

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ,ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΟ ΝΑΤΟΥΡΑΛΙΤΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ
SPINOSAD

ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**« Διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς στο
νατουραλίτη εντομοκτόνο spinosad »**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ
ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ**

ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

**ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

**ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ, ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
1. Εισαγωγή	8
1.1 Έλεγχος Εντόμων	8
1.2 Ανθεκτικότητα.....	11
1.3 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης στα έντομα	21
1.4 Εντομοκτόνο Spinosad	26
1.5 Δάκος της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i>	31
1.6 Σκοπός.....	33
2. Υλικά- Μέθοδοι	35
2.1 Εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων	35
2.2 Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα έντομα <i>Bactrocera oleae</i>	35
2.3 Σύνθεση μονόκλωνου cDNA από ολικό RNA.....	37
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	38
2.5. Ηλεκτροφόρηση	40
2.6 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	41
2.7 Κατακρήμνιση DNA.....	43
2.8 Εκχύλιση του DNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο	44
2.9 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation).....	44
2.10 Παρασκευή Δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση	46
2.11 Ηλεκτροδιάτρηση	47
2.12 Δημιουργία stock γλυκερόλης.....	49
2.13 Διάκριση ανασυνδιασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων	50
2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση	51
2.15 Προσδιορισμός Εστερασών	52
2.15 Επεξεργασία αλληλουχιών DNA	54
3. Αποτελέσματα.....	56
4. Συζήτηση	67
5.Βιβλιογραφία.....	73

Περίληψη

Μια από τις αρχαιότερες ενασχολήσεις του ανθρώπου, ήταν η ανάπτυξη μεθόδων αντιμετώπισης επιβλαβών εντόμων. Από τη χρήση της φωτιάς και την εφαρμογή μηχανικών παγίδων η συνεχής αναπτυξιακή έρευνα οδήγησε τον άνθρωπο στην ανακάλυψη των εντομοκτόνων, που αποτελεί τον σημαντικότερο σταθμό στην ιστορία αντιμετώπισης επιβλαβών εντόμων. Ένα σχετικά καινούριο εντομοκτόνο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των νατουραλιτών είναι το spinosad. Αποτελεί μια εναλλακτική λύση φιλικότερη προς το περιβάλλον, σε σύγκριση με τα κοινά συμβατικά εντομοκτόνα. Εμφανίστηκε στην Ελλάδα το 2004 για την αντιμετώπιση του κυριότερου εχθρού της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Εντούτοις, όπως παρατηρείται και σε κάθε συμβατικό εντομοκτόνο, η αλόγιστη χρήση του μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικών πληθυσμών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς στο νατουραλίτη εντομοκτόνο spinosad μέσω δυο διαφορετικών προσεγγίσεων. Αρχικά διερευνήθηκε η συμμετοχή των γενικών εστερασών στον μεταβολισμό του εντομοκτόνου και έπειτα εξετάστηκε ο μοριακός στόχος του εντομοκτόνου και η συμμετοχή του στην εμφάνιση ανθεκτικότητας.

Χρησιμοποιώντας έντομα από τους δυο εργαστηριακούς πληθυσμούς (ευαίσθητος και ανθεκτικός) πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές δοκιμές ώστε να προσδιοριστεί η δραστηριότητα των γενικών εστερασών. Τα επίπεδα των γενικών εστερασών μεταξύ των δυο πληθυσμών δεν κατέδειξαν μεγάλες διαφορές υποδεικνύοντας τη μη συμμετοχή τους στο μηχανισμό ανθεκτικότητας στο spinosad.

Επίσης μέσω μεθόδων RT-PCR απομονώθηκε ένα μεγάλο κομμάτι του α6 νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς στους δυο πληθυσμούς. Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές ενώ κατά τη σύγκριση της αμινοξικής

τους αλληλουχίας εντοπίστηκαν αντικαταστάσεις αμινοξέων οι οποίες ίσως να συμμετέχουν στον μηχανισμό ανθεκτικότητας.

Summary

One of the oldest occupations of human kind is the development of methods for pest management. From the simple use of fire and mechanical traps, the continuous and evolving research led human kind to the discovery of insecticides. A newly introduced insecticide that belongs to the category of naturalyte is spinosad. Compare to the well known insecticides, it is an environment friendly alternative solution. Here, in Greece, it was used for the first time in 2004 against the common threat of olive trees, *Bactrocera oleae*. As it is known for all types of insecticides, the extensive use of spinosad leads to the development of resistance. The aim of this project was to determine the mechanism of spinosad resistance in the olive fly through two different methods.

By biochemical analysis we investigated the involvement of general esterases. General esterases activity did not reveal any significant difference between the two strains indicating that there is no involvement of the enzymes to the metabolism of the insecticide.

By virtue of homology we isolated and compared the sequences of the Boα6 nAChR subunits from sensitive and resistance strains. Comparison of the nucleotide sequences did not induce any important difference while comparison of the protein sequences showed replacements of some aminoacids that might be involved in the mechanism of resistance.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

1.1 Έλεγχος Εντόμων

Η ιστορία για την διαχείριση των εντόμων αρχίζει από πολύ παλιά. Η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά μας πάει πίσω στο 2500 π.Χ. όπου οι Σουμέριοι χρησιμοποιούσαν το θείο ως ένα είδος ανόργανου εντομοκτόνου. Το 1200 π.Χ. στην Κίνα, κατά την περίοδο της δυναστείας του Κύκνου, αναπτύχθηκαν ακόμη περισσότερες μέθοδοι όπως η χρησιμοποίηση μυρμηγκιών για τη προστασία των εσπεριδοειδών από τις κάμπιες. Επόμενος μεγάλος σταθμός ήταν το 8^ο αιώνα π.Χ. στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Ομήρου Ιλιάδα όπου περιγράφεται η χρήση της φωτιάς για την μετακίνηση των ακρίδων προς τη θάλασσα. Επίσης, ο Έλληνας φιλόσοφος και μαθηματικός Πυθαγόρας κατάφερε να εξαλείψει τη μαλάρια από ένα χωριό της Σικελίας παροτρύνοντας τους κατοίκους να αποξηράνουν τα έλη για την απομάκρυνση των κουνουπιών. Ένας άλλος λαός, οι Αιγύπτιοι, το 440 π.Χ. χρησιμοποιούσαν δίκτυα ψαρέματος για να καλύψουν τα κρεβάτια τους και να προστατευτούν από τα κουνούπια.

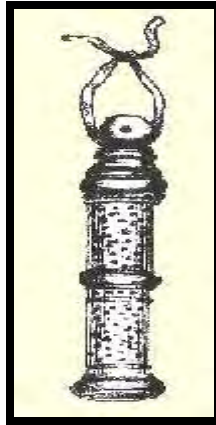
Κατά τον Μεσαίωνα με τον σκοταδισμό και την προκατάληψη να επικρατούν δεν έγινε καμία πρόοδος. Παράδειγμα αυτού το βιβλίο του Ferrante Imperato με το όνομα «Φυσική Ιστορία» το 1599 συμπεριλαμβάνει το τρόπο που προσπαθούσαν να απομακρύνουν μύγες χρησιμοποιώντας τα εξής λόγια:

«... ζωγραφίζεις μια μύγα σε ένα κομμάτι χαλκό κατά το δεύτερο μισό του αστερισμού του Ιχθύ... και την θάβεις στο κέντρο του σπιτιού κατά το πρώτο μισό του αστερισμού του Ταύρου...»

Έπειτα την περίοδο της Αναγέννησης οι άνθρωποι άρχισαν να βλέπουν τα έντομα λιγότερο ως τιμωρία από το Θεό και περισσότερο ως μέρος της φύσης το οποίο έπρεπε να μελετηθεί. Η μελέτη των εντόμων ως οργανισμών οδήγησε στην ανακάλυψη καλύτερων μεθόδων ελέγχου. Μεγάλο βήμα στην ιστορία της εντομολογίας ήταν

αποτελεί το 1758 μ.Χ. όπου ο μεγάλος Σουηδός βοτανολόγος Κάρολος Λιναίος ονόμασε και ταξινόμησε τα περισσότερα είδη εντόμων που υπάρχουν, μια ταξινόμηση που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα.

Ο Franz Ernst Brückmann, ένας γερμανός φυσικός που έζησε το 1700 μ.Χ., σχεδίασε την πρώτη μηχανική παγίδα για τα έντομα. Η παγίδα αποτελείτο από ένα ξύλινο κουτί με καπάκι και ελατήριο και περιείχε μια ελκυστική ουσία εντόμων. Όταν γέμιζε το κουτί με έντομα το καπάκι έπεφτε, παγιδεύονταν τα έντομα μέσα στο κουτί και συμπιέζονταν από τη μετακίνηση των τοιχών προς τα μέσα. Επίσης σχεδίασε και τις πρώτες παγίδες ψύλλων (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Κύλινδροι με δόλωμα στο εσωτερικό από μέλι ή αίμα που φοριώνταν ως μενταγιόν. Ήταν φτιαγμένο από άργυρο ή ελεφαντόδοντο και περίτεχνα στο σχεδιασμό ώστε να είναι ελκυστικά και να φοριούνται ως αξεσουάρ μόδας στην αυτοκρατορία της δυτικής Ευρώπης.

Μέχρι εκείνη την εποχή για την αντιμετώπιση των επιβλαβών εντόμων ασχολούνταν κυρίως οι άμεσα ενδιαφερόμενοι, δηλαδή οι αγρότες και οι άνθρωποι που αντιμετώπιζαν προβλήματα στο σπίτι τους. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα αυτό άρχισε να αλλάζει καθώς όλο και περισσότερες επιστημονικές μελέτες εμφανίζονταν με θέμα τα έντομα και τη διαχείρησή τους δημιουργώντας ένα ανεξάρτητο επιστημονικό τομέα.

Αξιοσημείωτο βήμα αποτέλεσε η εξάλειψη της μεσογειακής μύγας, με τη χρήση εντομοκτόνων, το 1929 σε μια περιοχή στη Φλόριδα. Το 1930 από μια ομάδα Γερμανών επιστημόνων παρήχθηκε το πρώτο οργανικό εντομοκτόνο ακολουθούμενο το 1939 από το πολύ γνωστό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, DDT.

Το DDT χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την αντιμετώπιση κουνουπιών που μετέφεραν ασθένειες όπως η μαλάρια. Με τη λήξη του πολέμου άρχισε μια ευρύτερη χρησιμοποίησή του για την αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων στις καλλιέργειες όπως στις πατάτες, στο καλαμπόκι και στον καπνό.

Λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητάς του, το DDT χρησιμοποιήθηκε σε τεράστιες ποσότητες σε πάρα πολλές χώρες οδηγώντας στην εμφάνιση των πρώτων ανθεκτικών πληθυσμών. Αυτό το αντιμετώπιζαν με συνεχής αύξηση της δόσης του DDT αγνοώντας τυχόν επιβλαβείς επιπτώσεις στο πληθυσμό (εικόνα 1.2). Το 1962, με αφορμή το βιβλίο που εξέδωσε η αμερικανίδα βιολόγος Rachel Carlson με το όνομα «Silent Spring» (ανάλυση των βλαβερών συνεπειών από την αλόγιστη χρήση του DDT στη φύση και τον άνθρωπο) ξεκίνησε μια περιβαλλοντική αφύπνιση των ανθρώπων με αποτέλεσμα το 1972 να απαγορευτεί η χρήση του στις Ηνωμένες Πολιτείες από την EPA αλλά και σχεδόν παγκοσμίως από τη συνθήκη της Στοκχόλμης.



Εικόνα 1.2: Χρήση του DDT στις παραλίες χωρίς την οποιαδήποτε προστασία των πολιτών

Με την απαγόρευση του DDT και έχοντας πλέον εις γνώση τους κινδύνους που μπορούν να κρύβουν τα εντομοκτόνα άρχισαν οι ελέγχοι για σωστή χρήση εντομοκτόνων αλλά και η βιομηχανία στράφηκε προς την παραγωγή «ασφαλέστερων» για το περιβάλλον και για τον άνθρωπο εντομοκτόνων.

1. 2 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται όταν ένας πληθυσμός εντόμων, εκτίθεται σε μια ποσότητα εντομοκτόνου επαναλαμβανόμενα, δηλαδή ο πληθυσμός βρίσκεται συνεχώς υπό επιλογή. Από τον πληθυσμό αυτό κάποια άτομα θα επιβιώσουν γιατί «τυχαία» φέρουν μια γενετική αλλαγή η οποία τους προσδίδει ανθεκτικότητα. Η ανθεκτικότητα δηλαδή προϋπάρχει σε κάποια άτομα εντόμων (δεν είναι *de novo* μετάλλαξη) και με τη συνεχή επιλογή έναντι του εντομοκτόνου η παρουσία της μεταλλαγής αυτής στον πληθυσμό αυξάνεται. Αυτό είναι αναμενόμενο να συμβεί εξελικτικά καθώς σκοπός των ζωντανών οργανισμών είναι η διαίωνιση του είδους τους θέτοντας την επιβίωσή τους απαραίτητη. Άρα οποιαδήποτε αλλαγή που τους προσφέρει μεγαλύτερη ανεκτικότητα στο περιβάλλον είναι πολύ σημαντική.

Η γενετική βάση αυτής της αλλαγής έχει ως συνέπεια τη μεταβίβασή της, από γενιά σε γενιά και τη συνεχή αύξηση των ανθεκτικών στο εντομοκτόνο ατόμων με κατάληξη την υπερίσχυσή τους έναντι των ευαίσθητων πληθυσμών. Η διεργασία αυτή, λόγω του μικρού αναπαραγωγικού κύκλου των εντόμων (μέσα σε ένα χρόνο μπορούν να υπάρξουν πολλές γενεές (Robert et al., 1996), μπορεί να συμβεί σε σημαντικά σύντομο χρονικό διάστημα.

Η αύξηση της ανθεκτικότητας σε ένα πληθυσμό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το ρυθμό αναπαραγωγής, τη γενετική ποικιλομορφία, τη γονιδιακή ροή μέσα στον άγριο πληθυσμό, τις μεταναστεύσεις (εισαγωγή μη ανθεκτικών εντόμων) και την αποτελεσματικότητα των μεθόδων διαχείρισης (ρυθμό, διάρκεια και αριθμό εφαρμογής εντομοκτόνου). Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι φαινόμενα όπως πολλαπλή ανθεκτικότητα και διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μπορούν να επιταχύνουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Η πολλαπλή ανθεκτικότητα αναφέρεται στην ανθεκτικότητα των εντόμων σε διαφορετικά είδη χημικών εντομοκτόνων και διασταυρούμενη ανθεκτικότητα αναφέρεται στην περίπτωση όπου η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται για ένα συγκεκριμένο εντομοκτόνο προσδίδει ανθεκτικότητα και σε άλλα εντομοκτόνα.

Η ανθεκτικότητα στα έντομα μπορεί να αναπτυχθεί με τους εξής τρεις κύριους μηχανισμούς:

1. Συμπεριφορά εντόμου

Τα έντομα μπορούν να αλλάξουν συμπεριφορά και να αποφύγουν την περιοχή που υπάρχει εντομοκτόνο χωρίς απαραίτητα να αναπτύξουν ανθεκτικότητα σε αυτό. Μια ομάδα επιστημόνων μελέτησε πληθυσμούς κατσαρίδων σε περιοχές με κακές συνθήκες υγιεινής, στις οποίες γινόταν έντονη χρήση τζελ-δολωμάτων όπου παρατηρήθηκε ότι μετά από κάποιο χρονικό διάστημα οι κατσαρίδες σταματούσαν να τρέφονται από αυτά.

Μετά από συλλογή πληθυσμών *B.germanica* ανακαλύφθηκε ότι λόγω της συνεχούς επιλογής, οι κατσαρίδες ανέπτυξαν ένα μηχανισμό αποστροφής προς τις ουσίες που περιείχαν τα τζελ-δολώματα. Οι ουσίες στα τζελ-δολώματα ήταν κυρίως σάκχαρα τα οποία είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη των εντόμων. Άρα με τον μηχανισμό αποστροφής που ανέπτυξαν οι πληθυσμοί αυτοί είχαν αρνητικό αντίκτυπο στην ανάπτυξή τους καθώς παρατηρήθηκε υπογονιμότητα σε σύγκριση με πληθυσμούς αγρίου τύπου (Changlu et al., 2004).

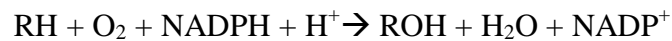
2. Αυξάνοντας τον καταβολισμό του εντομοκτόνου και την αποβολή του από τον οργανισμό.

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: 1. οξειδάσες ευρέου φάσματος- κυτόχρωμα P450, 2. υδρολάσες που διασπούν εστερικούς, αιθερικούς και εποξειδικούς δεσμούς και 3. ένζυμα που συμμετέχουν σε συστήματα σύζευξης όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης η οποία δεσμεύει τη δραστική ομάδα του μορίου και την απομακρύνει αδρανοποιώντας το εντομοκτόνο.

Σε μοριακό επίπεδο η αυξημένη παραγωγή των ενζύμων που εμπλέκονται στον καταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών γίνεται μέσω της αύξησης της μεταγραφής του γονιδίου ή μέσω της αύξησης των αντιγράφων του γονιδίου στο γονιδίωμα. Τα δυο αυτά γεγονότα μπορούν να συμβαίνουν ταυτόχρονα όπως περιγράφεται παρακάτω για τις

εστεράσες στο *Culex pipiens* είτε μοναδιαία όπως συμβαίνει στην περίπτωση των κουνουπιών όπου η ανθεκτικότητα τους μέσω S-τρανσφεράσης και μονο-οξυγενάσης οφείλεται αποκλειστικά στην αύξηση της μεταγραφής τους (Hemingway et al., 1997).

Οξειδάσες ευρέους φάσματος- Κυτόχρωμα P450: Το κυτόχρωμα P450 καταλύει μια μεγάλη γκάμα χημικών αντιδράσεων. Η αντίδραση είναι:



όπου RH αποτελεί το υπόστρωμα. Κυτταρικά βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και απαιτεί τη φλάβοπρωτεΐνη NADPH για να καταλύσει την αντίδραση (Jean-Baptiste et al., 1998).

Ένα P450 ονομάζεται CYP και ακολουθείται από ένα αριθμό, ένα γράμμα και ένα ακόμη αριθμό. Ένζυμα με >40% ομοιότητα στην αλληλουχία ανήκουν στην ίδια οικογένεια και μέλη μιας οικογένειας με >55% ομοιότητα ανήκουν στην ίδια υπο-οικογένεια με ελάχιστες εξαιρέσεις (Nelson et al., 1998). Για παράδειγμα τα CYP6A1 και CYP6B2 ανήκουν στην οικογένεια 6 ενώ δε έχουν ομοιότητα 40%. Σε αυτή την περίπτωση το κριτήριο αυτό αγνοήθηκε γιατί οι αλληλουχίες γύρω από τη συντηρημένη περιοχή των κυστεϊνών είναι απολύτως ταυτόσημες (Nelson et al, 1993). Δεδομένου ότι η ονοματολογία αυτή των κυτοχρωμάτων είναι βασισμένη σε μια γενική εικόνα της αμινοξικής αλληλουχίας τους και ότι μια μόνο διαφορά αμινοξέος μπορεί να αλλάξει δραματικά την εξειδίκευση των κυτοχρωμάτων δεν πρέπει να διεξάγεται οποιοδήποτε συμπέρασμα σχετικά με τη λειτουργικότητα ενός κυτοχρώματος με βάση το όνομά του (Lindberg et al., 1989, Negishi et al. 1996).

Γενικά στα έντομα υπάρχουν περίπου 80-120 γονίδια που κωδικοποιούν P450 με εξαίρεση τη μέλισσα που περιέχει μόνο 46. Συγκεκριμένα στη *Drosophila melanogaster* υπάρχουν 86 γονίδια των P450 και 4 ψευδογονίδια που συνθέτουν 25 διαφορετικές οικογένειες. Οι κυριότερες οικογένειες είναι η 4 (με 22 μέλη) και η 6 (με 23 μέλη) (Adams et al, 2000). Σύγκριση της αμινοξικής τους αλληλουχίας έδειξε ότι τη

μεγαλύτερη ομοιότητα την έχουν τα κυτοχρώματα CYP6A17 και CYP6A23 με 87% ομοιότητα. Συμπερασματικά μόνο σε 10 συγκρίσεις διαφορετικών κυτοχρωμάτων εμφανίστηκε ομοιότητα >70% ενώ στην πλειοψηφία είχαν πολύ χαμηλή ομοιότητα τονίζοντας την μεγάλη ποικιλομορφία τους.

Εντονότερη είναι η ποικιλομορφία των P450s και κατά τη σύγκρισή τους σε διαφορετικά είδη εντόμων. Είναι αναμενόμενο ότι ένα καινούριο P450 θα έχει ομολογία με γνωστά ένζυμα 40-50%, ακόμη και σε έντομα της ίδιας τάξης. Η περίπτωση του CYP6B8 του *Helicoverpa zea* που έχει ομοιότητα 99% με το CYP6B7 του *Helicoverpa armigera* αποτελεί εξαίρεση παρά κανόνα (Li et al., 2000).

Το κυτόχρωμα P450 συμμετέχει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας καθώς αποτελεί από τα πρωτεύοντα ένζυμα που συμμετέχουν στον καταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών (εντομοκτόνων). Αύξηση της ποσότητάς τους στον οργανισμό αυτόματα αυξάνει την «αντοχή» των εντόμων στα εντομοκτόνα. Μπορεί να ονομαστεί ως η πρώτη «ασπίδα» ενός εντόμου εναντίον ενός εντομοκτόνου γι αυτό και παρουσιάζεται αύξηση της λειτουργίας του και σε χαμηλού βαθμού ανθεκτικότητας. Στη *Drosophila melanogaster* η αυξημένη έκφραση του CYP6G1 προσδίδει ανθεκτικότητα σε πολλά είδη εντομοκτόνων όπως DDT, και νεονικοτινοειδή (Philip et al., 2007).

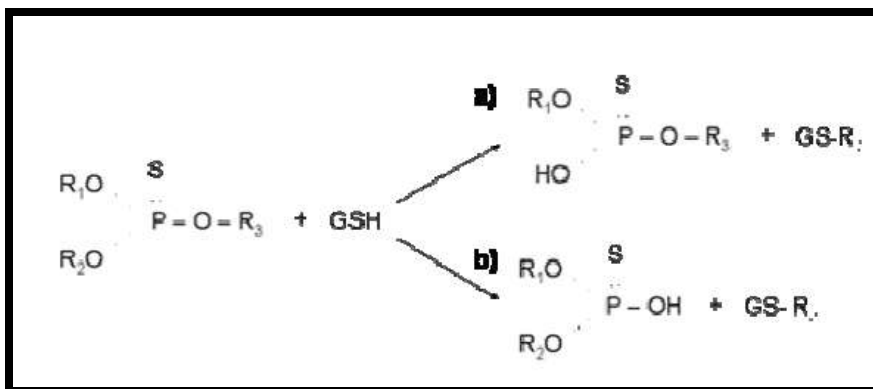
Επίσης, η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα οφείλεται κυρίως στην υπερέκφραση κυτοχρώματος P450. Συγκεκριμένα σε ανθεκτικούς πληθυσμούς *Anopheles gambiae* από τη δημοκρατία της Γκάνας και το Μπενίν εντοπίστηκε υπερέκφραση του κυτοχρώματος CYP6P3 το οποίο μεταβολίζει και τους δυο τύπους πυρεθροειδών (α-κυανό και μη α-κυανό). Επίσης πρόσφατα εντοπίστηκε διπλασιασμός του γονιδίου P450 σε ανθεκτικούς πληθυσμούς *Anopheles funestus* (Cuaba et al., 2010).

S-τρανσφεράση γλουταθειόνης (GST): Οι γλουταθειόνες είναι μέλη μιας μεγάλης ομάδας πολυ-λειτουργικών ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στην αποτοξικοποίηση ενδογενών και εξωγενών συμπλόκων μέσω σύζευξης με γλουταθειόνη ή μέσω της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Οι GST μπορούν να δράσουν και μη- ενζυμικά καθώς

μπορούν να λειτουργήσουν ως προσδέτες και να βοηθήσουν στην εισαγωγή ουσιών στα κύτταρα.

Παράδειγμα συμβολής των GST σε ανθεκτικότητα αποτελεί η ανθεκτικότητα στο DDT από τα κουνούπια *Aedes aegypti* η οποία οφείλεται αποκλειστικά στην αυξημένη παραγωγή αυτού του ενζύμου (Grant and Hammock, 1980).

Καθορίστηκε, επίσης, η διαδρομή για τον καταβολισμό από τα GST οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε διάφορα έντομα όπως στη *Musca domestica* (Orpenoorth et al., 1979) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Αντίδραση καταβολισμού οργανοφωσφορικών ουσιών μέσω GST. Το GST πραγματοποιεί δυο αντιδράσεις σύζευξης: α. Ο-αποαλκυλίωση, β. Ο-αποαρυλίωση.

Εστεράσες: Οι εστεράσες είναι μια ομάδα ενζύμων που ανήκουν στις υδρολάσες και υδρολύουν μια μεγάλη γκάμα από αλειφατικούς αρωματικούς και χολινεργικούς εστέρες καθώς και οργανοφωσφορικά σύμπλοκα. Τα ένζυμα αυτά δρουν πάνω σε ουσίες που υδρολύονται πλήρως από το νερό και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Klowden et al., 2007).

Τα έντομα έχουν μια ευρεία ομάδα εστερασών όπως τα θηλαστικά. Για παράδειγμα διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά 18 εστεράσες στο κουνούπι *Culex tarsalis*, από τις οποίες 14 είναι καρβοξυλεστεράσες, 2 ακετυλοχολινεστεράσες, μια αρυλ-εστεράση και μια ακετυλεστεράση.

Στη *Drosophila* οι α-εστεράσες αποτελούν μονομερή ένζυμα μοριακού βάρους 60KD και δε δρουν σε συγκεκριμένο ιστό και οι β-εστεράσες είναι κυρίως διμερή μοριακού βάρους 120 KD. Σε συγκεκριμένα συγγενικά είδη της *Drosophila melanogaster* (όπως *D.simulans* και *D. mauritiana*) παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή μονομερών β-εστερασών στα αρσενικά γεννητικά όργανα (Morton and Singh, 1985). Στη *Musca domestica* εντοπίστηκαν τουλάχιστον 10 διαφορετικές α-εστεράσες εκ τω οποίων μια από αυτές βρισκόταν σε άλλα έντομα (Velthuis et al., 1963).

Για τον προσδιορισμό των ενζύμων που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας απέναντι σε ένα εντομοκτόνο, βασικό ρόλο παίζει η χημική δομή του εντομοκτόνου. Σε εντομοκτόνα τα οποία φέρουν εστερικούς δεσμούς οι εστεράσες είναι πιθανόν να παίζουν ρόλο τόσο στον καταβολισμό τους όσο και στην ανθεκτικότητα. Πράγματι, για τη συμμετοχή των εστερασών σε ανθεκτικότητα γίνεται αναφορά σε περισσότερα από 30 είδη εντόμων.

Οι εστεράσες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα έντομα και σε άλλα αρθρόποδα. Χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: στις α-εστεράσες οι οποίες καταβολίζουν εντομοκτόνα όπως τα οργανοφωσφορικά, τις β-εστεράσες που αναστέλλονται από τα οργανοφωσφορικά και τις γ-εστεράσες οι οποίες δεν συσχετίζονται με εντομοκτόνα. Οι β-εστεράσες εμφανίζονται πιο συχνά από τις α-εστεράσες σε έντομα με ανθεκτικότητα μαζί με τις καρβοξυλεστεράσες και την ακετυλοχολινεστεράση.

Μια εξελικτική μελέτη 5 διαφορετικών πληθυσμών κουνουπιών από τη Βόρεια Κίνα το 2010 είχε ως στόχο τη συσχέτιση των διαφορετικών αλληλόμορφων των εστερασών σε ανθεκτικά *Culex pipiens*. Συμπερασματικά έδειξε ότι ένα εντομοκτόνο μπορεί να στοχεύσει σε διαφορετικά αλληλόμορφα εστερασών και αντίστροφα μια εστεράση μπορεί να αποικοδομήσει περισσότερα από ένα είδη εντομοκτόνων (Liu et al., 2011).

Τα περισσότερα ευρέως χρησιμοποιημένα εντομοκτόνα έχουν στη χημική τους δομή εστερικούς δεσμούς που μπορούν να υδρολυθούν από τις εστεράσες. Λόγω του μεγάλου

αριθμού των εστερασών στους διάφορους ιστούς η ταξινόμησή τους σε κατηγορίες ήταν πολύ δύσκολη. Το 1953 ο Aldridge χώρισε τις εστεράσες σε 3 κατηγορίες α, β, c σύμφωνα με τη συμπεριφορά τους απέναντι στους φωσφορικούς τριεστέρες. Οι α-εστεράσες ή αρυλεστεράσες, αποικοδομούν εστερικούς δεσμούς από αρωματικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένου οργανοφωσφορικών οξονίων. Οι β-εστεράσες ενώ δεσμεύονται από τις ίδιες ουσίες εντούτοις αναστέλλονται λόγω των φωσφορικών ομάδων τους. Οι c-εστεράσες ή ακετυλεστεράσες δεν δεσμεύονται σε οργανοφωσφορικά υποστρώματα.

Ένα από τα παλαιότερα εντομοκτόνα, το μαλάθειο, περιέχει δυο μέρη καρβοξυλ-εστέρα. Τα έντομα που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο μαλάθειο εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα καρβοξυλεστερασών. Οι καρβοξυλεστεράσες δεν είναι ευρέως φάσματος ένζυμα άρα η ανθεκτικότητα των εντόμων είναι εξειδικευμένη και δεν προσφέρει ανθεκτικότητα και σε άλλα εντομοκτόνα. Αυξημένη δράση εστερασών εντοπίστηκε σε πληθυσμούς *Plutella xylostella* στους οποίους διαφάνηκε ότι σε επίπεδο προνύμφης σε δυο ανθεκτικούς πληθυσμούς υπήρχε αυξημένη δραστηριότητα α-εστερασών σε σύγκριση με των μη ανθεκτικών (Maa et al., 1990).

Η μείωση της δραστηριότητας των καρβλυξεστερασών σε πληθυσμούς της μεσογειακής μύγας ανθεκτικούς στα οργανοφωσφορικά έδωσε την πρώτη απόδειξη για ανθεκτικότητα οφειλόμενη στην αλλαγή των εστερασών. Η υπόθεση γνωστή ως «αλο-εστεράση» ήταν ότι τα ανθεκτικά έντομα μείωσαν την ικανότητα να καταβολίζουν καρβλυξικά υποστρώματα ενώ κέρδισαν την ικανότητα να υδρολύουν οργανοφωσφορικά υποστρώματα (Orpenoorth et al., 1960). Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε από μελέτη της *Lucilia cuprina*. Σε αυτή τη μύγα σύγκριση του γονιδίου LcaE7 (που κωδικοποιεί το ένζυμο E3) σε ανθεκτικά και μη ανθεκτικά στελέχη έδειξε αντικατάσταση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (μιας γλυκίνης στη θέση 137 με ασπαρτικό οξύ) (Peter et al., 1997). Αυτή η συγκεκριμένη αντικατάσταση αυξάνει την υδρόλυση μόνο των οργανοφωσφορικών υποστρωμάτων.

Στα κουνούπια *Culex ripiens* η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά οφείλεται στην γρήγορη δέσμευση και διάσπαση τους από τις καρβοξυλεστεράσες ώστε να αποτραπεί η σύνδεσή τους με την ακετυλοχολινεστεράση (ένζυμο-στόχος του εντομοκτόνου). Αυτό για να είναι εφικτό είναι απαραίτητες τεράστιες ποσότητες εστερασών. Συγκεκριμένα συμμετέχουν δυο εστεράσες, α και β, που ανήκουν στις γεικές καρβοξυλεστεράσες. Τα γονίδια τους βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα και ονομάζονται Est-3 (που κωδικοποιεί την εστεράση Α) και Est-2 (που κωδικοποιεί την εστεράση Β). Οι δύο αυτοί γονιδιακοί τόποι παραμένουν άρικτα συνδεδεμένοι μεταξύ τους κατά την ενίσχυσή τους γι αυτό και συχνά αναφέρονται ως «superlocus» εστερασών (Feng et al., 2007). Οι γονιδιακοί αυτοί τόποι είναι αρκετά πολυμορφικοί με πάνω από 16 αλληλόμορφα για τον καθένα από τα οποία, προς το παρόν, μόνο 9 συνδέθηκαν με ανθεκτικότητα.

Στο γονιδίωμα του *A. gambiae* από ανθεκτικό στέλεχος εντοπίστηκαν ορθόλογοι τόποι εστερασών με του *Culex ripiens*. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν αποδείξεις για σύνδεση τους με εμφάνιση ανθεκτικότητας όμως η πιθανότητα συμμετοχής των εστερασών είναι αρκετά μεγάλη. (Janet et al., 2002).

Στην γενική κατηγορία των εστερασών ανήκουν οι ακετυλοχολινεστεράσες οι οποίες αποτελούν το μοριακό στόχο των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων καθώς δεσμεύονται μη αντιστρεπτά με το ενεργό κέντρο των ακετυλοχολινεστερασών εμποδίζοντας τη φυσιολογική τους λειτουργία δηλαδή τη διάσπαση του νευροδιαβιβαστή, ακετυλοχολίνη.

Το πρώτο γονίδιο ακετυλοχολινεστεράσης (Ace) που απομονώθηκε ήταν από τη *Drosophila*. Μελέτη πολλών ανθεκτικών στελεχών έδειξε ότι η ανθεκτικότητα οφειλόταν σε αντικατάσταση ενός ή πολλών αμινοξέων. Η *Drosophila* περιέχει μόνο ένα γονίδιο ακετυλοχολινεστεράσης ενώ άλλα έντομα όπως *Anopheles gambiae* περιέχει δυο γονίδια, ace-1 και ace-2, ένα από τα οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στο *Culex ripiens* (Claude et al., 1986). Γενικότερα τα ανώτερα δίπτερα περιέχουν μόνο ένα γονίδιο.

Το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης στο δάκο παρουσιάζει ένα ανοιχτό πλαίσιο 2022bp, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 673 αμινοξέων, παρουσιάζοντας 79% ομοιότητα με την πρωτεΐνη των 649 αμινοξέων της *D.melanogaster*. Εντοπίστηκαν τρεις μεταλλάξεις που αφορούν: 1. μια αντικατάσταση ισολευκίνης σε βαλίνη στη θέση I214V η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της πρόσβασης των μορίων του εντομοκτόνου και οδηγεί στη μείωση του ρυθμού της αποακετυλίωσης, 2. αντικατάσταση της γλυκίνης από μια σερίνη ώστε να συμπιέζεται η αύλακα του ένζυμου, επηρεάζοντας την είσοδο και τη σύνδεση των εντομοκτόνων στο ενεργό κέντρο, 3. ένα μικρό έλλειμμα εννέα νουκλεοτιδίων τα οποία αντιστοιχούν σε τρία κατάλοιπα γλουταμίνης στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης. Το καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνο για την αγκυροβόλησή της στη σύναψη, αυξάνοντας την ποσότητα της προσδεδεμένης πρωτεΐνης ώστε παρ' όλη την παρουσία του εντομοκτόνου το ένζυμο να παραμένει και να πραγματοποιεί τη φυσιολογική του λειτουργία (Kakani et al., 2008).

3. Τροποποιώντας τη δομή του στόχου του εντομοκτόνου

Ο τρίτος μηχανισμός με τον οποίο τα έντομα αποκτούν ανθεκτικότητα είναι η τροποποίηση της δομής του στόχου που δεσμεύεται το εντομοκτόνο. Στόχος των εντομοκτόνων μπορεί να είναι ένα κανάλι ιόντων, ένας υποδοχέας ή και ένα ένζυμο και αφορά κυρίως τη μεταλλαγή αμινοξέος με τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνεται η ευαισθησία του ως προς το εντομοκτόνο.

Τα κυκλοδιένια και οι φενυλπυραζόλες όπως η φιπρολίνη στοχεύουν τον GABA υποδοχέα των εντόμων, το γονίδιο του οποίου απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά από ένα ανθεκτικό πληθυσμό της *Drosophila melanogaster*. Η γενετική χαρτογράφηση του γονιδίου ανθεκτικότητας έδειξε ότι η ανθεκτικότητα οφειλόταν σε ένα γονίδιο στο χρωμόσωμα III στη θέση 66F. Έπειτα έγιναν αρκετές γενετικές αναδιατάξεις και αναλύσεις με στόχο τον εντοπισμό της βασικής αλλαγής που προσδίδει ανθεκτικότητα καταλήγοντας στην αντικατάσταση μιας αλανίνης από μια σερίνη ή γλυκίνη (Constant et al., 2000). Φαρμακολογικά αποδείχτηκε ότι η αλανίνη στη θέση αυτή είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του εντομοκτόνου με αποτέλεσμα η έλλειψή της

να προσδίδει ανθεκτικότητα. Αντικατάσταση αυτού του αμινοξέος εντοπίστηκε σε ένα μεγάλο αριθμό εντόμων δίνοντας ίσως ένα παράδειγμα οριζόντιας εξέλιξης (Εικόνα 1.4).

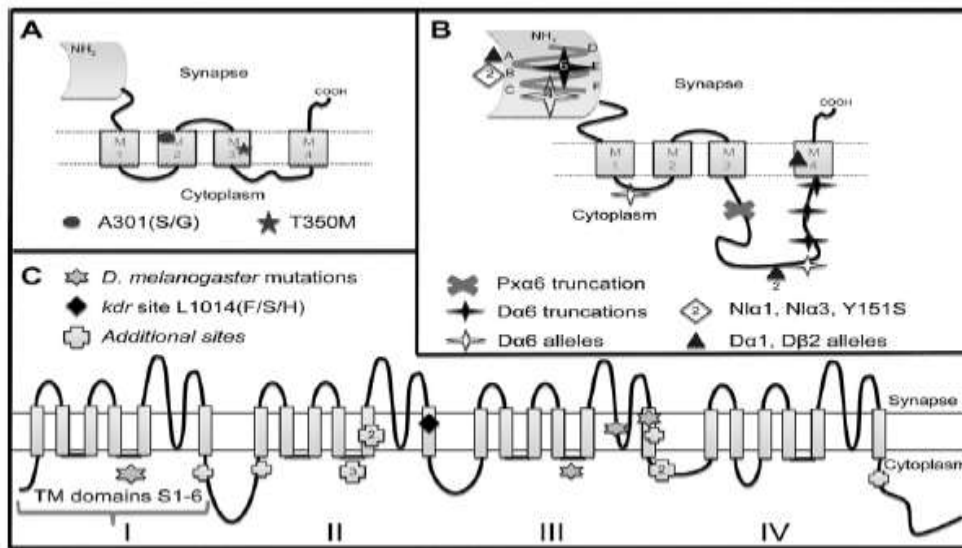
	Amino acid	L	N	R	N	A	T	P/L	A	R	V	S/G	L	G	V	T	T
<i>D. melanogaster</i>	S	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	COG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
<i>D. simulans</i> allele 1	R	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	COG	GCG	CGT	GTG	T ^A CG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
												↑ ^S					
<i>D. simulans</i> allele 2	S	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	COG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
	R	CTC	AAT	CGC	AAT	GCA	ACG	COG	GCG	CGT	GTG	GCG	CTC	GGT	GTG	ACA	ACC
												↑ ^G					
Housefly	S	CCT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTA	GCT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
	R	CCT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTA	T ^S CT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
												↑ ^S					
Red flour beetle	S	CTG	AAT	CGT	AAC	GCT	ACT	CTC	GCC	AGA	GTG	GCT	CTG	GGG	GTC	ACC	ACC
	R	CCT	AAT	CGT	AAT	GCT	ACA	CCA	GCC	CGT	GTR	T ^S CT	TTA	GGT	GTC	ACC	ACT
												↑ ^S					
German cockroach	S	CTG	AAC	CGC	AAY	GCG	ACG	CCC	GCC	CGA	GTC	GCC	CTC	GGG	GTT	ACC	ACT
	R	CTS	AAC	CGC	AAT	GCG	ACG	CCC	GCC	CGA	GTC	T ^S CC	CTC	GGG	GTT	ACC	ACT
												↑ ^S					
Yellow fever mosquito	S	CCT	AAT	AGA	GAT	GCT	ACA	CCA	GCA	CGT	GTT	GCA	TTA	GGT	GTA	ACC	ACT
	R	CCT	AAT	AGA	GAT	GCT	ACA	CCA	GCA	CGT	GTT	T ^S CA	TTA	GGT	GTA	ACC	ACT
												↑ ^S					

Εικόνα 1.4: Μεταφορά από είδος σε είδος της μετάλλαξης που προκαλεί ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνο. Η σημειακή μετάλλαξη μέσα στο ανθεκτικό στέλεχος Rdl αντικαθιστά το ίδιο αμινοξύ σε πολλά είδη εντόμων. Το γονίδιο Rdl κωδικοποιεί τον GABA υποδοχέα. Ο προσδέτης GABA είναι ένας πολύ σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής και τα εντομοκτόνα με την πρόσδεση τους στον υποδοχέα του εμποδίζουν την δράση του οδηγώντας στο θάνατο τον οργανισμό. Η ανθεκτικότητα αφεΐεται στην αντικατάσταση μιας αλανίνης στη θέση 302 με ένα κατάλοιπο σερίνης ή γλυκίνης. Οι δυο αντικαταστάσεις κωδικοποιούνται από μια σημειακή μετάλλαξη όπως φαίνεται στις αλληλουχίες του ανθεκτικού και μη ανθεκτικού στέλεχους. Η αλανίνη στη θέση 302 βρίσκεται μέσα στο κανάλι ιόντων άρα με την αντικατάστασή της υπάρχει διπλή δράση καθώς από τη μια εμποδίζει τη δέσμευση του εντομοκτόνου και από την άλλη αλλάζει ολόκληρη τη μορφή του υποδοχέα

Μια άλλη ομάδα εντομοκτόνων που δρα στο νευρικό σύστημα είναι τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα. Αποτελούν συνθετικά ανάλογα φυσικών εντομοκτόνων που βρίσκονται στο λουλούδι *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Ο τρόπος δράσης τους είναι η προσκόλληση τους στις υπομονάδες των διαύλων νατρίου προκαλώντας το παρατεταμένο άνοιγμα των διαύλων νατρίου. Η ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή αποδόθηκε σε μεταλλάξεις στα τασηο-εξαρτώμενα κανάλια Na⁺ σε περιοχές της πρωτεΐνης που συμμετέχουν στο σχηματισμό του καναλιού (Dong et al., 2007).

Μια σχετικά καινούρια ομάδα εντομοκτόνων, τα νεονικοτινοειδή δρουν επίσης στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Συγκεκριμένα τα εντομοκτόνα αυτά δομικά

προσομοιάζουν την νικοτίνη και δρουν ως αγωνιστές στο νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Tomizawa et al., 2005). Μελέτες σε φυσικούς ανθεκτικούς πληθυσμούς *Nilaparvata lugens* εντόπισαν μια σημειακή μετάλλαξη σε δυο υπομονάδες του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, Nla1 και Nla3, η οποία μειώνει σημαντικά την πρόσδεση του εντομοκτόνου στον υποδοχέα (Gorman et al., 2008). Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζονται συνοπτικά κοινές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε διάφορα είδη εντόμων και προκαλούν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.



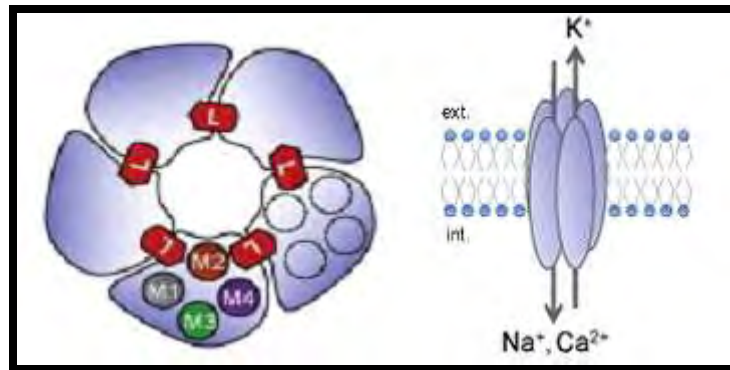
Εικόνα 1.5: Κοινές μεταλλάξεις που βρέθηκαν σε διάφορα έντομα πάνω σε κανάλια ιόντων ή υποδοχέων. A: Η Rdl πρωτεΐνη έχει μια αντικατάσταση A301S ή A301G στη δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή μέσα στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη T350M προσδίδει ανθεκτικότητα στη φαινυλπυραζόλη (Le Coff et al., 2005), B: στο νικοτινικό υποδοχέα οι αλλαγές αφορούν μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (Baxter et al., 2010, Liu et al., 2005, Perry et al., 2008, Watson et al., 2010) C: Σημεία αντικατάστασης αμινοξέων σε ένα κανάλι ιόντων. Η kdr περιοχή προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή και στο DDT.

Οι τρεις τρόποι ανάπτυξης ανθεκτικότητας που περιγράφηκαν παραπάνω παρουσιάζουν το νευρικό σύστημα ως πρωταρχικό στόχο των περισσότερων εντομοκτόνων καθώς αλλαγές στα μόρια που το συνθέτουν (είτε είναι νευροδιαδραστές είτε είναι υποδοχείς) εντοπίζονται σε όλες τις καταγεγραμμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας των εντόμων.

1.3 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης στα έντομα

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης είναι ιονοτροπικοί υποδοχείς που σχηματίζουν κανάλια ιόντων στις κυτταρικές μεμβράνες και χωρίζονται σε δυο

κατηγορίες, τους μουσκαρινικούς και τους νικοτινικούς υποδοχείς. Ως προσδέτες τους ορίζονται η ακετυλοχολίνη και η νικοτίνη (Engel et al.,2003) και εντοπίζονται στο νευρικό και στο νευρομυϊκό σύστημα. Το νευρικό σύστημα των εντόμων είναι πολύ πλούσιο σε αυτούς τους υποδοχείς, περισσότερο από των θηλαστικών ενώ ο κεντρικός διαβιβαστής στα έντομα είναι η ακετυλοχολίνη ενώ στα θηλαστικά η σεροτονίνη.

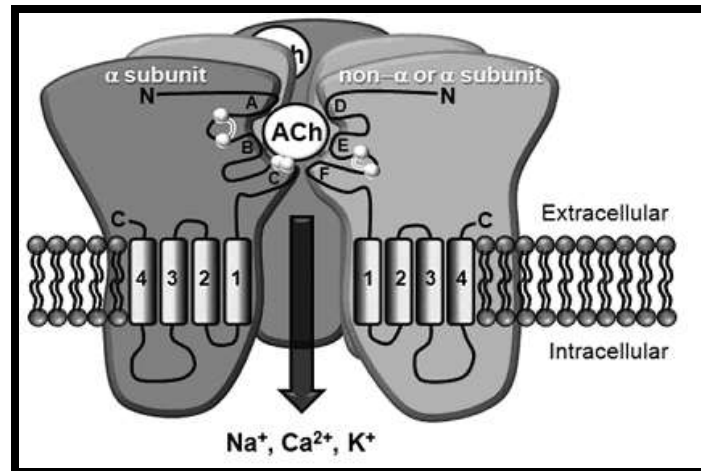


Εικόνα 1.6: Σχηματική δομή ενός νικοτινικού υποδοχέα. Κάθε υποδοχέας αποτελείται από 5 υπομονάδες, με 4 διαμεμβρανικές περιοχές η κάθε μια. Με την πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή, ο υποδοχέας ενεργοποιείται και ανοίγει ως κανάλι ιόντων για την εισαγωγή Na^+ ενδοκυτταρικά.

Οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι μέλη της υπερικογένειας των καναλιών ιόντων με χαρακτηριστική Cys-θηλιά που ενεργοποιούνται με πρόσδεση ενός νευροδιαβιβαστή (Sine et al.,2006). Στην οικογένεια αυτή ανήκουν και οι ιονοτροπικοί υποδοχείς σεροτονίνης, γλυκίνης και GABA. Αποτελούνται από πέντε υπομονάδες δομημένες έτσι ώστε να σχηματίσουν ένα κεντρικό κανάλι ιόντων το οποίο με την πρόσδεση ενός μορίου ενεργοποιείται, αλλάζει τη δομή του και επιτρέπει την είσοδο μονοσθενών ιόντων Na^+ στο νευρώνα (Εικόνα 1.6). Έχουν δηλαδή τον ρόλο ενός μοριακού διακόπτη στο έντομο (Changeux et al., 2008).

Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM4) με μια μεγάλη εξωκυτταρική αμινοτελική ουρά η οποία περιέχει τα χαρακτηριστικά μοτίβα θηλιάς κυστεΐνης που διαχωρίζονται από 13 κατάλοιπα αμινοξέων. Αυτή η θηλιά παίζει ρόλο στην κινητική του καναλιού των ιόντων (Corringier et al.,2000). Η ακετυλοχολίνη (μόριο-προσδέτης στους υποδοχείς των εντόμων) δεσμεύεται στις θηλιές που σχηματίζονται μεταξύ των υπομονάδων μέσω έξι συντηρημένων περιοχών (θηλιές A-F)

στη μεγάλη αμινοτελική ουρά. Οι θηλιές A,B και C προέρχονται από μια α - υπομονάδα ενώ οι θηλιές D,E και F μπορούν να προέρχονται και από μη- α υπομονάδα (Corringer et al.,2000). Ως α -υπομονάδες ορίζονται οι υπομονάδες που περιέχουν τη C-θηλιά απαραίτητη για τη δέσμευση της ακετυλοχολίνης ενώ οι υπομονάδες που δεν την περιέχουν ονομάζονται μη- α υπομονάδες (β,δ,ϵ ή γ). Οι υποδοχείς που περιέχουν μόνο α -υπομονάδες ονομάζονται ομομερείς ενώ μπορούν να εντοπιστούν και ετερομερείς υποδοχείς όπου περιέχονται εκτός από α -υπομονάδες και συνδιασμός άλλων μη α -υπομονάδων (Εικόνα 1.7). Ανάλογα με τη δομή τους καθορίζεται και η λειτουργική και φαρμακολογική ιδιότητα τους (Millar et al.,2009).



Εικόνα 1.7: Δομή νικοτινικών υπομονάδων. Αποτελούνται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές (1-4), μια μικρή καρβοξυτελική ουρά και μια μεγάλη αμινοτελική εξωκυτταρική ουρά. Στην αμινοτελική περιοχή εμφανίζονται οι θηλιές (A-F) όπου προσδένεται η ακετυλοχολίνη. Οι α -υπομονάδες φέρουν πάντα την C-θηλιά.

1.3.1 Μοριακή δομή νικοτινικών υπομονάδων της ακετυλοχολίνης στα έντομα

Η πρώτη αλληλούχηση υπομονάδων ακετυλοχολίνης έγινε το 1980 στο *Torpedo californica* και στο *Torpedo marmorata* (Ballivet et al., 1982, Devillers-Thiery et al., 1983, Noda et al., 1983.). Με βάση τις αλληλουχίες αυτές σχεδιάστηκαν ανιχνευτές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πρώτων cDNA κλώνων νικοτινικού υποδοχέα στα έντομα, του οργανισμού μοντέλου *Drosophila melanogaster* (Hermans-Borgmeyer et al.,1986). Μέσα στα επόμενα 20 χρόνια ταυτοποιήθηκαν ακόμη 9 άλλες υπομονάδες. Συγκεντρωτικά, ταυτοποιήθηκαν 10 διαφορετικές υπομονάδες από τις οποίες οι 7 είναι α -υπομονάδες (Da1-7) και οι 3 μη α -υπομονάδες (D β 1-D β 3) (Littleton

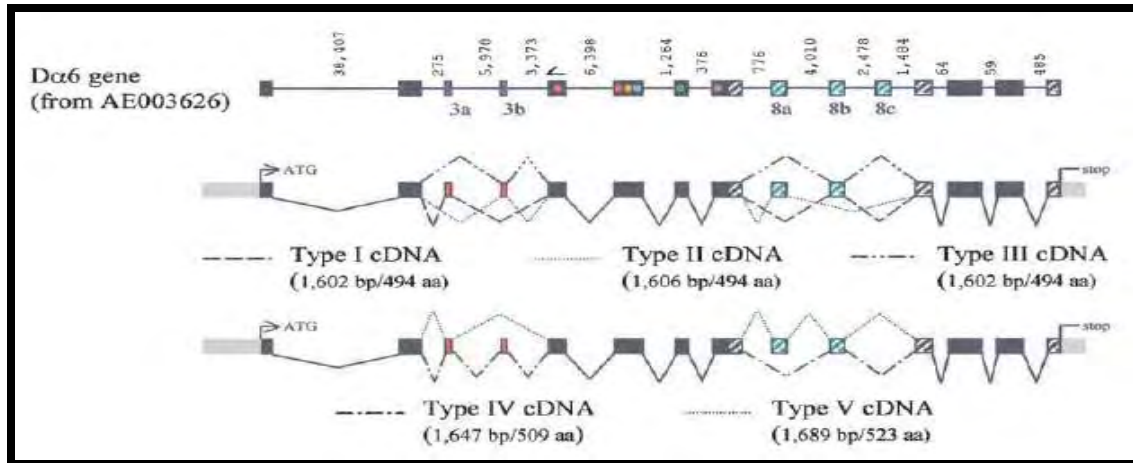
et al.,2000). Τα cDNA των υπομονάδων Da6 και Da7 κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 494 αμινοξέων και 542 αμινοξέων αντίστοιχα.

Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την δομή ολόκληρων των υποδοχέων δεν είναι εφικτές λόγω της αδυναμίας του σχηματισμού υπομονάδων εντόμου σε ετερόλογα συστήματα. Οι μόνες πληροφορίες που υπάρχουν είναι μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρίμησης από υβριδικούς υποδοχείς (αποτελούμενους δηλαδή από υπομονάδες εντόμου αλλά και θηλαστικών) οι οποίες παρουσιάζουν τρεις διαφορετικές δομές υποδοχέων: α. όπου συμμετέχουν τουλάχιστον μια Dβ1 και Dβ2 υπομονάδα, β. συμμετέχουν τουλάχιστον μια Dβ1 και Da3 υπομονάδα και γ. Da1, Da2 και Dβ2. (Chamaon et al.,2002).

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση των υπομονάδων στη *Drosophila melanogaster* ακολούθησαν αλληλουχήσεις των υπομονάδων στα έντομα *Anopheles gambiae* (Jones et al.,2005), *Apis mellifera* (Jones et al.,2006), *Bombix mori* (Xia et al.,2004). Αυτά τα έντομα εξελικτικά διαχωρίστηκαν πριν από 300 εκατομμύρια χρόνια. Εντούτοις οι οικογένειες των νικοτινικών υποδοχέων τους παραμένουν συντηρημένες και αποτελούνται από 10 γονίδια σε *Drosophila melanogaster* και *Anopheles gambiae*, 11 γονίδια σε *Apis mellifera* και 12 γονίδια σε *Bombix mori*. Παρ' όλο που ο αριθμός των γονιδίων μεταξύ των εντόμων παρουσιάζεται κάπως συντηρημένος οι τελικές πρωτεΐνες μπορούν να διαφέρουν λόγω της παρουσίας εναλλακτικού ματίσματος και RNA A-to-I editing.

Δυο υπομονάδες της *Drosophila melanogaster* (Da4 και Da6) (Grauso et al.,2002, Jonas et al.,1990, Landstell et al., 2000) αλλά και τα ορθόλογα γονίδιά τους στα άλλα είδη παρουσιάζουν εναλλακτικό μάτισμα (Jones et al.,2005, Jones et al.,2006, Shao et al.,2007). Συγκεκριμένα στη Da6 υπομονάδα παρουσιάζονται δυο εναλλακτικά ματίσματα για το εξόνιο 3 (3a και 3b) και τρία για το εξόνιο 8 (8a, 8b και 8c) (Εικόνα 1.8). Ο αριθμός αυτός μπορεί να ποικίλει μεταξύ των ειδών π.χ Agama6 και Bmora6 παρουσιάζουν δυο διαφορετικά εναλλακτικά ματίσματα στο εξόνιο 8 ενώ στα Amela6 και Da6 υπάρχουν 3 διαφορετικά.. Το εναλλακτικό μάτισμα στο Agama6 στο εξόνιο 8

αντικαθιστά μια βαλίνη με μια λευκίνη στην TM2 περιοχή του καναλιού ιόντων, ενώ το κατάλοιπο λευκίνης είναι διατηρημένο σε όλα τα εναλλακτικά ματίσματα στις *Amela6*, *Da6* και *Tcasa6* (Jin et al.,2007).



Εικόνα 1.8: Οργάνωση γονιδίου της *Da6* υπομονάδας του nAChR. Τα εξόνια παρουσιάζονται με τη μορφή μαύρων κουτιών ενώ με χρωματιστές τελείες οι διαμεμβρανικές περιοχές. Παρουσιάζονται 5 τελικά διαφορετικά μετάγραφα που προκύπτου με εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 3 (3a και 3b) και 8 (8a, 8b και 8c).

Από εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να προκύψουν και οι διαφορετικές ισομορφές των νικοτινικών υποδοχέων όπως συμβαίνει στην *Amela3* όπου παρουσιάζονται δυο μορφές υπομονάδων με διαφορετική θηλιά μεταξύ των TM3-TM4 περιοχών (διαφέρουν μεταξύ τους κατά 13 αμινοξέα) (Jones et al.,2006). Η υπομονάδα με τη μεγάλη θηλιά περιέχει περισσότερες περιοχές φωσφορυλίωσης όπου δεσμεύεται ο προσδέτης υποδηλώνοντας τη συμμετοχή του σε διαφορετικές αποκρίσεις του υποδοχέα σε περιπτώσεις απευαισθητοποίησης και ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα (Borges et al.,2001, Hopfield et al.,1988).

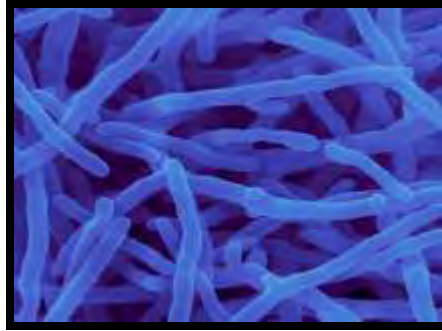
Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι το RNA A-to-I editing δίνοντας διαφορετικά μετάγραφα με αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία ώστε να έχουμε αλλαγή των αμινοξικών καταλοίπων δίνοντας διαφορετικές ισομορφές υπομονάδων. Στη *Drosophila melanogaster* παρατηρήθηκε στις υπομονάδες *Da5*, *Da7* και *Dβ2* όπου ετοπίστηκαν αλλαγές στα κατάλοιπα αμινοξέων στις TM2-TM4 διαμεμβρανικές περιοχές αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά του καναλιού ιόντων (Guzman et al.,2003, Tamamizu et

al., 1999). Επίσης πιθανόν να επηρεάζει την περιοχή πρόσδεσης του νευροδιαβιβαστή στις Da6 και Db1 καθώς παρατηρούνται αλλαγές στην εξωκυτταρική αμινοτελική ουρά.. Το RNA editing παρατηρείται και στο γονίδιο της α6 υπομονάδα της *A.mellifera* με αποτέλεσμα την προσθήκη 9 αμινοξέων σε μια συντηρημένη περιοχή στην θηλιά E που συνήθως δίνει μια περιοχή γλυκοσυλίωσης. Σχεδόν όλα αυτά τα κατάλοιπα παρουσιάζονται μέσω RNA editing και σε άλλα είδη όπως *B.mori*, *D.melanogaster*, *H.viriscens*, *M.domestica* και *T.castaneum* (Jin et al.,2007). Η απουσία της περιοχής γλυκοσυλίωσης ίσως να επηρεάζει την ωρίμανση της πρωτεΐνης και την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα. Το αντίθετο φαινόμενο συμβαίνει στην περίπτωση της *M.domestica* όπου η περιοχή γλυκοσυλίωσης σχηματίζεται μετά από το RNA editing αντικαθιστώντας μια ασπαραγίνη σε σερίνη (Gao et al.,2007).

1.4 Εντομοκτόνο Spinosad

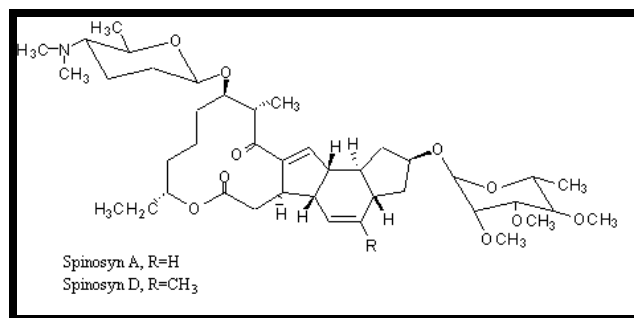
Το Spinosad πρωτοεμφανίστηκε στην αγορά το 1997 και αποτελεί το ενεργό συστατικό των εντομοκτόνων Tracer Naturalyte, Conserve και Success (Thompson et al., 1997, Thompson et al. 2000). Ανήκει στην κατηγορία των νατουραλιτών δηλαδή των εντομοκτόνων που έχουν ως βάση φυσικά προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών που έχουν ιδιότητες εντομοκτόνου.

Αποτελείται κυρίως από τις δυο ενεργές μακρολίδες, spinosyn A και spinosyn D που παράγονται κατά την αερόβια ζύμωση του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa* (Bret et al., 1997). Ο ακτινομύκητας αυτός απομονώθηκε πρώτη φορά το 1982 από ένα εγκαταλελειμμένο εργοστάσιο παραγωγής ρουμιού απ' όπου ένας επιστήμονας της Eli Lilly πήρε μερικά εδαφικά δείγματα για διερεύνηση της ύπαρξης βιολογικής δράσης (Εικόνα 1.9). Στη συνέχεια απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν περισσότερες από 20 διαφορετικές σπινოსίνες (A-Y) (Sparks et al.,1997).



Εικόνα 1.9: Δομή Gram+ ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa*.

Δομικά οι μακρολίδες αυτές περιέχουν ένα τετρακυκλικό σύστημα όπου είναι ενωμένα δυο σάκχαρα. Μεταξύ τους διαφέρουν στην παρουσία μιας μεθυλομάδας στο Spinosyn D (Εικόνα 1.10).



Εικόνα1.10: Δομή των βασικών τετρακυκλικών μακρολιδών του Spinosad, Spinosyn A και Spinosyn D

Βασικά πλεονεκτήματα του Spinosad είναι η γρήγορη διάσπασή του στο περιβάλλον καθώς διασπάται μέσω φωτοδιάσπασης και μικροβιακής διάσπασης στα φυσικά συστατικά του με χρόνο ημιζωής που διαρκεί από μια έως δεκαεπτά μέρες, και το μεγάλο φάσμα δράσης του καθώς χρησιμοποιείται απέναντι σε κολεόπτερα, δίπτερα, λεπιδόπτερα, θυσανόπτερα, ομόπτερα, υμενόπτερα, ισόπτερα και αρθρόπτερα (Salgado et al., 1998).

Μια σημαντική διαφορά του Spinosad από τα κοινά εντομοκτόνα είναι ο διαφορετικός μοριακός στόχος που φέρεται να έχει, μειώνοντας και την πιθανότητα εμφάνισης φαινομένων όπως η διασταυρωμένη ανθεκτικότητα. Συγκεκριμένα με γνωστές βιοχημικές δοκιμασίες απέναντι σε γνωστούς μοριακούς στόχους εντομοκτόνων δεν

εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική τοξικότητα υποδεικνύοντας την ιδιαιτερότητα του στόχου του εντομοκτόνου αυτού (Salgado et al.,1997).

Καταγράφοντας τα φαινοτυπικά συμπτώματα διαφόρων εντόμων υπό την επίδραση του εντομοκτόνου παρατηρήθηκαν φαινοτυπικά αλλαγές στο νευρομυϊκό σύστημα. Συγκεκριμένα τα φαινοτυπικά συμπτώματα σε ένα έντομο είναι αρχικά η ανύψωση του σώματός του λόγω της ασύμμετρης επιμήκνωσης των ποδιών του. Όσο το εντομοκτόνο συνεχίζει να επιδρά τα πόδια συνεχίζονται να επιμηκύνονται με αποτέλεσμα να προκαλείται αναστροφή του εντόμου και τρέμουλο που ακολουθείται από παράλυση. Αυτό δε παρατηρείται μόνο στο εξωτερικό του εντόμου αλλά οι συνεχείς συσπάσεις συμβαίνουν σε όλα τα όργανά του εντόμου με αποτέλεσμα στο τέλος το έντομο να πεθαίνει από ασφυξία λόγω των συνεχών συσπάσεων του αναπνευστικού συστήματος (Εικόνα 1.7). Τα συμπτώματα αυτά παραμένουν τα ίδια είτε αν χορηγηθεί το εντομοκτόνο μέσω ένεσης είτε αν χορηγηθεί μέσω επαφής (Salgado et al., 1998). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις ως μοριακό στόχο το εντομοκτόνο θα μπορούσε να είναι οποιοδήποτε μόριο συμμετέχει στην νευροδιαβίβαση είτε αυτό μπορεί να είναι νευροδιαβιβαστής είτε υποδοχέας.



Εικόνα 1.11: Συμπτώματα τοξικότητας του Spinosad: α. Έντομο στην φυσιολογική του κατάσταση, β. ασύμμετρη ανάπτυξη των ποδιών του εντόμου, γ. Η τοξικότητα συνεχίζεται με αποτέλεσμα την ανύψωση του θώρακα και το άνοιγμα των φτερών του εντόμου, δ. Η ασύμμετρη επιμήκνωση των άκρων οδηγεί στο αναποδογύρισμα του εντόμου ενώ οι συσπάσεις συνεχίζονται.

Σημαντική παρατήρηση είναι ότι σε απομονωμένα γάγγλια εντόμων το Spinosad μπορούσε να «ενεργοποιήσει» τα γάγγλια δίνοντας ώση στο νευρικό σύστημα των

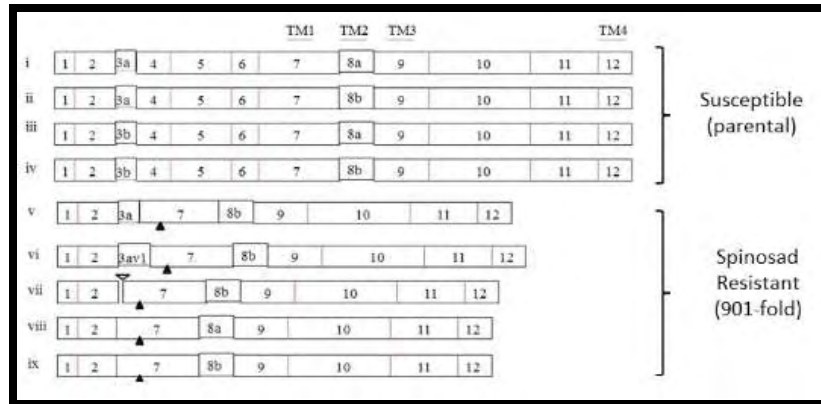
εντόμων υποδεικνύοντας την άμεση δράση του εντομοκτόνου στους υποδοχείς και όχι στους νευροδιαβιβαστές όπως η ακετυλοχολίνη (Salgado et al., 1998). Με αυτή τη λογική ως μοριακός στόχος του εντομοκτόνου φέρεται να είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης.

Με την καταγραφή ανθεκτικών φυσικών πληθυσμών εντόμων προς το Spinosad όπως *Plutella xylostella* (Zhao et al., 2002), *Spodoptera exigua* (Moulton et al., 2000) και *Liriomyza trifolii* (Ferguson et al., 2004) το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε ακόμη περισσότερο στον εντοπισμό του μοριακού στόχου του εντομοκτόνου ώστε να εντοπιστούν οι παράγοντες που προκαλούν την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας.

Αρχικά δημιουργήθηκαν ανθεκτικές εργαστηριακές σειρές εντόμων στο Spinosad και μελετήθηκε η συμβολή ενζύμων αποτοξικοποίησης του οργανισμού. Όπως παρατηρήθηκε με βιοχημικές μελέτες η ανθεκτικότητα δεν οφείλεται σε αύξηση του μεταβολισμού του εντομοκτόνου (Shono et al., 2003, Scott et al., 2008) αυξάνοντας τις πιθανότητες να συμμετέχει ο υπονήφιος μοριακός στόχος του εντομοκτόνου, ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης. Αυτό επιβεβαιώθηκε σε μελέτες που έγιναν σε διάφορους πληθυσμούς όπως *Drosophila melanogaster*, *Bactrocera dorsalis*, *Plutella xylostella*.

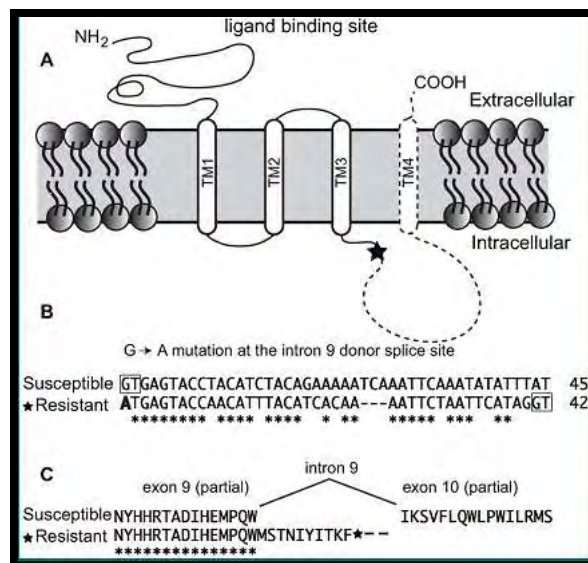
Συγκεκριμένα, στη *Drosophila melanogaster* και σε μια εργαστηριακή σειρά με ανθεκτικότητα ~1181X, εντοπίστηκε μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη συγκεκριμένα μια αναστροφή στο εξόνιο 8 του γονιδίου της α6 υπομονάδας η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας μη λειτουργικής υπομονάδας, χωρίς TM3, κυτταροπλασματική θηλιά, TM4 και εξωκυτταρικής θηλιάς (Perry et al., 2007).

Στη μύγα *Bactrocera dorsalis* η απουσία των εξονίων 4-6 αλλά και μικρές απαλοιφές και προσθήκες καθώς και πρώιμα κωδικόνια λήξης στο εξόνιο 7 του cDNA της α6 υπομονάδας εμποδίζουν το σχηματισμό μιας λειτουργικής υπομονάδας και αυξάνουν την ανθεκτικότητα του εντόμου μέχρι και ~901X όπως φαίνεται στην εικόνα 1.8 (Hsu et al., 2012) (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12: Σχηματική παρουσίαση όλου του μεταγράφου που κωδικοποιεί το α6 νικοτινικό υποδοχέα του *Bactrocera dorsalis* σε ευαίσθητες και ανθεκτικές σειρές. Το μαύρο τρίγωνο υποδεικνύει τα πρώιμα κωδικόνια λήξης. Τα λευκά τρίγωνα υποδεικνύουν την περιοχή ματίσματος στο εξόνιο 3 που προσθέτουν την αλληλουχία TTTGAG.

Η υπομονάδα α6 φέρεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας και στην *Plutella xylostella*. Συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα αποδίδεται σε μια σημειακή μετάλλαξη στο 5-άκρο του ιντρονίου 9 το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη 40 βάσεων στο τελικό μετάγραφο (Εικόνα 1.13). Σε επίπεδο πρωτεΐνης αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός πρώιμου κωδικονίου λήξης και την παραγωγή μιας μη λειτουργικής υπομονάδας (Baxter et al., 2010).



Εικόνα 1.13: Α Σχηματική παρουσίαση των τεσσάρων διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα α6. Στον υποδοχέα του αθεκτικού πληθυσμού παρουσιάζεται ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης (αστερίσκος). Β. Η αλληλουχία του ιντρονίου 9 της ευαίσθητης σειράς (πρώτες 45 βάσεις) και η αντίστοιχη περιοχή στην ανθεκτική σειρά. Ατικατάσταση του G σε Α έχει

σαν αποτέλεσμα την προσθήκη αυτού του ιντρονίου στο τελικό μετάγραφο και την παραγωγή ενός πρώιμου κωδικονίου λήξης.C. Η αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των εξονίων 9 και 10. Με αστερίσκο είναι τα κοινά αμινοξέα

Σημαντική διαφορά παρουσιάζει η ανθεκτικότητα στη *Musca domestica* όπου ο παράγοντας ανθεκτικότητας εντοπίστηκε στο αυτόσωμα 1. Στην περιοχή αυτή υπάρχει το γονίδιο του CYP6D1 το οποίο σχετίζεται με εμφάνιση ανθεκτικότητας σε διάφορα έντομα (Shono et al., 2003). Για να μελετήσουν αν όντως το P450 συμμετέχει στην ανθεκτικότητα χρησιμοποίησαν PBO.

Το PBO προσδένεται στις μονοοξυγενάσες και αναστέλλει τη λειτουργία τους. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1947 ως συνεργιστής των πυρεθροειδών εντομοκτόνων όπου παρατήρησαν ότι με τη χορήγηση του PBO υπήρχε αναστολή της ανθεκτικότητας που προκαλούνταν από αυξημένο μεταβολισμό του εντομοκτόνου. Πλέον, το μόριο αυτό χρησιμοποιείται σε τοξικολογικά πειράματα καθώς αναστολή της ανθεκτικότητας με χορήγηση PBO υποδηλώνει συμμετοχή των P450 στην ανάπτυξη της. Αυτό στην περίπτωση της *Musca domestica* δεν παρατηρήθηκε αποκλείοντας τη συμμετοχή του γονιδίου του CYP6D1 στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στο Spinosad.

Η συμβολή της α6 υπομονάδας στις πάραπάνω περιπτώσεις ανθεκτικότητας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η υπομονάδα αυτή ίσως είναι και ο μοριακός στόχος του εντομοκτόνου αυτού. Ίσως να αποτελεί τη μοναδική υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα που να εμπλέκεται στην πρόσδεση του Spinosad στα έντομα ή να αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο του υποδοχέα για τη δράση του εντομοκτόνου. Η επιτυχής κλωνοποίηση και αλληλούχηση της υπομονάδας αυτής στα διάφορα έντομα είναι απαραίτητη για τις μελέτες ανθεκτικότητας καθώς και τις μελέτες δράσης του εντομοκτόνου αυτού.

1.5 Δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς ή *Bactrocera oleae* αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και ιδιαίτερα καταστρεπτικά παράσιτα της ελιάς (Εικόνα 1.13). Οι απώλειες στην ελαιοπαραγωγή μπορεί να φτάσει το 15% στις Μεσογειακές χώρες (Montiel-Bueno and Jones, 2002).

Ανήκει στην οικογένεια Tephritidae της τάξης των Διπτέρων μαζί με την μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*) και τη μύγα των κερασιών (*Rhagoletis cerasi*). Αποτελεί ένα από τα μικρότερα σε μέγεθος είδη του γένους του, με μέγεθος περίπου 5mm το ενήλικο θηλυκό και έκταση φτερών 10mm (Κακάνη, 2009).

Ο δάκος της ελιάς είναι ολομετάβολο και πολυκυκλικό έντομο. Το στάδιο του αυγού ακολουθούν τρία προνυμφικά στάδια, μετά το τέλος των οποίων επιτελείται η πρώτη μεταμόρφωση σε νύμφη και τέλος με τη δεύτερη μεταμόρφωση προκύπτει το ενήλικο ενώ μπορεί να πραγματοποιήσει τον βιολογικό κύκλο περισσότερες από μια φορές ανά έτος.



Εικόνα 1.14: Απεικόνιση του δάκου της ελιάς.

Κάθε χρόνο προκαλεί σημαντική οικονομική ζημιά στην ελαιοπαραγωγή, τόσο με την υποβάθμιση των ελαιοκομικών προϊόντων, ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές, όσο και με το κόστος πρόληψης των δακοπροσβολών. Οι ζημιές που προκαλούνται σε καλλιέργειες ελιάς από τον δάκο διακρίνονται σε ποιοτικές και ποσοτικές. Ποιοτικές διότι ελιές προσβλημένες από δάκο δίνουν χαμηλής ποιότητας ελαιόλαδο με υψηλή οξύτητα και μειωμένη διάρκεια ζωής σε πρώτο βαθμό και σε δεύτερο η νύξη που προκαλεί το έντομο στον καρπό επιτρέπει την ανάπτυξη μυκήτων. Ποσοτικές διότι οι καρποί δύναται να πέσουν πρόωρα από το δέντρο με αποτέλεσμα τη μειωμένη απόδοση συγκομιδής.

Ο έλεγχος των πληθυσμών του δάκου βασίζεται ακόμη και σήμερα σχεδόν αποκλειστικά στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Τα περιβαλλοντικά προβλήματα, όμως, που συνεπάγονται από τη χρήση εντομοκτόνων οδήγησαν στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου με τη χρήση εντομοπαθογόνων οργανισμών ή βιολογικών εντομοκτόνων, όπως το νατουραλίτη εντομοκτόνο Spinosad, το οποίο άρχισε να χρησιμοποιείται για την προστασία της ελαιοκαλλιέργειας από το 2004.

1.6 Σκοπός

Όπως προαναφέρθηκε το Spinosad είναι σχετικά καινούριο εντομοκτόνο για το οποίο λόγω της περιορισμένης προς το παρόν χρήσης του δεν εμφανίστηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς. Η μακροχρόνια όμως επιλογική του δράση, όπως είναι φυσιολογικό και παρατηρείται για κάθε συμβατικό εντομοκτόνο, θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς στο νατουραλίτη εντομοκτόνο Spinosad μέσω δυο διαφορετικών προσεγγίσεων. Μέσω βιοχημικής δοκιμής προσδιορίστηκε η συμβολή των γενικών εστερασών στην ανθεκτικότητα ενώ έγινε κλωνοποίηση του μοριακού στόχου του εντομοκτόνου Spinosad στους δυο εργαστηριακούς πληθυσμούς έναν ευαίσθητο στο Spinosad και έναν που διατηρείται στο εργαστήριό μας υπό συνεχή επιλογή σε Spinosad. Η σύγκριση ανάμεσα στις αλληλουχίες που προέκυψαν μπορεί να μας οδηγήσουν στη διαλεύκανση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο.

2.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά- Μέθοδοι

2.1 Εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων

Ο εργαστηριακός πληθυσμός εντόμων προέρχεται από την αποικία του εργαστηρίου εντομολογίας ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με κωδικό ΑΤ που εγκαθιδρύθηκε στο εντομοτροφείο πριν από περίπου 40 χρόνια. Η εκτροφή του εντόμου γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία 23-25 °C, σχετικής υγρασίας 65% και φωτοπερίοδο 12:12 (φως: σκοτάδι).

Ο ανθεκτικός εργαστηριακός πληθυσμός αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Προέρχεται από την ανάμιξη του στελέχους Δημόκριτος με άτομα από φυσικούς πληθυσμούς, τόσο διαφορετικών περιοχών της Ελλάδας όσο και της Καλιφόρνιας. Το στέλεχος αυτό αναπτύχθηκε κάτω από συνθήκες επιλογής, προσθέτοντας συνεχώς αυξανόμενες δόσεις του εντομοκτόνου Spinosad Success 8000 στο νερό εκτροφής. Η συγκέντρωση εντομοκτόνου υπολογίζεται ως εξής: 1X εντομοκτόνου αντιστοιχεί σε 1 γραμμάριο συμπυκνωμένου εντομοκτόνου Spinosad διαλυμένο σε 50ml νερού βρύσης. Μετά από 36 γενιές συνεχούς επιλογής η ανθεκτικότητα υπολογίστηκε στο ~30X.

2.2 Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα έντομα *Bactrocera oleae*

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προέρχεται από την εταιρία Invitrogen και αποτελεί βελτίωση της μεθόδου που περιγράφηκε το 1987 από τους Chomczynski και Sacchi «Single step RNA isolation».

Η μέθοδος αποτελείται από τέσσερα στάδια : ομογενοποίηση του εντόμου, διαχωρισμός φάσεων RNA/DNA/πρωτεΐνες, κατακρήμνιση και καθαρισμός. Η διαδικασία βασίζεται στο αντιδραστήριο TRIzol® Reagent το οποίο αποτελεί ένα μονοφασικό μείγμα φαινόλης, ισοθειοκυανίνη και άλλων ουσιών που υποβοηθούν την απομόνωση RNA. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανασταλτική δράση του TRIzol® Reagent στις RNAσες προστατεύοντας το RNA και αυξάνοντας έτσι την απόδοση της μεθόδου.

Υλικά:

- ✓ TRIzol
- ✓ Χλωροφόρμιο
- ✓ Ισοπροπανόλη
- ✓ Αιθανόλη 70%

Μέθοδος:

1. Ομογενοποίηση του ιστού σε 1ml TRIzol ανά 50-100mg ιστού. Ο ιστός πρέπει να είναι μικρότερος από το 10% του όγκου του υγρού.
2. Επάωση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να γίνει διάχυση των ενδοκυτταρικών μορίων στο διάλυμα.
3. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4 °C για να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
4. Μεταφορά του υπερκείμενου σε 1.5ml eppendorf και προσθήκη χλωροφορμίου. Για 1ml TRIzol προστίθεται 200μl χλωροφορμίου.
5. Ανακίνηση και επάωση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15 λεπτά στους 4 °C όπου γίνεται ο διαχωρισμός σε τρεις διακριτές φάσεις. Η πρώτη φάση (από τη βάση του eppendorf) είναι χρώματος κυανού (όπως το ατιδραστήριο TRIzol) και περιέχει όλα τα οργανικά στοιχεία του ομογενοποιημένου (πρωτεΐνες), μια μεσόφαση που περιέχει το DNA και μια υδατική-διαφανής φάση όπου περιέχεται το RNA. Η υδατική φάση αντιστοιχεί στο 60% του όγκου TRIzol που χρησιμοποιήθηκε.
7. Μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης σε καινούριο eppendorf.
8. Προσθήκη ισοπροπανόλης (500μl για 1 ml TRIzol) και ανακίνηση.
9. Επάωση για 10-60 λεπτά στους -80 °C.
10. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 30 λεπτά, 4 °C.
11. Αφαίρεση του υπερκείμενου και καθαρισμός του ιζήματος με 75% αιθανόλη. Προσθήκη 1ml αιθανόλης για 1ml TRIzol.
12. Ελαφριά ανακίνηση με vortex και φυγοκέντρηση στις 7500rpm για 5 λεπτά, 4 °C.
13. Αφαίρεση του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος για 10 λεπτά. Το ιζήμα γίνεται διαφανές.

14. Αναδιάλυση του ιζήματος στην επιθυμητή ποσότητα ddH₂O. Για καλύτερη αναδιάλυση πραγματοποιείται επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 °C.
15. Το απομονωμένο RNA αποθηκεύεται στους -80 °C.

2.3 Σύνθεση μονόκλωνου cDNA από ολικό RNA

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας «First strand synthesis with M-MuLV reverse transcriptase».

Υλικά

- ✓ ολικό RNA
- ✓ dNTP mix
- ✓ Εκκινητή dT
- ✓ 10X RT Buffer
- ✓ RNase inhibitor
- ✓ M-Mulv Reverse Transcriptase

Μέθοδος

1. Σε ένα PCR tube προστίθεται:

ολικό RNA	0,5-2 μg	X
Εκκινητή dT		2μl
dNTP mix		<u>4μl</u>

και ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 16μl.
2. Θέρμανση για 5 λεπτά στους 65-80 °C
3. Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων:

10X RT Buffer	2μl
RNase inhibitor	1μl
M-Mulv Reverse Transcriptase	1μl
4. Επώαση στους 42 °C για 1 ώρα.
5. Απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 90 °C για 10 λεπτά.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Τα πρώτα πρωτόκολλα για τη μέθοδο αυτή παρουσιάστηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '80, ενώ το 1993 ο K.Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR (Mullis et al., 1986).

Η μέθοδος βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους με εναλλαγές στη θερμοκρασία που έχουν ως στόχο:

- α. Την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA-στόχου σχηματίζοντας δυο μονόκλωνες αλυσίδες ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία, 94-95 °C.
- β. Την υβριδοποίηση των εκκινητών (primers) με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περίπου 5 °C κάτω από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών ($T_a = T_m - 5$). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace $T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + 2 * (\text{αριθμός βάσεων A+T})$.
- γ. Τον πολυμερισμό- επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων σε θερμοκρασία 72-74 °C. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση.

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους (συνήθως 30 κύκλοι), έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική και ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης περίπου 10^9 μόρια DNA.

Το πρόγραμμα μιας τυπικής αντίδρασης PCR είναι:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	94°C	4min	1
Αποδιάταξη	94°C	30sec	
Υβριδισμός	T_a °C	30sec	30
Πολυμερισμός	72°C	1kb/min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Υλικά:

- ✓ DNA
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)
- ✓ MgCl₂
- ✓ dNTPs
- ✓ Ειδική DNA πολυμεράση (Taq)
- ✓ Εκκινητές (Primers)

Μέθοδος:

1. Σε μια τυπική αντίδραση PCR τελικού όγκου 20 μl προστίθενται:

Υλικά	Carχ.	Γτελ	Ποσότητα
DNA		10-40ng	-
Buffer	10X	1X	2 μl
MgCl₂	50mM	1,5mM	0,6 μl
dNTPs	10Mm each	0,2Mm each	0,4 μl
Εκκινητές F	10pcmol/μl	0,4-0,6μM	0,7 μl
R	10pcmol/μl	0,4-0,6μM	0,7 μl
Taq	5Unit/μl	1unit	0,2 μl
ddH₂O			Μέχρι Vτελ= 20μl
Τελικός όγκος			20μl

2. Τα σωληνάκια PCR τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα.

Η απόδοση μιας PCR αντίδρασης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η συγκέντρωση των Mg²⁺, ο αριθμός των κύκλων και η χρονική τους διάρκεια, η πολυμεράση που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου και τέλος ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών.

2.5. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA (Sambrook et al., 1989). Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος τότε το DNA θα μετακινηθεί προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH.

Η μετακίνηση του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Όσο πιο μικρό το μέγεθος του DNA τόσο πιο γρήγορα μετακινείται προς το θετικό πόλο. Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όσο πιο πυκνή η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη τόσο πιο υψηλή η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος.

Το DNA είναι ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA σε ποσότητα ίση με τη συγκέντρωση του. Άρα με βάση το φθορισμό των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και το γενετικό υλικό. Επίσης μπορούμε να υπολογιστεί το μέγεθος του DNA έχοντας ως «χάρακα» ένα μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder).

Υλικά:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X 1L: 54g Tris-base, 27,5g Boric acid, 20ml EDTA 0,5M (pH 8.0)
- ✓ Αγαρόζη
- ✓ Ladder
- ✓ Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X: 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο

Μέθοδος:

Για την παρασκευή 100ml πηκτώματος αγαρόζης 1% με 0,5X TBE:

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης σε μια κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 100ml TBE 0,5X.

3. Θέρμανση της κωνικής φιάλης με συνεχή παρακολούθηση μέχρι να πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της αγαρόζης
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση
5. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στις ειδικές βάσεις ηλεκτροφορητικής συσκευής.
6. Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν τα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα και ανάδευση.
4. Μεταφορά των δειγμάτων και του μάρτυρα μοριακού βάρους στα πηγαδάκια.

Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης γίνεται με παρατήρηση μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας του πηκτώματος. Την κινητικότητα των τμημάτων DNA στο πήκτωμα επηρεάζει η συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο $\mu = \log \mu_0 - K\tau$ όπου μ_0 είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και $K\tau$ ο συντελεστής επιβράδυνσης

2.6 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας Promega με όνομα «First strand synthesis with M-MuLV reverse transcriptase».

Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης ώστε να χρησιμοποιηθούν για άλλες πειραματικές διαδικασίες όπως re-PCR, κλωνοποίηση.

Υλικά:

- ✓ Membrane binding solution
- ✓ Διάλυμα πλύσης Μεμβράνης (Membrane wash solution)
- ✓ Υδατικό διάλυμα ελεύθερο Νουκλεασών (Nuclease-free water)
- ✓ Δείγμα του πηκτώματος

Μέθοδος:

1. Η επιθυμητή ζώνη του πηκτώματος αγαρόζης τοποθετείται σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf 1,5ml.
2. Υπολογισμός του βάρους του gel και προσθήκη 10μl από το διάλυμα Membrane Binding Solution ανά 10mg gel. Μέσα σε αυτό το διάλυμα θα διαχυθεί το γενετικό υλικό από το πήκτωμα. Όταν το βάρος του πηκτώματος είναι πάνω από 500mg, το πήκτωμα μοιράζεται σε δυο κομμάτια σε διαφορετικά erpendorfs.
3. Ανάδευση και επώαση 50-65°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα.
4. Όταν διαλυθεί πλήρως το διάλυμα μεταφέρεται στη στήλη (SV mini column). Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα στο σωλήνα συλλογής (tube collection). Επώαση για ένα λεπτό.
5. Φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό. Απορρίπτεται το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη στο σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 700μl Membrane Wash Solution. Το διάλυμα αυτό περιέχει και 95% αιθανόλη.
7. Φυγοκέντρηση στις μέγιστες στροφές για ένα λεπτό.
8. Το έκλουσμα απορρίπτεται από το σωλήνα συλλογής.
9. Προσθήκη 500μl Membrane Wash Solution και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές.
10. Απορρίπτεται το έκλουσμα και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για ένα λεπτό για να απομακρυνθεί η αιθανόλη.
11. Μεταφορά της στήλης προσεκτικά σε καθαρό σωληνάκι τύπου erpendorf.
12. Προσθήκη 25μl Nucleases-free water στο κέντρο της στήλης χωρίς να αγγίζει το φίλτρο. Το Nucleases free Water προθερμαίνεται σε υδατόλουτρο 50-65 °C.
13. Επώαση για ένα λεπτό και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό.

14. Επανάληψη των βημάτων 11 και 12.
15. Αποθήκευση του DNA στους 4 °C.

2.7 Κατακρήμνιση DNA

Ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο τροποποιημένο από το Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989.

Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη με σκοπό τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων ή άλλων προσμίξεων.

Υλικά:

- ✓ Ισοπροπανόλη
- ✓ Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa)
- ✓ Αιθανόλη 70%
- ✓ Γλυκογόνο

Μέθοδος:

1. Προσθήκη στο δείγμα ενός όγκου ισοπροπανόλης 100%, CH₃COONa 3M για τελική συγκέντρωση 0,3M (ασθενές αλάτι του οποίου τα ιόντα Na⁺ θα συνδεθούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA) και 0,5μλ γλυκογόνο(μεγαλομόριο με πόρους που παρασύρου το DNA).
2. Επώαση για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές για 15-20 λεπτά.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70% ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.
5. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται
7. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου το erpendorf μέχρι να ξηραθεί το ιζήμα του DNA.
8. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε υδατικό διάλυμα.

2.8 Εκχύλιση του DNA με φαινόλη- χλωροφόρμιο

Πρωτόκολλο τροποποιημένο από Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook, E.F. Fritisch, T. Maniatis, 1989).

Στόχος της μεθόδου είναι η απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιώντας δυο οργανικούς διαλύτες, τη φαινόλη και το χλωροφόρμιο.

Υλικά

- ✓ Φαινόλη
- ✓ Χλωροφόρμιο

Μέθοδος

1. Προσθήκη μισού όγκου (σε σχέση με τον όγκο του δείγματος) φαινόλης (αποδιατάσσει και διαχωρίζει τις πρωτεΐες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα) και χλωροφορμίου (διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τυχόν υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα) στο δείγμα.
2. Ανακίνηση ώστε να πάρει γαλακτώδη μορφή το μείγμα.
3. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις μέγιστες τροφές ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις (οργανική και υδατική).
4. Μεταφορά προσεκτικά της υδατικής φάσης με πιπέτα σε καινούριο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και απαλή ανάδευση.
6. Επανάληψη των βημάτων 3-5.

2.9 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται μέσω μιας διαμοριακής αντίδρασης στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με την δράση του ενζύμου DNA λιγάσης ώστε να πραγματοποιηθεί κυκλοποίηση και σχηματισμός ενός ανασυνδιασμένου πλασμιδίου.

Οι DNA λιγάσες είναι ζωτικής σημασίας ένζυμα απαραίτητα για σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως αναδιπλασιασμό και επιδιόρθωση του DNA και ανασυνδιασμό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιείται η T4 DNA λιγάση διότι έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών (τυφλά, προεξέχοντα 3' ή 5') (Sgaramella and Elrich, 1978).

Για να πραγματοποιηθεί αντίδραση σύνδεσης μεταξύ ενός κομματιού DNA και ενός φορέα απαραίτητο είναι να έχουν μεταξύ τους συμπληρωματικά άκρα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε φορέας pBlueScript II SK ο οποίος διαθέτει T-άκρα. Σε περιπτώσεις όπου το ένθεμα είναι προϊόν PCR με απλή Taq πολυμεράση, το ένθεμα λόγω της δράσης του ενζύμου περιέχει άκρα αδενίνης A. Έτσι διαθέτει συμπληρωματικά άκρα με τον φορέα και πραγματοποιείται απλή αντίδραση σύνδεσης. Σε περιπτώσεις όπου το ένθεμα είναι προϊόν πέψης ή άλλης αντίδρασης και δεν διαθέτει άκρα θυμίνης πραγματοποιείται προσθήκη άκρων θυμίνης.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιείται με τον εξής τύπο:

$$[(ng \text{ φορέα } X \text{ bp ενθέματος}) / \text{bp φορέα}] X \text{ αναλογία ενθέματος:φορέα} = ng \text{ ενθέματος}$$

Η αναλογία ενθέματος: φορέα κυμαίνεται από 3:1 – 8:1. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η T4 λιγάση η οποία έχει την ικανότητα να καταλύει τη σύνδεση άκρων όλων των ειδών σε αντίθεση με τη λιγάση της E.coli που καταλύει τη σύνδεση μόνο τυφλών άκρων και σε μια απλή αντίδραση λιγάσης προστίθεται 1U.

Υλικά:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) T4 λιγάσης 10X
- ✓ Ένζυμο T4 λιγάση
- ✓ pBlueScript II SK

Μέθοδος:

1. Σε σωληνάκι τύπου errendorf προστίθεται η υπολογισμένη ποσότητα ενθέματος με βάση τον τύπο, ποσότητα φορέα (συνήθως 50ng), ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος T4 λιγάσης για τελική συγκέντρωση 1X και 1Unit T4 λιγάσης.
2. Επώαση για 2.5 ώρες στους 22°C.

2.10 Παρασκευή Δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Το στέλεχος DH5a της *E.Coli* που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι εύκολο στην καλλιέργεια, στη διατήρηση και στην αποθήκευση. Για τον διαχωρισμό των μετασχηματισμένων κυττάρων (περιέχουν και το φορέα με το ένθεμα) από των μη μετασχηματισμένων εφαρμόζεται η μέθοδος α συμπληρωματικότητας καθώς εκφράζουν το καρβοξυτελικό τμήμα της β γαλακτοσιδάσης.

Υλικά:

- ✓ Θρεπτικό υλικό LB Broth 1L: περιέχει 10gr Bactrotryptone, 5gr Yeast extract και 5gr NaCl.
- ✓ *E. coli* DH5a κύτταρα.
- ✓ Γλυκερόλη 10%

Μέθοδος:

1. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται με πιπέτα 1ml θρεπτικού υλικού κάτω υπό ασηπτικές συνθήκες.
2. Ενοφθαλμισμός του θρεπτικού με *E. coli* DH5a κύτταρα.
3. Επώαση στις 220 στροφές, στους 37°C για 12-16 ώρες.
4. Μετά το τέλος της επώασης γίνεται μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιέχει 200ml θρεπτικού υλικού

5. Επώαση στους 37°C στις 210 στροφές μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.450-0.550 σε 600nm.
6. Μεταφορά της καλλιέργειας σε τέσσερα παγωμένα falcon των 50ml και επώαση για 10min στον πάγο.
7. Φυγοκέντρηση στις 4000g στους 4°C για 15min.
8. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50ml H₂O.
9. Επανάληψη βημάτων 7 και 8.
10. Φυγοκέντρηση στις 4000g στους 4°C για 15min και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10% γλυκερόλη.
11. Φυγοκέντρηση σε 4200g, στους 4°C για 10min.
12. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 250μl 10% γλυκερόλης ανά falcon.
13. Τα κύτταρα μοιράζονται σε κλάσματα σε παγωμένα erpendorfs (από 40μl).
14. Αποθήκευση στους -80°C.

Για να υπολογιστεί η απόδοση των δεκτικών κυττάρων γίνεται μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας πλασμίδια γνωστής συγκέντρωσης.

1. Μετασχηματισμός κυττάρων με την προσθήκη 10pg πλασμιδίου pUC19.
2. Προσθήκη 700μl SOC.
3. Σε 2μl, 4μl και 8μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια προστίθεται 198μl, 196μl, 192μl ddH₂O για τελικό όγκο 200μl και γίνεται επίστρωση σε τριβλία.
4. Επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες.
5. Μετά την επώαση μετριοούνται οι αποικίες στα τριβλία και γίνεται αναγωγή σε μονάδες pfu/μg.

2.11 Ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν τη φωσφολιπιδική στοιβάδα προκαλώντας το

σχηματισμό πόρων επιτρέποντας το DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Neuman et al., 1982).

Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες μεθόδους α. είναι πολύ αποτελεσματική β. χρειάζεται μικρή ποσότητα DNA γ. μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ιστούς που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία.

Σημαντική παράμετρος που είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη είναι ότι πρέπει η ένταση του ρεύματος που διέρχεται στο κύτταρο να είναι ελεγχόμενη. Εάν οι παλμοί δεν έχουν την κατάλληλη τάση τότε μπορεί οι πόροι που θα σχηματιστούν να είναι πολύ μεγάλοι ή να μην μπορούν να κλείσουν με αποτέλεσμα να προκληθεί ζημιά στο κύτταρο και η μέθοδος να αποτύχει.

Υλικά:

- ✓ Στερεό θρεπτικό μέσο LB agar 1L: 10g Tryptone, 15g agar, 15g Yeast extract, 5g NaCl.
- ✓ Αμπικιλίνη
- ✓ Θρεπτικό υλικό SOC 1L: 20g Tryptone, 5g Yeast extract, 0,5g NaCl, 20ml glucose 1M.
- ✓ X-Gal 20mg/ml
- ✓ IPTG 200mg/ml

Μέθοδος:

1. Τοποθέτηση των δεκτικών κυττάρων στον πάγο.
2. Αραίωση της αντίδρασης σύνδεσης 1:10.
3. Προσθήκη 2μl από την αραίωση στα δεκτικά κύτταρα.
4. Επώαση για ένα λεπτό στον πάγο.
5. Μεταφορά του μίγματος (δεκτικά και ανασυνδιασμένο πλασμίδιο) σε ειδική κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης.
6. Τοποθέτηση της κυψελίδας στην ειδική θέση στην συσκευή ηλεκτροδιάτρησης οπότε και διέρχεται ρεύμα εντάσεως 13.8Kv/ cm για 5-6 msec.

7. Προσθήκη 700μl SOC σε λιγότερο από 1 λεπτό.
8. Ανάδευση με πιπέτα και μεταφορά όλης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα.
9. Επώαση στους 37°C στις 175 στροφές για μια ώρα.

Μετά το τέλος της επώασης πραγματοποιείται επίστρωση των τριβλίων υπό ασηπτικές συνθήκες:

1. Παρασκευή της επιθυμητής ποσότητας στερεού θρεπτικού υλικού LB agar. Απαραίτητη η αποστείρωση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αμπικιλίνης (100 μg/ml) όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού φτάσει σχεδόν θερμοκρασία δωματίου.
2. Το LB agar τοποθετείται στα τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες για να στερεοποιηθεί
3. Προσθήκη στην επιθυμητή ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων της καλλιέργειας 30μl X-gal και 3μl IPTG και επίστρωση των τριβλίων.
4. Επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες.

2.12 Δημιουργία stock γλυκερόλης

Η αποθήκευση γίνεται στους -80 °C και χρησιμοποιείται γλυκερόλη η οποία προστατεύει τους οργανισμούς που φυλάγονται εμποδίζοντας το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου.

Υλικά:

- ✓ Γλυκερόλη 100%
- ✓ Βακτηριακή καλλιέργεια
- ✓ LB Broth με αμπικιλίνη

Μέθοδος:

1. Προσθήκη σε σωληνάκι τύπου erpendorf 850μl βακτηριακής καλλιέργειας και 150μl γλυκερόλης.

2. Ανάδευση και αποθήκευση στους -80°C .

Η ανάκτηση βακτηρίων από stock γλυκερόλης:

1. Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού LB Broth με αμπικιλίνη.
2. Ενοφθαλμισμός με μικροβιολογικό κρίκο ποσότητα βακτηρίων από το stock στον δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Επώαση στους 37°C στις 210 στροφές για 12-16 ώρες.

2.13 Διάκριση ανασυνδιασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων

Για να γίνει διάκριση των ανασυνδιασμένων κλώνων έχουμε δυο σημεία επιλογής. Πρώτο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που έχουν λάβει το πλασμίδιο (ανεξάρτητα αν περιέχει ένθεμα) και δεύτερο σημείο επιλογής είναι ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν ένθεμα.

Το πρώτο σημείο επιλογής οφείλεται στην παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης. Η αμπικιλίνη είναι αντιβιοτικό το οποίο προκαλεί το θάνατο των δεκτικών κυττάρων. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Άρα η παρουσία πλασμιδίου στα κύτταρα προσδίδει ανθεκτικότητα και επιβίωση. Αντίθετα αν στα δεκτικά κύτταρα δεν περιέχεται πλασμίδιο τότε δεν υπάρχει ανθεκτικότητα και προκαλείται θάνατος.

Το δεύτερο σημείο επιλογής, ο διαχωρισμός των δεκτικών κυττάρων που περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα και αυτών που δεν περιέχουν πλασμίδιο με ένθεμα, γίνεται με βάση το χρώμα των αποικιών. Αν έχουμε ανασυνδιασμένους κλώνους (που περιέχουν το πλασμίδιο με το ένθεμα) τότε οι αποικίες μας είναι λευκές. Αντίθετα αν έχουμε μη ανασυνδιασμένους κλώνους τότε έχουμε μπλε αποικίες. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή ή όχι ενός ενζύμου, της β-γαλακτοσιδάσης. Η β-γαλακτοσιδάση υπό φυσιολογικές συνθήκες μεταβολίζει τη λακτόζη σε γαλακτόζη και γλυκόζη. Η γαλακτόζη σε υψηλές ποσότητες λειτουργεί και ως επαγωγέας.

Το πλασμίδιο περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση. Η θέση που θα εισαχθεί το ένθεμά μας βρίσκεται ανάμεσα στο οπερόνιο. Αν σε ένα πλασμίδιο έχουμε την εισαγωγή ενός ενθέματος τότε το οπερόνιο διακόπτεται και δεν μπορεί να μεταγραφεί και να μεταφραστεί με αποτέλεσμα να μην έχουμε παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης. Άρα οι αποικίες με το ένθεμα παραμένουν λευκές. Αντίθετα πλασμίδια χωρίς ένθεμα έχοντας το IPTG ως επαγωγέα εκφράζουν το γονίδιο *lacZ* μεταβολίζοντας το X-gal δίνοντας μπλε αποικίες.

2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση και περιλαμβάνει: α. την ανάπτυξη βακτηριακών μακρομορίων, β. την τήρηση συνθηκών οι οποίες 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 (Birnboim and Doly 1979).

Υλικά:

- ✓ Διάλυμα I (GET): 50mM glucose, 25mM TrisCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)
- ✓ Διάλυμα II (alkali): 0.2N NaOH, 1% SDS.
- ✓ Διάλυμα III: 5 M potassium acetate (CH₃COOK) 60 ml, glacial acetic acid 11,5ml, dH₂O 28,5 ml.
- ✓ Ρυθμιστικό Διάλυμα TE: Περιέχει RNάση A σε συγκέντρωση 20μg/ml.

Μέθοδος:

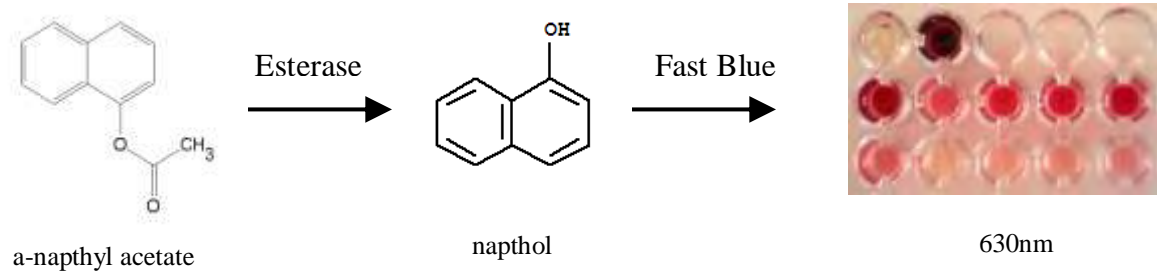
1. Ήπια ανάδευση της καλλιέργειας.
2. Εισαγωγή 1,5ml καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erpendorf.
3. Φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 3 λεπτά.
4. Απόρριψη του υπερκείμενου και εισαγωγή 100μl παγωμένου διαλύματος I.
5. Ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Τοποθέτηση σε πάγο και εισαγωγή 200μl διάλυμα II (alkali).
7. Επώαση στον πάγο για 7- 8 λεπτά και ανάδευση ανά διαστήματα με αργές κινήσεις.
8. Εισαγωγή 150μl παγωμένου διαλύματος Διάλυμα III (CH_3COOK).
9. Επώαση του erpendorf στον πάγο για 7- 8 λεπτά και ανάδευση με έντονες κινήσεις ανά διαστήματα.
10. Φυγοκέντρηση για 9 λεπτά στις μέγιστες στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σημασμένο erpendorf.
11. Εκχύλιση του διαλύματος με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του πλασμιδιακό DNA με ισοπροπανόλη.
12. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 50μl Ρυθμιστικό διάλυμα TE.
13. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

2.15 Προσδιορισμός Εστερασών

Ο προσδιορισμός των εστερασών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο άρθρο “Resistance management strategies in malaria vector mosquito control Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico” (Penilla et al, 1998).

Βασίζεται στη μέτρηση του προϊόντος που παράγεται κατά την κατάλυση του υποστρώματος (α ή β naphthyl acetate) από τις γενικές εστεράσες (α ή β εστεράσες αντίστοιχα). Το προϊόν που παράγεται (naphthol) δεσμεύεται από ένα διάζον αλάτι (Fast

Blue) παράγοντας χρωμογόνα ουσία η οποία μπορεί να μετρηθεί στα 630nm (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Βιοχημική δοκιμασία εστερασών

Υλικά:

- ✓ Διάλυμα Ομογενοποίησης: 50mM Sodium Phosphate Buffer pH 7.2
- ✓ Υπόστρωμα: α- ή β- naphthyl acetate 0,3mM σε αιθανόλη
- ✓ Χρωστική: Fast blue Sodium Phosphate Buffer pH 7.2

Παραγωγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος:

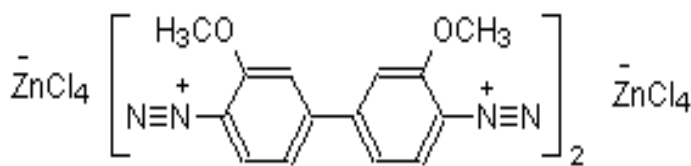
Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (πάγο).

1. Ως πηγή ενζύμων χρησιμοποιήθηκε το κεφάλι του εντόμου. Στο κεφάλι υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα εστερασών ενώ εμποδίζεται όσο το δυνατό, η παρουσία του κυτοχρώματος P450 το οποίο βρίσκεται σε περίσσεια στο θώρακα του εντόμου.
2. Ομογενοποίηση του εντόμου σε διάλυμα ομογενοποίησης (200μl ανά κεφάλι). Το διάλυμα ομογενοποίησης αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο θα διαχυθούν οι πρωτεΐνες της κεφαλής. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ομογενοποίημα χρωματίζεται λόγω των χρωστικών που διαθέτουν τα μάτια των εντόμων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σημείο ελέγχου.
3. Φυγοκέντρηση στα 1000g για 10 λεπτά στους 4°C για την απομάκρυνση των καταλοίπων της κεφαλής μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό eppendorf.

Βιοχημική διαδικασία γενικών εστερασών:

Οι βιοχημικές μετρήσεις πραγματοποιούνται σε microtiterplate.

1. Ανα πηγαδάκι προστίθεται 5μλ πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και 200μλ 0.3mM naphthyl-acetate.
2. Η αντίδραση πραγματοποιείται με επώση σε θερμοκρασία δωματίου από 5-30 λεπτά.
3. Για να σταματήσει η αντίδραση προστίθεται 50μλ χρωστικής Fast Blue (Εικόνα 2.2).
4. Μετρείται η οπτική πυκνότητα στα 630nm



Εικόνα 2.2: Δομή άλατος Fast Blue.

2.15 Επεξεργασία αλληλουχιών DNA

Για την επεξεργασία των αλληλουχιών *in silico* (αναγνωστικά πλαίσια, μετάφραση αλληλουχίας) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Omiga 2.0. Για την σύγκριση αλληλουχιών DNA με αλληλουχίες άλλων οργανισμών και για τον σχεδιασμό εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του NCBI. ενώ για υπολογισμό μοριακή μάζας και ισοηλεκτρικού σημείου χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό πρόγραμμα Expsy-Compute Pi/Mw tool.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Αποτελέσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δραστηριότητας των γενικών εστερασών καθώς και η μελέτη της δομής και της οργάνωσης της αβ υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου της ελιάς ώστε να διερευνηθεί η εμπλοκή τους στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στο νατουραλίτη εντομοκτόνο Spinosad.

Βιοχημική μελέτη γενικών εστερασών

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας των γενικών εστερασών ακολουθήθηκε η naphthyl acetate μέθοδος όπως περιγράφεται από τους Penilla et al., 1998.

Οι γενικές εστεράσες χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, α- και β- εστεράσες. Ο διαχωρισμός των δυο κατηγοριών γίνεται με την προσθήκη διαφορετικού υποστρώματος, α- και β-naphthyl acetate αντίστοιχα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ανά κεφάλι σε σύνολο 12-20 κεφάλια (αναλογία αρσενικών και θηλυκών 1:1). Το ομογενοποίηση στο οποίο εκχυλίστηκαν οι εστεράσες επώαστηκε με υπόστρωμα κατάλληλο για το είδος των εστερασών, α- και β-naphthyl acetate και η δραστηριότητα μετρήθηκε στα 630nm για τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές, 5 min, 15 min και 30 min.

Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τις α- και β- εστεράσες (Πίνακες 3.1, 3.2). Τα αποτελέσματα δίνονται ως units/mg πρωτεΐνης. Οι τιμές μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων εντόμων συγκρίθηκαν μέσω two-tiles t-tests, όπου για $P \leq 0,05$ οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές, ενώ για $P > 0,05$ οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Εργαστηριακή σειρά	a-naphthyl acetate		
	5 min	15 min	30 min
Ευαίσθητη	0.150 ± 0.06	0.236 ± 0.08	0.385 ± 0.07
Ανθεκτική	0.157 ± 0.06	0.239 ± 0.07	0.400 ± 0.07

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα δραστηριότητας α-εστερασών

Εργαστηριακή σειρά	b-naptrthyl acetate		
	5 min	15 min	30 min
Ευαίσθητη	0.205± 0.05	0.261± 0.05	0.350 ±0.05
Ανθεκτική	0.200 ± 0.06	0.274± 0.06	0.345± 0.05

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα δραστηριότητας β-εστερασών

Απομόνωση της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς

Για την ενίσχυση του α6 νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς αρχικά απομονώθηκε ολικό RNA από άτομα του ευαίσθητου και του ανθεκτικού εργαστηριακού πληθυσμού *Bactrocera oleae*. Στη συνέχεια συντέθηκε cDNA και πραγματοποιήθηκε PCR με ειδικούς εκκινητές σχεδιασμένους για την ενίσχυση μεταγράφων που κωδικοποιούν την α6 υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.

Ο δάκος, *Bactrocera oleae*, ανήκει στα έντομα για τα οποία η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος τους δεν έχει πραγματοποιηθεί. Για το λόγο αυτό, ο σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση του μεταγράφου της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης πραγματοποιήθηκε με βάση την αλληλουχία του ομόλογου γονιδίου της αντίστοιχης υπομονάδας της μύγας *Bactrocera dorsalis*.

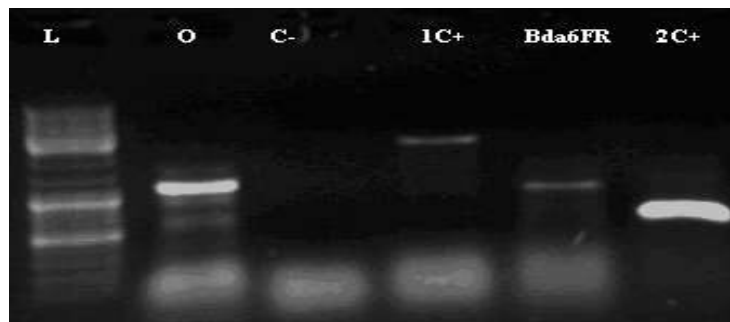
Η μύγα *Bactrocera dorsalis* όπως και ο δάκος της ελιάς ανήκει στο γένος *Bactrocera* της οικογένειας Tephritidae, της τάξης Diptera. Λόγω της φυλογενετικής τους συγγένειας αναμένεται οι ομόλογες αλληλουχίες των δύο ειδών να είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν σχεδιαστεί ώστε να ενισχύουν στο *Bactrocera dorsalis* μια περιοχή μεγέθους 1467 bp που κωδικοποιεί τα 489 αμινοξέα της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Πίνακα 3.3).

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία Ta	Αναμενόμενο προϊόν (bp)
Bda6F	ACATGGTCCCATTCGATGACC	61	1467
Bda6R	GCGACCATGAACATGATGCAATT	61	

Πίνακας 3.3 Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητών Bda6F/R.

Για την ενίσχυση της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου της ελιάς αρχικά απομονώθηκε ολικό RNA από άτομα ευαίσθητου και ανθεκτικού εργαστηριακού πληθυσμού *Bactrocera oleae*, χρησιμοποιώντας το TRIzol® Reagent Kit. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύνθεση μονόκλωνου cDNA χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο «First strand synthesis with M-MuLV reverse transcriptase» cDNA.

Έπειτα χρησιμοποιώντας ως μήτρα το νεοσυντιθέμενο cDNA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Ως εκκινητές για την ενίσχυση του μετάγραφου της υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών Bda6F/R. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες Ta (49-60 °C), εφόσον μειώνοντας τη θερμοκρασία υβριδοποίησης μειώνεται και η εξειδίκευση των εκκινητών. Επιτυχημένη ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία υβριδισμού 49°C, με το προϊόν ενίσχυσης να αντιστοιχεί σε ένα τμήμα μεγέθους ~1700bp σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με μήτρα cDNA και εκκινητές Bda6F/R. Χρησιμοποιήθηκαν δύο θετικά control τα οποία ενισχύουν περιοχές του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Συγκεκριμένα για το 1C+ χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές FO/RO οι οποίοι ενισχύουν όλο το γονίδιο και αντιστοιχούν σε 2200bp και για το 2C+ οι εκκινητές 8F/10R οι οποίοι ενισχύουν ένα προϊόν 400bp σε επίπεδο cDNA.

Το προϊόν PCR απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pBluescript II με άκρα θυμίνης. Επιλέχθηκε φορέας με άκρα θυμίνης γιατί το ένθεμα είναι προϊόν απλής PCR και φέρει συμπληρωματικά 3' άκρα αδενίνης από τη δράση της Taq πολυμεράσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με

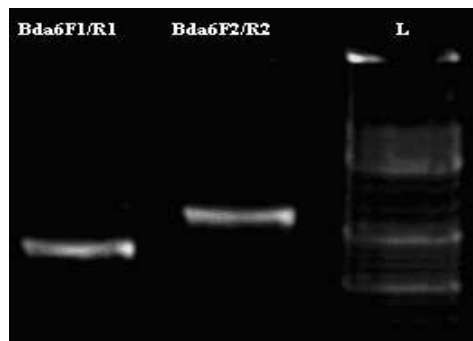
ηλεκτροδιάτρηση και ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μέσω Blue/White επιλογής. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι αλληλουχίστηκαν όπως επίσης και το απομονωμένο προϊόν PCR.

Οι αλληλουχίες των άκρων που προσδιορίστηκαν, συγκρίθηκαν αρχικά με το πρόγραμμα BLAST όπου επιβεβαιώθηκε για το προϊόν των ~1700bp η επιτυχής ενίσχυση μεταγράφου που κωδικοποιεί την $\alpha 6$ υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης *Bactrocera oleae*.

Λόγω του μεγάλου μεγέθους του μεταγράφου χρειάστηκε να σχεδιαστούν νέοι εσωτερικοί εκκινητές ώστε να αλληλουχηθεί η περιοχή ενδιάμεσα των άκρων του τμήματος των ~1700bp (Πίνακας 3.4, Εικόνα 3.2).

Ονομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία Ta	Αναμενόμενο προϊόν (bp)
Boa6F1	ATGAATCGGAATATGGAG	50	705
Boa6R1	AACGGATTTAATCCAAGG	50	
Boa6F2	CCCGTCGCTGCTTGTCG	52	1100
Boa6R2	ATCGATATCCAGCACATT	50	

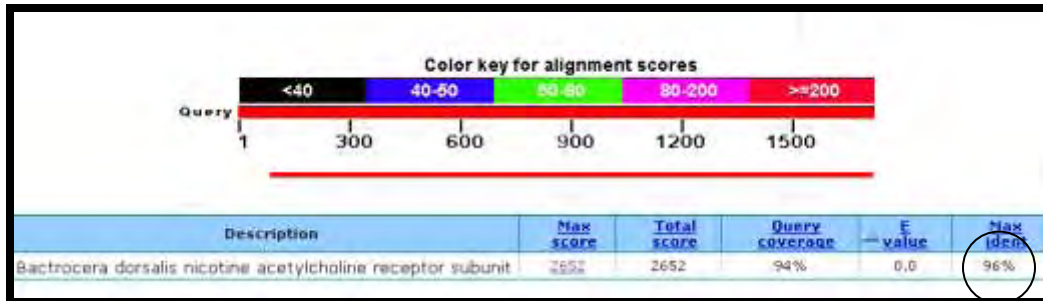
Πίνακας 3.4 Νουκλεοτιδική αλληλουχία εκκινητών Boa6F1, Boa6R1, Boa6F2 και Boa6R2



Εικόνα 3.2: Τα αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης με χρήση των εσωτερικών εκκινητών Bda6F1/R1 και Bda6F2/R2, μεγέθους 705bp και 1100bp αντίστοιχα.

Η cDNA αλληλουχία του $\alpha 6$ νικοτινικού υποδοχέα του ευαίσθητου πληθυσμού που αλληλουχίστηκε έχει μέγεθος 1724 bp και παρουσιάζει ομοιότητα 96% με το μετάγραφο

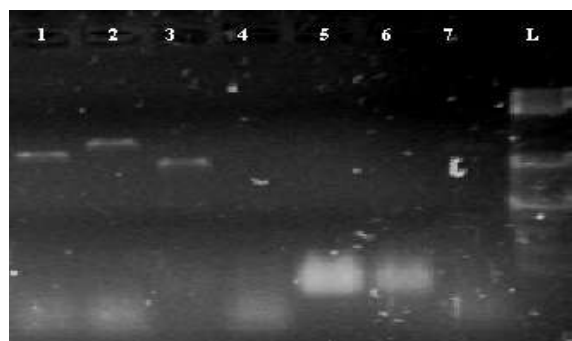
Η της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera dorsalis* και 84% ομοιότητα με το αντίστοιχο γονίδιο στη *Drosophila melanogaster* (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Αποτέλεσμα σύγκρισης με χρήση του προγράμματος Blast

Όσον αφορά την απομόνωση της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του ανθεκτικού εργαστηριακού πληθυσμού του *Bactrocera oleae* ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Ως εκκινητές για την ενίσχυση του μεταγράφου της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός εκκινητών όπως φαίνεται στον πίνακα 3.5. Προϊόντα ενίσχυσης παρατηρήθηκαν κατά τις αντιδράσεις σε θερμοκρασία Ta 49°C για τους συνδυασμούς Boa6F1/Bda6R, Boa6F2/ Bda6R και F1/R1 (Πίνακας 3.5, Εικόνα 3.4).

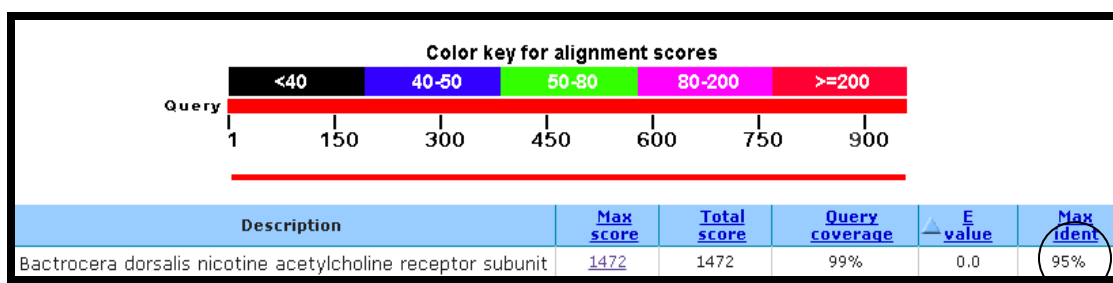


Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με μήτρα cDNA και διαφορετικών συνδυασμών εκκινητών. Ενισχύθηκαν μόνο οι συνδυασμοί 1-3 όπως απεικονίζονται στον πίνακα 3.5

Αριθμός πηγαδιού ηλεκτροφόρησης	Εκκινητές	Αναμενόμενο Προϊόν(bp)	Αριθμός Ηλεκτροφόρησης	Εκκινητές	Αναμενόμενο Προϊόν(bp)
1	F1/Bda6R	1171	5	Bda6F/R1	1290
2	F2/Bda6R	1428	6	Bda6F/R2	1430
3	F1/R1	705	7	Bda6F/R	1724
4	C-	----	8	Ladder	----

Πίνακας 3.5

Στη συνέχεια τα προϊόντα αυτά απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και κλωνοποιήθηκαν σε φορέα pBluescript II SK για να ακολουθήσει η αλληλούχησή τους.



Εικόνα 3.4: Αποτέλεσμα σύγκρισης με χρήση του προγράμματος Blast

Τα επιτυχή αποτελέσματα της αλληλούχησης συγκρίθηκαν με το πρόγραμμα BLAST όπου επιβεβαιώθηκε για το προϊόν μεγέθους ~960bp η επιτυχής ενίσχυση του δυνητικού μεταγράφου της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του *Bactrocera oleae*. Το μετάγραφο παρουσιάζει ομοιότητα 95% με το αντίστοιχο μετάγραφο II της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera dorsalis* (Εικόνα 3.4).

Ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης

Αξιοποιώντας την υψηλή ομολογία του cDNA του δάκου με τα αντίστοιχα του *Bactrocera dorsalis* και της *Drosophila melanogaster* καθορίστηκαν τα εξόνια που αποτελούν το μετάγραφο. Συγκεκριμένα καθορίστηκαν 12 εξόνια, ενώ η έναρξη της μεταγραφής εντοπίστηκε στη θέση 291 της συνολικής αλληλουχίας. Η αλληλουχία

ανοδικά πιθανόν να αντιστοιχεί στην 5'-UTR περιοχή. Η συνολική νουκλεοτιδική αλληλουχία καθώς επίσης και οι περιοχές των εξονίων παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5.

```

CATCATCGTGCTTGTGTGTATCCAAAGCTGTCAATACTTTACTCAGATTAGTGACAGCATAACCGCTTTT
TGCAATATAATATCTATCAACGAAAGACAACGGATCTCGTCTATCCGGCACCTTATCTTTTCGAGCAGCTG
TAGCACTTGCAGCTAATTGTGCTGAATCAACATCGACACATCCTCTACAAATATACATACATATACTTGTG
CATACTTATACCCACCCGCCCGCAACATCGACAACAGTTGAACGTGTGTTTATTGCTCGGTAGCTGAAAT
CTAAGGACATGGACCCGTCGCTGCTTGTGCTGTGATCTTTCTTGTGATAATTAAGAAAGCTGCCAAGG
ACCCACGAAAAACGTCTACTTAACCACCTACTATCCACCTATAAATACACTCGAGCGACCCGTAGCAAAAC
GAATCGGAACCGCTGGAAGTCAAATTCGGTTTAACGCTGCAACAAATATTGATGTGGACGAGAAGAAT
CAACTTCTTATAACCAATCTTTGGCTTTCGTTGGAGTGGAATGACTATAATTTACGATGGAATGAATCGGA
ATATGGAGGCGTGAAGGATTTGCGGATAACACCAAAATAAGCTGTGGAAACCGGATGTGCTGATGTACAA
CAGCGCGGATGAGGGATTTCGATGGCACGTATCACACAAACATTTGTGGTCAAACATGGCGGCAGTTGTCT
GTACGTGCCCCCTGCTATCTTCAGAAGCACATGCAGAATGGACATCACGTGGTTCCTATTTGATGACCAA
CACTGCGAAATGAAATTCGGTAGTTGGACTTACGATGGAATCAGTTGGATTTGGTTTTGAGTTCGGAAG
ATGGAGGGGATCTTCCGATTTCAACAATGGCGAGTGGTATCTGCTTGAATGCCTGGGAAGAAGAA
TACTGTCTACGCTGTGCTGCCCGAACCTACGTGGACGTCACATTCACGATACAAATCCGACGACGTACA
TTATAATTTTTTTAATTTAATTTGTGCCGTGTGTGCTGATATCATCGATGGCTTTATTAGGATTTACACTA
CCTCCCGATTCGGGCGAAAACTAACATTAGGAGTTACTATCCTTCTATCCTTAACAGTATTTCTAAACCT
TGTAGCTGAAACATTGCCACAAGTTCGGACGCTATCCCCCTTATAGGCACCTACTTCAATTGCATCATGT
TTATGGTGGCATCATCGGTGGTGCTGACGGTTGTGTGCTCAACTATCATCATCGCACGGCGGATATACA
CGAAATGCCGCCTTGGATTAATCCGTTTTCTGCAATGGCTGCCATGGATTTTACGATATGGGTGGTCCGG
GCCGTAATAATCACACGAAAAACAATTCTACTAAGTAATCGCATGAAGGAATTGGAATTAAGGAACGTT
CTTCCAAATCACTACTAGCCAATGTGCTGGATATCGATGATGATTCCGGCATACGATCTCCGGTTCAAA
ACGGCGATCGGTTTCATCAGCAAGTTTCGGTTCGCCCCACAACGGTGGAGGAGCATCATAACACAATAGGT
GCAATCATAAAGATTTACATTTGATTTCTTAAAGAATTACAATTCATCACATCACGATGCGTAAATCCGAT
GATGAGGCGGAATTGATAAGCGATTGAAAATTCGCGGCAATGGTTGTGGATAGATTTTGTTTAATTGTTT
TTACGCTCTTACGATTATCGCAACAGTGACCGTTCGT

```

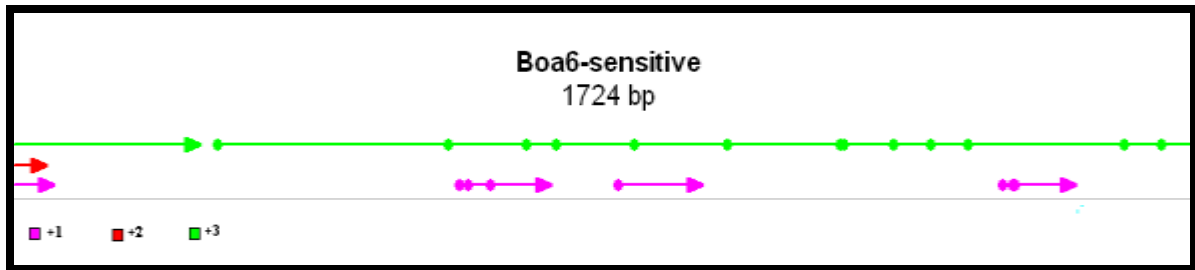
Εικόνα 3.5: Τα εξόνια της κωδικής αλληλουχίας της υπομονάδας α6 του ευαίσθητου πληθυσμού. Με σκίαση σημειώνονται διαδοχικά τα 12 εξόνια.

Κατά την επεξεργασία της αλληλουχίας εντοπίστηκαν δυο δυνητικά εναλλακτικά μετάγραφα του εξονίου 8 (8a και 8b) με διαφορές τόσο στη νουκλεοτιδική αλληλουχία όσο και στην αμινοξική (Εικόνα 3.6).

exon 8a	TCGGGCGAAAAACTAACATTAGGAGTTACTATCCTTCTATCCTTAACAGTATTTCTAAACCTT S G E K L T L G V T I L L S L T V F L N L GTAGCTGAAACATTGCCAC AAGT V A E T L P T S
exon 8b	TCGGGCGAAAAACTAACATTAGGCGTAACTATCTTCTATCCTTAACAGTATTTCTAAATCTT S G E K L T L G V T I L L S L T V F L N L GTGCTGAAATCCATGCCGACAACG V A E S M P T T

Εικόνα 3.6 Τα δύο εναλλακτικά μετάγραφα του εξονίου 8.

Η αμινοξική αλληλουχία μεγέθους 489 αμινοξέων, κωδικοποιείται από το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο +3 (Εικόνα 3.7). Μέσω του προγράμματος βιοπληροφορικής ExPASy υπολογίστηκε το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης που ισούται με 4.49 και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (M.W.) 55,57 kDa. Η ομοιότητα της πρωτεΐνης με τις ομόλογες του *B. dorsalis* και της *D. melanogaster* είναι 97% και 95% αντίστοιχα.



Εικόνα 3.7: Το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ορίζεται στο +3 (πράσινο).

Στη συνέχεια εντοπίστηκαν όλα τα κατάλοιπα αμινοξέων που χαρακτηρίζουν τις α-υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης όπως περιγράφεται και στην Εισαγωγή. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8, η ώριμη πρωτεΐνη χαρακτηρίζεται από τα τυπικά μοτίβα ενός καναλιού ιόντων. Εντοπίζονται οι δυο χαρακτηριστικές κυστεΐνες που απέχουν μεταξύ τους 13 αμινοξέα (Karlin,2002) και οι 4 διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM4) των nAChRs (Le Novere and Changeux, 1995) ενώ εντοπίζονται και οι θέσεις πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης (6 θηλιές) και το χαρακτηριστικό μοτίβο των α-υπομονάδων YxCC (Kao et al.,1984).

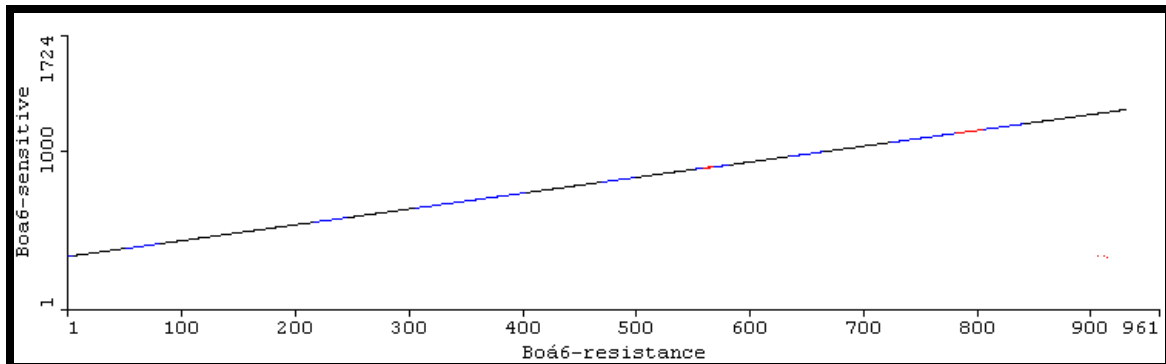
```

M D P S L L V V L I E L V I I K E S C Q G P H E K R L L N H L L S T Y N T L E R P V A N E S E P L E V K F G L T L Q Q I I D V D E K N Q
L L I T N L W L S L E W N D Y N L R W N E S E Y G G V K D L R I T P N K L W K P D V L M Y N S A D E G F D G T Y H T N I V V K
H G G S C L Y V P P A I F R S T C R M D I T W F P F D D Q H C E M K F G S W T Y D G N Q L D L V L S S E D G G D L S D F I T N G E
W Y L L A M P G K K N T V Y A C C P E P Y V D V T F T I Q I R R R T L Y Y F F N L I V P C V L I S S M A L L G F T L P P D S G E K L
T I G V T I L L S L T V F L N L V A E T L P T S S D A I P L I G T Y F N C I M F M V A S S V V L T V V V L N Y H H R T A D I H E M P P
W I K S V F L Q W L P W I L R M G G P G R K I T R K T I L L S N R M K E L E L K E R S S K S L L A N V L D I D D D F R H T I S G S Q T
A I G S S A S F G R P T T V E E H H N T I G C N H K D L H L I L K E L Q F I T S R M R K S D D E A E L I S D W K F A A M V V D R F C L
I V F T L F T H A I T V T V L S S C L L C I Q S C Q

```

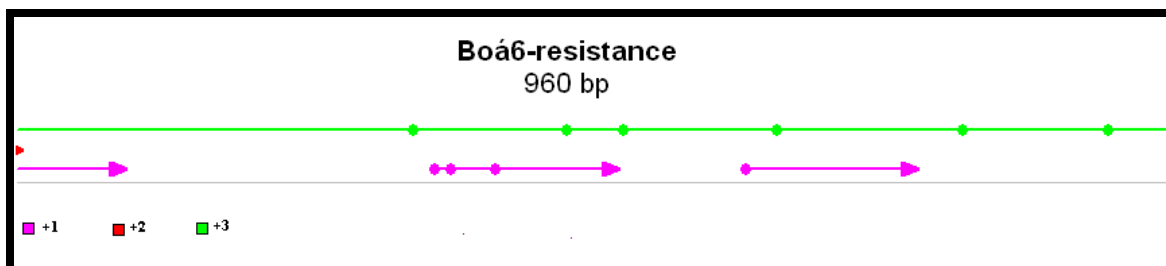
Εικόνα 3.8: Επισήμανση των βασικών αμινοξικών καταλοίπων που χαρακτηρίζουν την α6 υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα. Το αμινοτελικό άκρο παρουσιάζεται με διακεκομμένη γραμμή και αποτελείται από 20 αμινοξέα. Η τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM4) εμφανίζονται με πλάγια έντονα γράμματα, ενώ σε κουτιά παρουσιάζονται οι περιοχές γλυκοσυλίωσης. Επισημασμένο παρουσιάζεται το πρότυπο YxCC των α-υπομονάδων και με βέλος ορίζονται τα κατάλοιπα C που απέχουν 13 αμινοξέα μεταξύ τους. Οι έξι θηλιές (D,A,E, B, F, C) που δεσμεύεται ο προσδέτης παρουσιάζονται με απλή γραμμή.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για την αλληλουχία της υπομονάδας α6 του ανθεκτικού εργαστηριακού πληθυσμού. Παρατηρήθηκε η απουσία του πρώτου εξονίου και των αρχικών βάσεων του δεύτερου εξονίου, ενώ εντοπίστηκαν όλα τα εξόνια 3 έως 9. Επιπλέον μέσω του προγράμματος OMIGA πραγματοποιήθηκε dot plot (πίνακας συσχέτισης) μεταξύ των αλληλουχιών του ευαίσθητου και του ανθεκτικού πληθυσμού (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9: Πίνακας συσχέτισης μεταξύ των αλληλουχιών του α6 υποδοχέα του ανθεκτικού και του ευαίσθητου πληθυσμού.

Επίσης εντοπίστηκε στο +3 το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο της κωδικής αλληλουχίας (Εικ.3.10) και πραγματοποιήθηκε μετάφραση της αλληλουχίας στα αντίστοιχα κατάλοιπα αμινοξέων.



Εικόνα 3.10: Το αναγνωστικό πλαίσιο ορίστηκε στο +3 με χρήση του προγράμματος OMIGA.

Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες των υπομονάδων α6 του ευαίσθητου (Sensitive) και του ανθεκτικού (Resistance) πληθυσμού συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος ClustalW, για τον εντοπισμό τυχόν διαφορών. Από την ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών τους προέκυψε ότι εμφανίζουν υψηλή ομολογία, ενώ σε ορισμένες θέσεις διαπιστώθηκε

η διαφοροποίηση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων, όπως σχολιάζεται περαιτέρω στη Συζήτηση.

Sensitive	MDPSLLVVLIFLVIKESQCGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESEPLEVKFGLTLQIQI	60
Resistance	-----IEKLPQGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESEPLEVKFGLTLQIQI	45
	* . *****	
Sensitive	IDVDEKNQLLITNLWLSLEWNDYNLRWNESEYCGVKDLRITPNKLNKPDVLMYNSADEGF	120
Resistance	IDVDEKNQLLITNLWLSLEWNDYNLRWNESEYCGVKDLRITPNKLNKPDVLMYNSADEGF	105
	*****; *****	
Sensitive	DGTYHTNIVVKHGCGCLYVPPAIFRSTCRMDITWFPDDQHCCEMKFSGSWTYDGNQLDLVL	180
Resistance	DGTYHTNIVVKHGCGCLYVPPGIFKSTCKMDITWFPDDQHCCEMKFSGSWTYDGNQLDLVL	165
	*****; *****; **; ***; *****	
Sensitive	SSEDCGDLSDFITNGEWYLLAMPCKKN-TVYACCPYVDVFTTIQIRRTLYYFFNLIV	239
Resistance	NSEDCGDLSDFITNGEWYLLAMPCKNTIVYACCPYVDVFTTIQIRRTLYYFFNLIV	225
	. ***** *****	
Sensitive	PCVLISSMALLGFTLPPDSGEKLTLCVTILLSLTVFLNLVARTLPTSSDAIPLIGTYFNC	299
Resistance	PCVLISSMALLGFTLPPDSGEKLTLCVTILLSLTVFLNLVARTLPTSSDAIPLIGTYFNC	285
	*****; **; ***; **; *****	
Sensitive	IMFMVASSVVLTVVVLNYHHRTADIHMPPIKSVFLQWLPWILRMGGPGRKTRKTI	359
Resistance	IMFMVASSVVLTVVVLNYHHRTADIHMPPIKSVFLQWLPWILRMGGPGRKTRKTI	319

Sensitive	SNRMKELELKERSSKSLLANVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFRPTTVEEHHHTIGC	419
Resistance	-----	
Sensitive	NHKDLHLILKELQFITSRMRKSDDEALISDWKFAAMVVDRFCLIVFTLFTIIATVTVLS	479
Resistance	-----	
Sensitive	SCLLCIQSCQ	489
Resistance	-----	

Εικόνα 3.11 Ομοπαράθεση των διαθέσιμων αμινοξικών αλληλουχιών των υπομονάδων α6 του ευαίσθητου (Sensitive) και ανθεκτικού (Resistance) πληθυσμού

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συζήτηση

Οι συνέπειες που συνοδεύουν την εξάπλωση των εντόμων τόσο σε υγειονομικό όσο και σε αγρονομικό επίπεδο, απασχόλησαν από νωρίς την ανθρωπότητα και την ερευνητική κοινότητα με σκοπό την εύρεση αποτελεσματικών τρόπων αντιμετώπισής τους. Το 1939 έκανε την εμφάνιση του το ευρέως πλέον γνωστό εντομοκτόνο, DDT. Η αλόγιστη χρήση του οδήγησε στην εμφάνιση των πρώτων ανθεκτικών εντόμων. Παρόμοια φαινόμενα ακολούθησαν την εφαρμογή και άλλων συμβατικών εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν κατά καιρούς, δημιουργώντας την ανάγκη για τη μελέτη των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας από τη χρήση τους.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς στο νατουραλίτη εντομοκτόνο spinosad. Το spinosad άρχισε να χρησιμοποιείται στην Ελλάδα για την προστασία της ελαιοκαλλιέργειας το 2004, ενώ έχει εγκριθεί η χρήση του για περισσότερες από 100 καλλιέργειες συμπεριλαμβανομένου των μήλων, των ακρόδριων, των εσπεριδοειδών, της μελιτζάνας, της ντομάτας και του βαμβακιού. Ανήκει στην ομάδα των Νατουραλιτών δηλαδή των εντομοκτόνων που έχουν ως βάση φυσικούς μεταβολίτες οργανισμών, συνιστώντας επομένως μια εναλλακτική λύση φιλικότερη προς το περιβάλλον σε σύγκριση με τα κοινά συμβατικά εντομοκτόνα. Ωστόσο, παρόμοια με άλλα εντομοκτόνα, η αποκλειστική του χρήση όπως για παράδειγμα στους αγρούς της Καλιφόρνιας, οδήγησε στην εμφάνιση των πρώτων ανθεκτικών πληθυσμών εντόμων.

Η ανθεκτικότητα είναι δυνατό να οφείλεται είτε στην αύξηση του μεταβολισμού του εντομοκτόνου από το έντομο, είτε στην αλλαγή της δομής του στόχου στον οποίο αυτό δρα. Για το λόγο αυτό η πειραματική διαδικασία διαχωρίστηκε σε δύο ενότητες, τη μελέτη της δραστηριότητας των γενικών εστερασών στο μεταβολισμό του εντομοκτόνου και τη μοριακή κλωνοποίηση του στόχου του spinosad.

Οι γενικές εστεράσες χωρίζονται σε α- και β- εστεράσες και για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας τους πραγματοποιήθηκε βιοχημική δοκιμή γενικών εστερασών σε έντομα

ανθεκτικού και ευαίσθητου πληθυσμού. Ποσότητα ενζύμου επωάστηκε με υπόστρωμα ειδικό είτε για α-εστεράσες είτε για β-εστεράσες και μετά από επώαση προστέθηκε χρωστική ειδική για τη δέσμευση του προϊόντος της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος. Η αντίδραση φτάνει στο τελικό της σημείο στα 30min κάτι που καθορίστηκε μετά από μετρήσεις σε πολλές και διαφορετικές χρονικές στιγμές. Παρατηρήθηκε ότι μετά τα 30min οι τιμές της απορρόφησης δεν αυξάνονται σημαντικά. Μετά τον καθορισμό του τελικού σημείου οι βιοχημικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν ενδεικτικά σε τρεις χρονικές στιγμές 5min, 15min, 30 min. Τα αποτελέσματα δίνονται σε units/mg πρωτεΐνης

Συγκρίνοντας τη δραστικότητα των γενικών εστερασών μεταξύ των δυο πληθυσμών (ανθεκτικού και ευαίσθητου) όπως παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.1 και 3.2 φαίνεται πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο πληθυσμών. Τόσο για τις α-εστεράσες όσο και για τις β-εστεράσες υπάρχει μια ομοιόμορφη αύξηση της δραστικότητας ανά χρονικό διάστημα φτάνοντας στο ίδιο τελικό σημείο. Όσον αφορά τη δραστικότητα των γενικών εστερασών δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στους ανθεκτικούς πληθυσμούς του *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2012) καθώς και στην *Plutella xylostella* (Baxter et al., 2010). Επίσης μελέτη του μεταβολισμού του spinosad σε λάρβες του *H. virescens* έδειξαν ότι η Α-σπινοςίνη (κύριο συστατικό του εντομοκτόνου) μεταβολίζεται σε πολύ μικρό βαθμό από τον οργανισμό του εντόμου αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της δράσης του εντομοκτόνου (Sparks et al., 1997). Όμως, απαραίτητη είναι και η μελέτη της δραστικότητας και άλλων ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του εντόμου όπως το P450, ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Πρόσφατες μελέτες στο λεπιδόπτερο *Tuta absoluta* έδειξαν διαφορά δραστικότητας των MFO μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων πληθυσμών (Maritza et al., 2011).

Στη δεύτερη ενότητα, ο πιθανότερος μοριακός στόχος του εντομοκτόνου καθορίστηκε σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές. Με βάση μελέτες που έγιναν τόσο στον οργανισμό μοντέλο *Drosophila melanogaster* (Perry et al., 2006) όσο και σε άλλα έντομα όπως *Bactrocera dorsalis* (Hsu et al., 2012) και *Plutella xylostella* (Baxter et al., 2010) ο

μοριακός στόχος του *spinosad* φέρεται να είναι η $\alpha 6$ υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (nAChR).

Για την ανάλυση του γονιδίου της $\alpha 6$ υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στο δάκο της ελιάς συντέθηκε cDNA από άτομα ανθεκτικού και ευαίσθητου πληθυσμού. Μέσω μεθόδων RT-PCR ενισχύθηκε ένα προϊόν 1724bp, από τον ευαίσθητο πληθυσμό, το οποίο αντιστοιχεί στην $\alpha 6$ υπομονάδα του nAChR του δάκου της ελιάς με ομοιότητα 96% με το μετάγραφο II της $\alpha 6$ υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera dorsalis* και 84% ομοιότητα με το αντίστοιχο γονίδιο στη *Drosophila melanogaster*. Στη νουκλεοτιδική αλληλουχία εντοπίστηκαν 12 εξόνια και μια περιοχή 290bp στο 5'-άκρο που ίσως να αντιστοιχεί στην 5'-UTR. Επίσης εντοπίστηκαν δυο ισομορφές του εξονίου 8 (8a και 8b). Δυο ισομορφές του εξονίου 8 παρουσιάζονται στο *Anopheles gambiae* και στη *Bactrocera dorsalis* (Jin et al., 2007, Hsu et al., 2012). Στο cDNA απουσιάζει το τέλος του εξονίου 12 και η 3'-UTR περιοχή συμπεραίνοντας ότι η απομονωση του μεταγράφου Bo $\alpha 6$ δεν έχει ολοκληρωθεί.

Μετάφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας δίνει μια πρωτεΐνη 489 αμινοξέων, η οποία διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά μιας α -υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα. Εντοπίστηκαν όλα τα κατάλοιπα αμινοξέων των τεσσάρων διαμεμβρανικών περιοχών, οι θηλιές όπου ενώνεται ο προσδέτης, το χαρακτηριστικό μοτίβο YxCC, τα δυο κατάλοιπα κυστεϊνών που απέχουν 13 αμινοξέα και οι περιοχές γλυκοσιλίωσης. Απουσιάζουν τα τελικά αμινοξέα που συνθέτουν τη μικρή καρβοξυτελική ουρά της πρωτεΐνης και κωδικοποιούνται από τις τελικές βάσεις του εξονίου 12. Η ομολογία της πρωτεΐνης με του *B.dorsalis* είναι 97% και με της *D. melanogaster* 95%. Εφόσον είναι η μεγάλη ομοιότητα πρόκειται για συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των εντόμων άρα παίζουν σημαντικό ρόλο κι είναι εύλογο να περιμένει κανείς να βρει τις ίδιες μεταλλάξεις ανθεκτικότητας μεταξύ των εντόμων όπως πχ με την ακετυλοχολινεστεράση που είναι ένζυμο-κλειδί του νευρικού συστήματος κ εμφανίζει κοινές μεταλλάξεις ανθεκτικότητας σε οργανοφωσφορικά.

Στον ανθεκτικό πληθυσμό ενισχύθηκε ένα κομμάτι 960bp το οποίο κωδικοποιεί το cDNA της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης *Bactrocera oleae* με ομοιότητα 95% με το μετάγραφο II της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera dorsalis*. Στη νουκλεοτιδική αλληλουχία εντοπίστηκαν μέρος του εξονίου 2 και ολόκληρα τα εξόνια 3-9. Ομοπαράθεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με την αντίστοιχη στο υποδοχέα από τον ευαίσθητο πληθυσμό δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές.

Μετάφραση της αλληλουχίας έδωσε 319 αμινοξέα, τα οποία αντιστοιχούν σε ένα μέρος της πρωτεΐνης του Βοα6 υποδοχέα που ενισχύθηκε από τον ευαίσθητο πληθυσμό. Ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών από τους δυο πληθυσμούς έδειξε αλλαγές αμινοξέων οι οποίες αφορούν κυρίως αντικαταστάσεις αμινοξέων από αμινοξέα του ίδιου φορτίου δηλαδή, ουδέτερο αμινοξύ αλλαγή σε ουδέτερο αμινοξύ και βασικό αμινοξύ αλλαγή σε άλλο βασικό αμινοξύ. Έτσι το γενικό φορτίο της πρωτεΐνης δεν φαίνεται αν επηρεάζεται. Μοριακές αλλαγές που θα μπορούσαν να προκύψουν ίσως να οφείλονται στην γενικότερη αρχιτεκτονική των αμινοξέων.

Οι αλλαγές στα πρώτα αμινοξέα δεν μελετήθηκαν εκτενέστερα καθώς μπορεί οι αλλαγές αυτές να οφείλονται στο «λάθος διάβασμα» που παρατηρείται στις αρχικές βάσεις κατά την αλληλούχηση.

Στην περιοχή μεταξύ 135-150 εντοπίζονται πέντε διαφορές αμινοξικών καταλοίπων. Τα αμινοξέα στην περιοχή αυτή βρίσκονται στη μεγάλη αμινοτελική ουρά όπου υπάρχουν οι θηλίες για την ένωση του προσδέτη. Συγκεκριμένα παρατηρούνται αλλαγές: Σερίνης (S) σε γλυκίνη(G), αλανίνης(A) σε γλυκίνη (G) και αργινίνης (R) σε λυσίνη (K). Αντικαταστάσεις αμινοξέων εμπλέκονται στην αλλαγή της μοριακής λειτουργίας ενός υποδοχέα. Για παράδειγμα στον υποδοχέα GABA, αντικατάσταση μιας αλανίνης από μια γλυκίνη λόγω αλλαγής στο γονιδιακό τόπο Rdl στο *D. simulans* συνδέθηκε με την ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή (Du, 2005).

Στην περιοχή μεταξύ 281-295 βρίσκονται τα αμινοξέα που συνθέτουν τη θηλιά μεταξύ των TM2-TM3 διαμεμβρανικών περιοχών και εντοπίζονται πέντε αντικαταστάσεις αμινοξέων συγκριτικά με την πρωτεΐνη του ευαίσθητου πληθυσμού. Οι πρώτες τρεις κωδικοποιούνται από το εξόνιο 8 το οποίο έχει δυο ισομορφές (8α και 8β). Στην αλληλουχία που απομονώθηκε από τον ευαίσθητο πληθυσμό αντιστοιχεί το εξόνιο 8β ενώ στην αλληλουχία που απομονώθηκε από τον ανθεκτικό πληθυσμό αντιστοιχεί το εξόνιο 8α άρα οι διαφορές αυτές οφείλονται στη διαφορετική ισομορφή εξονίου. Οι επόμενες δυο διαφορές κωδικοποιούνται από το εξόνιο 9 το οποίο δεν παρουσιάζει διαφορετικές ισομορφές. Οι αλλαγές αφορούν την αντικατάσταση μιας ισολευκίνη (I) από μια βαλίνη (V) και μιας γλυκίνης(G) από μια αλανίνη(A). Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των υπομονάδων είναι απαραίτητη η πλήρης αλληλούχηση των μεταγράφων της α6 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στον ευαίσθητο και στον ανθεκτικό πληθυσμό και ο σχεδιασμός ενός μοριακού μοντέλου του υποδοχέα για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν γενικότερες αλλαγές στην αρχιτεκτονική του υποδοχέα.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.Βιβλιογραφία

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*, 2000, Science 287: 2185-2195
- Alan LD, Graham DM., *A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach- potato aphids (Myzus persicae)*, 1982, Pest.Biochem.Phys. 18:235-246
- Ballivet M., Pattrick J, Lee J et al., *Molecular cloning of cDNA coding for the gamma subunit of Torpedo acetylcholine receptor*,1982, Proc Natl Acad Sci USA, 79:4466-4470
- Baxter BL, Chen M, Dawson A, Zhao JZ et al, *Mis- spliced Transcripts of Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved Spinosad resistance in Plutella xylostella*, 2010, Plos Genet, 6:1
- Birboim HC, Doly J, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*, 1979, Nucleic acid Res 7: 1513-1523
- Borges LS, Ferns M, *Argin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor regulates cyroskeletal anchoring and clusterin*, 2001, J Cell Biol, 153:1-12
- Brett BL, Larson LL, Schoonover JR, Sparks TC, Thompson GD, *Biological properties of spinosad*, 1997, Down to Earth, 52: 1
- Chamaon K., Smalla KH, Thomas U et al., *Nicotinic acetylcholine receptors of Drosophila: three subunits encoded by genomically linked genes can co assemble into the same receptor complex*, 2002, J. Neurochem., 80:149-157
- Changeux JP, Taly A, *Nicotinic receptors allosteric proteins and medicine*, 2008, Trends Mol. Med, 2008 14:93-102
- Changlu W., Michael E.S, Garry W.B., *Behavioral and physiological resistance of the german cockroach to gel baits*, 2004, J. Econom. Entomol., 6: 2067-2072
- Claude M., Michel M., Jean-Baptiste B., Monique D.S., Valerie B., Nicole P., George P.G., *Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant Cules mosquitoes and their presence in other insects*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2113-2116
- Constant R.H., Nicola A., Kate A., Thomas R., Geoff S., *Cyclodiene insecticide resistance : from molecular to popoulatio genetics*, 2000, An. Rev. Entom. 45: 449-466

- Corringer PJ, Le Novere N., Changeux JP, *Nicotinic receptors at the amino acid level*, 2000, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:431-458
- Cuamba N, Morgan JC, Irving H, Steven A, Wondji CS *High Level of Pyrethroid Resistance in an Anopheles funestus Population of the Chokwe District in Mozambique*, 2010, *PLoS ONE* 5:6
- Devillers-Thierry A, Giraudat J, Bentaboulet M et al. *Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain*, 1983, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:2067-2071
- Dong, K. *Insect sodium channels and insecticide resistance*, 2007, *Invert Neurosci*, 7: 17-30, 1354-2516.
- Du W, Awolola TS, Howell P, Koekemoer LL, Brooke BD, Benedict MQ, Coetzee M, Zheng L, *Independent mutation in the Rdl locus confer dieldrin resistance to Anopheles gambiae and An. Arabiensis*, 2005 *Mol.Biol* 2:179-83.
- Engel AG, Ohno K, Sine SM, *Congenital myasthenic syndromes: Progress over the pass decade*, 2003, *Muscle Nerve*, 27:4-25
- Feng C., Mylene W., Arnaud B., Michel R., Chuan-Ling Q., *Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes*, 2007, *Ins. Bioch. and Mol.Biol.*, 37: 1131-1137
- Ferguson JS, *Development and stability of insecticide resistance in the leafminer Liriomyza trifolii (Diptera:Agromyzidae) to cyromazine, abamectin and spinosad*, 2004, *Jou. Econ. Entomol.*, 97:112-119
- Gao JR, Deacutis JM, Scott JG, *The nicotinic acetylcholine receptor subunit Mdelta6 from Musca domestica is diversified via posttranscriptional modification*, 2007, *Insect Mol Biol*, 16:325-334
- Gorman K., Liu Z., Denholm I., Bruggen K.U., Nauen R., *Neonicotinoid resistance in rice brown planthopper, Nilaparvata lugens*, 2008, *Pest Man. Sc.* 11: 1122-1125
- Grant DF, Hammock BD, *Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in Aedes aegypti*, 1992, *Mol Gen Genet* 234: 169-176
- Grauso M., Reenan RA, Culetto E et al., *Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes Dalpha5, Dalpha6 and Dalpha7, in Drosophila melanogaster identify a ew and highly conserved target od adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing*, 2002, *Genetics*, 160: 1519-1533

- Guzman GR, Santiago J, Ricardo A et al., *Tryptophan scanning mutagenesis in the alpha M3 transmembrane domain of the Torpedo californica acetylcholine receptor: functional and structural implication*, 2003, *Biochemistry*, 42:12243-12250
- Hermans-Borgmeyer I, Zopf D, Ryseck et al., *Primary structure of a developmentally regulated nicotinic receptor protein from Drosophila* 1986, *EMBO J*, 5:1503-1508
- Hopfield JF, Tank DW, Greengard P et al., *Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation*, 1988, *Nature*, 336:677-680
- Hsu JC, Feng HT, Wu WJ, Scott G and Vontas J. *Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene bdalpha6 are associated with spinosad resistance in Bactrocera dorsalis*, 2012, *Insect Biochem Mol Biol*
- Janet H., Patricia R.P, Americo D.R, James B.M., Edge W., Hillary R., Mario H.R, *Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large-scale field trial in southern Mexico*, 1997, *Pestic. Sci.* 51: 375-382
- Janet H., Linda F., Joh V., *An overview of insecticide resistance*, 2002, *Science*, 298
- Jean-Baptiste B., Rene F., Marcel A., *Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects*, 1998, *Phil. Trans. R. Soc.*, 353: 1701-1705
- Jeremy MB, John LT, Lubert S, *Βιοχημεία*, 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Τόμος I
- Jin Y, Tian N, Cao J et al., *RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation*, 2007, *BMC Evol Biol*, 7:98
- Jonas P., Baumann A., Merz B et al, *Structure and developmental expression of the D alpha 2 gene encoding a novel nicotinic acetylcholine receptor protein of Drosophila melanogaster*, 1990, *FEBS Lett.*, 269:264-268
- Jones AK, Grauso M, Sattelle DB, *The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, Anopheles gambiae*, 2005, *Genomics*, 85:176-187
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH et al., *The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, Apis mellifera*, 2006, *Genome Res.* 16:1422-1430
- Κακάνη Ευδοξία, *Μοριακή ανάλυση γονιδιακών τόπων που εμπλέκονται στον μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς του εντόμου Bactrocera oleae*, Διδακτορική διατριβή, 2009
- Klowden MJ, *Physiological systems in insects.*, 2007, Elsevier Inc.

- Landstell SJ, Millar NS, *Cloning and heterologous expression of Dalpha4, a Drosophila neuronal nicotinic receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly*, 2000, *Neuropharmacology*, 39:2604-2614
- Li X, Berenbaum MR, Schuler MA, *Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 CcDNA from Helicoverpa zea*, 2000, *Insect Biochem Molec Biol* 30: 75-84
- Liu Y., Zhang H., Qiao C., Lu X., Cui F., *Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in Culex pipiens complex from China*, 2011 *Par. Vec.* 4:236
- Lindberg RLP, Negishi M, *Alteration of mouse cytochrome P450 substrate specificity by mutation of a single aminoacid residue*, 1989, *Nature* 339:632-634
- Littleton JT, Ganetzky B., *Ion channels and synaptic organization: analysis of the Drosophila genome*, 2000, *Neuron*, 26:35-43
- Maa CJW, Tseng WP, Huan IC, *Preliminary characterization of the larval esterase and the isozymes of diamond-back moth, Plutella xylostella (L)*, 1990, *Bull. Inst.Zool.Acad.Sinica* 29: 181-194
- Maritza R., Karen R, Lucia A., Myriam S., Benoit S., *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field population of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad*, 2012, *Pest Biochem and Phys.* 102:45-50
- Millar NS, Gotti C., *Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors*, 2009, *Neuropharmacology* 56(1):237-46
- Montiel Bueno A., Jones O., *Alternative methods for controlling the olive fly, Bactrocera oleae, involving semiochemicals*, 2002, *IOBC Bulletin* 25
- Moulton JK, Pepper DA, Dennehy TJ, *Beet armyworm(Spodoptera exigua) resistance to Spinosad*, 2000, *Pest manag Science*, 56: 842-848
- Morton R.A, Singh R.S., *Biochemical properties, Homology and Genetic Variation of Drosophila "Non-specific" esterases*, 1985, *Biochem.Genetics*, 23: 11-12
- Nelson DR, *Cytochrome P450 nomenclature*, 1998, *Meth. In Mol. Biology*, 107:15-24
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R et al., *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature*, 1993, *DNA Cdl Biol* 12:1-51

- Negishi M, Uno T, Darden TA, Sueyoshi T, Pedersen LG, *Structural flexibility and functional versatility of mammalian P450 enzymes*, 1996, *Faseb* 10: 683-689
- Neuman E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH, *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*, 1982, *EMBO* 1: 841-845
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T et al. *Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence*, 1982, *Nature*, 299:793-797
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T et al. *Primary structure of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence*, 1983, *Nature*, 301: 251-255
- Openoorth FJ, Van der Pas LJT, Houx NWH, *Glutathione S-transferases and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance*, 1979, *Pestic. Biochem. Physiol.* 11: 176-188
- Perilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI Rodriguez MH, *Resistance management strategies in malaria vector mosquito control: Baseline data for a large-scale field trial against Anopheles albimanus in Mexico*, 1998, *Med.Vet. Entomol.* 12, 217
- Perry T, McKenzie JA, Batterham P, *A Da6 knockout strain of Drosophila melanogaster confers a high level of resistance to spinosad*, 2007, *Ins. Bioch. Mol. Biol.*, 372: 184-188
- Peter M.C, Josephine F.T, Charles C., Kerrie-Ann S., Robyn J.R, John G.O, *Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in Lucilia Cuprina with comparison to putative orthologues in other diptera*, 1997, *Bioch.Genet.* 35:1-2
- Philip D., Christopher L., Adrian B., Wayne W., Richard H.C, Philip B., *Evaluating the insecticide resistance potential of eight Drosophila melanogaster cytochrome P450 genes by transgenic over-expression*, 2007, *Insect Bioch. Mol. Biology*
- Ramesh CG, *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*, 2006, Academic Press
- Robert G.B, *Pest Resistance to Pesticides*, 1996, 1
- Salgado VL, Watson GB, Sheets JJ, *Studies on the mode of action of Spinosad, the active ingredient in Tracer insect control*, 1997, *Proc. Beltwide Cotton Conf*, 1082- 1086
- Salgado VL, *Studies on the mode of action of Spinosad: Insect Symptoms and Physiological Correlates*, 1998, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 60:91-102

- Scott JG, *Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects*, Jour. Pest. Sct, 2008, 333: 221-227
- Sgaramella V, Elrich SD, *Use of T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases*, 1978, Eur J Biochem 86: 531-537
- Shao YM, Dong K, Zhang CX, *The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm Bombyx mori*, 2007, BMC Genomics, 8:324
- Shono T, Scott JG, *Spinosad resistance in the housefly Musca Domestica is due to a recessive factor on autosome 1*, 2003, Pestic. Biochem. Physiol., 75: 1-7
- Sine SM, Engel AG, *Recent advances in Cys-loop receptor structure and function*, 2006, Nature, 440:448-455
- Sparks TC, Sheets JJ, Skomp JR, Worden TV, Hertlein MB et al., *Penetration and metabolism of spinosyn A in lepidopterous larvae*, 1997, UKPMC 1259-1265
- Tamamizu S, Lee Y, Hung B et al., *Alteration in ion channel function of mouse nicotinic acetylcholine receptor by mutations in the M4 transmembrane domain*, 1999, J Membr Biol, 170: 157-164
- Thompson GD, Michel KH, Yao RS, Mynderse JS et al, *The discovery of Saccharopolyspora spinosa and a new class of insect control products*, 1997, Down to Earth, 52:1
- Thompson GD, Dutton R, Sparks TC, *Spinosad -a case study: an example from natural products discovery programme*, 2000, Pest Manag. Science, 8: 696-702
- Tomizawa M., Casida John E., *Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action*, 2005, An. Rev. Pharm. Toxic., 45: 247- 268
- Velthuis H.H.W., Asperen K.V., *Occurance and inheritance of esterases in Musca Domestica*, 1963, Entomologia experiment. et Applic 1:79-87
- Wen Z, Horak CE, Scott JG, *CYP9E2, CYP4C21 and related pseudogenes from German cockroaches, Blatella germanica: implications for molecular evolution, expression studies and nomenclature of P450s*, 2001, Gene, 1-2: 257-66
- Xia Q, Zhou Z, Lu C et al., *A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (Bombyx mori)*, 2004, Science, 306:1937-1940

Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RFL, Thompson GD, Shelton AM, *Monitoring and characterization of diamond back moth resistance to Spinosad*, 2002, Jour Econ. Entomol, 95: 430-436