddH_2O έως τον τελικό όγκο και το ένζυμο.

DNA	V_{DNA}
Ρυθμιστικό διάλυμα	V_{buffer} = 1X
Ένζυμο	$V_{ενζ}$ = x units
ddH_2O	$V_{ddH2O} = V_{τελ} - V_{DNA} - V_{ενζ}$
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$

2. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται στην κατάλληλη για το χρησιμοποιούμενο ένζυμο θερμοκρασία (συνήθως 37°C) για 1-2 ώρες.

3. Η αντίδραση πέψης τερματίζεται είτε με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM είτε με επώαση του μείγματος στη θερμοκρασία απενεργοποίησης του ενζύμου.

Σημειώσεις

- ✓ Ως μονάδα ενεργότητας του ενζύμου (unit) ορίζεται συνήθως το ποσό ενζύμου (σε αντίδραση 20 μl) που απαιτείται για την κατάτμηση 1 μg DNA (μεγέθους 40 kb) σε μία ώρα στην απαιτούμενη θερμοκρασία.
- ✓ Η συγκέντρωση του ενζύμου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης, διότι μπορεί να προκληθεί αναστολή της δράσης του λόγω αυξημένης παρουσίας γλυκερόλης. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 50% και σε θερμοκρασία -20°C.
- ✓ Η ενεργότητα του ενζύμου μπορεί να μειωθεί σε συνθήκες υψηλού pH ή/και παρουσία οργανικών διαλύτων.
- ✓ Η ποσότητα του ενζύμου μπορεί να μειωθεί εάν αυξηθεί ο χρόνος επώασης της αντίδρασης.

3.5 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση του Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega)

Η ανάκτηση μορίων DNA μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατάσκευάστριας εταιρείας. Η διαδικασία περιλαμβάνει: α. την τήξη του πηκτώματος παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης που περιέχεται στο διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη (Membrane Binding Solution), β. τη σύνδεση του DNA σε μεμβράνες πυριτίου παρουσία χαοτροπικών αλάτων και γ. την έκλουση του DNA σε ddH_2O.

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προσδιορίζεται το βάρος του.

2. Προστίθενται 10 μl Διαλύματος Πρόσδεσης στη Μεμβράνη (Membrane Binding Solution) για κάθε 10 mg πηκτώματος.

3. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου επιτευχθεί η τήξη του πηκτώματος.

4. Το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη (SV Minicolumn), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής (Collection Tube) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση σε 16,000 g για 1 λεπτό.

5. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη. Προστίθεται Διάλυμα Πλύσης Μεμβράνης (700 μl, Membrane Wash Solution) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 16,000 g για 1 λεπτό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

6. Το έκλουσμα απομακρύνεται, προστίθεται στη στήλη Διάλυμα Πλύσης Μεμβράνης (500 μl) και αυτή φυγοκεντρείται για 5 λεπτά.
7. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής, επανατοποθετείται η στήλη και αυτή φυγοκεντρείται σε 14,000 g για επιπλέον 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.
8. Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προστίθεται υδατικό Διάλυμα Ελεύθερο Νουκλεασών (30-40 μl, Nuclease-Free water), το οποίο έχει προθερμανθεί σε θερμοκρασία 60°C.
9. Ακολουθεί επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά ώστε να ενυδατωθεί και πραγματοποιείται έκλουση του DNA με φυγοκέντρηση σε 16,000 g για 2 λεπτά.
10. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C.

Σημειώσεις

- ✓ Τμήματα DNA τα οποία έχουν μέγεθος μεγαλύτερο των 5 kb πρέπει να αναδεύονται ήπια κατά την επώαση τους με το διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη, ώστε να αποφευχθεί η κατάτμησή τους.
- ✓ Με το συγκεκριμένο σύστημα μπορεί να επιτευχθεί ανάλογα με το μέγεθος του DNA έως και 95% ανάκτηση της ηλεκτροφορημένης ποσότητάς του. Η μέγιστη δυνατότητα πρόσδεσης (binding capacity) της στήλης είναι περίπου 40 μg ανά στήλη, ενώ DNA ποσότητας 10 ng έχει απομονωθεί επιτυχώς.
- ✓ Υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο επώασης για να επιτευχθεί η τήξη τους.
- ✓ Το απομονωμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας σε αντιδράσεις αλληλούχισης, κλωνοποίησης, σήμανσης ή *in vitro* μεταγραφής.

4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλωνα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια. Ένα τυπικό πλασμίδιο-φορέας κλωνοποίησης πρέπει να περιέχει μία αφετηρία αντιγραφής, ώστε να μπορεί να αντιγράφεται στο βακτηριακό κύτταρο ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα, και μία θέση-στόχο για μία ενδονουκλεάση περιορισμού, ώστε να μπορεί να κατατμηθεί και να ενσωματώσει ένα ξένο τμήμα DNA. Συνήθως το πλασμίδιο περιέχει επιπλέον ένα γονίδιο για κάποια επιλέξιμη ιδιότητα, όπως η ανοχή στα αντιβιοτικά, που επιτρέπει την ταυτοποίηση των βακτηρίων τα οποία έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (Bolivar et al., 1977; Bernard, 1995).

4.1 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων

Η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων, αυτών δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας. Τα πλασμίδια-φορείς που χρησιμοποιούνται στην α-συμπληρωματικότητα φέρουν α. ένα τμήμα του DNA της *E.coli* που περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων του γονιδίου της β- γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) και β. την αλληλουχία του πολύσυνδέτη (polylinker) ενσωματωμένη (στο ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) στο γονίδιο *lacZ*. Ο πολύσυνδέτης δηλαδή δε διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο αλλά απλώς προσθέτει κάποια αμινοξέα στο προϊόν του γονιδίου. Οι φορείς αυτοί χρησιμοποιούνται σε βακτηριάκα στελέχη τα οποία κωδικοποιούν το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Με τον τρόπο αυτό ούτε οι φορείς ούτε τα κύτταρα μπορούν από μόνα τους να δώσουν μία ενεργή μορφή, μπορούν όμως να συνδυαστούν και να δώσουν μια ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη (Ullman et al., 1967). Τα *lac*+ βακτήρια γίνονται εύκολα αντιληπτά λόγω της δημιουργίας μπλε αποικιών παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal (Horwitz et al., 1964). Συνεπώς, εάν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδυαστεί, το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται κανονικά και σε συνδυασμό με τα γονίδια βακτηρίου-ξενιστή επιτρέπει το μεταβολισμό της ουσίας X-gal και της δημιουργίας μπλε αποικιών. Αντίθετα, εάν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *lacZ* διακόπτεται, το X-gal δεν μεταβολίζεται και ως αποτέλεσμα οι αποικίες που παράγονται έχουν χρώμα λευκό. Έτσι, παρουσία X-gal και IPTG, ο οποίος λειτουργεί ως επαγωγέας σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη στο θρεπτικό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

μέσο των τρυβλίων, οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παρουσιάζουν λευκό χρώμα, ενώ αυτές που περιέχουν το κανονικό πλασμίδιο είναι, κατά κανόνα, μπλε.

Ο πλήρης έλεγχος των ανασυνδυασμένων κλώνων πραγματοποιείται με απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, κατάτμηση με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα που διαχωρίζουν το κλωνοποιημένο DNA από τον φορέα του καθώς και με προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του ενθέματος.

4.2 Προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα για κλωνοποίηση

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις ομάδες με βάση τα άκρα που παρουσιάζουν, δηλαδή συμπληρωματικά, τυφλά και άκρα θυμίνης που χρησιμοποιούνται στην κλωνοποίηση προϊόντων PCR.

4.2.1 Συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα

Η διαδικασία περιλαμβάνει κατάτμηση με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση σε συγκεκριμένη θέση του πολυσυνδέτη ώστε να δημιουργηθούν τα επιθυμητά άκρα και απομάκρυνση των ακραίων φωσφορικών ομάδων ώστε να αποτραπεί η επανακυκλοποίηση του γραμμοποιημένου πλασμιδίου. Η αποφωσφορυλίωση του φορέα πραγματοποιείται με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, μια διμερή γλυκοπρωτεΐνη (CI- Calf Intestinal), η οποία καταλύει την αφαίρεση των φωσφορικών ομάδων από τα 5΄ άκρα του πλασμιδίου, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών με τα ελεύθερα 3΄ άκρα του και συνεπώς την επανακυκλοποίησή του (Seeburg et al., 1977; Ullrich et al., 1977).

1. Η επιθυμητή ποσότητα του πλασμιδιακού DNA πέπτεται με το κατάλληλο, για τη δεδομένη υποκλωνοποίηση, περιοριστικό ένζυμο.
2. Το ένζυμο απενεργοποιείται είτε με επώαση στην προτεινόμενη θερμοκρασία απενεργοποίησης είτε με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
3. Προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) του ενζύμου, η αλκαλική φωσφατάση (1 unit) και ο απαιτούμενος όγκος ddH_2O.

DNA	V_{DNA} (έχει υποστεί κατάτμηση)
Ρυθμιστικό διάλυμα	V_{buffer} = 1X
CIAP	$V_{ενζ}$ = 1 unit
ddH_2O	$V_{ddH2O} = V_{τελ} - V_{DNA} - V_{ενζ}$
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$

4. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
5. Προστίθεται επιπλέον ένζυμο (1 unit) και η επώαση συνεχίζεται για ακόμη 20 λεπτά.
6. Το δείγμα εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με αιθανόλη.
7. Το ίζημα αναδιαλύεται σε ddH_2O σε συγκέντρωση περίπου 50 ng/μl.

Σημειώσεις

- ✓ Το ρυθμιστικό διάλυμα της αλκαλικής φωσφατάσης πρέπει να περιέχει $ZnCl_2$ σε τελική συγκέντρωση 1 mM, διότι το κάθε μονομερές του ενζύμου φέρει δύο άτομα ψευδαργύρου, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενζυμική του δράση (Simsek et a., 1973).
- ✓ Η μονάδα του ενζύμου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που υδρολύει 1 μmol 4–nitrophenylphosphate σε θερμοκρασία 37°C σε 1 λεπτό.
- ✓ 2 μg γραμμοποιημένου πλασμιδιακού DNA μήκους 5 kb περιέχει περίπου 1.4 pmoles 5΄φωσφορικών καταλοίπων (5΄terminal phosphate residue).
- ✓ Η απομάκρυνση των 5΄φωσφορικών ομάδων από το RNA πραγματοποιείται με προσθήκη 0.01 unit αλκαλικής φωσφατάσης / pmoles των 5΄άκρων και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά και έπειτα 55°C για 30 λεπτά.

4.2.2 Φορέας Τ- άκρων

Η διαδικασία περιλαμβάνει την κατάτμηση του πλασμιδίου με περιοριστική ενδονουκλεάση σε θέση του πολυσυνδέτη η οποία δημιουργεί τυφλά άκρα και την επώαση του γραμμοποιημένου φορέα με Taq πολυμεράση παρουσία dTTPs, ώστε να προστεθούν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

στα 3΄ άκρα βάσεις θυμίνης (3΄-T overhangs). Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ιδιότητα των κοινών Taq DNA πολυμερασών (μη επιδιορθωτικού ελέγχου-non proofreading) να προσθέτει δεοξυαδενοσίνες στο 3΄ άκρο των δίκλωνων DNA μο-ρίων (Aslanidis & de Jong, 1990) με απο-τέλεσμα η υποκλωνοποίηση των προϊόντων PCR να πραγματοποιείται σε γραμμικό πλασμίδιο που έχει προεξέχοντα 3΄-T άκρα.

1. Ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα (~2-3 μg) υπόκειται κατάτμηση με περιοριστική ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει θέση εντός του πολυσυνδέτη δημιουργώντας τυφλά άκρα.
2. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
3. Το ίζημα αναδιαλύεται σε ddH_2O (20 μl), προστίθενται dTTPs σε τελική συγκέντρωση 2 mM, ρυθμιστικό διάλυμα Taq πολυμεράσης 1X, διάλυμα $MgCl_2$ 1.5mM και Taq πολυμεράση 2-3 units (Vτελ= 50 μl), και επωάζεται σε θερμοκρασία 72°C για 2 ώρες και 30 λεπτά.
4. Ακολουθεί εκχύλιση φαινόλης/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
5. Το ίζημα αναδιαλύεται σε ddH_2O σε συγκέντρωση περίπου 50 ng/μl.

4.3 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Η κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στην πιο απλή της μορφή περιλαμβάνει μια διαμοριακή αντίδραση στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με τη δράση DNA λιγάσης για το σχηματισμό μιας γραμμικής DNA χίμαιρας και ακολουθείται από κυκλοποίηση με την πρόσδεση των δύο εναπομείναντων άκρων. Η σύνδεση πραγματοποιείται με το σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5΄ φωσφορικών καταλοίπων (5΄-P) και των 3΄υδροξυλομάδων (3΄–OH) στην περίπτωση όπου ο φορέας δεν έχει υποστεί αποφωσφορυλίωση (διαφορετικά σχηματίζονται δύο δεσμοί). Ο σχηματισμός των δεσμών αυτών *in vitro* καταλύεται από τα ένζυμα : α. DNA λιγάση της *E.coli* και β. DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 με ταυτόχρονη υδρόλυση ενός μορίου NAD και ενός μορίου ATP, αντίστοιχα. Η T4 DNA λιγάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιείται κυρίως διότι έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα 3΄ ή 5΄) (Sgaramella & Khorana, 1972; Sgaramella & Ehrlich, 1978) σε αντίθεση με την λιγάση της *E.coli* που καταλύει τη σύνδεση μόνο τυφλών άκρων.

Σε μία αντίδραση σύνδεσης, ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου (δηλαδή ο λόγος των μορίων DNA προς τα μόρια του πλασμιδίου) θα πρέπει να είναι 1:1 έως 3:1. Η ποσότητα του DNA που κλωνοποιείται υπολογίζεται από τον τύπο: ng DNA = ng πλασμιδίου x a x b, όπου a ο μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου και b ο λόγος μεγέθους DNA/πλασμιδίου. Η αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA επηρεάζεται από μια σειρά παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, το είδος των άκρων του DNA (συμπληρωματικά ή τυφλά) και τη συγκέντρωση και το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA.

1. Η απαραίτητη ποσότητα του ενθέματος τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και διαδοχικά προστίθεται ο κατάλληλος πλασμιαδιακός φορέας (50 ng), το ρυθμιστικό διάλυμα της λιγάσης (1 X) και τελευταίο το ένζυμο της λιγάσης (1 u). Η ποσότητα του ddH_2O αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.

Ένθεμα	$V_{ένθεμα}$ (προϊόν κατάτμησης ή αντίδρασης PCR)
Φορέας	$V_{φορέα}$
Ρυθμιστικό διάλυμα	V_{buffer} = 1X
T4 DNA λιγάση	$V_{ενζ}$ = 1 unit
ddH_2O	$V_{ddH2O} = V_{τελ} - V_{DNA} - V_{ενζ}$
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

2. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 22°C για 2 ώρες και 30 λεπτά.
3. Το ένζυμο T4 DNA λιγάση απενεργοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 65°C για 15 λεπτά.
4. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό σε δεκτικά κύτταρα.

Σημειώσεις

- ✓ Στην περίπτωση σύνδεσης τμήματος με τυφλά άκρα απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ενζυμού (5 u) καθώς και προσθήκη PEG.
- ✓ Το PEG αυξάνει το ρυθμό σύνδεσης των τυφλών άκρων από 1 σε 3 τάξεις μεγέθους και αλλάζει την κατανομή των προϊόντων. Οι ενδομοριακές συνδέσεις αναστέλλονται και τα προϊόντα δημιουργούνται αποκλειστικά από διαμοριακές συνδέσεις.

4.4 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

Οι περισσότεροι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για βακτηριακό μετασχηματισμό βασίζονται στις παρατηρήσεις των Mandel & Higa (1970), οι οποίοι έδειξαν ότι βακτήρια κατεργασμένα με παγωμένο διάλυμα $CaCl_2$ αν θερμανθούν για μικρό χρονικό διάστημα, μπορούν να μετασχηματιστούν με DNA βακτηριοφάγου λ. Η έκθεση των βακτηρίων σε παγωμένο υποτονικό διάλυμα $CaCl_2$ έχει ως συνέπεια τη διόγκωση τους (σχηματισμός σφαιροπλαστών) και τη σύνδεση του DNA, αφού σχηματίσει ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, στην επιφάνεια των σφαιροπλαστών. Με μία σύντομη έκθεση του μείγματος σε υψηλή θερμοκρασία 42°C (heat shock) τα βακτηριάκα κύτταρα μπορούν να ενσωματώσουν τα σύμπλοκα DNA.

Ο ακριβής μηχανισμός του θερμικού σοκ και της εισαγωγής του DNA δεν είναι γνωστός. Πρόσφατη όμως έρευνα κατέδειξε ότι α. η διαφορά θερμοκρασίας που δημιουργείται με το θερμικό σοκ εσωτερικά και εξωτερικά της μεμβράνης του κυττάρου προκαλεί την απελευθέρωση λιπιδίων και πρωτεϊνών από την εξωτερική μεμβράνη, δημιουργώντας οπές από τις οποίες εισέρχεται το DNA και β. ότι η μεμβράνη εκπολώνεται, με αποτέλεσμα να προκαλεί την εισροή του αρνητικά φορτισμένου DNA ώστε να αποκατασταθεί το δυναμικό (Panja et al., 2008). Το στάδιο του θερμικού σοκ ακολουθεί επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο και χαμηλές στροφές ώστε να "επουλωθούν" και να εκφράσουν το γονίδιο της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό

Σημειώσεις

- ✓ Η καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων πρέπει να βρίσκεται στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Στο σημείο αυτό η συγκέντρωση των κυττάρων είναι περίπου 10^8 κύτταρα/ml και η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 550 nm είναι 0.5-0.6 μονάδες.
- ✓ Το στέλεχος που χρησιμοποιείται είναι το DH5α της *E. coli* ο γενότυπος του οποίου χαρακτηρίζεται από την έλλειψη Δ(lacZ)M15 που εκφράζει το καρβοξύ τμήμα της β γαλακτοσιδάσης, επιτρέποντας έτσι την εφαρμογή της α-συμπληρωματικότητας.
- ✓ Η απόδοση της αρχικής μεθόδου των Mandel & Higa (1970), η οποία κυμαίνεται από 10^5 έως 10^6 μετασχηματισμένες αποικίες/μg πλασμιδίου μπορεί να αυξηθεί από 100 έως 1000 φορές με έκθεση των βακτηριακών στελεχών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε δισθενή κατιόντα και κατεργασία με DMSO, αναγωγικούς παράγοντες και χλωριούχο εξαμινοκοβάλτιο (Kushner, 1978; Hanahan, 1983).

4.4.1α Παρασκευή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hanahan & Meselson (1983). Η απόδοση του μετασχηματισμού εξαρτάται από την καθαρότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στα διαλύματα, το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων, την καθαρότητα του εξοπλισμού ώστε να αποφευχθεί η παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων και άλλων χημικών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να έχει απόδοση έως ≥ 5×10^7 αποικίες/μg πλασμιδιακού DNA υπερελικωμένης μορφής.

1. Αναπτύσσεται βακτηριακή καλλιέργεια του στελέχους DH5α της *E.coli* σε υγρό θρεπτικό μέσο SOB (1 ml) εμπλουτισμένου με 20 mM $MgSO_4$.
2. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250 ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο SOB (100 ml) με 20 mM $MgSO_4$, και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) έως ότου η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να παρουσιάσει τιμή 0.45-0.55 μονάδες (OD_{600}=0.45-0.55).

1. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon όγκου 50 ml και ψύχεται σε πάγο για 10 λεπτά.
2. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και οι σωλήνες αναστρέφονται για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα θρεπτικού υλικού.
4. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα FSB (20 ml) με ήπια ανάδευση και διατηρούνται σε πάγο για 10 λεπτά.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, απομάκρυνση του υπερκειμένου και αναστροφή των σωλήνων για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα θρεπτικού υλικού.
6. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα FSB (4 ml) με ήπια ανάδευση και προστίθεται DMSO (140 μl). Αναδεύονται ήπια και διατηρούνται σε πάγο για 15 λεπτά.
7. Προστίθεται επιπλέον DMSO (140 μl), αναδεύονται ήπια και μοιράζονται σε κλάσματα (200 μl) σε παγωμένα σωληνάκια τύπου eppendorf.
8. Τα κλάσματα ψύχονται γρήγορα και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80°C.

4.4.1β Μετασχηματισμός με χημική μέθοδο

1. Κλάσμα (200 μl) χημικά παρασκευασμένων δεκτικών κυττάρων *E. coli* απομακρύνεται από τη θερμοκρασία αποθήκευσης -80°C και τήκεται σε πάγο.
2. Προστίθεται το ανασυνδυασμένο DNA (συνήθως η μισή ποσότητα της αντίδρασης σύνδεσης), η ποσότητα του οποίου δε μπορεί να υπερβαίνει περίπου το 5% του όγκου του κλάσματος, και ακολουθεί επώαση σε πάγο για 30 λεπτά.
3. Το μείγμα κυττάρων-DNA υφίστανται θερμικό σοκ με μεταφορά σε θερμοκρασία 42°C για 90 δευτερόλεπτα και αμέσως τοποθετούνται σε πάγο για 2 λεπτά.
4. Προστίθεται διάλυμα υγρού θρεπτικού μέσου SOC (1 ml) και όλο το μείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα καλλιέργειας, ο οποίος επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 45 λεπτά σε 180 rpm.
5. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία petri LB άγαρ–αμπικιλλίνης (100 μg/ml), προσθέτοντας X-gal και IPTG (για πιάτα 90 mm, X-gal: 30 μl από stock 20 mg/ml, IPTG:3 μl από stock 200 mg/ ml).
6. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες.

Σημείωση

✓ Όταν η επιλογή πραγματοποιείται με αμπικιλλίνη, τα μετασχηματισμένα βακτήρια πρέπει να επι-στρώνονται με χαμηλή πυκνότητα (<104 colonies per 90mm plate) και η επώση δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 20 ώρες σε θερμοκρασία 37°C διό-τι η β-λακταμάση που εκκρίνεται στο θρεπτικό με-σο από τα μετασχηματισμένα βακτήρια απενερ-γοποιεί γρήγορα το αντιβιοτικό στη περιοχή γύρω από τις αποικίες. Έτσι, επίστρωση σε υψηλή πυκνότητα ή για μεγάλο χρονικό διάστημα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ευαίσθητων μικροδορυφορικών αποικιών.

4.4.2α Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Neuman et al., 1982). Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυττάρων έως το μέσο της εκθετικής φάσης και διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος, ώστε να μειωθεί η ιονικής ισχύς του εναιωρήματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν απαιτεί το σχηματισμό σφαιροπλαστών. Τα κύτταρα αναδια-λύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10% σε συγκέ-ντρωση 3 x 10^{10} κύτταρα/ml και διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C. Η απόδοση κυμαίνεται από 10^9 έως 10^{10} αποικίες/μg DNA και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το μήκος του ηλεκτρικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

παλμού και η συγκέντρωση του DNA (Dower et al., 1988).

1. Αναπτύσσεται βακτηριακή καλλιέργεια του στελέχους DH5α της *E.coli* σε υγρό θρεπτικό μέσο SOB (1 ml) εμπλουτισμένου με 20 mM $MgSO_4$
2. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250 ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (100 ml), και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) έως ότου η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να παρουσιάσει τιμή 0.4-0.5 μονάδες (OD_{600}=0.4-0.5).
3. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon όγκου 50 ml και ψύχεται σε πάγο για 10 λεπτά.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναιωρούνται με ήπια ανάδευση σε παγωμένο ddH_2O (50 ml/falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
6. Επανάληψη του βήματος 5.
7. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4 ml/ falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250 μl/ falcon) και μοιράζονται σε κλάσματα (40 μl) σε παγωμένα σωληνάκια τύπου eppendorf.
9. Τα κλάσματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80°C

4.4.2β Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

1. Κλάσμα (40 μl) παρασκευασμένων για ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων *E. coli* απομακρύνεται από τη θερμοκρασία αποθήκευσης -80°C και τήκεται σε πάγο.
2. Προστίθεται το ανασυνδυασμένο DNA, η ποσότητα του οποίου κυμαίνεται από 10 pg έως 25 ng (2 μl από το 1/10 της αντίδρασης σύνδεσης) και ακολουθεί επώαση σε πάγο για 1 λεπτό.
3. Το μείγμα μεταφέρεται σε κατάλληλη παγωμένη κυψελίδα/κυβέττα διαμέτρου 0.2 cm και τοποθετείται στη θέση υποδοχής της συσκευής, οπότε και διέρχεται ρεύμα εντάσεως 13.8 kV/ cm για 5-6 msec.
4. Αμέσως προστίθενται διάλυμα υγρού θρεπτικού SOC (1 ml) και όλο το μείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα καλλιέργειας, ο οποίος επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 45 λεπτά σε 180 rpm.
5. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία petri LB άγαρ – αμπικιλλίνης (100 μg/ml), προσθέτοντας X-gal και IPTG [για πιάτα 90 mm, X-gal: 30 μl (από stock 20 mg/ml), IPTG:3 μl (από stock 200 mg/ ml)].
6. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες.

5. ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ

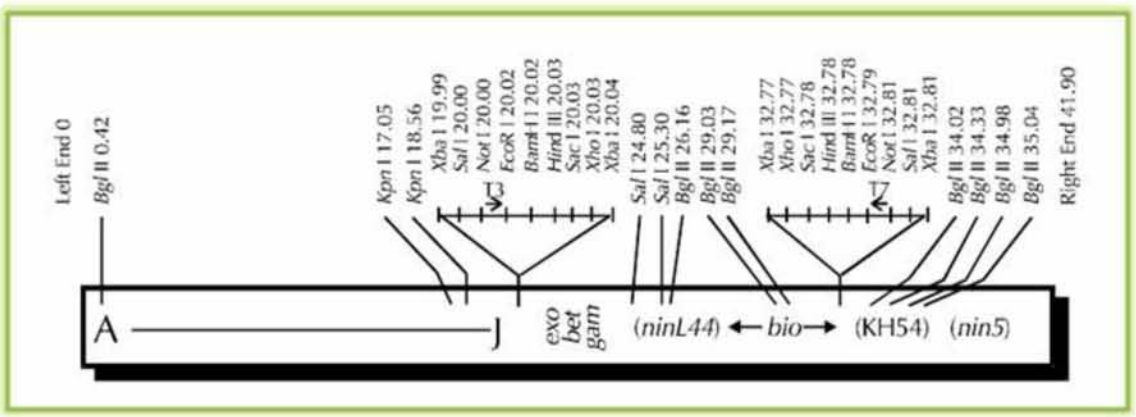
Οι βακτηριοφάγοι ή φάγοι είναι ιοί οι οποίοι προσβάλλουν βακτήρια. Τροποποιημένες μορφές των βακτηριοφάγων χρησιμοποιούνται ως φορείς (Murray & Murray, 1974; Rambach & Tiollais, 1974; Thomas et al., 1974). Ο καλύτερα μελετημένος και ευρέως χρησιμοποιούμενος βακτηριοφάγος είναι ο λ-φάγος που προσβάλλει το βακτήριο *E. coli*. Ένας πλήρως αναπτυγμένος λ-βακτηριοφάγος αποτελείται από την κεφαλή, που περιέχει συσκευασμένο το γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA (~50 kb), την ουρά, μέσω της οποίας διοχετεύεται το DNA της κεφαλής στο βακτήριο ξενιστή και τα έξι ινίδια της ουράς. Ο βακτηριοφάγος μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικές πορείες πολλαπλασιασμού σε ένα βακτήριο ξενιστή: α. τη λυτική πορεία, όπου το DNA του ιού και οι πρωτεΐνες εκφράζονται γρήγορα, συσκευάζονται σε σωμάτια και καταστρέφουν το βακτήριο με ταυτόχρονη απελευθέρωση 100 έως 1000 περίπου ιοσωματίων (virions), και β. τη λυσιγονική πορεία, όπου το DNA του ιού ενσωματώνεται στο βακτηριακό γονιδίωμα και πολλαπλασιάζεται μαζί του παραμένοντας ανενεργό, μέχρις ότου αλλαγές στο περιβάλλον το ενεργοποιήσουν και ακολουθήσει τη λυτική πορεία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Ο γενετικός χάρτης του λ-βακτηριοφάγου είναι γνωστός και αποτελείται από περίπου 40. Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την κατασκευή της κεφαλής και της ουράς (γονίδια A-J) βρίσκονται στο αριστερό μέρος του συμβατικού γενετικού χάρτη. Στην κεντρική περιοχή υπάρχουν γονίδια υπεύθυνα για τη λυσιγονική πορεία του βακτηριοφάγου, ενώ αμέσως μετά υπάρχουν αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA (γονίδια O και P) και τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών (γονίδια S και R). Η περιοχή της έναρξης της αντιγραφής (ori) βρίσκεται μέσα στο γονίδιο O. Στα άκρα του μορίου υπάρχουν δύο συνεκτικές συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες 12 νουκλεοτιδίων στο 5΄ άκρο. Τα άκρα αυτά ονομάζονται cos και επιτρέπουν στο μόριο DNA, μετά τη μόλυνση του βακτηρίου, να πάρει κυκλικό σχήμα (Hendrix et al., 1983). Ένας βακτηριοφάγος για να χρησιμοποιηθεί ως φορέας θα πρέπει να τροποποιηθεί με έναν από τους εξής τρόπους : α. να αφαιρεθούν αλληλουχίες από το γονιδίωμα του φάγου οι οποίες δεν είναι απαραίτητες για το λυτικό κύκλο, ώστε να μπορεί να δεχθεί το "ξένο" DNA (φορείς παρεμβολής). Οι αλληλουχίες που μπορούν να αφαιρεθούν αντιστοιχούν σε περίπου 15 kb και βρίσκονται στην κεντρική περιοχή που εδράζονται τα γονίδια της λυσιγονικής πορείας του βακτηριοφάγου (Campbell, 1993και β. να δημιουργηθούν δύο θέσεις δράσης περιοριστικού ενζύμου στα άκρα της αλληλουχίας του βακτηριοφάγου που θα απομακρυνθεί και θα αντικατασταθεί από το "ξένο" DNA (φορείς αντικατάστασης).

5.1 Βακτηριοφάγος λ-DASH®II (Stratagene)

Ο βακτηριοφάγος λ-DASH® II αποτελεί φορέα αντι-κατάστασης ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων γονιδιωματικού DNA και παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά (Εικόνα 3-2): α. αναπτύσσεται σε κύτταρα XL1-Blue MRA΄ (P2) εκμεταλλευό-μενος την επιλογή spi (spi selection-sensitive to P2 inhibition). Οι βακτηριοφάγοι λ, οι οποίοι περιέχουν ενεργά τα γονίδια *red* και *gam* δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε στελέχη ξενιστών που περιέχουν λυσιγόνους φάγους P2. Τα γονίδια *red* και *gam* στο βακτηριοφάλο λ DASH II εντοπίζονται στο τμήμα που απομακρύνεται κατά την εισαγωγή του ενθέματος (stuffer). Έτσι, ο αγρίου τύπου λ DASH® II δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε κύτταρα XL1-Blue MRA΄, σε αντίθεση με τον ανασυνδυασμένο λ DASH® II, ο οποίος καθίσταται *red⁻/gam⁻* μετά την απομάκρυνση του "stuffer" και την εισαγωγή του ενθέματος. Με τον τρόπο αυτό, κατά την επίστρωση της βιβλιοθήκης σε στέλεχος XL1-Blue MRA΄ P2 πραγματοποιείται spi επιλογή και αναπτύσσονται μό-νο ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι. β. Επιπλέον, είναι κατασκευασμένος κατά τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος τους υποκινητές T3 και T7 και να επιτρέπει τη δημιουργία τελο-ειδικών (end-specific) RNA ανιχνευτών και γ. το ένθεμα μπορεί να απομακρυνθεί με κατάτμηση με τη περιο-



Εικόνα 2-2: Γενετικός χάρτης του βακτηριοφάγου λ-DASH®II. Το ένθεμα κλωνοποιείται στις θέσεις *EcoR*I και μπορεί να αποχτηθεί με κατάτμηση με τη περιοριστική ενδονουκλεάση *Not*I. Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις πρόσδεσης των T3 και T7 RNA πολυμερασών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ριστική ενδονουκλεάση *Not*I, καθώς αυτό είναι κλωνοποιημένο στις θέσεις *Eco*RI του φορέα.

5.2 Ανάπτυξη βακτηριοφάγου λ, απομόνωση και εξαγωγή DNA

5.2.1 Προετοιμασία/ανάπτυξη βακτηρίων ξενιστών του βακτηριοφάγου λ (plating cells)

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται παρουσία μαλτόζης και ιόντων μαγνησίου. Ο βακτηριοφάγος λ για να εισαχθεί στο κύτταρο συνδέεται στον εξωμεμβρανικό υποδοχέα της μαλτοπορίνης (Thirion & Hofnung, 1972; Schwartz, 1967), ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας είναι η διευ-κόλυνση της διάχυσης της μαλτόζης και της μαλτοδεξτρίνης μέσα στο κύτταρο (Szmelcman & Hofnung, 1975). Η σύνθεση του υποδοχέα, ο οποίος κωδικοποιείται από το βακτηριακό γονίδιο *lamb*, καταστέλλεται από τη γλυκόζη και επάγεται από τη μαλτόζη (Schwartz, 1967). Έτσι, η παρουσία της μαλτόζης στο θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα ιόντα μαγνησίου χρησιμοποιούνται για τη διευκόλυνση της πρόσδεσης του βακτηριοφάγου στον υποδοχέα (Lieb, 1953).

1. Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA΄ αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM $MgSO_4$ και 0.2% μαλτόζη είτε σε θερμοκρασία 37°C υπό ισχυρή ανάδευση (220 rpm) για 4-6 ώρες είτε σε θερμοκρασία 30°C για 12-16 ώρες.
2. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 λεπτά.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται ήπια στην απαραίτητη ποσότητα διαλύματος 10 mM $MgSO_4$, ώστε η οπτική πυκνότητα (OD_{600}) του εναιωρήματος των κυττάρων να παρουσιάζει τιμή 0.4-0.6 μονάδες.
4. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4°C.

Σημειώσεις

✓Η εξωτερική μεμβράνη ενός πλήρους επαγώμενου βακτηριακού κυττάρου περιέχει περίπου 5 x 10^5 υποδοχείς μαλτοπορίνης.

✓Τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C για περίπου μία εβδομάδα.

5.2.2 Επίστρωση βακτηριοφάγων λ σε τρυβλίο

Οι πλάκες, οι οποίες εμφανίζονται ως διαυγή σημεία επάνω στο βακτηριακό υπόστρωμα (bacterial lawn) είναι αποτέλεσμα των συνεχών κύκλων προσβολής και λύσης των βακτηρίων από τα φαγικά σωμάτια. Κάθε πλάκα προέρχεται από την αρχική προσβολή ενός βακτηρίου από ένα βακτηριοφάγο με αποτέλεσμα όλα τα φαγικά σωμάτια που περιέχονται σε αυτή να παρουσιάζουν το ίδιο γενετικό προφίλ.

1. Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις (των τάξεων 10^{-2}-10^{-4}) των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων σε διάλυμα SM.
2. Ποσότητα των αραιώσεων αυτών (συνήθως 2-4 μl) αναμιγνύονται με βακτήρια ξενιστές του στελέχους XL1-Blue MRA΄ (200 μl από το απόθεμα με OD_{600}=0.4-0.6) σε σωληνάκι τύπου eppendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
3. Το μείγμα βακτηρίων και φάγων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 15 ml, ο οποίος περιέχει NZY υπερκείμενη αγαρόζη (3 ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία 47-49°C.
4. Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε τρυβλίο petri NZY- άγαρ διαμέτρου 90 mm. Το τρυβλίο αναδεύεται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος.
5. Τα τρυβλία, αφού στερεοποιηθούν, επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 12 ώρες.

Σημειώσεις

- ✓ Η ανάπτυξη των βακτηρίων σε ημιστερεά θρεπτικά μέσα, όπως αγαρόζη ή άγαρ, συμβάλλει στον περιορισμό της διάχυσης των φαγικών σωματιδίων.
- ✓ Τα τρυβλία προτιμάται να είναι παρασκευασμένα 2-3 ημέρες πριν την επίστρωση, ώστε να αποφευχθεί η ανάμιξη των πλακών λόγω των σταγόνων υγρασίας.
- ✓ Η εμφάνιση και το μέγεθος των πλακών επηρεάζεται από το ρυθμό ανάπτυξης του βακτηριακού υποστρώματος, τη συγκέντρωση άγαρ/αγαρόζης, την παλαιότητα του τρυβλίου καθώς και την υγρασία του επωαστικού θαλάμου. Η εμφάνιση μικρών πλακών οφείλεται σε γρήγορη βακτηριακή ανάπτυξη, σε υψηλή συγκέντρωση υπερκείμενης αγαρόζης/άγαρ, σε στεγνά (dry)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

τρυβλία και σε ξηρή ατμόσφαιρα του επωαστικού θαλάμου.

✓ Το μέγεθος των βακτηριοφαγικών πλακών δεν αυξάνεται μετά την πλήρη ανάπτυξη του βακτηριακού υποστρώματος, όταν δηλαδή τα κύτταρα βρίσκονται στη στατική φάση ανάπτυξης.

5.2.3 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ

1. Με τη χρήση υάλινης πιπέτας Pasteur απομονώνεται η επιθυμητή βακτηριοφαγική πλάκα μαζί με το άγαρ και την υπερκείμενη αγαρόζη και τοποθετείται σε διάλυμα SM (200 μl) το οποίο περιέχει χλωροφόρμιο (0.3%). Το χλωροφόρμιο παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών.
2. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C για 12 ώρες ώστε να επιτευχθεί η διάχυση των φαγικών σωματιδίων στο διάλυμα.

Σημειώσεις

✓ Μία πλάκα περιέχει περίπου 10^6-10^7 φαγικά σωμάτια, τα οποία μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα SM/χλωροφορμίου σε θερμοκρασία 4°C για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητα τους.

✓ Οι βακτηριοφάγοι λ διαχέονται σε μεγάλες αποστάσεις γι' αυτό συνίσταται η επιλογή απομονωμένων πλακών καθώς και η σύντομη απομόνωση τους μετά την εμφάνισή τους.

5.2.4 Απομόνωση βακτηριοφάγου λ – εξαγωγή DNA

Η διαδικασία απομόνωσης DNA από βακτηριοφάγο λ περιλαμβάνει τρία στάδια: α. την παρασκευή εναιωρήματος βακτηριοφάγου λ (lysate), β. την απόμονωση του βακτηριοφάγου και γ. την εξαγωγή του DNA.

Η παρασκευή εναιωρήματος πραγματοποιείται με τη βακτηριοφαγική επιμόλυνση μικρού αριθμού κυττάρων και τη μεταφορά τους σε θρεπτικό μέσο ώστε να αναπτυχθούν. Αρχικά, η συγκέντρωση των βακτηριοφάγων είναι χαμηλή, ενώ τα κύτταρα της καλλιέργειας τα οποία δεν έχουν μολυνθεί συνεχίζουν να διαιρούνται για αρκετές ώρες. Διαδοχικές όμως επιμολύνσεις των βακτηρίων οδηγούν στην παραγωγή όλο και περισσοτέρων βακτηριοφάγων, προκαλώντας τελικά τη επιμόλυνση όλων των κυττάρων και τη λύση της καλλιέργειας. Η λύση διαπιστώνεται από τη μείωση της οπτικής πυκνότητας (θολερότητα) της καλλιέργειας καθώς και από την αύξηση του ιξώδους της λόγω της απελευθέρωσης χρωμοσωμικού DNA από τα νεκρά βακτήρια. Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Wizard® Lambda Preps DNA Purification System (Promega).

5.2.4α Παρασκευή εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ

1. Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA΄ καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM $MgSO_4$ και 0.2% μαλτόζη.
2. Ποσότητα (500 μl) της βακτηριακής καλλιέργειας αναμιγνύεται με τη διαχυμένη φαγική πλάκα (40 μl) σε σωληνάκι τύπου eppendorf και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
3. Μέρος (250 μl) του μείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250 ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (20 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM $MgSO_4$.
4. Η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C έως ότου πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων (5-7 ώρες) και όταν αυτή επιτευχθεί προστίθεται χλωροφόρμιο (100 μl).
5. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml και φυγοκεντρείται σε 8,000 g για 10 λεπτά ώστε να ιζηματοποιηθούν τα βακτηριακά υπολείμματα.
6. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα φαγικά σωματίδια, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C για χρονικό διάστημα έως και 6 μηνών.

Σημείωση

✓ Η διαδικασία απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στην αναλογία κυττάρων και βακτηριοφάγων κατά την αρχική επιμόλυνση διότι ακόμη και μικρές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν την τελική απόδοση του εναιωρήματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

5.2.4β Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ

Το πρωτόκολλο αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου του Yamamoto et al., (1970), όπως αυτό περιγράφεται στο βιβλίο "Molecular Cloning, A laboratory manual" (Sambrook et al., 1989). Η απομόνωση των λ βακτηριοφάγων πραγματοποιείται με κατακρήμνισή τους παρουσία 1M NaCl και 10% w/v πολυαιθυλενογλυκόλη 8000 (PEG 8000), αφού προηγηθεί επώαση με DNάση I και RNάση A. Η επώαση του εναιωρήμα-τος με τις νουκλεάσες απαιτείται για την αποδόμηση των νουκλεϊνικών οξέων που ελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η παγίδευση των φαγικών σωματιδίων σε αυτά. Η προσθήκη NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα, ενώ η πολυαιθυλενογλυκόλη 8000 προκαλεί την κατακρήμνισή τους.

1. Το εναιώρημα των βακτηριοφάγων επωάζεται με DNάση και RNάση σε συγκέντρωση 1 μg/ml σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά.
2. Προστίθεται στερεό NaCl σε συγκέντρωση 1 M, επωάζεται σε πάγο για τουλάχιστον μία ώρα και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 11,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
3. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml, προστίθεται PEG 8000 σε συγκέντρωση 10% w / v και επωάζεται σε πάγο για τουλάχιστον μία ώρα.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 11,000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, ώστε να συλλεχθούν τα φαγικά σωματίδια.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο σωλήνας τύπου falcon αναστρέφεται για 2 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα του υπερκειμένου.
6. Το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα SM (1 ml), μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf όγκου 2 ml και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
7. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (1 ml), ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 3,000 g για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν η πολυαιθυλενογλυκόλη και κυτταρικά υπολείμματα από το εναιώρημα των βακτηριοφάγων.
8. Το αιώρημα των βακτηριοφάγων (υδατική φάση) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.

5.2.4γ Εξαγωγή DNA βακτηριοφάγου λ

1. Στο εναιώρημα των βακτηριοφάγων προστίθενται EDTA, SDS και πρωτεϊνάση K σε συγκεντρώσεις 20 mM, 0.5% και 50 μg / ml αντίστοιχα.
2. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 56°C για 1 ώρα και αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
3. Το φαγικό DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη και το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα TE (200 μl), το οποίο περιέχει RNάση σε συγκέντρωση 20 μg/ml.
4. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

Σημειώσεις

- ✓ Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από τον τίτλο του βακτηριοφάγου στο εναιώρημα και κυμαίνεται από 1 έως 10 μg/ml φαγικού εναιωρήματος.
- ✓ Ένα σωματίδιο βακτηριοφάγου λ περιέχει περίπου 5 x 10^{-11} μg DNA.
- ✓ Κατά την απομόνωση των βακτηριοφαγικών σωματιδίων λ είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων Mg^{+2} (10-30 mM) ώστε να αποφευχθεί η αποσύνθεση τους από την παρουσία EDTA και άλλων χηλικών παραγόντων.

5.3 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Κάθε εναιώρημα φάγων παρουσιάζει έναν "τίτλο" που εκφράζει τον αριθμό των φαγικών σωμάτιων που περιέχει ανά ml (pfu / ml).

1. Παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις (των τάξεων 10^{-4}-10^{-7}) της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM ώστε να χρησιμοποιηθούν στην τιτλοδότηση.
2. Ποσότητα των αραιώσεων αυτών (2-3 μl) αναμιγνύεται με βακτήρια ξενιστές (plating cells) του στελέχους XL1-Blue MRA΄ (200 μl από το απόθεμα με OD_{600}=0.4-0.6) σε σωληνάκια τύπου eppendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

3. Το μείγμα βακτηρίων/φάγων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 15 ml, ο οποίος περιέχει NZY υπερκείμενη αγαρόζη (3 ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία ~ 47-49°C.
4. Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε προθερμασμένο (σε 37°C) τρυβλίο petri NZY-άγαρ διαμέτρου 90 mm. Το τρυβλίο ανακινείται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος.
5. Αφού στερεοποιηθεί η υπερκείμενη αγαρόζη, τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 12 ώρες.

Ο προσδιορισμός του τίτλου πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση :

[(αριθμός πλακών (pfu) x συντελεστής αραίωσης) / όγκος που επιστρώθηκε (μl)] x 1000 μl /ml.

Ο όγκος που επιστρώθηκε (σε μl) αναφέρεται στον όγκο του διαλύματος των βακτηριοφάγων που αναμίχθηκε με τα βακτήρια-ξενιστές.

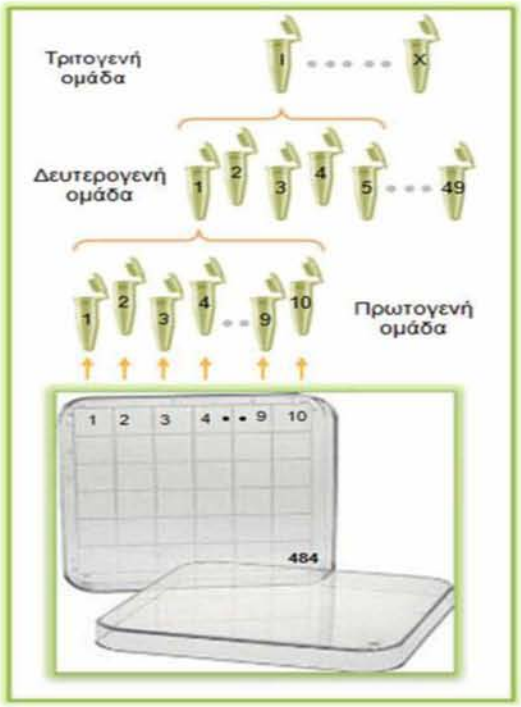
5.4 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη αποτελεί ένα τυχαίο άθροισμα τμημάτων DNA κλωνοποιημένων σε κατάλληλους και αντιπροσωπεύουν το γονιδίωμα ενός συγκεκρι-μένου οργανισμού. Η γονιδιωματκή βιβλιοθήκη παρέχει τη δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένων κλώνων μέσω υβριδοποίησης με κατάλληλους ανιχνευτές. Ο συνολικός αριθμός των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων (N) που απαιτείται να σαρωθεί για να επιτευχθεί η απομόνωση ενός κλώνου με 99% πιθανότητα (P) σε μία βιβλιοθήκη εξαρτάται από το μέσο μέγεθος των ενθεμάτων και από το μέγεθος του ως προς διαλογή γονιδιώματος ακολουθώντας τη σχέση: N = ln(1-P) / ln(1-f), όπου f το κλάσμα ενθέματος προς γονιδιωμα (Clarke & Carbon, 1976).

1. Η επιθυμητή ποσότητα ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων αναμιγνύεται με βακτήρια ξενιστές του στελέχους XL1-Blue MRA΄ (600μl από το απόθεμα με OD_{600}=0.4-0.6) σε σωληνάκι τύπου eppendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 λεπτά.
2. Το μείγμα βακτηρίων και φάγων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon (50ml), ο οποίος περιέχει NZY υπερκείμενη αγαρόζη (30ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία ~47-49°C.
3. Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε τρυβλίο NZY- άγαρ διαστάσεων 22cm x 22cm. Το τρυβλίο ανακινείται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος.
4. Αφού στερεοποιηθεί η υπερκείμενη αγαρόζη, το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12 ώρες.

5.5 Δημιουργία κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η διαδικασία της δημιουργίας κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου φαίνεται στην Εικόνα 2-3 και περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 2-3: Ο τρόπος δημιουργίας των κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου. Το τριβλίο όπου επιστρώθηκε η βιβλιοθήκη χωρίστηκε σε 484 ισομεγέθη τμήματα από τα οποία προήλθαν και τα 484 αντίστοιχα κλάσματα (πρωτογενή ομάδα). Ακολούθως, τα κλάσματα αυτά συνδυάστηκαν ανά δέκα, έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια νέα συλλογή 49 νέων κλασμάτων (δευτερογενή ομάδα). Αυτά συνδυάστηκαν ανά 5 και έδωσαν τα τελευταία 10 (I-X) κλάσματα (τριτογενή ομάδα). Με τον τρόπο αυτό, ένα θετικό σήμα στην PCR των τελευταίων δέκα κλασμάτων οδηγεί διαδοχικά σε ένα από τα αρχικά 484.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Σκοπός της δημιουργίας μιας τέτοιας συλλογής κλασμάτων ήταν η διευκόλυνση της ανεύρεσης ενός κλώνου με διαλογή σε ένα υποσύνολο της αρχικής βιβλιοθήκης σε μια διαδικασία που περιγράφεται στο τμήμα §1.1.1 των Αποτελεσμάτων.

1. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη διαιρείται σε 484 κλάσματα: Με οδηγό σχεδιασμένο πλέγμα (22 cm x 22 cm) 484 ισομεγέθων τετραγώνων στην πίσω επιφάνεια της βάσης τρυβλίου διαστάσεων 22 cm x 22 cm αποκόπτεται η υπερκείμενη αγαρόζη που αντιστοιχεί σε κάθε ένα τετράγωνο.
2. Η υπερκείμενη αγαρόζη του κάθε τμήματος που περιέχει τους ανασυνδυασμένους βακτηριοφάγους τοποθετείται σε 500 μl διαλύματος SM σε σωληνάκι τύπου eppendorf. Η διαδικασία αυτή δημιουργεί 484 κλάσματα, τα οποία αποτελούν την πρωτογενή ομάδα.
3. Τα 484 κλάσματα (25 μl από το καθένα) συνδυάζονται ανά δέκα και τοποθετούνται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf, ώστε να δημιουργηθεί μια συλλογή 49 κλασμάτων που αποτελούν τη δευτερογενή ομάδα.
4. Τα 49 κλάσματα (20 μl από το καθένα) στη συνέχεια συνδυάζονται ανά 5 και τοποθετούνται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf, οπότε προκύπτουν 10 κλάσματα (I-X) τα οποία αντιπροσωπεύουν ολόκληρη τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη που επιστρώθηκε και συνιστούν την τριτογενή ομάδα.

6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για γονιδιακή ενίσχυση (DNA)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού της επιλεγμένης αλληλουχίας με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Τα πρώτα πρωτόκολλα παρουσιάστηκαν στα μέσα της δεκαετίας του ΄80 (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis & Faloona 1987), ενώ το 1993 ο K.Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση :

1. μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, της Taq DNA πολυμεράσης η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) και επιτρέπει τη χρησιμοποίηση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα αναδιάταξης και επιμήκυνσης (ο χρόνος ημιζωής του ενζύμου σε θερμοκρασία 95°C είναι περίπου 40 λεπτά). Η Taq πολυμεράση παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού 75-80°C και ταχύτητα σύνθεσης 150 νουκλεοτίδια / μόριου ενζύμου το δευτερόλεπτο.

2. ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλης κατεύθυνσης με μήκος μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA. Επιπλέον, οι εκκινητές πρέπει α. να παρουσιάζουν αναλογία G/C και A/T περίπου 1:1, β. να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3΄ ή 5΄ άκρο τους, γ. να μην περιέχουν εσωτερικές παλίνδρομες αλληλουχίες, δ. να μην υπάρχουν επαναλήψεις 3 ή περισσοτέρων C ή G στο 3΄ άκρο και ε. να παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές θερμοκρασίας τήξης Tm. Η συγκέντρωση των εκκινητών καθορίζεται συνήθως μεταξύ 0.4-0.6 μM ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένη έναρξη και ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων.

3. κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5΄ τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) σε συγκέντρωση 0.2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λάθους νουκλεοτιδίου. Η εισαγωγή λάθος νουκλεοτιδίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του κάθε νουκλεοτιδίου στην αντίδραση. Έτσι, σε συγκέντρωση 1 mM για κάθε νουκλεοτίδιο η συχνότητα λάθους είναι περίπου 1.66×10^{-4} πολυμερισμένα νουκλεοτίδια ανά κύκλο, ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση (0.2 mM) το λάθος ελαττώνεται σημαντικά και γίνεται μικρότερο από 5×10^{-5}.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Έλλειψη ισορροπίας στο μείγμα των dNTPs μειώνει επίσης την πιστότητα της Taq πολυμεράσης.

4. κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος $MgCl_2$. Η παρουσία ιόντων Mg^{+2} είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg^{+2} σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση. Η συγκέντρωση των ελευθέρων ιόντων Mg^{+2} εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που δεσμεύουν το ιόν μεταξύ των οποίων είναι τα dNTPs, το EDTA και φωσφορικά ιόντα. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις Mg^{+2} είναι 1.5-2.0 mM, ενώ υψηλή συγκέντρωση (>4 mM) αυξάνει τη συχνότητα του πολυμερισμού λάθους νουκλεοτιδίων αλλά και την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων (Harris & Jones, 1997),

5. ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης.

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. την αποδιάταξη του DNA (μήτρα). Ολική αποδιάταξη του DNA στόχου πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94°C για 30 δευτερόλεπτα. Σε περιπτώσεις όμως υποστρώματος DNA πλούσιου σε G+C απαιτείται υψηλότερη θερμοκρασία.

2. την αναδιάταξη των αλυσίδων του DNA με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (Tm) και

3. τη σύνθεση (επιμήκυνση) από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο ανάλογα με το pH, τη συγκέντρωση ιόντων, το ρυθμιστικό διάλυμα και το είδος του υποστρώματος DNA.

Ο πρώτος κύκλος οδηγεί στο σχηματισμό δύο νέων αλυσίδων απροσδιορίστου μήκους που, μαζί με τις πατρικές αλυσίδες, συμμετέχουν στους επόμενους κύκλους πολυμερισμού. Τέτοια προϊόντα συσσωρεύονται αριθμητικά σε κάθε επόμενο κύκλο. Αντίθετα, από το δεύτερο κύκλο και μετά συντίθενται και αλυσίδες με καθορισμένο μήκος (ίσο με την απόσταση ανάμεσα στα 5΄ άκρα των δύο εκκινητών) οι οποίες συμμετέχουν ως μήτρα στους επόμενους κύκλους. Τα προϊόντα αυτά συσσωρεύονται εκθετικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Με τον τρόπο αυτό μετά την ολοκλήρωση n κύκλων η αρχική αλληλουχία έχει πολλαπλασιαστεί 2^n φορές. Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από την αρχική συγκέντρωση του DNA στόχου.

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR (200 μl) προστίθενται:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
DNA	5 - 40 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X
dNTPs	0.2 mM το καθένα
$MgCl_2$	1.5 mM
Εκκινητής εμπρόσθιος	0.4 - 0.6 μM
Εκκινητής ανάστροφος	0.4 - 0.6 μM
Taq DNA πολυμεράση	1 unit
H_2O	x *

* x = ο απαραίτητος όγκος ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

2. Η αντίδραση τοποθετείται σε συσκευή PCR με τις εξής συνθήκες:

	θερμοκρασία	χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	2 - 4 min	
Αποδιάταξη DNA στόχου	94°C	30 sec	για 30 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών	Tm - 5°C	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	~1 min/kb	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 - 7 min	

3. Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

Σημειώσεις
- ✓ Ως μονάδα ενζύμου (unit) ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για τον πολυμερισμό 10 nmoles νουκλεοτιδίων σε 30 λεπτά σε θερμοκρασία 70°C σε όγκο αντίδρασης 50 μl.
- ✓ 1 μg ανθρώπινου DNA αντιστοιχεί σε περίπου 3 x 10^5 μόρια στόχους (μοναδικής αλληλουχίας). 1 ng βακτηριακού *E. coli* DNA και 1 pg πλασμιδιακού DNA αντιστοιχούν επίσης σε 3 x 10^5 μόρια στόχους.

6.2 5΄ RACE PCR (Rapid amplification of cDNA ends)

Κατά τη διαλογή μιας cDNA βιβλιοθήκης, η απόμόνωση ενός πλήρους μήκους cDNA δεν αποτελεί πάντα εύκολη διαδικασία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης η αντίστροφη μεταγραφάση δεν μπορεί πάντα να μεταγράψει ολόκληρη τη γονιδιακή νουκλεοτιδική αλληλουχία, ειδικά αν το μετάγραφο είναι μεγάλο σε μέγεθος. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό τμημάτων mRNA μηνυμάτων μεταξύ μιας καθορισμένης εσωτερικής περιοχής του μεταγράφου (ορίζεται από τον εκκινητή GSP1 - Gene Specific Primer 1) και άγνωστων αλληλουχιών είτε του 5΄ είτε του 3΄ άκρου. Μία από τις κυριότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα αποτελεί η RACE PCR, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Frohmann et al. (1988). Η διαδικασία περιλαμβάνει: α. την αντίστροφη μεταγραφή ολικού RNA ή πολύ(A)+ RNA, ώστε να συντεθεί μονόκλωνο cDNA, β. τη προ-σθήκη dATP στο 3΄άκρο του cDNA και γ. τον πολλα-πλασιασμό του cDNA με PCR (Εικόνα 2-4). Το πρωτό-κολλο που ακολουθείται αποτελεί τροποποίηση της αρχικής μεθόδου των Frohmann et al. (1988).

6.2.1 Σύνθεση μονόκλωνου cDNA με χρήση του AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene)

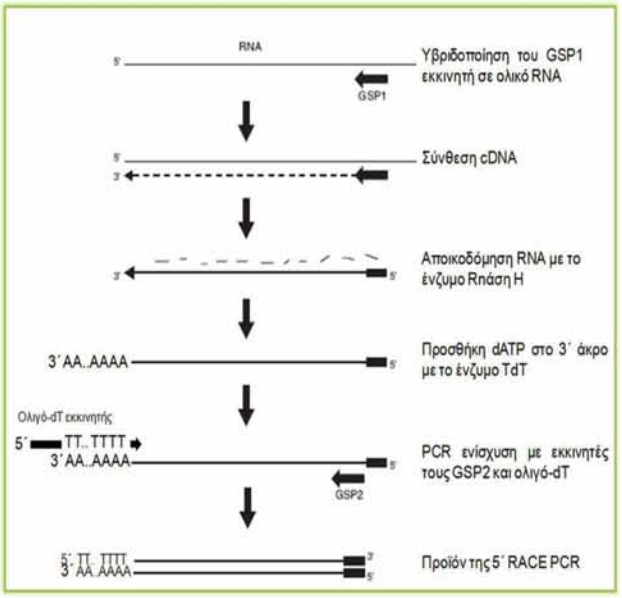
Η σύνθεση του μονόκλωνου cDNA πραγματοποιείται σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας.

1. Σε σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθεται το RNA, ο εκκινητής GSP1 και η ποσότητα ddH_2O που απαιτείται έως τον τελικό όγκο της αντίδρασης. Ο εκκινητής GSP1 σχεδιάζεται βάσει της γνωστής αλληλουχίας του μεταγράφου και με κατεύθυνση προς το 5΄άκρο του. Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία 70°C για 5 λεπτά και αμέσως μεταφέρεται σε πάγο για 1 λεπτό.
2. Στη συνέχεια προστίθεται το μείγμα των dNTPs, του $MgCl_2$ και των ενζύμων της αντίστροφης μεταγραφάσης (AffinityScript RT) και του αναστολέα των ριβονουκλεασών (RNase Block enzyme) και ακολουθούν τα εξής διαδοχικά στάδια επώασης σε συσκευή PCR: α. σε θερμοκρασία 25°C για 7 λεπτά, ώστε να επιτραπεί η υβριδοποίηση του εκκινητή β. σε θερμοκρασία 42°C για 3 λεπτά, γ. σε θερμοκρασία 48°C για 30 λεπτά όπου πραγματοποιείται ο πολυμερισμός και δ. σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά για τον τερματισμό της αντίδρασης.
3. Προστίθεται RNάση H (~30 units) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 30°C για μία ώρα, ώστε να αποικοδομηθούν οι αλυσίδες RNA.
4. Το μονόκλωνο cDNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη και το ίζημα αναδιάλυεται σε ddH_2O (40 μl).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Σημείωση

✓ Η ριβονουκλεάση Η της *E.coli* αποτελεί μια ενδοριβονουκλεάση, η οποία πέπτει μόνο το RNA σε ένα υβρίδιο RNA:DNA.



Εικόνα 2-4: Τα στάδια της 5΄ RACE PCR.

6.2.2 Προσθήκη dATP στο 3΄άκρο του cDNA

Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία του ενζύμου τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT). Η TdT αποτελεί μία πολυμεράση ανεξάρτητη υποστρώματος, η οποία παρουσία δισθενών ιόντων καταλύει την προσθήκη dNTPs στο 3΄ OH άκρο μονόκλωνων και δίκλωνων μορίων DNA (Bollum, 1974). Το DNA όπου πραγματοποιείται η προσθήκη (DNA-δέκτης), πρέπει να παρουσιάζει μήκος τουλάχιστον τριών νουκλεοτιδίων.

1. Το μονόκλωνο cDNA (15 μl) τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και dATP σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM, επωάζονται σε θερμοκρασία 94°C για 2-3 λεπτά και αμέσως μεταφέρονται σε πάγο για 1 λεπτό.
2. Προστίθεται το ένζυμο TdT (10 units) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά, ώστε να προστεθούν τα δεοξυριβονουκλεοτίδια της αδενίνης.
3. Το ένζυμο απενεργοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 70°C για 10 λεπτά.

Σημειώσεις

✓ Σε βέλτιστες συνθήκες, το ένζυμο μπορεί να προσθέσει στο DNA-δέκτη αρκετές εκατοντάδες dNTPs.

✓ Η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από το είδος του 3΄άκρου του DNA-δέκτη. Το ένζυμο παρουσιάζει ισχυρή προτίμηση σε μόρια DNA με 3΄ προεξέχοντα άκρα.

6.2.3 Πολλαπλασιασμός του cDNA με PCR

Μετά την προσθήκη της αλυσίδας των dATP στο 3΄άκρο του, Το cDNA πολλαπλασιάζεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μέθοδος αυτή διαφέρει από τη συμβατική PCR στο ότι απαιτεί τη γνώση μόνο μίας μικρής αλληλουχίας του μεταγράφου για τον σχεδιασμό του εκκινητή GSP1 ενώ ο δεύτερος εκκινητής είναι συμπληρωματικός ως προς την πολύ-Α ουρά που προστίθεται στο cDNA. Έτσι, για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται μέρος της αντίδρασης προσθήκης dATP χωρίς να προηγηθεί καθαρισμός. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με τη χρήση των εκκινητών, ολιγο-dT και GSP2 εκκινητή 30-60 βάσεις εσωτερικά (προς το 5΄άκρο του μεταγράφου) του εκκινητή (GSP1) που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του μονόκλωνου cDNA (Εικόνα 2-4). Η αντίδραση πραγματοποιείται σύμφωνα με την αρχή της αντίδρασης PCR με τη μόνη διαφορά ότι ο ολιγο-dT εκκινητής χρησιμοποιείται στη μίση συγκέντρωση από ότι οι άλλοι δύο (0.2-0.4 μM).

6.3 PCR ΜΕΓΑΛΟΥ ΜΗΚΟΥΣ (Long PCR) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ Long PCR Enzyme Mix (Fermentas)

Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR αντίδραση, η οποία ενισχύει προιόν έως 3 kb, η PCR μεγάλου μήκους παρέχει τη δυνάτοτητα ενίσχυσης έως και 40 kb. Η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια με τη συμβατική PCR (βλέπε Υλικά & Μέθοδοι, §6.1) με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί: α. δύο ένζυμα, μία υψηλής απόδοσης Taq πολυμεράση και μία πολυμεράση με δράση 3΄ 5΄ εξωνουκλεάσης, ώστε να επιδιορθώνει την λανθασμένη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων, και β. DMSO, το οποίο λειτουργεί ως συνδιαλύτης και αυξάνει την απόδοση και αξιοποστία της αντίδρασης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται, αποτελεί τροποποποίηση του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας.

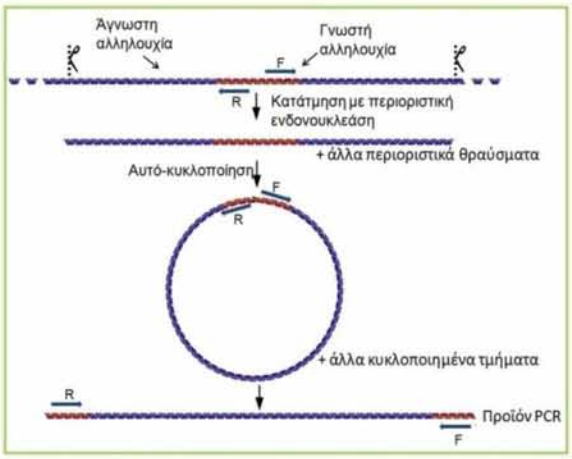
Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
DNA	0.75- 1 μg
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X
dNTPs	0.2 mM το καθένα
$MgCl_2$	1.5 mM
Εκκινητής εμπρόσθιος	0.6 – 1.0 μM
Εκκινητής ανάστροφος	0.6 - 1.0 μM
Long PCR Enzyme mix	2.5 unit
DMSO	4%
H_2O	x *

* x = ο απαραίτητος όγκος ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης

	θερμοκρασία	χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	1 - 2 min	
Αποδιάταξη DNA στόχου	94°C	30 sec	για 10 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών	Tm - 5°C	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	~1 min/kb	
Αποδιάταξη DNA στόχου	94°C	30 sec	για 25 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών	Tm - 5°C	30 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	~1 min/kb +10sec/κύκλο	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 - 7 min	

6.4 ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ PCR (inverse PCR)

Η ανάστροφη PCR, η οποία περιγράφηκε από τον Ochman et al., (1988), επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA, της οποίας μόνο το ένα άκρο είναι γνωστό. Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR η οποία απαιτεί το σχεδιασμό εκκινητών στα δύο άκρα του DNA στόχου, στην ανάστροφη PCR οι εκκινητές σχεδιάζονται στο ένα άκρο της γνωστής αλληλουχίας, με κατεύθυνση αντίθετη ο ένας του άλλου (Εικόνα 2-5). Η αλληλουχία στόχος για να αποτελέσει υπόστρωμα για την ανάστροφη PCR πρέπει να αυτοκυκλοποιηθεί. Η μέθοδος περιλαμβάνει: α. την κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA σε περιοριστικά θραύσματα μικρού μήκους (έως 3 kb), β. την αυτοκυκλοποίηση των περιοριστικών αυτών θραυσμάτων και γ. την ενίσχυσή τους μέσω συμβατικής αντίδρασης PCR.



Εικόνα 2-5: Τα στάδια της ανάστροφης PCR.

1. Γονιδιωματικό DNA (~1 μg) υφίσταται κατάτμηση με περιοριστική ενδονουκλεάση.
2. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ddH_2O (50 μl)
3. Μέρος του προϊόντος κατάτμησης (~50-100 ng) χρησιμοποιείται σε αντίδραση σύνδεσης με την T4 DNA λιγάση.
4. Κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ddH_2O (10 μl).
5. PCR αντίδραση του κυκλοποιημένου προϊόντος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Σημειώσεις

- ✓ Η απόδοση της ανάστροφης PCR αυξάνεται με την ενίσχυση γραμμικών πάρα κυκλικών DNA υποστρωμάτων. Η γραμμοποίηση του κυκλοποιημένου υποστρώματος (μετά το βήμα 3) μπορεί να επιτευχθεί με κατάτμησά του με περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία ανγνωρίζει αλληλουχία μεταξύ των 5΄ άκρων των δύο εκκινητών.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

7.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απόμόνωσης τμημάτων DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους :

α. το μέγεθος του DNA - δίκλωνα γραμμικά μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου (log) του μοριακού τους βάρους (Helling et al., 1974),

β. τη συγκέντρωση της αγαρόζης – η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο log μ = log μο - Kr τ, όπου μο η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και Kr ο συντελεστής επιβράδυνσης, ο οποίος έχει σχέση με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των κινούμενων μορίων,

γ. τη στερεοδομή των μορίων DNA – οι διαφορετικές μορφές (υπερελικωμένη κυκλική μορφή I, η ανοικτή κυκλική μορφη II και η γραμμική μορφή III) ενός μορίου DNA ίδιου μοριακού βάρους παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης (Thorne, 1966),

δ. την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται – σε χαμηλή τάση ρεύματος ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμο-ζόμενης τάσης, ενώ όσο αυξάνεται η τάση, ο ρυθμός μετανάστευσης των τμημάτων του DNA μεγάλου μοριακού βάρους μεταβάλλεται με διαφορετικό συντελεστή για το κάθε τμήμα,

ε. την παρουσία χρωστικών – το βρωμιούχο αιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική ικανότητα των γραμμικών μορίων περίπου κατά 15%, λόγω του γεγονότος ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο το μήκος τους και καθιστώντας τα πιο άκαμπτα,

ζ. τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Buffer) – απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη με αποτέλεσμα το DNA να κινείται με αργό ρυθμό, ενώ υψηλή ιοντική ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε τήξη του πηκτώματος και αποδιάταξη του DNA λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που προκαλείται από την αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα.

1. Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται με διάλυμα ηλεκτροφορήσεως και θερμαίνεται έως ότου τηχθεί η αγαρόζη και γίνει το διάλυμα τελείως διαυγές.
2. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg / ml.
3. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της τηγμένης αγαρόζης κατέβει στους 50°C μεταφέρεται σε μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συ-σκευής, στην οποία έχουν τοποθετηθεί με κάθετη διευθέτηση “χτενάκια” ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις “πηγαδάκια” φόρτωσης των δειγ-μάτων.
4. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τα “χτενάκια” απομακρύνονται και η βάση τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
5. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα χρωστικής (1:4)
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα “πηγαδάκια” και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

7. Η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία.

Σημειώσεις

- ✓ Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA.
- ✓ Όταν χρησιμοποιείται αγαρόζη χαμηλής τήξεως, η στερεοποίηση του πηκτώματος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4°C ενώ η θερμοκρασία κατά την ηλεκτροφόρηση πρέπει να διατηρείται χαμηλή.
- ✓ Η UV ακτινοβολία, η οποία απορροφάται είτε από το DNA στα 260nm και μεταβιβάζεται στο βρωμιούχο αιθίδιο είτε από την ίδια τη χρωστική στα 300nm και 360nm, εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα μόρια του DNA (Sharp et al., 1973).
- ✓ Το διάλυμα χρωστικής αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος λόγω της παρουσίας γλυκερόλης σε αυτό, ώστε να εισαχθεί ευκολότερα στο "πηγαδάκι". Στις συνθήκες ηλεκτροφόρησης το διάλυμα είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης.

7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

7.2.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό μορίων DNA όταν απαιτείται μεγάλη διακριτικότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0.2%. Το ακρυλαμίδιο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων 3% έως 30%. Το πήκτωμα σχηματίζεται με βινυλ-πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Σ' αυτές ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια NN-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (bis) τα οποία λόγω της δομής τους μπορούν να ενσωματωθούν σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι να δημιουργηθεί ένα πλέγμα. Η δημιουργία του πλέγματος πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού των ελεύθερων ριζών με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου $(NH_4)_2S_2O_8$ (APS) για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για τη διάδοση του. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου γίνεται με το TEMED, για τη δράση του οποίου είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων ($S_2O_3^{2-}$). Τα υπερθειικά ιόντα ενεργοποιούν το TEMED, προκαλώντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών, οι οποίες με τη σειρά τους καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου καθορίζει το μέσο μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς ενώ η αναλογία του ακρυλαμιδίου προς το μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο καθορίζει την έκταση του σχηματισμού γεφυρών (cross-links). Συνήθως ένα μόριο NN-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου αντιστοιχεί σε 29 μονομερή ακρυλαμιδίου. Έτσι και τα δύο είναι σημαντικά για τον καθορισμό των φυσικών ιδιοτήτων του πηκτώματος όπως είναι η πυκνότητα, η ελαστικότητα, η μηχανική αντοχή και το μέγεθος των πόρων.

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου διαχωρίζονται σε αποδιατακτικά και μη, και χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA και δίκλωνου DNA, αντίστοιχα. Τα αποδιατακτικά πηκτώματα περιέχουν ουρία και η ηλεκτροφόρηση επιτελείται σε θερμοκρασία 50-55°C. Στις συνθήκες αυτές τα δείγματα του DNA να παραμένουν αποδιαταγμένα. Επιπλέον στα αποδιατακτικά πηκτώματα, το διάλυμα της χρωστι-κής που χρησιμοποιείται περιέχει φορμαμίδιο, ώστε να διατηρείται αποδιαταγμένο το DNA και να μη σχηματίζει δευτεροταγές δομές κατά την ηλεκτροφόρηση. Η ταχύτητα πολυμερισμού του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου, από τη συγκέντρωση του καταλύτη καθώς και από τη θερμοκρασία.

1. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται ακρυλαμίδη/ bis ακρυλαμίδη (29:1) και TBE σε τελική συγκέντρωση 10% και 1X, αντίστοιχα.

*Στην περίπτωση του αποδιατακτικού πηκτώματος προστίθεται επιπλέον ουρία σε τελική συγκέντρωση 20%.

2. Στο πήκτωμα προστίθεται APS 0.07% και TEMED 0.1% ώστε να πολυμεριστεί και τοποθετείται σε μήτρα πολυμερισμού (20 x 20 x 0.2 cm) όπου τα τζάμια έχουν επαλειφθεί με αντικολλητική σιλικόνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Ακρυλαμίδιο	10%
TBE	1X
*Ουρία	20%
APS	0.07%
TEMED	0.1%
dH_2O	Έως $V_{τελ}$
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$

3. Τοποθετούνται τα "χτενάκια" και το πήκτωμα αφήνεται να πολυμερισθεί σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 2 ώρες.
4. Πριν την ηλεκτροφόρηση η μήτρα τοποθετείται σε κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία στεγανοποιείται και γεμίζεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X TBE.
5. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα χρωστικής (1:4).

*Στα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν σε αποδιατακτικό πήκτωμα προστίθεται χρωστική με φορμαμίδιο και αποδιατάσσονται σε θερμοκρασία 80°C για 10 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετούνται σε πάγο.

6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα "πηγαδάκια" και ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση.

7.2.2 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο

Η χρώση του DNA σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται αντί της πιο απλής μεθόδου με βρωμιούχο αιθίδιο λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσιάζει στην ανίχνευση των ζωνών. Η ποσότητα του DNA που μπορεί να ανιχνευτεί υπολογίζεται σε <1 ng DNA έχοντας περίπου 50 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή των ιόντων αργύρου από τα νουκλεϊνικά οξέα. Η ανηγμένη μορφή του αργύρου σχηματίζει κόκκους, οι οποίοι καθιζάνουν γύρω από τις ζώνες του DNA. Η προσθήκη του αναγωγικού παράγοντα $NaBH_4$ προκαλεί την εμφάνιση των ζωνών ως καφέ ή μαύρες περιοχές επάνω στο πήκτωμα. Η ανάπτυξη του χρώματος διακόπτεται με την αλλαγή του pH του πηκτώματος όπου σταματά να πραγματοποιείται η αναγωγή του αργύρου. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Sambrook et al. (1989).

1. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα 2% απόλυτης αιθανόλης και 0.125% οξικού οξέος για 3 λεπτά υπό ήπια ανάδευση.
2. Το διάλυμα απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 1.
3. Ακολουθεί έκπλυση με dH_2O για 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη και το οξικό οξύ.
4. Προστίθεται διάλυμα $AgNO_3$ (1 gr/lt) και το πήκτωμα επωάζεται για 15 λεπτά υπό ανάδευση.
5. Το διάλυμα απομακρύνεται και ξεπλένεται με dH_2O για την απομάκρυνση της περίσσειας του νιτρικού αργύρου.
6. Η εμφάνιση του σήματος πραγματοποιείται με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 1.5% w/v NaOH, 0.005 w/v $NaBH_4$ και 0.5% v/v φορμαλδεΰδη υπό ήπια ανάδευση, έως ότου επιτευχθεί ικανοποιητική χρώση.
7. Η αντίδραση εμφάνισης διακόπτεται με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα 5% οξικού οξέος και στη συνέχεια με έκπλυση με dH_2O.

Σημείωση

✓ Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ύστερα από χρώση με νιτρικό άργυρο μπορεί να διατηρηθεί σε διάλυμα 1% οξικού οξέος σε θερμοκρασία 4°C για μήνες.

7.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

7.3.1 Παρασκευή οριζόντιου πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων ενός πηκτώματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα εξαρτάται από τη διαφορά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης (q) σύμφωνα με την εξίσωση: v=E* q/f, όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες του πηκτώματος μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη.

Η ηλεκτροφόρηση (σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου) των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων της ακετυλοχολινεστεράσης που ακολουθήθηκε αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου των Helenius & Simons (1977). Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία ουδέτερων (0.5% Triton X-100) ή ανιονικών (anionic) απορρυπαντικών (0.5% Triton X-100 και 0.25% DOC), τα οποία μεταβάλλουν την ηλεκτροφορητική μετανάστευση των μορίων.

1. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται ακρυλαμίδη/ bis ακρυλαμίδη (29:1), ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης και Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 7.5%, 1X και 0.5%, αντίστοιχα.

*Στην περίπτωση της παρασκευής πηκτώματος παρουσία ανιονικών απορρυπαντικών, προστίθεται επιπλέον sodium deoxycolate DOC σε τελική συγκέντρωση 0.25%.

2. Στο πήκτωμα προστίθεται APS 0.07% και TEMED 0.1% ώστε να πολυμεριστεί και τοποθετείται σε μήτρα πολυμερισμού (11 x 20 x 0.2 cm) όπου τα τζάμια έχουν επαλειφθεί με αντικολλητική σιλικόνη.

Ακρυλαμίδιο	7.5%
Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης	1X
Triton X-100	0.5%
*DOC	0.25%
APS	0.07%
TEMED	0.1%
dH_2O	Έως $V_{τελ}$
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$

3. Τοποθετούνται τα “χτενάκια” και αφήνεται να πολυμερισθεί σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 2 ώρες.

4. Πριν την ηλεκτροφόρηση η μήτρα τοποθετείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία στεγανοποιείται και γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 1X με 0.5% Triton X-100.

*Στην περίπτωση που το πήκτωμα περιέχει DOC, το διάλυμα ηλεκτροφόρησης είναι ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 1X με 0.5% Triton X-100 και 0.25% DOC.

5. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα χρωστικής (1:1).

6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα “πηγαδάκια” και αναλύονται σε οριζόντια υδρόψυκτη συσκευή ηλεκτροφόρησης water-cooled υπό σταθερή τάση (15 V/cm).

7.3.2 Χρώση ακετυλοχολινεστεράσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τη μέθοδο Karnovsky

Η χρώση και κατ’ επέκταση ο εντοπισμός της ακετυλοχολινεστεράσης στο πήκτωμα πραγματοποιείται με την ιστοχημική μέθοδο για τις χολινεστεράσες των Karnovsky & Roots (1964). Η μέθοδος εκμεταλλεύεται την ικανότητα της ακετυλοχολινεστεράσης να υδρολύει το τεχνητό υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνη (ATC). Η θειοχολίνη που απελευθερώνεται δεσμεύεται από ιόντα Cu^{2+} (διάλυμα Karnovsky) και κατακρημνίζεται ως άχρωμη θειοχολίνη του χαλκού, η οποία τελικά μετατρέπεται σε καφέ χρώματος CuS ύστερα από κατεργασία με σουλφίδιου του αμμωνίο). Η μέθοδος εμφανίζει πλεονέκτημα έναντι των άλλων μεθόδων χρώσεων πρωτεϊνών ($AgNO_3$, Coomasie Brilliant Blue) στο ότι η χρώση είναι εξειδικευμένη και εμφανίζεται απευθείας στα σημεία όπου υπάρχει ενζυμική δραστικότητα.

1. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα οξικού οξέος 0.2 M pH 6.5 για 30 λεπτά υπό ήπια ανάδευση. Η αλλαγή του pH σε 6.5 (pH ηλεκτροφόρησης 8.5) είναι απαραίτητη διότι τα ιόντα χαλκού σε pH μεγαλύτερο του 7.0 δε μπορούν να συγκρατηθούν στο διάλυμα.

2. Το διάλυμα απομακρύνεται και ακολουθεί έκπλυση με dH_2O για 1 λεπτό για την απομάκρυνση του οξικού οξέος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

3. Προστίθεται διάλυμα Karnovsky και το πήκτωμα επωάζεται για 30 λεπτά υπό ήπια ανάδευση, ώστε τα ιόντα Cu^{2+} να διεισδύσουν στο πήκτωμα.
4. Το διάλυμα απομακρύνεται και προστίθεται διάλυμα Karnovsky με ATC 0.1% w/v. Το πήκτωμα επωάζεται σε αυτό για 30 λεπτά υπό ήπια ανάδευση.
5. Το διάλυμα απομακρύνεται ώστε να διακοπεί η αντίδραση εμφάνισης
6. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα γλυκερόλης 1% και ξηραίνεται.

8. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Το φαινόμενο της υβριδοποίησης, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊνικού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί τη βάση για πολλές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, μεταξύ αυτών και της υβριδοποίησης κατά Southern. Η υβριδοποίηση κατά Southern (φέρει το όνομα του E.M Southern που την ανέπτυξε) χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA (Southern, 1975). Τα βασικά στάδια περιλαμβάνουν α. τη σήμανση του ανιχνευτή, β. τη σταθεροποίηση του DNA σε νάυλον μεμβράνη, γ. την υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή και δ. την ανίχνευση του σήματος.

8.1 Σήμανση ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης υβριδοποίησης ανάμεσα στο μόριο ανιχνευτή και τις αναζητούμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων επιτρέπει τον εντοπισμό τους ακόμη και αν στο κύτταρο ή το διάλυμα περιέχονται εκατομμύρια διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA. Η σήμανση των διάφορων τύπων ανιχνευτών (DNA, RNA ανιχνευτών) πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs), εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα, είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής των ανιχνευτών (μεθοδος τυχαίων εκκινητών), είτε μετά την παραγωγή τους (σήμανση στο 5΄ ή 3΄ άκρο του ανιχνευτή). Η σήμανση των νουκλεοτιδίων μπορεί να γίνει με ραδιενέργεια (^{32}P, ^{35}S, ^{3}H) ή με μη ραδιενεργούς σημαντές [βιοτίνη (Bio), διγοξιγενίνη (DIG)]. Οι μη ραδιενεργοί σημαντές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο επικίνδυνοι για την υγεία και επιπλέον, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία -20°C και να είναι διαθέσιμοι προς χρήση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

8.1.1 Σήμανση του ανιχνευτή με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών με τη χρήση HexaLabel™ DNA Labelling kit (Fermentas)

Η μέθοδος περιγράφηκε αρχικά από τους Feinberg & Vogelstein (1983). Τα βασικά στάδια περιλαμβάνουν την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το κομμάτι Klenow (Klenow fragment - μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης I) δεν έχει την 5΄→3΄ εξωνουκλεοτική δράση του ολοενζύμου, ενώ διατηρεί τη δράση της 5΄→3΄ πολυμεράσης και της 3΄→5΄ εξωνουκλεάσης. Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας. Η σήμανση των μορίων DNA γίνεται με τη συμπλήρωση των 3΄ υπολειμματικών άκρων του με βιοτυνιλιωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP) και με εκκινητές τυχαία δεκανουκλεοτίδια.

1. Το DNA (100 ng–1 μg) που θα σημανθεί τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινητές (1X) και η ποσότητα του ddH_2O που αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.
2. Το μείγμα αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 100°C για 10 λεπτά και αμέσως τοποθετείται σε πάγο.
3. Προστίθενται Biotin-11-dUTP (0.035 mM), μείγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων (dGTP, dATP,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

dCTP: 0.1 mM, dTTP: 0.065 mM) και η DNA Klenow πολυμεράση I (5 u).

4. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 ώρες.
5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH_2O (50 μl).

DNA	V_{DNA} (100 ng – 1μg)
Ρυθμιστικό διάλυμα με δεξανουκλεοτίδια	V_{buffer} = 1X
ddH_2O	V_{ddH2O} = έως 50 μl
Επώαση σε 100^0C για 10 λεπτά	
Biotin-11-dUTP	V=0.035 mM
dNTPs [d(G,A,C)TP:dTTP]	V=0.1 : 0.065 mM
Klenow exo-	$V_{ενζ}$ = 5 units
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$ = 50 μl

Σημείωση

✓ Η αύξηση του χρόνου επώασης οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης του σημασμένου DNA.

8.1.2 In vitro μεταγραφή – σήμανση RNA ανιχνευτών

Η διαδικασία συνίσταται στην ικανότητα των βακτηριοφαγικών T7, T3 και SP6 RNA πολυμερασών να μεταγράφουν RNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο DNA. Το DNA εκμαγείο πρέπει να φέρει στην αλληλουχία του τις θέσεις πρόσδεσης των πολυμερασών ανοδικά της περιοχής που μεταγράφεται. Τα πλεονεκτήματα των RNA ανιχνευτών συνίστανται στο ότι είναι μονόκλωνοι, δεν παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στον εαυτό τους, έχουν ορισμένο μέγεθος και στο ότι τα υβρίδια RNA:DNA εμφανίζουν υψηλή σταθερό-τητα, παρουσιάζοντας συνεπώς μεγαλύτερη ευαι-σθησία και εντονότερο σήμα.

Ο βακτηριοφάγος λ-DASH®II φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος τις θέσεις αναγνώρισης πρόσδεσης των RNA πολυμερασών T3 και T7, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία RNA ανιχνευτών.

1. DNA βακτηριοφάγου λ υφίσταται πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII και στη συνέχεια εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με αιθανόλη.
2. Το ίζημα αναδιάλυεται σε ddH_2O και τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf, το οποίο περιέχει νουκλεοσίδια A, G, U σε συγκέντρωση 1 mM και C σε συγκέντρωση 0.5 mM και 0.5 mM Biotin-CTP. Επιπλέον, προστίθενται DDT σε συγκέντρωση 5 mM, ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (1X) και τα ένζυμα: αναστολέας ριβονουκλεασών (RNase inhibitor) (20 unit) και RNA πολυμεράση (25 unit).
3. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες και ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
4. Το ίζημα αναδιάλυεται σε 50 μl ddH_2O.

Σημειώσεις

✓ Η κατάτμηση του DNA εκμαγείου δεν πρέπει να πραγματοποιείται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που παράγουν αλληλοεπικαλυπτόμενα 3΄άκρα, διότι αυτά μπορούν να λειτουργήσουν ως εναρκήτρια σημεία για την RNA πολυμεράση (Schenborn & Mierendorf, 1985).

✓ Η χρήση του ενζύμου HaeIII εξασφαλίζει τη δημιουργία ανιχνευτών μικρού μήκους. Οι ανι-χνευτές μικρού μήκους τείνουν να λειτουργούν πιο ειδικά.

✓ Συνίσταται η χρήση DMPC H_2O αντί του DEPC H_2O, διότι το τελευταίο υπάρχει περίπτωση να αναστείλει την RNA πολυμεράση.

8.2 Southern υβριδοποίηση – Διαλογή βιβλιοθήκης

8.2.1 Μεταφορά σε νάυλον μεμβράνη

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊνικών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξή τους ώστε να καταστούν μονόκλωνα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊνικά οξέα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως “στόχοι” σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

κατά περίσταση ανιχνευτών. Η μεταφορά σε μεμβράνη από πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρείς διαφορετικές διαδικασίες: α. τριχοειδής μεταφορά (Lichtenstein et al., 1990; Chomczynski, 1992), β. ηλεκτροφορητική μεταφορά (Stellwag & Dahlberg, 1980; Church & Gilbert, 1984) και γ. μεταφορά με χρήση κενού (Olszewska & Jones, 1988; Trnovsky, 1992) ενώ υπάρχουν και τρία είδη μεμβρανών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, να-υλον ουδέτερη μεμβράνη και νάυλον θετικά φορτι-σμένη μεμβράνη.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η τριχοειδής μεταφορά όπου βασίζεται στη μεταφορά ενός ρυθμιστικού διαλύματος από μία περιοχή υψηλού υδατικού δυναμικού σε περιοχή χαμηλού δυναμικού. Το διάλυμα μεταφοράς παρασύρεται μέσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη λόγω των τριχοειδών φαινομένων με αποτέλεσμα να συμπαρασύρει μαζί και το μονόκλωνο DNA. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε θετικά φορτισμένη νάυλον μεμβράνη, η οποία διευκολύνει την δέσμευση του DNA λόγω των ιονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης. Ο ρυθμός μεταφοράς του DNA εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA, το πάχος του πηκτώματος και τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η σταθεροποίηση των νουκλεϊνικών οξέων στη μεμβράνη είτε με έκθεση σε UV ακτινοβολία συγκεκριμένης έντασης είτε με ξήρανση σε υψηλή θερμοκρασία.

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακας, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
2. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 15 λεπτά.
3. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβλανεται το βήμα 2.
4. Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 20 λεπτά.
5. Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβλανεται το βήμα 4.
6. Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 2X SSC σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά και τοποθετείται σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε διάλυμα 10X SSC.
7. Η μεμβράνη με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα διαβρέχεται με ddH_2O και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
8. Φύλλα (2) διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, ίσων διαστάσεων με τη μεμβράνη, διαβρέχονται με ddH_2O και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη, ακολουθούν επιπλέον φύλλα (2) διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 5 mm. Στη κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500 gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
9. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 16-18 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman 3MM και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των πηγαδιών.
10. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Σημειώσεις

- ✓ Ο χειρισμός των μεμβρανών πρέπει να γίνεται με γάντια και με ειδικές λαβίδες τύπου Millipore με πεπλατυσμένα άκρα.
- ✓ Εάν τα τμήματα DNA υπερβαίνουν τις 15 kb, το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 0.2N HCl υπό ανάδευση για 10 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί μερική υδρόλυση του DNA και να διευκολυνθεί η μεταφορά των θραυσμάτων DNA (Wahl et al., 1979).
- ✓ Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του DNA, το πήκτωμα μετά το τέλος της διαδικασίας εξετάζεται κάτω από υπεριώδες φως.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

8.2.2 Μεταφορά των πλακών των βακτηριοφάγων λ σε νάυλον μεμβράνη.

Η διαδικασία αποσκοπεί στη δημιουργία ενός αντιγράφου της επίστρωσης των βακτηριοφάγων. Η μεμβράνη-αντίγραφο περιέχει αρκετούς βακτηριοφάγους σχεδόν από κάθε πλάκα. Η κατεργασία της μεμβράνης έχει σαν αποτέλεσμα την αποδιάταξη του φαγικού DNA.

1. Το τρυβλίο που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά των πλακών σε μεμβράνη πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία 4°C για τουλάχιστον 2 ώρες, ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά τμημάτων της υπερκείμενης αγαρόζης στη μεμβράνη.
2. Η μεμβράνη, με διαστάσεις σχεδόν όσο το τρυβλίο petri, τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου petri, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διαβραχεί από το κέντρο προς την περιφέρεια και χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ υπερκείμενης αγαρόζης και μεμβράνης.
3. Όταν η μεμβράνη διαβραχεί πλήρως, προσανατολίζεται ως προς το τρυβλίο petri με τρυπήματα σε αντίστοιχα ασύμμετρα περιφερειακά σημεία της με αποστειρωμένη βελόνα ανατομίας.
4. Η μεμβράνη παραμένει πάνω στο τρυβλίο για 2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται ανεστραμμένη, ώστε να μην έρθουν οι φάγοι σε άμεση επαφή, στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 λεπτά.
5. Ακολουθεί μεταφορά της μεμβράνης κατά τον ίδιο τρόπο σε διάλυμα εξουδετέρωσης όπου και παραμένει για 5 λεπτά.
6. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)/ 2X SSC για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα.
7. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες, ώστε να σταθεροποιηθεί η πρόσδεση του DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Σημειώσεις

- ✓ Αν είναι επιθυμητή η δημιουργία αντιγράφου (replica), μία δεύτερη μεμβράνη τοποθετείται στο ίδιο τρυβλίο και επαναλαμβάνονται τα βήματα. Στη περίπτωση αυτή η μεταφορά των φάγων πραγματοποιείται για 4 λεπτά αντί δύο.
- ✓ Οι μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως ή να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε στεγνό και σκοτεινό μέρος.

8.3 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνες

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊνικών οξέων συνίσταται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του background με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι τα: Denhardt's (Denhardt's reagent), το SDS και το DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, salmon sperm DNA). Το αντιδραστήριο Denhardt's περιέχει φικόλη (ficol) και PVP, τα οποία είναι μεγάλα μόρια και καταλαμβάνουν χώρο καθώς και BSA, η οποία είναι μη ειδική πρωτεΐνη.

Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Το ποσοστό σχηματισμού των υβριδίων καθορίζεται από τις συνθήκες υβριδοποίησης. Η άριστη θερμοκρασία υβριδισμού στη περίπτωση DNA:DNA υβριδοποίησης είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία Tm (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου. Το σημείο τήξης Tm είναι η θερμοκρασία στην οποία η μισή ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Οι παράμετροι που επηρεά-ζουν τη Tm είναι η αναλογία των βάσεων (GC), η συγκέντρωση άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή, και συνδέονται μεταξύ τους με τη εξίσωση: $Tm = 81.5°C + 16.6 \log M + 0.41 (\%G+C) - 500/n$ όπου M είναι η συγκέντρωση των ιόντων του άλατος [Na+] και n ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το υβρίδιο. Η συγκέντρωση των ιόντων Na πρέπει να είναι υψηλή ώστε να επιτευχθεί υβριδοποίηση. Τα μονοσθενή κατιόντα αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων μειώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κλώνων και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

σταθεροποιώντας έτσι το υβρίδιο. Αντίθετα, με τη συγκέντρωση του άλατος, η υβρι-δοποίηση κατά Southern φτάνει τα όρια της ευαισθησίας της όταν χρησιμοποιούνται μικρού μήκους ανιχνευτές. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται περίπου σε 100 fg όταν χρησιμοποιείται βιοτυνιλιωμένος ανιχνευτής. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Church & Gilbert (1984).

1. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβρι-δοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύ-ματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδό x 0.2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης).
2. Επιπλέον, προστίθεται DNA από σπέρμα σολο-μού (ssDNA) σε συγκέντρωση 100 μg/ml διαλύ-ματος ϋβριδοποίησης, το οποίο προηγουμέ-νως έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποί-ησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή.
4. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα προϋβριδοποίησης (10 ml/100 cm^2) και ο ανιχνευτής (100-200 ng/ml δια-λύματος), ο οποίος έχει θερμανθεί σε 100°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
5. Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδο-ποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση.

Σημειώσεις

- ✓ Εάν το διάλυμα προϋβριδοποίησης και υβριδοποιήσης περιέχουν φορμαμίδιο, η θερμοκρασία υβριδισμού είναι πολύ χαμηλότερη σύμφωνα με τη σχέση : Tm = 81.5°C + 16.6 logM + 0.41 (%G+C)-0.63 (%φορμαμίδιο) - 500/n (Bolton & McCarthy, 1962). Η χρήση φορμαμί-διου συνίσταται σε περιπτώσεις όπου η υβριδοποίηση πρέπει να γίνει σε χαμηλή θερμοκρασία, ετσί ώστε να μειωθεί το background.
- ✓ Το φορμαμίδιο είναι οργανικός διαλύτης, ο οποίος μειώνει τη θερμική σταθερότητα των δεσμών και με αυτόν τον τρόπο δεν ευνοεί τη μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή.
- ✓ Όσο μικρότερος είναι ο όγκος του διαλύματος υβριδοποίησης τόσο αποτελεσματικότερη είναι η υβρι-δοποίηση διότι η κινητική και η επανασύνδεση των νουκλεινικών οξέων είναι πιο γρήγορη.

8.4 Ανίχνευση σήματος

Η διαδικασία συνίσταται στην απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου ανιχνευτή (βήμα 1-5), στη πρόσδεση της στρεπταβιδίνης [σύμπλοκο στρεπτα-βιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (AP)] στη βιοτίνη (βήμα 6-8) και στην ανίχνευση του σήματος (βήμα 9-10). Η απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή, ο οποίος δεν έχει προσδεθεί καθόλου ή έχει ασθε-νώς υβριδοποιηθεί μη ειδικά, με αλληλουχίες με τις οποίες μπορεί να έχει μια μικρού βαθμού ομολογία επιτυγχάνεται με διαλύματα που περιέχουν άλατα (SSC) σε προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις και την κατάλληλη ποσότητα SDS. Η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη της σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα, ώστε να μειωθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδε-σης του αντισώματος.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και την στρεπταβιδίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη με αλκαλική φωσφατάση, και την ιδιότητά της να καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση με το X-phosphate και το NBT. Το X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phospate, 4-toluidine salt) χρησιμο-ποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατά-ση και το 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl που σχηματί-ζεται αντιδρά αυθόρμητα με το O_2 για να δώσει μία αδιάλυτη ερυθροκυανή χρώση, ενώ το NBT χρησιμο-ποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων αντί του O_2. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστικό-τητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους.

1. Το διάλυμα υβριδοποίησης όπου περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C, έως ότου επα-ναχρησιμοποιηθεί.
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης Α και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

3. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα.
4. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης Β υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση για 20 λεπτά.
5. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.

Σημείωση

✓ Όσο μειώνεται η συγκέντρωση του SSC στο διάλυμα πλύσης (μείωση ιοντικής ισχύς), τόσο ευκολότερα απομακρύνεται ο ανιχνευτής..

**Όλες οι επόμενες διεργασίες πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου*

1. Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα Α για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα Β για τουλάχιστον 30 λεπτά.
2. Το διάλυμα Β απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα Β, το οποίο περιέχει 5 μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10 ml, και επωάζεται για 30 λεπτά.
3. Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διαλυμα Α για 15 λεπτά και επαναλαμβάνεται το βήμα.
4. Η μεμβράνη εξισσοροπείται σε διάλυμα C για 2 λεπτά.
5. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος C, το οποίο περιέχει 50 μl NBT και 37.5 μl BCIP ανά 10 ml διαλύματος.
6. Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με dH_2O.

Σημειώσεις

✓ Μετά την εμφάνιση, η μεμβράνη είναι δυνατόν να αποχρωματιστεί με επώαση σε διάλυμα DMF σε θερμοκρασία 50°C για 10 λεπτά.

✓ Όταν ο ανιχνευτής είναι βιοτινυλιωμένος, η μεμβράνη μπορεί να απουβριδοποιηθεί με επώαση σε διάλυμα 1X SSC / 1% SDS σε θερμοκρασία 95°C για 5 λεπτά και εξισορρόπησή της σε διάλυμα 1X SCC σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

✓ Στη διαλογή των βακτηριοφάγων ο προσανατολισμός της μεμβράνης ως προς το τρυβλίο προσδιορίζεται με βάση τα σημεία διάτρησης, ώστε να εντοπιστούν οι πλάκες που αντιστοιχούν σε θετικά σήματα υβριδοποίησης. Αραί-ωση του φαγικού εναιωρήματος της πλάκας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δεύτερη διαλογή.

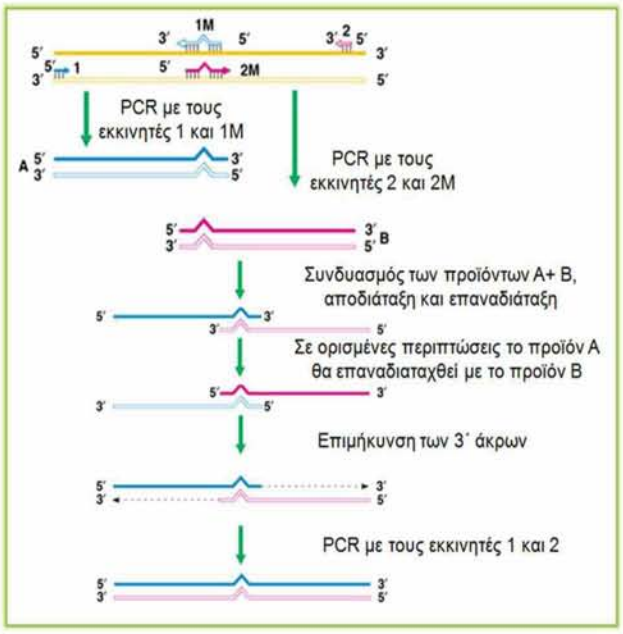
9. In vitro ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Η *in vitro* μεταλλαξιγένεση δίνει τη δυνατότητα στοχευμένης αλλαγής συγκεκριμένων βάσεων του DNA με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου τους. Ένα η βάση που μεταβάλλεται βρίσκεται σε κωδική περιοχή του DNA τότε η αλλαγή (προσθήκη, αφαίρεση ή αλλαγή νουκλεοτιδίων) μπορεί να συνεπάγεται και αλλαγή στο πρωτεϊνικό επίπεδο. Ένα αντίθετα, η βάση που μεταβάλλεται βρίσκεται σε ρυθμιστική περιοχή του DNA, η αλλαγή μπορεί να αποκαλύψει τον ιδιαίτερο ρόλο συγκεκριμένων περιοχών. Η πρώτη μέθοδος μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων περιγράφηκε το 1978 (Hutchison et al., 1978; Razin et al., 1978).

9.1 Μεταλλαξιγενεση με χρήση PCR

Η τεχνική της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης με τη μέθοδο της προέκτασης αλληλοεπικαλυπτώμενων άκρων (overlap extension) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Ho et al., 1989) επιτρέπει την αφαίρεση, προσθήκη ή αντικα-τάσταση νουκλεοτιδίων σε μια DNA αλληλουχία. Για την μεταλλαξιγένεση απαιτείται ένας συνδυασμός 4 ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, δύο “εσωτερικών” τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη στο κέντρο του μορίου και δύο “εξωτερικών” τα οποία προσδένονται στα άκρα της DNA αλληλουχίας. Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR με απότέλεσμα να παράγονται δύο δίκλωνα DNA προϊόντα με αλληλοεπικαλυπτόμενα άκρα. Στο δεύτερο στάδιο τα προϊόντα αυτά ενώνονται σε μια δεύτερη αντίδραση PCR κατά την οποία τελείται υβριδισμός στο τμήμα των αλληλοεπικαλυπτώμεναν άκρων με απότέλεσμα να παράγεται ένα δίκλωνο DNA προϊόν, το οποίο φέρει τη μετάλλαξη (Εικόνα 3-6).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 3-6: Αρχή της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης αλληλοεπικαλυπτώμενων άκρων.

1. Το DNA (cDNA κλωνοποιημένο σε πλασμίδιο), στο οποίο θα εισαχθεί η μετάλλαξη, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα σε δύο αντιδράσεις PCR με εκκινητές στην πρώτη αντίδραση: εξωτερικός εμπρόσθιος/εσωτερικός οπίσθιος και στη δεύτερη αντίδραση: εσωτερικός εμπρόσθιος/εξωτερικός οπίσθιος, αντίστοιχα.
2. Τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων PCR αναμιγνύονται και χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα σε νέα αντίδραση PCR με εκκινητές τους: εξωτερικός εμπρόσθιος/ εξωτερικός οπίσθιος.
3. Ο έλεγχος της ύπαρξης της μετάλλαξης πραγματοποιείται με κλωνοποίηση του προϊόντος, μετασχηματισμό και ανάλυση της πρωτοδιάταξης του.

9.2 Μεταλλαξιγένεση με τη μέθοδο Kunkel

Η μέθοδος Kunkel αποτελεί μία κλασσική τεχνική κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης για την εισαγωγή μεταλλάξεων, η οποία εκμεταλλεύεται το γεγονός της ισχυρής επιλογής κατά υποκατεστημένων με ουρακίλη DNA που συναντάται σε στελέχη *E.coli* τα οποία εκφράζουν την uracil-DNA glycosylase (Kunkel, 1985; Kunkel et al., 1987).

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: α. το μετασχηματισμό του πλασμιδίου, το οποίο περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να μεταλλαχθεί σε στέλεχος *E.coli* που δεν εκφράζει τα γονίδια dUTPάση και uracil-N-glycosidase (*dut-, ung-* F΄) παρουσία του βακτηριοφάγου M13 με αποτέλεσμα τη δημιουργία μονόκλωνου DNA (ssDNA) που περιέχει ουρακίλη αντί θυμίνης, β. τη χρησιμοποίηση του μονόκλωνου DNA ως υπόστρωμα σε μία διαδικασία μεταλλαξιγενεσης με ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο φέρει τη μετάλλαξη, για να παραχθεί ένα ετεροδίκλωνο μόριο στο οποίο η μία αλυσίδα περιέχει ουρακίλη στην αλυσίδα εκμαγείο και θυμίνη στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα και γ. το μετασχηματισμό του ετεροδίκλωνου μορίου DNA σε ένα στέλεχος *ung*$^{+}$, με αποτέλεσμα την καταστροφή της αλυσίδας που περιέχει ουρακίλη και τη συνεχή καταστολή της παραγωγής αγρίου τύπου βακτηριοφάγων. Ένα μεγάλο ποσοστό των απογόνων των βακτηριοφάγων (80%) επομένως θα παραχθούν από διπλασιασμό των αλυσίδων που περιέχουν θυμίνη κι επειδή η σύνθεση της αλυσίδας αυτή έχει πραγματοποιηθεί με μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο, ένα υψηλό ποσοστό των βακτηριοφάγων θα περιέχει τη μετάλλαξη.

Σημείωση

- ✓ Ο ρόλος της dUTPάσης συνίσταται στη μετατροπή του dUTP σε dUMP. Η έλλειψη της dUTPάσης σε κύτταρα *dut*-οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του dUTP, με αποτέλεσμα μέρος των dUTP να ενσωματώνονται στο DNA αντί της θυμίνης (Konrad & Lehman, 1975).
- ✓ Ο ρόλος της uracil-N-glycosidase είναι η απομάκρυνση των βάσεων ουρακίλης που έχουν ενσωματωθεί στο DNA, με αποτέλεσμα στελέχη που στερούνται της παρουσίας της (*ung*$^{-}$) να περιέχουν ουρακίλη (Lindhal, 1974).

9.2.1 *Δημιουργία μονόκλωνου DNA*

Η διαδικασία που ακολουθείται αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφεται από τους Sanger et al. (1980) και Messing (1983) και συνίσταται στην παραγωγή μονόκλωνου DNA βακτηριοφάγου M13 από ιικά σωμάτια. Τα σωμάτια αυτά εκκρίνονται από τα μολυσμένα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο και συλλέγονται με κατακρήμνιση παρουσία PEG και υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Το μονόκλωνο DNA λαμβάνεται με εκχύλιση με Tris-EDTA-CTAB και κατακρήμνιση με αιθανόλη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1. Το DNA, στο οποίο πρόκειται να εισαχθεί η μετάλλαξη, κλωνοποιείται σε πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματίζεται σε βακτήρια στελέχους RZ 1032.
2. Μοναδική αποικία, που προκύπτει από τον μετασχηματισμό, μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και αναδιαλύεται σε υγρό θρεπτικό μέσο 2XTY (50 μl).
3. Το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων επιμολύνεται με την προσθήκη του βοηθού βακτηριοφάγου M13KO7 (1 μl, > 10^{10} pfu/ ml) και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
4. Προστίθεται υγρό θρεπτικό μέσο 2XTY (500 μl) εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό της επιλογής του φορέα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 1 ώρα.
5. Ποσότητα της καλλιέργειας (200 μl) μεταφέρεται σε σωλήνα καλλιέργειας, προστίθεται υγρό θρεπτικό μέσο 2XTY (4 ml) εμπλουτισμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για την επιλογή του φορέα και του βακτηριοφάγου και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) για 18 ώρες.
6. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκι τύπου eppendorf (2 ml) και συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 13,000 g για 5 λεπτά.
7. Ποσότητα του υπερκειμένου (1.4 ml) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf, προστίθεται διάλυμα PEG-NaCl (175 μl) και επωά-ζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13,000 g για 10 λεπτά και επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα Tris-EDTA-CTAB (350 μl).
9. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 13,000 g για 10 λεπτά.
10. Το ίζημα αναδιαλύεται σε ddH_2O (50 μl) και κατάκρημνίζεται με αιθανόλη.
11. Το ίζημα αναδιαλύεται σε ddH_2O (20 μl).

Σημείωση

- ✓ Η απόδοση του μονόκλωνου DNA είναι συνήθως 5-10 μg / ml αρχικής καλλιέργειας που επιμολύνεται.
- ✓ Η προσθήκη NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα, ενώ η πολυαιθυλενογλυκόλη 8000 προκαλεί τη κατακρήμνιση τους.

9.2.2 Φωσφορυλίωση του εκκινητή που φέρει τη μετάλλαξη

Η φωσφορυλίωση των συνθετικών ολογονουκλεοτιδίων πραγματοποιείται από τη δράση του ενζύμου T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση. Η T4 κινάση καταλύει τη μεταφορά και ανταλλαγή ενός Pi από τη γ- θέση του ATP στο 5'υδροξυλικό άκρο μονόκλωνων και δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη και παρουσία ADP το ένζυμο παρουσιάζει δράση 5' φωσφατάσης και καταλύει την ανταλλαγή των φωσφορικών ομάδων του 5' άκρου (Berkner & Folk, 1977).

1. Σε σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθενται διαδοχικά ο εκκινητής (2.5 μl από διάλυμα 100 ng / μl), dATP σε συγκέντρωση 1 mM, το ρυθμιστικό διάλυμα, η απαραίτητη ποσότητα ddH_2O, ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος και το ένζυμο (3 -6 untis).

Εκκινητής	250 ng
dATP	1 mM
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X
T4 κινάση	3-6 unit
ddH2O	Έως τελικό όγκο
Τελικός όγκος	$V_{τελ}$

1. Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά.
2. Το ένζυμο απενεργοποιείται με επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία 70°C για 10 λεπτά.

Σημείωση

- ✓ Η αγρίου τύπου βακτηριοφαγική κινάση παρουσιάζει δράση 5' φωσφοτρανσφεράσης και 3' φωσφατάσης (Depew & Cozzarelli, 1974; Sirotkin et al., 1978).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

- ✓ Επειδή η T4 κινάση αναστέλλεται από την παρουσία ιόντων αμμωνίου, το DNA δε πρέπει να κατακρημνίζεται παρουσία ιόντων αμμωνίου πριν τη φωσφορυλίωση.
- ✓ Η δραστικότητα του ενζύμου μειώνεται όταν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο το DTT έχει οξειδωθεί. Η οξείδωση του DTT είναι ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο όμως επιταχύνεται με τους συνεχείς κύκλους παγώματος / ξεπαγώματος του ρυθμιστικού διαλύματος. Συνίσταται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος <1 χρόνου, ή η προσθήκη DTT σε τελική συγκέντρωση 5 mM.

9.2.3 Μεταλλαξιγένεση

Η μεταλλαξιγλενεση στηρίζεται στην υβριδοποίηση ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου συμπληρωματικού ως προς το μονόκλωνο εκμαγείο στο οποίο γίνεται η σημειακή μετάλλαξη. Το ολιγονουκλεοτίδιο φέρει τη μετάλλαξη στο κέντρο του μορίου, ενώ τα άκρα του παραμένουν συμπληρωματικά ως προς το εκμαγείο. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι τέτοιες, ώστε να ευνοούν τον εξειδικευμένο υβριδισμό του ολιγονουκλεοτιδίου στην επιθυμητή περιοχή του γονιδίου. Η επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA γίνεται με εκκινητή το ολιγονουκλεοτίδιο από μία DNA πολυμεράση, ενώ η δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο χάσμα μεταξύ εκκινητή και κλώνου γίνεται από μία λιγάση. Η επιλογή των μεταλλαγμάτων γίνεται με τη χρήση αντιβιοτικού, στο οποίο ο πλασμιδιακός φορέας προσδίδει ανθεκτικότητα.

Η διαδικασία που ακολουθείται αποτελεί συνδυασμό των μεθόδων των Zoller & Smith (1984) και του Kunkel (1985).

1. Σε σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθενται το μονόκλωνο DNA (4 μl), ο φωσφορυλιωμένος εκκινητής (4 μl), το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης και η απαραίτητη ποσότητα ddH_2O ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης.
2. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 70°C για 3 λεπτά και αμέσως μεταφέρεται σε πάγο για 10 λεπτά.
3. Προστίθενται ρυθμιστικό διάλυμα T7 DNA πολυμεράσης, η T7 DNA πολυμεράση και T4 DNA λιγάση και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.
4. Η απενεργοποίηση των ενζύμων πραγματοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 70°C για 10 λεπτά.
5. Ακολουθεί μετασχηματισμός (3 μl) σε κύτταρα DH5α.

10. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών επιτυγχάνεται κλω-νοποιώντας τα αντίστοιχα cDNAs σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς με ρυθμιστικά στοιχεία που επάγονται ισχυρά στο κυτταρικό περιβάλλον, όπου εισάγονται οι πλασμιδιακές κατασκευές. Την έκφραση των πρωτεϊνών ακολουθεί η απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και η ανάλυσή του με ηλεκτροφόρηση ή φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση σακχαρόζης.

10.1 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Η διαμόλυνση χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων, καθιστώντας δυνατή τη μελέτη της ρύθμισης και της έκφρασης της αλληλουχίας που έχει είσαχθεί. Συγκεκριμένα, με τη μεταφορά αυτή μπορούν να ελεγθούν ρυθμιστικές αλληλουχίες, να αναζητηθούν μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ωρίμανση και μεταμεταγραφική επεξεργασία του RNA, να εκφρασθούν κλωνοποιημένα cDNA και να παραχ-θούν σε μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνες από τα κλωνοποιημένα γονίδια. Η εξεταζόμενη αλληλουχία μεταφέρεται μέσω του κατάλληλου φορέα σε κύτταρα θηλαστικών, τα οποία κυρίως προέρχονται από καρκινικές σειρές. Για τη μεταφορά έχει αναπτυχθεί ποικιλία μεθόδων, είτε φυσικές είτε χημικές, γεγονός που αντικατοπτρίζει τις διαφορετικές απαιτήσεις και χαρακτηριστικά των επιμέρους κυτταρικών σειρών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

10.1.1 Διαμόλυνση με DEAE-δεξτράνη

Η διαμόλυνση με DEAE-δεξτράνη είναι η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή DNA μορίων σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Vaheri & Pagano, 1965). Η μεταφορά DNA πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση του θετικά φορτισμένου πολυμερούς DEAE-δεξτράνη (MW > 500,000) (Diethyl-aminoethyl-Dextran). Λόγω των αντίθετων φορτίων οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA συνδέονται με το πολυμερές και το σύμπλοκο προσκολλάται στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη (Lieber et al., 1987; Holter et al., 1989). Η είσοδος του "ξένου" μορίου πραγματοποιείται με ενδοκύττωση, η οποία ενεργοποιείται από οσμωτικό σοκ (Ryser, 1967; Yang & Yang, 1997).

- ✓ Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται είναι τα COS-7, τα οποία αποτελούν κυτταρική σειρά με μορφολογία ινοβλαστών που προέρχεται από μετασχηματισμό των κυττάρων CV1. Τα κύτταρα CV1 προέρχονται από νεφρό πράσινου Αφρικανικού πιθήκου με στέλεχος του ιού SV40. Η κυτταρική αυτή σειρά περιέχει το T αντιγόνο του ιού SV40, του οποίου επιτρέπει το λυτικό κυκλο (Gluzman, 1981).
- ✓ Ως φορέας έκφρασης χρησιμοποιείται ο pEF-BOS, ο έλεγχος του οποίου είναι κάτω από τον ανθρώπινο υποκινητή EF-10c (Mizushima S & Nagata S, 1990).
- ✓ Η ανάπτυξη των κυττάρων προς διαμόλυνση πραγματοποιείται με ορό από έμβρυο μόσχου (Fetal Calf Serum) και Nu–ορό, οι οποίοι έχουν κατεργαστεί με σόμαν (soman) (10^{-6} M), ώστε να ανασταλεί μη αναστρέψιμα η οποιαδήποτε χολινεργική δραστηριότητα των κυττάρων. Η κατεργασία πραγματοποιείται τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν την επιμόλυνση ώστε η περίσσεια σόμαν να υδρολυθεί κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε θερμοκρασία 4°C.

1. Τα κύτταρα πρέπει την ημέρα της διαμόλυνσης να καλύπτουν το 60-70% του δαπέδου του τρυβλίου (30 mm), στο οποίο έχουν μεταφερθεί την προηγούμενη ημέρα.
2. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από τα τρυβλία, τα κύτταρα ξεπλένονται με Διάλυμα PBS (3 ml) και προστίθεται Nu-ορός (1.5 ml).
3. Σε σωληνάκι τύπου eppendorf προστίθενται το DNA (4 μg), διάλυμα TBS (50 μl) και διάλυμα DEAE-δεξτράνη / TBS (100 μl), το οποίο έχει προ-θερμανθεί σε θερμοκρασία 37°C (1 mg DEAE –δεξτράνη/ml TBS).
4. Το μείγμα ανακινείται ισχυρά και προστίθεται στα τρυβλία μαζί με διάλυμα χλωροκουΐνης σε τελική συγκέντρωση 100 μM (0.5 ml, 10 μl ChlQ / ml Nu-ορός).
5. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO_2 για 2 ώρες και 30 λεπτά.
6. Το μείγμα (DNA-DEAE δεξτράνη-ChlQ-ορός) απομακρύνεται από τα τρυβλία, τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS (3 ml) και προστίθεται Nu-ορός.
7. Τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκασία 37°C για 3 ημέρες.

Σημείωση

- ✓ Η χλωροκουίνη (chloroquine) αυξάνει την αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης λόγω του ότι αναστέλλει την αποδόμηση του DNA από τις υδρολάσες των λυσσωμάτων και επάγει την πρόωρη απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα (Luthman & Magnusson, 1983).
- ✓ Τα κύτταρα πρέπει να αναπτυχθούν για τουλάχιστον 20 ώρες πριν την επιμόλυνση. Ανάπτυξη για λιγότερο από 12 ώρες έχει ως αποτέλεσμα την αποκόλληση των κυττάρων κατά την έκθεση τους σε DEAE-δεξτράνη.

10.1.2 Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από καλλιέργεια κυττάρων

Η απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, απαιτεί την ανάπτυξη μονοστιβάδων κυττάρων σε τρυβλία καλύπτοντας το υπόστρωμα κατά 90%. Η διαδικασία περιλαμβάνει: α. το διαχωρισμό του θρεπτικού μέσου και των κυττάρων, ώστε να διαχωριστούν οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες, β. τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης με επώαση των κυττάρων σε διάλυμα λύσης και γ. τη συλλογή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (υπερκείμενο), ύστερα από φυγοκέντρηση και καθίζηση των κυτταρικών υπολειμμάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1. Το θρεπτικό μέσο (2 ml) μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS (1.5 ml).
2. Στα κύτταρα προστίθεται διάλυμα εκχύλισης TMg (300 μl) προθερμασμένο σε 20°C.
3. Τα κύτταρα συλλέγονται με απόξυση, μεταφέρονται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και μετά από ισχυρή ανάδευση 30 δευτερολέπτων, αναδεύονται σε 200 rpm για 10 λεπτά.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13,000 g για 10 λεπτά και συλλογή του υπερκειμένου όπου περιέχεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων.
5. Η ανίχνευση της παραγόμενης πρωτεΐνης πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

10.2 Κατεργασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με PIPLC

Η ειδική φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIPLC) χρησιμοποιείται για τον καθορισμό πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη μέσω GPI άγκυρας.

1. Ποσότητα του πρωτεινικού εκχυλίσματος (10 μl) και του θρεπτικού μέσου (40 μl) αναμιγνύονται με το αντιδραστήριο Ellman και μετράται η δραστικότητα με φωτομέτρηση σε 414 nm.
2. Κύτταρα και θρεπτικό μέσο ίδιας δραστικότητας τοποθετούνται σε σωληνάκια τύπου eppendorf, προστίθεται PIPLC και επωάζονται σε θερμοκρασία 30°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.
3. Προστίθεται επιπλέον PIPLC και επωάζεται σε θερμοκρασία 30°C για 1 ώρα και 30 λεπτά.
4. Τα δείγματα αναλύονται είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είτε με βαθμίδωση πυκνότητας σουκρόζης.

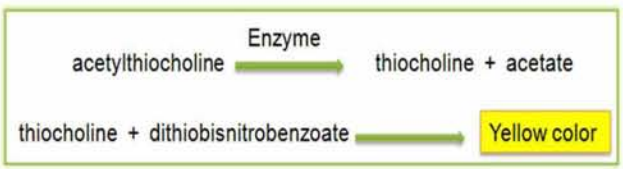
10.3 Κλασματοποίηση μορφών ακετυλοχολινεστεράσης σε βαθμίδωση πυκνότητας σουκρόζης

Ο συντελεστής καθίζησης των διάφορων μορφών της ακετυλοχολινεστεράσης προσδιορίζεται μετά από φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας σουκρόζης.

1. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα κατεργασμένο με και χωρίς PIPLC τοποθετείται στην κορυφή 5 ml γραμμικά μεταβαλλόμενης βαθμίδωσης, 5-20% κ.β. σουκρόζης.
2. Η βαθμίδωση παρασκευάζεται σε διάλυμα 0.8% Brij-96 και διάλυμα Triton X-100.
3. Επιπλέον σαν πρωτείνες αναφοράς προστίθενται η β-γαλακτοσιδάση της *E.coli* (16 S) και αλκαλική φωσφατάση (6.1 S) (sedimentation control).
4. Η βαθμίδωση πραγματοποιείται σε υπερφυγόκεντρο Beckman, κεφαλή SW 50.1,σε 36,000 rpm για 18 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.
5. Συλλέγονται κλάσματα των 200 μl από την κορυφή της βαθμίδωσης και αναλύονται για τη δραστικότητα της ακετυλχολινεστεράσης, της β-γαλακτοσιδάσης και της αλκαλικής φωσφατάσης με τη μέθοδο Ellman.

10.4 Προσδιορισμός δραστικότητας ακετυλοχολινεστεράσης με τη χρωμομετρική μέθοδο Ellman.

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης πραγματοποιείται με τη χρωμομετρική μέθοδο Ellman et al. (1961). Η μέθοδος βασίζεται στην προοδευτική ανάπτυξη κιτρίνου χρώματος από την αντίδραση της θειοχολίνης με το DTNB. Η ακετυλοθειοχολίνη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα και υδρολύεται από την ακετυλοχολινεστεράση. Η αρχή της μεθόδου είναι η μέτρηση του ρυθμού παραγωγής της θειοχολίνης καθώς υδρολύεται η ακετυλοθειοχολίνη από το ένζυμο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συνεχή αντίδραση της θειόλης (ρίζα SH, thiol) με το ιόν του DTNB (5:5-dithiobis-2-nitrobenzoate ion), ώστε να παραχθεί το ανιόν του 5-θειο-2-νιτρο βενζοϊκό οξύ (5-thio-2-nitrobenzoic acid) (Εικόνα 2-7). Ο ρυθμός της ανάπτυξης χρώματος μετράται στα 412 nm.



Εικόνα 2-7: Αρχή της χρωμομετρικής μεθόδου Ellman.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1. Κεφάλι από ενήλικο άτομο δάκου τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf το οποίο περιέχει διάλυμα ομογενοποίησης (200 μl) και ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου.
2. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 5,000 g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο που αποτελεί την πηγή του ενζύμου μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
3. Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, ώστε η μέτρηση της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης να πραγματοποιηθεί στην ίδια ποσότητα πρωτεΐνης για το κάθε δείγμα.
4. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά απουσία ή παρουσίας της επιθυμητής συγκέντρωσης αναστολέα (εντομοκτόνου).
5. Η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης προσδιορίζεται με χρήση του υποστρώματος ιωδούχος ακετυλοθειοχολίνη (ATCh) σε τελική συγκέντρωση 1 mM, με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M SP, pH 7.4 και σε τελικό όγκο αντίδρασης 200 μl.
6. Η δραστικότητα προσδιορίζεται με μέτρηση της παραγωγής του ανιόντος και τη συνακόλουθη αύξηση της απορρόφησης στα 412 nm, έναντι δύο τυφλών δειγμάτων: το ένα με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M SP, pH 7.4, αντί της πρωτεΐνης και το άλλο με το ίδιο ρυθμιστικό αντί υποστρώματος.
7. Ως μονάδα ενζυμικής δραστικότητας ορίζεται το ποσό του ενζύμου, που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol υποστρώματος σε προϊόν ανά λεπτό.
8. Ως ειδική δραστικότητα του ενζύμου ορίζεται το ποσό των ενζυμικών μονάδων ανα 1 mg πρωτεΐνης.

10.5 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976), η οποία αποτελεί μία φασματοσκοπική μέθοδο. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει η χρωστική ουσία Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 να δεσμεύεται στα μόρια των πρωτεϊνών. Η χρωστική αυτή, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση και σε όξινο περιβάλλον, απορροφά στα 465nm και το χρώμα της είναι καστανό. Η δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυανού χρώματος και τη μεταβολή του μέγιστου απορρόφησης στα 595nm, όπου και μετράται φωτομετρικά.

1. Προετοιμασία διαδοχικών αραιώσεων διαλύματος BSA (0.05 mg-2 mg) (standard stock solution) με το ρυθμιστικό διάλυμα του προς ανάλυση πρωτεϊνικού δείγμα-τος.
2. Εξισορρόπηση του αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue σε θερμοκρασία δωματίου. Απλή ανάμειξη με αναστροφή της φιάλης.
3. Προσθήκη 1 ml σε 20 μl του αγνώστου πρωτεϊνικού διαλύματος και των αραιωμένων BSA προτύπων διαλυμάτων (πρόσδεση της ανιονικής μορφής της χρωστικής σε κατάλοιπα αργινίνης, με ταυτόχρονη μεταβολή του χρώματος από ερυθρόφαιο σε κυανούν)
4. Ήπια ανάμιξη και μέτρηση (εντός 15 λεπτών) της απορρόφησης στα 595 nm, έναντι τυφλού δείγματος που περιέχει ddH_2O αντί πρωτεϊνικού διαλύματος.
5. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας τις ενδείξεις απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων και υπολογισμός της άγνωστης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του δείγματος.

11. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *in silico*

11.1 Ανάκτηση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων GenBank

Η GenBank είναι μια βάση δεδομένων με ελεύθερη πρόσβαση, η οποία περιέχει αλληλουχίες DNA και πρωτεϊνών (Benson et al, 2002). Η πρόσβαση στην GenBank γίνεται μέσω του συστήματος Entrez του NCBI (National Center for Biotechnology Information), το οποίο είναι διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο www.ncbi.nlm.nih.gov. Για την ανάκτηση μιας αλληλουχίας DNA ή πρωτεΐνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

χρησιμοποιείται ο αντίστοιχος αριθμός πρόσβασης της αλληλουχίας ή κατάλληλη λέξη-κλειδί.

11.2 Σύγκριση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές ή αμινοξικές αλληλουχίες της GenBank πραγματοποιήθηκαν με χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al, 1990), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Τα προγράμματα αυτά χρησιμοποιούνται με σκοπό:

- ✓ τη σύγκριση μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων (BLASTN),
- ✓ τη σύγκριση μιας αμινοξικής αλληλουχίας με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων (BLASTP),

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει τη στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης, δηλαδή την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία. Για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε εξ ορισμού ως όριο η τιμή E=10 και οι μικρότερες από αυτήν τιμές θεωρήθηκαν από το πρόγραμμα στατιστικά σημαντικές. Οι αποδεκτές στοιχίσεις είχαν σχεδόν μηδενική τιμή E.

11.3 Στοίχιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και κατασκευή εξελικτικών δέντρων

Η στοίχιση νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών άλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW στο δικτυακό τόπο www.ebi.ac.uk.clustalw. Για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με βάση τη στοίχιση αμινοξικών αλληλουχιών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.1) (Kumar et al, 2001). Η κατασκευή τους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των αποστάσεων UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean), με βάση την οποία το μήκος των κλάδων του δέντρου εκφράζουν τις αντικαταστάσεις αμινοξέων. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίζονται (p-distances) ανά ζεύγος συγκρινόμενων πρωτεϊνών εκφράζουν το ποσοστό των αμινοξέων που είναι διαφορετικά στις δύο πρωτεΐνες (p=Nd / L, όπου p είναι η εξελικτική απόσταση, Nd ο αριθμός των διαφορετικών αμινοξέων και L ο συνολικός αριθμός των αμινοξέων που συμμετέχουν στη στοίχιση). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης αξιολογείται από τον ίδιο αλγόριθμο εφαρμόζοντας τη στατιστική δοκιμή 'Bootstrap test' (Kumar et al, 2001). Ως 'αξιόπιστη' θεωρείται η τοπολογία του δέντρου με 'τιμή Bootstrap' μεγαλύτερη από 90%.

11.4 Επεξεργασία αλληλουχιών DNA με το πρόγραμμα Omiga 2.0

Η επεξεργασία των αλληλουχίων DNA *in silico*, όπως για παράδειγμα η μετάφραση τους σε πρωτεΐνη, οι θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, εύρεση αναγνωστικού πλαισίου κ.α, πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd) (Kramer, 2001). Το Omiga 2.0 παρέχει ένα λειτουργικό περιβάλλον για την επεξεργασία νουκλεϊνικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών περιλαμβάνοντας γραφικά και πρόσβαση σε δικτυακές συνδέσεις (BLAST, βάση δεδομένων Genbank).

11.5 Επεξεργασία πρωτεϊνικών αλληλουχιών

Η διερεύνηση των βασικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε υπολογιστικά μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής και κυρίως με τη χρήση του "Σύστημα Εξειδικευμένης Ανάλυσης Πρωτεϊνών" "ExPASy" (www.expasy.org). Το ExPASy αποτελεί server του Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) και διαθέτει μηχανές αναζήτησης και εύρεσης πληροφοριών σχετικά με την πρωτεομική.

11.6 Στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS

Βασικές στατιστικές παράμετροι (π.χ. μέσος όρος, τυπικό σφάλμα) υπολογίσθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS ver. 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Επίσης, γραφήματα που παρουσιάζουν στατιστικά δεδομένα κατασκευάστηκαν με το ίδιο πακέτο. Το SPSS είναι ένα ισχυρό στατιστικό πακέτο, που μπορεί να εγκατασταθεί σε διάφορα λειτουργικά συστήματα (Windows, MacOS, Linux) και αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1965 στο Πανεπιστήμιο Standford της Καλιφόρνιας. Χρησιμοποιείται για προηγμένες στατιστικές αναλύσεις δεδομένων έρευνας και όχι μόνο σε διάφορες επιστήμες. Το SPSS διαθέτει έναν εκτεταμένο κατάλογο στατιστικών διαδικασιών όπως π.χ. περιγραφική στατιστική, τεστ για έλεγχο υποθέσεων, ανάλυση διακύμανσης και συνδιακύμανσης, συσχέτιση, παλινδρόμηση, μη παραμετρικές μεθόδους και μεθόδους πολλαπλών ανταποκρίσεων-μεταβλητών (SPSS Inc., 2004).

11.7 Πληθυσμιακή ανάλυση με το πρόγραμμα PopGene

Το πρόγραμμα Popgene v. 1.31 (Yeh et al., 1999) είναι ιδιαίτερα εύχρηστο και διευκολύνει την ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ και εντός των φυσικών πληθυσμών, χρησιμοποιώντας υπερέχοντες και συνυπερέχοντες δείκτες, καθώς και QTLs, τόσο για απλοειδή, όσο και για διπλοειδή δεδομένα. Μπορεί να εκτελέσει τα περισσότερα είδη ανάλυσης δεδομένων που απαντώνται στις πληθυσμιακές αναλύσεις.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΥΛΙΚΑ

Παρακάτω δίνεται η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις Μεθόδους. Η αρίθμηση αντιστοιχεί στην αρίθμηση των Μεθόδων.

1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

1.1 Εκτροφή εντόμου

***§1.1.2. Μείγμα Παραφίνης* (1 kgr):** Παραφίνη σημείου τήξεως 52-54°C (0.85 kg), Παραφίνη σημείου τήξεως 46-48°C (0.085 kg), Φυσικό κερί μέλισσας (0.065 kg).

***§1.1.2 Τροφή ενηλίκων* (1 kgr):** Υδρολυμένη μαγιά (200 gr), Ζάχαρη (800 gr), Κρόκος αυγού, σκόνη (60 gr), Στρεπτομυκίνη (0.5 gr).

***§1.1.4. Τροφή προνυμφών* (1 kgr):** H_2O (550 ml), Μαγιά μπύρας (75 gr), Υδρολυμένη σόγια (30 gr), Σορβικό κάλιο (0.5 gr), Νιπαγίνη (2 gr), Ζάχαρη (20 gr), Ελαιόλαδο (20 ml), Tween 80 (7.5 ml), HCl 2N (30 ml), Κυτταρίνη, σκόνη (275 gr).

1.2. Ανάπτυξη βακτηρίων

Θρεπτικά μέσα

***Υγρό LB* (1 L):** Βακτοτρυπτόνη (10 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NaCl (5 gr) pH 7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).

***Υγρό SOB* (1 L):** Βακτοτρυπτόνη (20 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NaCl (0.5 gr), 250 mM KCl (10 ml) pH 7.2. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια προστίθεται 2 M $MgCl_2$ (5 ml).

***Υγρό SOC* (1 L):** Όμοια σύσταση με το υγρό θρεπτικό μέσο SOB για τελικό όγκο 1 L, με επιπλέον προσθήκη μετά την αποστείρωση 1M Γλυκόζη (20 ml).

***Υγρό 2X YT* (1 L):** Βακτοτρυπτόνη (16 gr), Εκχύλισμα ζύμης (10 gr), NaCl (5 gr), pH 7.0. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

***Στερεό LB* (*LB-agar*) (1 L):** Βακτοτρυπτόνη (10 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), Άγαρ (15 gr), NaCl (5 gr) pH 7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).

Στελέχη *E. coli*

DH5α: *supE*44, Δ*lac*U169(φ80*lacZ*ΔM15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1.

XL1-Blue: *supE*44, *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*46, *gyrA*46*thi*, *relA*1*lac*$^-$, F´ [*pro*AB$^+$, *lacI*^{q}, *lacZ*ΔM15, Tn10(tet^r)].

RZ 1032: *dut, ung, thi, relA, spo*T1/F´ *lysA*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Πλασμίδια

pBluescript II SK (+): πολυσυνδέτης (653-760 bp)

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.1 Απομόνωση DNA

Διάλυμα ομογενοποίησης: 100 mM NaCl, 200 mM σουκρόζη, 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM EDTA, 0.5% SDS.

***Διάλυμα ΤΕ*:** 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA.

2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Διάλυμα I: 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8.

***Διάλυμα II*:** 0.2 N NaOH, 1% SDS

***Διάλυμα III*:** 5M CH_3COOK (60 ml), CH_3COOH (11.5 ml), dH_2O (28.5 ml)

4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

4.4 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

***Διάλυμα FSB*:** 10 mM CH_3COOK (αραίωση από διάλυμα 1M CH_3COOK pH 7.5 ρυθμισμένο με CH_3COOH), 45 mM $MnCl_2$*4 H_2O, 10 mM $CaCl_2$* 2 H_2O, 100 mM KCl, 3 mM $Co(NH_3)_6Cl_3$, 10% γλυκερόλη. Αποστείρωση με διήθηση με φίλτρο.

5. ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ

***Διάλυμα SM*:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2% $MgSO_4$* 7 H_2O, 0.01% ζελατίνη.

***NZY υπερκείμενη αγαρόζη (1 L)*:** NaCl (5 gr), $MgSO_4$*7 H_2O (2 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NZ αμίνη (10 gr), Αγαρόζη (0.7% w/v), pH 7.5. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

***NZY Άγαρ* (1 L):** NaCl (5 gr), $MgSO_4$*7 H_2O (2 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NZ αμίνη (10 gr), Άγαρ (15 gr), pH 7.5. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

6. PCR

Οι αλληλουχίες, η θερμοκρασία υβριδοποίησης και το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών για τα αντίστοιχα εξόνια δίνονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

	Μέγεθος προϊόντος (bp)	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ Εμπρόσθιος	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ Οπίσθιος	Συνθήκες PCR Annealing temp (°C)	Συνθήκες PCR Διάρκεια επιμήκυνσης (sec)
Εξόνιο II	315	Boace2F TTCGCGTCAATACAGTGTCG	Boace2R CTTTCTTGCACACAGGTTGC	55	30
*Εξόνιο III-V**	1666	Boace3F TATTTTCCCGGTTTCTCTGGC	Boace5R CGTCTCTGACATTTCCCATC	48	90
Εξόνιο VIII	142	Boace8F ACTAGCACTTCCCTATGG	Boace8R TAACGGCATTCAGCATCC	48	30
Εξόνιο IX	156	Boace9F CCACAGATGGCGAAGAATGG	Boace9R ATCCCCATTTCCGGACTTCG	53	30
Εξόνιο X	96	Boace10F TGAAGTCAAACCATCATCCG	Boace10R GACAGCGCCAACATGAACG	51	30
Wt Εξόνιο X	76	Ex10wt3'F-IMP CTTCCTCCCTGCAACAATAG	Boace10R GACAGCGCCAACATGAACG	55	30
Mut Εξόνιο X	67	Ex10mut3'F-IMP CTTCCTCCCTGCAACAATAC	Boace10R GACAGCGCCAACATGAACG	55	30
		5΄ RACE PCR			
GSP1		ATGTCTGCACCACCAAAC			
GSP2		TGACGCCATACACGGAGGACATAC			

* Περιέχει και τα ιντρόνια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

***Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE* (1 L):** Tris-base (54 gr), Βορικό οξύ (27.5 gr), 0.5 M EDTA (20 ml).

***Διάλυμα χρωστικής* 6X:** 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% Κυανούν της ξυλόλης, 15% Φικόλλη σε dH_2O.

***Διάλυμα ηλεκτροφόρησης γλυκίνης 5X* (1 L):** Tris (15.1 gr), γλυκίνη (94 gr), SDS 20% (25 ml).

***Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης με 0.5% Triton* (1 L):** Triton 20% (12.5 ml), Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 1X (500 ml), dH_2O (έως 1 L).

***Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης με 0.5% Triton και 0.25% DOC* (1 L):** Triton 20% (12.5 ml), DOC 5% (10 ml), Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης 1X (500 ml), dH_2O (έως 1 L).

***Διάλυμα Karnovsky* (300 ml):** Ρυθμιστικό διάλυμα Οξικού (195 ml), $CuSO_4$ (2.25 gr), CH3COONa (8.82 gr), $K_4[Fe(CN)_6]^* 3H_2O$ (0.495 gr), dH2O (έως 300 ml).

8. ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

***Διάλυμα Αποδιάταξης*:** 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

***Διάλυμα Εξουδετέρωσης*:** 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl

***Διάλυμα 20X SSC*:** 0.3 M Κιτρικό νάτριο pH 7, 3 M NaCl

***Διάλυμα Υβριδοποίησης*:** 6X SSC, 5X Denhardt's, 0.5% SDS

***Διάλυμα 50X Denhardt's*:** 1% φικόλλη,1% PVP, 1% BSA.

***Διάλυμα Πλύσης A*:** 2X SSC, 0.1% SDS

***Διάλυμα Πλύσης B*:** 0.2X SSC, 0.1% SDS

***Διάλυμα A*:** 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl

***Διάλυμα B*:** Διάλυμα A, 1% Διάλυμα Blocking

***Διάλυμα Blocking* (10%):** Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (10 gr) σε 100 ml Διαλύματος A.

***Διάλυμα C*:** 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$

***9. In vitro* ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ**

***Διάλυμα PEG-NaCl*:** 10 gr PEG 6000 σε 50 ml NaCl 2.5M

***Διάλυμα Tris-EDTA-CTAB*:** 100 mM Tris-HCl pH 8.1, 50 mM EDTA, 02% CTAB.

***Ρυθμιστικό διάλυμα T7 DNA πολυμεράσης*:** 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.5 mg/ ml BSA, 1.5 mM το καθένα dNTPs, 10 mM ATP.

10. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

***Φορέας έκφρασης*:** pEF-BOS

***Ορός Nu*:** DMEM (500 ml), Ορός Nu (50 ml), Γλουταμίνη (6 ml), Γενταμυκίνη (500 μl), πυρουβικό οξύ (5 ml), Μείγμα αντιοβιοτικών (5 ml) (10,000 u πενικιλλίνη, 10,000 μg στρεπτομυκίνη, 25 μg αμφοτερικίνη B).

***Διάλυμα 1X PBS* (1 L):** NaCl (8 gr), KCl (0.2 gr) Na_2HPO_4 (1.78 gr), KH_2PO_4 (0.24 gr). pH 7.4. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

***Διάλυμα 1x TBS* (1 L):** NaCl (8 gr), KCl (0.2 gr), Tris base (3 gr), φαινόλη (0.015 gr). pH 7.4. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

***Διάλυμα εκχύλισης TMg*:** 10 mM Tris base, 33 mM $MgCl_2$, pH 8.0.

***Αντιδραστήριο Ellman* (200 ml):** ATC (10 ml), DTNB (10 ml), Ρυθμιστικό διάλυμα SP 0.5M (20 ml), dH_2O (160 ml).

***Acetylthiocholine iodide* (ATC):** 0.4 gr ATC σε 100 ml dH_2O.

***DTNB*:** 0.4 gr σε ρυθμιστικό διάλυμα SP 0.1M, pH 7.4

***Ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M SP pH 7.4* (1 L):** Na_2HPO_4 (68.88 gr), NaH_2PO_4 (15.59 gr)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M SP pH 7.4: Na_2HPO_4 1 M (77.4 ml), NaH_2PO_4 1 M (22.6 ml)

***Βαθμίδωση σουκρόζης 0.8% Brij-96* (400 ml):**

5% (20 gr σουκρόζη, 2 ml $MgCl_2$, 10 ml Tris-HCl 1M pH 7.0, 80 ml NaCl 4M, 40 ml Brig-96 10%)

25% (80 gr σουκρόζη, 2 ml $MgCl_2$, 10 ml Tris-HCl 1M pH 7.0, 80 ml NaCl 4M, 40 ml Brig-96 10%)

***Βαθμίδωση σουκρόζης 0.8% Triton X-100* (400 ml):**

5% (20 gr σουκρόζη, 2 ml $MgCl_2$, 10 ml Tris-HCl 1M pH 7.0, 80 ml NaCl 4M, 20 ml Triton X-100 20%)

25% (80 gr σουκρόζη, 2 ml $MgCl_2$, 10 ml Tris-HCl 1M pH 7.0, 80 ml NaCl 4M, 20 ml Triton X-100 20%)

***Διάλυμα ομογενοποίησης*:** Ρυθμιστικό διάλυμα SP 0.1M pH 7.4, 1% Triton X-100.

***Διαλύματα αναστολέα*:** Αραιώσεις του εντομοκτόνου από 1 M έως 10^{-5} M σε ρυθμιστικό διάλυμα SP.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ

Η διερεύνηση και η μοριακή ανάλυση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου πραγματοποιήθηκε με βάση τη δομή και την οργάνωση του ορθόλογου γονιδίου της *Drosophila melanogaster* (Fournier et al., 1989) και τη χρήση του διαθέσιμου cDNA κλώνου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου (Vontas et al., 2002).

Αρχικά, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η ανίχνευση και απομόνωση ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων από γονιδιωματική βιβλιοθήκη δάκου με διαλογή, καθώς αυτό θα επέτρεπε την υποκλωνοποίηση μεγάλων περιοχών του γονιδιώματος και τη μελέτη της γονιδιωματικής τους οργάνωσης. Η δομική όμως ανάλυση των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων που επιλέχθηκαν κατέδειξε ότι αυτοί δεν κάλυπταν όλο το γονιδιακό τόπο της ακετυλοχολινεστεράσης. Έτσι, τα μεγέθη ορισμένων ιντρονίων καθώς και τα σημεία σύνδεσης εξονίων-ιντρονίων προσδιορίστηκαν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μεγάλου μήκους και ανάστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τέλος, έγινε προσπάθεια απομόνωσης του αμινοτελικού άκρου του γονιδίου, ανοδικά της θέσης έναρξης της μετάφρασης, με εφαρμογή της αντίδρασης 5΄ RACE-PCR. Παρά το γεγονός ότι ο διαθέσιμος cDNA κλώνος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου απομονώθηκε με την τεχνική της 5΄ RACE-PCR (Vontas et al., 2002), παρέχει πληροφορίες μόνο από το σημείο έναρξης της μετάφρασης και καθοδικά του γονιδίου. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι ο σκοπός της απομόνωσής του ήταν ο προσδιορισμός μεταλλάξεων στην κωδικοποιούσα περιοχή του ενζύμου που προσέδιδαν ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Η γνώση ολόκληρου του μεταγράφου αποτελεί μέρος του χαρακτηρισμού της οργάνωσης ενός γονιδιακού τόπου αλλά και απαραίτητο βήμα για την προσέγγιση και λειτουργική ανάλυση της περιοχής του υποκινητή. Γενικά, τόσο η γονιδιακή ρύθμιση της ακετυλοχολινεστεράσης των εντόμων όσο και οι υποκινητές των γονιδίων του δάκου είναι περιοχές ελάχιστα μελετημένες. Προς το παρόν, στο δάκο έχει αναφερθεί η απομόνωση ενός μόνο υποκινητή, του υποκινητή των γονιδιών θερμικού σοκ (hsp70) (Drosopoulou et al., 2009).

1.1 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η ανίχνευση και απομόνωση ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων λ που φέρουν τμήμα του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου πραγματοποιήθηκε με διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης λ-DASH®II ενήλικων ατόμων του εντόμου (Lagos et al., 2005) μέσω δύο διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων: 1. με απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης και 2. με διαλογή προεπιλεγμένων μέσω PCR κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

1.1.1 Απευθείας διαλογή

Η απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου πραγματοποιήθηκε περίπου σε 80,000 πλάκες ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων λ. Δεδομένης της εκτίμησης του μεγέθους του γονιδιώματος του δάκου [που έχει υπολογιστεί 5.4 x 10^8 bp (Gomulski et al., 1997)], του μέσου μεγέθους του ενθέματος του βακτηριοφάγου λ (~20 kb) και της σχέσης N = ln (1-P) / ln (1-f) (βλέπε Υλικά & Μέθοδοι §5.4), υπολογίζεται ότι η διαλογή 80,000 φαγικών κλώνων θα επέτρεπε την απομόνωση ενός γονιδίου μονού αντιγράφου με πιθανότητα 99%.

Η διαλογή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το cDNA της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (θερμοκρασία 65°C). Το cDNA απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης έπειτα από κατάτμηση του πλασμιδίου όπου ήταν κλωνοποιημένο και σημάνθηκε με βιοτίνη με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών. Η επιλογή μοναδικών κλώνων πραγματοποιήθηκε με δύο επαναδιαλογές στις ίδιες συνθήκες με την αρχική διαλογή. Τελικά, επιτεύχθηκε η απομόνωση ενός κλώνου, ο οποίος ονομάστηκε φBoace-a.

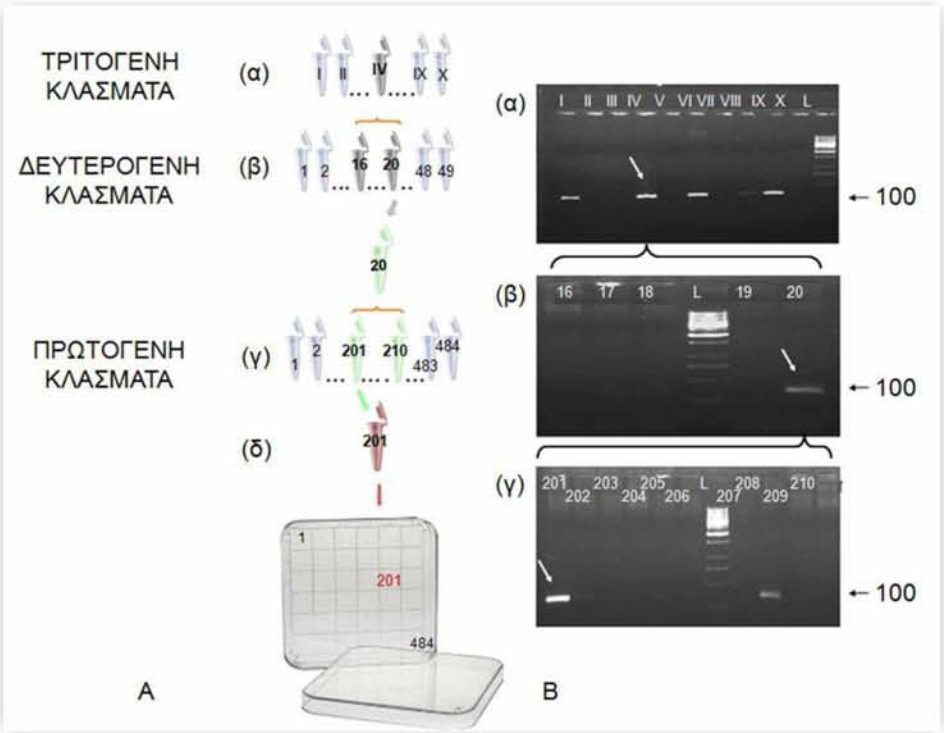
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

1.1.2 Διαλογή προεπιλεγμένων μέσω PCR κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Περίπου 100,000 ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου διαχωρίστηκαν σε 484 πρωτογενή κλάσματα, ώστε να περιέχουν περίπου 200 κλώνους ανά κλάσμα (βλέπε Υλικά & Μέθοδοι §5.5). Τα πρωτογενή κλάσματα συνδυάστηκαν ανά δέκα σε 49 δευτερογενή κλάσματα (με ~2,000 κλώνους το καθένα) και αυτά συνδυάστηκαν ανά 5 σε δέκα τριτογενή κλάσματα (με ~10,000 κλώνους το καθένα). Η συλλογή των κλασμάτων αυτών δίνει τη δυνατότητα ανεύρεσης ενός κλώνου με διαλογή σε ένα υποσύνολο της ολικής βιβλιοθήκης, το οποίο προεπιλέγεται σε μια διαδικασία διαδοχικών αντιδράσεων PCR στα τριτογενή και δευτερογενή κλάσματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3-1α.

Δηλαδή, θετικό σήμα στην αντίδραση PCR (με εκκινητές που ενισχύουν τμήμα της ακετυλοχολινεστεράσης) κάποιου κλάσματος της τριτογενούς ομάδας [(πχ κλάσμα IV, Εικόνα 3-1Β(α), λευκό βέλος)] υποδεικνύει την PCR ενίσχυση των δευτερογενών συστατικών του (κλάσματα 16-20). Στη συνέχεια, θετικό σήμα στην PCR κάποιου δευτερογενούς κλάσματος [(συγκεκριμένα του 20, Εικόνα 3-1Β(β)] υποδεικνύει την ενίσχυση των πρωτογενών συστατικών του (κλάσματα 201-210). Τέλος, θετικό σήμα στην PCR πρωτογενούς κλάσματος [(συγκεκριμένα του 201, Εικόνα 3-1Β(γ)] υποδεικνύει τη διαλογή του κλάσματος αυτού. Με τον τρόπο αυτό ο αριθμός των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων που υπόκεινται σε απευθείας διαλογή περιορίζεται σημαντικά, (καθώς ένα κλάσμα της πρωτογενούς ομάδας περιέχει ~200 κλώνους) καθιστώντας πιο εύκολο τον εντοπισμό του επιθυμητού κλώνου.

Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση βακτηριοφάγων που περιείχαν έξι διαφορετικά εξόνια του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Οι εκκινητές που χρησιμο-



Εικόνα 3-1: Διαλογή προεπιλεγμένων κλασμάτων μέσω PCR γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δάκου. Α και Β: Θετικό σήμα στην PCR των τριτογενών κλασμάτων [Α(α), γκρι eppendorf και Β(α), κλάσμα IV] οδηγεί σε 5 κλάσματα της δευτερογενούς ομάδας [Α(β), γκρι eppendorfs και Β(β)]. Θετικό σήμα στην PCR αυτών των 5 δευτερογενών κλασμάτων [Α(β), πράσινο eppendorf και Β(β), κλάσμα 20] οδηγεί σε 10 κλάσματα της πρωτογενούς ομάδας [Α(γ), πράσινα eppendorfs και Β(γ)] και αντίστοιχα θετικό σήμα στην PCR αυτών των κλασμάτων επιλέγει το τελικό κλάσμα [Α(δ), κόκκινο eppendorf και Β(γ), κλάσμα 201] για διαλογή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR σχεδιάστηκαν βάσει της αλληλουχίας του cDNA κλώνου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Συνδυάστηκαν με τρόπο ώστε να ενισχύονται σε διαφορετικές αντιδράσεις τα δυνητικά εξόνια II (Boace2F-Boace2R), VI (Boace6F-Boace6R), VII (Boace7F-Boace7R), VIII (Boace8F-Boace8R), IX (Boace9F-Boace9R) και X (Boace10F-Boace10R) του γονιδίου. Τα θετικά κλάσματα της τριτογενούς και δευτερογενούς ομάδας επιβεβαιώθηκαν με υβριδοποίηση των αντιδράσεων PCR κατά Southern, προτού ακολουθήσει η διαλογή των θετικών κλασμάτων της πρωτογενούς ομάδας. Η διαλογή πραγματοποιήθηκε σε περίπου 2,000 πλάκες ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων, έτσι ώστε να αντιπροσωπεύεται ο κάθε βακτηριοφάγος περίπου 10 φορές (ένα κλάσμα περιέχει ~200 βακτηριοφάγους). Ως ανιχνευτής στη διαλογή των πρωτογενών κλασμάτων αλλά και στην υβριδοποίηση κατά Southern των κλασμάτων των προηγουμένων ομάδων χρησιμοποιήθηκε το εξόνιο που ενίσχυαν σε κάθε αντίδραση PCR οι αντίστοιχοι εκκινητές και με το οποίο επιλέχθηκε το κάθε θετικό κλάσμα, σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (θερμοκρασία 65°C). Τα εξόνια απομονώθηκαν από πήκτωμα αγαρόζης έπειτα από αντίδραση PCR με εκμαγείο το cDNA κλώνο της ακετυλοχολινεστεράσης και σημάνθηκαν με βιοτίνη με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών ώστε να λειτουργήσουν ως ανιχνευτές. Παρόλο που επιλέχθηκαν πρωτογενή κλάσματα για όλες τις PCR αντιδράσεις (έξι διαφορετικές αλληλουχίες-εξόνια), κατά τη διαλογή τους εμφανίστηκαν θετικά σήματα μόνο για τα δυνητικά εξόνια VII (δύο σήματα) και IX (ένα σήμα). Τα σήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με επαναδιαλογή. Τελικά επιτεύχθηκε η απομόνωση τριών μοναδικών κλώνων, οι οποίοι ονομάστηκαν φBoace-b1, φBoace-b2 και φBoace-c. Συνοπτικά η πορεία των ενισχύσεων και επιλογών παρουσιάζεται στην Εικόνα 3-2.

1.2 Απομόνωση αμινοτελικού τμήματος γονιδίου με εφαρμογή 5΄ RACE-PCR και διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η απομόνωση του αμινοτελικού τμήματος του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή 5΄ RACE-PCR και με επακόλουθη διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του εντόμου χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το προϊόν της 5΄ RACE-PCR. Αρχικά, ολικό RNA από άτομο δάκου αποτέλεσε το εκμαγείο για τη σύνθεση cDNA με εκκινητή ειδικό για το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (GSP1-Gene Specific Primer). Ακολούθησε προσθήκη μορίων αδενίνης με το ένζυμο δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (TdT) στο 5΄ άκρο του νεοσυντιθέμενου cDNA. Στη συνέχεια, το μόριο αυτό ενισχύθηκε σε αντίδραση PCR με εκκινητές, έναν εσωτερικό του GSP1 (τον GSP2) και έναν ολιγό-dT.

Ονόματα εκκινητών	Θετικό τριτογενές	Αντίστοιχα δευτερογενή	Θετικό δευτερογενές	Αντίστοιχα πρωτογενή	Θετικό πρωτογενές	Κλώνος
Boace7F-Boace7R	I	1-5	✖			
	IV	16-20	20	201-210	201	φBoace-b1
	VI	26-30	27,28	271-280, 281-290	273, ✖	φBoace-b2
	IX	40-45	42	421-430	✖	
Boace9F-Boace9R	II	6-10	✖			
	III	11-15	12	121-130	124	φBoace-c

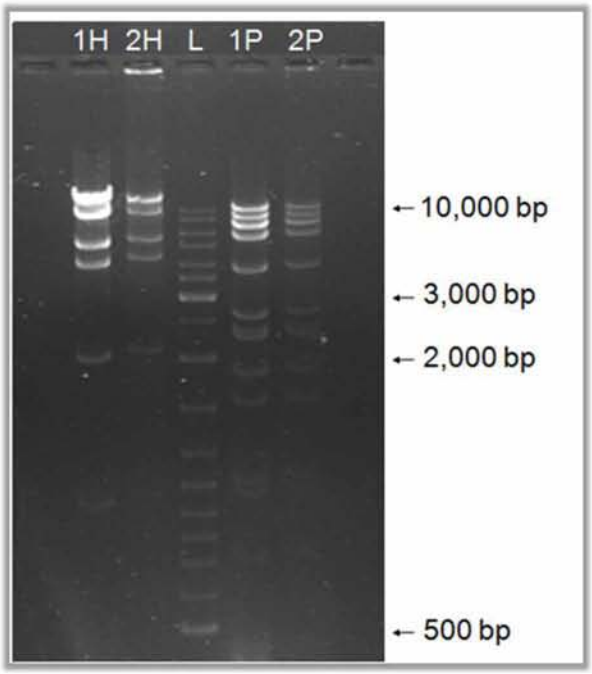
Εικόνα 3-2: Προεπιλογή κλασμάτων (μέσω PCR) γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δάκου. Οι αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές Boace7F-Boace7R και Boace9F-Boace9R (στήλη 1) ενίσχυσαν 4 και 2 κλάσματα, αντίστοιχα, από την τριτογενή ομάδα (στήλη 2). Τα δευτερογενή κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε αυτά (στήλη 3) χρησιμοποιήθηκαν σε νέα αντίδραση PCR με τους ίδιους εκκινητές. Τα θετικά κλάσματα που προέκυψαν (στήλη 4) κατέδειξαν τα πρωτογενή κλάσματα (στήλη 5) που έπρεπε να ελεγχθούν με PCR, ώστε να επιλεγεί το τελικό κλάσμα (στήλη 6) για διαλογή. Οι κλώνοι που απομονώθηκαν μετά τη διαλογή είναι οι φBoace-b1, φBoace-b2 και φBoace-c. Το σημείο στο οποίο σταμάτησε η προεπιλογή ορισμένων κλασμάτων, λόγω μη ενίσχυσης του επιθυμητού προϊόντος, συμβολίζεται με ✖.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Οι εκκινητές (GSP1, GSP2) σχεδιάστηκαν βάσει της αλληλουχίας του cDNA κλώνου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου και κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αντιστοιχούν σε περιοχή κοντινή του σημείου έναρξης της μετάφρασης (ATG) (Εικόνα 2-4). Ο λόγος αυτού του σχεδιασμού ήταν η όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη ενίσχυση της 5΄ περιοχής του μεταγράφου αλλά, ταυτοχρόνως, και η συνύπαρξη στο προϊόν ενίσχυσης μιας γνωστής αλληλουχίας που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην επιβεβαίωση του απομονωθέντος τμήματος. Το προϊόν που ενισχύθηκε κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBluescript II SK(+/-) (pBS) κατάλληλων άκρων. Η ανάλυση της πρωτοδιάταξής του με τον εξωτερικό εκκινητή του φορέα M13F (universal primer) παρουσίασε 100% ομοιότητα στην 3΄ περιοχή του με το 5΄ άκρο του cDNA της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου (μέσω dot blot του προγράμματος Omiga). Η επιβεβαίωση της επιθυμητής αλληλουχίας του προϊόντος της 5΄ RACE-PCR επέτρεψε τη χρήση του ως ανιχνευτή σε απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (θερμοκρασία 65°C). Ο ανιχνευτής σημάνθηκε με βιοτίνη με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών, αφού προηγήθηκε κατάτμηση του πλασμιδίου όπου ήταν κλωνοποιημένο το προϊόν της 5΄ RACE-PCR και απομόνωσή του από πήκτωμα αγαρόζης. Η πρώτη διαλογή οδήγησε στην απομόνωση τεσσάρων θετικών κλώνων, φBoace-d1, φBoace-d2, φBoace-d3 και φBoace-d4.

1.3 Δομική ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων

Η διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου με χρήση διαφορετικών ανιχνευτών (cDNA, εξόνια, προϊόν RACE-PCR) οδήγησε στην απομόνωση συνολικά οκτώ διακριτών ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων, για τους οποίους αρχικά δεν ήταν γνωστό πόσοι και ποιοι ήταν διαφορετικοί μεταξύ τους ή ακόμη αν ήταν όλοι όμοιοι. Προκειμένου να ελεγχθεί η ακεραιότητα των κλώνων αυτών και οι μεταξύ τους σχέσεις ήταν απαραίτητη η σύγκριση του πρότυπου κατάτμησης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες του κάθε κλώνου με το αντίστοιχο πρότυπο των υπολοίπων. Εξάλλου, βασική προϋπόθεση και για την περαιτέρω μελέτη και ανάλυση ενός οποιουδήποτε τμήματος DNA αποτελεί η δημιουργία ενός περιοριστικού χάρτη. Έτσι, οι οχτώ ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι (φBoace-a, φBoace-b1, φBoace-b2, φBoace-c, φBoace-d1, φBoace-d2, φBoace-d3, φBoace-d4) που επιλέχθηκαν με τις δύο διαδικασίες (απευθείας διαλογή και διαλογή προεπιλεγμένων κλασμάτων) ενισχύθηκαν με λύση σε υγρή καλλιέργεια και ακολούθησε η απομόνωση του φαγικού τους DNA. Το ανασυνδυασμένο φαγικό DNA των κλώνων κατατμήθηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες έξι θέσεων *Eco*RI, *Hin*dIII και το συνδυασμό τους για να δημιουργηθεί ένας χάρτης περιορισμού για τον καθένα και να διερευνηθεί η μεταξύ τους σύνδεση. Η προσέγγιση αυτή, με βάση το πρότυπο που προκύπτει από την κατάτμηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, η σύγκριση δηλαδή του αριθμού και του μεγέθους των περιοριστικών θραυσμάτων



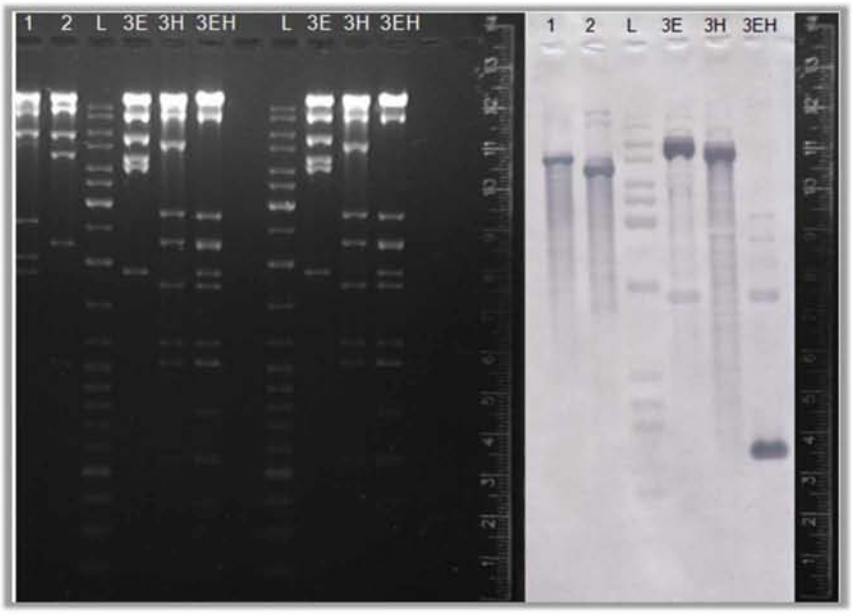
Εικόνα 3-3: Ανάλυση των απομονωμένων βακτηριοφαγικών κλώνων φBoace-b1 και φBoace-b2 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Φαγικό DNA των κλώνων υποβλήθηκε σε κατάτμηση με *Hin*dIII και *Pvu*II και αναλύθηκε σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Οι κλώνοι φBoace-b1 και φBoace-b2 παρουσίασαν πανομοιότυπο πρότυπο ως προς τις δύο κατατμήσεις, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για τον ίδιο γονιδιωματικό κλώνο. L: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA, 1H: κλώνος φBoace-b1 (*Hin*dIII), 2H: κλώνος φBoace-b2 (*Hin*dIII), 1P: κλώνος φBoace-b1 (*Pvu*II), 2P: κλώνος φBoace-b2 (*Pvu*II).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

που παρουσιάζει ο κάθε κλώνος, αποτέλεσε το πρώτο από μία σειρά βημάτων για τον καθορισμό των σχέσεων αυτών των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων μεταξύ τους. Οι κλώνοι φBoace-b1 και φBoace-b2 (Εικόνα 3-3) καθώς και οι φBoace-d1, φBoace-d2, φBoace-d3 και φBoace-d4 παρουσίασαν πανομοιότυπο πρότυπο ως προς το *Hind*III, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για τους ίδιους γονιδιωματικούς κλώνους κι επομένως η μελέτη όλων αυτών δε θα προσέφερε επιπλέον πληροφορίες. Έτσι, ο αριθμός των προς ανάλυση κλώνων μειώθηκε σε τέσσερις, τους φBoace-a, φBoace-b1, φBoace-c και φBoace-d1, το πρότυπο των οποίων ως προς τις διάφορες περιοριστικές κατατμήσεις ήταν διαφορετικό. Το μέγεθος του ενθέματος κάθε βακτηριοφάγου προσδιορίστηκε από το άθροισμα των μεγεθών των περιοριστικών θραυσμάτων που προέκυψαν από την κατάτμησή τους. Τα μεγέθη αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3-5. Επόμενο βήμα στη δομική ανάλυση των τεσσάρων πλέον ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων αποτέλεσε η διερεύνηση της ύπαρξης αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων. Ένα τέτοιο γεγονός θα επέτρεπε τη δημιουργία ενός συναρμολογήματος (contig) της περιοχής του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης με τη διαδοχική τοποθέτηση του συνόλου των γονιδιωματικών κλώνων με βάση την αλληλοεπικάλυψη των άκρων τους.

Η πιθανή αλληλοεπικάλυψη των κλώνων ελέγχθηκε με κατάτμησή τους με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hind*III και την υβριδοποίησή τους κατά Southern χρησιμοποιώντας τελο-ειδικούς (end-specific) T3 και T7 RNA ανιχνευτές σε θερμοκρασία 62°C. Ο φορέας λ DASH®II είναι κατασκευασμένος κατά τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος τους υποκινητές T3 και T7 και να επιτρέπει τη δημιουργία τελο-ειδικών RNA ανιχνευτών με τη χρήση των T3 και T7 RNA πολυμερασών. Η σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε με βιοτίνη μέσω *in vitro* μεταγραφής. Παρόλο που πραγματοποιήθηκαν έξι διαφορετικές υβριδοποιήσεις με τους εξής τελο-ειδικούς T3 και T7 RNA ανιχνευτές: T3-T7/φBoace-a, T3-T7/φBoace-b1, T3-T7/φBoace-c, σε καμία δεν υπήρξε θετικό σήμα, υποδεικνύοντας ότι οι τέσσερις ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι δεν έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενες περιοχές.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ομολογία του κάθε κλώνου με το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης και να εντοπιστούν οι περιοχές των βακτηριοφάγων που περιέχουν αλληλουχίες που κωδικοποιούν τμήμα της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε ανάλυσή τους κατά Southern. Το απομονωμένο φαγικό DNA των τεσσάρων ανασυνδυασμένων κλώνων κατατμήθηκε με διάφορες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και υβριδοποιήθηκε με ανιχνευτή το cDNA κλώνο της ακετυλοχολινεστεράσης σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (θερμοκρασία 68°C) (Εικόνα 3-4).



Εικόνα 3-4: Ηλεκτροφόρηση και ανάλυση κατά Southern απομονωμένων βακτηριοφαγικών κλώνων ύστερα από απλές και διπλές κατατμήσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*Eco*RI, *Hind*III) και ανάλυση σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε σε 68°C με ανιχνευτή το cDNA της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. L: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA, 1: κλώνος φBoace3-5 (*Hind*III), 2: κλώνος φBoace7 (*Hind*III), 3E: κλώνος φBoace9 (*Eco*RI), 3H: κλώνος φBoace9 (*Hind*III), 3EH: κλώνος φBoace9 (*Eco*RI-*Hind*III).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Για τον προσδιορισμό της πλήρους πρωτοδιάταξης των θετικών θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε απομόνωσή τους από πήκτωμα αγαρόζης και υποκλωνοποίησή τους σε πλασμιδιακό φορέα pBS κατάλληλων άκρων. Σε όλους τους υποκλώνους πραγματοποιήθηκε μία τουλάχιστον αντίδραση ανάλυσης της πρωτοδιάταξής τους χρησιμοποιώντας τον εξωτερικό εκκινητή (universal primer) του φορέα M13F. Επιπλέον, σε όποιες περιπτώσεις κρίθηκε σκόπιμο (λόγω αδυναμίας ολοκληρωτικού διαβάσματος μεγάλων ενθεμάτων), πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ανάλυσης της πρωτοδιάταξης σε αντίθετη κατεύθυνση από την πρώτη χρησιμοποιώντας τον ανάστροφο εξωτερικό εκκινητή του φορέα M13R καθώς και εσωτερικούς εκκινητές των δυνητικών εξονίων. Οι αλληλουχίες των κλώνων που αποκτήθηκαν διερευνήθηκαν σε επίπεδο ομοιότητας με τον διαθέσιμο cDNA κλώνο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου καθώς και με κατατεθειμένες αλληλουχίες άλλων οργανισμών σε βάσεις δεδομένων, με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος BLAST από το NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των υποκλώνων επιβεβαίωσε ότι οι κλώνοι που απομονώθηκαν, με μεγέθη ενθέματος από 13 kb έως 16 kb, αντιστοιχούν σε διακριτές περιοχές του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, περιέχοντας αλληλουχίες εξονίων που διακόπτονται από ιντρόνια. Συγκεκριμένα:

- ο κλώνος φBoace-a περιείχε τμήμα του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου από το ιντρονίο II έως το ιντρόνιο V και για το λόγο αυτό μετονομάστηκε σε φBoace3-5
- ο κλώνος φBoace-b1 περιείχε μέρος του ιντρονίου VI, το εξόνιο VII και μέρος του ιντρονίου VII και μετονομάστηκε σε φBoace7
- ο κλώνος φBoace-c περιείχε μέρος του ιντρονίου VIII, το εξόνιο IX και μέρος του ιντρονίου IX και μετονομάστηκε σε φBoace9 και
- ο κλώνος φBoace–d1 περιείχε το εξόνιο II και τις εκατέρωθεν περιοχές και μετονομάστηκε σε φBoace2.

Οι κλώνοι αυτοί παρουσιάζονται περιληπτικά στον Εικόνα 3-5 και σχηματικά στην Εικόνα 3-17.

Κλώνος	Τρόπος απομόνωσης	Ανιχνευτής	Ομοιότητα με γονίδιο ace	Μέγεθος
φBoace2	απευθείας διαλογή	προϊόν 5΄ RACE-PCR	εξόνιο 2	~ 15 kb
φBoace3-5	απευθείας διαλογή	cDNA	εξόνια 3, 4, 5	~ 13 kb
φBoace7	διαλογή προεπιλεγμένων κλασματων	εξόνιο 7	εξόνιο 7	~ 14 kb
φBoace9	διαλογή προεπιλεγμένων κλασματων	εξόνιο 9	εξόνιο 9	~ 16 Kb

Εικόνα 3-5: Οι τέσσερις διαφορετικοί βακτηριοφαγικοί κλώνοι που απομονώθηκαν. Παρουσιάζεται διαδοχικά ο τρόπος απομόνωσής τους, ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε, η ομοιότητα που παρουσίασαν με περιοχές του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης και το μέγεθος τους.

1.4 Ενίσχυση γονιδιωματικών τμημάτων της ακετυλοχολινεστεράσης μέσω PCR μεγάλου μήκους (Long PCR) και ανάστροφης PCR (Inverse PCR)

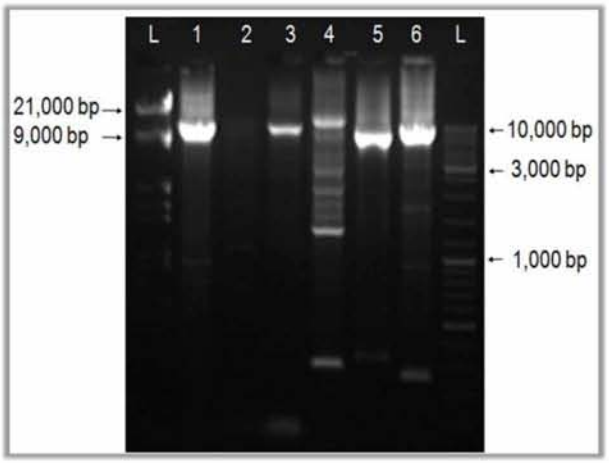
Η έλλειψη αλληλοεπικάλυψης των τεσσάρων διακριτών βακτηριοφάγων που απομονώθηκαν (συνολικού μεγέθους ~58 kb) κατέδειξε ότι οι περιοχές των ιντρονίων του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερο μέγεθος από τις αντίστοιχες περιοχές της *Drosophila melanogaster* (Fournier et al., 1989). Έτσι, οι περιοχές για τις οποίες δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων που να τις εμπεριέχουν προσεγγίστηκαν είτε με εφαρμογή PCR μεγάλου μήκους είτε με ανάστροφη PCR.

PCR μεγάλου μήκους: PCR μεγάλου μήκους εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ιντρονίων καθώς και για τα σημεία σύνδεσης εξονίων-ιντρονίων. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές σε γειτονικά άκρα διαδοχικών εξονίων ώστε να ενισχύουν το ενδιάμεσο ιντρόνιο (Boace2F- Boace3R, Boace5F-Boace6R, Boace6F-Boace7R, Boace7F-Boace8R, Boace8F-Boace9R, Boace9F-Boace10R).

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 3-6 και 3-7, το προϊόν της αντίδρασης PCR μεγάλου μήκους από το εξόνιο II έως III έχει μέγεθος περίπου 12 kb, ενώ τα αντίστοιχα των υπολοίπων αντιδράσεων VI-VII, VII-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

VIII,VIII-IX, IX-X παρουσίασαν μεγέθη περίπου 10 kb, 14 kb, 8 kb και 10 kb.



Εικόνα 3-6: Ενίσχυση τμημάτων του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου μέσω αντίδρασης PCR μεγάλου μήκους. Γονιδιωματικό DNA (~1 μg) δάκου υποβλήθηκε σε αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν σε εξόνια του γονιδίου. L1, L2: Μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA, 1: Boace2F-Boace3R, 2: Boace5F-Boace6R, 3: Boace6F-Boace7R, 4: Boace7F-Boace8R, 5: Boace8F-Boace9R, 6: Boace9F-Boace10R.

Ανάστροφη PCR: Η ανάστροφη PCR χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας σύνδεσης ιντρονίου-εξονίου, στις περιπτώσεις όπου αυτό δεν επιτεύχθηκε μέσω των φαγικών κλώνων ή της PCR μεγάλου μήκους. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με ανάστροφη κατεύθυνση και κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύουν τμήμα ενός εξονίου και τμήμα του ιντρονίου που το πλαισιώνει, είτε ανοδικά είτε καθοδικά (invBoace6F-invBoace6R, invBoace10F-invBoace10F). [Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε κυκλοποιημένο γονιδιωματικό DNA, το οποίο είχε υποστεί αρχικά κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hae*III και στη συνέχεια σύνδεση με λιγάση (Εικόνα 2-5)].

Τα προϊόντα των αντιδράσεων της ανάστροφης PCR συνδέθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pBS κατάλληλων άκρων και αναλύθηκε η πρωτοδιάταξή τους με τον εξωτερικό εκκινητή (universal primer) του φορέα M13F. Αντίθετα, τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR μεγάλου μήκους, η κλωνοποίηση των οποίων ήταν απαγορευτική, ανακτήθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και πραγματοποιήθηκε απευθείας ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας με χρήση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις PCR. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων των αντιδράσεων PCR και ο έλεγχος της ομοιότητας που παρουσίασαν με το διαθέσιμο cDNA κλώνο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου καθώς και με κατατεθειμένες αλληλουχίες άλλων οργανισμών σε βάσεις δεδομένων επιβεβαίωσε ότι τα προϊόντα που ενισχύθηκαν κατά την PCR μεγάλου μήκους και την ανάστροφη PCR αποτελούν περιοχές του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου.

PCR	Ονόματα εκκινητών	Ενίσχυση γονιδιωματικής περιοχής	Μέγεθος
μεγάλου μήκους PCR	Boace2F-Boace3R	εξόνιο 2 - ιντρόνιο 2 - εξόνιο 3	~ 12 kb
	Boace6F-Boace7R	εξόνιο 6 - ιντρόνιο 6 - εξόνιο 7	~ 10 kb
	Boace7F-Boace8R	εξόνιο 7 - ιντρόνιο 7 - εξόνιο 8	~ 14 kb
	Boace8F-Boace9R	εξόνιο 8 - ιντρόνιο 8 - εξόνιο 9	~ 8 kb
	Boace9F-Boace10R	εξόνιο 9 - ιντρόνιο 9 - εξόνιο 10	~ 10 kb
ανάστροφη PCR	invBoace6F- invBoace6R	...ιντρόνιο 5 - εξόνιο 6	~ 300 bp
	invBoace10F- invBoace10R	...ιντρόνιο 9 - εξόνιο 10	~ 650 bb

Εικόνα 3-7: Αποτελέσματα ενίσχυσης γονιδιωματικών περιοχών της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου με αντίδραση PCR μεγάλου μήκους και ανάστροφη PCR. Κάθε στήλη παρουσιάζει διαδοχικά τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, τη γονιδιωματική περιοχή που ενισχύθηκε και το μέγεθός της.

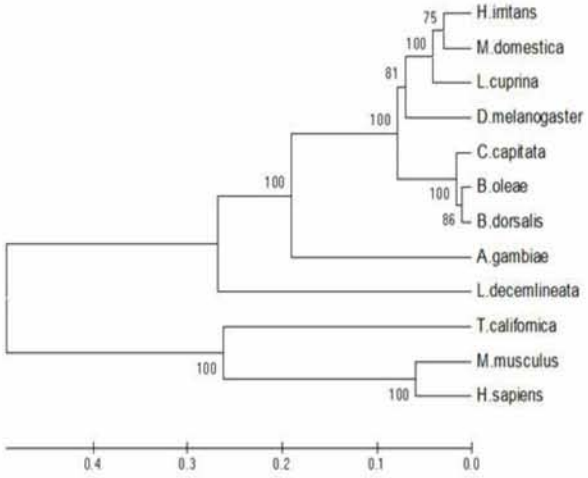
2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ

Η ακετυλοχολινεστεράση αποτελεί ένα εξελικτικά συντηρημένο ένζυμο μεταξύ των εντόμων και γενικότερα μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών, υποδεικνύοντας τη βασική βιολογική λειτουργία της στον οργανισμό. Οι διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές του ενζύμου, οι οποίες προέρχονται από τον άνθρωπο, το ποντίκι, το *Torpedo californica* και τη *Drosophila melanogaster*, παρουσιάζουν πλήρη ομοιότητα (Kryger et al., 2000; Bourne et al., 1999; Sussman et al., 1991; Harel et al., 2000). Η εξελικτική σταθερότητα της ακετυλοχολινεστεράσης αντικατοπτρίζεται επίσης στη σύγκριση των γνωστών αμινοξικών ακολουθιών καθώς και στην οργάνωση του γονιδίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

	Bactrocera oleae	*Bactrocera dorsalis*	*Ceratitis capitata*	*Heamatobia irritans*	*Lucillia cuprina*	*Drosophila melanogaster*	*Musca domestica*	*Anopheles gambiae*	*Leptinotarsa decemlineata*	*Mus musculus*	*Homo sapiens*	*Torpedo californica*
Bactrocera oleae												
Bactrocera dorsalis	0.020											
Ceratitis capitata	0.038	0.029										
Heamatobia irritans	0.154	0.142	0.146									
Lucillia cuprina	0.157	0.146	0.148	0.068								
Drosophila	0.161	0.150	0.150	0.124	0.142							
Musca domestica	0.177	0.171	0.171	0.060	0.092	0.150						
Anopheles gambiae	0.393	0.388	0.391	0.365	0.380	0.367	0.383					
Leptinotarsa	0.552	0.549	0.552	0.540	0.546	0.530	0.549	0.478				
Mus musculus	1.001	0.987	0.982	0.959	0.963	0.945	0.973	0.936	0.940			
Homo sapiens	1.016	1.001	0.996	0.977	0.977	0.982	1.001	0.959	0.968	0.118		
Torpedo californica	1.055	1.050	1.040	0.991	0.996	0.982	1.011	0.918	0.936	0.516	0.536	

Εικόνα 3-8: Ποσοστό των αμινοξικών αντικαταστάσεων ανά θέση με τη μέθοδο Pairwise-distance του προγράμματος φυλογενετικής ανάλυσης MEGA 3.1 (Kumar, 1993). Η σύγκριση πραγματοποιείται ανά δύο οργανισμούς. Η ομοιότητα μειώνεται καθώς η τιμή Pairwise-distance αυξάνεται.



Εικόνα 3-9: Δενδρόγραμμα φυλογενετικών σχέσεων της αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου της ακετυλοχολινε-στεράσης διαφόρων ειδών, με ιδιαίτερη έμφαση στο βασίλειο των εντόμων. Το δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε βάσει της μεθόδου UPGMA. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τα επί τοις εκατό ποσοστά πιστότητας κάθε κλάδου με τη μέθοδο bootstrap (Felsenstein, 1985).

Η ομοιότητα που χαρακτηρίζει το ένζυμο μεταξύ των διάφορων οργανισμών περιγράφεται από την Εικόνα 3-8 των γενετικών αποστάσεων (κατά Nei) και το αντίστοιχο δενδρόγραμμα (UPGMA) (Εικόνα 3-9), τα οποία προσδιορίστηκαν με βάση την αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης. Η ανάλυση και των δύο αυτών προσεγγίσεων συνάδει και αντικατοπτρίζει πλήρως τις φυλογενετικές αποστάσεις των οργανισμών αυτών. Όπως ήταν αναμενόμενο, η μικρότερη γενετική απόσταση παρατηρείται μεταξύ των εντόμων της ίδιας οικογενείας, όπως η οικογένεια των Tephritidae (*B. oleae, B. dorsalis, C. capitata*) ή των Muscidae (*H. irritans*, *M. domestica*), ενώ η μεγαλύτερη απόσταση παρατηρείται μεταξύ σπονδυλωτών και ασπόν-δυλων. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το δενδρόγραμμα, όπου καθώς τα σημεία διακλάδωσης αποτελούν ένδειξη του βαθμού ομοιότητας, τα έντομα της ίδιας οικογένειας

	Bactrocera oleae	*Bactrocera dorsalis*	*Ceratitis capitata*	*Heamatobia irritans*	*Lucillia cuprina*	*Drosophila melanogaster*	*Musca domestica*	*Anopheles gambiae*	*Leptinotarsa decemlineata*
Bactrocera oleae	100%								
Bactrocera dorsalis	97%	100%							
Ceratitis capitata	93%	92%	100%						
Heamatobia irritans	85%	85%	84%	100%					
Lucillia cuprina	85%	84%	84%	91%	100%				
Drosophila melanogaster	78%	80%	85%	89%	85%	100%			
Musca domestica	77%	78%	83%	93%	92%	85%	100%		
Anopheles gambiae	67%	67%	65%	67%	68%	83%	64%	100%	
Leptinotarsa decemlineata	58%	59%	59%	58%	56%	57%	56%	59%	100%

Εικόνα 3-10: Επί τοις εκατό ομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου με την αντίστοιχη πρωτεΐνη άλλων εντόμων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Έντομο	Μετάγραφο (bp)	5' UTR (bp)	Έναρξη μετάφρασης (εξόνιο - bp)	Πρωτεΐνη (aa)	Εκκριτικό πεπτίδιο (aa)
Drosophila melanogaster	4,291	1,086	2 - 1,087	649	38
Lucillia cuprina	4,085	1,904	2 - 1,905	708	98

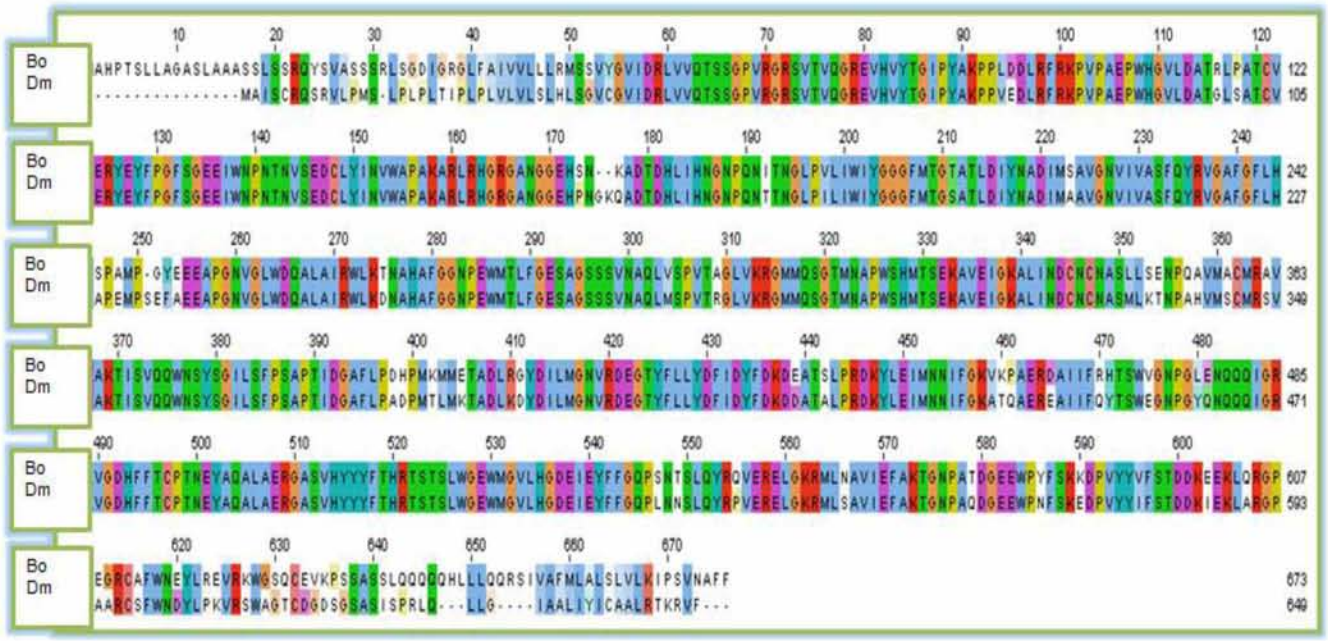
Εικόνα 3-11: Βασικά χαρακτηριστικά της οργάνωσης του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης των εντόμων *D. melanogaster* και *L.cuprina*

(σημαντική ομοιότητα) συνδέονται σε κοντινούς κλάδους (δεξιά πλευρά).

Η ομοιότητα που παρουσιάζει η ακετυλοχολινεστεράση σε αμινοξικό επίπεδο μεταξύ των εντόμων κυμαίνεται περίπου από 95% έως 60% (Εικόνα 3-10) και στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζει την ίδια γονιδιακή οργάνωση. Στη *D. melanogaster*, το γονίδιο της ακετυλχολινεστεράσης εκτείνεται σε μήκος περίπου 34 kb και οργανώνεται σε δέκα εξόνια και εννέα ιντρόνια. Το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στη μέση του εξόνιου ΙΙ ενώ η αρχή του εξονίου ΙΙ μαζί με το εξόνιο Ι συνιστούν την 5΄ μη μεταφραζόμενη περιοχή (5΄UTR). Η σύγκριση του γονιδιακού τόπου της ακετυλχολινεστεράσης διάφορων εντόμων με τον αντίστοιχο τόπο της *D. melanogaster* αποκάλυψε τη διατήρηση ορισμένων κύριων χαρακτηριστικών του.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3-11 και καταγράφεται στη βιβλιογραφία, το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης στα έντομα (αλλά και σε άλλους οργανισμούς, επίσης) χαρακτηρίζεται από μία αρκετά μεγάλη 5' UTR περιοχή, την οποία συνιστούν το εξόνιο Ι και μέρος του εξονίου ΙΙ, με την έναρξη της μετάφρασης να εντοπίζεται στο εξόνιο ΙΙ. Εξίσου χαρακτηριστικό είναι και ένα εκκριτικό πεπτίδιο ποικίλου μήκους.

Η αμινοξική ομοιότητα της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου με την αντίστοιχη της *D. melanogaster* (78%) (Εικόνα 3-10 και 3-12) καθώς και άλλων εντόμων (85% με *L. cuprina*) καθιστά πιθανή την υπόθεση της συντήρησης της οργάνωσης του γονιδιακού τόπου. Εξάλλου, μία πρόσφατη μελέτη της εξέλιξης της δομής των γονιδίων μεταξύ 11 οργανισμών κατέδειξε ότι η πρωτεϊνική ομοιότητα ενός γονιδίου ακολουθείται από ομοιότητα στη δομή ιντρονίων-εξονίων (Yandell et al., 2006). Έτσι, όλες οι προσεγγίσεις για το



Εικόνα 3-12: Συγκριτική ομοπαράθεση της αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου (Bo) και της ακετυλοχολινεστεράσης της *D. melanogaster (*Dm).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

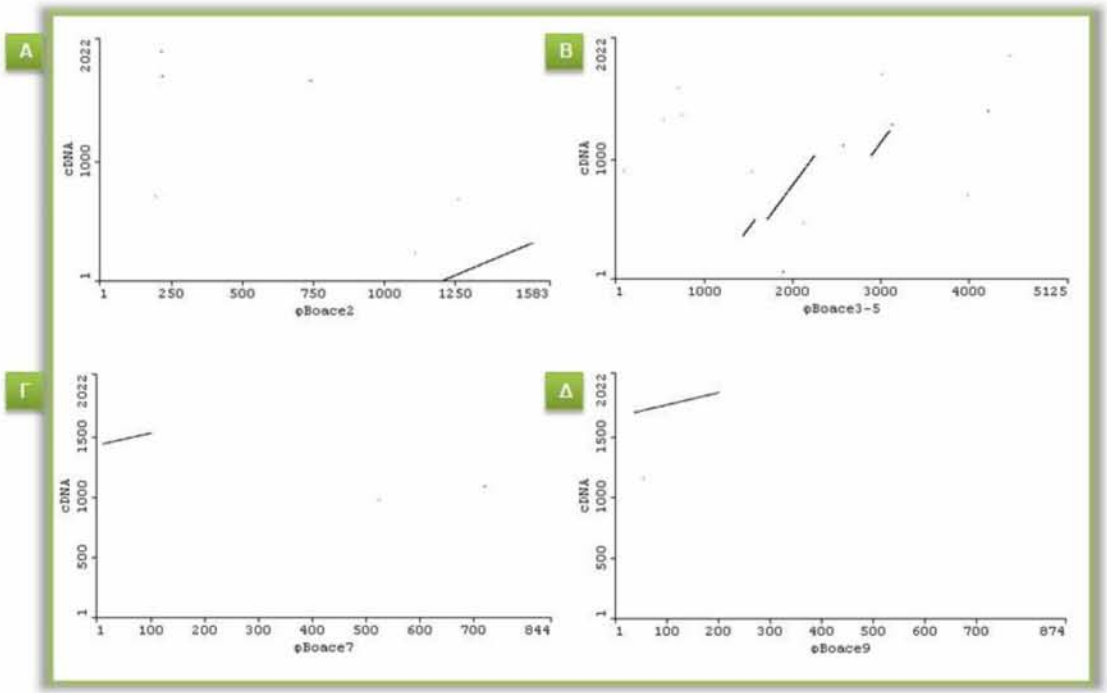
μοριακό χαρακτηρισμό του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου πραγματοποιήθηκαν με γνώμονα την παραδοχή ότι το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στο εξόνιο ΙΙ.

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των επιμέρους περιοχών του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, δηλαδή της 5΄ UTR, της δομής των εξονίων και ιντρονίων καθώς και των θέσεων ματίσματός τους (splice junctions), πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή ανάλυση των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων φBoace-a, φBoace-b1, φBoace-c και φBoace-d1 καθώς και των προϊόντων της PCR μεγάλου μήκους, ανάστροφης PCR και 5΄ RACE-PCR.

Ο γονιδιακός τόπος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, σύμφωνα με το άθροισμα των ενθεμάτων των απομονωμένων φαγικών κλώνων και των προϊόντων των διάφορων αντιδράσεων PCR, εκτείνεται σε μήκος τουλάχιστον 60 kb, χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί το μέγεθος του πρώτου και του πέμπτου ιντρονίου. Η ενίσχυση των συγκεκριμένων περιοχών μέσω αντίδρασης PCR μεγάλου μήκους δεν ήταν δυνατή, γεγονός που υποδεικνύει το μεγάλο μέγεθός τους. Τα αντίστοιχα ιντρόνια στη *D. melanogaster* συνιστούν τα δύο μεγαλύτερα ιντρόνια του γονιδίου και παρουσιάζουν μέγεθος 11,648 bp και 5,019 bp, αντίστοιχα.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων περιοριστικών θραυσμάτων των φαγικών κλώνων και των προϊόντων των αντιδράσεων PCR και η σύγκρισή τους με το διαθέσιμο cDNA κλώνο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου αποκάλυψε την οργάνωση του γονιδίου.

Ο πίνακας συσχέτισης σημείων (Dot plot) είναι μια γραφική αναπαράσταση της σχέσης δύο αλληλουχιών. Κάθε κουκίδα απεικονίζει μια θέση στην οποία η αλληλουχία των δύο γονιδίων είναι όμοια. Εάν δύο αλληλουχίες είναι πανομοιότυπες, οι κουκκίδες σχηματίζουν μια γραμμή με κλίση 45°. Η γραμμή διακόπτεται στις περιοχές όπου δεν υπάρχει ομοιότητα και μετατοπίζεται πλευρικά ή κάθετα, έξω από τη διαγώνιο, στις περιοχές όπου υπάρχουν ελλείμματα ή προσθήκες στις δύο συγγενικές αλληλουχίες. Έτσι, στη σύγκριση των κλώνων με το



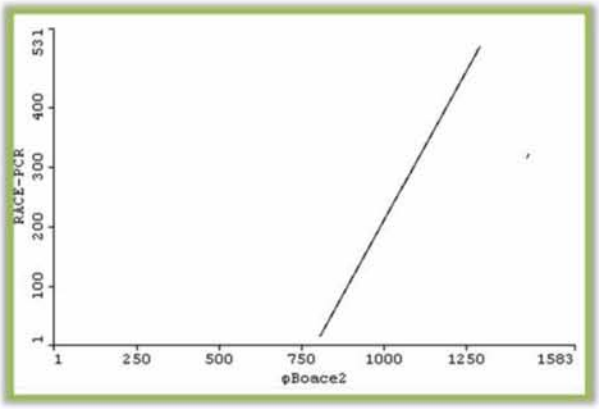
Εικόνα 3-13: Πίνακες συσχέτισης σημείων (Dot-plot) των υποκλώνων των απομονωμένων γονιδιωματικών φαγικών κλώνων και του cDNA της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, όπως προκύπτει από το πρόγραμμα μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd.). Α. Η ομοιότητα μεταξύ του κλώνου φBoace2 και του cDNA αντιστοιχεί στο εξόνιο 2 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, Β. Η ομοιότητα μεταξύ του κλώνου φBoace3-5 και του cDNA αντιστοιχεί στο εξόνια 3,4,5, Γ. η ομοιότητα μεταξύ του κλώνου φBoace7 και του cDNA αντιστοιχεί στο εξόνιο 7 και Δ. η ομοιότητα μεταξύ του κλώνου φBoace9 και του cDNA αντιστοιχεί στο εξόνιο 9.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

cDNA οι κουκκίδες αντιστοιχούν σε περιοχές εξονίων ενώ η ανυπαρξία κουκκίδων υποδεικνύουν περιοχές ιντρονίων. Χαρακτηριστικός είναι ο πίνακας συσχέτισης σημείων του κλώνου φBoace3-5, όπου διακρίνονται τρία εξόνια και τα ενδιάμεσα ιντρόνια (Εικόνα 3-13).

Κατά συνέπεια, το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου οργανώνεται σε δέκα εξόνια και εννιά ιντρόνια με το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF) να διακόπτεται από τα ιντρόνια δύο έως εννέα. Το σημείο έναρξης της μετάφρασης ATG εντοπίζεται στο εξόνιο II, με τη γειτονική νουκλεοτιδική του αλληλουχία να μην παρουσιάζει ομολογία με τις συντηρητικές αλληλουχίες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (GCCPuCCAUGG) (Kozak, 1984; Kozak et al., 1991) ή της *Drosophila* (C/A,AA,A/C,AUGG) (Cavener, 1987) αλλά να διατηρεί την ύπαρξη των συντηρημένων πουρινών στις θέσεις -3 και +4: TTAGCATGGC. Το εξόνιο II έχει μήκος τουλάχιστον 761 bp, εκ των οποίων οι 374 bp βρίσκονται καθοδικά του σημείου έναρξης της μετάφρασης ATG, ενώ οι υπόλοιπες 387 bp, οι οποίες προσδιορίστηκαν από το προϊόν της 5΄ RACE-PCR, συναντώνται ανοδικά του σημείου έναρξης της μετάφρασης ATG.

Η ομοπαράθεση του προϊόντος της 5΄ RACE PCR και του γονιδιωματικού φαγικού κλώνου φBoace2 (Εικόνα 3-14) κατέδειξε ότι αυτό αποτελεί εξ ολοκλήρου τμήμα του εξονίου II χωρίς να παρεμβάλλεται κάποιο ιντρόνιο. Η διερεύνηση όμως της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υπόλοιπου τμήματος του υποκλωνοποιημένου θραύσματος του βακτηριοφάγου φBoace2 δεν αποκάλυψε χαρακτηριστικές αλληλουχίες του υποκινητή είτε πιθανές θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Αντίθετα, η διερεύνηση με υπολογιστικά προγράμματα (http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/splice.pl) πιθανής θέσης ματίσματος ανάμεσα στο πρώτο ιντρόνιο και το δεύτερο εξόνιο παρουσίασε μία πιθανή θέση στη -708 bp (+1 το σημείο έναρξης της μετάφρασης ATG) ή στη 501 bp (+1 η έναρξη της αλληλουχίας του κλώνου φBoace2). Επομένως, είναι πιθανόν οι πρώτες 500 βάσεις να αποτελούν μέρος του ιντρονίου 1, εφόσον δε βρέθηκε κάποιο σημείο δότης, ώστε να είναι δυνατή η υπόθεση ότι ο κλώνος φBoace2 περιέχει και το εξόνιο I.



Εικόνα 3-14: Πίνακας συσχέτισης σημείων (Dot-plot) του υποκλώνου του βακτηριοφάγου φBoace2 και του προϊόντος της 5΄ RACE-PCR. Η ομοιότητα μεταξύ των δύο αλληλουχιών υποδεικνύει ότι δεν παρεμβάλλεται ιντρόνιο στην αλληλουχία του προϊόντος της 5΄ RACE-PCR και ότι αυτή αποτελεί μέρος του εξονίου II του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου.

Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια αρκετά μεγάλη ιντρονιακή περιοχή στην 5΄- μη κωδική περιοχή του cDNA που δυσκόλευε την απομόνωση γενωμικών κλώνων που να περιέχουν τον υποκινητή του γονιδίου, όπως συνέβη και στη *D. melanogaster* και το κουνούπι *Aedes aegypti* (Fournier et al., 1989; Mori et al., 2007). Το εξόνιο II περιέχει επίσης και το εκκριτικό πεπτίδιο.

Το εξόνιο III έχει μέγεθος 139 bp και περιλαμβάνει τα έξι πρώτα αμινοξέα του υδροφιλικού πεπτιδίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό του πρόδρομου μορίου σε δύο υπομονάδες. Το εξόνιο IV έχει μέγεθος 537 bp και περιλαμβάνει τη σερίνη της καταλυτικής τριάδας καθώς και τμήμα της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (202-204 aa, 289-291 aa, 294 aa, binding pocket). Το εξόνιο V έχει μήκος 208 bp και περιέχει ως τελευταίο αμινοξύ τη γλουταμίνη της καταλυτικής τριάδας. Το εξόνιο VI έχει μήκος 143 bp και περιλαμβάνει τμήμα της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (448 aa, 452-453 aa, binding pocket). Το εξόνιο VII έχει μήκος 150 bp και περιέχει τη βαλίνη V487, η οποία επίσης συμμετέχει στο θυλάκιο σύνδεσης. Το εξόνιο VIII έχει μήκος 164 bp και περιλαμβάνει το τρίτο αμινοξύ της καταλυτικής τριάδας, την ιστιδίνη και τα δύο τελευταία αμινοξέα,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

τη γλυκίνη G533 και την ισολευκίνη I536 που συμμετέχουν στο binding pocket. Το εξόνιο IX έχει μήκος 164 bp, ενώ το εξόνιο X 143 bp (μέχρι το κωδικόνιο λήξης) και περιλαμβάνει το πεπτίδιο το οποίο αποκόπτεται και αντικαθίσταται από GPI άγκυρα (Εικόνα 3-15).

Γονιδιακός τόπος ακετυλοχολινεστεράσης				
Εξόνιο	Θέση (nt)	Μέγεθος (bp)	Ιντρόνιο	Μέγεθος (bp)
εξόνιο 1			ιντρόνιο 1	
εξόνιο 2 (ATG)	1-374	374	ιντρόνιο 2	~ 12,000
εξόνιο 3	375-513	139	ιντρόνιο 3	137
εξόνιο 4	514-1050	537	ιντρόνιο 4	643
εξόνιο 5	1051-1258	208	ιντρόνιο 5	> 2,000
εξόνιο 6	1259-1401	143	ιντρόνιο 6	~ 10,000
εξόνιο 7	1402-1551	150	ιντρόνιο 7	~ 14,000
εξόνιο 8	1552-1715	164	ιντρόνιο 8	~ 8,000
εξόνιο 9	1716-1879	164	ιντρόνιο 9	~ 10,000
εξόνιο 10 (TAA)	1880-2022	143		
* upstream (from 5΄RACE PCR)	-1 - -387	387		
*upstream (from φBoace2)	-388 - -1207	820		

Εικόνα 3-15: Μεγέθη ιντρονίων και εξονίων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Με * υποδεικνύονται τα τμήματα που απομονώθηκαν με 5΄ RACE PCR και από το φαγικό κλώνο φBoace2. Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων είναι με βάση το cDNA της πρωτεΐνης όπου το +1 εντοπίζεται στο κωδικόνιο έναρξης και το +2022 στο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης.

ΙΝΤΡΟΝΙΑ

Το μέγεθος των μεγάλων ιντρονίων προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση από το μέγεθος των προϊόντων των αντιδράσεων PCR μεγάλου μήκους. Οι θέσεις των ιντρονίων αντιστοιχούν πλήρως στις θέσεις των ιντρονίων της *D. melanogaster* (Fournier et al., 1989), το δε μέγεθός τους κυμαίνεται από 137 bp έως τουλάχιστον 12,000 bp. Οι θέσεις ματίσματος των ιντρονίων δύο έως εννέα εντοπίζονται μετά τα νουκλεοτίδια 374, 513, 1050, 1258, 1401, 1551, 1715 και 1879 του cDNA κλώνου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Τα εννέα ζευγάρια των θέσεων δότη και δέκτη υπακούουν τον GT-AG κανόνα του Breathnach (1978). Στη θέση δότη διατηρείται η αλληλουχία G,T,(A/G),A,G ενώ η θέση δέκτη παρουσιάζει μία περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες (στα νουκλεοτίδια από -3 έως -10), στην οποία μάλιστα δε συναντάται AG. Όλα τα ιντρόνια ακολουθούν την προτεινόμενη αλληλουχία διακλάδωσης YTNAN των Keller & Noon (1985). Τέσσερα ιντρόνια είναι φάσης 0, δηλαδή διακόπτουν το μάτισμα στο τέλος του κωδικονίου, δύο ιντρόνια είναι φάσης I, δηλαδή διακόπτουν κωδικόνια μετά το πρώτο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας, ενώ υπάρχουν δύο ιντρόνια φάσης II, δηλαδή διακόπτουν κωδικόνια μετά το δεύτερο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας (Εικόνα 3-16).

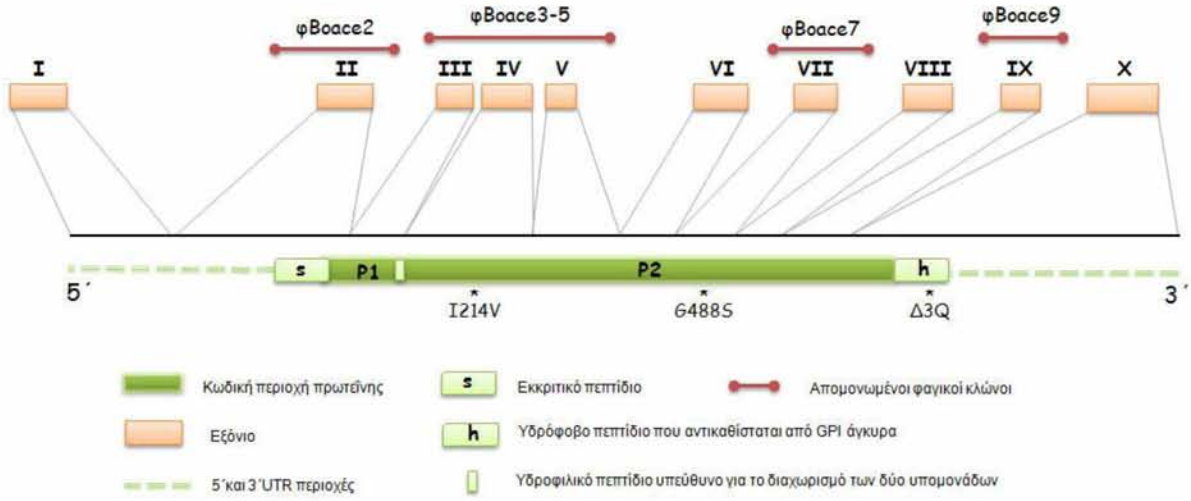
Επιπλέον, αναζήτηση στην τράπεζα δεδομένων EMBL για τον εντοπισμό ομολογιών με τις μη κωδικές περιοχές των γονιδίων, αποκάλυψε την ύπαρξη ενός τμήματος RNA ιού στο ιντρόνιο 2, ενός τμήματος του μεταθετού στοιχείου P της *D. sturtevanti* στο ιντρόνιο 4 και ενός τμήματος του μεταθετού *mariner* του *B. tryoni* στο ιντρόνιο 5.

Η μοριακή οργάνωση της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου φαίνεται στην Εικόνα 3-17.

Ιντρόνιο	Δότης	Δέκτης	Φάση
ιντρόνιο 1	~	~	~
ιντρόνιο 2	GTAAG	ACGCTACTAATTGCAAA **CTAAT** TGTTTGCTCTCTGATTTGACCATTGCAG	II
ιντρόνιο 3	GTGAG	CTCATTCATTTCCTT **CTTAT** ATTTCCTTTCATACTCAATTTCACTTTCAG	0
ιντρόνιο 4	GTGAG	TAATAACATACTCTTT **TTAAA** TAATTACCTTGTTTATAAATTTTTTTCAG	0
ιντρόνιο 5	GTAAG	CCCGTTCCAAAAATCTTTAGCAG **TTCAT** ATCCTTATCCTCTATATAATAG	I
ιντρόνιο 6	GTAAG	ATTTACTTCACTAGCCTTT **TTCAA** TAATTTAATTTATTTTGTGTTTGCAG	0
ιντρόνιο 7	GTGAG	GGAT **CTGAC** AATGACAATTATTTCGTTATCTTTGCACAG	0
ιντρόνιο 8	GTAAG	TATAAATTCGAAGGGATGTAACGAATT **CTAAA** TTTTATTGTCTTTTACAG	II
ιντρόνιο 9	GTAAG	CTGGGTAAGCAA **TTAAA** CATTCCCCCCATCTTTCTCCGTGTTTTTTTCAG	I

Εικόνα 3-16: Ανάλυση των θέσεων δότη και δέκτη και της φάσης των ιντρονίων της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Στη στήλη Δέκτης με έντονα γράμματα και υπογράμμιση υποδεικνύεται το πιθανό σημείο διακλάδωσης του κάθε ιντρονίου, ενώ η απλή υπογράμμιση νουκλεοτιδίων στις στήλες Δότης και Δέκτης υποδεικνύει τα συντηρημένα νουκλεοτίδια που συμμετέχουν στο μάτισμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 3-17: Σχηματικός χάρτης της μοριακής οργάνωσης του γενετικού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Το γονίδιο αποτελείται από δέκα εξόνια και εννέα ιντρόνια. Το πρόδρομο μόριο παρουσιάζει ένα εκκριτικό πεπτίδιο, ένα υδροφιλικό πεπτίδιο και ένα καρβοξυτελικό υδρόφοβο πεπτίδιο. Στην ώριμη πρωτεΐνη το εκκριτικό πεπτίδιο αποκόπτεται, το υδροφιλικό πεπτίδιο δίνει τις υπομονάδες P1 (18 kDa πολυπεπτίδιο) και P2 (55 kDa πολυπεπτίδιο) ενώ το καρβοξυτελικό υδρόφοβο πεπτίδιο αποκόπτεται και αντικαθίσταται με GPI άγκυρα. Απομονώθηκαν 4 γονιδιωματικοί φαγικοί κλώνοι, οι οποίοι αντιστοιχούν σε γονιδιωματική περιοχή της ακετυλοχολινεστεράσης. Με * υποδηλώνονται οι τρεις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα.

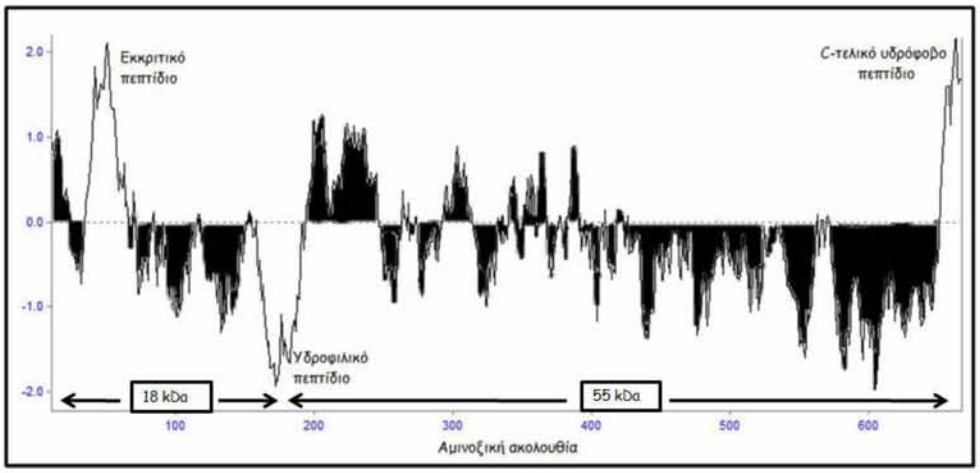
3. *IN SILICO* ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Ο διαθέσιμος cDNA κλώνος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου παρουσιάζει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2022 bp, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας πρωτεΐνης 673 αμινοξέων (Vontas et al., 2002). Καθώς ο σκοπός της απομόνωσης του συγκεκριμένου κλώνου ήταν ο προσδιορισμός της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου ώστε να μελετηθεί το φαινόμενο της ανθεκτικότητας, οι διαθέσιμες πληροφορίες της πρωτεΐνης αφορούν συγκεκριμένες αντικαταστάσεις αμινοξέων (μεταλλάξεις) και τον πιθανό ρόλο τους. Έτσι, θεωρήθηκε ενδιαφέρον η παρούσα ανάλυση του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου να συνοδευτεί με την ανάλυση των βασικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, εφόσον αυτά δεν έχουν καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η διερεύνηση των βασικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής και κυρίως με τη χρήση του "Σύστημα Εξειδικευμένης Ανάλυσης Πρωτεϊνών" (www.expasy.org), το οποίο διαθέτει μηχανές αναζήτησης και εύρεσης πληροφοριών σχετικά με την πρωτεομική. Το θεωρητικό μοριακό βάρος (MW) του πρόδρομου μορίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου προσδιορίστηκε σε 74,604.4 kDa και το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI), δηλαδή η τιμή του pH στην οποία το μόριο της πρωτεΐνης είναι ηλεκτρικά ουδέτερο, σε 5.97. Παρόμοιες τιμές παρουσιάζει και η πρωτεΐνη της *Drosophila melanogaster*.

Η δημιουργία του υδροφοβικού προφίλ της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0, επιβεβαίωσε τρία βασικά γνωρίσματα του ενζύμου: την ύπαρξη σηματοδοτικής αλληλουχίας (συναντάται στην ακετυλοχολινεστεράση όλων των οργανισμών), το διαχωρισμό του πρόδρομου μορίου σε δύο υπομονάδες (πραγματοποιείται κυρίως σε έντομα) και την προσθήκη GPI άγκυρας (κυρίως σε έντομα). Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας σύμφωνα με τον αλγόριθμο των Kyte & Doolittle (1982) περί υδροφοβικότητας αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη διαθέτει δύο περιοχές με υψηλή υδροφοβικότητα και μία περιοχή υψηλής υδροφιλικότητας (Εικόνα 3-18).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



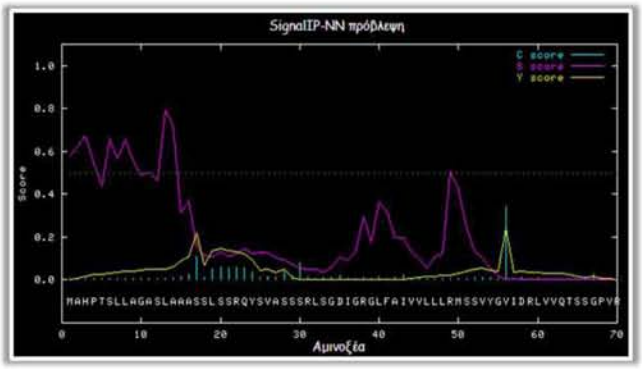
Εικόνα 3-18: Προφίλ υδροφοβικότητας της αμινοξικής ακολουθίας της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου όπως προκύπτει από το πρόγραμμα Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd). Οι θετικές τιμές του άξονα Υ υποδεικνύουν την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης, ενώ αντίθετα οι αρνητικές τιμές την υδροφιλικότητα. Το εκκριτικό πεπτίδιο, το υδροφιλικό πεπτίδιο υπεύθυνο για το διαχωρισμό των δύο υπομονάδων (18 kDa, 55 kDa) και το καρβοξυτελικό υδρόφοβο πεπτίδιο που σηματοδοτεί την προσθήκη GPI άγκυρας υποδεικνύονται με τις λευκές περιοχές. Το γράφημα έγινε με τη μέθοδο των Kyte & Doolittle (1982).

Η πρώτη περιοχή υψηλής υδροφοβικότητας εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και αντιπροσωπεύει τη σηματοδοτική της αλληλουχία (von Heijne, 1983). Η δεύτερη περιοχή εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου και αντιπροσωπεύει το τμήμα της πρωτεΐνης που αποκόπτεται και αντικαθίσταται από GPI άγκυρα. Στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται επίσης η περιοχή υψηλής υδροφιλικότητας, η οποία αποτελεί το υπεύθυνο πεπτίδιο για το διαχωρισμό του πρόδρομου μορίου σε δύο υπομονάδες. Η έλλειψη της αντίστοιχης περιοχής (148-180 aa) στο μόριο της *D. melanogaster* είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του σχηματισμού των δύο υπομονάδων των 18 kDa και 55 kDa (Mutero & Fournier, 1992). Ο διαχωρισμός του πρόδρομου μορίου σε δύο υπομονάδες αποτελεί υψηλά συντηρημένο χαρακτηριστικό στα έντομα. Βιοχημικά αποτελέσματα της ακετυλοχολινεστεράσης της *Musca domestica* (Steele & Smallman, 1976) και ανάλυση της αλληλουχίας του *Anopheles stephensi* (Hall & Malcom, 1991) επιβεβαίωσαν ότι πράγματι δύο υπομονάδες συνιστούν το ώριμο μόριο.

Επιπλέον, μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Signal P (version 3.0) προσδιορίστηκε η ακριβής αλληλουχία η οποία αποτελεί το σηματοδοτικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης. Το πρόγραμμα προβλέπει τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη σηματοδοτική αλληλουχία βασιζόμενο σε ένα συνδυασμό διάφορων μοντέλων τεχνητών νευρωνικών δικτύων και κρυφού μοντέλου Markov. Το γραφικό αποτέλεσμα (graphical output) του προγράμματος περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές τιμές πρόβλεψης C, S και Y για τη σηματοδοτική αλληλουχία. Η τιμή S αναφέρεται στη θέση κάθε αμινοξέος στην υποβληθείσα ακολουθία και υψηλές τιμές δείχνουν ότι το αντίστοιχο αμινοξύ αποτελεί μέρος της σηματοδοτικής αλληλουχίας, ενώ αντίθετα τα αμινοξέα με χαμηλές τιμές αποτελούν μέρος της ώριμης πρωτεΐνης. Η τιμή C καταδεικνύει το σημείο κοπής της σηματοδοτικής αλληλουχίας, ενώ η τιμή Y, η οποία προκύπτει από το συνδυασμό των τιμών S και C, λειτουργεί ως επιβεβαίωσή τους. Η θέση κοπής της αλληλουχίας που ορίζεται από την τιμή Y εντοπίζεται στο σημείο όπου παρουσιάζει ταυτόχρονα υψηλή τιμή C και απότομη κλίση της καμπύλης της τιμής S.

Επομένως, με βάση τις τιμές C, S και Y, η ακετυλοχολινεστεράση του δάκου φέρει μια σηματοδοτική αλληλουχία 55 αμινοξέων και το πρώτο αμινοξύ της ώριμης πρωτεΐνης είναι η βαλίνη στη θέση 56 (Εικόνα 3-19). Βαλίνη (V 39) αποτελεί, επίσης, το πρώτο αμινοξύ και στην ώριμη πρωτεΐνη της *Drosophila melanogaster* (Haas et al., 1988).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 3-19: Γραφική παράσταση του πιθανού εκκριτικού πεπτιδίου της αμινοξικής ακολουθίας της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου από το πρόγραμμα Signal P (Nielsen et al., 1997; Bendtsen et al., 2004). Το σημείο όπου οι τιμές πρόβλεψης C και Y εμφανίζουν συγχρόνως την υψηλότερη τιμή και ταυτόχρονα η κλίση της καμπύλης της τιμής S είναι απότομη, αντιστοιχεί στο σημείο μέγιστης πιθανότητας να πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του εκκριτικού πεπτιδίου από την ώριμη πρωτεΐνη

Αναγνωρίστηκε, επίσης, ο ρόλος των 8 κυστεϊνών που απαντώνται στο ένζυμο του δάκου. Με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος DISULFIND (http://disulfind.dsi.unifi.it.), το οποίο προβλέπει την ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών χρησιμοποιώντας ένα δυαδικό ταξινομητή SVM, προσδιορίστηκαν τρεις δισουλφιδικές γέφυρες στο μόριο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Οι δισουλφιδικές γέφυρες κατέχουν βασικό ρόλο στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία αναδίπλωσής τους και η γνώση τους αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη μελέτη των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Η πιθανότητα μια κυστεΐνη να συμμετέχει στο σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας εξαρτάται από τις τιμές που υπολογίζει το πρόγραμμα για τις παραμέτρους DB_state (disulfide bonding state) και DB_conf (confidence of disulfide bonding state prediction). Συγκεκριμένα, αν DB_state=1 η κυστεΐνη συμμετέχει σε δισουλφιδικό δεσμό ενώ αν DB_state=0 δεν συμμετέχει. Οι τιμές της παραμέτρου DB_conf κυμαίνονται από 0 έως 9, με την τιμή 0 να αντιστοιχεί σε χαμηλό επίπεδο εμπιστοσύνης και, αντίθετα, τιμή 9 σε υψηλό. Συνεπώς, σύμφωνα με τις τιμές του προγράμματος, η πρωτεΐνη εμφανίζει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των κυστεϊνών 121 και 148, 344 και 359, και 494 και 612 (Εικόνα 3-20).

Η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών του δάκου και της *D. melanogaster* κατέδειξε ότι οι συγκεκριμένες κυστεΐνες εντοπίζονται σε συντηρημένες θέσεις και μάλιστα οι αντίστοιχες γέφυρες περιέχουν τον ίδιο αριθμό αμινοξέων. Ακόμη, τα προφίλ των δισουλφιδικών δεσμών του

```
        .........10........20........30........40........50........60........70.......
AA      MAHPTSLLAGASLAAASSLSSRQYSVASSSRLSGDIGRGLFAIVVLLLRMSSVYGVIDRLVVQTSSGPVRGRSVTVQGR
DB_state                                                +--------------------------+
DB conf                                                 |                          |
        80........90........100.......110.......120.......130.......140.......150......
AA      EVHVYTGIPYAKPPLDDLRFRKPVPAEPWNGVLDATRLPATCVQERYEYFPGFSGEEIWNPNTNVSEDCLYINVWAPAK
DB_state                                                1                          1
DB conf                                                 9                          9
        .160.......170.......180.......190.......200.......210.......220.......230.....
AA      ARLPHGRGANGGEHSNKADTDHLIHNGNPQNITNGLPVLIWIYGGGFMTGTATLDIYNADIMSAVGNVIVASFQYRVGA
DB_state
DB conf

        ..240.......250.......260.......270.......280.......290.......300.......310....
AA      FGFLHLSPAMPGYEEEAPGNVGLWDQALAIRWLKTNAHAFGGNPEWMTLFGESAGSSSVNAQLVSPVTAGLVKRGMMQS
DB_state
DB conf                               +--------------+
                                      |              |
        ...320.......330.......340.......350.......360.......370.......380.......390...
AA      GTMNAPWSHMTSEKAVEIGKALINDCNCNASLLSENPQAVMACMRAVDAKTISVQQWNSYSGILSFPSAPTIDGAFLPD
DB_state                              0 1            1
DB conf                               9 9            9

        ....400.......410.......420.......430.......440.......450.......460.......470..
AA      HPMKMMETADLRGYDILMGNVRDEGTYFLLYDFIDYFDKDEATSLPRDKYLEIMNNIFGKVKPAERDAIIFRHTSWVGN
DB_state
DB conf                       +-------------------------------------------------------------
                              |
        .....480.......490.......500.......510.......520.......530.......540.......550.
AA      PGLENQQQIGRAVGDHFFTCPTNEYAQALAERGASVHYYYFTHRTSTSLWGEWMGVLHGDEIEYFFGQPSNTSLQYRQV
DB_state                      1
DB conf                       9
        ------------------------------------------------------------+
                                                                    |
        ......560.......570.......580.......590.......600.......610.......620.......630
AA      ERELGKRMLNAVIEFAKTGNPATDGEEWPYFSKKDPVYYVFSTDDKEEKLQRGPLEGRCAFWNEYLREVPRKWGSQCEVK
DB_state                                                          1                  0
DB conf                                                           9                  9
        .......640.......650.......660.......670.
AA      PSSASSLQQQQQHLLLQQRSIVAFMLALSLVLKIPSVNAFF
DB_state
DB conf

DB_bond   bond(121,148)
DB_bond   bond(344,359)
DB_bond   bond(494,612)

Conn_conf 0.556821
```

Εικόνα 3-20: Πρόβλεψη των πιθανών κατάλοιπων κυστεΐνης της αμινοξικής ακολουθίας της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου που συμμετέχουν σε δισουλφιδικές γέφυρες από πρόγραμμα DISOULFIND (Vullo & Frasconi, 2004). Οι κυστεΐνες που εμφανίζουν τιμή 1 στην παράμετρο DB_state συμμετέχουν στις δισουλφιδικές γέφυρες που απεικονίζονται με τη μεταξύ σύνδεση αυτών των κυστεϊνών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Torpedo (MacPhee-Quigley et al., 1985) και της ανθρώπινης βουτυροχολινεστεράσης (Lockridge et al., 1987) παρουσίασαν πανομοιότυπες δευτεροταγείς δομές, με τρεις βρόχους που περιέχουν κυστεΐνες στις ίδιες συντηρημένες θέσεις και με τον ίδιο αριθμό αμινοξέων σε κάθε βρόχο. Η συντήρηση των δισουλφιδικών γεφυρών στο μόριο της ακετυλοχολινεστεράσης επιτρέπει τη διατύπωση της υπόθεσης ότι πιθανόν και η πρωτεΐνη του δάκου να παρουσιάζει την ίδια πτύχωση με της *D. melanogaster* και του *Torpedo*. Οι υπόλοιπες δύο κυστεΐνες (342 και 629) οι οποίες δεν συμμετέχουν στις δισουλφιδικές γέφυρες χαρακτηρίζονται ως ελεύθερες, με την κυστεΐνη 629 να συμμετέχει στο σχηματισμό των διμερών. Οι συγκεκριμένες κυστεΐνες ενώ δεν παρουσιάζουν συντήρηση μεταξύ της οικογένειας των χολινεστερασών, εντοπίζονται στις ίδιες θέσεις στην πρωτεΐνη της *D. melanogaster* και του δάκου.

Μελετήθηκε, επίσης, η συχνότητα χρήσης των κωδικονίων του ενζύμου με τη βοήθεια του προγράμματος Graphical Codon Usage Analyser (GCUA) (http://gcua.schoedl.de/). Όπως είναι γνωστό ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος. Δηλαδή κάθε αμινοξύ, με εξαίρεση τη μεθειονίνη και την τρυπτοφάνη, κωδικοποιείται από δύο μέχρι και έξι διαφορετικά κωδικόνια (συνώνυμα), με αποτέλεσμα διαφορετικοί οργανισμοί να παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα χρήσης κωδικονίων μεταξύ τους (λόγω ποικίλων εξελικτικών δυνάμεων, μεταλλάξεων, επιλογής). Γενικότερα όμως ισχύει ότι κάθε οργανισμός παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο χρήσης κωδικονίων που διατηρείται στα περισσότερα γονίδιά του, καθώς και ότι συγγενείς οργανισμοί παρουσιάζουν ομοιότητα στην επιλογή των κωδικονίων. Σκοπός της συγκεκριμένης ανάλυσης αποτέλεσε η διερεύνηση του κατά πόσο το πρότυπο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου ακολουθεί το πρότυπο χρήσης των κωδικονίων του εντόμου, αλλά και το αν οι ακετυλοχολινεστεράσες των διαφόρων οργανισμών ακολουθούν το ίδιο πρότυπο.

Το πρόγραμμα GCUA κάνει χρήση της βάσης δεδομένων Codon Usage Database, στην οποία είναι κατατεθειμένοι πίνακες με τις συχνότητες χρήσης των κωδικονίων στο γονιδίωμα διαφόρων οργανισμών. Η σύγκριση μιας υποβληθείσας αμινοξικής ακολουθίας με τον πίνακα χρήσης κωδικονιών του ίδιου ή διαφορετικού οργανισμού παρέχει ένα γράφημα όπου η συχνότητα χρήσης του κάθε κωδικονίου της πρωτεΐνης συγκρίνεται με τη συχνότητα χρήσης του ίδιου κωδικονίου στον επιλεγμένο οργανισμό. Αρχικά, προσδιορίστηκε το πρότυπο της συχνότητας χρήσης των κωδικονίων κάθε αμινοξέος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου σε σχέση με τον ίδιο.

Η Εικόνα 3-21 παρουσιάζει τη σχετική προσαρμοστικότητα του κάθε κωδικονίου. Στο κωδικόνιο με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης δίδεται η τιμή 100 και όλα τα υπόλοιπα παρουσιάζονται συγκριτικά με τη μέγιστη αυτή τιμή. Όπως φαίνεται, η ακετυλοχολινεστεράση ακολουθεί το πρότυπο χρήσης των κωδικονίων του δάκου με μόνη αξιοσημείωτη διαφορά το αμινοξύ της ιστιδίνης, όπου ενώ στο γονιδίωμα του δάκου τα δύο κωδικόνιά του εμφανίζονται με την ίδια, περίπου, συχνότητα, στην ακετυλοχολινεστεράση προτιμάται το CAC.

Επιπλέον, η σύγκριση του προτύπου των κωδικονίων της ακετυλοχολινεστέρασης του δάκου με το αντίστοιχο πρότυπο άλλων εντόμων αλλά και σπονδυλωτών οργανισμών επιβεβαίωσε τον ισχυρισμό ότι συγγενείς οργανισμοί παρουσιάζουν ομοιότητα στην επιλογή των κωδικονίων τους (Εικόνα 3-22). Τα *Bactrocera oleae, Ceratitis capitata* και *Bactrocera dorsalis* ακολουθούν την ίδια επιλογή κωδικονίων μεταξύ τους για τα περισσότερα αμινοξέα, όπως αντίστοιχα και τα *Homo sapiens* και *Mus musculus*. Το διάγραμμα διαχωρίζει εμφανώς τα έντομα από τους σπονδυλωτούς οργανισμούς. Παρόλα αυτά οι διαφορές δε θα μπορούσαν να υποστηρίξουν τον ισχυρισμό ότι πρόκειται για διαφορετικές αμινοξικές ακολουθίες. Η συντήρηση που παρουσιάζει η πρωτεΐνη μεταξύ των οργανισμών, όπως φάνηκε από τις προηγούμενες αναλύσεις, εξακολουθεί να διαφαίνεται και με τη σύγκριση των κωδικονίων, ίσως όμως σε μικρότερο βαθμό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Εικόνα 3-21: Συχνότητα χρήσης των κωδικονίων του δάκου στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης και στο γονιδίωμά του με το πρόγραμμα Graphical Codon Usage Analyser (Fuhrmann et al., 2004). Τα αμινοξέα και τα κωδικόνιά τους εμφανίζονται στον άξονα Χ, ενώ στον άξονα Υ εμφανίζεται η σχετική προσαρμοστικότητα του κάθε κωδικονίου. Το ανοιχτό πράσινο αντιστοιχεί στην *ace* ενώ το σκούρο στο γονιδίωμα.

Εικόνα 3-22: Συχνότητα χρήσης των κωδικονίων του δάκου και άλλων οργανισμών (εντόμων και σπονδυλωτών) στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης με το πρόγραμμα Graphical Codon Usage Analyser (Fuhrmann et al., 2004). Τα αμινοξέα και τα κωδικόνιά τους εμφανίζονται στον άξονα Χ, ενώ στον άξονα Υ εμφανίζεται η σχετική προσαρμοστικότητα του κάθε κωδικονίου**.** Πράσινη στήλη: *B. oleae*, Κίτρινη στήλη: *B. dorsalis*, Πορτοκαλί στήλη: *C. capitata*, Ανοιχτή γαλάζια στήλη: *H. sapiens*, Σκούρη Μωβ στήλη: *M. musculus*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

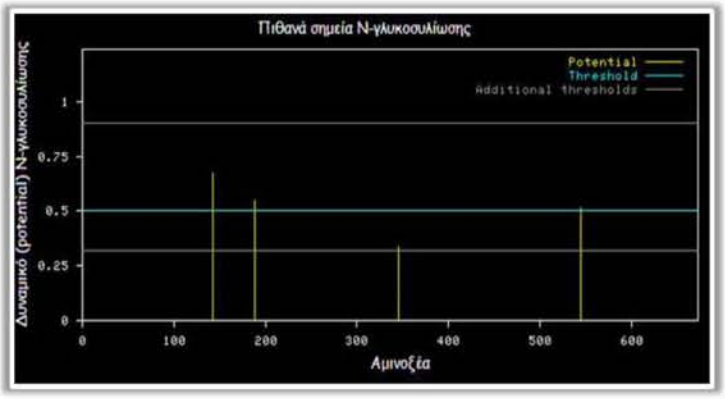
Τέλος με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής προβλέφθηκαν οι θέσεις μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζουν με διαφορετικούς τρόπους τη λειτουργικότητα των ενζύμων, αφού συμμετέχουν στην ταξινόμηση και τον εντοπισμό τους, τη λειτουργική δομή, τη σταθερότητα και την εξειδίκευση του υποστρώματος. Ο προσδιορισμός των πιθανών θέσεων N-γλυκοσυλίωσης και φωσφορυλίωσης πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα NetNGlyc και NetPhos, αντίστοιχα (Εικόνα 3-23).

Μετα-μεταφραστική τροποποίηση	Θέση αμινοξέος στο πρόδρομο μόριο AChE
N - γλυκοσυλίωση	N143, N189, N345, N545
S - Φωσφορυλίωση	S73, S133, S173, S290, S293, S324, S328, S439, S470, S509, S520, S585, S595, S635,
T - Φωσφορυλίωση	T285, T327, T387, T469, T516, T521
Y - Φωσφορυλίωση	Y126, Y150, Y250, Y422, Y431, Y445, Y499, Y538, Y583, Y592

Εικόνα 3-23: Θέσεις αμινοξικών καταλοίπων που υφίστανται N- γλυκοσυλίωση και φωσφορυλίωση.

Η N-γλυκοσυλίωση όπως είναι γνωστό, συμβαίνει σε ασπαραγίνες (Asn) που συμμετέχουν στο τριπεπτίδιο Asn-X-Ser/Thr. Η αλληλουχία του τριπεπτιδίου αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη γλυκοσυλίωση, αλλά δεν είναι μοναδική (Bause, 1983). Η Asn για να γλυκοσυλιωθεί θα πρέπει επιπλέον να βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της πρωτεΐνης. Το πρόγραμμα NetNGlyc αρχικά εντοπίζει το συγκεκριμένο τριπεπτίδιο στην υποβληθείσα ακολουθία και στη συνέχεια βασίζεται σε εννέα νευρωνικά δίκτυα για να προβλέψει την πιθανότητα της Asn να γλυκοσυλιώνεται. Για κάθε υποψήφιο κατάλοιπο γλυκοσυλίωσης δίνεται μία τιμή πρόβλεψης. Μια Asn θεωρείται ότι γλυκοσυλιώνεται όταν η τιμή αυτή υπερβαίνει ένα κατώτερο όριο.

Η αλληλουχία της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου σύμφωνα με την πρόβλεψη του NetNGlyc εμφανίζει τέσσερις Asn με τιμές ανώτερες του ορίου (Εικόνα 3-24) κι επομένως τέσσερις πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης. Οι Asn αυτές εντοπίζονται στις θέσεις 143, 189, 345 και 545, οι οποίες βρίσκονται στις υδροφιλικές περιοχές της πρωτεΐνης. Ο αριθμός και η θέση των σημείων γλυκοσυλίωσης δεν είναι αρκετά συντηρημένες μέσα στην οικογένεια των χολινεστερασών. Η ανθρώπινη βουτυροχολινεστεράση παρουσιάζει εννέα σημεία γλυκοσυλίωσης, ενώ η ακετυλοχολινεστεράση του *Torpedo* τέσσερα σημεία και μάλιστα κανένα από αυτά δεν αντιστοιχεί επακριβώς στα σημεία γλυκοσυλίωσης της *D. melanogaster* (Estrada-Mondaca et al., 1998). Παρόλα αυτά, οι θέσεις γλυκοσυλίωσης της πρωτεΐνης φαίνεται να διατηρούνται σταθερές μεταξύ συγγενών οργανισμών. Η *D. melanogaster* και η *Haematobia irritans*, τα οποία ανήκουν στην ίδια τάξη με το δάκο (Δίπτερα) παρουσιάζουν ακριβώς τις ίδιες θέσεις γλυκοσυλίωσης (Mutero & Fournier, 1992; Temeyer & Chen, 2007). Η γλυκοσυλίωση δεν παίζει ρόλο στις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου αλλά στην προστασία του από πρωτεάσες. Η ομοιότητα των θέσεων γλυκοσυλίωσης μεταξύ συγγενών οργανισμών ίσως υποδεικνύει την ύπαρξη

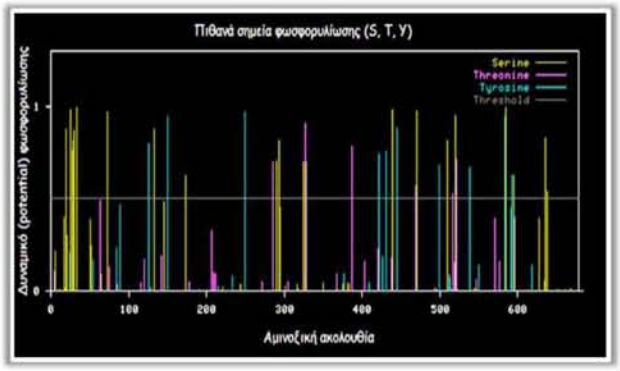


Εικόνα 3-24: Γραφική παράσταση της πρόβλεψης των πιθανών καταλοίπων της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου που υφίστανται N-γλυκοσυλίωση από το πρόγραμμα NetNGlyc 1.0 Server (Gupta et al., 2004). Η Asn, η οποία εμφανίζει τιμή μεγαλύτερη από το όριο, θεωρείται ότι γλυκοσυλιώνεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

συγκεκριμένων πρωτεασών μεταξύ των εντόμων, οι οποίες απουσιάζουν από άλλους οργανισμούς

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης από τις αντίστοιχες κινάσες. Το πρόγραμμα NetPhos προβλέπει τις πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης βασιζόμενο σε νευρωνικά δίκτυα. Για κάθε κατάλοιπο σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης που συναντά στην αλληλουχία υπολογίζει μία τιμή πρόβλεψης (prediction score). Ένα κατάλοιπο θεωρείται ότι είναι δυνατόν να φωσφορυλιωθεί όταν η τιμή πρόβλεψής του βρίσκεται πάνω από το όριο. Γενικά, όσο υψηλότερη είναι η τιμή πρόβλεψης τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα το κατάλοιπο να φωσφορυλιώνεται.



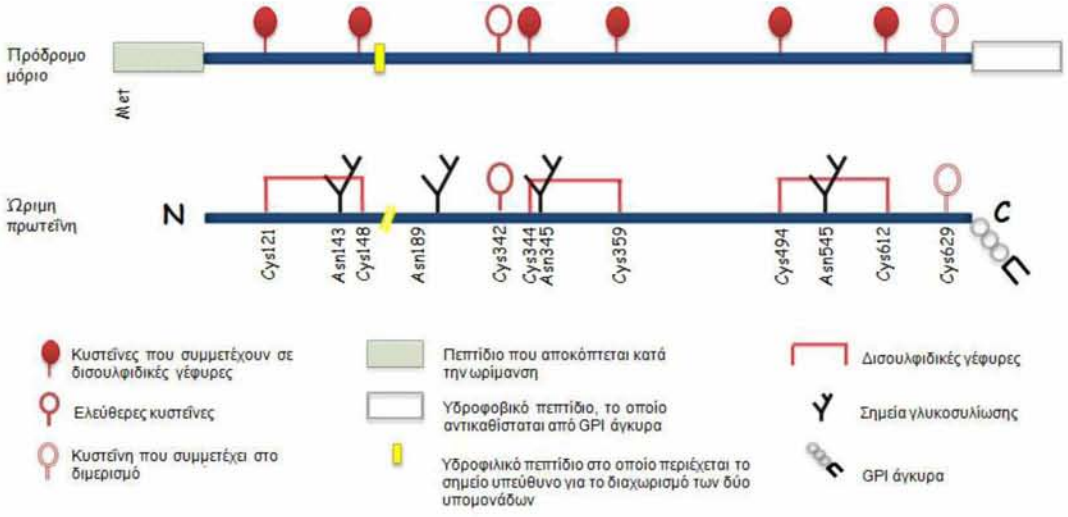
Εικόνα 3-25: Γραφική παράσταση πρόβλεψης των πιθανών καταλοίπων της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου που υφίστανται φωσφορυλίωση από το πρόγραμμα NetPhos 2.0 Server (Blom et al., 1999). Τα κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης, τα οποία εμφανίζουν τιμή μεγαλύτερη από το όριο, θεωρείται ότι φωσφορυλιώνονται.

Η Εικόνα 3-25 απεικονίζει τις τιμές πρόβλεψης του προγράμματος για κάθε αμινοξύ της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Σύμφωνα με αυτό, η ώριμη πρωτεΐνη παρουσιάζει πολλαπλά σημεία φωσφορυλίωσης: 15 κατάλοιπα σερίνης, 6 θρεονίνης και 10 τυροσίνης εμφανίζουν τιμές πρόβλεψης πάνω από το όριο. Πολλαπλά σημεία φωσφορυλίωσης απαντώνται συχνά σε μόρια ακετυλοχολινεστεράσης. Η πρωτεΐνη της *D. melanogaster* παρουσιάζει 34 σημεία φωσφορυλίωσης (15 Ser, 8 Thr και 10 Tyr) ενώ η πρωτεΐνη της *Haematobia irritans* 30 σημεία (13 Ser, 9 Thr και 9 Tyr) (Temeyer & Chen, 2007), πολλά από τα οποία είναι κοινά στους τρεις οργανισμούς. Η συντήρηση των περισσοτέρων θέσεων φωσφορυλίωσης αλλά και γενικότερα των περισσοτέρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο τους στο μόριο της πρωτεΐνης.

Οι κυριότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις εμφανίζονται στην Εικόνα 3-26.

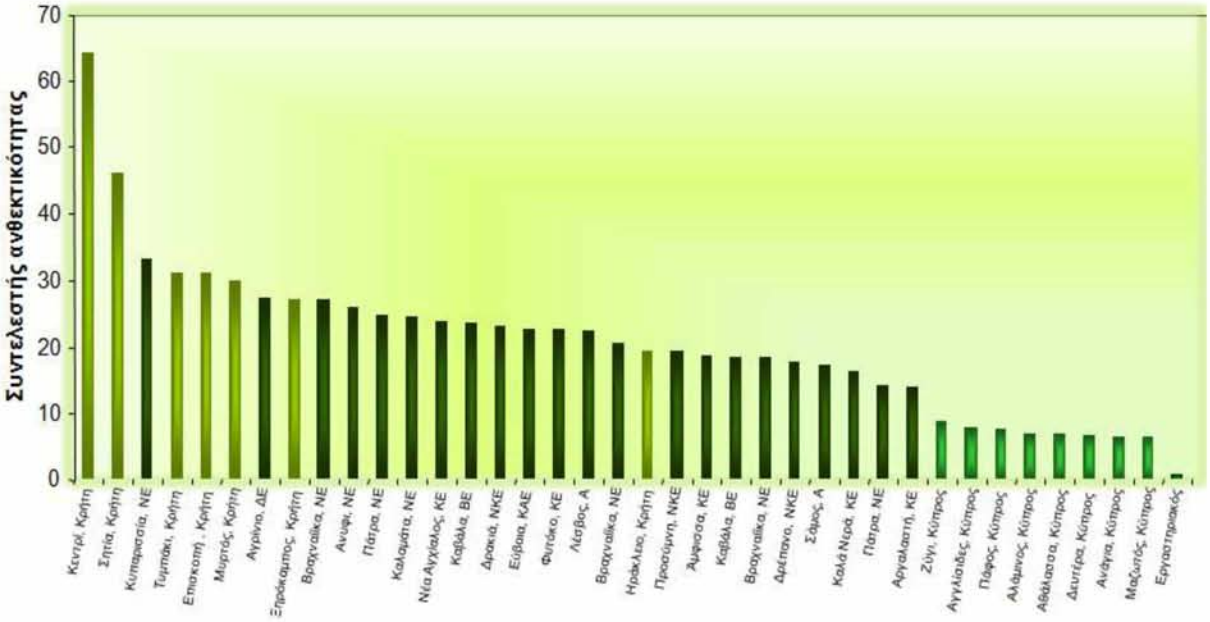
4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Δ3Q

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας φυσικών πληθυσμών δάκου της Ελλάδας και της Κύπρου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα κατέδειξε μία σημαντική διακύμανση [συντελεστής ανθεκτικότητας (RR)=6.3-64.4] (Εικόνα 3-27). Η διαφορά αυτή συσχετίζεται με το βαθμό χρήσης των εντομοκτόνων



Εικόνα 3-26: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της πρωτεΐνης της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 3-27: Κατάσταση ανθεκτικότητας φυσικών πληθυσμών δάκου από Ελλάδα και Κύπρο στο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο dimethoate με εφαρμογή βιοδοκιμών. Το διάγραμμα παρουσιάζει το συντελεστή ανθεκτικότητας (RR) που παρουσιάζει ο κάθε πληθυσμός σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό. Ο συντελεστής αθεκτικότητας των φυσικών πληθυσμών κυμαίνεται από 4 (Μαζωτός, Κύπρος) έως 64 (Κεντρί, Κρήτη) σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό. Περιοχές Κύπρου, Περιοχές Κρήτης Περιοχές από την υπόλοιπη Ελλάδα.

στις αντίστοιχες περιοχές (Skouras et al., 2007). Δηλαδή, οι φυσικοί πληθυσμοί που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τον εργαστηριακό πληθυσμό, εντοπίστηκαν στις περιοχές όπου καταγράφεται και εντονότερη χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

Η ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχει αποδοθεί, εν μέρει, στην παρουσία δύο μεταλλάξεων στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (Vontas et al., 2002). Η συμβολή των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στην παρατηρούμενη διακύμανση της ανθεκτικότητας ελέγχθηκε σε άτομα των πληθυσμών της παραπάνω μελέτης (Skouras et al., 2007) μέσω της παρακολούθησης της συχνότητας των ανθεκτικών αλληλομόρφων (F_R). Εάν, δηλαδή, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις αντικατόπτριζαν το επίπεδο της ανθεκτικότητας ενός φυσικού πληθυσμού, θα αναμενόταν αυξημένη συχνότητα ανθεκτικών αλληλομόρφων σε αυξανόμενης ανθεκτικότητας πληθυσμούς δάκου. Ο έλεγχος της παρουσίας των συγκεκριμένων μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με το PCR-RFLP τεστ που αναπτύχθηκε από τους Hawkes et al. (2005). Οι συχνότητες των ευαίσθητων (S) και ανθεκτικών (R) αλληλομόρφων και των δύο μεταλλάξεων δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά, παρά τη διακύμανση στα επίπεδα ανθεκτικότητας. Η πλειονότητα των ατόμων (~90%) που εξετάστηκε ήταν ομοζυγωτικά ως προς την ύπαρξη των δύο μεταλλάξεων (RR), ενώ όλα τα υπόλοιπα (~10%) ήταν ετεροζυγωτικά. Κανένα άτομο, ακόμη και αυτά με τη χαμηλότερη ανθεκτικότητα, δεν εμφανίστηκε ομοζυγωτικό ως προς τον ευαίσθητο γενότυπο (SS) των δύο μεταλλάξεων, είτε της I214V είτε της G488S μετάλλαξης (Εικόνα 3-28).

Παρόλη τη διακύμανση που καταγράφηκε στα επίπεδα ανθεκτικότητας μεταξύ των διάφορων πληθυσμών δάκου, η συχνότητα των ανθεκτικών αλληλομόρφων (F_R) των δύο γνωστών μεταλλάξεων δεν ακολούθησε την αντίστοιχη διακύμανση. Συνεπώς, οι δύο αυτές μεταλλάξεις δεν μπορεί να είναι οι μόνες που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Η μη διακύμανση των F_R αλληλομόρφων σε ευαίσθητα και ανθεκτικά άτομα υποδηλώνει την ύπαρξη επιπλέον παραγόντων που πιθανά σχετίζονται με υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας ορισμένων ατόμων. Ανάμεσά τους θα μπορούσαν να είναι είτε νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ακετυλοχολινεστεράσης, είτε η εμπλοκή κάποιου επιπλέον ενζυμικού συστήματος.

ng εντομοκτόνου ανά έντομο (εύρος)	I214V			G488S		
	n^1	R/N^2	$F_R{}^3$	n^1	R/N^2	$F_R{}^3$
4-9	SS:0 SR:25 RR:94	213/119	0.8950	SS:0 SR:22 RR:97	216/119	0.9076
19-37	SS:0 SR:28 RR:153	334/181	0.9227	SS:0 SR:31 RR:150	331/181	0.9144
75-150	SS:0 SR:10 RR:24	58/34	0.8529	SS:0 SR:10 RR:24	58/34	0.8529

Εικόνα 3-28: Συχνότητες αλληλομόρφων των μεταλλάξεων I214V, G488S. n^1: SS, SR, RR, ο αριθμός των ατόμων που παρουσίασαν ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία ως προς τον ευαίσθητο (S) ή (R) γενότυπο. R/N^2 : ο λόγος των ανθεκτικών (R) αλληλομόρφων που εντοπίστηκαν στο δείγμα προς το συνολικό αριθμό (N) ατόμων που ελέγχθηκε. Για ένα διπλοειδή οργανισμό, η μέγιστη τιμή που μπορεί να εμφανίσει το R είναι 2N. $F_R{}^3$: η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου όπως υπολογίζεται από το λόγο R/2N.

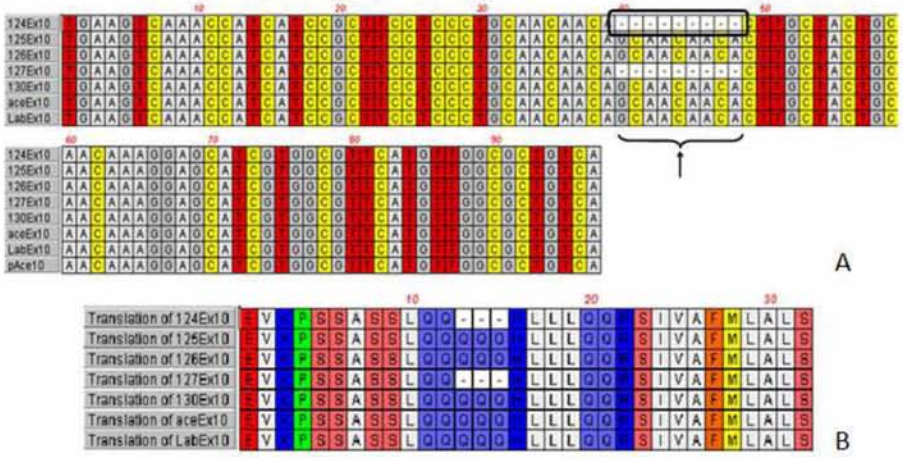
Η υπόθεση της ύπαρξης άλλων μεταλλάξεων στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης διερευνήθηκε μέσω της ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πιο ανθεκτικών ατόμων των βιοδοκιμών της προαναφερθείσας μελέτης (Skouras et al., 2007) στο συγκεκριμένο τόπο. Αρχικά, τα εξόνια II-X της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR με υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA των ατόμων που επέζησαν στην υψηλότερη δόση της βιοδοκιμής (150 ng, Kakani et al., 2008) και εν συνεχεία κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pBS κατάλληλων άκρων ώστε να ακολουθήσει η ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους.

Η σύγκριση των αλληλουχιών που αποκτήθηκαν με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές ακολουθίες του εργαστηριακού πληθυσμού παρουσίασε αρκετούς πολυμορφισμούς μεταξύ των εξονίων II-IX, οι οποίοι όμως οδηγούσαν σε συνώνυμες νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, εκτός φυσικά των δύο γνωστών μεταλλάξεων I214V και G488S.

Η ομοπαράθεση, όμως, της αλληλουχίας του εξονίου X μεταξύ ανθεκτικών και εργαστηριακών ατόμων αποκάλυψε μια μικρή έλλειψη 9 βάσεων σε δύο εκ των δέκα πιο ανθεκτικών ατόμων που εξετάστηκαν. Η έλλειψη αυτή των εννέα βάσεων (GCAACAACA) αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 1926-1934 του cDNA της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου (Vontas et al., 2002) και οδηγεί στην έλλειψη τριών καταλοίπων γλουταμίνης (Q) από μία σειρά πέντε γλουταμινών στις θέσεις 642-644 της πρωτεΐνης. Η νέα αυτή μετάλλαξη ονομάστηκε BoaceΔ3Q ή, εν συντομία, Δ3Q (Εικόνα 3-29).

4.1 Γενετική συσχέτιση της Δ3Q με την ανθεκτικότητα

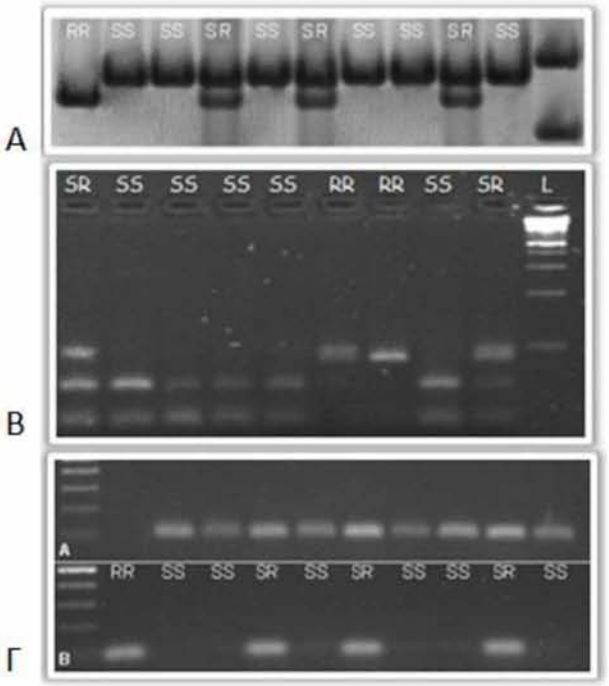
Για τη διερεύνηση του ρόλου της BoaceΔ3Q ελέγχθηκε η συχνότητά της σε άτομα δάκου τα οποία παρουσίασαν χαμηλή, μέτρια και υψηλή ανθεκτικότητα. Στόχος ήταν αφενός, να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο η νέα μετάλλαξη να αποτελεί απλώς ένα φυσικό πολυμορφισμό και αφετέρου να αξιολογηθεί η συμβολή της μετάλλαξης αυτής στην



Εικόνα 3-29: Α. Ομοπαράθεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του εξονίου X της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου από ανθεκτικά άτομα και από εργαστηριακής εκτροφής (Lab). Β. Ομοπαράθεση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του εξονίου X της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου από ανθεκτικά άτομα και από εργαστηριακής εκτροφής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ανάπτυξη της ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα των ατόμων ελέγχθηκε μέσω βιοδοκιμών και η κατηγοριοποίησή τους σε τρεις ομάδες ανθεκτικότητας (χαμηλή: 4-9 ng, μέτρια: 19-37 ng και υψηλή: 75-150 ng) πραγματοποιήθηκε βάσει της δόσης εντομοκτόνου που χρησιμοποιήθηκε στη βιοδοκιμή που συμμετείχαν. Ο έλεγχος της παρουσίας ή μη της μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε μεμονωμένα σε κάθε άτομο φυσικών πληθυσμών από διάφορες περιοχές με την εφαρμογή τριών διαφορετικών διαγνωστικών τεστ: α) με PCR, β) με PCR-RFLP και γ) με IPM-PCR, τα οποία αναπτύχθηκαν για το σκοπό αυτό.



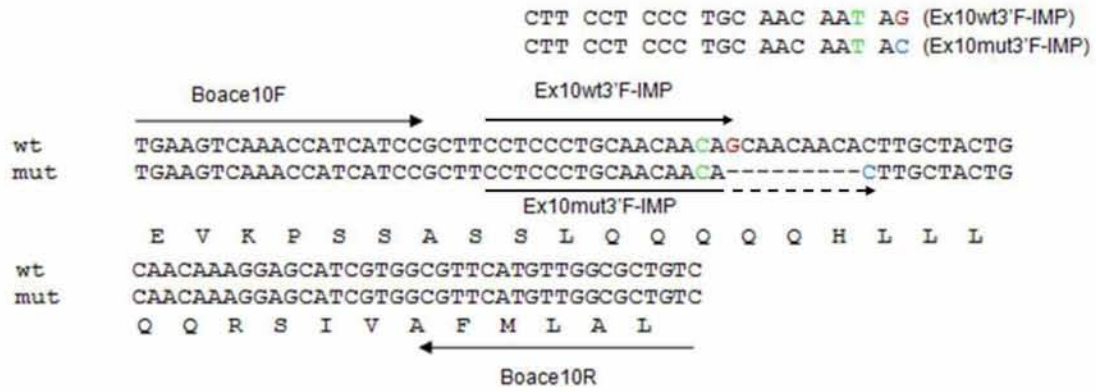
Εικόνα 3-30: Α. Ανάλυση με απευθείας PCR της μετάλλαξης Δ3Q σε 10% μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η ζώνη RR αντιστοιχεί στο ενισχυμένο προϊόν του κλωνοποιημένου Δ3Q αλληλόμορφου σε πλασμιδιακό φορέα και αναπαριστά τον υποθετικό γενότυπο $\Delta 3Q^{-/-}$. Οι ζώνες SR και RR αποτελούν τα ενισχυμένα προϊόντα των γενοτύπων $\Delta 3Q^{-/+}$ και $\Delta 3Q^{+/+}$ από φυσικούς πληθυσμούς εντόμων, αντίστοιχα. Β. Ανάλυση με PCR-RFLP της μετάλλαξης Δ3Q σε 3% πήκτωμα αγαρόζης MetaPhor (FMC). Η ζώνη RR αντιστοιχεί στο γενότυπο $\Delta 3Q^{-/-}$ στην οποία έχει καταστραφεί η θέση αναγνώρισης του ενζύμου MwoI. Ο γενότυπος $\Delta 3Q^{+/+}$ (SS) παρουσιάζει δύο ζώνες, διότι το MwoI διαχωρίζει το προϊόν στις ζώνες 58 και 38 bp. Ο γενότυπος $\Delta 3Q^{-/+}$ (SR) εμφανίζει και τις τρεις ζώνες. Γ. Ανάλυση με IPM-PCR της μετάλλαξης Δ3Q σε 1.5% πήκτωμα αγαρόζης. Οι εκκινητές Ex10mut3'F-IMP και Boace10R ενισχύουν μόνο το αλληλόμορφο R, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν προϊόν μόνο οι γενότυποι $\Delta 3Q^{-/+}$ και $\Delta 3Q^{+/+}$ (κάτω τμήμα εικόνας). Οι εκκινητές Ex10wt3'F-IMP και Boace10R ενισχύουν το αλληλόμορφο S κι επομένως μόνο στο γενότυπο $\Delta 3Q^{+/+}$ δε θα ενισχυθεί προϊόν (άνω τμήμα εικόνας).

Το PCR διαγνωστικό τεστ διαχωρίζει τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη από τα άτομα αγρίου τύπου με βάση το μέγεθος του εξονίου Χ που ενισχύεται στην κάθε περίπτωση. Οι εκκινητές (Boace10F και Boace10R) που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR ενισχύουν σχεδόν ολόκληρη την αλληλουχία του εξονίου Χ, στην οποία εντοπίζεται η έλλειψη των εννέα βάσεων. Έτσι, η αντίδραση PCR σε αγρίου τύπου αλληλόμορφο ενισχύει προϊόν 96 βάσεων ενώ η αντίστοιχη αντίδραση σε μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ενισχύει προϊόν 87 βάσεων. Ο χαρακτηρισμός ενός αλληλομόρφου ως αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένου πραγματοποιήθηκε ύστερα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης MetaPhor (FMC) 3% ή σε πήκτωμα αποδιατακτικού ή μη πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% (Εικόνα 3-30Α), στα οποία η διαφορά του μεγέθους των δύο προϊόντων είναι διακριτή.

Το PCR-RFLP διαγνωστικό τεστ βασίζεται στο γεγονός ότι η έλλειψη των εννέα νουκλεοτιδίων της μετάλλαξης BoaceΔ3Q απαλείφει τα δύο τελευταία GC κατάλοιπα της αλληλουχίας αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Mwo*I (GCNNNNNNNGC). Επομένως, το προϊόν της PCR ενίσχυσης του εξονίου Χ του αγρίου τύπου αλληλόμορφου (96 bp) ύστερα από κατάτμηση με το ένζυμο *Mwo*I αποδίδει δύο περιοριστικά θραύσματα (58 και 38 bp), ενώ το PCR προϊόν του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου παραμένει άθικτο (87 bp). Στην περίπτωση του ετεροζυγωτικού ως προς τη μετάλλαξη ατόμου (SR) παρουσιάζονται και οι τρεις ζώνες (96, 58 και 38 bp). Ο γενότυπος των ατόμων προσδιορίστηκε ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων κατάτμησης σε πήκτωμα αγαρόζης MetaPhor (FMC) 3% ή σε πήκτωμα αποδιατακτικού ή μη πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% (Εικόνα 3-30Β).

Τέλος, το IPM-PCR διαγνωστικό τεστ βασίζεται στη χρήση ειδικών για το κάθε αλληλόμορφο εκκινητών, των Ex10wt3'F-IMP και Ex10mut3'F-IMP για του αγρίου τύπου και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, αντίστοιχα. Η αλληλουχία των δύο αυτών εκκινητών είναι πανομοιότυπη με μόνη διαφορά το 3΄ τελευταίο νουκλεοτίδιο, το οποίο προσδίδει την εξειδίκευση για το ένα ή το άλλο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 3-31: Γραφική παράσταση της περιοχής του εξονίου Χ της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου και των σχεδιασμένων εκκινητών για το διαχωρισμό της μετάλλαξης Δ3Q. Οι εκκινητές Boace10F και Boace10R (υποδεικνύονται με βέλη στο 5΄και 3΄ τέλος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, αντίστοιχα) ενισχύουν ολόκληρη την αλληλουχία. Αντίθετα, οι εκκινητές Ex10wt3΄F-IPM και Ex10mut3΄F-IPM (υποδεικνύονται με βέλη επάνω στην αλληλουχία, αντίστοιχα) συνδυάζονται με τον εκκινητή Boace10R και ενισχύουν το αλληλόμορφο αγρίου τύπου ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, αντίστοιχα. Η αλληλουχία των δύο αυτών εκκινητών είναι πανομοιότυπη με μόνη διαφορά το 3΄ τελευταίο νουκλεοτίδιο, το οποίο υποδεικνύεται με διαφορετικό χρώμα. Επίσης, και στους δύο έχει εισαχθεί μία αυθαίρετη μετάλλαξη στο τρίτο από το τέλος νουκλεοτίδιο, ώστε να αυξηθεί η εξειδίκευσή τους.

αλληλόμορφο. Επιπλέον, και στους δύο εκκινητές έχει εισαχθεί μία αυθαίρετη μετάλλαξη στο τρίτο από το τέλος νουκλεοτίδιο, ώστε να αυξηθεί η εξειδίκευσή τους (Intentional Mismatch) (Guo et al., 1997, Wilkins et al., 2006) (Εικόνα 3-31). Έτσι, ο συνδυασμός των εκκινητών Ex10mut3'F-IMP και Boace10R λειτουργεί μόνο στα μεταλλαγμένα άτομα (RR) ενισχύοντας προϊόν 67 bp. Αντίθετα, ο συνδυασμός των εκκινητών Boace10R και Ex10wt3'F-IMP ενισχύει προϊόν 76 bp σε ετεροζυγωτικά (SR) και αγρίου τύπου άτομα (SS), ενώ τα ομοζυγωτικά ως προς τη μετάλλαξη άτομα δε ενισχύονται. Η ύπαρξη ή όχι προϊόντος ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης διαχώρισε τα ευαίσθητα από τα ανθεκτικά άτομα (Εικόνα 3-30Γ).

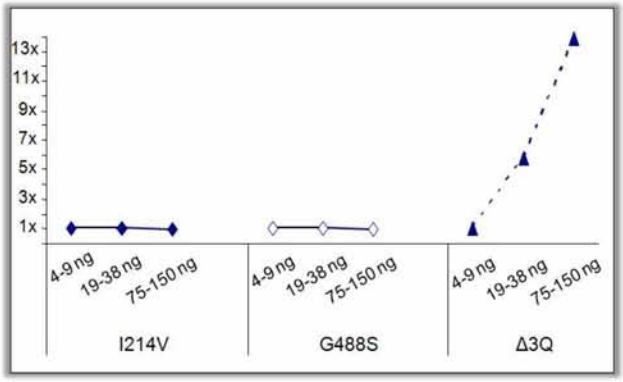
Η εφαρμογή των διαγνωστικών τεστ σε άτομα διαφορετικών περιοχών και διαφορετικού επιπέδου ανθεκτικότητας κατέδειξε ότι η μετάλλαξη δεν αποτελεί φυσικό πολυμορφισμό καθώς και ότι συσχετίζεται άρρηκτα με την ανθεκτικότητα. Η συχνότητα του R αλληλομόρφου παρουσίασε διακύμανση ανάμεσα στις τρεις ομάδες ανθεκτικότητας, επιβεβαιώνοντας τη σύνδεσή της με αυτήν. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3-32, η μικρότερη τιμή F_R της μετάλλαξης Δ3Q εμφανίζεται στην ομάδα των ευαίσθητων ατόμων. Η τιμή αυτή αυξάνεται ραγδαία με την αύξηση της ανθεκτικότητας στις υπό εξέταση ομάδες εντόμων. Η σύνδεση της νέας μετάλλαξης με την ανθεκτικότητα διαφαίνεται επίσης στο γράφημα της Εικόνας 3-33, το οποίο απεικονίζει τη διακύμανση της F_R στις τρεις ομάδες ανθεκτικότητας για τις τρεις μεταλλάξεις. Η τιμή της

ng εντομοκτόνου ανά έντομο (εύρος)	I214V			G488S			Δ3Q		
	n[1]	R/N[2]	F_R[3]	n[1]	R/N[2]	F_R[3]	n[1]	R/N[2]	F_R[3]
4-9	SS:0 SR:25 RR:94	213/119	0.8950	SS:0 SR:22 RR:97	216/119	0.9076	SS:81 SR:1 RR:0	1/82	0.0061
19-37	SS:0 SR:28 RR:153	334/181	0.9227	SS:0 SR:31 RR:150	331/181	0.9144	SS:170 SR:13 RR:0	13/183	0.0355
75-150	SS:0 SR:10 RR:24	58/34	0.8529	SS:0 SR:10 RR:24	58/34	0.8529	SS:49 SR:10 RR:0	10/59	0.0847

Εικόνα 3-32: Συχνότητες εμφάνισης της μετάλλαξης Δ3Q σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των μεταλλάξεων I214V και G488S. Οι συμβολισμοί περιγράφονται στην Εικόνα 3-28.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

F_R των μεταλλάξεων I214V και G488S έχει πολύ μικρό εύρος διακύμανσης, επιβεβαιώνοντας τον ισχυρισμό ότι οι δύο αυτές μεταλλάξεις ναι μεν είναι απαραίτητες για την εμφάνιση ανθεκτικότητας αλλά δεν είναι υπεύθυνες για την αύξηση της ανθεκτικότητας σε υψηλά επίπεδα επίπεδα. Αντίθετα, η καμπύλη διακύμανσης της F_R της μετάλλαξης Δ3Q παρουσιάζει απότομη θετική κλίση, καταδεικνύοντας τη συσχέτισή της με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας.

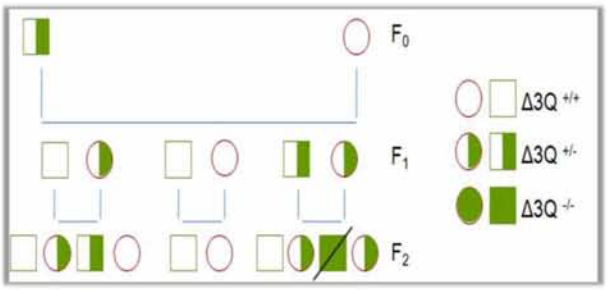


Εικόνα 3-33: Η διακύμανση της συχνότητας του R αλληλομόρφου (F_R) στις τρεις ομάδες ανθεκτικότητας για τις τρεις μεταλλάξεις της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου I214V, G488S και Δ3Q. Ως 1x ορίζεται η F_R της μικρότερης ομάδας ανθεκτικότητας.

4.2 Ατομικές διασταυρώσεις

Κάθε μετάλλαξη δημιουργεί ένα γενετικό κόστος (fitness cost) στον οργανισμό. Πολλές φορές το πλεονέκτημα ανθεκτικότητας που προσδίδει μια μετάλλαξη, αντισταθμίζεται από υψηλό γενετικό κόστος. Η ισορροπία μεταξύ του πλεονεκτήματος και του γενετικού κόστους της μετάλλαξης είναι αυτή που καθορίζει την επικράτηση ή εξαφάνιση του αλληλομόρφου. Έτσι, το γεγονός ότι η νέα μετάλλαξη Δ3Q δε βρέθηκε σε ομοζυγωτία στους εξεταζόμενους πληθυσμούς του εντόμου, υπαινίσσεται ένα υψηλό γενετικό κόστος. Το γεγονός αυτό υποκίνησε το ενδιαφέρον για τη γενετική μελέτη της νέας μετάλλαξης.

Θεωρήθηκε, λοιπόν, σκόπιμη η προσπάθεια δημιουργίας ενός ατόμου που να φέρει τη μετάλλαξη Δ3Q σε ομοζυγωτία. Αυτό πραγματοποιήθηκε με ατομικές διασταυρώσεις μεταξύ αρσενικών ατόμων αγρίου τύπου και θηλυκών εργαστηριακών ατόμων. Η επιλογή του αρσενικού αγρίου τύπου έγινε από περιοχή που εμφάνισε σε υψηλό ποσοστό τη μετάλλαξη, ώστε να υπάρχει η πιθανότητα να φέρει τη μετάλλαξη. Αντίθετα, η επιλογή του εργαστηριακού θηλυκού έγινε λόγω της ικανότητας του να ωοθετεί σε τεχνητό υπόστρωμα ωοτοκίας. Αρχικά, δημιουργήθηκαν 30 οικογένειες άγνωστου γενοτυπικού προφίλ. Μετά τη συλλογή των ατόμων της F_1, εξετάστηκαν τα άτομα της F_0 για την ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης Δ3Q. Οι απόγονοι των οικογενειών στις οποίες αποδείχθηκε ότι το αρσενικό άτομο ήταν $\Delta 3Q^{+/-}$ (6 οικογένειες), επαναδιασταυρώθηκαν μεταξύ τους σε 24 νέες ατομικές διασταυρώσεις. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρι να υπάρξει διασταύρωση (οικογένεια) στην οποία και οι δύο γονείς να είναι ετεροζυγώτες ως προς τη μετάλλαξη Δ3Q. Αυτό επετεύχθη μετά από τρεις κύκλους διασταυρώσεων (διασταύρωση C-101). Παρά το γεγονός ότι το 25% των απογόνων θα έπρεπε να είναι ομοζυγώτες ως προς τη Δ3Q (Εικόνα 3-34), κανένας από τους απογόνους της διασταύρωσης αυτής δεν βρέθηκε με το γενότυπο αυτό. Η προσπάθεια επαναλήφθηκε με τους ετερόζυγους απογόνους της C-101, χωρίς πάλι να βρεθεί ομοζυγωτικό Δ3Q άτομο, υποδηλώνοντας ότι η μετάλλαξη πιθανώς παρουσιάζει υψηλό γενετικό κόστος για το έντομο και ότι η ύπαρξη της σε ομοζυγωτία μπορεί να είναι θανατογόνος.

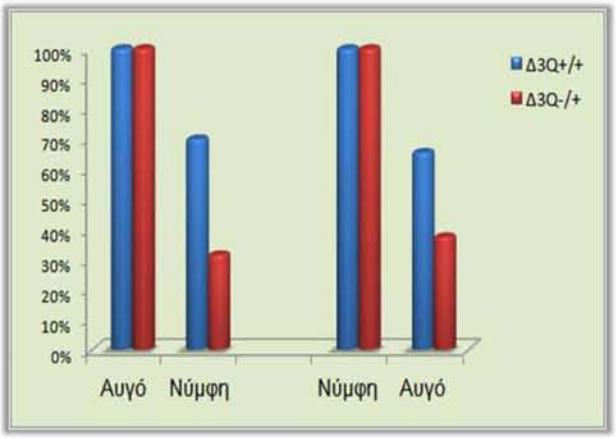


Εικόνα 3-33: Διασταύρωση ατόμων αγρίου τύπου και ετεροζυγωτικού ως προς τη Δ3Q μετάλλαξη και οι φαινότυποι που προκύπτουν στις επόμενες γενιές.

Η αποτυχία απομόνωσης ομοζυγωτικού $\Delta 3Q^{-/-}$ ατόμου οδήγησε στη διερεύνηση της επίδρασης που θα μπορούσε να έχει η μετάλλαξη στην ικανότητα ολοκλήρωσης ορισμένων σταδίων του βιολογικού κύκλου του εντόμου. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν έξι από τις οικογένειες της γενιάς F_3, εκ των οποίων στις τρεις το ένα άτομο έφερε τη μετάλλαξη σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ετεροζυγωτία και τρεις ήταν αγρίου τύπου. Για την κάθε οικογένεια έγινε καταμέτρηση των αυγών που ωαπόθεσαν στο τεχνητό στρώμα ωοτοκίας καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους, των βομβυκίων που προέκυψαν από τα αντίστοιχα αυγά και τέλος των ακμαίων που εκκολάφτηκαν. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3-35, η ύπαρξη της μετάλλαξης Δ3Q μειώνει τόσο τον αριθμό των βομβυκίων που προκύπτουν, όσο και τον αριθμό των ακμαίων που εκκολάπτονται. Παραμένει προς διευκρίνιση το κατά πόσο η μείωση της βομβυκίωσης είναι αποτέλεσμα μειωμένης εκκολαψιμότητας ή μειωμένης επιβίωσης προνυμφών. Από μία πρώτη παρατήρηση, δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην εκκολαψιμότητα των αυγών των δύο γενοτύπων. Κατά συνέπεια, η εκδοχή της μειωμένης επιβίωσης των προνυμφών θεωρείται πιθανότερη. Η μειωμένη ικανότητα του Δ3Q γενότυπου να ολοκληρώσει τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου επιβεβαιώνει το υψηλό γενετικό κόστος και δίνει μια πιθανή εξήγηση της αποτυχίας απομόνωσης ομοζυγωτικού $\Delta3Q^{-/-}$ ατόμων στις ατομικές διασταυρώσεις.



Εικόνα 3-35: Ποσοστό (%) βομβυκίων που προκύπτουν από τα αυγά που έχουν καταμετρηθεί, καθώς και το ποσοστό (%) των ακμαίων που προκύπτει από τα βομβύκια που συλλέχθηκαν για τους δύο γενότυπους $\Delta3Q^{+/+}$ $\Delta3Q^{-/+}$.

4.3 Ανάλυση της εξάπλωσης της μετάλλαξης Δ3Q στη λεκάνη της Μεσογείου

Η μελέτη της κατανομής της μετάλλαξης Δ3Q σε φυσικούς πληθυσμούς δάκου από χώρες της λεκάνης της Μεσογείου πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του διαγνωστικού PCR-RFLP τεστ. Συνολικά 10 πληθυσμοί (~ 30 άτομα ο καθένας) από περιοχές οκτώ διαφορετικών χωρών (δύο από το Ισραήλ και τη Γαλλία και από έναν από την Κύπρο, την Ελλάδα, την Ιταλία, την Ισπανία, την Πορτογαλίας και το Μαρόκο), αναλύθηκαν γενοτυπικά ως προς τη μετάλλαξη Δ3Q του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Τα δεδομένα από κάθε πληθυσμό επεξεργάστηκαν ως προς το ποσοστό εμφάνισης των δύο αλληλομόρφων (S και R).

Περιοχή	F_R	R/N	HW χ^2
Ελλάδα (Κρήτη)	0.1250	8/32	*
Ιταλία (Vasto)	0.1112	6/27	*
Ισραήλ (Ιεροσόλυμα)	0.1000	6/30	*
Ισραήλ (Sde Boker)	0.1000	6/30	*
Κύπρος	0.0645	4/31	*
Γαλλία (Κορσική-Λούμιο)	0.0625	4/32	*
Γαλλία (ακτές Ν. Γαλλίας)	0.0333	2/30	*
Ισπανία (Κόρδοβα)	0.0167	1/30	*
Πορτογαλία (Λισσαβώνα)	0	0/30	
Μαρόκο	0.0500	3/30	*

Εικόνα 3-36: Συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης Δ3Q (R αλληλομόρφου) σε φυσικούς πληθυσμούς δάκου από περιοχές της Μεσογείου. Με * υποδεικνύεται ο πληθυσμός που βρίσκεται εντός ισορροπίας HW, ικανοποιώντας το κριτήριο χ^2. Ο πληθυσμός της Πορτογαλίας είναι μονομορφικός.

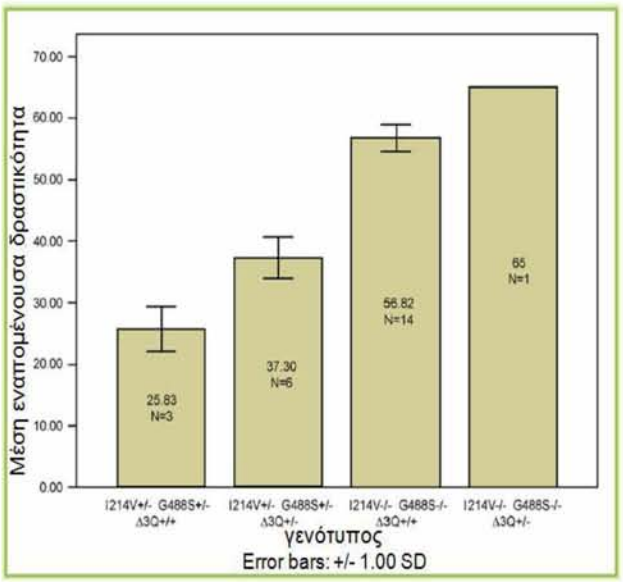
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3-36 των συχνοτήτων F_R των εξεταζόμενων περιοχών, το R αλληλόμορφο εμφανίζει τις μέγιστες τιμές στην Ελλάδα και την Ιταλία, ενώ παρουσιάζει μια τάση μείωσης της συχνότητάς του προς τη δυτική Μεσόγειο (Εικόνα 3-37). Η διακύμανση που παρατηρείται θα μπορούσε να αποδοθεί στη χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στις περιοχές αυτές. Σύμφωνα με στοιχεία του FAO, η Ελλάδα χρησιμοποιεί πολλαπλάσιους όγκους οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων απ' ότι η Πορτογαλία. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφονται και στις μελέτες των Hawkes et al. (2005) και Nardi et al. (2006), όπου το υψηλότερο ποσοστό των αλληλομόρφων των μεταλλάξεων I214V και G488S που προσδίδουν ανθεκτικότητα καταγράφηκε στην Ελλάδα και την κεντρική και νότια Ιταλία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Εικόνα 3-37: Χάρτης της λεκάνης της Μεσογείου όπου απεικονίζονται οι περιοχές δειγματοληψίας για τον έλεγχο της εξάπλωσης της μετάλλαξης Δ3Q. Στα γραφήματα (πίτες) με κίτρινο χρώμα συμβολίζεται η συχνότητα του αλληλομόρφου S ενώ με το πορτοκαλί χρώμα η συχνότητα του αλληλομόρφου R

4.4 Βιοχημική συσχέτιση της Δ3Q με την ανθεκτικότητα

Διερευνήθηκαν επίσης ορισμένες βιοχημικές επιδράσεις που θα μπορούσε να έχει η μετάλλαξη BoaceΔ3Q σε μεμονωμένα άτομα δάκου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές δοκιμές ακετυλοχολινεστεράσης σε άτομα φυσικού πληθυσμού βάσει της χρωματομετρικής μεθόδου Ellmann (1961). Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την εναπομένουσα δραστικότητα του ενζύμου ύστερα από εφαρμογή αναστολέα (εντομοκτόνο). Επιπλέον, μετά τη βιοχημική ανάλυση το κάθε άτομο ελέγχθηκε μοριακά, ώστε να προσδιοριστεί ο γενότυπός του ως προς τις τρεις μεταλλάξεις (I214V, G488S, Δ3Q) που συνδέονται με την ανθεκτικότητα. Η αντιστοίχιση των βιοχημικών αποτελεσμάτων με το γενότυπο του κάθε ατόμου κατέδειξε ότι η παρουσία ενός Δ3Q αλληλομόρφου είτε στο γενότυπο $I214V^{+/-}G488S^{+/-}$, είτε στον $I214V^{-/-}G488S^{-/-}$ προκαλεί αύξηση της εναπομένουσας δραστικότητας του ενζύμου κατά 44% και 14%, αντίστοιχα (Εικόνα 3-38). Η μεταβολή αυτή της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης που καταγράφεται παρουσία της νέας μετάλλαξης αποτελεί μία επιπλέον επιβεβαίωση της σύνδεσής της με την ανθεκτικότητα.



Εικόνα 3-38: Η εναπομένουσα δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (ύστερα από αναστολή με εντομοκτόνο) των διαφορετικών γενοτύπων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Η γραφική παράσταση προήλθε από το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS 13.0 for Windows (Leadtools). Μέσα στις στήλες εμφανίζεται η τιμή της μέσης εναπομένουσας δραστικότητας του ενζύμου και ο αριθμός των ατόμων (N) που ελέγχθηκαν. Η τυπική απόκλιση (error bars) παρουσιάζεται στην κορυφή των στηλών.

5. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Η εμφάνιση μιας μετάλλαξης στο καρβοξυτελικό άκρο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου με εμφανή συσχέτιση με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα προκάλεσε

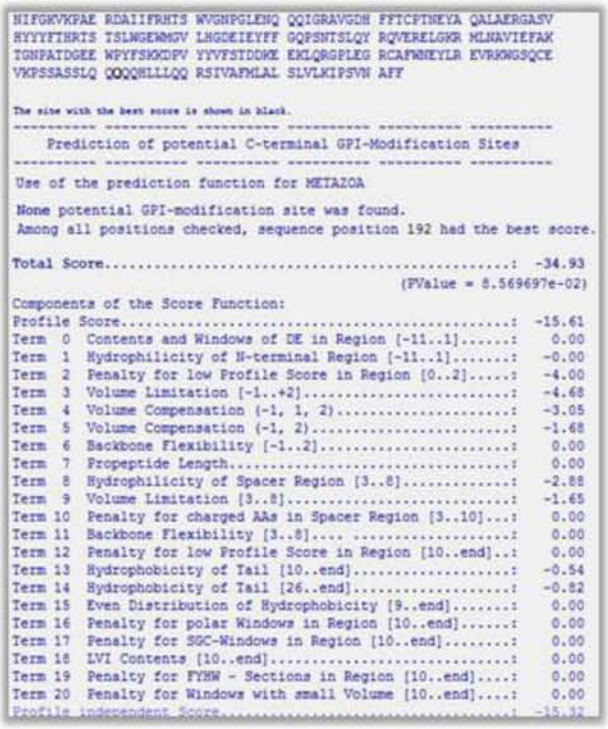
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

εξαιρετικό ενδιαφέρον. Διότι το άκρο αυτό όχι μόνο δεν αποτελεί μέρος του καταλυτικού του κέντρου του ενζύμου αλλά αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη. Ποιος, λοιπόν, θα μπορούσε να είναι ο ρόλος μιας μετάλλαξης σε ένα τμήμα ενός ενζύμου που δεν αποτελεί μέρος της ώριμης πρωτεΐνης; Όπως έχει προαναφερθεί, το καρβοξυτελικό άκρο της ακετυλοχολινεστεράσης είναι υπεύθυνο για τη μορφή και τη διευθέτηση του ενζύμου στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Στα έντομα η ακετυλοχολινεστεράση συναντάται κυρίως στη μορφή "H", στην οποία μέρος του καρβοξυτελικού πεπτιδίου αποκόπτεται και αντικαθίσταται από ένα γλυκολιπίδιο (GPI άγκυρα). Το ένζυμο, δηλαδή, δεν εμφανίζει την καρβοξυτελική υδρόφοβη περιοχή σύνδεσης με τη μεμβράνη που υπάρχει στις περισσότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Αντίθετα, το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης συνδέεται με ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης σε μια κατασκευή γλυκάνης που με τη σειρά της συνδέεται με το μόριο φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης που έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη (Rosse & Ware, 1995). Ο εντοπισμός της Δ3Q μετάλλαξης στην περιοχή αυτή (που καθορίζει την προσθήκη GPI άγκυρας) οδήγησε τη μελέτη για την αξιολόγηση του ρόλου της στη συσχέτιση της με την προσθήκη GPI άγκυρας.

Η πρωτεΐνη της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ως ένα διμερές μόριο, το οποίο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μίας GPI άγκυρας (Vontas et al., 2001). Η ύπαρξη όμως της GPI άγκυρας δεν έχει ποτέ επιβεβαιωθεί πειραματικά. Για το λόγο αυτό, πρώτο βήμα αποτέλεσε η διερεύνηση της ύπαρξης της GPI άγκυρας στο μόριο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου και εν συνεχεία η λειτουργική μελέτη της νέας μετάλλαξης.

5.1 GPI - άγκυρα

Αρχικά, η μελέτη της παρουσίας GPI άγκυρας στο ένζυμο του δάκου πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογιστικού προγράμματος big-PI Predictor (http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html), το οποίο προβλέπει το πιθανότερο κατάλοιπο (ω-κατάλοιπο) όπου θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η προσθήκη της GPI άγκυρας στο καρβοξυτελικό άκρο μιας πρωτεΐνης (Eisenhaber et al., 1999). Μία πρωτεΐνη για να κατηγοριοποιηθεί ως GPI πρωτεΐνη πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις (βλέπε Εισαγωγή §10). Το πρόγραμμα big-PI Predictor χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο ο οποίος εξετάζει το κατά πόσο το προφίλ της υποβληθείσας αμινοξικής αλληλουχίας πληροί τις διάφορες παραμέτρους. Ο αλγόριθμος ανιχνεύει το πιθανότερο νουκλεοτίδιο που μπορεί να λειτουργήσει ως ω-κατάλοιπο (ω-site) και με βάση την τιμή που προκύπτει κατατάσσει την πρωτεΐνη ως GPI ή όχι. Θετική τιμή υπονοεί τη δυνατότητα GPI προσθήκης, ενώ αρνητική τιμή καταδεικνύει ότι δεν είναι δυνατή η προσθήκη GPI άγκυρας. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερη είναι η προβλεπόμενη τιμή τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα η πρωτεΐνη να υφίσταται GPI προσθήκη.



```
NIFGKVKPAE RDAIIFRHIS WVGNPGLENQ QQIGRAVGDH FFTCPTNEYA QALAERGASV
HYYYFTHRIS TSLWGEWMGV LHGDEIEYFF GQPSNTSLQY RQVERELGKR MLNAVIEFAK
TGNPATDGEE WPYFSKKDPV YYVFSIDDKE EKLQRGPLEG RCAFWNEYLR EVRKWGSQCE
VKPSSASSLQ QQQQHLLLQQ RSIVAFMLAL SLVLKIPSVN AFF

The site with the best score is shown in black.
---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
    Prediction of potential C-terminal GPI-Modification Sites
---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
Use of the prediction function for METAZOA

None potential GPI-modification site was found.
Among all positions checked, sequence position 192 had the best score.

Total Score.....................................................:  -34.93
                                                    (PValue = 8.569697e-02)
Components of the Score Function:
Profile Score...................................................:  -15.61
Term  0  Contents and Windows of DE in Region [-11..1].....:    0.00
Term  1  Hydrophilicity of N-terminal Region [-11..1].....:   -0.00
Term  2  Penalty for low Profile Score in Region [0..2].....:   -4.00
Term  3  Volume Limitation [-1..+2].....................:   -4.68
Term  4  Volume Compensation (-1, 1, 2).....................:   -3.05
Term  5  Volume Compensation (-1, 2).....................:   -1.68
Term  6  Backbone Flexibility [-1..2].....................:    0.00
Term  7  Propeptide Length.....................................:    0.00
Term  8  Hydrophilicity of Spacer Region [3..8].............:   -2.88
Term  9  Volume Limitation [3..8].....................:   -1.65
Term 10  Penalty for charged AAs in Spacer Region [3..10]...:    0.00
Term 11  Backbone Flexibility [3..8].... .....................:    0.00
Term 12  Penalty for low Profile Score in Region [10..end]..:    0.00
Term 13  Hydrophobicity of Tail [10..end].....................:   -0.54
Term 14  Hydrophobicity of Tail [26..end].....................:   -0.82
Term 15  Even Distribution of Hydrophobicity [9..end].....:    0.00
Term 16  Penalty for polar Windows in Region [10..end].....:    0.00
Term 17  Penalty for SGC-Windows in Region [10..end].....:    0.00
Term 18  LVI Contents [10..end].....................:    0.00
Term 19  Penalty for FYHW - Sections in Region [10..end]....:    0.00
Term 20  Penalty for Windows with small Volume [10..end]....:    0.00
Profile independent Score.....................................:  -15.32
```

Εικόνα 3-39: Πρόβλεψη του πιθανού ω-κατάλοιπου από το πρόγραμμα big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 1999). Με βάση τις επιμέρους προϋποθέσεις της προσθήκης GPI άγκυρας, το πρόγραμμα υπολογίζει μία τιμή πρόβλεψης. Όσο μεγαλύτερη είναι η προβλεπόμενη τιμή, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα η πρωτεΐνη να υφίσταται προσθήκη GPI άγκυρας.

Προς έκπληξη, η ανάλυση της αλληλουχίας του δάκου δεν παρουσίασε θετική τιμή προτείνοντας, σύμφωνα με το πρόγραμμα, ότι δεν υπάρχει πιθανό ω-κατάλοιπο που να μπορεί να συνδεθεί με την GPI άγκυρα κι επομένως το ένζυμο δε χαρακτηρίζεται ως GPI συνδεόμενο (Εικόνα 3-39). Η ομοιότητα, όμως,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ανάμεσα στην ακετυλοχολινεστεράση του δάκου και της *D. melanogaster* (τόσο όσον αφορά την αμινοξική ακολουθία όσο και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις), το γεγονός ότι η ακετυλοχολινεστεράση των εντόμων παρουσιάζει GPI άγκυρα, καθώς και ότι αμινοξικές αλληλουχίες εντόμων, που επιβεβαιωμένα φέρουν GPI άγκυρα, παρουσίασαν επίσης αρνητικές τιμές στο πρόγραμμα, προκάλεσε την αμφισβήτηση του αποτελέσματος και την *in vivo* μελέτη του ενζύμου.

5.2 *In vivo* μελέτη της παρουσίας ή μη GPI άγκυρας

Η ακετυλοχολινεστεράση, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζει διάφορες μορφές, που συνιστούν τα μονομερή G_1, διμερή G_2, ή τετραμερή G_4. Οι μορφές αυτές συναντώνται είτε ως αμφιφιλικές (a, συνδεδεμένες στη μεμβράνη) είτε ως μη αμφιφιλικές (na, εκκρινόμενες) παραλλαγές του ενζύμου. Η "αγκυροβολημένη" με GPI ακετυλοχολινεστεράση συγκαταλέγεται στις G_2^a μορφές του ενζύμου και είναι ευαίσθητη στη διάσπαση από την ειδική φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PIPLC), όπως και όλες οι GPI πρωτεΐνες (Futerman et al., 1983). Η κατεργασία με PIPLC διαχωρίζει τον γλυκερολ-φωσφοδιεστερικό δεσμό και μετατρέπει το συνδεδεμένο στη μεμβράνη ένζυμο G_2^a σε μη αμφιφιλική μορφή G_2^{na}, χωρίς όμως να μεταβάλλεται η δραστικότητα του ενζύμου (Davitz et al., 1987).

Εκμεταλλευόμενοι την ευαισθησία αυτή στην PIPLC, η επιβεβαίωση της παρουσίας της GPI άγκυρας στην ακετυλοχολινεστεράση του δάκου πραγματοποιήθηκε με απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τον εγκέφαλο εντόμων, κατεργασία αυτού με PI-PLC (του *Bacillus thuringiensis*) και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση και καθίζηση σε βαθμίδωση σουκρόζης. Και οι δύο αυτές μέθοδοι ανάλυσης βασίζονται στο γεγονός ότι οι αμφιφιλικές G_2^a μορφές της ακετυλοχολινεστεράσης, λόγω της ύπαρξης της GPI άγκυρας, παρουσιάζουν χαρακτηριστικές αλληλεπιδράσεις με μικκύλια μη αποδιατακτικών απορρυπαντικών σε αντίθεση με τη μη αμφιφιλική μορφή G_2^{na} (Silman & Futerman, 1987; Massoulié & Bon, 1982; Bon et al., 1988a;1988b; Toutant, 1989). Επιπλέον, οι μέθοδοι αυτές έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να εφαρμοστούν όχι μόνο σε καθαρές πρωτεΐνες αλλά και σε ακατέργαστα εκχυλίσματα, στα οποία οι GPI-πρωτεΐνες μπορούν να προσδιοριστούν ιστοχημικά ή/και χρωμομετρικά. Έτσι, ενώ οι κλασσικοί χημικοί χαρακτηρισμοί πρωτεϊνών απαιτούν μεγάλης κλίμακας απομονώσεις πρωτεϊνών, οι μέθοδοι αυτοί απαιτούν μικρά ποσά ακατέργαστων εκχυλισμάτων .

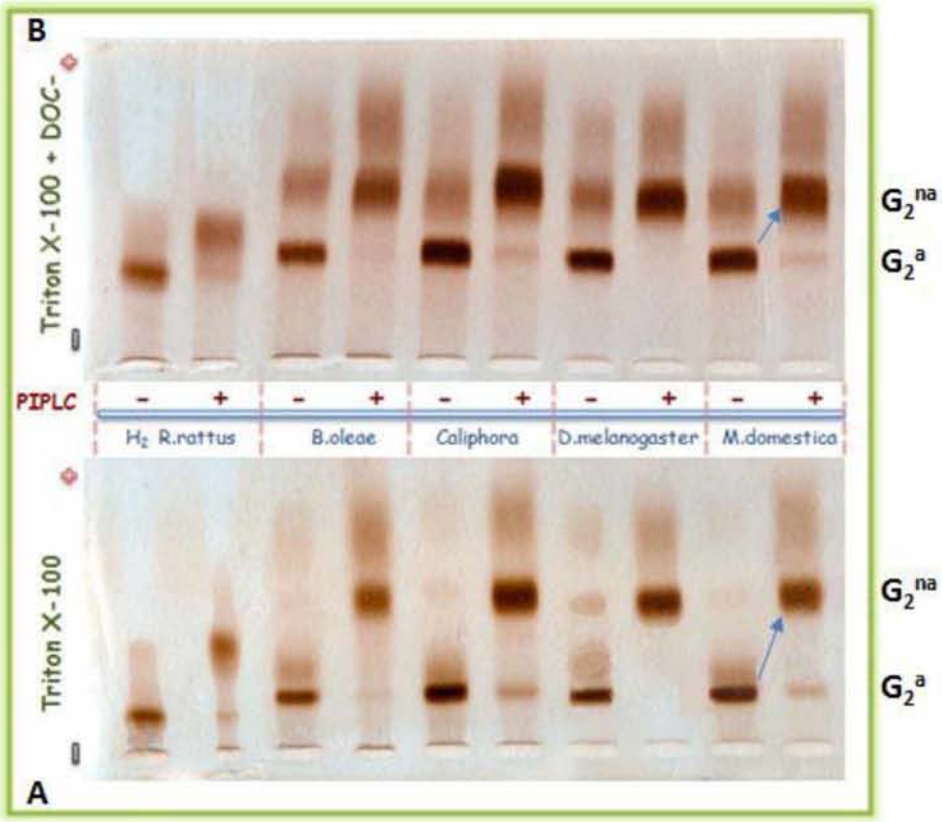
5.2.1 Ανάλυση ύπαρξης GPI άγκυρας με ηλεκτροφόρηση.

Ο ρυθμός μετανάστευσης των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα εξαρτάται από το φορτίο τους και από τις υδροδυναμικές τους παραμέτρους. Τα μη αμφιφιλικά διμερή G_2^{na} μεταναστεύουν σχεδόν δύο φορές ταχύτερα από την αμφιφιλική μορφή G_2^a σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα. Αυτό οφείλεται στη δραματική μείωση του μεγέθους της ακετυλοχολινεστεράσης, η οποία προκαλείται από την απομάκρυνση της GPI άγκυρας και την αλληλεπίδρασή της με τα μικκύλια των απορρυπαντικών (Rosenberry & Scoggin, 1984; Toutant et al., 1988). Σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα η μετανάστευση των αμφιφιλικών μορφών G_2^a εξαρτάται κυρίως από το απορρυπαντικό που περιέχεται στο πήκτωμα. Οι αμφιφιλικές μορφές G_2^a μεταναστεύουν πιο γρήγορα όταν στο πήκτωμα δεν περιέχεται απορρυπαντικό παρά παρουσία Triton X-100 λόγω της ύπαρξης της GPI άγκυρας. Η GPI άγκυρα αλληλεπιδρά με τα μικκύλια των απορρυπαντικών με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η μετανάστευση των αμφιφιλικών μορίων. Επιπλέον, η μετανάστευση της διμερούς αμφιφιλικής μορφής G_2^a της ακετυλοχολινεστεράσης παρουσιάζει διαφορετικό ρυθμό παρουσία διαφορετικών απορρυπαντικών. Η μετανάστευση σε πηκτώματα που περιέχουν Triton X-100 πραγματοποιείται με μικρότερο ρυθμό από ότι σε πηκτώματα που περιέχουν επιπλέον Na doexycolate (DOC) (αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό) λόγω της αύξησης της πυκνότητας φορτίου. Έτσι, η κατεργασία με PI-PLC, όταν αυτή επάγει το σχηματισμό ενεργών G_2^{na} παραγώγων, τα οποία δεν επιβραδύνονται πλέον παρουσία Triton X-100,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

υποδεικνύει τη γλυκολιπιδιακή φύση της υδροφοβικής περιοχής της πρωτεΐνης (Futerman et al.,1985).

Με βάση τα παραπάνω ο αμφιφιλικός χαρακτήρας της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου προσδιορί-στηκε με ηλεκτροφόρηση μετατόπισης φορτίου (charge-shift) πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, με και χωρίς κατεργασία με PIPLC σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου το οποίο περιείχε Triton X-100, καθώς και σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου το οποίο περιείχε Triton X-100 και DOC. Ο προσδιορισμός των διάφορων μορφών της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την ιστοχημική μέθοδο των Karnovsky και Roots (1964). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα παρουσίασε διαφορετική κινητικότητα στην περίπτωση που είχε προηγηθεί κατεργασία του με PI-PLC. Η εφαρμογή PI-PLC μετέτρεψε τις μορφές G_2^a από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα σε μη αμφιφιλική μορφή G_2^{na}, υποδεικνύοντας ότι η κύρια μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου είναι η μορφή Η, δηλαδή φέρει μία γλυκολιπιδιακή άγκυρα (GPI). Οι εναπομείναντες στο κύτταρο μορφές G_2^a επίσης βρέθηκαν να είναι ευαίσθητες στη δράση PIPLC, ύστερα από κατεργασία και διαλυτοποίηση με Triton X-100, αποδεικνύοντας επιπλέον ότι η μορφή Η GPI-G_2^a εκτίθεται κυρίως στην επιφάνεια του κυττάρου (Εικόνα 3-40).



Εικόνα 3-40: Ηλεκτροφορητικό πρότυπο της επίδρασης της PIPLC στην ακετυλοχολινεστεράση του δάκου, της *Caliphora spp*, της *Drosophila* και της *M.domestica*. Το ένζυμο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο των εντόμων και ύστερα από κατεργασία με PIPLC ηλεκτροφορήθηκε σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100 (A) και παρουσία των απορρυπαντικών Triton X-100 και DOC (B). Ο προσδιορισμός των διάφορων μορφών του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με την ιστοχημική μέθοδο Karnovsky & Roots (1964). Η σύγκριση της μετανάστευσης του μη και του κατεργασμένου με PIPLC ενζύμου που παρατηρείται στα δύο πηκτώματα κατέδειξε την ύπαρξη του αμφιφιλικού και του μη αμφιφιλικού χαρακτήρα της πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας τη γλυκολιπιδιακή φύση της υδροφοβικής περιοχής της πρωτεΐνης. Η αμφιφιλική μορφή (G_2) μεταναστεύει πιο αργά παρουσία των απορρυπαντικών, διότι τα μικκύλια αλληλεπιδρούν με τη GPI άγκυρα. Ως κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε η H_2 μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης του αρουραίου.Τα βέλη δείχνουν την αρχή της μετανάστευσης και ο προσανατολισμος από αρνητικό σε θετικό υποδεικνύεται με το – και +.

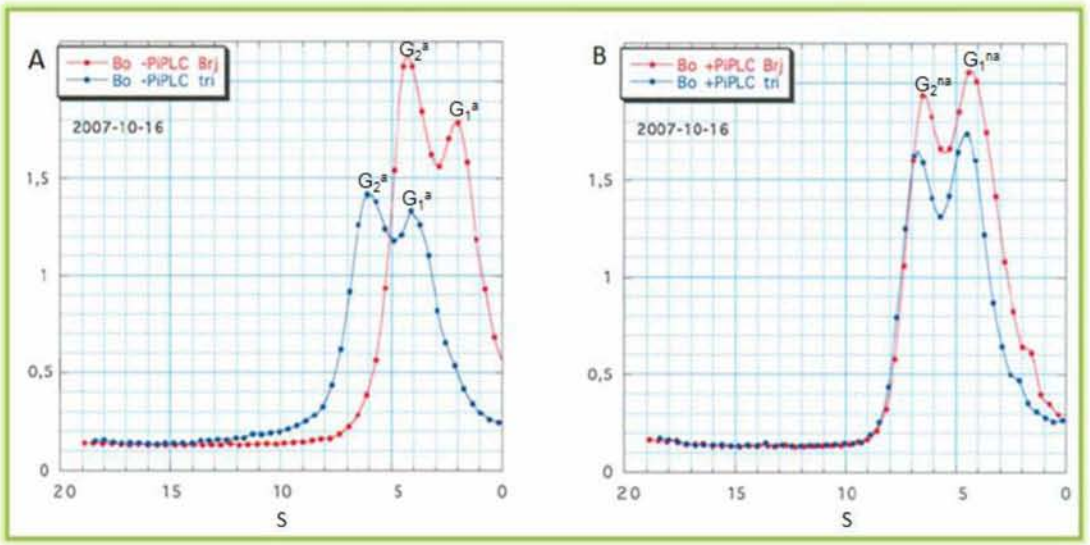
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

5.2.2 Ανάλυση ύπαρξης GPI άγκυρας με καθίζηση

Σύμφωνα με τους Bon et al. (1988a; 1988b), οι αμφιφιλικές μορφές G^a της ακετυλοχολινεστεράσης χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι (εκτός της ηλεκτροφορητικής μετανάστευσης) και ο συντελεστής καθίζησής τους αλλάζει παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100. Η G_2^a μορφή καθιζάνει ως μονοδιασκορπιζόμενο σύμπλοκο (monodisperse complex) με αποδιατακτικά μικκύλια και έχει συντελεστή καθίζησης 6.8 S παρουσία Triton X-100 και 4.7 S παρουσία Brij-96, ενώ απουσία απορρυπαντικού, τα διμερή καθιζάνουν γρηγορότερα ως μονοδιασκορπιζόμενες κορυφές (monidisperse peaks).

Οι ενεργές μορφές της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου αναλύθηκαν με καθίζηση σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προήλθε από τον εγκέφαλο. Η ακετυλοχολινεστεράση διαλυτοποιήθηκε παρουσία 1% Triton X-100 (low salt/detergent extract) και η ανάλυση του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε με και χωρίς κατεργασία με PI-PLC σε βαθμίδωση σουκρόζης παρουσία δύο διαφορετικών απορρυπαντικών, Triton X -100 και Brij-96. Η μέτρηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο κατά Ellman (1961).

Σύμφωνα με τα διαγράμματα του συντελεστή καθίζησης (Εικόνα 3-41), το πρωτεϊνικό εκχύλισμα χωρίς κατεργασία PIPLC παρουσίασε δύο κορυφές των οποίων ο συντελεστής καθίζησης ήταν διαφορετικός μεταξύ των απορρυπαντικών Triton X-100 και Brij-96, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για τις αμφιφιλικές μορφές του ενζύμου G_2^a και G_1^a. Παρουσία Triton X-100, οι G_2^a και G_1^a μορφές της ακετυλοχολινεστεράσης εμφάνισαν συντελεστή καθίζησης περίπου 6 S και 4 S, αντίστοιχα, ενώ παρουσία Brij-96 ο συντελεστής καθίζησης ήταν χαμηλότερος (4 S και 2 S). Η διαφορά του συντελεστή καθίζησης που παρουσιάζεται στα δύο απορρυπαντικά οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος των μικκυλίων τους και στην αλληλεπίδρασή τους με τη GPI άγκυρα. Αντίθετα, η κατεργασία με PIPLC των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων μετατόπισε τις κορυφές των G_2^a και G_1^a μορφών (και στα δύο απορρυπαντικά), υποδεικνύοντας τη μετατροπή τους



Εικόνα 3-41: Προφίλ καθίζησης των διάφορων μορφών ακετυλοχολινεστεράσης πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από εγκέφαλο δάκου. Κατεργασμένο με και χωρίς PIPLC πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε σε βαθμίδωση σακχαρόζης (5%-20%) παρουσία Triton X-100 (μπλε γραμμή) και παρουσία Brj 96 (κόκκινη γραμμή). Ύστερα από τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκαν κλάσματα των 200 μl, των οποίων η δραστικότητα μετρήθηκε με τη χρωμομετρική μέθοδο Ellman (1961). **A**. Οι αμφιφιλικές μορφές G_2^a και G_1^a παρουσιάζουν διαφορετικό συντελεστή καθίζησης παρουσία του απορρυπαντικού Triton X-100 (6 S και 4 S) και παρουσία του απορρυπαντικού Brj96 (4 S και 2 S) λόγω του διαφορετικού μεγέθους των μικκυλίων τους και της αλληλεπίδρασης αυτών με τη GPI άγκυρα. **B**. Η κατεργασία του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με PIPLC μετατοπίζει τις κορυφές των G_2^a και G_1^a (και στα δύο απορρυπαντικά), υποδεικνύοντας τη μετατροπή τους στις μη αμφιλικές μορφές G_2^{na} και G_1^{na}. Το κατεργασμένο με PIPLC πρωτεϊνικό εκχύλισμα παρουσιάζει τον ίδιο συντελεστή καθίζησης και στα δύο απορρυπαντικά, λόγω της αποκοπής της GPI άγκυρας. Ως εσωτερικά κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν η αλκαλική φωσφατάση (6.1 S) και β-γαλακτοσιδάση (16 S) της *E.coli*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

στις μη αμφιλικές μορφές G_2^{na} και G_1^{na}. Μάλιστα, ο συντελεστής καθίζησης των μη αμφιφιλικών μορφών ήταν ο ίδιος και για τα δύο απορρυπαντικά λόγω της μη αλληλεπίδρασης της GPI άγκυρας με τα μικύλλια, υποδεικνύοντας την αποκοπή της. Έτσι, η μετατόπιση των κορυφών του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος παρουσία PIPLC καθώς και η εμφάνιση του ίδιου συντελεστή καθίζησης μεταξύ των δύο απορρυπαντικών υποδεικνύει την ύπαρξη GPI άγκυρας.

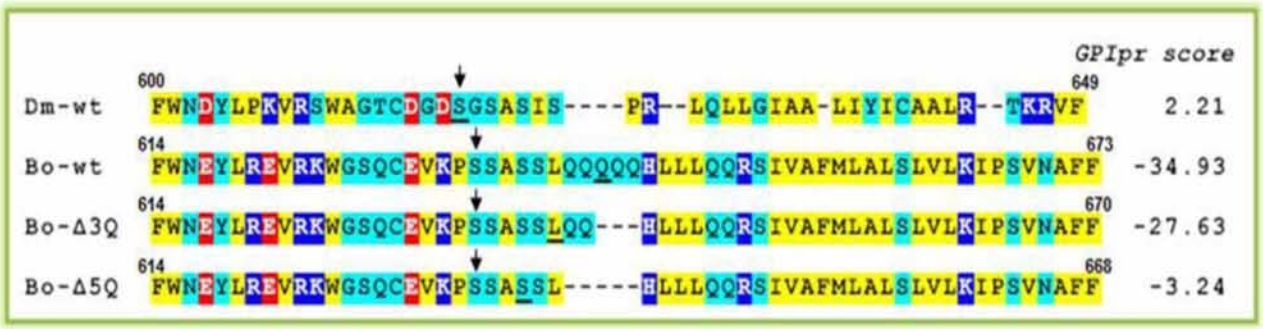
Η *in vivo* μελέτη της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου αποκάλυψε ότι το ένζυμο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και αγκυροβολείται σε αυτή μέσω της GPI δομής. Η ύπαρξη αμφιφιλικών μορφών της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο και η μετατροπή τους σε μη αμφιφιλικές μορφές ύστερα από κατεργασία με PIPLC επιβεβαίωσε ότι η κύρια μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου είναι η GPI-G_2^a μορφή. Η παρουσία της GPI άγκυρας στην πρωτεΐνη του δάκου συνάδει και ενισχύει τον ισχυρισμό ότι στα έντομα την κύρια μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης αποτελεί η μορφή “H”. Η αδυναμία του προγράμματος big-PI Predictor να προβλέψει το πιθανό ω-κατάλοιπο στην αμινοξική ακολουθία της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, αλλά και άλλων εντόμων, καταδεικνύει την ανάγκη βελτίωσης του χρησιμοποιούμενου αλγορίθμου.

5.3 Έκφραση και ανάλυση της πρωτεΐνης που φέρει τη μετάλλαξη Δ3Q

Την επιβεβαίωση της ύπαρξης GPI άγκυρας στην πρωτεΐνη του δάκου ακολούθησε η λειτουργική μελέτη της νέας μετάλλαξης Δ3Q. Εφόσον η ακετυλοχολινεστεράση του δάκου αποδεδειγμένα υφίσταται GPI προσθήκη, η έλλειψη των τριών γλουταμινών (Δ3Q μετάλλαξη) στην υδρόφοβη περιοχή που αντικαθιστάται από την GPI δομή, είναι πιθανόν να επηρεάζει τη διαδικασία προσθήκης της GPI άγκυρας.

Ο ρόλος της μετάλλαξης Δ3Q στην προσθήκη GPI άγκυρας αξιολογήθηκε και με τη χρήση του προγράμματος big-PI Predictor. Παρότι, όπως έγινε φανερό, το πρόγραμμα δε χρησιμοποιεί τον κατάλληλο αλγόριθμο για την πρόβλεψη της GPI προσθήκης στα έντομα, ο έλεγχος της μεταλλαγμένης ακολουθίας παρουσίασε βελτίωση της πιθανότητας εύρεσης ω-καταλοίπου (Εικόνα 3-42). Η τιμή που προέκυψε παρέμεινε αρνητική, αλλά αυξήθηκε περίπου κατά 8 μονάδες, υποδεικνύοντας ότι η έλλειψη των τριών γλουταμινών μεταβάλλει την υδρόφοβη περιοχή με τρόπο που να προσεγγίζει περισσότερο τις προϋποθέσεις του προγράμματος.

Οι τρεις γλουταμίνες (Q) που απαλείφονται στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν τμήμα μιας αλληλουχίας πέντε διαδοχικών γλουταμινών. Το ερώτημα που γεννάται



Εικόνα 3-42: Ομοπαράθεση της καρβοξυτελικής περιοχής της ακετυλοχολινεστεράσης της *Drosophila melanogaster* (Dm-wt), του δάκου αγρίου τύπου (Bo-wt), του μεταλλάγματος Δ3Q (Bo-Δ3Q) και του υποθετικού μεταλλάγματος Δ5Q (Bo-Δ5Q). Οι αριθμοί των αμινοξικών αλληλουχιών (στην αρχή και στο τέλος) αναφέρονται στο αμινοξικό κατάλοιπο της πρωτεΐνης. Το προβλεπόμενο ω-κατάλοιπο υπογραμμίζεται, ενώ με βέλος παρουσιάζεται το πραγματικό ω-κατάλοιπο για την Dm και το πιθανολογούμενο (από εμάς) ω-κατάλοιπο για το δάκο . Δεξιά των αμινοξικών ακολουθιών εμφανίζονται οι τιμές πρόβλεψης προσθήκης της GPI άγκυρας με βάση το πρόγραμμα big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 1999).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

είναι πώς θα επηρεαζόταν η πρωτεΐνη σε περίπτωση απάλειψης και των πέντε διαδοχικών καταλοίπων γλουταμίνης. Η *in silico* αξιολόγηση της θεωρητικής αμινοξικής ακολουθίας στο πρόγραμμα big-PI Predictor έδωσε τιμή πρόβλεψης GPI προσθήκης για τη θεωρητική Δ5Q μετάλλαξη σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της πρωτεΐνης αγρίου τύπου (Εικόνα 3-42). Αυτό ενίσχυσε περαιτέρω τον ισχυρισμό ότι η συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου σχετίζεται με την προσθήκη GPI άγκυρας.

Η δυνατότητα προσθήκης GPI άγκυρας στο μετάλλαγμα Δ3Q καθώς επίσης και στο θεωρητικό Δ5Q μελετήθηκε *in vitro* μέσω της έκφρασής τους σε ετερόλογο σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν οι τρεις παραλλαγές της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου (wt, Δ3Q και Δ5Q) στο φορέα έκφρασης pEF-BOS και χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς COS-7. Η ευκαρυωτική κυτταρική σειρά COS έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε παρόμοια πειράματα διαπίστωσης GPI προσθήκης διάφορων οργανισμών (Bon et al., 1988a; 1988b).

Οι κατασκευές δημιουργήθηκαν ως εξής:

Άγριος τύπος (wt): Το cDNA της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου κλωνοποιήθηκε στο ευκαρυωτικό φορέα έκφρασης pEF-BOS ύστερα από κατάτμηση και των δύο με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoR*I και *Kpn*I. Ο εκκινητής ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία δημιουργίας του cDNA περιείχε μία θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoR*I και συνεπώς το cDNA έφερε ανοδικά της θέσης έναρξης της μετάφρασης ATG μία θέση αναγώρισης *EcoR*I. Η κλωνοποίηση του cDNA στον πλασμιδιακό φορέα pBS και η κατάτμησή του με τα ένζυμα *EcoR*I και *Kpn*I, απομόνωσε ολόκληρο το cDNA. Ο φορέας pEF-BOS περιέχει τη θέση αναγνώρισης *EcoR*I ενώ η θέση *Kpn*I δημιουργήθηκε με μεταλλαξιγένεση με τη μέθοδο Kunkel.

Δ3Q: Η έλλειψη των τριών γλουταμινών δημιουργήθηκε με μεταλλαξιγένεση με τη μέθοδο της προέκτασης αλληλοεπικαλυπτώμενων άκρων (overlap extension) με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το cDNA αγρίου τύπου. Το τελικό προϊόν που έφερε τη μετάλλαξη κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pBS και στη συνέχεια με κατάτμηση με τις ενδονουκλεάσες *EcoR*I και *Kpn*I κλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του ευκαρυωτικού φορέα pEF-BOS, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Δ5Q: Η έλλειψη των πέντε γλουταμινών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kunkel χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το cDNA αγρίου τύπου, το οποίο ήταν κλωνοποιημένο στο φορέα pEF-BOS.

Οι κατασκευές ελέχθησαν για την ορθότητα της αλληλουχίας τους με τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξής τους και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων COS.

5.3.1 Ανάλυση ύπαρξης GPI άγκυρας στην εκφραζόμενη πρωτεΐνη με ηλεκτροφόρηση

Η ικανότητα προσθήκης GPI άγκυρας μεταξύ των τριών κατασκευών μελετήθηκε μέσω του προσδιορισμού της ύπαρξης αμφιφιλικών και μη αμφιφιλικών μορφών της ακετυλοχολινεστεράσης στην κάθε κατασκευή. (βλέπε Αποτελέσματα, §5.2.1). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη διαμόλυνση των κυττάρων COS-7 με τις αντίστοιχες κατασκευές κατεργάστηκαν με PIPLC και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Τα τρία εκχυλίσματα παρουσίασαν σχεδόν το ίδιο προφίλ μεταξύ τους είτε ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα που περιείχε μόνο Triton X-100 είτε σε πήκτωμα με Triton X-100 και DOC. Ο προσδιορισμός των μορφών της πρωτεΐνης (Karnovsky & Roots, 1964) κατέδειξε ότι το ένζυμο που παράγεται και στις τρεις περιπτώσεις είναι GPI συνδεόμενο στη μεμβράνη των κυττάρων και ότι η παρουσία PIPLC επάγει τη δημιουργία μη αμφιφιλικών G_2^{na} παραγώγων. Η διαφορά των αμφιφιλικών και μη αμφιφιλικών μορφών μεταξύ των τριών κατασκευών ήταν πάρα πολύ μικρή έως καθόλου διακριτή. Εντούτοις, παραμένει η αμφιβολία της καταλληλότητας των κυττάρων COS για τη μελέτη της προσθήκης GPI άγκυρας στα έντομα. Ίσως ένα σύστημα κυττάρων εντόμων να προσέγγιζε με μεγαλύτερη πιστότητα την πραγματικότητα. Η

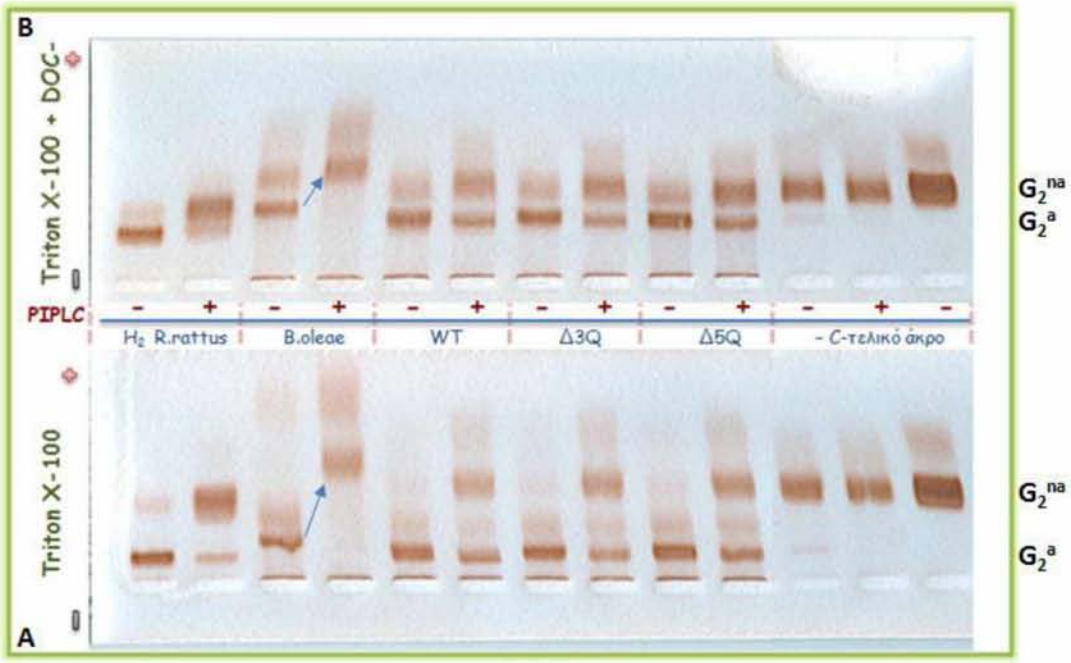
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

αμφιβολία αυτή ενισχύεται επίσης και από τη σύγκριση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τον εγκέφαλο του εντόμου και του εκχυλίσματος από τη διαμόλυνση των κυττάρων. Η μετατροπή των αμφιφιλικών μορφών της ακετυλοχολινεστεράσης στη μη αμφιφιλική μορφή ήταν πλήρης στο εκχύλισμα του εγκεφάλου, ενώ ένα ποσοστό των αμφιφιλικών μορφών της ακετυλοχολινεστεράσης που παράχθηκε από τα κύτταρα COS παρέμεινε άθικτο (Εικόνα 3-43).

5.3.2 Κινητική των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

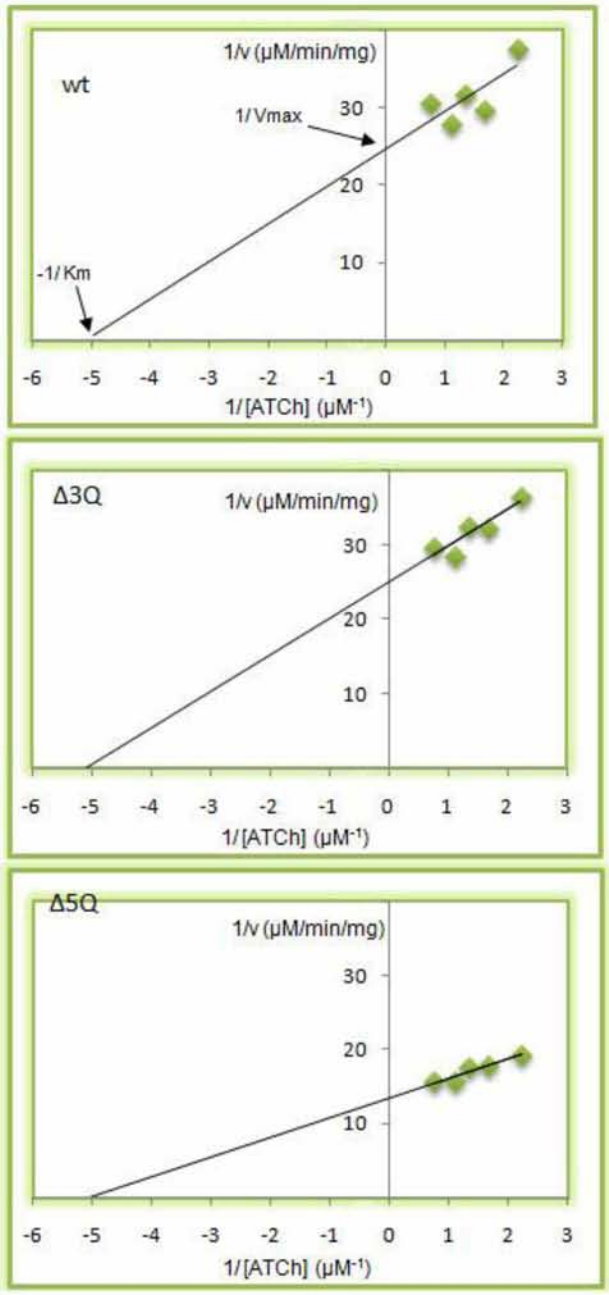
Σύμφωνα με την εξελικτική υπόθεση του Clarke (1975) και των Eanes & Koehn (1978), οι βιοχημικές ιδιότητες των ενζύμων που καθορίζονται από διαφορετικούς γενοτύπους βρίσκονται σε άμεση σχέση με την προσαρμογή των γενοτύπων αυτών στο περιβάλλον. Με βάση την παραπάνω υπόθεση μελετήθηκαν οι βιοχημικές ιδιότητες των τριών εναλλακτικών μορφών της ακετυλοχολινεστεράσης ώστε να διευκρινιστεί εάν η διαφορετική προσαρμογή που παρουσιάζουν στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα συνοδεύεται με διαφορά στις κινητικές τους παραμέτρους. Οι λειτουργικές ιδιότητες του ενζύμου έχουν εκτενώς μελετηθεί σε αρκετά είδη όπως στη *Drosophila melanogaster* και *Bactrocera dorsalis* (Fournier et al., 1989; Hsu et al., 2004).

Η κινητική μελέτη των τριών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (wt, Δ3Q, Δ5Q) του δάκου πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (με τη χρωμομετρική μέθοδο Ellman et al., 1961) ανά τακτά χρονικά διαστήματα



Εικόνα 3-43: Ηλεκτροφορητικό πρότυπο της επίδρασης της PIPLC στην ακετυλοχολινεστεράση του δάκου και στην ακετυλοχολινεστεράση που απομονώθηκε από τη διαμόλυνση των COS κυττάρων με τις τρεις κατασκευές (wt, Δ3Q, Δ5Q). Το ένζυμο του δάκου απομονώθηκε από τον εγκέφαλο, ενώ το ένζυμο των τριών κατασκευών εμπεριέχεται στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία Triton X-100 (A) και παρουσία Triton X-100 και DOC (B) ύστερα από κατεργασία τους με PIPLC. Ο προσδιορισμός των διάφορων μορφών του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με την ιστοχημική μέθοδο Karnovsky & Roots (1964). Η σύγκριση της μετανάστευσης του μη και του κατεργασμένου με PIPLC ενζύμου που παρατηρείται στα δύο πηκτώματα κατέδειξε την ύπαρξη του αμφιφιλικού και του μη αμφιφιλικού χαρακτήρα της πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας τη γλυκολιπιδιακή φύση της υδροφοβικής περιοχής της πρωτεΐνης. Η αμφιφιλική μορφή (G_2^a) μεταναστεύει πιο αργά παρουσία των απορρυπαντικών, διότι τα μικκύλια αλληλεπιδρούν με τη GPI άγκυρα. Παρόλο που η πρωτεΐνη του εγκεφάλου μετατρέπεται 100% σε μη αμφιφιλική μορφή (G_2^a), δεν συμβαίνει το ίδιο και με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κατασκευών, υποδεικνύοντας ότι το ευκαρυωτικό σύστημα των COS κυττάρων δεν είναι το πλέον αποτελεσματικό για τη μελέτη της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Ως κοντρόλ χρησιμοποιήθηκε η H_2 μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης του αρουραίου.Τα βέλη δείχνουν τη αρχή της μετανάστευσης και ο προσανατολισμος από αρνητικό σε θετικό υποδεικνύεται με το – και +.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 3 - 44: Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών των τριών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (wt, Δ3Q, Δ5Q).

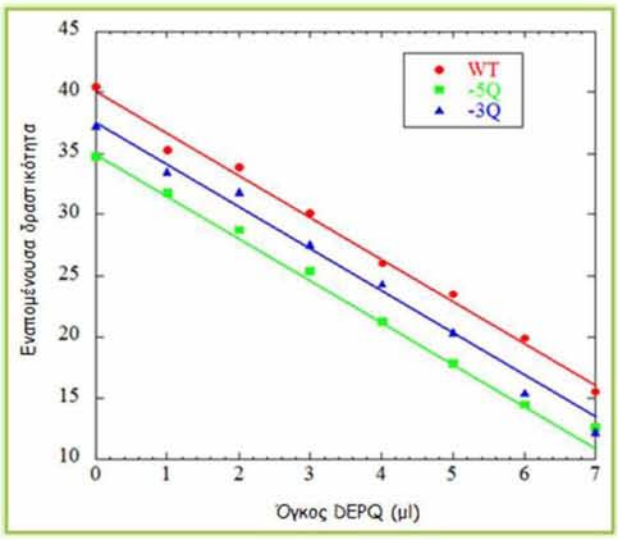
και την επεξεργασία τους σε χρονοκαμπύλες. Η αντίδραση του κάθε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με το υπόστρωμα ιωδιούχο ακετυλοθειοχολίνη (ATChI) παρακολουθήθηκε για διάστημα 15 λεπτών, ώστε να σχεδιαστεί η καμπύλη χρόνου από 1 έως 15 λεπτά. Με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης σχεδιάστηκαν οι αρχικές χρονοκαμπύλες και τα αρχικά ποσοστά χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της καμπύλης του διπλού αντιστρόφου. Η γραμμικότητα της καμπύλης υποδεικνύει ότι η ακετυλοχολινεστεράση του δάκου παρουσιάζει κινητική κατά Michaelis-Menten. Οι φαινομενικές τιμές των σταθερών app-Km, app-Vmax και app-Kcat της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου για τις τρεις διαφορετικές μορφές προσδιορίστηκαν από τρεις ανεξάρτητες σειρές.

Η σταθερά Km προσδιορίζει τη συγγένεια ενός ενζύμου για ένα ειδικό υπόστρωμα. Χαμηλή τιμή της σταθεράς Km αντιπροσωπεύει υψηλή συγγένεια ενώ υψηλή τιμή της Km αντιπροσωπεύει χαμηλή συγγένεια. Οι τιμές της σταθεράς app-Km των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των τριών διαφορετικών γενοτύπων (wt, Δ3Q, Δ5Q) εξήχθησαν γραφικά από την ευθεία του διπλού αντιστρόφου των Lineweaver-Burk με κάθε τιμή να αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των τριών επαναλήψεων της ενζυμικής δραστικότητας. Η Km παρουσίασε την ίδια φαινομενική τιμή (app-Km) και για τα τρία εκχυλίσματα, υποδεικνύοντας ότι τα τρία ένζυμα παρουσιάζουν την ίδια αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (Εικόνα 3-44).

Ο αριθμός ανακύκλησης (Kcat) αντιπροσωπεύει τον αριθμό των moles του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν από κάθε ενεργή περιοχή του ενζύμου στη μονάδα του χρόνου. Με μία διαφορετική προσέγγιση, η Kcat αντιπροσωπεύει τον αριθμό επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη στη μονάδα του χρόνου. Έτσι, υψηλή Kcat καταδεικνύει τη δυναμική του ενζύμου να λειτουργεί με ταχύτερο ρυθμό ανά μονάδα ενζυμικής δραστικότητας. Η φαινομενική kcat (app-Kcat) προσδιορίστηκε με κατεργασία των τριών διαφορετικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με DEPQ, το οποίο παρουσιάζει την ικανότητα να δεσμεύεται με την ακετυλοχολιν-εστεράση. Μάλιστα η αντίδραση είναι γραμμική, δηλαδή ένα μόριο DEPQ δεσμεύεται σε ένα μόριο ακετυλοχολινεστεράσης. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κατεργάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις DEPQ και μετά από ίσο χρονικό διάστημα μετρήθηκε η δραστικότητα του ενζύμου με τη χρωματομετρική μέθοδο Ellman (1961). Η μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας κατέδειξε ότι ο αριθμός ανακύκλησης παραμένει σταθερός στις τρεις εναλλακτικές μορφές του ενζύμου (wt, Δ3Q, Δ5Q) (Εικόνα 3-45). Το γεγονός ότι και οι τρεις αυτές καμπύλες τιτλοδότησης παριστάνονται από τρεις παράλληλες γραμμές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

καταδεικνύει ότι οι ρυθμοί ανακύκλησης (που αντιπροσωπεύονται από τις κλίσεις των παράλληλων γραμμών) είναι ταυτόσημοι.



Εικόνα 3-45: Γραφική παράσταση της εναπομένουσας δραστικότητας των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των τριών κατασκευών (wt, Δ3Q, Δ5Q) ύστερα από αναστολή τους με διαφορετικές συγκεντρώσεις DEPQ. Το ότι οι γραμμές είναι παράλληλες υποδεικνύει τον ίδιο συντελεστή Kcat μεταξύ των τοιών κατασκευών

Η τιμή Vmax προσδιορίζει τη μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης, η οποία επιτυγχάνεται όταν τα ενεργά κέντρα όλων των ενζύμων είναι κορεσμένα με υπόστρωμα. Διαφορά της Vmax ανάμεσα σε δύο εκχυλίσματα καταδεικνύει ότι υπάρχει διαφορά στα μόρια ενζύμου που περιέχει το κάθε εκχύλισμα. Η φαινομενική Vmax (app-Vmax) των τριών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε από την ευθεία του διπλού αντιστρόφου των Lineweaver-Burk. Η app-Vmax παρουσίασε μία μικρή διαφορά (στατιστικά μη σημαντική) μεταξύ wt και Δ3Q εκχυλίσματος, ενώ το πρωτεϊνικό εκχύλισμα Δ5Q παρουσίασε τη διπλάσια τιμή (Εικόνα 3-44).

Οι ταυτόσημες τιμές των app-Km και app-Kcat των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ήταν αναμενόμενες καθώς η μετάλλαξη δεν εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι κινητικές παράμετροι app-Km και app-Kcat αφορούν στην ικανότητα κατάλυσης της πρωτεΐνης. Η έλλειψη των τριών γλουταμινών ή η υποθετική έλλειψη των πέντε γλουταμινών βρίσκεται στην υδρόφοβη περιοχή που αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη, επομένως κάθε σχέση αυτών με μεταβολή της καταλυτικής λειτουργίας του ενζύμου θα ήταν απρόσμενη. Αντίθετα, η ολική δραστικότητα των τριών εκχυλισμάτων (app-Vmax) ήταν διαφορετική, παρά το ότι παρουσίασαν την ίδια δραστικότητα ανά ενεργό μόριο (app-Kcat). Παρόλο που η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες και για τις τρεις κατασκευές (ίδιος φορέας έκφρασης, ίδια ποσότητα DNA, ίδιος αριθμός κυττάρων) ο αριθμός των ενεργών μορίων που παράχθηκε για κάθε μία από αυτές από το σύστημα των COS κυττάρων ήταν διαφορετικός. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι τα τρία πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν διαφορές στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή/και στη σταθερότητα και αποδόμηση της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, η παρουσία της νέας μετάλλαξης Δ3Q όντως επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Εδώ και χιλιετίες, το κατ' εξοχήν δέντρο του μεσογειακού χώρου, η ελιά, συνυπάρχει με τους λαούς της Μεσογείου, έχει συνδεθεί με την καθημερινότητα και τις συνήθειές τους και, έχοντας ξεπεράσει τα όρια του τοπίου, έχει αφήσει τα ίχνη της σε όλους τους πολιτισμούς που αναπτύχθηκαν στα παράλια της.

Σήμερα, καλλιεργούνται σε παγκόσμια κλίμακα περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα, καταλαμβάνοντας έκταση 80 εκ. στρεμμάτων. Οι παραμεσόγειες περιοχές κρατούν τα πρωτεία με το 98% της καλλιεργούμενης έκτασης. Το δέντρο αποτελεί την κύρια δενδροκομική καλλιέργεια της Ελλάδας και βασικό στοιχείο της διατροφής του πληθυσμού της.

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το κυριότερο παράσιτο της ελαιοκαλλιέργειας. Κάθε χρόνο προκαλεί σημαντική οικονομική ζημία στην ελαιοπαραγωγή, τόσο με την υποβάθμιση των ελαιοκομικών προϊόντων, ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές, όσο και με το κόστος πρόληψης των δακοπροσβολών με τη συστηματική δακοκτονία κάθε έτος. Η ποσοτική μείωση της ελαιοπαραγωγής λόγω του εντόμου, μπορεί να φτάσει έως 30%, ενώ η ποιοτική υποβάθμιση είναι ανυπολόγιστη (Montiel-Bueno & Jones, 2002). Ο έλεγχος των πληθυσμών του δάκου βασίζεται ακόμη και σήμερα σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Η επί δεκαετιών όμως αλόγιστη και συνεχής χρήση τους, πέρα από τις επιπτώσεις στο περιβάλλον και γενικά στο οικοσύστημα, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία και εξάπλωση της ανθεκτικότητας του δάκου σε αυτά.

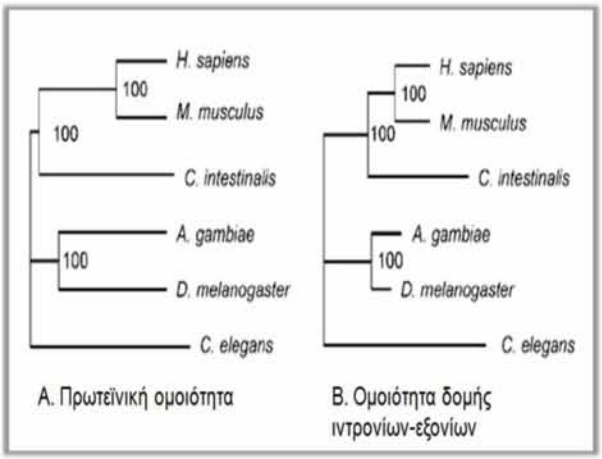
Η αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών ουσιών στον οργανισμό του εντόμου πραγματοποιείται από διάφορα ενζυμικά συστήματα. Η αυξημένη ικανότητα των συστημάτων αυτών να αποικοδομούν τα εντομοκτόνα ή η δομική μεταβολή των στόχων όπου δρουν αυτά, αποτελούν τους κυριότερους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα αφορά στη δομική μεταβολή του μορίου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), η οποία αποτελεί στόχο δράσης της ομάδας των OP εντομοκτόνων. Ο ρόλος και η εμπλοκή του γονιδίου στην πίεση επιλογής των εντομοκτόνων και την εμφανιζόμενη ανθεκτικότητα των πληθυσμών του εντόμου καθόρισε τη βασική κατεύθυνση της παρούσας μελέτης στην κλωνοποίηση του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης. Η ακετυλοχολινεστεράση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, σπονδυλωτών και ασπόνδυλων. Ο κύριος ρόλος της συνίσταται στη ρύθμιση της συγκέντρωσης της ακετυλοχολίνης στη συναπτική σχισμή κατά τη μεταβίβαση του νευρικού σήματος. Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με τη δραστική θέση της ακετυλοχολινεστεράσης, προκαλώντας την αδρανοποίηση (μη αντιστρεπτά) του ενζύμου μετά από σχετική φωσφορυλίωση.

1. Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ ΤΗΣ ACHE ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η απομόνωση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης πραγματοποιήθηκε με διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης λ-DASH®II δάκου και με πειράματα αντίδρασης PCR (μεγάλου μήκους και ανάστροφης PCR). Η γονιδιωματική οργάνωση της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως προκύπτει από τη δομική ανάλυση των βακτηριοφαγικών κλώνων και των προϊόντων PCR, αποκάλυψε ότι το γονίδιο καταλαμβάνει περιοχή μεγαλύτερη των 60 kb, χωρίς να έχει προσδιοριστεί το μέγεθος του πρώτου και του πέμπτου ιντρονίου. Ο χαρακτηρισμός του αντίστοιχου γονιδιακού τόπου στη *Drosophila melanogaster* κατέδειξε ότι τα ιντρόνια αυτά αποτελούν τα μεγαλύτερα ιντρόνια του γονιδίου, με μέγεθος 11,648 και 5,019 bp, αντίστοιχα. Τα ιντρόνια του δάκου παρουσιάζουν πολλαπλάσιο μέγεθος από τα ιντρόνια της *D. melanogaster,* με χαρακτηριστικό παράδειγμα το όγδοο ιντρόνιο, όπου στη *D. melanogaster* είναι μόλις 118 bp ενώ στο δάκο έχει προσδιοριστεί περίπου 8,000 bp. Εάν αναλογιστεί κανείς τη διαφορά που παρουσιάζουν στο μέγεθος και αν υποθέσει ότι το πρώτο και το πέμπτο ιντρόνιο στο δάκο θα έχουν εάν όχι μεγαλύτερο, ίσο μέγεθος με τα αντίστοιχα της *D. melanogaster*, ο γονιδιακός τόπος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου θα πρέπει να εκτείνεται σε περιοχή τουλάχιστον 75 kb.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Το πρώτο ιντρόνιο εμφανίζει μεγάλο μέγεθος και στο έντομο *Aedes aegypti* (114,350 bp) ενώ ολόκληρος ο γονιδιακός του τόπος είναι περίπου 137 kb. Η διαφορά αυτή στο μέγεθος του γονιδιακού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης αναμφίβολα αντικατοπτρίζει την ολική διαφορά στην οργάνωση του γονιδιώματος των ειδών. Το μέγεθος του γονιδιώματος της *D. melanogaster* παρουσιάζει τιμή C 0.16 (~ 1.4 x 10^8 bp) του δάκου 0.55 (~ 5.4 x 10^8 bp) και του *Aedes aegypti* 0.83 (~ 8.1 x 10^8 bp). Γεγονός που υποδεικνύει τη συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους των ιντρονίων και του μεγέθους του γονιδιώματος. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από τα ως τώρα ευρήματα σε πολλά σπονδυλωτά και ασπόνδυλα είδη, σύμφωνα με τα οποία το μέγεθος και ο αριθμός των ιντρονίων συμβαδίζει με το μέγεθος του γονιδιώματος (Vinogradov, 1999). Εξάλλου, πρώτα στα έντομα, οι Lengyel και Penman κατέδειξαν ότι το μέγεθος του hnRNA (heterogeneous nuclear RNA), αλλά όχι του ώριμου mRNA, αυξάνεται καθώς αυξάνεται το μέγεθος του γονιδιώματος στα Δίπτερα. Η παρατήρηση αυτή, πολύ πριν την ανακάλυψη των ιντρονίων το 1977, αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη της θετικής συσχέτισης μεταξύ του γονιδιώματος και του μήκος των ιντρονίων (Lengyel & Penman, 1975).



Εικόνα 4-1: Δενδρόγραμμα (NJ μέθοδος) Α. της πρωτεινικής ομοιότητας και Β. της αντίστοιχης ομοιότητας της δομής ιντρονίων εξονίων.

Η πρωτεϊνική ομοιότητα που εμφανίζει η ακετυλοχολινεστεράση του δάκου με την αντίστοιχη άλλων εντόμων, όπως *της D. melanogaster* (78%) και της *L. cuprina* (85%), καθόρισε την οργάνωση του γονιδιακού της τόπου. Σύμφωνα με τη μελέτη των Yandell et al. (2006), οι οποίοι ασχολήθηκαν με την εξέλιξη της δομής ίδιων γονιδίων σε διάφορους οργανισμούς, η πρωτεϊνική ομοιότητα ενός γονιδίου ακολουθείται από ομοιότητα στη δομή ιντρονίων-εξονίων (Εικόνα 4-1). Η ανάλυση του γονιδιώματος 11 οργανισμών κατέδειξε ότι η εξέλιξη του μεγέθους και κυρίως της θέσης των ιντρονίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εξέλιξη της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. Έτσι, με βάση τα παραπάνω ο γονιδιακός τόπος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου θεωρήθηκε ότι παρουσιάζει ίδιο πρότυπο με τα αντίστοιχα γονίδια σε άλλα ασπόνδυλα όπως τη *D. melanogaster* και τη *L.cuprina*.

Η προτεινόμενη γονιδιωματική οργάνωση της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου χαρακτηρίζεται από δέκα εξόνια και εννέα ιντρόνια. Η ύπαρξη ενός τέτοιου αριθμού εξονίων και ιντρονίων ίσως χαρακτηρίζει την εξέλιξη της πρωτεΐνης και αποτελεί ένδειξη ανακατάταξης εξονίων, που πραγματοποιήθηκε κατά την εξέλιξή της. Η ακετυλοχολινεστεράση ανήκει στην οικογένεια α/β υδρολασών, η οποία περιέχει διάφορα μέλη όπως χολινεστεράσες και εστεράσες (Cygler et al., 1993). Θεωρείται ότι γενετικές διαδικασίες όπως ανακατάταξη γονιδίων, διπλασιασμός γονιδίων και μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση αυτών των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Maeda & Smithies, 1986). Η δομική οργάνωση γονιδίων πολλαπλής λειτουργικότητας, έτσι ώστε η κάθε λειτουργική περιοχή να κωδικοποιείται από διαφορετικό εξόνιο, πιστεύεται ότι αποδείχτηκε εξελικτικά ωφέλιμη, γιατί νέοι συνδυασμοί εξονίων θα μπορούσαν να δώσουν νέους συνεργατικούς συνδυασμούς (Gilbert, 1978). Για παράδειγμα, υδροφοβικές περιοχές οι οποίες είναι υπεύθυνες για την τοποθέτηση του μορίου συχνά εντοπίζονται σε ξεχωριστά εξόνια.

Παρόλο που το μέγεθος των ιντρονίων είναι διαφορετικό, παρατηρείται η συντήρηση της τοπολογίας τους μεταξύ της *D. melanogaster* και του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

δάκου καθώς και η διατήρηση των σημείων ένθεσης και η φάση τους. Το μέγεθος των ιντρονίων κυμαίνεται από 137 bp έως 12 kb. Οι αλληλουχίες μετάπτωσης εξονίου-ιντρονίου αντανακλούν στα συντηρημένα GT-AG άκρα. Όλα τα σημεία δηλαδή γειτνίασης ιντρονιακών τμημάτων και εξονίων παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική για τη *D. melanogaster* συντηρημένη αλληλουχία, που συμφωνεί με την αντίστοιχη για τους σπονδυλωτούς οργανισμούς. Επιπλέον, όλα τα ιντρόνια ακολουθούν την προτεινόμενη αλληλουχία διακλάδωσης YTNAN των Keller & Noon (1985) και παρουσιάζουν μία πλούσια σε πυριμιδίνες – σχετιζόμενη με το 3΄σημείο αποκοπής τους - περιοχή, κατ' αναλογία προς τα ιντρόνια των γονιδίων των θηλαστικών.

Το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στη μέση του εξονίου 2, ενώ το υπόλοιπο εξόνιο μαζί με το πρώτο εξόνιο αποτελεί την 5΄ UTR του γονιδίου. Στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης όλων των μέχρι σήμερα μελετημένων οργανισμών, το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στο δεύτερο εξόνιο και η θέση του πρώτου ιντρονίου είναι εξαιρετικά συντηρημένη, αφού πάντα εκτείνεται ανάμεσα στην 5΄ UTR και στην αρχή της κωδικής αλληλουχίας. Οι UTR περιοχές είναι γνωστό ότι περιέχουν ιντρόνια είτε αρκετά σε αριθμό είτε μεγάλα σε μέγεθος (Pesole et al., 2001). Η 5΄ UTR είναι σημαντική δομική και ρυθμιστική περιοχή των ευκαρυωτικών γονιδίων (Ptashne & Gann 2001; Larizza et al, 2002). Έχει προταθεί ότι τα ιντρόνια σε αυτή τη περιοχή είναι μεγάλα λόγω της πιθανότητας να φιλοξενούν ρυθμιστικά στοιχεία (Duret, 2001), συσχετίζοντάς τα με αυτόν τον τρόπο με την εξέλιξη της πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικό του μεγέθους του πρώτου ιντρονίου είναι το γεγονός ότι το 33% των ιντρονικών βάσεων της *D. melanogaster* βρίσκεται στις 5΄ UTR (Hong et al., 2006). Το πρώτο ιντρόνιο είναι σχεδόν δύο φορές μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα ιντρόνια σε σπονδυλωτά και στη *D. melanogaster* (Duret, 2001). Επιπλέον, το μέγεθός του σχετίζεται με το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ιντρόνια του γονιδίου (Marais et al., 2005). Γενικά, το σύνολο των ιντρονίων ενός γονιδίου της *D. melanogaster* δεν σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασής του, όπως αναφέρθηκε για άλλους ευκαρυώτες (Castillo-Davis et al., 2002) αλλά μεμονωμένα το πρώτο ιντρόνιο της 5΄ UTR παρουσιάζει σχετική συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης. [Αυτό όμως δεν συμβαίνει και με τον άνθρωπο όπου το πρώτο ιντρόνιο είναι μικρότερο σε γονίδια ευρείας έκφρασης από ότι περιορισμένης έκφρασης (Comerón, 2004)]. Αναλογιζόμενοι την ομοιότητα του δάκου και της *D. melanogaster* καθώς και το ότι η ακετυλοχολινεστεράση αποτελεί ένζυμο υψηλής έκφρασης, είναι λογικό το πρώτο ιντρόνιο να παρουσιάζει μεγάλο μέγεθος, γεγονός που δυσκολεύει την απομόνωση του.

Τα εξόνια 3 έως 9 της πρωτεΐνης του δάκου, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί πλήρως, παρουσιάζουν ακριβώς το ίδιο μέγεθος με τα αντίστοιχα της *D. melanogaster* αναδεικνύοντας την υψηλή εξελικτική συντήρησή τους. Μάλιστα, η κωδικοποιούσα περιοχή διατηρεί τα υψηλότερα ποσοστά ταυτότητας με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων ειδών ενώ η περιοχή των μη μεταφραζόμενων εξονίων (το πρώτο εξόνιο και μέρος του δεύτερου) είναι λιγότερο συντηρημένη. Οι μη μεταφραζόμενες περιοχές είναι λογικό να απέχουν μεταξύ των ειδών, καθώς οι περισσότερες από τις αλλαγές που συμβαίνουν σε αυτές δεν επηρεάζουν την πρωτεΐνη σε τέτοιο βαθμό που ο οργανισμός να προσπαθεί να τις διατηρήσει αμετάβλητες. Επίσης, μεγάλη ανομοιογένεια παρουσιάζει και το τελευταίο εξόνιο του ενζύμου, το οποίο είναι υπεύθυνο για τις διαφορετικές μορφές της ακετυλοχολινεστεράσης. Ακόμη και οργανισμοί με την ίδια μορφή ενζύμου, παρουσιάζουν διαφορετική αμινοξική αλληλουχία. Η ακετυλοχολινεστεράση του δάκου και της *D. melanogaster* εμφανίζει την ίδια μορφή (H_2) χωρίς όμως να παρουσιάζει και την ίδια αμινοξική αλληλουχία στο πεπτίδιο που είναι υπεύθυνο για αυτήν. Η ομολογία μεταξύ τους είναι μόλις 21% όταν η ομολογία της υπόλοιπης πρωτεΐνης υπολογίζεται περίπου 87%.

2. ΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ ΤΗΣ AChE

Η ανάλυση της πρωτεΐνης αποκάλυψε την ύπαρξη: α) ενός εκκριτικού πεπτιδίου στο αμινοτελικό άκρο, γεγονός που τη συνδέει με την εξωκυττάρια λειτουργία της, β) ενός υδροφιλικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

πεπτιδίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των δύο υπομονάδων, γ) την καταλυτική περιοχή και δ) μία υδρόφοβη περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο που υφίσταται μετα-μεταφραστική τροποποίηση και αντικαθίσταται με γλυκοζυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτολική άγκυρα (GPI). Η ακετυλοχολινεστεράση οδηγείται μέσω του εκκριτικού πεπτιδίου, το οποίο συναντάται στη πρωτεΐνη όλων των οργανισμών, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αντίθετα, το υδροφιλικό πεπτίδιο εντοπίζεται μόνο στην πρωτεΐνη των εντόμων. Μάλιστα, η ομοπαράθεση της πρωτεΐνης εντόμων και σπονδυλωτών αποκάλυψε ότι πρόκειται για μια ένθεση στα έντομα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-2, μεταξύ του εκκριτικού πεπτιδίου και της καταλυτικής περιοχής. Η GPI άγκυρα είναι υπεύθυνη για τον σωστό εντοπισμό της πρωτεΐνης στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης.

Ο διαθέσιμος cDNA κλώνος της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου μελετήθηκε επίσης ως προς τα βασικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης. Το πρόδρομο ένζυμο του δάκου παρουσιάζει θεωρητικό μοριακό βάρος 74,604.4 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο 5.97. Παρόμοιες τιμές παρουσιάζει και η ακετυλοχολινεστεράση της *D. melanogaster,* άλλων εντόμων (*C. capitata*, *A. gambiae*) καθώς όμως και του ανθρώπου και του *Torpedo*, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την υψηλή συντήρηση του ενζύμου. Από την ανάλυση της αμινοξικής ακολουθίας αναγνωρίστηκε επιπλέον ο ρόλος των 8 κυστεϊνών του ενζύμου και προέκυψαν οι δυνητικές, βιολογικά σημαντικές θέσεις, γλυκοσυλίωσης και φωσφορυλίωσης. Η πρωτεΐνη εμφανίζει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των κυστεϊνών 121 και 148, 344 και 359, και 494 και 612, ενώ οι κυστεΐνες 342 και 629 χαρακτηρίζονται ελεύθερες, με την κυστεΐνη 629 να συμμετέχει στο σχηματισμό του ώριμου διμερούς ενζύμου. Η συντήρηση των δισουλφιδικών γεφυρών ως προς τη θέση αλλά και ως προς τον αριθμό των αμινοξέων που εμπεριέχονται στο βρόχο μεταξύ των διάφορων οργανισμών (*Drosophila*, *Homo*, *Torpedo*) υποδεικνύει το βασικό ρόλο που κατέχουν στη σταθεροποίηση και αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Η ακετυλοχολινεστεράση πρέπει να παρουσιάζει την ίδια ακριβώς πτύχωση στο δάκο όπως και στους υπόλοιπους οργανισμούς. Οι 4 δυνητικές θέσεις γλυκοσυλίωσης (CHO) βρίσκονται στις ασπαραγίνες των αμινοξικών θέσεων 143, 189, 345 και 545. Οι υδατάνθρακες των γλυκοπρωτεϊνών γενικά παίζουν σπουδαίο ρόλο στη μοριακή στόχευση και στην αναγνώριση κυττάρου από κύτταρο και συνδέονται είτε με το οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας

Εικόνα 4-2: Ομοπαράθεση τμήματος της ακετυλοχολινεστεράσης εντόμων (*B. oleae, D. melanogaster, L. cuprina)* και σπονδυλωτών (*H.sapiens, M. musculus, T. californca*). Χαρακτηριστική είναι η ένθεση που εμφανίζεται μόνο στα έντομα και αντιστοιχεί στο υδροφιλικό πεπίδιο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

καταλοίπων θρεονίνης ή σερίνης, είτε με το άζωτο καταλοίπων ασπαραγίνης (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Διάσπαρτες σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης υπάρχουν 31 δυνητικές θέσεις φωσφορυλίωσης (P) εκ των οποίων οι δέκα αφορούν φωσφορυλίωση από την κινάση C ενώ οι υπόλοιπες 21 αφορούν φωσφορυλίωση από την κινάση II της καζεΐνης. Γενικότερα, η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών γίνεται στα υδροξυαμινοξέα σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη και προκαλεί αλλαγές στη δραστικότητα των ενζύμων, ενώ αφαίρεση των φωσφορικών ομάδων από τις φωσφοπρωτεΐνες, τις καθιστούν ρυθμιστές των κυτταρικών διαδικασιών (Karplus, 1986). Η διατήρηση των θέσεων των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθώς και των δισουλφιδικών γεφυρών μεταξύ του δάκου και της *Drosophila* (και όχι μόνο) αποτελεί μία επιπλέον ένδειξη της υψηλής συντήρησης του ενζύμου. Τέλος, η υψηλή συντήρηση του ενζύμου διαφαίνεται από τη μελέτη της συχνότητας χρήσης των κωδικονίων (codon usage). Η πρωτεΐνη ακολουθεί το πρότυπο χρήσης των κωδικονίων του δάκου καθώς και το πρότυπο επιλογής των κωδικονίων των εντόμων για την ακετυλοχολινεστεράση.

Γενικά, σήμερα είναι αποδεκτό ότι η ακετυλοχολινεστεράση αποτελεί ένα από τα πιο συντηρημένα γονίδια. Η πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών αντιπροσωπευτικών οργανισμών, από έντομο έως άνθρωπο, αποκάλυψε την ύπαρξη σημαντικής ομολογίας, υποδεικνύοντας ένα υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης του ενζύμου. Μάλιστα, η σύγκριση των τμημάτων του ενζύμου που αντιπροσωπεύουν τις διάφορες περιοχές με τα αντίστοιχα άλλων οργανισμών έδειξε πως η εξελικτική συντήρηση της καταλυτικής περιοχής είναι μεγάλη, σε αντίθεση με το εκκριτικό πεπτίδιο και το καρβοξυτελικό άκρο. Είναι φανερό πως ο ρυθμός εξέλιξης είναι διαφορετικός για τις υποπεριοχές του ενζύμου, κατά τρόπο που ερμηνεύεται βάσει του ξεχωριστού λειτουργικού τους ρόλου. Ιδιαίτερα η συντήρηση αμινοξέων (ο ρόλος των οποίων, στη δράση του μορίου, έχει αποδειχθεί πειραματικά), ανάμεσα σε απομακρυσμένα είδη, υποδηλώνει την αναγκαιότητα της παρουσίας τους για τη δομή και τη λειτουργικότητα του ενζύμου. Το ιδιαίτερο υψηλό ποσοστό ταυτότητας μεταξύ των ακολουθιών των ειδών (οι πιο απομακρυσμένοι φυλογενετικά οργανισμοί παρουσιάζουν τουλάχιστον 30% ομολογία του συγκεκριμένου γονιδίου) φανερώνει περιορισμούς στην απόκλιση των ακολουθιών κατά την πορεία της εξέλιξης, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντική βιολογική λειτουργία του ενζύμου στον οργανισμό και την ανάγκη διατήρησής της.

3. Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ Δ3Q

Η διακύμανση στα επίπεδα ανθεκτικότητας που παρουσίασαν φυσικοί πληθυσμοί δάκου και η αναντίστοιχη σταθερότητα των συχνοτήτων των δύο μεταλλάξεων I214V και G488S, που είναι γνωστό ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Vontas et al., 2002), οδήγησε στην ανακάλυψη μίας νέας μετάλλαξης. Η διαφορά των επιπέδων ανθεκτικότητας των πληθυσμών δάκου στο dimethoate αποδόθηκε κυρίως στη διαφορετική πίεση επιλογής της εφαρμογής εντομοκτόνων μεταξύ των πληθυσμών από διάφορες περιοχές. Πληθυσμοί δάκου από περιοχές όπου καταγράφεται έντονη χρήση εντομοκτόνων παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας συγκρινόμενοι με πληθυσμούς περιοχών, όπου πραγματοποιείται μικρότερη εφαρμογή εντομοκτόνων. Εάν οι δύο γνωστές μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ήταν οι μοναδικοί παράγοντες που συμμετείχαν στην αυξημένη ανθεκτικότητα, κάποιος θα περίμενε ότι η συχνότητά τους σε έναν φυσικό πληθυσμό θα ήταν συνάρτηση των επιπέδων ανθεκτικότητας των πληθυσμών. Παρόλα αυτά, οι συχνότητες των μεταλλάξεων I214V και G488S μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών ατόμων δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση. Η πλειονότητα των ατόμων που εξετάστηκε ήταν ομοζυγωτικά ως προς την ύπαρξη των δύο μεταλλάξεων, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ συχνότητας μεταλλάξεων και διαφορετικών επιπέδων ανθεκτικότητας. Οι δύο αυτές μεταλλάξεις ναι μεν είναι απαραίτητες για την εμφάνιση ανθεκτικότητας αλλά δεν είναι υπεύθυνες για την αύξηση της ανθεκτικότητας σε υψηλά επίπεδα. Συνεπώς, πρέπει να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συνεισφέρουν στη διακύμανση της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ανθεκτικότητας, όπως νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης ή η εμπλοκή άλλων γενετικών τόπων (αποτοξινωτικά ένζυμα).

Η διερεύνηση για νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης αρχικά εστιάστηκε στο ενεργό κέντρο. Θα ήταν λογικό μία νέα μετάλλαξη, η οποία σχετίζεται με ανθεκτικότητα, να τροποποιεί τις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα. Παρόλα αυτά οι μεταλλάξεις που προσδιορίστηκαν στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου αντιπροσώπευαν μόνο σημειακές σιωπηλές αντικαταστάσεις. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι ο έλεγχος του δάκου με OP εντομοκτόνα τα τελευταία 40 χρόνια επιτελείται με τη χρήση δύο μόνο σκευασμάτων: fenthion και dimethoate. Επομένως, ίσως οι δύο αυτές μεταλλάξεις είναι ο καλύτερος συνδυασμός χαμηλού γενετικού κόστους (fitness cost) και υψηλότερης ανθεκτικότητας στα δύο εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των πληθυσμών του δάκου. Ο μεγαλύτερος αριθμός μεταλλάξεων του ενεργού κέντρου που συναντάται σε άλλα έντομα ίσως να οφείλεται στην έκθεσή τους σε μεγαλύτερη ποικιλία οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Πράγματι, η *in vitro* έκφραση πρωτεϊνών, οι οποίες έφεραν αρκετές μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο, κατέδειξε ότι οδηγούν σε αύξηση της ανθεκτικότητα, προσδίδοντας επιπλέον ανθεκτικότητα σε μεγαλύτερο εύρος εντομοκτόνων (Menozzi et al., 2004). Εναλλακτικά, η ύπαρξη μόνο δύο μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, της I214V και G488S, θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι το ενεργό κέντρο είναι ήδη κορεσμένο με τις δύο αυτές μεταλλάξεις και πιθανόν νέες μεταλλάξεις να επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου ή να αυξάνει το γενετικό κόστος για το έντομο.

Τουλάχιστον 14 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί να εδρεύουν εσωτερικά ή γύρω από το ενεργό κέντρο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης και να προσδίδουν ανθεκτικότητα (Fournier, 2005). Οι περισσότερες από αυτές είναι συντηρημένες σε διάφορα είδη, παρά το γεγονός της ύπαρξης OP εντομοκτόνων διαφορετικού μεγέθους και δομής. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο λόγοι που συμβαίνει αυτό. Ο πρώτος είναι ίσως λόγω της ανάγκης οι στόχοι ανθεκτικότητας να διατηρούν τις λειτουργίες του αγρίου τύπου και ο δεύτερος το γενετικό κόστος που μπορεί κάποιες μεταλλάξεις να φέρουν (Mutero et al., 1994). Το γενετικό κόστος ίσως να σχετίζεται με το γεγονός ότι λόγω της ομοιότητας του ενζύμου μεταξύ των ειδών, υπάρχει ένας περιορισμός στον αριθμό των καταλοίπων τα οποία αλληλεπιδρούν με το εντομοκτόνο και μπορούν επομένως να αποτελούν στόχους αλλαγών (ffrench-Constant et al., 1998). Ίσως οι σχετιζόμενες με την ανθεκτικότητα μεταλλάξεις επιδρούν ελάχιστα στη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου και μπορούν να διατηρηθούν στους φυσικούς πληθυσμούς. Πράγματι, μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο μαλαθείο παρατηρήθηκαν σε δείγματα μυγών του γένους *Calliphora* τα οποία συλλέχτηκαν πριν την εισαγωγή των εντομοκτόνων, αποδεικνύοντας ότι τα ανθεκτικά αλληλόμορφα προϋπήρχαν σε ικανές συχνότητες χωρίς να επιβάλλουν γενετικό κόστος στους φυσικούς πληθυσμούς (Hartley et al., 2006).

Αντίθετα και απρόσμενα, η έρευνα των απομακρυσμένων από το ενεργό κέντρο εξονίων, αποκάλυψε μία νέα μετάλλαξη, η οποία εντοπίστηκε στο τελευταίο εξόνιο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου. Η μετάλλαξη αυτή αποτελεί μία μικρή έλλειψη 9 νουκλεοτιδίων (νουκλεοτίδια 1926-1934) της ώριμης cDNA αλληλουχίας του δάκου και αντιστοιχεί σε μία έλλειψη τριών καταλοίπων γλουταμίνης (642-644) γι' αυτό και ονομάστηκε BoaceΔ642-644, ή Δ3Q. Μία καινούργια μετάλλαξη δεν επηρεάζει τη λειτουργία του ενζύμου όπου εντοπίστηκε, αλλά μπορεί να αποτελεί απλώς και έναν ουδέτερο πολυμορφισμό. Η ανάγκη διερεύνησης αυτού του ενδεχομένου οδήγησε στην ανάπτυξη τριών διαγνωστικών τεστ. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης της μετάλλαξης σε διάφορους πληθυσμούς κατέστησε σαφές το γεγονός ότι δεν πρόκειται για ένα ουδέτερο αλληλόμορφο ενός πληθυσμού. Η εμφάνισή της, επομένως, μπορεί να ήταν αποτέλεσμα της προσαρμογής του εντόμου σε συγκεκριμένη επιλογική πίεση, κατ' αντιστοιχία με την εμφάνιση των I214V και G488S. Η γενετική και βιοχημική μελέτης της νέας μετάλλαξης συνέδεσε την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

παρουσία της με την ανθεκτικότητα. Σε γενετικό επίπεδο, πληθυσμοί αυξημένης ανθεκτικότητας παρουσίασαν και την αντίστοιχη αύξηση στη συχνότητα της Δ3Q μετάλλαξης. Αντίθετα με τη συχνότητα του R αλληλομόρφου (F_R) των μεταλλάξεων I214V και G488S, η οποία παραμένει σταθερή μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών ατόμων, η F_R της Δ3Q αυξάνεται ραγδαία με την αύξηση της ανθεκτικότητας. Ομοίως σε βιοχημικό επίπεδο, η παρουσία του Δ3Q αλληλόμορφου σε άτομα συγκεκριμένου γενότυπου οδηγεί σε αύξηση της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης. Η παρουσία ενός Δ3Q αλληλομόρφου είτε στο γενότυπο $I214V^{+/-}G488S^{+/-}$, είτε στο $I214V^{-/-}G488S^{-/-}$ προκάλεσε αύξηση της εναπομένουσας δραστικότητας του ενζύμου κατά 44% και 14%, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας τη σύνδεση της με την ανθεκτικότητα.

Δύο συμπεράσματα προκύπτουν από αυτά τα αποτελέσματα. Πρώτον, οι δύο γνωστές μεταλλάξεις είναι οι κύριες μεταλλάξεις που επιλέγονται κάτω από την ελάχιστη πίεση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Πράγματι, όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, κανένα από τα άτομα που ελέχθησαν ακόμη και αυτά που παρουσίασαν τη μικρότερη ανθεκτικότητα δεν παρουσίασαν τον ευαίσθητο φαινότυπο (SS) για καμία από τις μεταλλάξεις. Αυτό συνηγορεί υπέρ του χαμηλού γενετικού κόστους των δύο μεταλλάξεων και τη σημαντικότητά τους στην εμφάνιση του ελάχιστου επίπεδου ανθεκτικότητας. Αντίθετα, η νέα μετάλλαξη φαίνεται να σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε υψηλές δόσεις και πιθανόν κάτω από ένα διαφορετικό μηχανισμό που δεν στοχεύει στη μεταβολή του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Προφανώς, το γενετικό κόστος της Δ3Q μετάλλαξης για το έντομο είναι υψηλό, καθώς προτείνεται από το γεγονός ότι το R αλληλόμορφο βρίσκεται πάντα σε ετεροζυγωτία. Όλα τα άτομα, ακόμη και τα πιο ανθεκτικά, των πληθυσμών του εντόμου που αναλύθηκαν γενοτυπικά, παρουσίασαν ένα μόνο αλληλόμορφο της νέας μετάλλαξης. Επίσης, πρέπει να υπογραμμιστεί ότι αν και η νέα μετάλλαξη συμμετέχει σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, εντούτοις δεν είναι η μοναδική. Πράγματι, η χαμηλή συχνότητα της μετάλλαξης ακόμη και στην πλέον ανθεκτική ομάδα ατόμων συνηγορεί στο γεγονός ότι υπάρχουν επιπρόσθετοι παράγοντες που συμμετέχουν στα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο δάκου.

Το υψηλό γενετικό κόστος της μετάλλαξης Δ3Q διαφαίνεται και από τα αποτελέσματα των ατομικών διασταυρώσεων του εντόμου. Η προσπάθεια δημιουργίας ενός ατόμου που να φέρει τη μετάλλαξη Δ3Q σε ομοζυγωτία ($\Delta3Q^{-/-}$) ήταν ανεπιτυχής. Ακόμη και ύστερα από πέντε γενιές επαναδιασταυρώσεων ετεροζυγωτικών ατόμων Δ3Q, δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση ενός $\Delta3Q^{-/-}$ ατόμου. Το γεγονός αυτό συνάδει με την ιδέα υψηλού γενετικού κόστους της Δ3Q μετάλλαξης που έχει ως αποτέλεσμα τη θνησιμότητα των ομοζυγωτών ατόμων. Ποιος όμως μπορεί να είναι ο λόγος που χαρακτηρίζει τη νέα μετάλλαξη θνησιγόνο; Το μοντέλο που προτείνεται παρακάτω για τον πιθανό ρόλο της Δ3Q θεωρεί ότι η μετάλλαξη επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε παραγωγή περισσοτέρων μορίων ενεργού ενζύμου. Η αύξηση αυτή φυσικά θα είναι μεγαλύτερη όταν η μετάλλαξη βρίσκεται σε ομοζυγωτία. Έτσι, είναι πιθανό το $\Delta3Q^{-/-}$ άτομο να παράγει τόσα πολλά μόρια ενζύμου, τα οποία προκαλούν την ταχύτατη υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα, ο νευροδιαβιβαστής να μην προλαβαίνει να επιτελέσει το ρόλο του, να μην προλαβαίνει δηλαδή να συνδεθεί στη μετασυναπτική μεμβράνη και να μεταβιβάσει το νευρικό ερέθισμα. Η διακοπή της νευρικής ώσης μπορεί να οδηγήσει στη διακοπή των βασικών λειτουργιών του εντόμου, τη παράλυση και τελικά το θάνατό του. Επίσης, το υψηλό γενετικό κόστος υπαγορεύεται από τη μειωμένη ικανότητα ολοκλήρωσης όλων των σταδίων του βιολογικού κύκλου του εντόμου. Η αποτυχία απομόνωσης ενός $\Delta3Q^{-/-}$ ατόμου οδήγησε στη διερεύνηση της επίδρασης που θα μπορούσε να έχει η μετάλλαξη στην ικανότητα ολοκλήρωσης ορισμένων σταδίων του βιολογικού κύκλου. Η καταμέτρηση αυγών, νυμφών και ακμαίων κατέδειξε ότι οικογένειες, οι οποίες έφεραν ένα άτομο με τη μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία, παρουσίασαν μικρότερο ποσοστό νυμφών και ακμαίων από ότι οι οικογένειες που δεν έφεραν τη μετάλλαξη. Ίσως, στα στάδια της προνύμφης και της νύμφης, το γενετικό κόστος της Δ3Q είναι ακόμη μεγαλύτερο, εφόσον δεν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

αντισταθμίζεται από την παρουσία εντομοκτόνου, προκαλώντας ένα υψηλό επίπεδο θνησιμότητας. Το υψηλό γενετικό κόστος δικαιολογεί επίσης και τη μικρή συχνότητα της μετάλλαξης καθώς και τη σύνδεσή της με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Ένα έντομο το οποίο μπορεί να ανεχτεί την εφαρμοζόμενη ποσότητα εντομοκτόνου με τις δύο μεταλλάξεις I214V και G488S, οι οποίες έχουν μικρό γενετικό κόστος, δεν χρειάζεται να φέρει και να "πληρώνει" το γενετικό κόστος της νέας μετάλλαξης. Αντίθετα, ένα έντομο το οποίο με τις ήδη δύο υπάρχουσες μεταλλάξεις δε μπορεί να επιβιώσει, θα υιοθετήσει τη νέα μετάλλαξη, έστω και με το υψηλό γενετικό κόστος. Το έντομο δηλαδή μπροστά στην πιθανότητα να μην επιβιώσει προτιμά να φέρει τη μετάλλαξη Δ3Q με όλα τα συνακόλουθα. Παρόλα αυτά, παραμένει προς διευκρίνιση το κατά πόσο η μείωση της βομβυκίωσης είναι αποτέλεσμα μειωμένης εκκολαψιμότητας ή μειωμένης επιβίωσης προνυμφών. Ωστόσο, η μη σημαντική διαφορά στην εκκολαψιμότητα των αυγών των δύο γενοτύπων συνηγορεί στην εκδοχή της μειωμένης επιβίωσης των προνυμφών.

4. Η ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ Δ3Q

Η μελέτη της κατανομής της μετάλλαξης Δ3Q σε φυσικούς πληθυσμούς δάκου από χώρες της λεκάνης της Μεσογείου αποκάλυψε ότι ακολουθεί τη συχνότητα χρήσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Δηλαδή, η μεγαλύτερη συχνότητα της μετάλλαξης (R αλληλόμορφο) καταγράφεται στην Ελλάδα και την Ιταλία όπου η χρήση των OPs είναι συχνότερη και εντατικότερη και η μικρότερη στην Πορτογαλία, όπου η χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι πιο περιορισμένη. Η εξάπλωση της Δ3Q μετάλλαξης ακολουθεί σε γενικές γραμμές το πρότυπο των μεταλλάξεων I214V και G488S, αφού παρόμοια αποτελέσματα καταγράφονται και στις μελέτες των Hawkes et al. (2005) και Nardi et al. (2006). Το υψηλότερο ποσοστό των αλληλομόρφων των μεταλλάξεων I214V και G488S που προσδίδουν ανθεκτικότητα καταγράφηκε στην Ελλάδα και την κεντρική και νότια Ιταλία. Γεγονός που δικαιολογείται αφού στις περιοχές αυτές η μύγα της ελιάς έχει υποστεί ισχυρή πίεση λόγω της εκτεταμένης χρήσης των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (Haniotakis, 2003). Η διαπίστωση αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο και από τα δεδομένα του FAOSTAT (www.faostat.com). Στην Πορτογαλία το 1996 η κατανάλωση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων ήταν μόλις 225 τόνοι σε αντίθεση με την Ελλάδα όπου καταναλώθηκαν 1,437. Όπως και ένα χρόνο αργότερα, όπου η Ελλάδα σχεδόν διπλασίασε την κατανάλωση αυτή (2.275 τόνοι) σε αντίθεση με την Πορτογαλία που παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα.

5. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ Δ3Q

Η εμφάνιση της Δ3Q μετάλλαξης στο καρβοξυτελικό άκρο της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου με εμφανή συσχέτιση με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα προκάλεσε εξαιρετικό ενδιαφέρον. Ποιος μπορεί να είναι ο ρόλος μιας μετάλλαξης που βρίσκεται έξω από το ενεργό κέντρο του ενζύμου; Το άκρο αυτό όχι μόνο δεν αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου αλλά αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη. Στα έντομα η ακετυλοχολινεστεράση συναντάται κυρίως στη μορφή "Η", στην οποία μέρος του καρβοξυτελικού πεπτιδίου αποκόπτεται και αντικαθίσταται από ένα γλυκολιπίδιο (GPI άγκυρα). Λεπτομερή ανάλυση της πρωτεΐνης στη *D. melanogaster* και τη *M.domestica* επιβεβαίωσε ότι η κύρια μορφή του ενζύμου συνιστά ένα διμερές μόριο συνδεδεμένο στη μεμβράνη (ανασκόπηση: Toutant, 1989). Έτσι, ο εντοπισμός της Δ3Q μετάλλαξης στην περιοχή αυτή (που καθορίζει την προσθήκη GPI άγκυρας) οδήγησε τη μελέτη για την αξιολόγηση του ρόλου της στη συσχέτιση της με την προσθήκη GPI άγκυρας.

Η πρωτεΐνη της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ως ένα διμερές μόριο, το οποίο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μίας GPI άγκυρας (Vontas et al., 2001). Η ύπαρξη όμως της GPI άγκυρας δεν έχει ποτέ επιβεβαιωθεί πειραματικά. Η παρούσα μελέτη κατέδειξε ότι η κύρια μορφή της ακετυλοχολινεστερά-σης του δάκου είναι η "Η" μορφή. Η πρωτεΐνη αποτελεί ένα διμερές μόριο συνδεδεμένο με GPI άγκυρα στην κυτταρική μεμβράνη. Η *in vivo* ανάλυση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

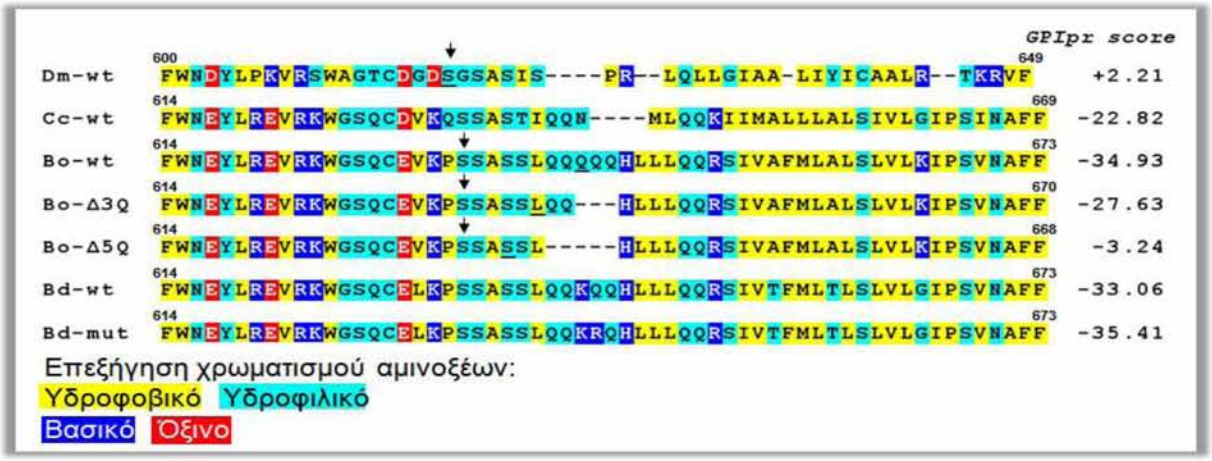
της ακετυλοχολινεστεράσης αποκάλυψε ότι το ένζυμο, πράγματι, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και αγκυροβολείται σε αυτή μέσω της GPI δομής. Το απομονωμένο από τον εγκέφαλο του εντόμου ένζυμο παρουσίασε διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα και διαφορετικό συντελεστή καθίζησης ύστερα από κατεργασία του με το ένζυμο PIPLC. Η επιβεβαίωση του ρόλου του καρβοξυτελικού πεπτιδίου στον εντοπισμό της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη και η ύπαρξη της Δ3Q μετάλλαξης σε αυτό, συνέδεσε την πιθανή λειτουργία της με τη διαδικασία της αγκυροβόλησης.

Ίσως η νέα μετάλλαξη επηρεάζει την ικανότητα και το βαθμό προσθήκης της GPI άγκυρας στο μόριο. Γεγονός το οποίο θα μπορούσε να δικαιολογήσει και τη βελτιωμένη τιμή που παρουσιάζει η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη στην πρόβλεψη της προσθήκης GPI άγκυρας (μέσω του προγράμματος big-PI Predictor). Οι τρεις γλουταμίνες (Q) που απαλείφονται στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν τμήμα μιας αλληλουχίας πέντε διαδοχικών γλουταμινών. Το ερώτημα που γεννάται είναι πώς θα επηρεαζόταν η πρωτεΐνη σε περίπτωση απάλειψης και των πέντε διαδοχικών καταλοίπων γλουταμίνης. Η *in silico* αξιολόγηση της θεωρητικής αμινοξικής ακολουθίας στο πρόγραμμα big-PI Predictor έδωσε τιμή πρόβλεψης GPI προσθήκης για τη θεωρητική Δ5Q μετάλλαξη σχεδόν 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της πρωτεΐνης αγρίου τύπου. Αυτό ενίσχυσε περαιτέρω τον ισχυρισμό ότι η συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου σχετίζεται με την προσθήκη GPI άγκυρας. Η δυνατότητα προσθήκης GPI άγκυρας στο μετάλλαγμα Δ3Q καθώς επίσης και στο θεωρητικό Δ5Q μελετήθηκε *in vitro* μέσω της έκφρασής τους σε ετερόλογο σύστημα ευκαρυωτικών κυττάρων.

Πριν την ανάλυση όμως οποιουδήποτε νέου μηχανισμού, ήταν σκόπιμο να μελετηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ενζύμου, δηλαδή οι σταθερές Km, Vmax και Kcat. Η ανάλυση της πρωτεΐνης αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων Δ3Q και Δ5Q επιβεβαίωσε τον ισχυρισμό ότι αφού πρόκειται για μία μετάλλαξη εκτός ενεργού κέντρου δεν επηρεάζονται οι καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου. Οι σταθερές app-Km και app-Kcat παρουσίασαν την ίδια τιμή, καταδεικνύοντας ότι κάποιος άλλος μηχανισμός προσδίδει ανθεκτικότητα. Οι κινητικές παράμετροι app-Km και app-Kcat αφορούν στην ικανότητα κατάλυσης της πρωτεΐνης. Η έλλειψη των τριών γλουταμινών ή η υποθετική έλλειψη των πέντε γλουταμινών βρίσκεται στην υδρόφοβη περιοχή που αποκόπτεται από την ώριμη πρωτεΐνη, επομένως κάθε σχέση αυτών με μεταβολή της καταλυτικής λειτουργίας του ενζύμου θα ήταν απρόσμενη. Αντίθετα, η διαφορετική τιμή της ολικής δραστικότητας των τριών εκχυλισμάτων (app-Vmax), υπαγορεύει διαφορές στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ή/και στη σταθερότητα και αποδόμηση της πρωτεΐνης, οδηγώντας στην ύπαρξη περισσοτέρων ενεργών μορίων. Κατά συνέπεια, η παρουσία της νέας μετάλλαξης Δ3Q όντως επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

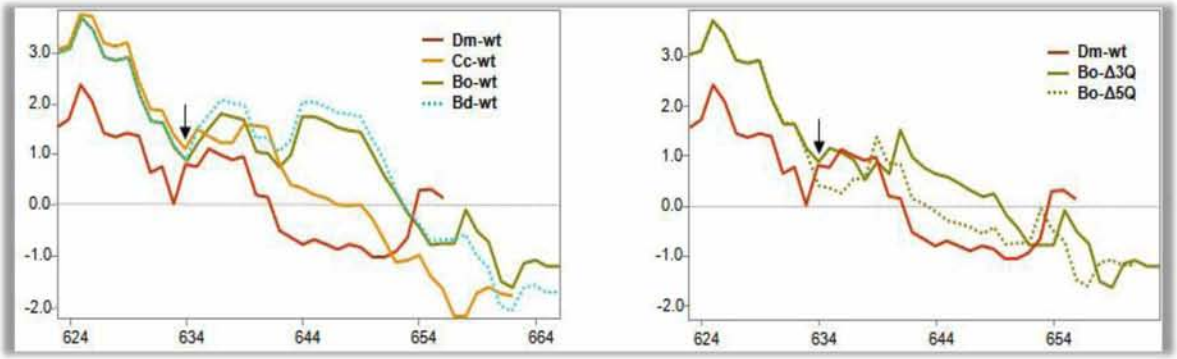
Η κατάλληλη λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης δεν απαιτεί μόνο την αποτελεσματική καταλυτική δραστικότητα αλλά επίσης τον ακριβή εντοπισμό της πρωτεΐνης. Η τροποποίηση που παίζει το σημαντικότερο ρόλο στη σωστή τοποθέτηση του ενζύμου αφορά την ενζυματική αποκοπή της καρβοξυτελικής υδρόφοβης περιοχής και την αντικατάστασή της από GPI άγκυρα (ανασκόπηση: Massoulié et al., 1993). Η GPI άγκυρα χρησιμοποιείται για την αγκυροβόληση αρκετών πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Μελέτες των GPI πρωτεϊνών προσδιόρισαν τα κύρια χαρακτηριστικά του σήματος για την προσθήκη GPI. Αυτό αποτελείται από μία σειρά τριών αμινοξέων (ω, ω+1, ω+2 όπου το ω κατάλοιπο υποδεικνύει το τελευταίο αμινοξύ το οποίο παραμένει ύστερα από την αποκοπή), ακολουθούμενο από ένα υδροφιλικό τμήμα (spacer) 8-12 αμινοξέων (Furukawa et al., 1997; Maeda et al., 2006). Αποτυχία ικανοποίησης αυτών των κριτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την ακύρωση της GPI προσθήκης και συνεπώς τη μη κατάλληλη τοποθέτηση. Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία αλγορίθμου πρόβλεψης των εν δυνάμει σημείων προσθήκης GPI σε πρωτεϊνικές αλληλουχίες (Eisenhaber et al., 1999).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38



Εικόνα 4-3: Ομοπαράθεση της αμινοκιξής ακολουθίας του καρβοξυτελικού πεπτιδίου της AChE των *D. melanogaster* αγρίου τύπου (Dm-wt), *C. capitata* αγρίου τύπου (Cc-wt), *B. oleae* αγρίου τύπου (Bo-wt), *B. oleae* Δ3Q μεταλλάγματος (Bo-Δ3Q), *B. oleae* Δ5Q υποθετικού μεταλλάγματος (Bo-Δ5Q), *B. dorsalis* αγρίου τύπου (Bd-wt) και *B. dorsalis* Q643R μεταλλάγματος (Bd-mut). Δεξιά των αμινοξικών ακολουθιών βρίσκεται η τιμή πρόβλεψης για την προσθήκη GPI άγκυρας.

Αμινοξέα στις θέσεις 634, 635 και 636 της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου είναι τρία τυπικά αμινοξέα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ω, ω+1, ω+2, αντίστοιχα. Εάν η σερίνη 634 ήταν το πραγματικό ω-κατάλοιπο στο αγρίου τύπου ένζυμο, θα δημιουργούσε μία ασυνήθιστα μεγάλη σε μήκος υδροφιλική περιοχή (16 αμινοξέα), πολύ πέρα των ορίων της "κανονικής" δομής του Furukawa et al. (1997). Η έλλειψη των τριών καταλοίπων γλουταμίνης της Δ3Q μετάλλαξης μικραίνει την υδροφιλική περιοχή, πληρώντας καλύτερα τις προϋποθέσεις για την ευνοϊκότερη διαδικασία. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η υποθετική μετάλλαξη, στην οποία λείπουν οι 5 γλουταμίνες της υδροφιλικής περιοχής δημιουργεί ένα καταλληλότερο ω-κατάλοιπο και υδροφιλική περιοχή. Η επίδραση του μήκους της υδροφιλικής περιοχής απεικονίζεται επίσης στην τιμή πρόβλεψης GPI και τα υδροφιλικά προφίλ της εικόνας. Η τιμή πρόβλεψης βελτιώνεται καθώς η υδροφιλική περιοχή μικραίνει σε μήκος μεταξύ του αγρίου τύπου και των μεταλλαγμάτων. Επιπλέον, στα υδροφιλικά προφίλ φαίνεται ότι το προφίλ των δύο μεταλλαγμάτων μοιάζει περισσότερο το προφίλ της *D. melanogaster* (Εικόνα 4-3). Είναι φανερό, ότι το μήκος της υδροφιλικής περιοχής του αγρίου τύπου ενζύμου του δάκου παρουσιάζει δύο "καμπούρες", ενώ η έλλειψη των τριών ή των πέντε γλουταμινών στα δύο μεταλλάγματα αλλάζει το υδροφιλικό τους προφίλ σε ένα προφίλ πιο κοντινό με εκείνο της *D. melamogaster*. Η σπουδαιότητα της υδροφιλικής περιοχής διαφαίνεται επίσης στη τιμή πρόβλεψης GPI και το υδροφιλικό προφίλ που παρουσιάζουν οι *C. capitata* και *B. dorsalis*: όσο μικρότερο είναι το



Εικόνα 4-3: Υδροφιλικό προφίλ κατά Goldman, Engelmanand Steitz (GES). Αριστερά: τα υδροφιλικά προφίλ του καρβοξυτελικού άκρου της AChE της D. melanogaster, C. capitata, B.oleae και B. dorsalis. Δεξιά: τα υδροφιλικά προφίλ του καρβοξυτελικού άκρου της AChE του Δ3Q και Δ5Q του δάκου υπερθετούνται στο υδροφιλικό προφίλ της D. melanogaster.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

μήκος του υδροφιλικού τμήματος (spacer), τόσο περισσότερο προσομοιάζουν το υδροφιλικό προφίλ της *Drosophila* (Εικόνα 4-4).

Συνεπώς, ο μηχανισμός που προτείνεται είναι ότι η μετάλλαξη Δ3Q οδηγεί σε μεγαλύτερη σταθερότητα του ενζύμου λόγω αποτελεσματικότερης GPI τροποποίησης, με αποτέλεσμα την παραγωγή περισσοτέρων GPI μορίων σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Πράγματι, έχει δειχτεί ότι το φυσικό μέγεθος της υδροφιλικής περιοχής στην ανθρώπινη ακετυλοχολινεστεράση δεν είναι το ευνοϊκότερο για το υψηλότερο επίπεδο προσθήκης GPI (Bucht et al., 1999). Παρομοίως, ο Δ3Q δάκος θα μπορούσε να παράγει αρκετή ποσότητα ενζύμου ώστε να μεταβολίζει ικανοποιητικά την ακετυλοχολίνη αλλά και να αλληλεπιδρά με το εντομοκτόνο. Ως αποτέλεσμα, η ακετυλοχολίνη δεν συγκεντρώνεται στη συναπτική σχισμή και το έντομο μπορεί να επιβιώνει και σε υψηλότερες δόσεις εντομοκτόνου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι αυξημένη παραγωγή ακετυλοχολινεστεράσης συμβάλλει σε ανθεκτικότητα. Πράγματι, το ποσό της ακετυλοχολινεστεράσης ήταν πολύ μεγαλύτερο σε ένα φυσικό στέλεχος της *Drosophila* και μάλιστα, η συγκέντρωση του ενζύμου συσχετίστηκε με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Charpentier & Fournier, 2001). Εφόσον μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο του ενζύμου συνήθως οδηγούν σε μείωση του ρυθμού υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης, η υπερπαραγωγή του ενζύμου αποδόθηκε στη προσπάθεια του εντόμου να αντισταθμίσει τη μείωση αυτή.

Επιπλέον, η έλλειψη της GPI άγκυρας έχει εμπλακεί σε ένα μηχανισμό ανθεκτικότητας του κουνουπιού *Culex pipiens* στην εντομοκτόνο δράση του *Bacillus sphaericus* (Darboux et al., 2002). Στόχος της τοξίνης του βακίλου είναι η μαλτάση 1, η οποία μέσω GPI αγκυροβόλησης εντοπίζεται στο μεσοστόμαχο του κουνουπιού. Μεταλλαγμένο, όμως, στέλεχος του κουνουπιού παρήγαγε μια μαλτάση 1 η οποία είχε έλλειψη της φυσιολογικής GPI άγκυρας και ως αποτέλεσμα, δεν παρουσίαζε σωστό εντοπισμό (στο μεσοστόμαχο του κουνουπιού). Συνεπώς, η τοξίνη του βακίλου δεν μπορούσε να συνδεθεί με την μαλτάση 1 με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η καταστροφή της μεμβράνης και το έντομο να επιβιώνει.

Πολλά, πάντως, είναι τα ερωτήματα που μένουν αναπάντητα. Ποιος είναι ο ακριβής εντοπισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης; Πώς μεταβάλλεται η σταθερότητά της; Πώς διαμορφώνεται η συγγένεια με το φυσικό υπόστρωμα (ACh) ή το εντομοκτόνο; Ποια είναι η *in vivo* δραστικότητα;. *In silico* ανάλυση μιας υποθετικής έλλειψης και των πέντε καταλοίπων γλουταμίνης προβλέπει αύξηση της GPI τροποποίησης. Γιατί, λοιπόν, το αγρίου τύπου ένζυμο εξακολουθεί να διατηρεί τις πέντε γλουταμίνες μειώνοντας θεωρητικά την GPI τροποποίηση; Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα από τα πιο γρήγορα ένζυμα ενός οργανισμού, με περισσότερο από 10^4 μόρια υποστρώματος να υδρολύονται ανά δευτερόλεπτο από κάθε μόριο ενζύμου. Η ενζυματική ταχύτητά της φαίνεται να περιορίζεται μόνο από την ταχύτητα διάχυσης του υποστρώματος (Quinn, 1987). Ίσως, λοιπόν, το έντομο να πρέπει να ρυθμίσει την δραστικότητα του ενζύμου εμποδίζοντας τη σωστή τοποθέτησή του στη συναπτική σχισμή μέσω λιγότερο αποδοτικής GPI αγκυροβόλησης. Η παρουσία του εντομοκτόνου, όμως, εμποδίζει τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου, υποχρεώνοντάς το να αντισταθμίσει την κατάσταση μέσω βελτίωσης της προσθήκης GPI άγκυρας. Αυτό μπορεί να διευκολύνει την τοποθέτηση του ενζύμου, φέρνοντας περισσότερα μόρια ενζύμου στη συναπτική σχισμή.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ

Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα καθιστά δύσκολο τον έλεγχο των εντόμων-εχθρών, εκμηδενίζει την αξία τους και οδηγεί στην επαναλαμβανόμενη χρήση τους με δυσμενείς επιπτώσεις στο αγρο-οικοσύστημα. Παράλληλα, η ανακάλυψη εντομοκτόνων με νέους τρόπους δράσης γίνεται ολοένα δυσκολότερη και δαπανηρότερη. Για τους λόγους αυτούς έχει ήδη αλλάξει η νοοτροπία περί νέων εντομοκτόνων και έχει ενισχυθεί η άποψη της ορθολογικής χρήσης των υπαρχόντων έτσι ώστε να διατηρηθεί η αποτελεσματικότητά τους. Η ικανότητα διαχείρισης της ανθεκτικότητας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

τη γνώση των μηχανισμών της ανθεκτικότητας (γενετικών και βιοχημικών), της βιολογίας και της δυναμικής των πληθυσμών των εντόμων-στόχων καθώς και την επιλογή των καταλληλότερων χειρισμών κατά την εφαρμογή των φυτοφαρμάκων. Ανάμεσα στα μέτρα που βοηθούν στη μείωση του κινδύνου για την εξέλιξη μονής ή πολλαπλής ανθεκτικότητας είναι οι τακτικοί έλεγχοι του ποσοστού ανθεκτικών εντόμων στο φυσικό πληθυσμό αλλά και των ορίων ανεκτικότητας στα διάφορα εντομοκτόνα.

Η μοριακή βιολογία παρέχει τη δυνατότητα μετάβασης από τη γνώση και κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των γονιδίων ανθεκτικότητας στη πρακτική εφαρμογή αυτής της γνώσης στον αγρό. Έτσι, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η κατάκτηση της μοριακής γνώσης της ανθεκτικότητας του δάκου στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και η πρακτική εφαρμογή της για την καταπολέμησή του.

Με γνώμονα αφενός την κατανόηση του μεγέθους της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στους φυσικούς πληθυσμούς του δάκου και αφετέρου την κατανόηση της γενετικής της βάσης πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του γενετικού τόπου-στόχου των OP εντομοκτόνων, η καταγραφή της εξάπλωσης μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του εντόμου στα εντομοκτόνα αυτά και επιτεύχθηκε η αποκάλυψη μιας νέας μετάλλαξης. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση του ρόλου της νέας μετάλλαξης, αποκαλύπτοντας έναν εντελώς νέο μηχανισμό ανθεκτικότητας, και επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών τεστ για τον έλεγχο της παρουσίας της σε φυσικούς πληθυσμούς δάκου.

Τα μοριακά διαγνωστικά τεστ που αναπτύχθηκαν για τη Δ3Q μετάλλαξη (η οποία σχετίζεται με υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη πρόβλεψη της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στους φυσικούς πληθυσμούς. Η εφαρμογή τους θα βοηθήσει στη λήψη ορθών αποφάσεων όσον αφορά στην επιλογή κατάλληλων εντομοκτόνων ή γενικότερα μεθόδων καταπολέμησης. Η αποτίμηση της κατάστασης ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου θα αποτελέσει ουσιαστική συμβολή στη φυτοπροστασία της ελιάς και γενικότερα στην κατανόηση της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στη φύση ή στο συγκεκριμένο αγρο-οικοσύστημα. Συνεπώς, η παρούσα διατριβή θα συνεισφέρει στη μείωση των αναποτελεσματικών ψεκασμών που όχι μόνο δεν καταπολεμούν τον δάκο αλλά δημιουργούν προβλήματα με τη θανάτωση ωφελίμων οργανισμών και τη γενικότερη επιβάρυνση του περιβάλλοντος, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στη μείωση του κόστους παραγωγής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Alarcón de la Lastra C., Barranco M.D., Motilva V., Herreriás J.M. (2001) Mediterranean diet and health: Biological importance of olive oil. *Curr Pharm Des* **7**: 933-950.

Aldridge A.N. (1950) Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl-p-nitrophenyl thiophosphate and analogs (E605). *J Biochem* **46**: 451-460.

Aldridge A.N., Davison A.N. (1952) The inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid. *J Biochem* **51**: 61-70.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.

Anazawa Y., Tomita T., Aiki Y., Kozaki T., Kono Y. (2003) Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 509-514.

Andrews M.C., Callaghan A., Field L.M., Williamson M.S., Moores G.D. (2004) Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol Biol* **13**: 555-561.

Arambourg Y. (1975) Insectes nuisibles à l' olivier. *II Sem. Oleicola International* – Córdoba (España).

Arpagaus M., Richier P., Berge J.B., Toutant J.P. (1992) Acetylcholinesterase of the nematode *Steinernema carpocapsae*. Characterization of two types of amphiphilic forms differing in their mode of membrane association. *Eur J Biochem* **207**: 1101-1108.

Ashburner M. (1989) Drosophila. *A laboratory handbook.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Aslanidis C., de Jong P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* **18**: 6069-6074.

Augustine G.J., Adler E.M., Charlton M.P. (1991) The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann N Y Acad Sci* **635**: 365-381.

Baker R., Herbert R., Howse P.E., Jones O.T., Frankle W. et al. (1980) Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *J Chem Soc Chem Comm* **2**: 52-53.

Baumhover A.H., Graham A.J., Hopkins D.E., Dudley F.H., New W.D. et al. (1955) Control of screwworms through release of sterilized flies. *J Econ Entomol* **48**: 462-466.

Bause E. (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* **209**: 331-336.

Bender W., Spierer P., Hogness D.S. (1983) Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from *Ace* and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogster. J Mol Biol* **168**: 17-33.

Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A. et al. (2002) GenBank *Nucleic Acids Res* **30**:17-20.

Berkner K.L., Folk W.R. (1977) Polynoucleotide kinase exchange reaction: quantitave assay for restriction endonuclease-generated 5´-phosphoroyl termini in DNA. *J Biol Chem* **252**: 3176-3184.

Bernard P. (1995) New *ccdB* positive-selection cloning vectors with kanamycin of chloramphenicol selectable markers. *Gene* **162**: 159-160.

Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M.C., Boyer H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of plasmid pMB9. Gene **2**: 75-93.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Bollum F.J. (1974) Terminal deoxynucleotide transferase, In: The enzymes (Ed. by Boyer P.D.), **10**: 37-61, Academic Press, New York.

Bon S., Méflah K., Toutant J.P., Massoulié J. (1988a) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: I. Solubility and aggregation properties. *J Neurochem* **51**: 776-785.

Bon S., Toutant J.P, Méflah K., Massoulié J. (1988b) Amphiphilic and nonamphiphilic forms of *Torpedo* cholinesterases: II. Electrophoretic variants and phoshpatidylinositol phospholipase C-sensitive and –insensitive forms. *J Neurochem* **51**: 786-794.

Bourguet D., Raymond M., Fournier D., Malcom C.A., Toutant J.P. et al. (1996) Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). *J Neurochem* **67**: 2115-2123.

Bourne Y., Grassi J., Bougis P.E., Marchot P. (1999) Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by x-ray crystallography. *J Biol Chem* **274**: 30370-30376.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Breathnach R., Benoist C., O' Hare K., Cannon F., Chambon P. (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci* USA **75**: 4853-4857.

Breer H., Knipper M. (1984) Characterization of acetylcholine release from insect synaptosomes. *Insect Biochem.* **14**: 337-344.

Buchner E. (1991) Genes expressed in the adult brain of *Drosophila* and effects of their mutations on behavior: a survey of transmitter and second messenger-related genes. *J Neurogent* **7**: 153-192.

Bucht G., Wikström P., Hjalmarsson K. (1999) Optimizing the signal peptide for glycosyl-phosphatidylinositol modification of human acetylcholinesterase using mutational analysis and peptide-quantitative structure-activity relationships. *Biochim Biophys Acta* **1431**: 471-482.

Buckingham S.D., Biggin P.C., Sattelle B.M., Brown L.A., Sattelle D.B. (2005) Insect GABA Receptors: Splicing, Editing, and Targeting by Antiparasitics and Insecticides. *Mol Pharmacol* **68**: 942-951.

Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M. et al. (1997) Persistence of insecticide residues in olives and olive oil. *J Ag Food* Chem **45**: 2244-2247.

Campbell A.M. (1993) Thirty years ago in *Genetics*: Prophage insertion into bacterial chromosomes. *Genetics* **133**: 433-437.

Cavener D.R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in Drosophila and vertebrates. *Nucleic Acids Res* **15**: 1353-1361.

Castillo-Davis C.I., Mekhedov S.L., Hartl D.L., Koonin E.V., Kondrashov F.A. (2002) Selection for short introns in highly expresses genes. *Nat Genet* **31**: 415-418.

Charpentier A., Fournier D. (2001) Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pesticide Biochem Physiol* **70**: 100-107.

Chen Z., Newcomb R., Forbes E., McKenzie J., Batterham P. (2001) The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 805-816.

Chomczynski P. (1992) Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *NUcleic Acids Res* **20**: 3791-3792.

Church G.M., Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 1991-1995.

Clarke B.H. (1975) The contribution of ecological genetics to evolutionary theory: detecting the direct

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

effects of natural selection on particular polymorphic loci. *Genetics* **79 Suppl**: 101-113.

Clarke L., Carbon J. (1976) A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91-106.

Cohen J.A., Oosterbaan R.A. (1963) The active site of acetylcholinesterase and related esterases and its reactivity toward substrates and inhibitors, In: *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*, (Ed. by Koelle G.B.) Vol **15**, Springer-Verlag, Berlin, pp. 300-373.

Cohen S.G., Salih E., Solomon M., Howard S., Chishti S.B. et al. (1989) Reactions of 1-bromo-2-[14c]pinacolone with acetylcholinesterase from *Torpedo nobiliana*. Effects of 5-trimethylammonio-2-pentanone and diisopropyl fluorophosphate. *Biochim Biophys Acta* **997**: 167-175.

Coluzzi M. (1992) Malaria Vector Analysis and Control. *Parasitologia Today* **8**: 113-118.

Comerón J.M. (2004) Selective and mutational patterns associated with gene expression in humans: influences on synonymous composition and intron presence. *Genetics* **167**: 1293-1304.

Cousin X., Créminon C., Grassi J., Méflah K., Cornu. G. et al. (1996) Acetylcholinesterase from *Bungarus* venom: a monomeric species. *FEBS Lett* **387**: 196-200

Cousin X., Bon S., Massoulié J., Bon C. (1998) Identification of a novel type of alternative spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. *J Biol Chem* **273**: 9812-9820..

Coussen F., Bonnerot C., Massoulié J. (1995) Stable expression of acetylcholinesterase and associated collagenic subunits in transfected RBL cell lines: production of GPI-anchored dimmers and collagen-tailed forms. *Eur J Cell Biol* **67**: 254-260.

Cygler M., Schrag J.D., Sussman J.L., Harel M., Silman I. et al. (1993) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci* **2**: 366-382.

Daborn P.J., Yen J.L., Bogwitz M.R., Le Goff G., Feil E. et al. (2002) A single P450 allele associated with insecticide resistance in global population of *Drosophila*. *Science* **297**: 2252-2256.

Darboux I., Pauchet Y., Castella C., Silva-Filha M.H., Nielsen-LeRoux C. et al. (2002) Loss of membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci* USA **99**: 5830-5835.

Dauterman W.C. (1971) Biological and nonbiological modifications of organophosphorus compound. *Bull WHO* **44**: 133-150.

Davitz M.A., Hereld D., Shak S., Krakow J., Englund P.T., Nussenzweig V. (1987) A glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase D in human serum. *Science* **238**: 81-84.

De Candolle A. (1886) *Origin of Cultivated Plants* (2nd end, reprinted by Hafner Publishing Co.) London, 1959.

Denholm I., Rowland M.W. (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomol* **37**: 91-112.

Devonshire A.L., Moores G.D., Ffrench-Constant R.H. (1986) Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross-reaction of the anti-serum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphidae). *Bull Entomol Res* **76**: 97-107.

Dieffenbach C.W., Dveksler G.S. (1995) *PCR primer: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Dong K. (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* **7**: 17-30.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.

Drew R.A.I. (1989) The tropical Fruit Flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australian and Oceanic regions. *Mem Queensl Mus* **26**: 1-521

Drosopoulou E., Chrysopoulou A., Nikita V., Mavragani-Tsipidou P. (2009) The heat shock 70 genes of the olive pest *Bactrocera oleae*: genomic organization and molecular characterization of a transcription unit and its proximal promoter region. *Genome* **52**: 210-214.

Duret L. (2001) Why do genes have introns? Recombination might add a new piece to the puzzle. *Trends Genet* **17**: 172-175**.**

Eanes W.F., Koehn R.K. (1978) Relationship between subunit size and number of rare electrophoretic alleles in human enzymes. *Biochem Genet* **16**: 971-985.

Economopoulos A.P. (1977) Gamma-ray sterilization of *Dacus oleae* (Gmelin). Effect of nitrogen on the competitiveness of irradiated males. *Z ang Ent* **83**: 86-95.

Economopoulos A.P. (1972) Sexual competitiveness of γ-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environ Ent* **1**: 490-497.

Economopoulos A.P., Raptis A., Stavropoulou-Delivoria A., Papadopoulos A. (1986) Control of *Dacus oleae* by yellow sticky traps combined with ammonium acetate slow release dispensers. *Ent exp appl* **41**: 11-16.

Economopoulos A.P., Artis N., Zervas G., Tsitsipis G., Haniotakis G. et al. (1977) Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effect of insecticides and release of gamma sterilized insects. *Z Angrew Entomol* **83**: 201-215.

Economopoulos A.P., Voyatzoglou A.V., Giannakakis A. (1971) Reproductive behavior and physiology of *Dacus oleae*. Fecundity as affected by mating, adult diet and artificial rearing. *Ann ent Soc Am* **69**: 725-729.

Economopoulos A.P., Tzanakakis M.E. (1967) Egg yolk and olive juice as supplements to the yeast hydrolysate-sucrose diet for adults of *Dacus oleae*. *Life Sci* **6**: 2409-2416.

Eisenhaber B., Bork P., Eisenhaber F. (1999) Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J Mol Biol* **292**: 741-758.

Ekstrom T.J., klump W.M., Getman D., Karin M., Taylor P. (1993) Promoter elements and transcriptional regulation of the acetylcholinesterase gene. *DNA Cell Biol* **12**: 63-72.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V Jr, Feather-Stone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**: 88-95.

Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* **14**: 3-8.

Estrada-Mondaca S., Lougarre A., Fournier D. (1998) *Drosophila* acetylcholinesterase: effect of post-translational [correction of post-traductional] modifications on the production in the baculovirus system and substrate metabolization. *Arch Insect Biochem Physiol* **38**: 84-90.

ΕΣΥΕ-Γενική Γραμματεία ΕΣΥΕ, www.statistics.gr

Eto M. (1974) *Organophosphorus Pesticides*. CRC, Cleveland, OH.

FAOSTAT-Statistics, http://www.fao.org/corp/statistics/en/

Feinberg A.P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.

Felder C.E., Botti S.A., Lifson S., Silman I., Sussman J.L. (1997) External and internal electrostatic

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

potentials of cholinesterase models. *J Mol Graph Model* **15**: 318-327, 335-337.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791

Feyerseinen R. (1995) Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett* **82/83**: 83-90.

ffrench-Constant R.H., Pittendrigh B., Vaughan A., Anthony N. (1998) Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1685-1693.

Fournier D. (2005) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact* **157-158**: 257-261.

Fournier D., Cuany A., Bride J.M., Bergé J.B. (1987) Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica L.*). *J Neurochem* **49**: 1455-1461.

Fournier D., Bergé J.B., Cardoso de Almeida M.L., Bordier C. (1988a) Acetylcholinesterases from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycophospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *J Neurochem* **50**: 1158-1163.

Fournier D., Bride J.M., Karch F., Bergé J.B. (1988b) Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*. Identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS Lett* **238**: 333-337.

Fournier D., Karch F., Bride J.M., Hall L.M., Bergé J.B., Spierer P. (1989) *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. *J Mol Biol* **210**: 15-22.

Fournier D., Bride J.M., Hoffman F., Karch F. (1992) Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticides. *J Biol Chem* **267**: 14270-14274.

Fournier D., Mutero A. (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol* **108C**: 19-31.

Frobert Y., Créminon C., Cousin X., Rémy M.H., Chatel J.M. et al. (1997) Acetylcholinesterases from Elapidae snakes venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochim Biophys Acta* **1339**: 253-267.

Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988) Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 8998-9002.

Fukuto R.T. (1990) Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ Health Perspect.* **87**: 245-254.

Furukawa Y., Tsukamoto K., Ikezawa H. (1997) Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5´- nucleotidase for GPI anchoring: a study on the significance of the hydrophilic spacer region. *Biochim Biophys Acta* **1328**: 185-196.

Futerman A.H., Low M.G., Silman I. (1983) A hydrophobic dimer of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* electric organ is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci Lett.* **40**: 85-89.

Futerman A.H., Low M.G., Michaelson D.M., Silman I. (1985) Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Neurochem* **45**: 1487-1494.

Gage J.C. (1953) A cholinesterase inhibitor derived from O, O-diethylO-p-nitrophenyl thiophosphate *in vivo*. J *Biochem* **4**: 426-430.

Georgiou G.P. (1990) Overview of insecticide resistance. *ACS Symp Ser* **421**: 18-41.

Gerschenfeld H.M. (1973) Chemical transmission in inmembrane vesicles prepared from synaptosomes of insect vertebrate central nervous systems and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

neuromuscular nervous tissue. *Neurochem Int* **5**: 713-720.

Gibney G., MacPhee-Quigley K., Thompson B., Vedvick T., Low M.G. et al. (1988) Divergence in primary structure between the molecular forms of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **263**: 1140-1145.

Gilbert W. (1978) Why genes in pieces? *Nature* **271**: 501

Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182.

Gnagey A.L., Forte M., Rosenberry T.L. (1987) Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila. J Biol Chem* **262**: 13290-13298.

Gomulski L.M., Torti C., Malacrida A.R., Gasperi G. (1997) Ccmar1, a full-length mariner element from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capita. Insect Mol Biol* **6**: 241-253.

Grisaru D., Sternfeld M., Eldor A., Glick D., Soreq H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* **264**: 672-686.

Guo Z., Liu Q., Smith L.M. (1997) Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nat Biotechnol* **15**: 331-335.

Gupta R.C. (2006) *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds.* Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press: 763p.

Haas R., Marshall T.L., Rosenberry T.L. (1988) *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycoinositol phospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* **27**: 6453-6457.

Hagen K.S., Santas L., Tsekouras A. (1963) A technique of culturing the olive fly *Dacus oleae* Gmel, on synthetic media under xenic condition, In: *Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance*, *Proc Symp Athens* 22-26 April 1963, p. 333-356, Int. Atom. Energy Agency, Vienna.

Hall J.C., Kankel D.R. (1976) Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster. Genetics* **83**: 517-35.

Hall L.M., Spierer P. (1986) The *ace* locus of *Drosophila melanogaster*. Structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5´ leader. *J EMBO* **5**: 2949-2954.

Hall L.M., Malcolm C.A. (1991) The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. *Cell Mol Neurobiol* **11**: 131-141.

Hanahan D., Meselson M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**: 333-342.

Haniotakis G.E., Kozyrakis M., Bonatsos K. (1987) Area-Wide management of the olive fruit fly by feeding attractant and sex pheromones on toxic traps. Proc. II Intern. Symp. Fruit Flies/Crete Sept. 1986, pp 549-560.

Haniotakis G.E., Kozyrakis M., Fitsakis Th, Antonidaki A. (1991) An effective mass trapping method for control of the olive fruit fly *Dacus oleae* [Diptera: Tephritidae]. *J Econ Entomol* **84**: 3326-3331.

Haniotakis G.E. (2003) Olive pest control: present status and prospects, *Proceedings of the IOBC/WPRS Conference*, Integrated Protection of Olives Crops, Chania, Crete.

Hansch C., Deutsch E.W. (1966) The use of substituent constants in the study of structure-activity relationships in cholinesterase inhibitors. *Biochem Biophys Acta* **126**: 117-128.

Harel M., Kryger G., Rosenberry T., Mallender W.D., Lewis T. et al. (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* **9**: 1063-1072.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Harris S., Jones D.B. (1997) Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci* **54**: 166-173.

Harrow I.D., David J.A., Sattelle D.B. (1982) Acetylcholine receptors on identified insect neurons, In *Neuropharmacology of Insects* (CIBA Foundation Symposium 88) (Ed. by O' Connor M. and Whelan J.) pp. 12-31. Pitman, London.

Hartley C.J., Newcomb R.D., Russell R.J., Yong C.G., Stevens J.R. et al. (2006) Amplification of DNA from preserved specimens shows blow-flies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci* USA **103**: 8757-8762.

Hawkes N.J., Janes R.W., Hemingway J., Vontas J. (2005) Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pest Biochem Physiol* **81**: 154-163.

Helenius A., Simons K. (1977) Charge shift electrophoresis: simple method for distinguishing between amphiphilic and hydrophilic proteins in detergent solution. *Proc Natl Acad Sci* USA **74**: 529-532.

Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-*Eco*RI fragments of DNA from lambdoid bacteriphages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **14**: 1235-1244.

Hemingway J. (2000) The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 1009-1015.

Hendrichs J., Ortiz G., Liedo P., Schwarz A. (1983) Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala, In: *Fruit Flies of Economic Importance* (ed. by Cavalloro R.) A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 353-65.

Hendrix R.W., Roberts J.W., Stahl F.W., Weisberg R.A. (1983) *Lambda II*. (Ed. by Cold Spring Harbor Laboratory), Cold Spring Harbor, New York.

Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K.., Pease L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.

Holmquist M. (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr protein Pept Sci* **1**: 209-235.

Holmstedt B. (1963) Structure-activity relationship of the organophosphorus anticholinesterase agents, In: *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* (ed. by Eichler O. and Farah A.), Berlin, Springer-Verlag 428-485.

Holter W., Fordi C.M., Howard B.H. (1989) Efficient gene transfer by sequential treatment of mammalian cells with DEAE-dextran and deoxyribonucleic acid. *Exp Cell Res* **184**: 546-551.

Hong X., Scofield D.G., Lynch M. (2006) Intron size, abudance, and distribution within untranslated regions of genes. *Mol Biol Evol* **23**: 2392-2404.

Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., DaRooge M.A. et al. (1964) Substrates for cyrochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indonyl-β-D-glycopyranosides. *J Med Chem* **7**: 574-575.

Hsu J.C., Feng H.T., Wu W.J., (2004) Resistance and synergistic effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. *J Econ Entomol* **97**: 1682-1688.

Hsu J.C., Hymer D.S., Wu W.J., Feng H.T. (2006) Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **36**: 396-402.

Hutchison C.A. 3rd, Phillips S., Edgell M.H., Gilam S., Jahnke P. et al. (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* **253**: 6551-6560.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Inestrosa N.C., Alvarez J. (1988) Axons grow in the aging rat but fast transport and acetylcholinesterase content remain unchanged. *Brain Res* **441**: 331-338.

Inestrosa N.C., Perelman S. (1989) Distribution and anchoring of molecular forms of acetylcholinesterase. *TIPS* **10**: 325-329.

Ish-Horowicz D., Burke J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**: 2989-2998.

Ito Y., Koyama J. (1982) Eradication of the melon fly: Role of population ecology in the successful implementation of the sterile insect release method. *Protection Ecol* **4**: 1-28.

Javed N., Viner R., Williamson M.S., Field L.M., Devonshire A.L. (2003) Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Mol Biol* **12**: 613-620.

Kakani E.G., Ioannides I.M., Margaritopoulos J.T., Seraphides N.A., Skouras P.J. et al. (2008) A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 781-787.

Kapatos E.T., Fletcher B.S. (1984) The phenology of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu. *Zeit ang Ent* **97**: 360-370.

Karnovsky M.J., Roots L. (1964) A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* **12**: 219-221.

Karplus M. (1986) Internal dynamics of protein. *Methods Enzymol* **131**: 283-307

Katsoyannos P. (1992) Olive pests and their control in the Near East. *FAO Plant Production and Protection Paper* N°115, FAO Rome.

Katz B., Miledi R. (1972) The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J Physiol* **132**: 650-666.

Katz B., Miledi R. (1979) Estimates of quantal content during "chemical potentiation" of transmitter release. *Proc R Soc B* **205**: 369-378.

Keller E.B., Noon W.A. (1985) Intron splicing: a conserved internal signal in introns of *Drosophila* pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res* **13**: 4971-4981.

Kiritsakis A., Markakis P. (1987) Olive oil: a review. *Adv Food Res* **31**: 453-482.

Kiritsakis A.K, Min D.B. (1989) Flavour chemistry of olive oil, In: *Flavour Chemistry of Lipid Foods* (ed. by Min D.B) The American Oil Chemists' Society: Champaign, IL.

Kitz R.J., Braswell L.M., Ginsburg S. (1970) On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? *Mol Pharmacol* **6**: 108-121.

Konrad E.B., Lehman I.R. (1975) Novel mutants of *Escherichia coli* that accumulate very small DNA replicative intermediates. *Proc Natl Acad Sci* **72**: 2150-2154.

Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagines-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**: 631-664.

Κοσμίδης Ν.Γ. (1995) Μελέτη της επιλογής του γόνου αφυδρογονάση της αλκοόλης στο δάκο της ελιάς. Διδακτορική διατριβή.

Kozak M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **12**: 857-872.

Kozak M. (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* **115**: 887-903.

Kozaki T., Shono T., Tomita T., Kono Y. (2001) Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 991-997.

Kramer J.A. (2001) Omiga ™: A PC-based sequence analysis tool. *Mol Biotech* **19**: 97-106.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Krimbas C.B., Tsakas S. (1971) The genetics of *Dacus oleae*. V. Changes of esterase polymorphism in a natural population following insecticide control: selection or drift? *Evolution* **25**: 454-460.

Kryger G., Harel M., Giles K., Toker L., Velan B., et al. (2000) Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 1385-1394.

Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.

Kunkel T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci* USA **82**: 488-492.

Kunkel T.A., Roberts J.D., Zakour R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**: 367-382.

Kyte J., Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-132.

Lagos D., Ruiz M.F., Sáchez L., Komitopoulou K. (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* **348**: 111-121.

Land B.R., Harris W.V., Salpeter E.E., Salpeter M.M. (1984) Diffusion and binding constants for acetylcholine derived from the falling phase of miniature endplate currents. *Proc Natl Acad Sci* USA **81**: 1594-1598.

Larizza A., Makalowski W., Pesole G., Saccone C. (2002) Evolutionary dynamics of mammalian mRNA untranslated regions by comparative analysis of orthologous human, artiodactyl and rodent gene pairs. *Comput Chem* **26**: 479-490

Legay C., Bon S., Massoulié J. (1993) Expression of a cDNA encoding the glycolipid-anchored form of rat acetylcholinesterase. *FEBS Lett* **315**: 163-166.

Legay C., Huchet M., Massoulié J., Changeux J.P. (1995) Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: Alternative splicing and focalization. *Eur J Neurosci.* **7**: 1803-1809.

Legay C. (2000) Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microsc Res Tech.* **49**: 56-72.

Lengyel J., Penman S. (1975) hnRNA size and processing as related to different DNA content in two dipterans: *Drosophila* and *Aedes*. *Cell* **5**: 281-290.

Li F., Han Z.J. (2002) Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*) *Genome* **45**: 1134-1141.

Li F., Han Z. (2004) Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 397-405.

Li Y., Camp S., Rachinsky T.L., Getman D., Taylor P. (1991) Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J Biol Chem* **266**: 23083-23090.

Li Y., Camp S., Rachinsky T.L., Bongiorno C., Taylor P. (1993a) Promoter elements and transcriptional control of the mouse acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem* **268**: 3563-3572.

Li Y., Camp S., Taylor P. (1993b) Tissue-specific expression and alternate mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene. *The Journal of Bio Chem* **268**: 5790-5797.

Liao D.I., Remington S.J. (1990) Structure of wheat serine carboxylpeptidase II at 3.5-A resolution. A new class of serine proteinase. *J Biol Chem* **265**: 6528-6531.

Lichtenstein A.V., Moiseev V.L., Zaboikin M.M. (1990) A procedure for DNA and RNA transfer to

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

membrane filters avoiding weight-induced flattening. *Anal Biochem* **191**: 187-191.

Lieb M. (1953) Studies on lysogenization in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* **18**: 71-73.

Lieber M.R., Hesse J.E., Mizuuchi K., Gellert M. (1987) Developmental stage specificity of the lymphoid V(D)J recombination activity. *Genes Dev* **1**: 751-761.

Lindahl T. (1974) An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci* **71**: 3649-3653.

Liu Z., Williamson M.S., Lansdell S.J., Denholm I., Han Z. et al. (2005) A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci* **102**: 8420-8425.

Lockridge O., Adkins S., La Du B.N. (1987) Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* **262**: 12945-12952.

Luthman H., Magnusson G. (1983) High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res* **11**: 1295-1308.

MacPhee-Quigley K., Taylor P., Taylor S. (1985) Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of NH_2-terminal and active center sequences. *J Biol Chem* **260**: 12185-12189.

Maeda N., Smithies O. (1986) The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annu Rev Genet* **20**: 81-108.

Maeda Y., Ashida H., Kinoshita T. (2006) CHO glycosylation mutants: GPI anchor. *Methods Enzymol* **416**: 182-205

Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-depented bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.

Manikas G.P. (1974) A contribution to the biology and ecology of *Dacus oleae* Gmel. (Diptera-Tephritidae). Ph.D thesis, University of Athens (in Greek with English summary), 75 pp.

Manikas G., Tsiroyannis V. (1983) Biological control of *Dacus oleae* in Greece using the parasite *Opius concolor*. *Entomophagus insects and biotechnologies against olive pests. Joinst Research Centre. Commision of the European Communities.* EUR 8647 EN-FR, 75-83.

Marais G., Nouvellet P., Keightley P.D., Charlesworth B. (2005) Intron Size and Exon Evolution in *Drosophila*. *Genetics* **170**: 481-485.

Massoulié J., Bon S. (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetycholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* **5**: 57-106.

Massoulié J., Pessementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* **41**: 31-91.

Maulet Y., Camp S., Gibney G., Rachinsky T.L., Ekstrom T.J. et al. (1990) Single gene encodes glycophospholipid-anchored and asymmetric acetylcholinesterase forms: Alternate coding exons contain inverted repeat sequences. *Neuron* **4**: 289-301.

Mazomenos B.E., Haniotakis G.E. (1981) A multi component female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmel. Isolation and bioassay. *J Chem Ecol* **7**: 437-443.

Mazomenos B.E., Haniotakis G.E., Ioannou A., Spanakis I., Kozyrakis A. (1983) Field evaluation of the olive fruit fly pheromone traps with various dispensers andconcentrations. In: Fruit Flies of Economic Importance. R Cavalloro (ed) Proc of the CEC/IOBC. Intern. Sympos. Athens Greece, 16-19 Nov. 1982, pp 506-512.

Mazomenos B.E., Haniotakis G.E. (1985) Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and fields tests. *J Chem Ecol* **11**: 397-405.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Melander A.L. (1914) Can insects become resistant to sprays? *J Econ Entomol* **7**: 167-173.

Menozzi P., Shi M.A., Lougarre A., Tang Z.H., Fournier D. (2004) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol Biol* **4**: 4.

Messing J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* **101**: 20-78.

Mizushima S., Nagata S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* **18**: 5322.

Montiel-Bueno A., Jones O. (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semio-chemicals. *IOBC Wprs Bull* **25**: 1-11.

Moran P., Caras I.W. (1994) Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *J Cell Biol* **125**: 333-343.

Moretto A. (1998) Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicol Lett* **103**: 509-513.

Mori A., Lobo N.F., deBruyn B., Severson D.W. (2007) Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (Ace1) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analysis. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 667-674.

Motoyama N., Hayaoka T., Nomura K., Dauterman W.C. (1980) Multiple factors for organophosphorus resistance in the housefly *Musca domestica* L. *J Pestic Sci* **5**: 393-402.

Mount S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**: 459-472.

Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A., Avora-Canãda M.J. (2003) Fourier transform Raman spectrometry for the quantitative analysis of oil content and humidity in olives. *Appl Spectrosc* **57**: 223-227.

Mullis K.B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**: 263-273.

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-caralyzed reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

Murray N.E., Murray K. (1974) Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature* **251**: 476-481.

Mutero A., Fournier D. (1992) Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus oocytes*. *J Biol Chem* **267**: 1695-1700.

Mutero A., Pralavorio M., Bride J.M., Fournier D. (1994) Resistance-associated point mutation in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci* USA **91**: 5922-5926.

Nachmansohn D. (1955) *Harvey Lectures* 1953/1954, pp. 57-99, Academic Press.

Nachmansohn D., Neumann E. (1975) *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity*, Academic Press.

Nagoshi R.N., Gelbart W.M. (1987) Molecular and recombinational mapping of mutations in the *Ace* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **117**: 487-502.

Nardi F., Carapelli A., Vontas J., Dallai R., Roderick G.K. et al. (2006) Evolution of an insecticide resistance: the *ace* gene in the olive fly, *Bactrocera oelae*. *Insect Biochem Mol Biol* **36**: 593-602.

Needham P.H., Sawicki R.M. (1971) Diagnosis of resistance to organophosphorus insecticides in *Myzus persicae* (Sulz). *Nature, Lond.* **230**: 126-127.

Neuenschwander P., Michelidakis S. (1978) The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Zeit ang Ent* **86**: 420-433.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **1**: 841-845.

Newcomb R.D., Campbell P.M., Ollis D.L., Cheah E., Russell R.J. et al. (1997) A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 7464-7468.

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**: 581-599.

Oakeshott J., Devonshire A., Claudianos C., Sutherland T., Horne I. et al. (2005) Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chem Biol Interact* **157-158**: 269-275.

Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetcs* **120**: 621-623.

Olszewska E., Jones K. (1988) Vacuum blotting enchances nucleic acid transfer. *Trends Genet* **4**: 92-94.

Oppenoorth F.J. (1985) Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. **12** (Edited by Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), Pergamon Press, Oxford.

Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Ariel N., Segall Y. et al. (1995) Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **270**: 2082-2091.

Orphanidis, Danielidou R.K., Alexopoulou P.S., Tsamakis A.A., Karayannis G.B. (1958) Recherches experimentales surl l' attractivite exercee par certaines substances proteinees sur le *Dacus* adulte de l'olive. *Ann Inst Phytopath Benaki* **1**: 171-198.

Ορφανίδης Π.Σ., Σουλτανόπουλος Κ.Δ. (1962) Καταπολέμησις του Δάκου της ελαίας διά ψεκασμού πρωτεϊνούχων ελκυστικών δολωμάτων (Συγκριτικά αποτελέσματα προς την δι'αρσενικομελασσούχων πολτών μεθόδου). *Χρον. Μπενακείου Φυτοπαθ. Ινστ.* (Ν.Σ.) **4**: 242-251.

Panja S., Aich P., Jana B., Basu T. (2008) How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol* **25**: 411-422.

Pesole G., Liuni S., Grillo G., Licciulli F., Mignone F. et al. (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* **276**: 73-81.

Pitman R.M. (1971) Transmitter substances in insects: a review. *Camp Gen Pharmac* **2**: 347-737.

Price N.R. (1991) Insect resistance to insecticides: Mechanisms and Diagnosis *Comp Biochem Physiol* **100C**: 319-326.

Prokopy RJ., Economopoulos A.P., McFadden M.W. (1975) Attraction of wild and laboratory-cultured *Dacus oleae* flies to small rectangles of different hues, shades and tints. *Entomol Exper Appl* **18**: 141-152.

Ptashne M., Gann A. (2001) Transcription initiation: imposing specificity by localization. *Essays Biochem* **37**: 1-15.

Quinn D.M. (1987) Acetylcholinesterase dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev* **87**: 955-979.

Rambach A., Tiollais P. (1974) Bacteriophage λ having *Eco*RI endonuclease sites only in the non-essential region of the genome. *Proc Natl Acad Sci* **71**: 3927-3930.

Raspi A., Viggiani G. (2008) On the senior authorship of *Musca oleae* (Diptera: Tephritidae). *Zootaxa* **1714**: 67-68.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Ravin H.A., Tsou K.C., Seligman A.M. (1951) Colorimetric estimation and histochemical demonstration of serum cholinesterases. *J Biol Chem* **191**: 843-857.

Razin A., Hirose T., Itakura K., Riggs A.D. (1978) Efficient correction of a mutation by use of chemically synthesized DNA. *Proc Natl Acad Sci* USA **75**: 4268-4270.

Restifo L.L., White K. (1990) Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila*. *Adv Insect Physiol* **22**: 115-219.

Rice R.E. (2000) Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera* (*Dacus) oleae*, In: *Olives Notes.*Tulare Country, University of California Cooperative Extension, 1-5.

Robinson A.S. (2002) Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* **116**: 5-13.

Roessler Y. (1989) Control, insecticides, insecticidal bait and cover sprays, in World Crop Pests. Vol **3B**, Fruit Flies, *Their Biology, Natural Enemies and Control* (Ed. by Robinson A.S. and Hooper G.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holland, pp. 329-336.

Romoser S.W., Stoffolano G.J. (1998) *The science of entomology.* 4rth Edition McGraw-Hill.

Rosenberry T.L. (1975) Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol* **43**: 103-218.

Rosenberry T.L., Neumann E. (1977) Interaction of ligands with acetylcholinesterase. Use of temperature-jump relaxation kinetics in the binding of specific fluorescent ligands. *Biochemistry* **16**: 3870-3878.

Rosenberry T.L., Scoggin D.M. (1984) Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase. Characterization of intersubunit disulfide bonding and detergent interaction. *J Biol Chem* **259**: 5643-5652.

Rosse W.F., Ware R.E. (1995) The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **86**: 3277-3286.

Rotundo R.L. (1984) Asymmetric acetylcholinesterase is assembled in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci* USA **81**: 479-483.

Rotundo R.L., Fambrough D.M. (1980) Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultured chick embryos muscle cells. *Cell* **22**: 583-594.

Rotundo R.L. (1988) Biogenesis of acetylcholine-sterase molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. *J Biol Chem* **263**: 19398-19406.

Rotundo R.L., Thomas K., Porter-Jordan K., Benson R.J.J., Fernandez-Valle C. et al. (1989) Intracellural transport, sorting, and turnover of acetylcholine-sterase : Evidence for endoglycosidase H-sensitive form in golgi apparatus, sarcoplasmic reticulum, and clathrin-coated vesicles and its rapid degradarion by a non-Lysosomal mechanism. *J Biol Chem* **264**: 3146-3152.

Rotundo R.L., Fambrough D.M. (1994) Function and molecular structure of acetylcholinesterase, In: *Myology* (Ed. by Engel A.G. and Franziniarmstrong C.), New York: McGraw-Hill.

Ryser H.J.-P. (1967) A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size. *Nature* **215**: 934-936.

Saez-Valero J., Sberna G., McLean C.A., Small D.H. (1999) Molecular isoform distribution and glycosylation of acetylcholinesterase are altered in brain and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* **72**: 1600-1608.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. Higuchi R. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F., Coulson A.R., Barrell B.G., Smith A.J., Roe B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* **143**: 161-178.

Sattellle D.B. (1980) Acetylcholine receptors of insects. *Adc Insect Physiol* **15**: 215-315.

Sattelle D.B. (1985) Acetylcholine receptors, In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Ed. by Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), Vol **II**, pp. 395-434. Pergamon Press. Oxford.

Schenborn E.T., Mierendorf R.C. Jr (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerase: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res* **13**: 6223-6236.

Schumacher M.J., Maulet Y., Camp S., Taylor P. (1988) Multiple messenger RNA species give rise to the structural diversity in acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **263**: 18979-18987.

Schwartz M. (1967) Sur l' existence chez *Escherichia coli* K12 d' une régulation commune à la biosythesis des récepteurs du bactériophage λ et au métabolisme du maltose. *Ann Instr Pasteur* **113**: 685-704.

Scott J.G. (2008) Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects. *J Pestic Sci* **33**: 221-227.

Scott J.G., Liu N., Wen Z. (1998) Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp Biochem Physiol C* **121**: 147-155.

Seeburg P., Shine J., Martial J.A., Baxter J.D., Goodman H.M. (1977) Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* **270**: 486-494.

Sgaramella V., Khorana H.G. (1972) CXII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer RNA from yeast. Enzymic joining of the chemically synthesized polydeoxynucleotides to form the DNA duplex representing nucleotide sequence 1 to 20. *J Mol Biol* **72**: 427-444.

Sgaramella V., Ehrlich S.D. (1978) Use of T4 polynoucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur J Biochem* **86**: 531-537.

Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055-3063.

Shi M.A., Lougarre A., Alies C., Fremaux I., Tang Z.H. et al. (2004) Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol Biol* **4**: 5.

Sikorav J.L., Krejci E., Massoulié J. (1987) cDNA sequences of *Torpedo* marmorata acetylcholinesterase: Primary structure of the precursor of a catalytic subunit; existence of multiple 5´-untranslated regions. *J EMBO* **6**: 1865-1873.

Sikorav J.L., Duval N., Anselmet A., Bon S., Krejci E. et al. (1988) Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in *Torpedo* electric organ; Primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form. J *EMBO* **7**: 2983-2993.

Silman I., Futerman A.H. (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur J Biochem* **170**: 11-22.

Silman I., Millard C.B., Ordentlich A., Greenblatt H.M., Harel M. et al. (1999) A preliminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcholinesterase. *Chem Biol Interact* **119-120**: 43-52.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Simsek M., Ziegenmeyer J., Heckman J.E., RajBhandary U.L. (1973) Absence of the sequence G-T-psi-C-G(A)- in several eukaryotic cytoplasmic initiator transfer RNAs. *Proc Natl Acad Sci* USA **70**: 1041-1045.

Skouras P.J., Margaritopoulos J.T., Seraphides N.A., Ioannides I.M., Kakani E.G., Mathiopoulos K.D., Tsitsipis J.A. (2007) Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* **63**: 42-48.

Smissaert H.R. (1964) Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science* **143**: 407-409.

Smith R.F., Reynolds H.T. (1967) Principles, definitions and scope of Integrated Pest Control, In: *Proceeding of the FAO Symposium on Integrated pest control*, 11-15 October 1965, Rome, Fd. Agric. org. U.N., **1**: 11-18.

Soreq H., Ben-Aziz R., Prody C.A., Seidman S., Gnatt A. et al. (1990) Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals G+C-rich attenuation structure. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 9688-9692.

Soreq H., Zakut H. (1990) *Monographs in Human Genetics* (Ed. by Sparkes R.S.) vol **13**, Karger.

Soreq H., Zakut H. (1993) *Human Cholinesterases and Anticholinesterases*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 47-61.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

SPSS Inc. (2004). SPSS Base 13.0 User's Guide. SPSS Inc., Chicago IL.

Steele R.W, Smallman B.N. (1976) Acetylcholinesterase of the house-fly head. Affinity purification and subunit composition. *Biochim Biophys Acta* **445**:147-157.

Steiner L.F., Harris E.J., Mitchell W.C., Fujimoto M.S., Christenson L.D. (1965) Melon fly eradication by overflooding with sterile flies. *J Econ Entomol* **58**: 519-522.

Stellwag E.J., Dahlberg A.E. (1980) Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzyloxymethyl (DBM) – paper. *Nucleic Acids Res* **8**: 299-317.

Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A. et al. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253**: 872-879.

Szegletes T., Mallender W.D., Thomas P.J., Rosenberry T.L. (1999) Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* **38**: 122-133.

Szmelcman S., Hofnung M. (1975) Maltose transport in *Escherichia coli* K12: Involvement of the bacteriophage lambda receptor. *J Bacteriol* **124**: 112-118.

Taylor P. (1990) In, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Ed. by Gilman A.G., Rail T.W., Nies A.S. and Taylor P.) 8th ed, pp. 131-147, Pergamon.

Taylor P. (1991) The cholinesterases. *The Journal of Bio Chem* **266**: 4025-4028.

Temeyer K.B., Chen A.C. (2007) Identification and characterization of a cDNA encoding the acetylcholinesterase of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *DNA Seq* **18**: 85-91.

Thomas M., Cameron J.R., Davis R.W. (1974) Viable molecular hybrids of bacteriophage λ and eukaryotic DNA. *Proc Natl Acad Sci* **71**: 4579-4583.

Thorne H.V. (1966) Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* **29**: 234-239.

Toda S., Komazaki S., Tomita T., Kono Y. (2004) Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with primicarb and organophosphorus insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

gossypii Glover (Homoptera: Aphididae). *Insect Mol Biol* **13**: 549-553.

Tomita T., Hidoh., Kono Y. (2000) Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps. Insect Biochem Mol Biol* **30**: 325-333.

Tomlin C. (2003) *The Pesticide Manual*, 13th ed., 1344 pp, British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom.

Toutant J.P. (1989) Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol* **32**: 423-446.

Toutant J.P., Arpagaus M., Fournier D. (1988) Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*: quaternary structure and hydrophobic character. *J Neurochem* **50**: 209-218.

Trnovsky J. (1992) Semi-dry electroblotting of DNA and RNA from agarose and polyacrylamide gels. *Biotechniques* **13**: 800-804.

Tsakas S. (1977) Genetics of *Dacus oleae*. VIII. Selection for the amount of acetylcholinesterase after organophosphate treatment. *Evolution* **31**: 901-904.

Tsakas S., Krimbas C.B. (1970) The genetics of *Dacus oleae*. IV. Relation between adult esterase genotypes and survival to organophosphate insecticides. *Evolution* **24**: 807-815.

Tsiropoulos G.J. (1977) Survival and reproduction of *Dacus olea* (Gmel.) fed on chemically defined diets. *Z Ang Entomol* **84**: 192-197.

Τζανακάκης Μ.Ε. (1995) Εντομολογία, University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Udenfriend S., Kodukula K. (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann Rev Biochem* **64**: 563-591.

Ullman A., Jacob F., Monod J. (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structure gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **24**: 339-343.

Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E. et al. (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**: 1313-1319.

Vaheri A., Pagano J.S. (1965) Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. *Virology* **27**: 434-436.

Vale J.A. (1998) Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol Lett* **103**: 649-652.

Van den Bosch R. (1967) The role of parasites and predators in Integrated Control. In: *Proceeding of the FAO Symposium on Integrated pest control*, 11-15 October 1965, Rome, Fd. Agric. org. U.N., **2**: 143-148.

Vaughan A., Rochelaeau T., Ffrench-Constant R. (1997) Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exp Parasitol* **87**: 237-244.

Velan B., Grosfeld H., Kronman C., Leitner M., Gozes Y. et al. (1991) The effect of elimination of intersubunit disulfide bonds on the activity, assembly, and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. Expression of acetylcholinesterase Cys-580-Ala mutant. *J Biol Chem* **266**: 23977-23984.

Vinogradov A.E. (1999) Intron-Genome Size Relationship on a Large Evolutionary Scale. *J Mol Evol* **49**: 376-384.

Von Heijne G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**: 17-21.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Vontas J.G., Cosmidis N., Loukas M., Tsakas S., Hejazi M.J. et al. (2001) Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* **71**: 124-132.

Vontas J.G., Hejazi M.J., Hawkes N.J., Cosmidis N., Loukas M. et al. (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, *Insect Mol Biol* **11**: 329-336.

Vossen P., Varela L., Devarenne A. (2005) Olive Fruit Fly. University of California. Cooperative Extension.

Wahl G.M., Stern M., Stark G.R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci* USA **76**: 3683-3687.

Walsh S.B., Dolden T.A., Moores G.D., Kristensen M., Lewis T. et al. (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* **359**: 175-181.

Ware G.W. (2000) *The Pesticide Book*, 5th ed., 418pp, Thomson Publications, Fresno, CA.

Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A. et al. (2003) Comparative genomics: insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* **423**: 136-137.

Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A. et al. (2004) The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* **13**: 1-7.

Whalon M., Mota-Sanchez D., Hollingworth R. (2008) Analysis of Global Pesticide Resistance in Arthropods, In: *Global Pesticide Resistance in Arthropods* (ed. by Whalon M., Mota-Sanchez D. and Hollingworth R) CABI Organization

Wilkins E.E., Howell P.I., Benedict M.Q. (2006) IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for *Anopheles gambiae* species identification, Mopti and Savanna rDNA types, and resistance to dieldrin in *Anopheles arabiensis*. *Malar J* **19**: 125.

Williamson M.S., Moores G.D., Devonshire A.L. (1992) Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica)*, In: *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Fuctions,* (Ed. by Shafferman A. and Velan B.), Plenum Press, New York, 83-86.

Wilson I.B., Bergmann F. (1950a) Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholine esterase derived from effects of pH on inhibitors. *J Biol Chem* **185**: 479-489.

Wilson I.B., Bergmann F. (1950b) Aceylcholinesterase. VIII. Dissociation constants of the active groups. *J Biol Chem* **186**: 683-692.

Wilson I.B., Hatch M.A., Ginsburg S. (1960) Carbamylation of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **235**: 2312-2315.

Woodwell G.M., Wurster C.F. Jr, Isaacson P.A. (1967) DDT residues in an east coast estuary: a case of biological concentration of a persisten insecticide. *Science* **156**: 821-824.

Worthing C.R., Walker S.B. (1987) *The Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Croyden, 1987.

Yandell M., Mungall C.J., Smith C., Prochnik S., Kaminker J. et al. (2006) Large-Scale Trends in the Evolution of Gene Structures within 11 Animal Genomes *PLoS Comp Biol* **2**: 113-1125.

Yang Y.W., Yang J.C. (1997) Studies of DEAE-dextran-mediated gene transfer. *Biotechnol Appl Biochem* **25**: 47-51.

Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for population genetic analysis.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Zervas G.A., Economopoulos A.P. (1982) Mating frequency in caged population suppression. *Proc CEC/IOBC Ad-hoc Meetion on Fruit Flies of Economic Importance*, Hamburg, Aug 23, pp. 75-80.

Zhu K.Y., Lee S.H., Clark M. (1996) A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pestic Biochem Physiol* **55**: 100-108.

Zoller M.J., Smith M. (1984) Oligonucleotide-directed mutagenesis: A simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *DNA* **3**: 479-488.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Insect Biochemistry and Molecular Biology 38 (2008) 781–787

Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmb

A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance

E.G. Kakani [a], I.M. Ioannides [b], J.T. Margaritopoulos [c], N.A. Seraphides [b], P.J. Skouras [c], J.A. Tsitsipis [c], K.D. Mathiopoulos [a,*]

[a] Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26, Larissa 41221, Greece
[b] Agricultural Research Institute, Nicosia 1516, Cyprus
[c] Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology, Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environment, University of Thessaly, Nea Ionia 38446, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 October 2007
Received in revised form
22 April 2008
Accepted 12 May 2008

Keywords:
Bactrocera oleae
Olive fly
Acetylcholinesterase
Insecticide resistance
Dimethoate

ABSTRACT

Organophosphate resistance in the olive fly was previously shown to associate with two point mutations in the *ace* gene. The frequency of these mutations was monitored in *Bactrocera oleae* individuals of increasing resistance. In spite of the difference in resistance among the individuals, there was no correlation between mutation frequencies and resistance level, indicating that other factors may contribute to this variation. The search for additional mutations in the *ace* gene of highly resistant insects revealed a small deletion at the carboxyl terminal of the protein (termed Δ3Q). Significant correlation was shown between the mutation frequency and resistance level in natural populations. In addition, remaining activity of acetylcholinesterase enzyme (AChE) after dimethoate inhibition was higher in genotypes carrying the mutation. These results strongly suggest a role of Δ3Q in high levels of organophosphate (OP) resistance. Interestingly, the carboxyl terminal of AChE is normally cleaved and substituted by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. We hypothesize that Δ3Q may improve GPI anchoring, thus increasing the amount of AChE that reaches the synaptic cleft. In this way, despite the presence of insecticide, enough enzyme would remain in the cleft for its normal role of acetylcholine hydrolysis, allowing the insect to survive. This provides a previously un-described mechanism of resistance.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There is a growing concern about the recent increase of pesticide use, which has led to the development of resistance. More so, considering that a growing number of field populations of insects develop multiple resistance to more than one insecticides. Modification of the acetylcholinesterase enzyme (AChE) has been implicated in several cases of resistance against organophosphate (OP) and carbamate (CB) insecticides (O'Brien, 1976; Matsumura, 1985). Normally, acetylcholinesterase hydrolyzes the acetylcholine (Rosenberry, 1975) at the neural synapses and terminates the nerve pulse. OPs and CBs enter the active site gorge of the enzyme and phosporylate or carbamoylate, respectively, the active site serine of AChE. However, the reaction rate of dephosphorylation or carbamoylation of the insecticides is very slow and, consequently, fewer molecules of the enzyme are available for the hydrolysis of acetylcholine. The acetylcholine is accumulated in the neural synapse, the acetylcholine receptor remains permanently opened, thus causing the death of the insect (Aldridge, 1950).

In contrast, a modified AChE that confers resistance displays decreased affinity to OPs and CBs than that of the susceptible enzyme. Several mutations have been identified in the gene for AChE (termed *ace*) of different insects. In almost all cases, these mutations affect amino acid residues that are predicted to be located in the active site gorge of the enzyme (Mutero et al., 1994). They all point to a mechanism that involves a steric alteration of the active site residues in such a way that affect the entrance and the binding of the OP insecticide into the active site (Harel et al., 2000) and the efficiency of AChE phosphorylation.

Such mutations have been described in *Drosophila melanogaster* (Fournier et al., 1992b; Mutero et al., 1994), in mosquito species (Nabeshima et al., 2004; Weill et al., 2004), in *Musca domestica* (Williamson et al., 1992; Feyereisen, 1995; Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001), *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2006), *Aphis gossypii* (Andrews et al., 2004; Toda et al., 2004), as well as in other hemipteran species (Javed et al., 2003). The only documented report of a resistance-associated mutation outside

* Corresponding author. Tel.: +30 2410565284; fax: +30 2410565290.
E-mail address: kmathiop@bio.uth.gr (K.D. Mathiopoulos).

0965-1748/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ibmb.2008.05.004

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

the catalytic region of AChE is that of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu et al., 1996), in which resistance is hypothesized to be associated with a more generalized change of the secondary structure of the protein. Finally, there are species, such as *Nephotettix cincticeps* (Tomita et al., 2000), *Boophilus microplus* (Baxter and Baker, 1998) and *Lucilia cuprina* (Hughes and Raftos, 1985; Newcomb et al., 1997a), where the OP resistant phenotype is not associated with alterations in the *ace* gene. For instance, in *L. cuprina* OP resistance arises mostly from a mutant form of the carboxylesterase E3 (Newcomb et al., 1997b; Campbell et al., 1998). Evidently, there are other mechanisms that also result in OP resistance.

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most destructive pest of cultivated olive trees in almost every country where olive trees are cultivated. The damage caused by the oviposition of eggs and tunneling of the emerged larvae in the fruit, results at about 30% loss of the olive crop (Chaniotakis, 1994). The control of the fly is based mainly on the use of organophosphate insecticides. Early studies in the 1970 s indicated that overproduction of an AChE allele was associated with resistance of *B. oleae* to dimethoate (Tsakas and Krimbas, 1970; Krimbas and Tsakas, 1971; Tsakas, 1977). More recently, however, it was shown that responsible for such resistance, at least in part, were two point mutations in the active site gorge of AChE of *B. oleae* (Vontas et al., 2002). It was also reported that oxidative metabolism (monoxygenase activity) and Est (esterase)-based and/or GST (glutathione S-transferase)-based organophosphate metabolic pathways did not have a major role in resistance to OPs (Vontas et al., 2001). Subsequently, it was shown that both mutations were widespread in several Mediterranean countries (Hawkes et al., 2005), although there was no clear correlation between the frequencies of these mutations and the actual resistance level of the fly populations.

Recently, we published a large survey of the resistance status of *B. oleae* in Greece and Cyprus (Skouras et al., 2007), where considerable variation in the resistance levels was observed. This was mainly attributed to different selection pressures from insecticidal applications in the various regions. However, the molecular basis of these differences remained unanswered. The present study tries to assess whether these differences can be attributed to differences in the frequencies of the two known *ace* mutations (Vontas et al., 2002) or to some additional modification(s). This search led to the discovery of a new mutation that associates with high levels of resistance. Curiously, this mutation lies outside the active site gorge of AChE and indicates that the carboxyl terminal of the enzyme may be involved in a novel OP-resistance mechanism.

2. Materials and methods

2.1. Insects

The study was carried out on field-collected olive flies. Flies were selected from the populations used in a previous study of Skouras et al. (2007) or collected from new locations, as indicated in the Results. Most flies used in this study had previously undergone classical bioassays in order to determine their OP resistance.

2.2. PCR amplification of exons II, III–V, VIII, IX and X

Primers for PCR amplification of the different putative *ace* exons were designed based on the known *B. oleae* cDNA sequence (Vontas et al., 2002) (Table 1). Fly genomic DNA was extracted from the abdomen and thorax of individual flies as described by Ashburner (1989). PCR was performed in 20 μl reaction volume and ~10 ng genomic DNA was used as a template. The amplification reactions contained a final concentration of 1 × Taq buffer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pmol of each primer and 1 unit of Taq polymerase (GoTaq™ Promega). All amplifications were performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles consisting of 94 °C for 30 s, annealing temperature for 30 s and 72 °C for extension time. This was followed by 7 min of final extension. Annealing temperatures and extension times are described in Table 1.

2.3. Cloning, DNA sequence analysis and data analysis

PCR products of the different exons were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels and appropriate size fragments were gel extracted using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega). Purified products were ligated with T4 DNA ligase (Fermentas) into *Eco*RV-cleaved, T-tailed Bluescript II SK(+) plasmid vector and transformed into *E. coli* DH5α cells, using standard molecular biology techniques (Sambrook et al., 1989). DNA sequences of recombinant plasmids were analyzed using the Omiga software (Oxford Molecular Ltd.) and the Clustal W software online. The frequencies of the different alleles (*R* and *S*) were determined with the use of POPGENE version 1.32 (Yeh et al., 1999).

2.4. Diagnostic tests

Detection of I214 V and G488 S mutations was performed as described by Hawkes et al. (2005).

For the detection of Δ3Q, ~10 ng genomic DNA was amplified in a 20 μl reaction volume with primers Boace10F and Boace10R. The amplification reaction contained a final concentration of 1 × Taq buffer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 pmol of each primer and 1 unit of Taq polymerase (GoTaq™ Promega). Amplification conditions were: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 51 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. This was followed by 7 min final extension. PCR products were electrophoresed in a high resolution 3% MetaPhor agarose gel (FMC) or in a 10% native or denaturing 2-mm-thick acrylamide

Table 1
Oligonucleotide primers and conditions used in PCRs

Exons of ace gene	Product size (bp)	Primers		PCR conditions	
		Forward	Reverse	Annealing temp (°C)	Extension time (s)
Exon II	315	Boace2F TTCGCGTCAATACAGTGTCG	Boace2R CTTTCTTGCACACAGGTTGC	55	30
Exon III-V[a]	1666	Boace3F TATTTTCCCGGTTTCTCTGGC	Boace5R CGTCTCTGACATTTCCCATC	48	90
Exon VIII	142	Boace8F ACTAGCACTTCCCTATGG	Boace8R TAACGGCATTCAGCATCC	48	30
Exon IX	156	Boace9F CCACAGATGGCGAAGAATGG	Boace9R ATCCCCATTTCCGGACTTCG	53	30
Exon X	96	Boace10F TGAAGTCAAACCATCATCCG	Boace10R GACAGCGCCAACATGAACG	51	30

[a] Includes introns.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

gel. Visualization of the bands in the acrylamide gels was obtained after silver staining (Sambrook et al., 1989).

2.5. Biochemical assays

Heads from the untreated adults were homogenized in 200 μl of ice-cold homogenization SP buffer (0.1 M sodium phosphate, pH 7.4, 0.1% Triton X-100) with a pestle homogenizer. The homogenate was centrifuged at 5000*g* for 5 min and the supernatant was used as the enzyme source.

Acetylcholinesterase activity was measured in the absence and presence of an OP using acetylthiocholine (ATC) as a substrate, based on the colorimetric method of Ellman et al. (1961). The uninhibited (−OP) and inhibited (+OP) AChE reaction mixtures contained the same amount of protein, as determined by the Bradford method (with BSA as the standard protein). Reactions were incubated at 25 °C for 15 min. Individual assays in flat-bottomed 96 well plates were initiated by the addition of the stain solution (5 ml SP buffer, 0.5 ml 0.1 M ATC and 1.25 ml DTNB in 50 ml volume). The hydrolysis was monitored by the formation of the thiolate dianion of DTNB at 405 nm for 10 min at intervals of 30 s using a Bio-Tek EL808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Each measurement was replicated two times. The degree of inhibition of AChE activity with OP was expressed as a percentage (%) of AChE activity remaining at the 10 min timed reading. [(D absorbance of the inhibited reaction/D absorbance of the uninhibited reaction) × 100]. Mean remaining activity and error bars of the biochemical data were calculated using the SPSS program version 13.0.

3. Results

3.1. Frequency of I214V and G488S in Greek and Cypriot populations

In a previous study, the resistance level of olive fly populations from Greece and Cyprus to OP insecticides was monitored (Skouras et al., 2007). Resistance ratios ranged between 6.3 and 64.4, which demonstrated considerable variation, obviously related to selective pressure due to OP use. However, we wanted to determine whether this variation correlated with a corresponding frequency variation of the two known *ace* mutations (I214V and G488S) that are related to OP resistance (Vontas et al., 2002) employing the PCR-RFLP assay developed by Hawkes et al. (2005). For this reason, individuals from the above bioassays (Skouras et al., 2007) or more recent ones performed in our laboratory (data not shown) were divided in three groups of increasing resistance (4–9 ng of insecticide per insect, 19–37 and 75–150 ng). It should be noted that in classical bioassays about 20 individuals are assayed per dose in order to estimate the LD_{50}. Instead, we performed the mutation assay in the survivors of each dose, since those reflected the portion of the population that was resistant in that particular dose.

Despite the difference in resistance among the examined groups of insects, the frequencies of the susceptible (*S*) and resistant (*R*) alleles for the two mutations did not show significant variation (Table 2). The majority of the flies genotyped were homozygous for the two mutations (90%) whereas few individuals were heterozygous (Table 2). However, none of the flies and not even the individuals with the lowest resistance levels exhibited the homozygous genotype for the susceptible type (SS) for either I214V or G488S mutations.

3.2. Sequencing analysis of ace exons II–V in resistant individuals

Since allele frequencies of I214V and G488S seemed uncorrelated with resistance levels, we set out to analyze the nucleotide sequence of the *ace* locus of *B. oleae* in order to isolate additional mutations that could be related to high OP-resistance levels. The most resistant individuals from the Skouras et al. (2007) study were selected for the analysis.

PCR products of exons II–V from 30 flies from the Kentri (Crete) population that were alive at the highest OP dose (150 ng) in the Skouras et al. (2007) bioassays, were cloned and their sequences were analyzed. Several polymorphisms were detected. All polymorphisms in exons II–V and VIII–IX resulted in synonymous nucleotide changes except of the known I214V substitution.

3.3. A novel small deletion mutation in exon X

PCR products of exons VIII–X from 10 flies from the Kentri (Crete) population that were alive at the highest OP dose (150 ng per insect) in the Skouras et al. (2007) bioassays, were cloned and their sequences were analyzed. Several polymorphisms were detected. All polymorphisms in exons VIII and IX resulted in synonymous nucleotide changes. However, the alignment of the exon X sequences revealed an interesting 9 bp deletion (termed Δ3Q) in two out of the 10 flies. These 9 bp (GCAACAACA) corresponded to nucleotides 1926–1934 of the mature cDNA sequence of *B. oleae* acetylcholinesterase gene (Vontas et al., 2002) and resulted in a deletion of three glutamine residues at positions 642–644 (Fig. 1).

Table 2
Allele frequencies of I214V, G488S and Δ3Q in Greece and Cyprus

R allele ng dimethoate per insect (range)	I214V			G488S			Δ3Q		
	F_R[b]	*R*/*N*[a]	*N*[c]	F_R	*R*/*N*	*N*[c]	F_R	*R*/*N*	*N*[c]
4–9	0.8950	213/119	SS: 0 SR: 25 RR: 94	0.9076	216/119	SS: 0 SR: 22 RR: 97	0.0061	1/82	SS: 81 SR: 1 RR: 0
19–37	0.9227	334/181	SS: 0 SR: 28 RR: 153	0.9144	331/181	SS: 0 SR: 31 RR: 150	0.0355	13/183	SS: 170 SR: 13 RR: 0
75–150	0.8529	58/34	SS: 0 SR: 10 RR: 24	0.8529	58/34	SS: 0 SR: 10 RR: 24	0.0847	10/59	SS: 49 SR: 10 RR: 0

[a] *N* is the total number of individuals tested and *R* is the number of the resistant alleles found in the sample. For a diploid organism, the maximum value for *R* is 2*N*.
[b] F_R is the frequency of the resistant allele calculated as the ratio *R*/2*N*.
[c] Number of individuals of each genotype observed.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

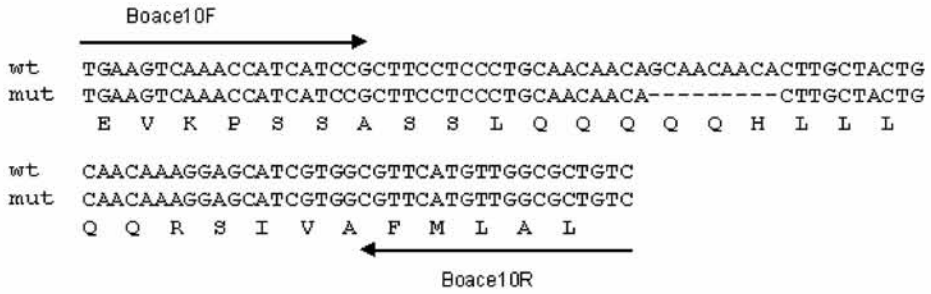


Fig. 1. Diagrammatic representation of the PCR product of *B. oleae ace* exon 10. Primers Boace10F and Boace10R (indicated at the 5′ end and 3′ end, respectively) are the two primers used for the amplification of the entire fragment.

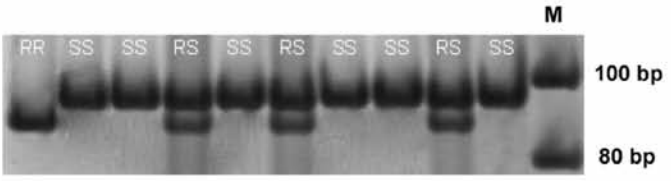


Fig. 2. Direct PCR analysis of the Δ3Qin a 10% native acrylamide gel. The *RR* lane is the amplification product of the cloned Δ3Q allele in a plasmid vector and represents a hypothetical $\Delta3Q^{-/-}$ genotype. The *RS* and *SS* lanes are amplification products of filed-collected flies of $\Delta3Q^{-/+}$ and $\Delta3Q^{+/+}$ genotypes, respectively. The rightmost lane, indicated *M*, is the molecular weight marker.

3.4. Genetic correlation of Δ3Q with resistance

In order to assess the likely importance of the Δ3Q mutation in conferring OP resistance, the frequency of the mutant allele was monitored in similar groups of flies, as described above. In order to achieve this, a direct PCR diagnostic test was used: The designed primers for exon X PCR used above (Boace10F and Boace10R) allow the amplification of almost the entire exon X, which contains the 9 bp deletion. Thus, PCR of the wild-type allele yields a 96 bp product whereas PCR of the mutant allele yields an 87 bp product due to the mentioned deletion. The difference between the wild-type and the mutant PCR products can be visualized after electrophoresis in a high resolution 3% MetaPhor (FMC) agarose gel (data not shown) or in a 10% native or denaturing acrylamide gel (Fig. 2).

As shown in Table 2, the frequency of the mutant allele showed a significant correlation with OP-resistance levels. Interestingly, the *R* allele was always found in heterozygosis.

3.5. Biochemical correlation of Δ3Q with resistance

In order to confirm the correlation of the new mutation with the OP resistance at the individual level, acetylcholinesterase remaining activity was assayed in field-collected flies. For this purpose, flies collected from the Chania region of Crete this year were genotyped with regard the three *ace* mutations (I214V, G488S and Δ3Q). At the same time, AChE remaining activity was assayed from the heads of the same flies. As Fig. 3 illustrates, the presence of one Δ3Q allele either in the $I214V^{+/-}$, $G488S^{+/-}$ or $I214V^{-/-}$, $G488S^{-/-}$ genotypes increased AChE remaining activity by 44% and 14%, respectively. In addition, the expression of the *ace* gene was also measured in the same individuals and was shown unaffected (data not shown).

4. Discussion

The resistance status of *B. oleae* in Greece and Cyprus was recently examined (Skouras et al., 2007) and considerable variation in the resistance levels to dimethoate was recorded. Resistance ratios ranged from 6.3 to 64.4 (compared to a laboratory susceptible strain). The highest resistance ratios were found in populations from Crete, and the lowest in those from Cyprus. This variation was mainly attributed to different selection pressures from insecticidal applications among populations from the various regions. However, the molecular basis of this variation remained unanswered. Two mutations (I214V and G488S), localized in the catalytic gorge of acetylcholinesterase of *B. oleae*, are known to confer resistance to organophosphate insecticides (Vontas et al., 2002). If these two mutations were the only contributors to resistance, one should expect that their frequency in a natural population would vary according to the resistance level of the population. In view of that, the frequencies of the two mutations in individuals with increasing resistance were estimated. Both mutations were observed almost in homozygocity at about 90% of the samples (Table 2). However, there was no frequency variation and therefore no correlation between mutation frequencies and resistance level (Table 2). Consequently, there must be other contributing factors to the variation of resistance, such as other mutations in the *ace* gene or the involvement of other loci. In this study, the presence of additional mutations in the *ace* gene of the most resistant insects of the Skouras et al. (2007) study was investigated.

At least 14 different mutations have been described that reside in and around the active site gorge of the *ace* gene that confer resistance in different insects (Fournier, 2005). Most of these mutations are conserved in several species, despite the widely differing sizes and structures of OP insecticides. There are at least two reasons that may account for this. One may be due to the necessity for resistance targets to maintain their wild-type functions and to the fitness cost some of these mutations may carry (Mutero et al., 1994). The second may relate to the fact that, because of the enzyme similarity among species, there are a limited (and always the same) number of residues that interact with the insecticide and could therefore be targets for mutagenesis (ffrench-Constant et al., 1998). Perhaps these resistance-associated mutations have little effect on normal enzyme function and can be readily maintained in natural populations. In fact, resistance to malathion was detected in pinned specimens of Australian sheep blow-flies that were collected prior to the introduction of the insecticide, which suggests that resistance alleles pre-existed at sufficient frequencies without imposing a fitness cost in the natural population (Hartley et al., 2006). It was therefore sensible to expect more mutations in the *ace* gene of *B. oleae* that would contribute to OP resistance than the two known ones.

However, the search for new mutations in the exons that encompass the active site gorge (i.e., exons II–VI) yielded nothing but silent nucleotide substitutions. This maybe due to the fact that the olive fly, even though it has been consistently controlled with OP insecticides the last 40 years both in Greece and Cyprus, has

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

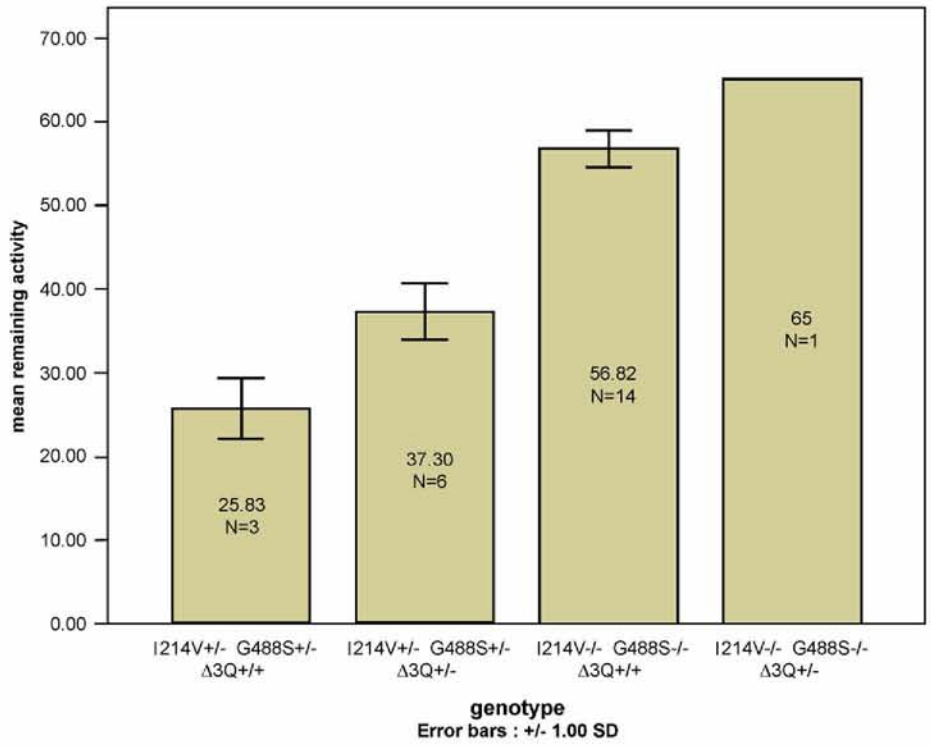


Fig. 3. AChE remaining activity (after dimethoate inhibition) of different genotypes containing different combinations of the three mutations (I214V, G488S and Δ3Q) in the *ace* gene. Inside the columns are indicated the mean remaining activity and the number of individuals assayed (*N*). The error bars at the top of the columns indicate the standard deviation.

encountered a limited variety of them, that is fenthion and dimethoate. Therefore, the two mutations observed maybe the best combination that confers lowest fitness cost and highest resistance to the two OPs used against olive fly populations. It may be that the larger number of *ace* mutations acquired by other insects is due to their exposure to a larger variety of OPs and CBs. In fact, *in vitro* expression of mutated proteins that contained several OP-associated mutations at the same protein both increased the resistance level and provided a wide spectrum of resistance (Menozzi et al., 2004). Alternatively, it could be that the active site gorge of *B. oleae*'s *ace* gene is saturated with I214V and G488S and any more mutations would hamper normal AChE function and greatly affect the fitness of the fly.

Contrary to our expectation, however, the search in exons VIII–X led to the discovery of a new mutation that lied in the putative exon X of the *ace* gene. This mutation was a short deletion of nine nucleotides (nucleotides 1926–1934 of the mature cDNA sequence of *B. oleae*'s *ace* gene (Vontas et al., 2002)) that corresponded to the deletion of three glutamine residues (at positions 642–644) (Fig. 1). This deletion was initially observed in two out of the 10 most resistant individuals that were alive at the highest OP doses in the Skouras et al. (2007) bioassays.

It was essential to determine whether this mutation was a neutral allele of AChE found in Cretan flies or, rather, a resistance-associated one. For this reason a direct PCR assay was used that could easily monitor the presence of the new mutation in the field. Firstly, a few individuals from mainland Greece and Cyprus were tested for the presence of Δ3Q where it was readily found (data not shown). This made clear that Δ3Q was not a Cretan allele and, therefore, its presence could have been a result of the insect's adaptation to a particular selective pressure, such as insecticides. Secondly, the likely importance of the Δ3Q mutation in conferring OP resistance was assessed. For this, the frequency of the Δ3Q mutation was determined in samples of different levels of resistance. Such samples were formed by the survivors of the different doses used in the bioassays of the Skouras et al. (2007) study or more recent ones, since those reflected the portion of the population that was resistant in that particular dose. As evidenced in Table 2, the frequency of the Δ3Q allele showed a significant correlation with OP-resistance levels.

In addition, biochemical studies were conducted in order to evaluate the contribution of the Δ3Q mutation in the resistance. Acetylcholinesterase activity of field-collected flies of known genotypes for the three mutations (I214V, G488S and Δ3Q) was assayed. Results demonstrated that the presence of one Δ3Q allele either in the $I214V^{+/-}$, $G488S^{+/-}$ or $I214V^{-/-}$, $G488S^{-/-}$ genotypes increased AChE remaining activity by 44% and 14%, respectively (Fig. 3). At the same time, the expression of the *ace* gene remained unaffected (data not shown).

Two major conclusions can be drawn from these data. Firstly, mutations I214V and G488S are the first ones to be selected under the minimum OP pressure. In fact, as mentioned earlier, none of the flies tested, not even the individuals that demonstrated the lowest resistance level, exhibited the homozygous genotype of the susceptible type (SS) for mutations I214V or G488S (i.e., $I214V^{+/+}$, $G488S^{+/+}$). This advocates for a low fitness cost of the two mutations and for their importance at a minimum level of resistance. On the contrary, the Δ3Q mutation appears associated with resistance at higher OP doses and, possibly under a different mechanism other than the steric alteration of the active site residues of AChE. Apparently, the fitness cost of Δ3Q maybe much higher, as also suggested by the fact that the *R* allele was always found in heterozygosis. However, it should be emphasized that by no means do we claim that Δ3Q is the only contributor to high-resistance levels. In fact, the low-frequency level of Δ3Q, even in the highest resistance group (8.5%, Table 2), points to more contributing factors for the high OP resistance of *B. oleae*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

5. Possible role of Δ3Q

What may the role be of such a mutation that is located outside the catalytic center of the enzyme? Detailed analysis of AChE in *Musca* and *Drosophila* indicates that the major form of the enzyme is a synaptic membrane-bound dimer (for a review see Toutant, 1989). The enzyme undergoes several post-translational modifications, none of which significantly affect the activity of AChE or affinity for its substrate (Fournier et al., 1992a; Mutero and Fournier, 1992; Chaabihi et al., 1994; Estrada-Mondaca et al., 1998). However, the proper function of AChE does not only require an efficient catalytic activity but also a precise localization of the enzyme. The modification that plays the most important role in the correct localization of AChE regards the enzymatic cleavage of the enzyme's hydrophobic carboxyl-terminal domain and its substitution for a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (for reviews see Massoulié et al., 1993, 1999). GPI is used for anchoring several cell surface proteins to the plasma membrane. Studies on GPI anchored proteins have indicated characteristic features of the GPI anchor addition signal. These consist of a stretch of three amino acids, followed by a hydrophilic spacer segment of 8–12 amino acids and a terminal hydrophobic segment of 12–20 amino acids (Furukawa et al., 1997; Maeda et al., 2006; Zacks and Garg, 2006). Failure to satisfy these criteria results in abolished GPI anchoring and therefore improper localization. These features have also been used to create computer algorithms in order to predict potential GPI modification sites in protein sequences (Eisenhaber et al., 1999). The big-PI Predictor score for the Δ3Q mutant is substantially improved relatively to its wild-type counterpart (data not shown). This is mainly due to the fact that the deletion of the three glutamine residues of the Δ3Q mutation shortens the unusually long hydrophilic spacer region (of 16 amino acids) that is beyond the limits of the "canonical" structure of Furukawa et al. (1997) and thus makes it comply better with the prerequisites for optimal processing.

Consequently, we hypothesize that in the mutant Δ3Q fly, AChE undergoes a more efficient GPI modification thus producing more anchored molecules than the wild-type fly. Human's AChE is not optimal for the highest degree of GPI modification as well: it has been shown that the insertion of one or two amino acids in the spacer region substantially increases the amount of GPI anchored AChE as compared to the wild-type enzyme (Bucht et al., 1999). Similarly, it could be that in the mutant Δ3Q fly there are sufficient amounts of the enzyme both for the efficient metabolism of the acetylcholine and for the interaction with the insecticide. As a result, the acetylcholine does not accumulate into the synaptic cleft and the insect survives the higher doses of the insecticide.

There is evidence that increased AChE production may contribute to resistance. In fact, the level of AChE was estimated in 82 *D. melanogaster* strains from field collected samples and the amount of the enzyme was directly correlated with insecticide resistance (Charpentier and Fournier, 2001). Since mutations in the active site of the enzyme usually result in a decrease in the rate of neurotransmitter hydrolysis, it was hypothesized that overproduction of a modified AChE could compensate for this decrease.

Furthermore, loss of a GPI anchor has been implicated in a mechanism of resistance of the mosquito *Culex pipiens* to the insecticidal activity of *Bacillus sphaericus* (Darboux et al., 2002). In this case, a mutant strain of *C. pipiens* produced a maltase 1 (the target of *B. sphaericus* toxin) that lacked its normal GPI anchor and, as a result, it was not localized properly (in the mosquito midgut). Consequently, *B. sphaericus*' toxin could not bind the maltase 1 in the mosquito midgut, damaging of the midgut membrane was prevented, and the insect was able to survive.

Be that as it may, the question still remains as to the exact localization of the mutated protein and its stability, the affinity for the normal substrate (acetylcholine) or the insecticide and the *in vivo* activity. The lack of all five glutamine residues is predicted to increase even further the GPI modification of the protein. So, why does wild type maintain the five glutamines, theoretically decreasing the GPI modification? AChE is one of the fastest known enzymes with up to 10^4 substrate molecules being hydrolyzed per second by each enzyme molecule, and its enzymatic velocity seems to be limited only by the diffusion velocity of its substrate (Quinn, 1987). Perhaps, the insect needs to moderate the enzyme's activity by obstructing its proper localization through a less efficient GPI anchoring. However, when large amounts of insecticide are present occupying a large portion of the enzyme from its normal function, the insect compensates by optimizing GPI anchoring thus facilitating the enzyme's localization and bringing more enzymes in the synaptic cleft.

Acknowledgments

The authors wish to thank Christina Mikellidou-Demetriou for excellent technical assistance and Jean Massoulié for useful criticisms on the manuscript. The work was financially supported by a Greek-Cypriot Research and Technology grant of the Greek General Secretariat for Research and Technology and the Cyprus Research Promotion Foundation with the contribution of BASF Agro Hellas ABEE.

References

Aldridge, W.N., 1950. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. J. Biochem. (Tokyo) 46, 451–460.

Andrews, M.C., Callaghan, A., Field, L.M., Williamson, M.S., Moores, G.D., 2004. Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. Insect Mol. Biol. 13, 555–561.

Ashburner, M., 1989. Drosophila: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Baxter, G.D., Baker, S.C., 1998. Acetlycholinesterase cDNA of cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 581–589.

Bucht, G., Wikström, P., Hjalmarsson, K., 1999. Optimising the signal peptide for glycosyl phosphatidylinositol modification of human acetylcholinesterase using mutational analysis and peptide-quantitative structure–activity relationships. Biochim. Biophys. Acta 1431, 471–482.

Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 139–150.

Chaniotakis, N., 1994. Protection of olive orchards inorganic farming. In: National Conference on Organic Farming, Kalamata, Greece, p. 135.

Chaabihi, H., Fournier, D., Fedon, Y., Bossy, J.P., Ravallec, M., Devauchelle, G., Cerruti, M., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculoviruses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203, 734–742.

Charpentier, A., Fournier, D., 2001. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. Pesticide Biochem. Physiol. 70, 100–107.

Darboux, I., Pouchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J-F., Pauron, D., 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5830–5835.

Eisenhaber, B., Bork, P., Eisenhaber, F., 1999. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. J. Mol. Biol. 292, 741–758.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.

Estrada-Mondaca, S., Lougarre, A., Fournier, D., 1998. Drosophila acetylcholinesterase: effect of post-translational modifications on the production in the Baculovirus system and substrate metabolism. Arch. Insect Biochem. Physiol. 38, 84–90.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Feyereisen, R., 1995. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicol. Lett. 82/83, 83–90.
ffrench-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Anthony, N., 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 353, 1685–1693.
Fournier, D., 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. Chem. Biol. Interact 157–158, 257–261.
Fournier, D., Mutero, A., Rungger, D., 1992a. Drosophila acetylcholinesterase; expression of a functional precursor in Xenopus oocytes. Eur. J. Biochem. 203, 513–519.
Fournier, D., Bride, J.M., Hoffman, F., Karch, F., 1992b. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticides. J. Biol. Chem. 267, 14270–14274.
Furukawa, Y., Tsukamoto, K., Ikezawa, H., 1997. Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5′-nucleotidase for GPI anchoring: a study on the significance of the hydrophilic spacer region. Biochim. Biophys. Acta 1328, 185–196.
Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, J.M., Silman, I., Sussman, J.L., 2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. Protein Sci. 9, 1063–1072.
Hartley, C.J., Newcomb, R.D., Russell, R.J., Yong, C.G., Stevens, J.R., Yeates, D.K., La Salle, J., Oakeshott, J.G., 2006. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 8757–8762.
Hawkes, N.J., Janes, R.W., Hemingway, J., Vontas, J., 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). Pestic Biochem. Physiol. 81, 154–163.
Hsu, J.-C., Hymer, D.S., Wu, W.-J., Feng, H.-T., 2006. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 396–402.
Hughes, P.B., Raftos, D.A., 1985. Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Bull. Entomol. Res. 75, 535–544.
Javed, N., Viner, R., Williamson, M.S., Field, L.M., Devonshire, A.L., Moores, G.D., 2003. Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Insect Mol. Biol. 12, 613–620.
Kozaki, T., Shono, T., Tomita, T., Kono, Y., 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 991–997.
Krimbas, C.B., Tsakas, S., 1971. The genetics of *Dacus oleae*. V. Changes of esterase polymorphism in a natural population following insecticide control: selection or drift? Evolution 25, 454–460.
Maeda, Y., Ashida, H., Kinoshita, T., 2006. CHO glycosylation mutants: GPI anchor. Meth. Enzymol. 416, 182–205.
Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog. Neurosci. 41, 31–91.
Massoulié, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., Simon, S., 1999. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. Chem. Biol. Interact. 119–120, 29–42.
Matsumura, F., 1985. Toxicology of Insecticides, second ed. Plenum Press, New York.
Menozzi, P., Shi, M.A., Lougarre, A., Tang, Z.H., Fournier, D., 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. BMC Evol. Biol. 4, 4.
Mutero, A., Fournier, D., 1992. Post-translational modifications of Drosophila acetylcholinesterase. J. Biol. Chem. 267, 1695–1700.
Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M., Fournier, D., 1994. Resistance-associated point mutation in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5922–5926.
Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D.W., Kono, Y., Tomita, T., 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313, 794–801.
Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1997a. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. Insect Biochem. Mol. Biol. 27, 15–25.
Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1997b. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 7464–7468.
O'Brien, R.D., 1976. Acetylcholinesterase and its inhibition. In: Wilkinson, C.F. (Ed.), Insecticide Biochemistry and Physiology. Heyden Press, Chichester, pp. 271–296.
Quinn, DM., 1987. Acetylcholinesterase dynamics, and virtual transition states. Chem. Rev. 87, 955–979.
Rosenberry, T.L., 1975. Acetylcholinesterase. Adv. Enzymol. 43, 103–218.
Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
Skouras, P.J., Margaritopoulos, J.T., Seraphides, N.A., Ioannides, I.M., Kakani, E.G., Mathiopoulos, K.D., Tsitsipis, J.A., 2007. Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. Pest Manag. Sci. 63, 42–48.
Toda, S., Komazaki, S., Tomita, T., Kono, V., 2004. Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididaee). Insect Mol. Biol. 13, 549–553.
Tomita, T., Hidoh, O., Yoshiaki, K., 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 325–333.
Toutant, J.-P., 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog. Neurobiol. 32, 423–446.
Tsakas, S., 1977. Genetics of *Dacus oleae*. VIII. Selection for the amount of acetylcholinesterase after organophosphate treatment. Evolution 31, 901–904.
Tsakas, S., Krimbas, C.B., 1970. The genetics of *Dacus oleae*. IV. Relation between adult esterase genotypes and survival to organophosphate insecticides. Evolution 24, 807–815.
Vontas, J.G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, J., Ayoutanti, A., Hemingway, J., 2001. Altered Acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in *Bactrocera oleae*. Pestic Biochem. Physiol. 71, 124–132.
Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M., Hemingway, J., 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Mol. Biol. 11, 329–336.
Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. Biochem. J. 359, 175–181.
Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marguine, M., Raymond, M., 2004. The unique mutation in *ace*-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol. Biol. 13, 1–7.
Williamson, M.S., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1992. Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). In: Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions. Plenum Press, New York, pp. 83–86.
Yeh, F.C., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z., Xiyan, J.M., 1999. POPGENE VERSION 1.32 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. ⟨http://www.ualberta.ca/~fyeh/⟩.
Zacks, M.A., Garg, N., 2006. Recent developments in the molecular, biochemical and functional characterization of GPI8 and the GPI-anchoring mechanism. Mol. Membr. Biol. 23, 209–225.
Zhu, K.Y., Lee, S.H., Clark, M., 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. Pestic Biochem. Physiol. 55, 100–108.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Organophosphate resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Tephritidae

E. G. Kakani & K. D. Mathiopoulos

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

Keywords
ace, glycosyl-phosphatidyl-inositol, insecticide, tolerance

Correspondence
Kostas D. Mathiopoulos (corresponding author), Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26, Larissa 41221, Greece.
E-mail: kmathiop@bio.uth.gr

Received: May 26, 2008; accepted: November 20, 2008.

doi: 10.1111/j.1439-0418.2008.01373.x

Abstract

Tephritid insects comprise one of the most devastating families of insect pests worldwide. Organophosphate insecticides have been extensively used for their control during the last 40 years. Inevitably, this has led to the development of resistance. Acetylcholinesterase is the principal target of organophosphates (OP) and, consequently, its gene is the most likely locus where resistance mutations appear. In this review, OP resistance-associated mutations in Tephritidae are described. Apart from the mutations that lie in the catalytic centre of the enzyme, those that lie at the C-terminal of the protein are of particular interest as they indicate a possible new mechanism of resistance. Nonetheless, the number of resistance-associated mutations in the catalytic centre of the Tephritidae *ace* gene is low, a fact that could be attributed to the fitness cost that any other mutations may have.

Introduction

The Tephritidae family, commonly referred to as 'true fruit flies', is found all over the world. It includes more than 4000 species arranged in about 500 genera (Foote et al. 1993). The New World genus *Anastrepha*, the primarily African genus *Ceratitis* and the genus *Bactrocera* are the most agriculturally important genera of flies, as they are capable of attacking a wide range of commercially produced fruits and vegetables. Worldwide crop losses have been estimated to amount up to 50% of the total agricultural output (Shani 1998). Despite the growing ecotoxicological concerns, chemical pesticides remain the principal tool for insect management. Among the synthetic pesticides used, organophosphorus (OP) and carbamate (CB) esters correspond to the most significant part of the pesticide market for more than four decades (Casida and Quistad 1998). Both classes target acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) and owe their primary toxicity to the irreversible inhibition of the enzyme.

Acetylcholinesterase, Target of OPs

Acetylcholinesterase is a member of the serine hydrolase family of enzymes and a key enzyme in the central nervous system of insects. Normally, AChE is responsible for the hydrolytic degradation of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) at cholinergic synapses and terminates impulse transmission (Rosenberry 1975; Toutant 1989). In Tephritidae there is only a single acetylcholinesterase (*ace*) gene, whereas in other insect species (mosquitoes, aphids, leafhopper) two *ace* genes are expressed (Bourguet et al. 1996; Tomita et al. 2000; Li et al. 2002). In several species, AChE exist in either asymmetric or globular molecular forms (for reviews, see Massoulié and Bon 1982; Rosenberry 1985). In insects, the predominant AChE form is a glycosylated globular amphiphilic dimer anchored to cell membrane via a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) structure at the C-terminal of each catalytic subunit (Gnagey et al. 1987; Fournier et al. 1988). In this way, the C-terminal of the protein governs its eventual cellular localization. According to the three-dimensional

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

(3D) structure of the *Drosophila melanogaster* AChE (DmAChE), the only invertebrate structure elucidated so far, the catalytic triad of the active site is composed of three residues: serine, histidine and glutamic acid (Ser238, His440 and Glu367) (Harel et al. 2000). Sant' Anna et al. (2006) suggested that serine acts as a nucleophile towards the carbonyl group of ACh, histidine serves as a general acid–base catalyst (that reduces the energetic cost for the nucleophilic attack) and glutamine interacts with the imidazole group of the catalytic histidine residue. This catalytic domain of AChE is flanked by aromatic residues located at the loops between different beta sheets and their role is to guide the substrate from the protein surface to the bottom of the gorge (Felder et al. 1997; for a review, see Zimmerman and Soreq 2006).

Organophosphate and CB pesticides are analogues of ACh. They phosphorylate or carbamoylate the serine hydroxyl group within the active site gorge (Corbett 1974; O'Brien 1976; Matsumura 1985), blocking the degradation of ACh. The accumulation of ACh in the synaptic cleft generates a continuous stimulus that leads to tremors and uncoordinated movement and finally to the death of the insect (Aldridge 1950; Eldefrawi and Eldefrawi 1976; Eldefrawi et al. 1982).

Organophosphate Resistance Mechanisms

The intensive and excessive use of OP and CB pesticides over the past 40 years led to the development of insecticide-resistant insects across a range of species (Georghiou 1990; Claudianos et al. 1999). Resistance is the result of either biochemical–metabolic or target-site modifications, i.e. increased insecticide metabolism or alteration of a target protein (Fournier et al. 1992; Scott and Dong 1994; Feyereisen 1995). In the case of resistance against OPs and CBs, Fournier et al. (1992) showed that both quantitative and qualitative changes in AChE could lead to resistance development. However, the predominant mechanism that has been implicated in most OP resistance cases is the qualitative modification of the AChE enzyme. The first case of correlation between OP resistance and AChE had been described in the two-spotted spider mite (Smissaert 1964; Voss and Matsumura 1964). Since then, over 30 species have been proven resistant to OPs and CBs because of AChE modification (Fournier and Mutero 1994; Fournier 2005; Oakeshott et al. 2005). In almost all cases, the modification of the *ace* gene regards point mutations of amino acid residues that are predicted to be located in the active site gorge of the enzyme and indicates that certain positions are important in the phosphorylation or carbomylation of the enzyme by insecticides (Mutero et al. 1994). These mutations are often bulkier than the corresponding wild-type residues. This points to a mechanism that involves a steric alteration or an alteration of the orientation of the active site residues in such a way that the neck of the gorge is constricted affecting the entrance and the binding of the insecticides to the base of the active site gorge (Harel et al. 2000). In general, the level of insecticide insensitivity conferred by a single polymorphism is low, but combinatory point mutations generate increasingly more resistant enzymes (Mutero et al. 1994; Walsh et al. 2001; Vontas et al. 2002).

Such mutations have been described in *Drosophila melanogaster* (Fournier et al. 1992; Mutero et al. 1994), several mosquito species (Vaughan et al. 1997; Weill et al. 2004), *Musca domestica* (Williamson et al. 1992; Feyereisen 1995; Kozaki et al. 2001; Walsh et al. 2001), *Aphis gossypii* (Andrews et al. 2004; Toda et al. 2004), as well as in other hemipteran species (Javed et al. 2003). The only documented report of a resistance-associated mutation outside the catalytic region of AChE is that of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu et al. 1996), in which resistance is hypothesized to be associated with a more generalized change of the secondary structure of the protein.

ace Mutations in Tephritidae

The development of insecticide resistance to OPs and CBs in the field has been reported in *Bactrocera oleae*, *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis capitata* and *Dacus ciliatus*. However, among these pests, resistance-associated mutations in the *ace* gene have been identified only in the first three (fig. 1).

The olive fly, *Bactrocera oleae*

The olive fruit fly *Bactrocera oleae* Gmelin is the most destructive and intractable pest of olives (Navrozidis et al. 2000). It is found in almost every olive-producing country, primarily in the Mediterranean basin, along the east coast of Africa and recently in California, USA (Rice 1999). Despite early limited efforts for developing biological control strategies [sterile insect technique (SIT)] (Economopoulos et al. 1977), natural enemies (Kapatos 1989), mass trapping systems (Broumas et al. 2002) and the new switch towards pyrethroids and the macrocyclic lactone

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

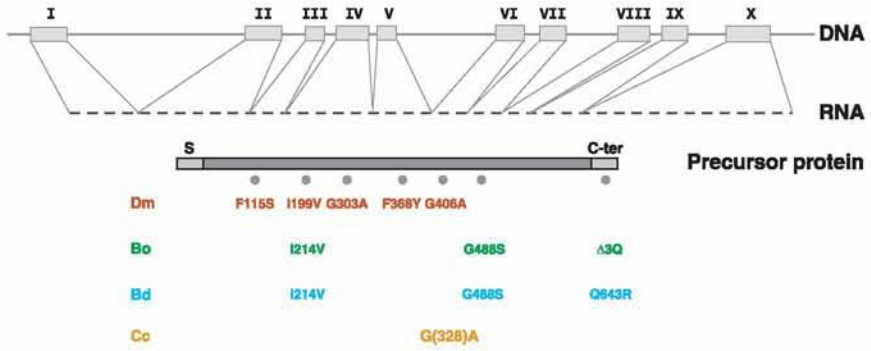


Fig. 1 Organophosphate resistance-associated mutations in the *ace* gene of *Drosophila* (Dm), *Bactrocera oleae* (Bo), *Bactrocera dorsalis* (Bd) and *Ceratitis capitata* (Cc). The top line with the shaded boxes shows the molecular organization of the regions coding the mature protein. Exons are numbered I to X. Exon sequences are highly conserved whereas intron sequences vary a lot between species. The total length of the Dm *ace* transcript is about 34 kb long (Fournier et al. 1989). The exact length in Tephritidae is not known but at least in *B. oleae* the so far isolated introns are much longer than the Dm ones (E. G. Kakani, M. Trakala, K. D. Mathiopoulos, unpublished data). The lower part depicts the protein sequence with the positions of the discussed mutations in the different species. The numbering refers to the precursor protein. The G(328)A numbering of *C. capitata* refers to the corresponding amino acid in the mature *Torpedo* AChE. S = signal peptide. C-ter = carboxyl-terminal hydrophobic peptide exchanged in the mature protein with a GPI anchor; this is the least conserved part of the protein.

spinosad (Haniotakis 2003), the management of *B. oleae* in the last four decades has been based on the use of OP insecticides.

Early studies in the 1970s indicated that a quantitative, rather than a qualitative, change in AChE was associated with resistance of *B. oleae* to dimethoate (Tsakas and Krimbas 1970; Krimbas and Tsakas 1971; Tsakas 1977). A duplication of the *ace* gene was hypothesized. Three decades later, however, qualitative changes of the enzyme were proven responsible for OP resistance: three mutations in the *ace* gene were isolated and shown to correlate with higher levels of tolerance in *B. oleae*. (Vontas et al. 2001, 2002; Kakani et al. 2008).

The *B. oleae ace* gene has a open-reading frame of 2022 bp, encoding a putative protein of 673 amino acids, which presents 79% identity with *D. melanogaster*'s 649-amino acid protein (Vontas et al. 2002). Analysis of the *ace* locus in *B. oleae* showed a structure similar to that of *D. melanogaster* (E. G. Kakani, M. Trakala, K. D. Mathiopoulos, unpublished data). It is composed of 10 exons (I–X), with the start codon being located in the second exon and the stop codon in exon X (fig. 1). The carboxyl-terminal of the protein undergoes enzymatic cleavage and is substituted by a GPI anchor (E. G. Kakani, M. Trakala, K. D. Mathiopoulos unpublished data).

ace mutation I214V

This is one of the first two mutations discovered in a resistant *B. oleae* strain from Attiki (Vontas et al. 2002). It is in exon IV of the *B. oleae ace* gene (fig. 1), changing an ATA codon to GTA and leading to the replacement of an isoleucine by a valine. This I214V mutation is equivalent to the I199V mutation of the *D. melanogaster ace* gene, which is involved in the development of low OP resistance level (Mutero et al. 1994). The role of this substitution was studied in detail in *D. melanogaster*. The 3D structure of DmAChE reveals that isoleucine 199 is located at the bottom of the active site gorge and interacts with tryptophan 121. Tryptophan 121 participates in the anionic site, which recognizes and binds the trimethylammonium moiety of ACh or the leaving group of the insecticide (Harel et al. 2000). The substitution of isoleucine with valine changes the mobility of tryptophan 121, increasing its freedom. Generally, this results in limiting the access of insecticide molecules to the catalytic serine residue and in the subsequent decrease in deacetylation activity. The altered AChE is less inhibited, decreasing the phosphorylation and leading to resistant insect strains. Although valine is smaller than isoleucine and decreases the stability of the protein, the ACh can still sufficiently bind to the serine, and hence the cholinergic function of the enzyme is not interrupted (Shi et al. 2004). A similar role is hypothesized for *B. oleae*'s I214V (Vontas et al. 2002).

ace mutation G488S

This mutation was discovered in the aforementioned Attiki resistant strain and, together with the I214V, conferred a 16-fold resistance in an enzyme inhibition assay with omethoate (Vontas et al. 2002). The glycine at position 488 of the *B. oleae* enzyme is a highly conserved residue across species, indicating

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

that it possesses a significant role in the protein, be that structural or functional. This residue is equivalent to G474 in *Drosophila* (Sussman et al. 1991; Mutero et al. 1994). Despite the fact that the substitution of conserved amino acids is usually responsible for target-site resistance across a wide range of species (ffrench-Constant et al. 1998), mutation G488S has been identified only in *B. oleae* and *B. dorsalis* (Vontas et al. 2002; Hsu et al. 2006). It is located at exon VII of the *B. oleae* gene (fig. 1) and is the result of the changing of GGC to AGC. Analysis of G488S based on the *Drosophila* model (Harel et al. 2000) demonstrated that resistance arises from the steric hindrance caused by the mutation. The G488 is located at the helix close to the active site of the enzyme. In this region, the distance between the alpha carbon atoms of amino acids is very small (3.5 Å). Therefore, any change of an amino acid that causes an alteration of the side chain would result in the displacement of the helix. The replacement of a glycine by a serine, a bulkier amino acid, is likely to affect the configuration of the adjacent glutamate in the catalytic triad. This altered orientation of the glutamate enhances the nucleophilic attack of water on the carbonyl group of the phosphorylated serine (Vontas et al. 2002). Walsh et al. (2001) proposed the same role for mutation G365A in *M. domestica ace* gene, which causes insensitivity to insecticide.

ace mutation Δ3Q

The above two mutations are found almost in homozygosity in about 90% of the samples tested in Greece and Cyprus (Shouras et al. 2007). However, this high frequency was not correlated with a large resistance-level variation observed in these samples (Kakani et al. 2008). The search for other contributing factors that could account for the observed resistance variation led to the discovery of a novel short deletion in the carboxyl terminal of AChE. This BoaceΔ3Q mutation is located in exon X of the *B. oleae ace* gene (fig. 1) and corresponds to the deletion of three glutamines at positions 642 to 644. It is located outside the catalytic centre of AChE and is speculated to affect the GPI-anchoring efficiency or the stability of the protein (Kakani et al. 2008).

The proper function of AChE does not only require an efficient catalytic activity but also a precise localization of the enzyme. The modification that plays the most important role in the correct localization of AChE regards the enzymatic cleavage of the enzyme's hydrophobic carboxyl-terminal domain and its substitution by a GPI anchor (for reviews, see Massoulié et al. 1993, 1999). GPI is used for anchoring several cell-surface proteins to the plasma membrane. Studies on GPI-anchored proteins have indicated characteristic features of the GPI anchor addition signal. These consist of a stretch of three amino acids (ω, $\omega + 1$, $\omega + 2$, where ω signifies the last amino acid that remains after the cleavage), followed by a hydrophilic spacer segment of 8–12 amino acids and a terminal hydrophobic segment of 12–20 amino acids (Furukawa et al. 1997; Maeda et al. 2006; Zacks and Garg 2006). Failure to satisfy these criteria results in abolished GPI anchoring and therefore improper localization. These features have also been used to create computer algorithms in order to predict potential GPI modification sites in protein sequences (Eisenhaber et al. 1999).

Amino acids at positions 634, 635 and 636 of the olive fly's AChE are three typical amino acids that could be used as ω, $\omega + 1$ and $\omega + 2$ sites, respectively. If Ser634 were, indeed, the actual ω site in the wild-type enzyme (arrow in fig. 2), it would generate an unusually long hydrophilic spacer region (of 16 amino acids), which is beyond the limits of the 'canonical' structure of Furukawa et al. (1997). The deletion of the three glutamine residues of the BoaceΔ3Q mutation would shorten the spacer region, complying better with the prerequisites for optimal processing. Interestingly, a hypothetical mutation that lacks all five glutamines of the hydrophilic spacer would generate an optimal ω site and spacer length. The effect of spacer length is also reflected in the GPI predictor score and the hydrophilicity plots presented in fig. 2. The score is improved as long as the hydrophilic spacer region is shortened between the wild type and the mutants. In addition, the hydrophilicity plots of fig. 2 show that the plots of the two mutants resemble much more that of *D. melanogaster*. It is evident that the long hydrophilic spacer region of *B. oleae*'s wild-type AChE presents two 'hunches', while the deletion of three or five glutamines in the two mutants shifts their hydrophilicity profile to a more *Drosophila*-like plot. The importance of the spacer region is also demonstrated by the GPI scores and hydrophilicity plots of *C. capitata* and *B. dorsalis*: the shorter the length of the spacer the better the GPI scores and the more resemblance to the *D. melanogaster* hydrophilicity profile (fig. 2).

Consequently, it is hypothesized that the mutant BoaceΔ3Q fly undergoes a more efficient GPI modification, thus producing more anchored AChE molecules than the wild-type fly. In fact, it has been

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

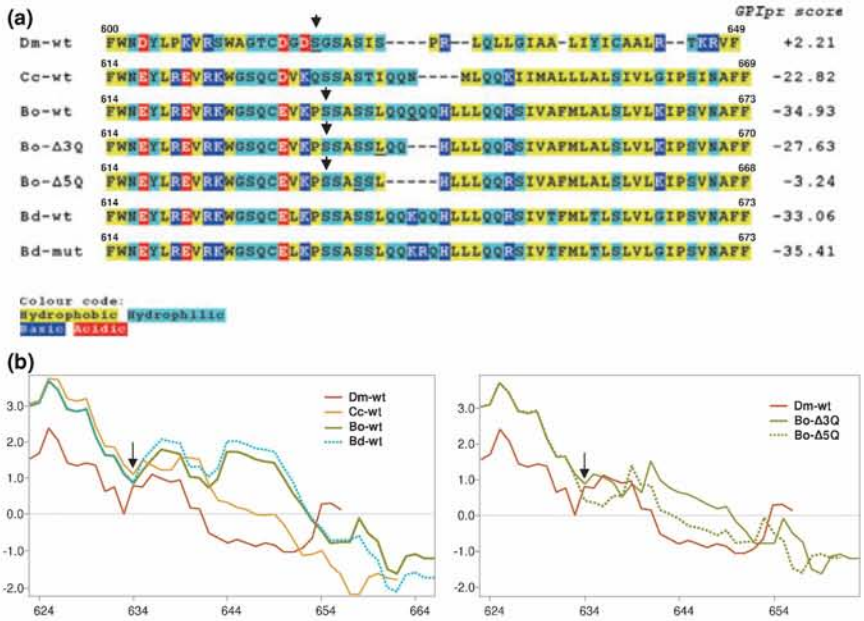


Fig. 2 (a) Alignment of the AChE carboxyl-terminal domain of *D. melanogaster* wild type (Dm-wt), *C. capitata* wild type (Cc-wt), *B. oleae* wild type (Bo-wt), *B. oleae* Δ3Q mutant (Bo-Δ3Q), *B. oleae* Δ5Q hypothetical mutant (Bo-Δ5Q), *B. dorsalis* wild type (Bd-wt) and *B. dorsalis* mutant Q643R (Bd-mut). Numbers over the protein sequences (at the beginning and the end) refer to the amino acid numbers of the mature protein. The predicted ω amino acids are underlined. To the right of the protein sequences are the predicted scores for GPI anchoring. (b) Goldman, Engelman and Steitz (GES) hydrophilicity plots. To the left, the wild-type C-terminal hydrophilicity plots of *D. melanogaster*, *C. capitata*, *B. oleae* and *B. dorsalis* are superimposed. Colour codes are shown on the graph. To the right, the C-terminal hydrophilicity plots of *B. oleae* Δ3Q and Δ5Q mutants are superimposed to the plot of *D. melanogaster* for comparison. Colour codes are shown on the graph. Arrows indicate the position of the predicted (by big-PI predictor) ω site in *D. melanogaster* and the hypothesized ω sites in *B. oleae*. On the *x*-axis, numbers refer to the amino acid numbers of the mature *B. oleae* protein. On the *y*-axis, numbers above 0.0 indicate hydrophilic regions, whereas numbers below 0.0 indicate hydrophobic regions.

shown that the natural length of the spacer region in the human AChE is not optimal for the highest degree of GPI modification (Bucht et al. 1999). Similarly, the mutant BoaceΔ3Q fly would generate sufficient amounts of the enzyme both for the efficient metabolism of ACh and for the interaction with the insecticide. As a result, ACh would not accumulate into the synaptic cleft and the insect would survive higher doses of insecticide. There is evidence that increased AChE production may contribute to resistance. In fact, the level of AChE was estimated in different *D. melanogaster* strains from field-collected samples and the amount of the enzyme was directly correlated with insecticide resistance (Charpentier and Fournier 2001).

Be that as it may, the question still remains as to the exact localization of the mutated protein and its stability, the affinity for the normal substrate (ACh) or the insecticide and the *in vivo* activity. Models predict that the lack of all five glutamine residues would greatly increase the GPI modification of the protein. So, why does wild type maintain the five glutamines, theoretically decreasing the GPI modification? AChE is one of the fastest known enzymes with up to 104 substrate molecules being hydrolysed per second by each enzyme molecule, and its enzymatic velocity seems to be limited only by the diffusion velocity of its substrate (Quinn 1987). It may be that the insect needs to moderate the enzyme's activity by obstructing its proper localization through a less efficient GPI anchoring. However, the presence of insecticide may inhibit the normal function of a number of enzyme molecules, obligating the insect to compensate through the optimization of GPI anchoring. This would facilitate the enzyme's localization and would bring more enzymes to the synaptic cleft.

The oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*

The oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) is an agriculture pest of considerable economic importance. It has been recovered from more than 150 kinds of fruits and vegetables, including avocado, mango and papaya, which are the most commonly attacked and it is distributed all over South Asia and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

the Hawaiian Islands (Christenson and Foote 1960). Even though fly control is based on OP insecticides (fenitrothion) since 1960 (Nishizawa et al. 1961), no resistance to malathion had been observed until 1989 (Keiser 1989). In 2002, however, Hsu and Feng (2002) observed that the oriental fruit fly had developed cross-resistance or multiple resistance to OPs. Four years later, this resistance was attributed to qualitative alterations of AChE (Hsu et al. 2004, 2006).

Bactrocera dorsalis AChE is a 673-amino acid protein, presenting 97% identity to the *B. oleae* sequence, differing only in 17 amino acid residues (Hsu et al. 2006). The comparison between the *ace* gene of the oriental fruit flies susceptible and resistant to fenitrothion revealed three point mutations (I214V, G488S and Q643R) associated with AChE insensitivity. The I214V and G488S substitutions are identical to those reported previously in the catalytic domain of *B. oleae* (Vontas et al. 2002). The independent occurrence of these two identical mutations in both species is particularly striking because different insecticides (dimethoate and fenitrothion) served as the underlying selective pressure. This suggests that either the mechanism that leads to resistance development of these two chemically different insecticides is similar, or that the enzyme cannot accommodate many more resistance mutations. The third mutation Q643R is located at the end of the protein (fig. 1). Glutamate 643 is one of the three glutamates that is absent in the Δ3Q mutation of *B. oleae*, indicating that this region contributes to the development of resistance. However, the exact role of Q643R has not been elucidated yet.

The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*

Ceratitis capitata (Wiedemann), the Mediterranean fruit fly (medfly), is a tephritid polyphagous insect and one of the most destructive fruit fly pests around the world (Harris 1989). Medfly attacks more than 260 different fruits, flowers, vegetables and nuts, primarily temperate and sub-tropical, including citrus, oranges, peaches and apples (Liquido et al. 1991). Insect control is mainly based on malathion cover spays. Despite the insect's exposure to OPs for several years, no resistance had been observed until the late 1990s (Wood and Harris 1989; Viñuela 1998). The explanation offered was the incomplete selection pressure of the insecticide (Orphanidis et al. 1980). Nevertheless, minor resistance to malathion was developed in the laboratory after 18 generations of selective pressure (Koren et al. 1984), a fact that showed the ability of the insect to develop resistance. Indeed, two- to 60-fold resistance of a medfly field population to malathion was reported in 2007 (Magaña et al. 2007). A year later, the involvement of medfly's *ace* locus was implicated (Magaña et al. 2008).

The known *C. capitata ace* coding sequence covers exons 2 to 10 (2010 bp) (Magaña et al. 2008; Hernandez-Crespo P, personal communication). The corresponding 669-amino acid protein presents 99%, 97% and 89% identity to that of *B. dorsalis*, *B. oleae* and *D. melanogaster* AChE sequence, respectively (Magaña et al. 2008). The alignment of the AChE sequence between susceptible and resistant medfly individuals revealed a substitution of the glycine codon (GGC) at amino acid position 328 (Torpedo numbering) to an alanine (GCC) one in resistant flies (fig. 1). This mutation is equivalent to the G365A of *M. domestica* (Walsh et al. 2001), the G406A of *D. melanogaster* (Menozzi et al. 2004) and is very close to the G488S of *B. oleae* (Vontas et al. 2002) that was mentioned above. All these mutations are located close to the glutamate of the catalytic triad and associated with OP-insensitive AChE. It is speculated that they all affect the normal AChE activity because of the steric hindrance of the mutated enzyme, as analysed above in *B. oleae*'s G488S mutation.

The pumpkin fly, *Dacus ciliatus*

The lesser pumpkin fly, *Dacus ciliatus* (Loew), is considered a pest of economic importance, especially of cucurbit crops (Hancock 1989). Malathion is the usual choice of insecticide, frequently combined with protein hydrolysate to form a bait spray (Roessler 1989). Maklakov et al. (2001) studied the sensitivity of pumpkin fly to OPs and found high resistance in field populations to malathion. Albeit still unclear, they suggest an altered AChE as the most likely mechanism of resistance.

Conclusions

At least 14 different mutations have been described that reside in and around the active site gorge of the *ace* gene and confer resistance to different insects (Fournier 2005). Most of these mutations are conserved in several species, despite the widely differing sizes and structures of OP insecticides. There are at least two reasons that may account for this. One may be due to the necessity for resistance targets to maintain their wild-type functions and to the fitness

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

cost some of these mutations may carry (Mutero et al. 1994). The second may relate to the fact that, because of the enzyme similarity among species, there are a limited (and always the same) number of residues that interact with the insecticide and could therefore be targets for mutagenesis (ffrench-Constant et al. 1998). Perhaps these resistance-associated mutations have little effect on normal enzyme function and can be readily maintained in natural populations. In fact, resistance to malathion was detected in pinned specimens of Australian sheep blow-flies that were collected prior to the introduction of the insecticide, which suggests that resistance alleles preexisted at sufficient frequencies without imposing a fitness cost on the natural population (Hartley et al. 2006).

The question that arises, then, is why are there so few AChE mutations observed in Tephritidae so far? The answer may lie in the fact that these pests, even though consistently controlled with OP insecticides for more than 40 years, have encountered a limited variety of them, that is fenthion/fenitrothion and dimethoate/omethoate. Therefore, the two mutations observed in the active site gorge of *B. oleae* and *B. dorsalis* may be the best combination that confers lowest fitness cost and highest resistance to the two OPs used against natural populations. It may be that the larger number of *ace* mutations acquired by other insects is due to their exposure to a larger variety of OPs and CBs. In fact, *in vitro* expression of mutated proteins that contained several OP-associated mutations at the same protein both increased the resistance level and provided a wide spectrum of resistance (Menozzi et al. 2004). Alternatively, it could be that the active site gorge of *Bactrocera*'s *ace* gene is saturated with I214V and G488S and any more mutations would hamper normal AChE function and greatly affect the fitness of these flies. In either case, the need to reach any higher resistance levels may result in completely different mechanisms of resistance that involve the GPI ability of the enzyme.

References

Aldridge WN, 1950. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. J. Biochem. (Tokyo) 46, 451–460.

Andrews MC, Callaghan A, Field LM, Williamson MS, Moores GD, 2004. Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. Insect Mol. Biol. 13, 555–561.

Bourguet D, Raymond M, Fournier D, Malcolm CA, Toutant JP, Arpagaus M, 1996. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J. Neurochem. 67, 2115–2123.

Broumas T, Haniotakis G, Liaropoulos C, Tomazou T, Ragoussis N, 2002. The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae): pilot-scale feasibility studies. J. Appl. Entomol. 126, 217–223.

Bucht G, Wikström P, Hjalmarsson K, 1999. Optimizing the signal peptide for glycosyl phosphatidylinositol modification of human acetylcholinesterase using mutational analysis and peptide-quantitative structure-activity relationships. Biochim. Biophys. Acta 1431, 471–482.

Casida JE, Quistad GB, 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? Annu. Rev. Entomol. 43, 1–16.

Charpentier A, Fournier D, 2001. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. Pesticide Biochem. Physiol. 70, 100–107.

Christenson LD, Foote RH, 1960. Biology of fruit flies. Annu. Rev. Entomol. 5, 171–192.

Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG, 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 675–686.

Corbett JR, 1974. The Biochemical Mode of Action of Pesticides. Academic Press, London.

Economopoulos AP, Artis N, Zervas G, Tsitsipis G, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Mamoukas A, 1977. Control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by the combined effect of insecticides and release of gamma sterilized insects. Z. Angew Ent. 83, 201–215.

Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F, 1999. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. J. Mol. Biol. 292, 741–758.

Eldefrawi AT, Eldefrawi ME, 1976. Identification of a calcium-binding subunit of the acetylcholine receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1020–7.

Eldefrawi AT, Mansour NA, Eldefrawi ME, 1982. Insecticides affecting acetylcholine receptor interactions. Pharmacol. Ther. 16, 45–65.

Felder CE, Botti SA, Lifson S, Silman I, Sussman JL, 1997. External and internal electrostatic potentials of cholinesterase models. J. Mol. Graph Model 15, 318–327; 335–337.

Feyereisen R, 1995. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicol. Lett. 82/83, 83–90.

ffrench-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N, 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 353, 1685–1693.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Foote RH, Blanc FL, Norrbom AL, 1993. Handbook of the Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico. Comstock, Ithaca, NY.

Fournier D, 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. Chem. Biol. Interact. 157–158, 257–261.

Fournier D, Mutero A, 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. Comp. Biochem. Physiol. 108C, 19–31.

Fournier D, Bride JM, Karch F, Berge JB, 1988. Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*. Identification of two subunits encoded by the same gene. FEBS Lett. 238, 333–337.

Fournier D, Karch F, Bride JM, Hall LM, Berge JB, Spierer P, 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. J. Mol. Biol. 210, 15–22.

Fournier D, Bride JM, Hoffman F, Karch F, 1992. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticides. J. Biol. Chem. 267, 14270–14274.

Furukawa Y, Tsukamoto K, Ikezawa H, 1997. Mutational analysis of the C-terminal signal peptide of bovine liver 5′-nucleotidase for GPI anchoring: a study on the significance of the hydrophilic spacer region. Biochim. Biophys. Acta 1328, 185–196.

Georghiou G P, 1990. Overview of insecticide resistance. ACS Symp. Ser. 421, 18–41.

Gnagey AL, Forte M, Rosenberry TL, 1987. Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. J. Biol. Chem. 262, 13290–13298.

Hancock DL, 1989. Pest status; Southern Africa. In: World crop pests 3 (A): Fruit flies: their biology, natural enemies and Control, Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier, Amsterdam, 51–58.

Haniotakis GE, 2003. Olive Pest Control: Present Status and Prospects. Proc. IOBC/WPRS Conf. Integr. Prot. Olive Crops, Chania, Crete.

Harel M, Kryger G, Rosenberry T, Mallender WD, Lewis T, Fletcher RJ, Guss JM, Silman I, Sussman JL, 2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. Protein Sci. 9, 1063–1072.

Harris EJ, 1989. Hawaiian islands and North America. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 3b, Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier, Amsterdam, 73–81.

Hartley CJ, Newcomb RD, Russell RJ, Yong CG, Stevens JR, Yeates DK, La Salle J, Oakeshott JG, 2006. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103, 8757–8762.

Hsu JC, Feng HT, 2002. Susceptibility of melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and oriental fruit fly (*B. dorsalis*) to insecticides in Taiwan. Plant Prot. Bull. 44, 303–314 (in Chinese, with English abstract).

Hsu JC, Feng HT, Wu WJ, 2004. Resistance and synergistic effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. J. Econ. Entomol. 97, 1682–1688.

Hsu JC, Hymer DS, Wu WJ, Feng HT, 2006. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 396–402.

Javed N, Viner R, Williamson MS, Field LM, Devonshire AL, Moores GD, 2003. Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Insect Mol. Biol. 12, 613–620.

Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Mathiopoulos KD, 2008. A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 781–787.

Kapatos ET, 1989. Integrated pest management systems of *Dacus oleae*. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 3B. Ed. by Rombinson AS, Hooper GHS, Elsevier, Amsterdam, 391–398.

Keiser I, 1989. Insecticide resistance status. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies, and Control, vol 3B. Ed. by Robinson AS, Hopper G, Elsevier, Amsterdam, 337–344.

Koren B, Yawetz A, Pery AS, 1984. Biochemical properties of characterizing the development of tolerance to malathion in *Ceratitis capitata*, Wiedmann (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 77, 864–867.

Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y, 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 991–997.

Krimbas CB, Tsakas S, 1971. The genetics of *Dacus oleae*. V. Changes of esterase polymorphism in a natural population following insecticide control: selection or drift? Evolution 25, 454–460.

Li F, Han ZJ, 2002. Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*), Genome 45, 1134–1141.

Liquido NJ, Shinoda LA, Cunningham RT, 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae): an annotated world review. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 77, 1–52.

Maeda Y, Ashida H, Kinoshita T, 2006. CHO glycosylation mutants: GPI anchor. Methods Enzymol. 416, 182–205.

Magaña C, Hernandez-Crespo P, Ortego F, Castanera P, 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. J. Econ. Entomol. 100, 1836–1843.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Magaña C, Hernandez-Crespo P, Brun-Barale A, Couso-Ferrer F, Bride JM, Castanera P, Feyereisen R, Ortego F, 2008. Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 756–762.

Maklakov A, Ishhaya I, Freidberg A, Yametz A, Horowitz AR, Yarom I, 2001. Toxicological studies of organophosphate and pyrethroid insecticides for controlling the fruit fly *Dacus ciliates* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 94, 1059–1066.

Massoulié J, Bon S, 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Annu. Rev. Neurosci. 5, 57–106.

Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM, 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog. Neurosci. 41, 31–91.

Massoulié J, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N, Simon S, 1999. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. Chem. Biol. Interact. 119-120, 29–42.

Matsumura F, 1985. Toxicology of Insecticides, 2nd edn. Plenum Press, New York.

Menozzi P, Shi MA, Lougarre A, Tang ZH, Fournier D, 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. BMC Evol. Biol. 4, 4.

Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D, 1994. Resistance-associated point mutation in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 5922–5926.

Navrozidis EI, Vasara E, Karamanlidou G, Salpiggidis GK, Koliais SI, 2000. Biological control of *Bactocera oleae* (Diptera: Tephritidae) using a Greek *Bacillus thuringiensis* isolate. J. Econ. Entomol. 93, 1657–1661.

Nishizawa Y, Fujii K, Kadota T, Miyamoto J, Sakamoto H, 1961. Studies on organophosphorus insecticides part VII. Chemical and biological properties of new low toxic organophosphorus insecticide, O, O-dimiethyl-O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate. Agric. Biol. Chem. 25, 605–610.

O'Brien RD, 1976. Acetylcholinesterase and its inhibition. In: Insecticide Biochemistry and Physiology. Ed. by Wilkinson CF, Heyden Press, Chichester, 271–296.

Oakeshott J, Devonshire A, Claudianos C, Sutherland T, Horne I, Campbell P, Ollis D, Russell R, 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. Chem. Biol. Interactions 157–158, 269–275.

Orphanidis PS, Kalmoukos SB, Betzios B, Kapetanakis E, 1980. Development of resistance in *Ceratitis capitata* Wied. in laboratory under intermittent pressure of organophosphorus and chlorinated insecticides. Ann. Inst. Phytopathol. Benaki 12, 198–207.

Quinn DM, 1987. Acetylcholinesterase dynamics, and virtual transition states. Chem. Rev. 87, 955–979.

Rice RE, 1999. Olive fruit fly, *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae*. UC Plant Prot. Quart., 9, 2.

Roessler Y, 1989. Insecticides; insecticidal bait and cover sprays. In: World Crop Pests. Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control, vol. 3B. Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier, Amsterdam, 329–336.

Rosenberry TL, 1975. Acetylcholinesterase. Adv. Enzymol. 43, 103–218.

Rosenberry TL, 1985. Structural distinctions among acetylcholinesterase forms. In: The Enzymes of Biological Membranes, 2nd edn, Vol. IV. Ed. by Martonosi A, Plenum Publishing Corp., New York, 403–429.

Sant' Anna CMR, Viana ADS, Nascimento NMD Jr, 2006. A semiempirical study of acetylcholine hydrolysis catalyzed by *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. Bioorg. Chem. 34, 77–89.

Scott JG, Dong K, 1994. kdr-Type resistance in insects with special reference to the German cockroach, *Blattella germanica*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 109, 191–8.

Shani A, 1998. Integrated pest management using pheromones. Chemtech 28, 30–35.

Shi MA, Lougarre A, Alies C, Fremaux I, Tang ZH, Stojan J, Fournier D, 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. BMC Evol. Biol. 4, 5.

Skouras PJ, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Ioannides IM, Kakani EG, Mathiopoulos KD, Tsitsipis JA, 2007. Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. Pest Manage. Sci. 63, 42–48.

Smissaert HR, 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. Science 143, 407–409.

Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science 253, 872–879.

Toda S, Komazaki S, Tomita T, Kono Y, 2004. Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididaee). Insect Mol. Biol. 13, 549–553.

Tomita T, Hidoh O, Kono Y, 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 325–333.

Toutant JP, 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog. Neurobiol. 32, 423–446.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38

Tsakas S, 1977. Genetics of *Dacus oleae*. VIII. Selection for the amount of acetylcholinesterase after organophosphate treatment. Evolution 31, 901–904.

Tsakas S, Krimbas CB, 1970. The genetics of *Dacus oleae*. IV. Relation between adult esterase genotypes and survival to organophosphate insecticides. Evolution 24, 807–815.

Vaughan A, Rochelaeau T, ffrench-Constant R, 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. Exp. Parasitol. 87, 237–244.

Viñuela E, 1998. La resistencia a insecticidas en Espana. Bol. San. Veg. Plagas. 24, 487–496.

Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Hejazi MJ, Ayoutanti A, Hemingway J, 2001. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Pestic. Biochem. Physiol. 71, 124–132.

Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Hemingway J, 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Mol. Biol. 11, 329–336.

Voss G, Matsumura F, 1964. Resistance to organophosphorus compounds in the two-spotted spider mite: two different mechanisms of resistance. Nature 202, 319–320.

Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS, 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. Biochem. J. 359, 175–181.

Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marguine M, Raymond M, 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol. Biol. 13, 1–7.

Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL, 1992. Altered forms of acetylcholinesterase in insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). In: Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions. Ed. by Shafferman A and Velan B, Plenum Press, New York, 83–86.

Wood RJ, Harris DJ, 1989. Artificial and natural selection. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control, vol. 3B. Ed. by Robinson AS, Hopper G, Elsevier, Amsterdam, 19–31.

Zacks MA, Garg N, 2006. Recent developments in the molecular, biochemical and functional characterization of GPI8 and the GPI-anchoring mechanism. Mol. Membr. Biol. 23, 209–225.

Zhu KY, Lee SH, Clark M, 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. Pestic. Biochem. Physiol. 55, 100–108.

Zimmerman G, Soreq H, 2006. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. Cell Tissue Res. 326, 655–669.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
02/05/2026 07:33:43 EEST - 216.73.217.38