

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας «Εφαρμογές
Μοριακής Βιολογίας-Μοριακή Γενετική-
Διαγνωστικοί Δείκτες»

Κλωνοποίηση υπομονάδων του υποδοχέα ακετυλοχολίνης στο δάκο της ελιάς.

Φοιτητής: Κουϊμάνης Χρυσοβαλάντης

2011-2012

**«Κλωνοποίηση υπομονάδων του υποδοχέα της
ακετυλοχολίνης στο δάκο της ελιάς»**

Τριμελής Επιτροπή

**Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	6
1.Εισαγωγή.....	7
Νευρικό σύστημα των εντόμων.....	7
Δομή.....	7
Σύγκριση Δομής και Εξέλιξης Νευρικού συστήματος Εντόμων με το υπόλοιπο ζωικό βασίλειο.....	9
Κύτταρα.....	14
Ανάπτυξη.....	15
Σύγκριση ανάπτυξης Νευρικού Συστήματος μεταξύ Εντόμων και Σπονδυλωτών.....	16
Λειτουργία.....	18
Νευροδιαβιβαστές.....	19
Υποδοχέας της Ακετυλοχολίνης.....	20
Νικοτινικός Υποδοχέας της Ακετυλοχολίνης.....	21
Εντομοκτόνα.....	23
Νεονικοτινοειδή.....	25
Spinosad.....	26
Υποδοχείς νευροδιαβιβαστών ως στόχοι εντομοκτόνων.....	27
Σκοπός.....	28
2.Υλικά-Μέθοδοι.....	30
Υλικά.....	30
Διαλύματα.....	32
Φωτογραφίες εργαστηριακού εξοπλισμού.....	33
Μέθοδοι.....	36
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	36
Παρασκευή γέλης αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση δειγμάτων.....	38
Ηλεκτροφόρηση.....	38
Απομόνωση DNA από γέλη ηλεκτροφόρησης.....	39
Κατακρήμνιση DNA/RNA.....	40
Απομόνωση ολικού RNA με χρήση TRIZOL.....	41
PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (RT PCR).....	42
Poly A tailing.....	42

RACE PCR	43
Στύπωμα κατά Southern	43
Κλωνοποίηση ενθέματος στόχου σε πλασμιδιακό φορέα και καθαρισμός ..	46
Προετοιμασία κυττάρων	46
Ηλεκτροδιάτρηση και καλλιέργεια	47
Διαλογή αποικιών	48
Mini Preps.....	48
Καθαρισμός φαινόλη-χλωροφόρμιο.....	49
Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων:	49
Πέψη και διαλογή πλασμιδίων φερόντων ένθεμα	50
Επεξεργασία Δεδομένων	50
3.Αποτελέσματα.....	51
Πειραματική Διαδικασία.....	51
Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	61
4.Συζήτηση.....	70
Βιβλιογραφία.....	72
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	78

Πρόλογος

Η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας μου προσδίδει μεγάλη ικανοποίηση διότι με αυτό τον τρόπο μου δόθηκε η δυνατότητα αφενός να ασχοληθώ με ένα νέο για εμένα γνωστικό αντικείμενο, αφετέρου διότι έμαθα νέες τεχνικές και εμπάθυνα σε αυτές.

Νιώθω την ανάγκη όμως να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου κάποιους ανθρώπους, η βοήθεια των οποίων υπήρξε για μένα πολύτιμη στην έρευνα αυτή.

Θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια που σπουδάζω και που πάντα βρίσκεται δίπλα μου.

Ευχαριστώ τον κύριο Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τους κυρίους Μαμούρη Ζήση και Καρπούζα Δημήτριο για την συμβολή τους στην εργασία αυτή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην φίλη Μαριλένα Γρηγορίου καθότι χωρίς την βοήθεια της και την υπομονή της η εργασία αυτή ίσως να μην είχε ολοκληρωθεί. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Αχιλλέα Κρητικό, Ιωάννη Αλεβιζάκη και Γιώργο Γιοβανούλη για την παρέα τους και την υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια του προγράμματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Εύη Κακάνη, Κωνσταντίνα Τσουμάνη, Νίκο Ζυγουρίδη, Αντώνη Αυγουστίνο και Έφη Σαγρή για την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο κατά την εκπόνηση την εργασίας μου, την υπομονή τους, την συμπαράσταση τους και την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου Εύα Κουβάτα, Βασιλική Λιγυρού, Δέσποινα Μπαλτζή, Χρυσάνθη Αλεξανδρή, Αναστασία Μανούση και Κώστα Σταυρόπουλο για το ωραίο κλίμα που είχαμε στο εργαστήριο και την άψογη συνεργασία.

1.Εισαγωγή

Ίδιον των ζωντανών οργανισμών είναι η αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλοντα χώρο, αλλά και μεταξύ τους. Για να την επίτευξη αυτού του στόχου είναι σημαντική τόσο η συλλογή πληροφοριών από αυτόν, όσο και η ανταπόκρισή του σε αυτές τις πληροφορίες. Ποικίλες στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί από τους οργανισμούς από την στιγμή που εμφανίστηκε η ζωή στη Γη έως σήμερα. Μάλιστα οι οργανισμοί αυτοί που δύνανται να αποκριθούν γρηγορότερα στις πληροφορίες αυτές είναι και οι πιο «πετυχημένοι» εξελικτικά, καθώς είναι αυτοί που θα έχουν την ευκαιρία να διαιωνίσουν τα γονίδιά τους. Οι στρατηγικές αυτές μπορούν να συνοψιστούν ανάλογα σε ποια αυτοκρατορία (Mayr 1998) ή ποιο βασίλειο ανήκουν (Cavalier-Smith 2004). Γενικά οι οργανισμοί που αποτελούνται από ένα κύτταρο αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους μέσω του κυτταροπλάσματός τους· το κυτταρόπλασμα λαμβάνει τις πληροφορίες μέσω των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης και μέσω βιοχημικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται αντιδρά σε αυτές. Οργανισμοί με πολυπλοκότερη δομή και οργάνωση αναπτύσσουν εξειδικευμένα συστήματα για την συλλογή, επεξεργασία και απόκριση στις πληροφορίες.

Νευρικό σύστημα των εντόμων

Στα έντομα όπως και στο υπόλοιπο ζωικό βασίλειο το σύστημα που είναι υπεύθυνο για την συλλογή, επεξεργασία και απόκριση στις πληροφορίες είναι το νευρικό σύστημα.

Δομή

Τα Έντομα ανήκουν στα Αρθρόποδα τα οποία αποτελούν την πολυπληθέστερη και ποικίλη ομάδα όλου του ζωικού βασιλείου. Το σώμα τους δομείται (όπως και των Σκωλήκων) από μεταμερή. Η διαφορά Εντόμων-Σκωλήκων έγκειται στην εξειδίκευση των μεταμερών των Εντόμων καθώς και στην ύπαρξη διαφόρων εξαρτημάτων. Το κάθε μεταμερές έχει δικό του γάγγλιο το οποίο ενώνεται κατά μήκος της κοιλιακής χώρας με τα υπόλοιπα. Σε διάφορα σημεία του σώματος ανάλογα το είδος σχηματίζουν μεγαλύτερα γάγγλια και στην περιοχή της κεφαλής τον εγκέφαλο ή υπεροισοφαγικό γάγγλιο. Το υποοισοφαγικό γάγγλιο ελέγχει τα στοματικά εξαρτήματα, τους σιελογόνους αδένες και ορισμένους μύες. Ο εγκέφαλος στα Αρθρόποδα χωρίζεται σε 3 τμήματα: τον πρωτεγκέφαλο, τον δευτεροεγκέφαλο και τον τριτεγκέφαλο (Harzsch 2006).

Το νευρικό σύστημα των Εντόμων αποτελείται από 4 υποσυστήματα: α)Τα αισθητήρια όργανα, περιλαμβάνοντα αισθητήρες φωτός, θερμοκρασίας, μηχανικούς και χημικούς β)Το περιφερικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνον αισθητήριους και κινητήριους νευρώνες προς επικοινωνία με τους μύες και το περίβλημα του εντόμου γ)το κεντρικό

νευρικό σύστημα περιλαμβάνουν τον εγκέφαλο και την μεταμερή κοιλιακή γαγγλιακή αλυσίδα που ελέγχουν την σωματική δραστηριότητα και δ) το στοματογαστρικό σύστημα που περιλαμβάνει γάγγλια για τον έλεγχο του γαστρικού σωλήνα και διάφορους ενδοκρινείς αδένες.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει τον εγκέφαλο και την μεταμερή κοιλιακή γαγγλιακή αλυσίδα όπως προαναφέρθηκε.

Ο εγκέφαλος αποτελείται από 3 γαγγλιακές μάζες: πρωτεγέφαλο, δευτεροεγκέφαλο και τριτεγέφαλο. Ο πρωτεγέφαλος είναι η μεγαλύτερη και πολυπλοκότερη δομή εκ των τριών. Σε αυτόν πλευρικά απολήγουν τα νεύρα των οπτικών λοβών των σύνθετων οφθαλμών και ραχιαίως τα νεύρα των απλών οφθαλμών. Εσωτερικά φέρει ένα ζεύγος νευροπιλημάτων σε σχήμα μανιταριού τα οποία έχουν καθοριστικό ρόλο στην συμπεριφορά. Στα κοινωνικά Υμενόπτερα οι δομές αυτές είναι ιδιαίτερα μεγεθυμένες υποδεικνύοντας την σημασία τους για την περίπλοκη συμπεριφορά των εντόμων αυτών. Ενδιάμεσα βρίσκεται η δομή *pars intercerebralis*. Τρία ακόμα νευροπιλήματα αποτελούν τον πρωτεγέφαλο και ενώνονται μεταξύ τους με μια σύζευξη, η προτεγκεφαλική γέφυρα, το κεντρικό σώμα και οι συμπληρωματικοί λοβοί. Ο δευτεροεγκέφαλος φέρει κινητήριους και αισθητήριους άξονες για τις κεραιές του εντόμου οι οποίες είναι οι κύριες δομές εισαγωγής πληροφοριών για τα Έντομα. Ο τριτεγέφαλος φέρει αισθητήριους και κινητήριους άξονες για τον επιχείλιο χόνδρο και το εμπρόσθιο γάγγλιο του στοματογαστρικού συστήματος (Daly et al.).

Υπολογίζεται ότι ο αριθμός των νευρώνων στον εγκέφαλο μιας εργάτριας μέλισσας αριθμεί τους 850000, ενός κηφήνα 1,2 εκατομμύρια, μιας οικιακής μύγας 330000 και μιας ακρίδας 360000.

Η κοιλιακή νευρική χορδή είναι μια αλυσίδα μεταμερικών γαγγλίων ενωμένη πρόσθια με τον τριτεγέφαλο. Τα γάγγλια των τριών γναθικών τμημάτων ενώνονται σε ένα ενιαίο σχηματισμό το υποοισοφαγικό γάγγλιο. Τα τρία γάγγλια των θωρακικών τμημάτων εξυπηρετούν τα πόδια και τον μηχανισμό πτήσης και είναι τα μεγαλύτερα γάγγλια της χορδής. Αισθητήρια και κινητήρια νεύρα εκτείνονται σε διάφορα όργανα και μυς. Στην κοιλιακή χώρα εντοπίζονται όχι περισσότερα από οκτώ γάγγλια. Το τελευταίο εξ αυτών είναι ένα μεγάλο σύνθετο γάγγλιο που εξυπηρετεί τα ακολουθούντα μεταμερή συμπεριλαμβανομένων των γεννητικών οργάνων και των αισθητήριων τριχών. Εξελικτικά υπάρχει μια τάση συγχώνευσης γαγγλίων. Στην ακρίδα τα τρία πρώτα κοιλιακά γάγγλια συγχωνεύονται με το μεταθωρακικό γάγγλιο. Στα Κολεόπτερα και Δίπτερα ανιχνεύονται διάφοροι βαθμοί συγχώνευσης γαγγλίων. Σχεδόν σε όλα τα Ημίπτερα τα γάγγλια του θώρακα και της κοιλιάς συγχωνεύονται σε ένα ενιαίο (Daly et al.).

Το στοματογαστρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει δύο διάμεσα γάγγλια συνδεδεμένα με τον εγκέφαλο και ένα γάγγλιο ή ζεύγος

γαγγλίων στην επιφάνεια του προσθίου εντέρου. Το πρόσθιο γάγγλιο βρίσκεται μπροστά από τον φάρυγγα και λαμβάνει το ζεύγος εμπρόσθιων συνδέσμων από τον τριτεγκέφαλο και το μονό επαναλαμβανόμενο νεύρο από το υπεγκεφαλικό γάγγλιο. Το υπεγκεφαλικό γάγγλιο εντοπίζεται πίσω από τον εγκέφαλο, μεταξύ αορτής και προσθίου εντέρου και έχει συνήθως 3 συνδέσεις: το μονό επαναλαμβανόμενο νεύρο και ένα ή δύο οισοφαγικά νεύρα. Το μονό γάγγλιο (ή ζεύγος γαγγλίων) που εντοπίζεται πίσω από το πρόσθιο έντερο ελέγχει τις κοιλιακές κινήσεις (Daly et al.).

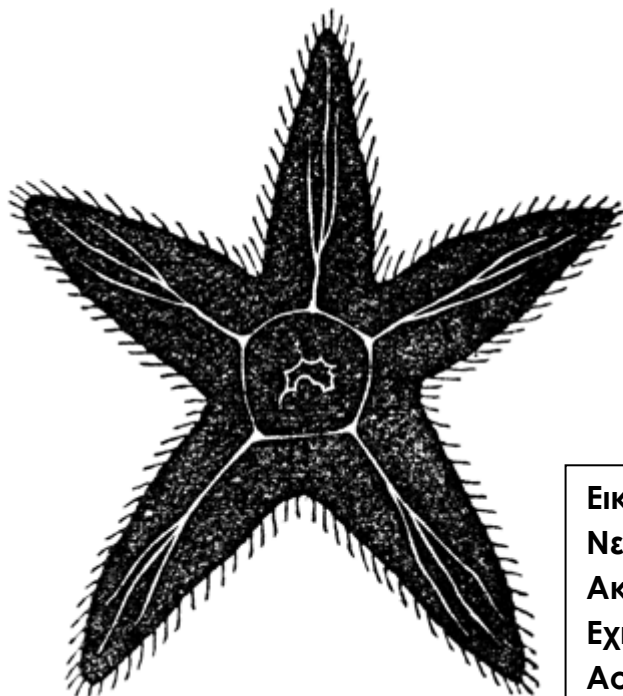
Σύγκριση Δομής και Εξέλιξης Νευρικού συστήματος Εντόμων με το υπόλοιπο ζωικό βασίλειο

Εξελικτικά τα διαφόρων τύπων νευρικά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί χρονολογούνται με την εμφάνιση των πρώτων ζώων. Η δομή του νευρικού συστήματος θυμίζει δέσμες από ίνες που διατρέχουν όλο το σώμα. Οι σπόγγοι είναι τα μόνα πολυκύτταρα ζώα που δεν διαθέτουν νευρικό σύστημα αλλά αντί αυτού διαθέτουν διακυτταρική επικοινωνία όμοια των μονοκύτταρων οργανισμών και των μυκήτων (Sakarya et al. 2007). Σε ζώα ακτινωτής συμμετρίας (Κνηδωτά και Εχινόδερμα) το σύστημα αποτελείται από ένα διάχυτο δίκτυο απομονωμένων κυττάρων (Ruppert EE, Fox RS 2004) (Sanes DH, Reh TA 2006), ενώ σε ζώα αμφίπλευρης συμμετρίας από μια κοινή δομή που αναπτύχθηκε κατά την Κάμβρια περίοδο (Balavoine & Adoutte 2003).

Τα νευρικά πρόδρομα εξελίχθηκαν από τους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Για την λειτουργία του μηχανισμού χρησιμοποιείται ασβέστιο αντί νατρίου και μάλλον εξελίχθηκε σε ηλεκτρικά σήματα στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Οι αποικιακοί ευκαρυώτες δεν διαθέτουν νευρικό σύστημα, εντούτοις ηλεκτρικά σήματα μεταφέρονται μέσω του επιθηλίου στο πεπτικό σύστημα της αποικίας (Matthews 2001).

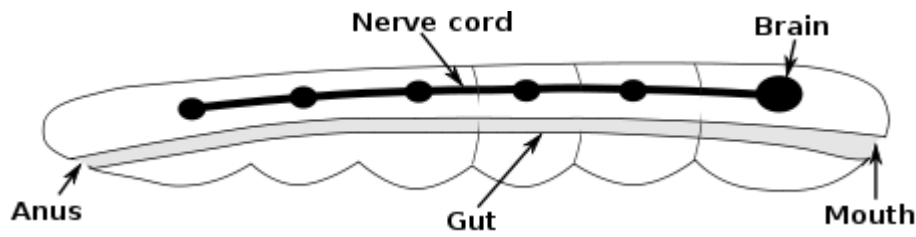
Οι σπόγγοι διαθέτουν ομόλογα γονιδίων που έχουν βασικό ρόλο στη λειτουργία των συνάψεων και επικοινωνούν κυρίως με κύματα ιόντων ασβεστίου που επιτρέπουν απλές πράξεις όπως η συσπείρωση (Jacobs et al. 2007). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι ακόμα και σε σαρκοφάγους σπόγγους δεν έχει βρεθεί κάποιου είδους οργάνωση νευρικού συστήματος (VACELET 2008). Έχουν βρεθεί γονίδια όμοια της λειτουργίας σηματοδότησης που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρων σε προνύμφες σπόγγων. Δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα εάν αυτά τα γονίδια αποτελούν πρόδρομα γονίδια στην εξέλιξη του νευρικού ή αν οι πρόγονοι των σπόγγων έφεραν κάποιου είδους νευρικό σύστημα το οποίο απωλέστηκε κατά την διάρκεια της εξέλιξης (Sakarya et al. 2007). Είναι ζώα μονοβλαστικά και αν και παράγουν διαφοροποιημένα κύτταρα εντούτοις δεν έχουν πραγματικό συντονισμό ιστών.

Τα Ακτινωτά (που περιλαμβάνουν τα Κνηδωτά και τα Εχινόδερμα) διαθέτουν το διάχυτο νευρικό δίκτυο που προαναφέρθηκε (Ruppert EE, Fox RS 2004) το οποίο σε σπάνιες περιπτώσεις σχηματίζει γάγγλια. Η ακτινωτή συμμετρία σύμφωνα με νεώτερες έρευνες είναι νεώτερη της αμφίπλευρης (Finnerty 2003)(Finnerty et al. 2004). Είναι ζώα διπλοβλαστικά, η βλάστουλά τους αποτελείται από εξώδερμα και ενδόδερμα.



Εικόνα 1.1
Νευρικό σύστημα
Ακτινωτού (Φύλο
Εχινόδερμα Τάξη
Αστεροειδή)

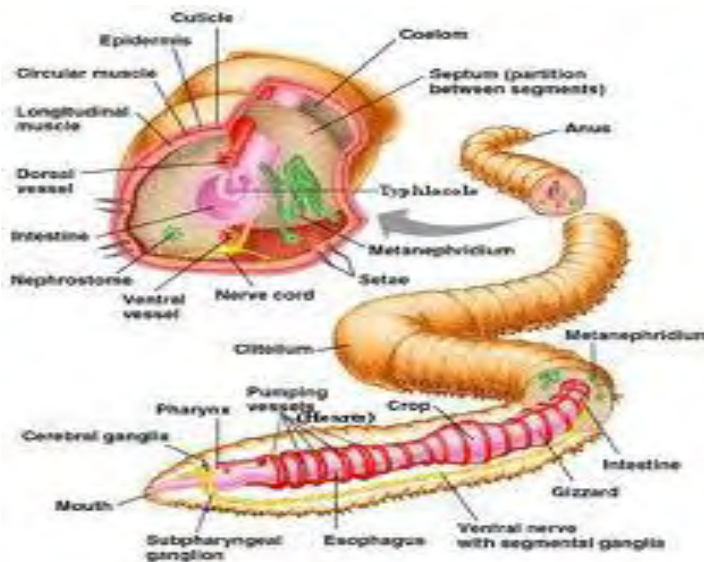
Τα ζώα αμφίπλευρης συμμετρίας προέρχονται από ένα σκληρόμορφο κοινό πρόγονο που έζησε κατά την Κάμβρια περίοδο, περίπου 500-600 εκατομμύρια χρόνια πριν. Η βασική μορφή ενός τέτοιου ζώου είναι σωληνοειδής με μια κενή κοιλότητα που διατρέχει το σώμα από έδρα σε έδρα και μια νευρική χορδή που σχηματίζει ένα εξόγκωμα για κάθε τμήμα του σώματος και απολήγει σε έναν εγκέφαλο. Το βασίλειο των ζώων χωρίζεται σε 2 υπερσυνομοταξίες τα Πρωτοστόμια και τα Δευτεροστόμια ανάλογα με την χρονική σειρά που εμφανίζεται η σπή που θα σχηματίσει το στόμα στο ζυγωτό. Το ζυγωτό είναι τριπλοβλαστικό (διαθέτει εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα) και το νευρικό σύστημα του ζώου προέρχεται από το εξώδερμα (Langman 2010). Σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές συνομοταξίες είναι η τοποθέτηση της νευρικής χορδής, στα Πρωτοστόμια είναι συνήθως στην κάτω (κοιλιακή) πλευρά του σώματος ενώ στα Δευτεροστόμια στην πάνω (ραχιαία) πλευρά. Πρόσφατες έρευνες (Zhu et al. 2008) αποκάλυψαν μια κοινή υπεροικογένεια εκκρινόμενων σηματοδοτικών μορίων τις νευροτροφίνες, οι οποίες ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των νευρώνων σε όλα τα ζώα αμφίπλευρης συμμετρίας γεγονός που υποδεικνύει ότι υπήρχαν και στον κοινό πρόγονο.



Εικόνα 1.2
Σχηματική
απεικόνιση
Αμφίπλευρου

Τα Αμφίπλευρα χωρίζονται σε 4 σημαντικές συνομοταξίες τα Μαλάκια, τα Αρθρόποδα, τους Σκώληκες και τα Σπονδυλωτά.

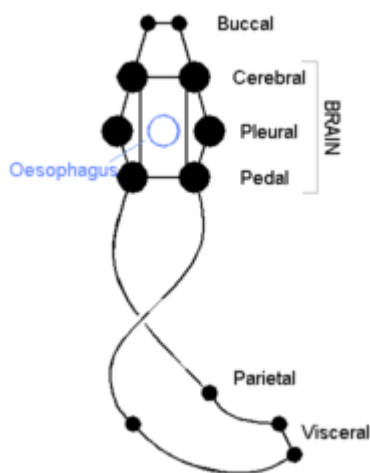
Οι Σκώληκες είναι οι απλούστεροι αμφίπλευροι οργανισμοί. Αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα και αυτόνομα μεταμερή που το καθένα φέρει δικό του νευρικό γάγγλιο, μυϊκό ιστό, κυκλοφορικό και πεπτικό σύστημα. Η κεφαλή του ζώου φέρει λίγα γάγγλια που φέρουν το ρόλο του εγκεφάλου. Σημαντικός αντιπρόσωπος είναι το *C. elegans* οι νευρώνες του οποίου είναι οι μόνοι που έχει καταγραφεί πλήρως η ανάπτυξη τους και η κυτταρική καταγωγή τους καθώς και σχεδόν όλες οι συνάψεις αυτών. Η υποκατηγορία των Πλατυελμίνθων περιλαμβάνει ζώα σκωληκόμορφα και πεπλατυσμένα όπως υποδεικνύει και το όνομά τους, θεωρούνται πρώιμο στάδιο στην εξέλιξη των Αμφίπλευρων ίσως και εγγύτερα στον αρχικό πρόγονο από άλλες ομάδες (Ruiz-Trillo et al. 2002). Δεν φέρουν μεταμερή και το νευρικό τους συγκεντρώνεται στην περιοχή της κεφαλής και έχει δομή ελάχιστα πολυπλοκότερη από τα Ακτινωτά.



Εικόνα 1.3 Ανατομική
απεικόνιση Σκώληκα.
Διακρίνονται τα
μεταμερή του ζώου και
τα βασικά συστήματα
(Νευρικό, Πεπτικό,
Κυκλοφορικό)

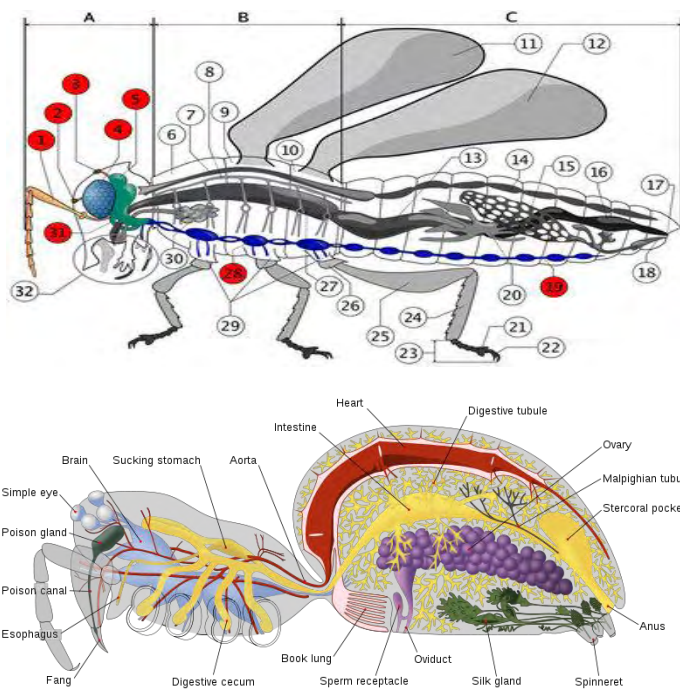
Τα Μαλάκια φέρουν δύο νευρικές χορδές που διατρέχουν το σώμα τους, και έχουν γάγγλια σε σημαντικές περιοχές ή όργανά τους. Στα είδη που φέρουν εγκέφαλο αυτός εντοπίζεται πάνω από τον οισοφάγο. Είναι γεγονός ότι μεταξύ των Ασπόνδυλων ο μεγαλύτερος εγκέφαλος ανήκει σε Μαλάκιο και μάλιστα σε είδος γιγαντιαίου καλαμαριού, το οποίο ανήκει στα Κεφαλόποδα τα οποία διαθέτουν την πολυπλοκότερη νευρολογικά οργάνωση μεταξύ των Ασπόνδυλων. Εξαιρεση στον

κανόνα των 2 νευρικών «σχοιριών» αποτελούν τα Δίθυρα Μαλάκια, τα οποία διαθέτουν 3.



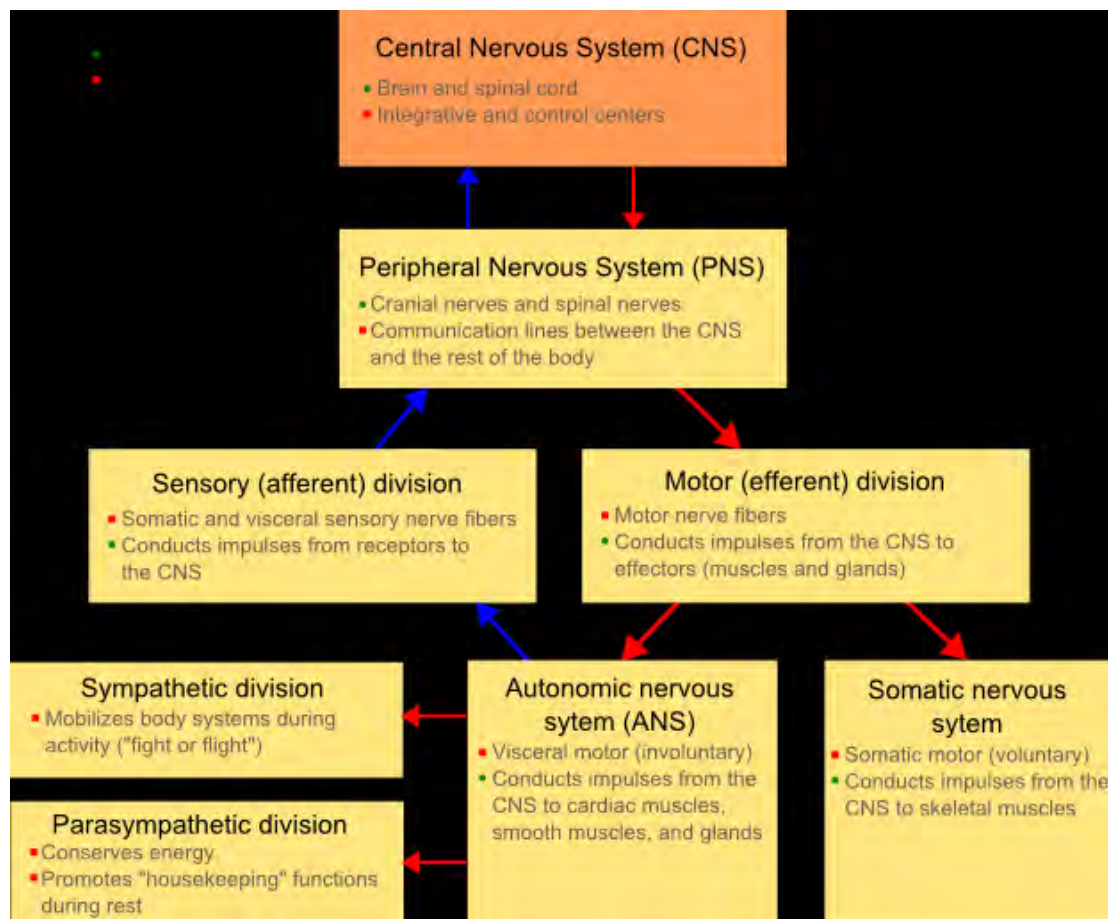
Εικόνα 1.4 Σχηματική Απεικόνιση Νευρικού συστήματος ενός τυπικού Μαλακίου

Τα Αρθρόποδα αποτελούν την πολυπληθέστερη και ποικίλη ομάδα όλου του ζωικού βασιλείου. Αποτελούνται όπως και οι Σκώληκες από μεταμερή. Η διαφορά έγκειται στην εξειδίκευση αυτών καθώς και στην ύπαρξη διαφόρων εξαρτημάτων. Το κάθε μεταμερές έχει δικό του γάγγλιο το οποίο ενώνεται κατά μήκος της κοιλιακής χώρας με τα υπόλοιπα. Σε διάφορα σημεία του σώματος ανάλογα το είδος σχηματίζουν μεγαλύτερα γάγγλια και στην περιοχή της κεφαλής τον εγκέφαλο ή υπεροισοφαγικό γάγγλιο. Το υποοισοφαγικό γάγγλιο ελέγχει τα στοματικά εξαρτήματα, τους σιελογόνους αδένες και ορισμένους μύες. Ο εγκέφαλος στα Αρθρόποδα χωρίζεται σε 3 τμήματα: τον πρωτεγκέφαλο, τον δευτεροεγκέφαλο και τον τριτεγκέφαλο (Harzsch 2006).

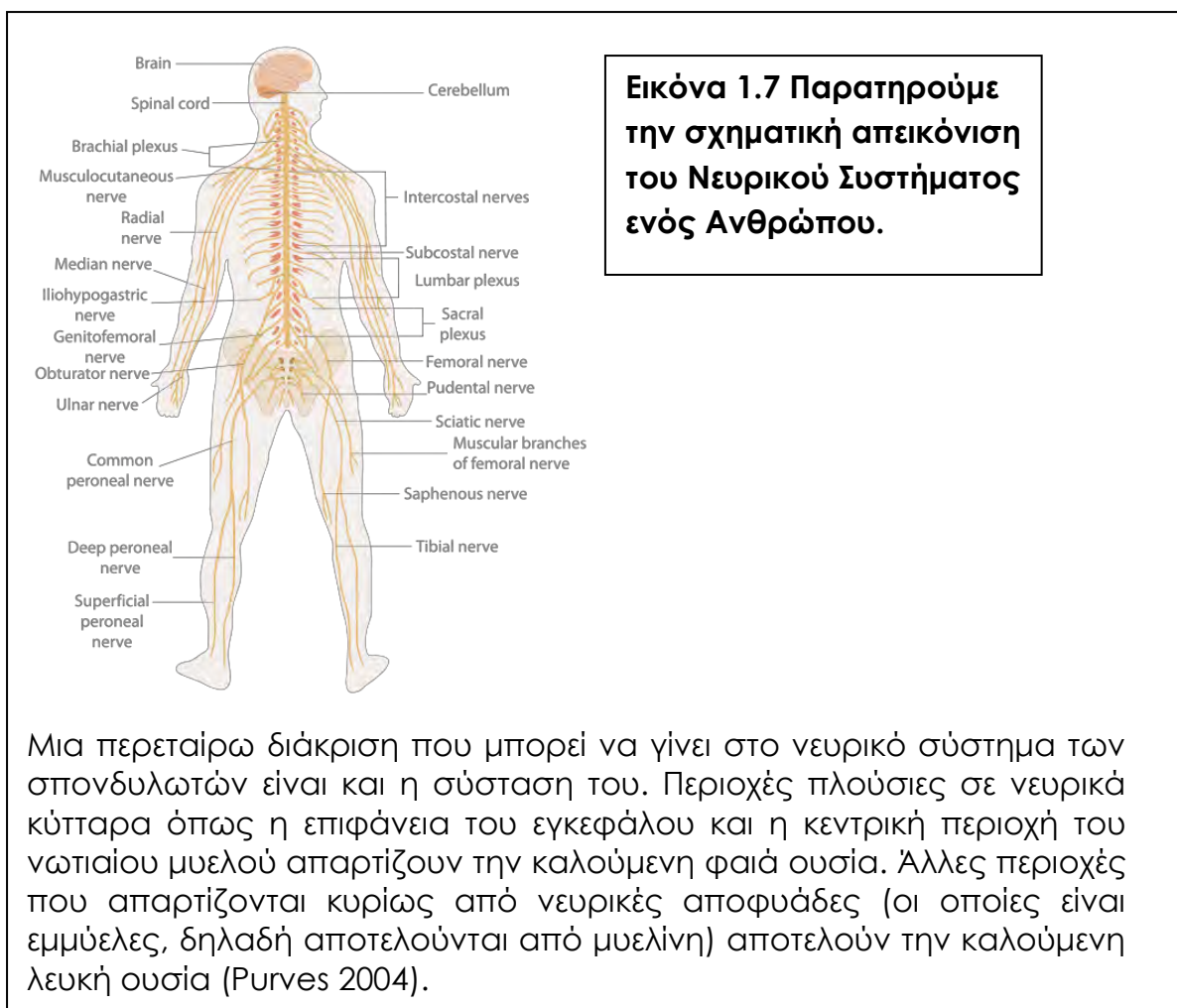


Εικόνες 1.4 και 1.5 Ανατομική απεικόνιση κύριων συστημάτων σε 2 βασικούς εκπροσώπους των Αρθρόποδων τα Έντομα (εικόνα 1.4) και τις Αραχνίδες (εικόνα 1.5)

Τα Σπονδυλωτά είναι η πλέον πρόσφατη, εξελικτικά, ομάδα στο ζωικό βασίλειο. Ως εκ τούτου διαθέτουν και το πιο πολύπλοκα δομημένο νευρικό σύστημα. Αυτό αποτελείται από 2 κυρίως δομές το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) (Purves 2004). Το ΚΝΣ είναι το μεγαλύτερο και περιλαμβάνει τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Το ΠΝΣ είναι ευρύς όρος που περιλαμβάνει όλες τις νευρικές δομές που δεν ανήκουν στο ΚΝΣ. Χωρίζεται σε σωματικά και σπλαχνικά μέρη. Τα σωματικά νευρώνουν το δέρμα, τις αρθρώσεις και τους μύες και εδράζονται στο ραχιαίο τμήμα του νωτιαίου μυελού. Τα σπλαχνικά (επίσης γνωστά με το όνομα Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα) νευρώνουν τα εσωτερικά όργανα, τους αδένες και τα αιμοφόρα αγγεία. Το ΑΝΣ αποτελείται από το Συμπαθητικό και το Παρασυμπαθητικό Νευρικό Σύστημα. Στην εικόνα που ακολουθεί παρατηρούμε την αλληλεπίδραση μεταξύ των τμημάτων που απαρτίζουν το νευρικό σύστημα στα σπονδυλωτά.



Στην εικόνα 1.6 παρατηρούμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βασικών τμημάτων του Νευρικού Συστήματος στα Σπονδυλωτά.



Εικόνα 1.7 Παρατηρούμε την σχηματική απεικόνιση του Νευρικού Συστήματος ενός Ανθρώπου.

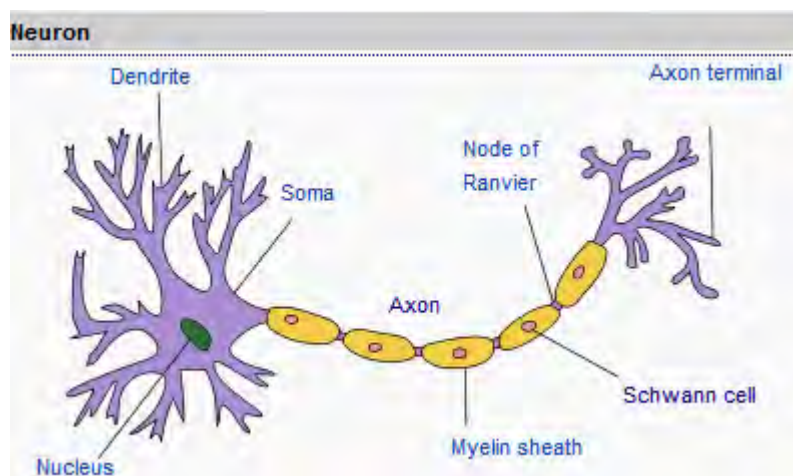
Μια περαιτέρω διάκριση που μπορεί να γίνει στο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών είναι και η σύσταση του. Περιοχές πλούσιες σε νευρικά κύτταρα όπως η επιφάνεια του εγκεφάλου και η κεντρική περιοχή του νωτιαίου μυελού απαρτίζουν την καλούμενη φαιά ουσία. Άλλες περιοχές που απαρτίζονται κυρίως από νευρικές αποφυάδες (οι οποίες είναι εμμύελες, δηλαδή αποτελούνται από μυελίνη) αποτελούν την καλούμενη λευκή ουσία (Purves 2004).

Κύτταρα

Ένα τυπικό νευρικό σύστημα αποτελείται από 2 ειδών κύτταρα: τους νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα. Τα κύρια κύτταρα του νευρικού συστήματος είναι οι νευρώνες (E. J. [Main author] Kandel et al. n.d.), η δομή των οποίων περιλαμβάνει τις χαρακτηριστικές δομές άξονες και δενδρίτες. Κύριο χαρακτηριστικό διαφοροποίησης των νευρώνων από άλλου τύπου κύτταρα είναι η ιδιότητα να επικοινωνούν με άλλα κύτταρα μέσω συνάψεων. Αυτές είναι κόμβοι μεμβράνης-μεμβράνης περιέχοντες μοριακούς μηχανισμούς που επιτρέπουν την γρήγορη διαβίβαση σημάτων χημικών ή ηλεκτρικών. Πολλοί τύποι νευρώνων φέρουν μια πρωτοπλασματική εκβλάστηση, τον άξονα, η οποία εκτείνεται σε απόμακρα σημεία του σώματος και είναι δυνατόν να συνάψει χιλιάδες επαφές. Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά των νευρώνων είναι η διακοπή της αυτοδιαίρεσής τους μετά την διαφοροποίησή τους, το μεγάλο προσδόκιμο ζωής τους καθώς και τα μεγάλα ποσά ενέργειας που καταναλώνουν. Ο άξονας του νευρώνα συνήθως περιέχει μία χαρακτηριστική ουσία, την μυελίνη, η οποία καθορίζει και την αγωγιμότητά του. Η μυελίνη παίζει ρόλο μονωτή αποτρέποντας την διαρροή ιόντων στην μεμβράνη του άξονα. Υπάρχουν και σημεία που ο νευροάξονας εμφανίζεται γυμνός και αυτά ονομάζονται κόμβοι Ρανβιέ. Οι νευρώνες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων τους και ανάλογα με την λειτουργία τους. Έτσι διακρίνονται

σε μονοπολικούς, πολυπολικούς, αισθητικούς, κινητικούς, συνδετικούς. Υπάρχει μια ποικιλότητα στην μορφολογία και την λειτουργία των διαφόρων τύπων νευρώνων ωστόσο όμως σε πολλά είδη η πλειοψηφία των νευρώνων μεταφέρει σήματα από και προς άλλους νευρώνες.

Τα νευρογλοιακά κύτταρα (Allen & Barres 2009)(Azevedo et al. 2009) είναι μη νευρωνικά και ο ρόλος τους είναι να παρέχουν υποστήριξη και θρέψη στους νευρώνες, διατηρώντας έτσι την ομοιόσταση αυτών, να παράγουν μυελίνη και να συμμετέχουν στην διαβίβαση του σήματος. Ακόμη μονώνουν ηλεκτρικά τους νευρώνες, τους προφυλάσσουν από παθογόνα, απομακρύνουν τους νεκρούς νευρώνες και παρέχουν καθοδήγηση στον νευρωνικό άξονα προς τον στόχο του. Η μόνωση των νευρώνων είναι αποτέλεσμα στρωμάτων μυελίνης (η οποία είναι λιπαρή ουσία) και η οποία παράγεται από τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και από τα κύτταρα Schwann στο περιφερικό.

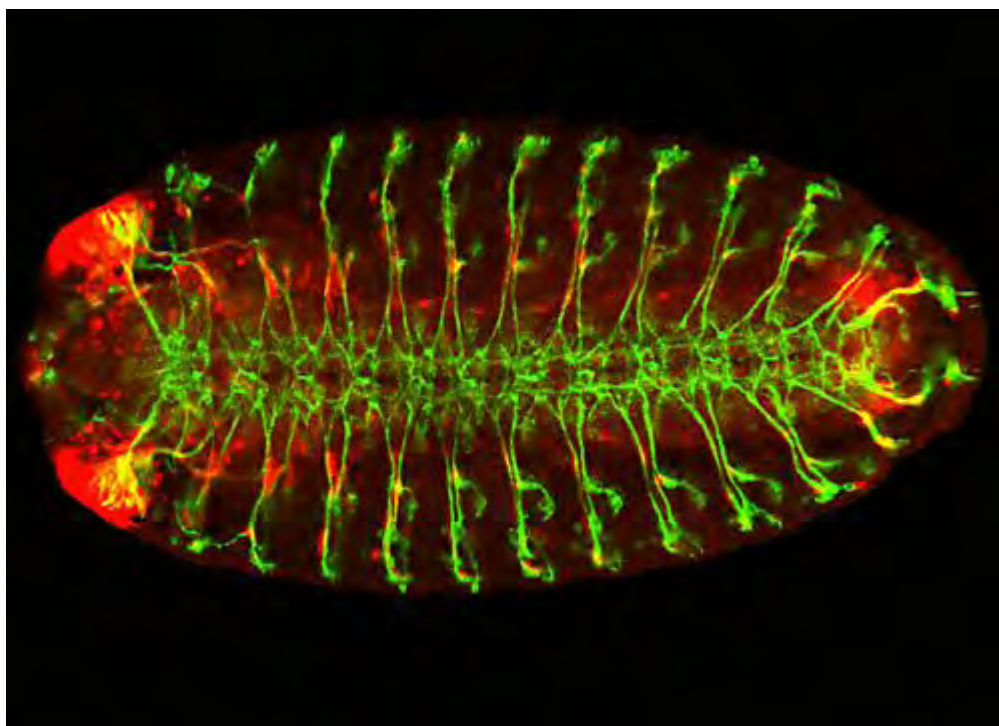


Εικόνα 1.8 Τυπικό νευρικό κύτταρο

Ανάπτυξη

Από τα Ασπόνδυλα το νευρικό έχει μελετηθεί πολύ στα Αρθρόποδα και ειδικότερα στα Έντομα. Μετά την γονιμοποίηση του ένα αυγό εντόμου αρχίζει τις διαιρέσεις του πυρήνα του χωρίς όμως διαίρεση της πλασματικής μεμβράνης. Αυτό που προκύπτει μετά από πολλές διαιρέσεις είναι ένα κυτταρόπλασμα με χιλιάδες πυρήνες. Στη φάση αυτή το έμβρυο ονομάζεται συγκύτιο. Μόλις διαιρεθούν αρκετοί πυρήνες ανάλογα το είδος μεταναστεύουν οι περισσότεροι στην περιφέρεια του αυγού και τότε πραγματοποιείται εγκόλπωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τελικά σχηματισμός κυττάρων. Το έμβρυο σε αυτή τη φάση αποτελείται από μια στοιβία ομοιόμορφων κύτταρων η οποία λέγεται βλαστόδερμα και περικλείει στο εσωτερικό της μια κροκοειδή ουσία. Καθώς προχωρά η εμβρυική ανάπτυξη τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται έως ότου να φτιάξουν τα 3 δέρματα όπως και στα σπονδυλωτά. Έπειτα το έμβρυο περνάει σε μια φάση κατάτμησης ώστε να δημιουργηθούν τα μεταμερή. Στο κάθε μεταμερές τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα (τα οποία προέρχονται από το εξώδερμα όπως και στα σπονδυλωτά) θα δώσουν ένα νευρικό γάγγλιο.

Σε ύστερη φάση της ανάπτυξης ορισμένα από τα γάγγλια θα συνενωθούν και θα δώσουν είτε μεγαλύτερα γάγγλια του νευρικού είτε τον εγκέφαλο του εντόμου (Harzsch 2006)(Stent 1985).



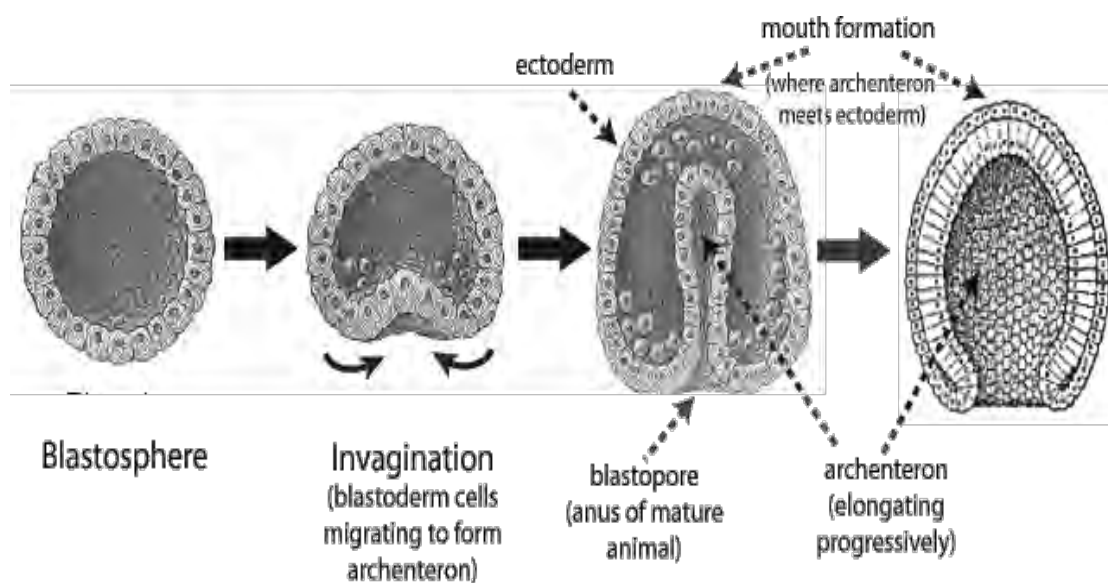
Εικόνα 1.9 Νευρικό Σύστημα εμβρύου *Drosophila*.

Νεότερες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει ένας κοινός παράγοντας ανάπτυξης του νευρικού συστήματος σε όλα τα Αμφίπλευρα. Πρόκειται για μια οικογένεια μορίων τις νευροτροφίνες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και επιβίωση των νευρώνων. Το πρώτο σύστημα που προσδιορίστηκε ήταν το DNT1 στις *Drosophila* και καθορίζει την τύχη των νευρώνων σε αυτή. Ανάλογα συστήματα έχουν ανιχνευθεί και σε άλλα Σπονδυλωτά και Ασπόνδυλα γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός τέτοιου συστήματος στον κοινό πρόγονο (Zhu et al. 2008). Μια ακόμη ομοιότητα μεταξύ σπονδυλωτών και εντόμων είναι η υπερανάπτυξη των νευρώνων στο έμβρυο, καθώς και το γεγονός ότι πάνω από τους μισούς θα πεθάνουν μέχρι την τελική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.(Zhu et al. 2008).

Σύγκριση ανάπτυξης Νευρικού Συστήματος μεταξύ Εντόμων και Σπονδυλωτών

Η εμφάνιση και η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος είναι καλά μελετημένα στα Σπονδυλωτά. Η διαδικασία ξεκινάει από την φάση της γαστριδίωσης του εμβρύου το οποίο μέχρι αυτή τη φάση είναι μια μάζα κυττάρων προερχόμενα από τις αλληπάλληλες μιτωτικές διαιρέσεις του ζυγωτού. Στη φάση της γαστριδίωσης παρατηρείται μια εγκόλπωση της εξωτερικής επιφάνειας του εμβρύου η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη των

3 δερμάτων: εξώδερμα, ενδόδερμα, μεσόδερμα (με σειρά παρατήρησης από την εξωτερική στοιβάδα στην εσωτερική) και τα οποία τελικά θα δώσουν τους διάφορους ιστούς που απαρτίζουν το σώμα. Βασικής σημασίας σε αυτό το στάδιο είναι η εμφάνιση της νωτοχορδής. Σχηματίζεται από το μεσόδερμα και επεκτείνεται από το επιφανειακό σημείο γνωστό ως πρωταρχικό κοίλωμα (κατόπιν το πρωταρχικό κοίλωμα επεκτείνεται και σχηματίζει την αρχέγονη αύλακα). Ως αποτέλεσμα αυτών των πρωταρχικών κυτταρικών κινήσεων δημιουργείται η εμβρυική μεσογραμμή η οποία αποτελεί και τον άξονα συμμετρίας του ζώου. Η νωτοχορδή στη συνέχεια στέλνει επαγόμενα σήματα στην παρακείμενη στοιβάδα κυττάρων του εξωδέρματος ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετατροπής των νευροεξωδερμικών κυττάρων σε πρόδρομα νευρικά. Η διαδικασία αυτή λέγεται νευριδίωση. Τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα κατόπιν διαιρούνται σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (γνωστά ως νευροβλάστες οι οποίοι μπορούν να διαιρεθούν και να δώσουν τα κύτταρα που απαρτίζουν το νευρικό σύστημα) και μη μιτωτικούς νευροβλάστες οι οποίοι διαφοροποιούνται σε νευρώνες. Καθώς αποχωρίζεται ο νευρικός σωλήνας από το επιπολής εξώδερμα, σχηματίζεται η νευρική ακρολοφία. Η εν λόγω ακρολοφία σχηματίζει μια ακανόνιστου σχήματος, αποπλατυσμένη κυτταρική μάζα μεταξύ του νευρικού σωλήνα και του επιπολής εξωδέρματος. Μεταναστεύοντα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας παράγουν τα νωτιαία γάγγλια (γάγγλια των οπίσθιων ριζών), τα αυτόνομα γάγγλια και τα γάγγλια ορισμένων εγκεφαλικών νεύρων. Τα εν λόγω κύτταρα σχηματίζουν επίσης τα έλυτρα των περιφερικών νεύρων, τα μηνιγγικά περιβλήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και ποικίλες άλλες δομές, όπως π.χ. σκελετικά και μυϊκά στοιχεία της κεφαλής και του λαιμού. Μετά την ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα ακολουθούν άλλες αλλαγές στο έμβρυο οι οποίες τελικά παράγουν τις υπόλοιπες δομές του νευρικού συστήματος ανάλογα το είδος (Purves 2004).



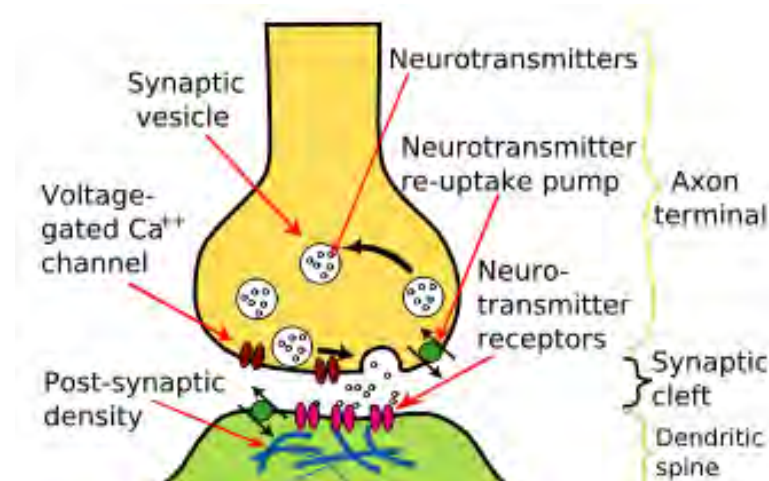
Εικόνα 1.10 Γαστριδίωση εμβρύου.

Λειτουργία

Τα νευρικά κύτταρα επικοινωνούν με άλλα κύτταρα ή μέρη του σώματος με διάφορους τρόπους. Με την χρήση των χημικών ενώσεων γνωστών ως ορμόνες επιτυγχάνεται ένας πιο γενικευμένος τρόπος επικοινωνίας με τον επιθυμητό στόχο. Διαμέσου του νευρικού δικτύου και με την χρήση των νευρικών συνάψεων επιτυγχάνεται ένας περισσότερο στοχευμένος και συνάμα γρηγορότερος τρόπος επικοινωνίας. Σε εξελικτικά ανώτερους οργανισμούς με οργανωμένο νευρικό σύστημα παρατηρείται μια άλλου τύπου βαθμίδα επικοινωνίας. Τα νευρικά κύτταρα έχοντας λάβει κάποιο σήμα από το περιβάλλον του ζώου το προωθούν στον εγκέφαλο, αυτός με την σειρά του επεξεργάζεται κατάλληλα την πληροφορία και προωθεί την κατάλληλη απόκριση για το ερέθισμα που έλαβε, πάλι μέσω του νευρικού δικτύου.

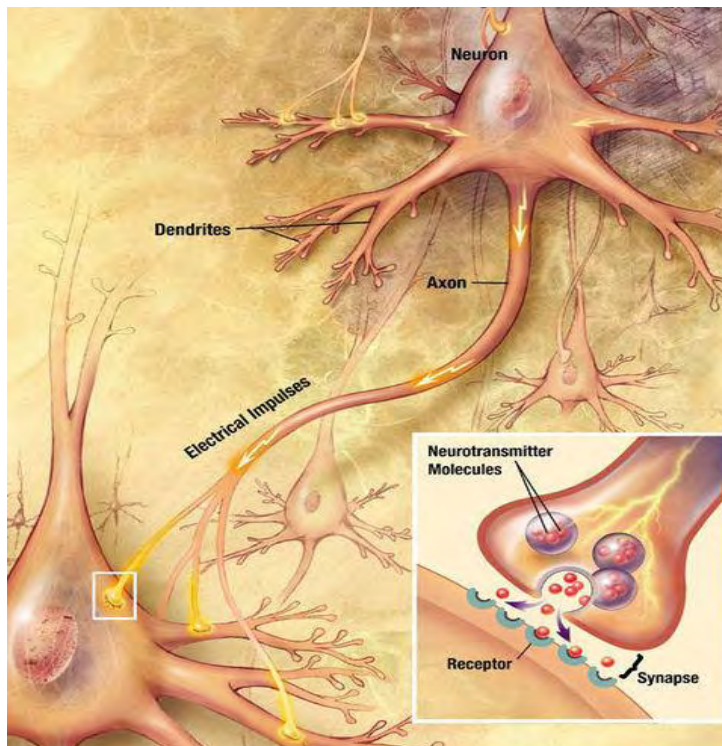
Οι συνάψεις μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρικά είτε χημικά σήματα. Οι ηλεκτρικές συνάψεις προσφέρουν άμεση επαφή στα κύτταρα και οι χημικές αποτελούν την πλειοψηφία του συνόλου, ενώ ταυτόχρονα είναι και οι πιο ποικίλες. Η περιοχή πέριξ μιας χημικής σύναψης μεταξύ δύο κυττάρων περιλαμβάνει μια προσυναπτική περιοχή, που ανήκει στο κύτταρο που στέλνει το σήμα, και την μετασυναπτική η οποία ανήκει στο κύτταρο που λαμβάνει το σήμα. Στην προσυναπτική περιοχή ανιχνεύεται πλήθος κυστιδίων τα οποία φέρουν μια ομάδα μορίων γνωστή ως νευροδιαβιβαστές. Όταν η προσυναπτική περιοχή διεγερθεί ηλεκτρικά τότε ενεργοποιούνται μεμβρανικά μόρια τα οποία απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κυστιδίων στον περιβάλλοντα χώρο της σύναψης. Στη συνέχεια αυτά προσλαμβάνονται από μεμβρανικά μόρια της μετασυναπτικής περιοχής και κατ' αυτόν τον τρόπο μεταβιβάζεται το σήμα από κύτταρο σε κύτταρο. Τα μεμβρανικά μόρια της μετασυναπτικής περιοχής καλούνται υποδοχείς νευροδιαβιβαστών. Αναλόγως του τύπου του υποδοχέα η δράση που επάγεται μπορεί να είναι διεγερτική, κατασταλτική ή ρυθμιστική. Αν και η μεταβίβαση του σήματος διαρκεί απειροελάχιστα (ίσως και λιγότερο από 1 millisecond) εν τούτοις η διάρκεια του σήματος μπορεί να διαρκέσει πολύ περισσότερο (έως και για πάντα στην περίπτωση που δημιουργείται ένα ίχνος μνήμης) (Purves 2004). Το αξίωμα του Dale ορίζει ότι ένας νευρώνας πραγματοποιεί την ίδια χημική αντίδραση σε όλες τις

συνάψεις του ανεξαρτήτως του κυττάρου στόχου (Burn 1934). Η ορθότερη ερμηνεία του αξιώματος



Εικόνα 1.11
Διαγραμματική
απεικόνιση σύναψης
μεταξύ 2 νευρικών
κυττάρων

σύμφωνα με τις σύγχρονες παρατηρήσεις είναι ότι ο νευρώνας απελευθερώνει το ίδιο σύνολο νευροδιαβιβαστών σε όλες του τις συνάψεις.



Εικόνα 1.12 Σχηματική απεικόνιση επικοινωνίας 2 νευρικών κυττάρων (με ηλεκτρικούς παλμούς στην μεγάλη εικόνα και νευροδιαβιβαστές στην μικρότερη)

Νευροδιαβιβαστές

Η ανακάλυψη των νευροδιαβιβαστών έγινε από τις ιστολογικές μελέτες του Ramon y Cajal ο οποίος ανίχνευσε μια εγκοπή 20-24nm μεταξύ των νευρώνων. Η εγκοπή αυτή ονομάστηκε αργότερα συναπτική σχισμή και η παρουσία της αποτέλεσε ένδειξη ότι υπήρχε και άλλος τρόπος μεταφοράς σήματος από κύτταρο σε κύτταρο πέρα από τον ηλεκτρικό που γνώριζαν πριν τον 20 αιώνα. Αυτός ο τρόπος είναι ο χημικός με τις ενδογενώς παραγόμενες ουσίες τους νευροδιαβιβαστές. Ο πρώτος που απέδειξε εμπράκτως την θεωρία αυτή ήταν ο Γερμανός φαρμακοποιός Otto Loewi το 1921.

Σήμερα γνωρίζουμε μια πλειάδα νευροδιαβιβαστών, γεγονός που καθιστά την κατηγοριοποίησή τους δύσκολο έργο. Γνωρίζουμε 2 βασικές ομάδες τους συμβατικούς και τους μη συμβατικούς. Οι συμβατικοί νευροδιαβιβαστές διακρίνονται σε 2 κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος. Τα νευροπεπτίδια τα οποία είναι μεγαλομόρια αποτελούμενα από 3-36 αμινοξέα. Σε αντιδιαστολή το γλουταμινικό, το GABA(γ-αμινοβουτυρικό οξύ), η ισταμίνη, η ακετυλοχολίνη και η σεροτονίνη όντας πολύ μικρότερες ουσίες από τα νευροπεπτίδια καλούνται

μικρομοριακοί νευροδιαβιβαστές. Οι βιογενείς αμίνες (ντοπαμίνη, νορεπινεφρίνη, επινεφρίνη, σεροτονίνη και ιστιδίνη) αποτελούν ξέχωρη υποκατηγορία μικρομοριακών νευροδιαβιβαστών λόγω παρόμοιων χημικών ιδιοτήτων και μετασυναπτικών δράσεων (Purves 2004). Η άλλη βασική ομάδα, οι μη συμβατικοί, αποτελούνται από ασυνήθιστα μόρια η έκκριση των οποίων ρυθμίζεται από ιόντα ασβεστίου και τα οποία δεν αποθηκεύονται σε κυστίδια ούτε είναι απαραίτητο να εκκρίνονται από προσυναπτικό κύτταρο. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως ανάστροφη σηματοδότηση από τα μετασυναπτικά κύτταρα προς τα προσυναπτικά. Τέτοια μόρια είναι τα ενδοκανναβινοειδή και το μονοξειδίο του αζώτου (NO) (Purves 2004)(Kahle 2003).

Τα κύρια νευροδιαβιβαστικά συστήματα και οι επιδράσεις τους είναι τα εξής:

Σύστημα	Επίδραση
Νοραδρεναλίνης	Διέγερση/ Σύστημα ανταμοιβής
Ντοπαμίνης	Κινητικό σύστημα/ Σύστημα ανταμοιβής/Γνωστική λειτουργία/Ενδοκρινικό/Ναυτία
Σεροτονίνης	Αύξηση (εσωστρέφεια)/ Διάθεση/Κορεσμό/Θερμοκρασία του σώματος/Υπνο/Μειώνει την αλγαισθησία (αντίληψη του πόνου)
Χοληνεργικό	Μάθηση/Μνήμη μικρής διάρκειας/Διέγερση/Σύστημα επιβράβευσης

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στα θηλαστικά ο κύριος νευροδιαβιβαστής είναι το γλουταμινικό ενώ στα έντομα η ακετυλοχολίνη (Neil S Millar & Denholm 2007).

Υποδοχέας της Ακετυλοχολίνης

Ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και ο ρόλος της είναι να ανταποκρίνεται σε συζεύξεις με το εκκρινόμενο μόριο της ακετυλοχολίνης. Όμοια με τους υπόλοιπους υποδοχείς νευροδιαβιβαστών κατηγοριοποιείται σύμφωνα με την «φαρμακολογία» του. Αν και όλοι οι υποδοχείς ακετυλοχολίνης είναι ευαίσθητοι στην ακετυλοχολίνη δεν είναι το ίδιο ευαίσθητοι σε άλλα μόρια. Έχουν βρεθεί 2 μόρια που κατηγοριοποιούν περαιτέρω τους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης: η νικοτίνη και η μουσκαρίνη. Οι υποδοχείς αντίστοιχα ονομάζονται νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης και μουσκαρινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης. Αμφότεροι ανήκουν στο ευρύτερο σύστημα του Χοληνεργικού.

Νικοτινικός Υποδοχέας της Ακετυλοχολίνης

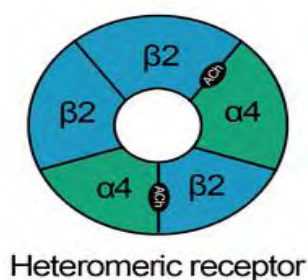
Οι νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης, ή nAChRs, είναι χολινεργικοί υποδοχείς που αποτελούν διαύλους σύζευξης ιόντων στις πλασματικές μεμβράνες ορισμένων νευρώνων και στη μετασυναπτική πλευρά της νευρομυϊκής σύναψης. Όπως όλοι οι ιονοτροπικοί υποδοχείς, οι nAChRs συνδέονται άμεσα με τα κανάλια ιόντων και δεν χρησιμοποιούν δευτερεύοντες αγγελιοφόρους (όπως κάνουν μεταβοτροπικοί υποδοχείς) (Purves 2004).

Έχουν μάζα περίπου 290 kDa και αποτελούνται από 5 υπομονάδες τοποθετημένες ασύμμετρα γύρω από ένα κεντρικό πόρο. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές και τα αμινοτελικά και καρβοξυλικά της άκρα εντοπίζονται εξωκυτάρια (Purves 2004).

Μόρια που επάγουν την δράση του υποδοχέα χαρακτηρίζονται ως αγωνιστές του υποδοχέα. Παραδείγματα τέτοιων μορίων αποτελούν τα εξής: Νικοτίνη, Ακετυλοχολίνη, Χολίνη κα. Αντίθετα μόρια των οποίων η δράση καταστέλλει την λειτουργία του υποδοχέα χαρακτηρίζονται ως ανταγωνιστές αυτού. Παραδείγματα τέτοιων μορίων είναι τα εξής: Μεκαμυλαμίνη, 18-μεθοξυκοροναριδίνη, Τουμοκουρανίνη κα. Η πρόσδεση ενός αγωνιστή στον υποδοχέα ανοίγει το κανάλι αυτού και επιτρέπει την διέλευση φορτισμένων ιόντων και συγκεκριμένα την εξαγωγή Καλίου και την εισαγωγή Νατρίου (Purves 2004)(Webster 2001)(M Tomizawa & J E Casida 2001). Το κανάλι δεν είναι επιλεκτικό ως προς τα ιόντα που μετακινούνται οπότε είναι εφικτή η διέλευση και άλλων ιόντων όπως το κατιόν ασβεστίου Ca^{+2} το οποίο μπορεί να επηρεάσει την απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών (Itier & Bertrand 2001). Η μετακίνηση κατιόντων προκαλεί την εκπόλωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και την ενεργοποίηση ιοντικών διόδων δυναμικού, ενώ η εισαγωγή ασβεστίου επιδρά στις ενδοκυτταρικές λειτουργίες ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων, επάγοντας μεταβολικά μονοπάτια ή απελευθερώνοντας άλλους νευροδιαβιβαστές.

Στα σπονδυλωτά οι νικοτινικοί υποδοχείς, σε γενικές γραμμές, κατατάσσονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τους πρωτεύοντες τύπους της έκφρασης τους: μυϊκού τύπου νικοτινικούς υποδοχείς και νευρωνικού τύπου νικοτινικούς υποδοχείς. Στους μυϊκού-τύπου υποδοχείς, που βρέθηκαν στη νευρομυϊκή σύναψη, οι υποδοχείς είτε βρίσκονται σε εμβρυακή μορφή, που αποτελείται από $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , και γ υπομονάδες σε αναλογία 2:1:1:1, ή την ενήλικη μορφή που αποτελείται από $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ και υπομονάδες σε αναλογία 2:1:1:1. Οι νευρωνικοί υπότυποι αποτελούνται από ομομερείς ή ετερομερείς συνδυασμούς 12 διαφορετικών υπομονάδων $\alpha 2$ έως $\alpha 10$ και $\beta 2$ έως $\beta 4$. Σημαντικό είναι ότι και στους 2 τύπους υποδοχέων οι υπομονάδες είναι όμοιες μεταξύ τους, ειδικά στις υδρόφοβες περιοχές (Purves 2004)(Lukas et al. 1999)(Karlin 2002). Η υπομονάδα $\alpha 8$ ανιχνεύεται μόνο σε πτηνά και η

υπομονάδα $\alpha 9$ σε έχει ανιχνευθεί μόνο σε αρουραίους μέχρι στιγμής (M Tomizawa & J E Casida 2001). Στα σπονδυλωτά παρατηρούνται 3 κυρίως μηχανισμοί δράσης: ο $\alpha 4\beta 2$, ο $\alpha 7$ και ο μυϊκός τύπος (N S Millar 2003) (Motohiro Tomizawa & John E Casida 2003) (M Tomizawa & J E Casida 2001). Ο $\alpha 4\beta 2$ μηχανισμός ονομάζεται έτσι από τον ετερομερή υποδοχέα που φέρει 3 υπομονάδες $\beta 2$ και 2 υπομονάδες $\alpha 4$, έχοντας παράλληλα και 2 θέσεις πρόσδεσης ακετυλοχολίνης. Ο υποδοχέας του $\alpha 7$ μηχανισμού αποτελείται από 5 υπομονάδες $\alpha 7$ και έχει 5 θέσεις πρόσδεσης ακετυλοχολίνης. Ο μυϊκός τύπος διαφέρει ανάμεσα σε ενήλικες και βρέφη καθώς ο υποδοχέας των ενηλίκων αποτελείται από 2 υπομονάδες $\alpha 1,1 \beta 1,1 \delta$ και 1 ενώ στα βρέφη απουσιάζει η δ και στην θέση της υπάρχει η γ . Αμφότεροι διαθέτουν 2 θέσεις πρόσδεσης ακετυλοχολίνης (Karlin 2002). Έρευνες σε ποντίκια έδειξαν ότι η υπομονάδα $\alpha 7$ είναι απαραίτητη για την αναστολή έκκρισης του μακροφαγικού TNF, αναστέλλοντας έτσι την σύνθεση κυτοκίνης μέσω του χοληνεργικού αντιφλεγμονώδους μονοπατιού (Hong Wang et al. 2003).



Εικόνα 1.13 Νικοτινικοί Υποδοχείς της Ακετυλοχολίνης στα Σπονδυλωτά



Στα Ασπόνδυλα παρατηρούνται κάποιες διαφορές συγκριτικά με τους νικοτινικούς υποδοχείς των σπονδυλωτών. Όλοι οι γνωστοί υποδοχείς είναι επιλεκτικοί για κατιόντα εκτός από έναν επιλεκτικό για ανιόντα που εντοπίζεται στα Ασπόνδυλα (Karlin 2002). Στα Έντομα παρατηρείται μια υπερέκφραση των nAChRs σε όλο το νευρικό σύστημα (Lansdell & Neil S Millar 2004). Στα Έντομα έχουν αναγνωρισθεί διάφορες υπομονάδες πολλές από αυτές ομόλογες των Σπονδυλωτών όμως η ακριβής σύσταση των υποδοχέων δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ακόμα (M Tomizawa & J E Casida 2001) (Gundelfinger 1992). Ωστόσο έρευνες έχουν δείξει ότι το γονίδιο *ara* που κωδικοποιεί για τον νικοτινικό υποδοχέα στην *Drosophila* αν και περιέχει λιγότερα ιντρόνια από τον

μυϊκό νικοτινικό υποδοχέα των σπονδυλωτών, οι θέσεις των ιντρονίων πλην ενός είναι συντηρημένες (Sawruk et al. 1988), ενώ άλλες έρευνες έδειξαν την ετερογένεια που παρουσιάζει ο νικοτινικός υποδοχέας στην *Drosophila* (Sawruk et al. 1990). Επίσης στην *Drosophila* ο νικοτινικός υποδοχέας Da7 είναι απαραίτητος για την εκδήλωση συμπεριφοράς απόδρασης (Fayyazuddin et al. 2006).

Εντομοκτόνα

Τα Αρθρόποδα είναι μια από τις παλαιότερες ομάδες του ζωικού βασιλείου και εκείνη που έχει αναπτύξει τις πιο περίπλοκες σχέσεις με τις υπόλοιπες ομάδες ίσως όχι μόνο του ζωικού αλλά και γενικότερα. Η υποκατηγορία των Εντόμων εμφανίστηκε λίγο αργότερα αλλά είναι εκείνα που έχουν καταφέρει να αποικίσουν κάθε περιβάλλον της Γης. Αναπόφευκτα λοιπόν συντροφεύουν τον άνθρωπο από τη στιγμή που αποσχίστηκε από τον τελευταίο κοινό του πρόγονο με τον κοντινότερο συγγενή του. Για τον άνθρωπο τα έντομα αποτέλεσαν εξαρχής πηγή τροφής άμεσα (τα ενήλικα άτομα ή οι προνύμφες τους) ή έμμεσα (με την γονιμοποίηση των φυτών) αλλά και πηγή προβλημάτων με την ικανότητά τους να παρασιτούν σε αυτόν αρχικά ή στις καλλιέργειες που δημιούργησε και στα ζώα που εξέτρεφε αργότερα όταν ανέπτυξε τις πρώτες κοινωνίες. Ακόμα τα έντομα είναι συχνά φορείς ασθενειών ή παρασίτων. Συνεπώς η δημιουργία εντομοκτόνων ήταν επιτακτική ανάγκη για την καλύτερη ζωή του ανθρώπου. Αρχαία κείμενα αναφέρουν την χρήση θείου ή διαφόρων σκευασμάτων ικανών να απωθούν ή να εξοντώνουν τα επιβλαβή έντομα. Με την πάροδο των αιώνων και την καλύτερη κατανόηση του φυσικού κόσμου αναπτύχθηκαν καλύτερες μέθοδοι (όπως της αποξήρανσης ελών) και αναπτύχθηκαν δυνατότερα εντομοκτόνα είτε φυσικά είτε τεχνητά.

Τα σύγχρονα εντομοκτόνα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με :

- Το στάδιο του εντόμου που προσβάλλει (αυγό, προνύμφη, τελικό έντομο)
- Τον τρόπο εισόδου στο έντομο:
 - Αέρια τα οποία εισέρχονται μέσω του αναπνευστικού
 - Επαφής διαμέσου της επιδερμίδας
 - Στομάχου όταν εισέρχονται διάμεσο του πεπτικού
- Χημική σύσταση:
 - Φυσικά όταν αυτά προέρχονται από άλλα φυτά όπως η νικοτίνη του καπνού και η πυρεθρίνη των χρυσάνθεμων
 - Ανόργανα όταν προέρχονται από ανόργανες ουσίες (πχ μέταλλα)
 - Οργανικά όταν παρασκευάζονται με την χρήση αντιδράσεων της οργανικής χημείας
- Την προέλευσή τους:
 - Όλα τα ανωτέρω

- Ουσίες που παράγονται από άλλους οργανισμούς και το γονίδιο που τις κωδικοποιεί μεταφέρεται στο γονιδίωμα του φυτού με γενετική τροποποίηση
- Τρόπος δράσης: ο τρόπος δηλαδή που το εντομοκτόνο σκοτώνει ή αδρανοποιεί. Η δράση του μπορεί να είναι άμεση με την καταστροφή κάποιου ιστού ή έμμεση με την παρεμπόδιση κάποιου μεταβολικού μονοπατιού.

Η χρήση εντομοκτόνων μπορεί να επιφέρει εκτός από τα επιθυμητά αποτελέσματα και κάποια ανεπιθύμητα. Τέτοια ανεπιθύμητα αποτελέσματα αφορούν την επίδραση του εντομοκτόνου σε είδη μη στόχους και τα οποία δεν είναι απαραίτητα έντομα. Η επίδραση αυτή μπορεί να γίνει άμεσα στον προσβαλλόμενο οργανισμό με την θανάτωσή του ή έμμεσα. Η πλειοψηφία των εντομοκτόνων είναι ουσίες λιπόφιλες οι οποίες τείνουν να συσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό των ζώων. Με το φαινόμενο της συσσώρευσης κάθε ζώο ανώτερο στην τροφική αλυσίδα συσσωρεύει αυτές τις ουσίες σε εκθετικά μεγαλύτερο βαθμό από την προηγούμενη βαθμίδα. Αυτό έχει δυνητικά ολέθρια αποτελέσματα. Μια τέτοια περίπτωση αφορά το εντομοκτόνο οργανοχλωρίνης DDT το οποίο όπως αποδείχθηκε ενώ δεν σκότωνε τα ενήλικα πτηνά που το συσσωρεύουν, όμως τα αυγά τους εμφάνιζαν λεπτότερο στρώμα ασβεστίου κατά συνέπεια το έμβρυο είχε μειωμένες πιθανότητες επιτυχούς εκκόλαψης. Η αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων έχει επίσης ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών προς αυτό. Δημιουργείται έτσι ένας φαύλος κύκλος ανάπτυξης ολοένα και ισχυρότερων εντομοκτόνων τα οποία είναι καταδικασμένα σε μια περιορισμένη διάρκεια χρήσης προτού ο πληθυσμός του εντόμου που στοχεύεται γίνει ανθεκτικός σε αυτά. Μια ακόμα απρόσμενη συνέπεια των εντομοκτόνων ήταν η μειωμένη σοδιά ως αποτέλεσμα της εξαφάνισης εντόμων που χρησιμεύουν ως μεταφορείς της γύρης στα φυτά. Εξ αυτών των εντόμων υπάρχει και ένα οικονομικής σημασίας για τον άνθρωπο η μέλισσα. Ο πληθυσμός της κινδυνεύει διπλά από την χρήση εντομοκτόνων καθώς όχι μόνο πεθαίνουν άτομα, αλλά και ο ίδιος ο πληθυσμός κινδυνεύει από κατάρρευση λόγω λανθασμένης συμπεριφοράς από άτομα που έχουν λάβει μη θανατηφόρες δόσεις (Vanengelsdorp et al. 2009)(Benjamin & Scarborough 2012). Επίσης μπορεί να υπάρξει διασπορά του εντομοκτόνου στο περιβάλλον και να καταλήξει σε μη επιθυμητό χώρο όπως ένα παρακείμενο δάσος έχοντας παρόμοια αποτελέσματα με τα προαναφερθέντα σε εκείνο το οικοσύστημα.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω ένα ιδανικό εντομοκτόνο φέρει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Αυξημένη και στοχευμένη τοξικότητα εναντίον επιβλαβών εντόμων και όχι ωφέλιμων.
- Χαμηλή τοξικότητα σε φυτά και ζώα.
- Φθηνή και ασφαλή παρασκευή.

- Εύκολη αποθήκευση.
- Εύκολη ανιχνευσιμότητα στο περιβάλλον.

Οι σύγχρονες ερευνητικές τάσεις στην καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων εστιάζονται περισσότερο στον έλεγχο του πληθυσμού παρά στην ολική εξόντωσή του. Μερικά παραδείγματα τέτοιων προσπαθειών αφορούν τον βιολογικό έλεγχο του πληθυσμού με χρήση κάποιου φυσικού θηρευτή του ή κάποιου φυσικού παρασιτιστή του. Το πρόβλημα με τέτοιου είδους έλεγχο έγκειται όταν ο φυσικός θηρευτής ή παρασιτιστής επιτίθεται και σε άλλα είδη θέτοντας σε κίνδυνο την ισορροπία του οικοσυστήματος όπως στην περίπτωση του σαρκοβόρου σαλιγκαριού *Euglandina rosea* (B. Clarke & Work 1988). Μια διαφορετική προσέγγιση στο ζήτημα προσφέρει η τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique-SIT). Ο στόχος σε αυτή την τεχνική είναι η παραγωγή στέρων αρσενικών ατόμων ώστε αυτά να αφεθούν στο περιβάλλον. Τα άτομα αυτά παράγονται με γενετική τροποποίηση συνήθως καθώς έτσι μπορούν να καθοριστούν οι επιθυμητοί φυλοειδικοί ή μορφογενετικοί παράγοντες. Παλαιότερα τα άτομα ακτινοβολούσαν για να στειρωθούν ωστόσο η τεχνική αυτή έχει εγκαταλειφθεί λόγω των ευκολιών αλλά και των καλύτερων αποτελεσμάτων που παρέχει η γενετική τροποποίηση. Τα αρσενικά αυτά με την σειρά τους θα διασταυρωθούν με τα θηλυκά του αγρίου πληθυσμού και τα θηλυκά θα γεννήσουν αυγά. Στο σημείο αυτό υπάρχουν 2 επιλογές. Είτε τα αρσενικά είναι ήδη στείρα οπότε τα αυγά δεν θα εκκολαφθούν, είτε τα αρσενικά φέρουν επιλεγμένα γονίδια στειρότητας ή θανατηφόρα τα οποία μεταβιβάζονται στην επόμενη γενεά. Η δεύτερη επιλογή αναπτύχθηκε διότι τα θηλυκά αγρίου τύπου συχνά αντιλαμβάνονται αν η διασταύρωση ήταν επιτυχημένη και άρα αν τα αυγά θα είναι γόνιμα ή όχι. Αυτό είχε σαν συνέπεια να επαναδιασταυρώνονται με αγρίου τύπου αρσενικά μειώνοντας την επιτυχία της τεχνικής (Phuc et al. 2007). Επιτυχημένη προσπάθεια της τεχνικής SIT αποτελεί η περίπτωση της μύγας *Tsetse* στην Αφρική.

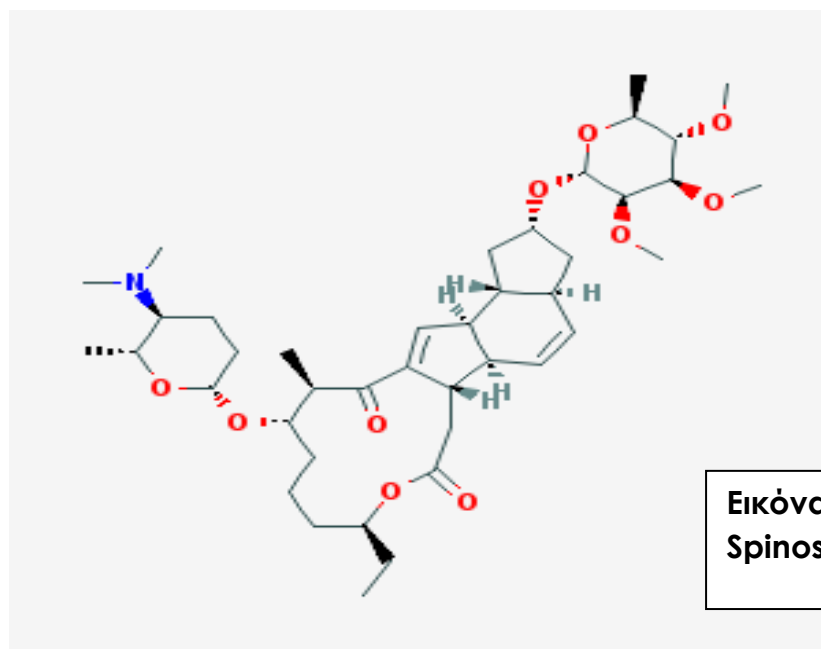
Νεονικοτινοειδή

Τα νεονικοτινοειδή ή χλωρονικοτινύλια είναι μια νέα τάξη συνθετικών εντομοκτόνων. Όπως τα πυρεθροειδή ομοιάζουν με το φυσικό προϊόν πύρεθρο, έτσι και τα νεονικοτινοειδή ομοιάζουν με το φυσικό προϊόν νικοτίνη. Η τάξη αντιπροσωπεύεται κυρίως από το Imidacloprid το οποίο είναι εντομοκτόνο συστηματικό και επαφής με κύρια δραστηριότητα σε διατρυπόντα-απομύζοντα έντομα όπως οι αφίδες. Ο μηχανισμός δράσης διαφέρει από τα κλασσικά εντομοκτόνα παρέχοντας την δυνατότητα ελέγχου εντόμων ανθεκτικών σε συμβατικά εντομοκτόνα. Έχουν χαμηλή τοξικότητα σε θηλαστικά και γενικά καλά περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά(Pedigo).

Spinosad

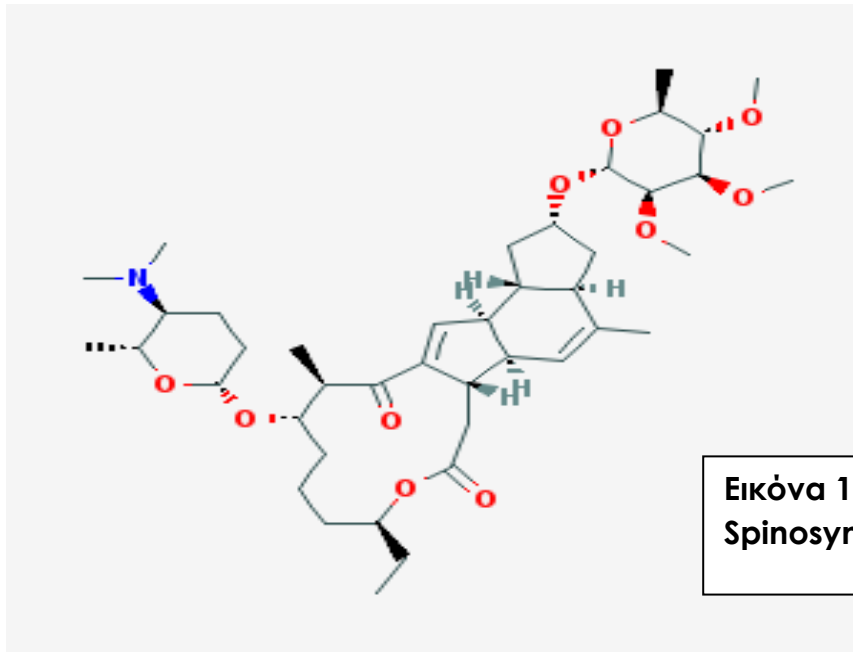
Το Spinosad ανήκει στην νέα γενιά εντομοκτόνων τα νεονικοτινοειδή. Αποτελείται από 2 μόρια το spinosynA και το spinosynD. Ανακαλύφθηκε τυχαία από έναν ερευνητή που παραθέρριζε στα νησιά της Καραϊβικής, το 1982, όταν εκείνος συνέλεξε δείγμα εδάφους από ένα εγκαταλελειμμένο αποστακτήριο ρουμιού. Τρία χρόνια μετά την αποστολή των δειγμάτων εδάφους στο εργαστήριο ανακαλύφθηκαν εντομοκτόνες ουσίες στα δείγματα από τις καλλιέργειες. Στα δείγματα αυτά βρέθηκε το ακτινοβακτήριο *Saccharopolyspora spinosa* ο οποίος δεν έχει βρεθεί από τότε αλλού στην φύση και παράγει την δραστική ουσία του εντομοκτόνου. Ένα χρόνο έπειτα απομονώθηκαν οι δραστικότεροι μεταβολίτες που παράγαγε το βακτήριο. Χρειάστηκαν ακόμα 5 χρόνια ερευνών παγκοσμίως για αναπτυχθεί η τελική φόρμουλα του εντομοκτόνου η οποία περιείχε τους μεταβολίτες spinosynA και spinosynD. Το όνομα Spinosad προκύπτει από τον συνδυασμό των ονομάτων του βακτηρίου και των ενεργών μεταβολιτών. Το 1995 η αμερικανική υπηρεσία περιβαλλοντολογικής προστασίας EPA το κατηγοριοποίησε ως προϊόν μειωμένου κινδύνου και έδωσε άδεια για εφαρμογές του προϊόντος βασιζόμενη στα πολύ καλά τοξικολογικά και περιβαλλοντολογικά προφίλ που αυτό παρουσίασε (Dow Agrosciences).

Ο μεταβολίτης spinosynA σύμφωνα με την βάση δεδομένων Pubchem έχει την μοριακή σύσταση $C_{41}H_{65}NO_{10}$ και μοριακό βάρος 731,9555. Η δισδιάστατη διάταξη των μορίων του είναι αυτή:



Εικόνα 1.14 Μόριο SpinosynA

Ομοίως ο μεταβολίτης spinosynD έχει την μοριακή σύσταση $C_{42}H_{67}NO_{10}$ μοριακό βάρος 745,98298 και η δισδιάστατη διάταξη των μορίων του είναι αυτή:



Εικόνα 1.15 Μόριο SpinosynD

Υποδοχείς νευροδιαβιβαστών ως στόχοι εντομοκτόνων

Είναι σαφής πλέον η σημασία των νευροδιαβιβαστών και των υποδοχέων τους για την λειτουργία του νευρικού συστήματος και την επικοινωνία του με το μυϊκό. Επομένως δεν πρέπει να προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί συστήματα που στοχεύουν αυτή την επικοινωνία. Τέτοια συστήματα δεν πρωτοανέπτυξε ο άνθρωπος αλλά η ίδια η φύση με την μορφή διάφορων νευροτοξινών και δηλητηρίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν από τους διάφορους οργανισμούς τόσο για θηρευτικούς σκοπούς όσο και για αμυντικούς. Ενδιαφέρον δε προκαλεί το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί παρόμοια συστήματα σε όλα σχεδόν τα βασίλεια της Ζωής. Ο άνθρωπος αντιλήφθηκε από πολύ νωρίς την ιδιότητα αυτή και την χρησιμοποίησε και ο ίδιος. Με την πάροδο των χρόνων και την ανάπτυξη της επιστήμης κατόρθωσε να κατανοήσει τους μοριακούς μηχανισμούς και τα βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή. Ένας τομέας στη σύγχρονη κοινωνία που χρησιμοποιείται αυτή η γνώση είναι στην παρασκευή και την βελτίωση εντομοκτόνων ουσιών.

Τα νεονικοτινοειδή ανήκουν στην νέα γενιά εντομοκτόνων. Δρουν ως ανταγωνιστές στον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, επηρεάζοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων προκαλώντας παράλυση και τελικά θάνατο. Όπως προαναφέρθηκε ο κύριος νευροδιαβιβαστής στα Έντομα είναι η ακετυλοχολίνη (Neil S Millar & Denholm 2007) και είναι ο λόγος που τα νεονικοτινοειδή είναι τόσο επιτυχημένα εναντίον τους. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι αν και τα σπονδυλωτά φέρουν νικοτινικούς υποδοχείς στο νευρικό τους σύστημα εντούτοις η τοξικότητα των νεονικοτινικών εμφανίζεται μόνο στα έντομα

(Neil S Millar & Denholm 2007), (D. B. Sattelle et al. 2005). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας κατατάσσονται στις ουσίες τοξικότητας κατηγορίας II ή III. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε χρήση νεονικοτινοειδών με καρβαμιδικά, οργανοφωσφορικά ή σύνθετα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Corbel et al. 2004)(Prabhaker et al. 2007). Επίσης εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα στα έντομα ανθεκτικά σε άλλου τύπου εντομοκτόνα παρά σε ευαίσθητους σε αυτά πληθυσμούς (Prabhaker et al. 2007) (Corbel et al. 2004). Είναι αποτελεσματικά τόσο εναντίον μυζητικών όσο και μασητικών εντόμων βλαβερών για τις καλλιέργειες (Bayer Cropscience) αλλά και παρασίτων (D. B. Sattelle et al. 2005). Ευρέως διαδεδομένα νεονικοτινοειδή είναι το Imidacloprid και το Thiamethoxam, ενώ το Spinosad είναι ανερχόμενο στην κατηγορία.

Σημασία πρέπει να δοθεί στις ανεπιθύμητες παρενέργειες που εμφανίζονται σε όλα τα εντομοκτόνα και άρα δυνητικά και στα νεονικοτινοειδή. Μια από τις κύριες είναι, όπως και με όλες τις εντομοκτόνες ουσίες, η ανάπτυξη αντίστασης. Για τον λόγο αυτό μελετάται ο μηχανισμός δράσης τους αλλά και της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αυτά. Το Spinosad ως νέο προϊόν βρίσκεται στην αιχμή των ερευνητικών προσπαθειών. Η υπομονάδα που έχει αναγνωριστεί ότι έχει σίγουρα βασικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο Spinosad είναι η Da6 της *Drosophila* (Watson et al. 2010)(Perry et al. 2007) και η Mda6 της *Musca domestica*(Gao et al. 2007).

Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί μια υπομονάδα του υποδοχέα ακετυλοχολίνης του δάκου, ώστε να διασαφηνιστεί η λειτουργία του υποδοχέα και να διαλευκανθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης αυτού με εντομοκτόνα. Ο δάκος ανήκει στα Έντομα στην τάξη των Δίπτερων. Είναι έντομο σχετικά μικρό σε μέγεθος σώματος περίπου 4-5 mm. Ο κύκλος ζωής του περιλαμβάνει τα 3 διακριτά στάδια που απαντώνται στα Έντομα: προνύμφη, αυγό, νύμφη, ενήλικο άτομο και διαρκεί περίπου 30-40 μέρες συνολικά. Κατά την χειμερινή περίοδο όπου οι νύμφες μπαίνουν σε χειμερία νάρκη η διάρκεια του κύκλου επιμηκύνεται σημαντικά. 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 μούχλας. Ποσοτικές διότι οι καρποί δύναται να πέσουν πρόωρα από το δέντρο, καθώς και μειωμένη απόδοση συγκομιδής. Αυτό δεν παρατηρείται τόσο σε ελιές που προορίζονται για ελαιόλαδο όσο σε αυτές που προορίζονται για κατανάλωση.

2.Υλικά-Μέθοδοι

Υλικά

- Σωληνάρια πλαστικά κωνικά
- Σωληνάρια κωνικά τύπου Eppendorf με πώμα
- Σωληνάρια PCR
- Κυψελίδες
- Τρυβλία Petri
- Στατώ σωληναρίων
- Πιπέτες
- Πλαστικά ρύγχη πιπιετών
- Κωνική φιάλη
- Πυρίμαχα δοχεία
- Μαρκαδόροι
- Δοχεία απορριμμάτων
- Εργαστηριακός πάγκος
- Χαρτί
- Παραφίλμ
- Ξυράφι
- Νυστέρι
- Ψαλίδι
- Παγοκύστες
- Χαρτί τύπου Watman
- Μεμβράνη μεταφοράς κατά Southern
- Απαγωγός
- Αυτόκαυστο
- Λυχνία τύπου Bunsen
- Συσκευή φυγοκέντρωσης
- Συσκευή φυγοκέντρωσης ψυχόμενη
- Επωαστήρας
- Θερμαινόμενος θάλαμος
- Υδατόλουτρο θερμαινόμενο
- Ψυγείο
- Καταψύκτης
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης
- Θερμαινόμενος θάλαμος με ικανότητα ανάδευσης
- Αναδευτήρας σωληναρίων
- Αναδευτήρας μεγάλων δοχείων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης γέλης αγαρόζης
- Συσκευή παραγωγής ακτινών UV
- Συσκευή φωτογράφισης γέλης αγαρόζης υπό φωτισμό ακτινών UV
- Θερμοκυκλοποιητής αντιδράσεων PCR
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής
- Κύτταρα E.coli DH5α

- Πληθυσμός *Bactrocera oleae* ευαίσθητος στο εντομοκτόνο Spinosad
- Πληθυσμός *Bactrocera oleae* ανθεκτικός στο εντομοκτόνο Spinosad
- Εντομοκτόνο Spinosad
- Νερό ενέσιμο ελεύθερο πυρετογόνων
- Καθαρή αλκοόλη
- Ισοπροπανόλη
- Ντισολόλη
- Διάλυμα SDS 10%
- Διάλυμα EDTA pH 8.0 0,5M
- Διάλυμα Mg₂SO₄ 10mM
- Διάλυμα Tris pH 9,5 1M
- Διάλυμα Tris pH 8,0 1M
- Διάλυμα Tris pH 7,5 1M
- Διάλυμα NaCl 5,0M
- Διάλυμα MgCl₂ 2M
- Διάλυμα CH₃COONa pH7,0 3M
- Διάλυμα NaOH 2M
- Χλωριούχο νάτριο
- Βορικό οξύ σε σκόνη
- Tris Base σε σκόνη
- Αγαρόζη
- Χρωστική (Μείγμα: Κυανό της Ξυλόλης και Μπλε της Βρωμοφαινόλης)
- Εκκινητές αντιδράσεων PCR
- Πολυμεράσες
 - goscript reverse transcriptase της εταιρίας Promega
 - BioTaq της εταιρίας Bioline
 - onetaq Hotstart της εταιρίας New England Biolabs
 - Maximo Taq της εταιρίας GeneOn
 - LongAmp Taq της εταιρίας New England Biolabs
- Ένζυμα πέψης
 - PvuII της εταιρίας Fermentas
 - NotI της εταιρίας TAKARA
 - XhoI της εταιρίας TAKARA
- Αντιδραστήριο TRIZOL
- KITS:
 - Gel Clean Up System της εταιρίας PROMEGA
 - Absolutely RNA της εταιρίας Stratagene
- Εκκινητές:

Όνομα	5'-3' Αλληλουχία	Tm (°C)
a7F	ATAAGGTTCTGGGCAGC	52
a7R	ATGGAGGCGATCAGTACG	56
a1F	TCTTCTCGCCGGAATCGC	58
a1R	ATGGAGGCCATCAGTACG	56

Da6 6F	GAAGATGGAGGGGATCTTCC	61
Da6 10R	TCGTCGATGTCGAGGACATTG	64
Da6 12R	CGACGTATCCGTAGCTTAATG	62
Da6 9F	CGGTGGTGCTGACAGTAGTGG	65
Da6 F1	CCCGGTCGCAAGATTACACGC	68
Da6 6R	ATGAAATCGGAAAGATCCCCTCC	63
Boa6 ex5 GSP ₂	ATACGTGCCATCGAATCC	54
Boa1 ex7 GSP ₂	TCTTCTCGCCGAATCGC	54
Boa6 ex5	TTGAAGATACCAGCGGGC	56
Boa6 ex5 GSP ₂	ATACGTGCCATCGAATCCC	58
Boa6 R1	AACGGATTTAATCCAAGG	50
Boa6 R2	ATCGATATCCAGCACATT	50
Boa6 F1	ATGAATCGGAATATGGAG	50
Boa6 F2	CCCGTCGCTGCTTGTCTGTGT	66
Bda6 F	GCTCACTCGGCTCCAATGTA	72
Bda6 R	TTATGCTPAAACCTCGTATGCAATTAG	76
F0	GTCGCTGTCCGTGTTTGTCC	64
R0	CCAATCGCCGATCAATCC	58

Διαλύματα

TBE 5x: 54g Tris Base, 27,5g boric acid, 20ml EDTA 0,5M (ph 8.0). Τοποθετούμε τα άνωθεν σε μεγάλο και πυρίμαχο δοχείο και συμπληρώνουμε με 800ml H₂O. Υποβοηθούμε με θέρμανση και ανάδευση με την βοήθεια περιστρεφόμενου μαγνήτη.

Διάλυμα χρωστικής 6X: 0,25% Μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% Κυανό της ξυλόλης, 15% Φικόλη σε dH₂O

Διάλυμα εξουδετέρωσης: TrisHCl 2M 50ml + NaCl 5M 60ml + H₂O 90ml τελικός όγκος 200ml

Διάλυμα αποδιάταξης: NaCl 5M 120ml + NaOH 2M 100ml + H₂O 180ml τελικός όγκος 400ml

Διάλυμα A: TrisHCl 2M 40ml + NaCl 5M 24ml + H₂O 736ml τελικός όγκος 800ml

Διάλυμα B: Γάλα 20ml + δ/μα A 180ml τελικός όγκος 200ml

Διάλυμα C: TrisHCl 2M 25ml + NaCl 5M 5ml + MgCl₂ 6,25ml + H₂O 213,75ml τελικός όγκος 250ml

Wash 1: SSC 20x 70ml + SDS 10x 7ml + H₂O 623ml τελικός όγκος 700ml

Wash 2: SSC 20x 4ml + SDS 10x 4 ml + H₂O 392ml τελικός όγκος 400ml

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

Στερέο LB (LB Agar) (1L): Βακτοκρυπτόνη (10gr) , Εκχύλισμα ζύμης (5gr), Άγαρ (15gr) NaCl (5gr) pH 7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο 20 λεπτά σε 15lb/sq.in

Υγρό SOC (1L): Βακτοκρυπτόνη (10gr) , Εκχύλισμα ζύμης (5gr), NaCl (0,5gr), 250mM KCl (10ml) pH7,2. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο 20 λεπτά σε 15lb/sq.in και στη συνέχεια προσθέτουμε 2M MgCl₂ (5ml) και διάλυμα γλυκόζης 1M (20ml)

Διάλυμα 20X SSC: 0,3M Κιτρικό νάτριο pH7, 3M NaCl

*Στις αντιδράσεις PCR όπου αναφέρεται διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου χρησιμοποιείται το παρεχόμενο διάλυμα της εκάστοτε εταιρίας που προμηθεύει το ένζυμο.

Φωτογραφίες εργαστηριακού εξοπλισμού



Εικόνα 2.1 Συσκευή ακτινών UV



Εικόνα 2.2
Συσκευή
ηλεκτροφόρησης



Εικόνες 2.3 και 2.4
Συσκευή PCR κλειστή
και ανοιχτή φορτωμένη
με δείγματα



Εικόνα 2.5
Ηλεκτρονικός Ζυγός



Εικόνα 2.6 Συσκευή
θέρμανσης και
ανάδευσης με μαγνητικό
πεδίο



**Εικόνα 2.7 Συσσκευή
Ανάδευσης**



Εικόνα 2.8 Φυγόκεντρος



**Εικόνα 2.10 Συσσκευή
Ηλεκτροδιάτρησης**



**Εικόνα 2.11
Θερμαινόμενος θάλαμος
με ικανότητα ανάδευσης**

Μέθοδοι

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Σκοπός της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι ο εξειδικευμένος πολλαπλασιασμός μιας περιοχής DNA στόχου (ανεξαρτήτου προελεύσεως) με απώτερο σκοπό την ευκολότερη μελέτη αυτής. Μέσω αλληπάλληλων κύκλων αποδιάταξης του στόχου-υβριδισμού εκκινητών-επιμήκυνση του τμήματος στόχου (βήματα που αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης) ο στόχος πολλαπλασιάζεται και μάλιστα με γεωμετρική πρόοδο σε σύγκριση με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Η ανακάλυψη της αντίδρασης αποδίδεται στον Kary Mullis ο οποίος την παρουσίασε το 1983.

Για να πραγματοποιήσουμε μια αντίδραση PCR λαμβάνουμε υπόψη τα εξής:

Ταq DNA πολυμεράση: ανάλογα το μήκος του τμήματος που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε και τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης, χρησιμοποιούμε και την αντίστοιχη πολυμεράση (πιο οικονομική για μικρά τμήματα και μικρό κύκλο αντιδράσεων ή πιο ακριβή-εξειδικευμένη για μεγάλα τμήματα και μεγάλο αριθμό αντιδράσεων)

Συγκέντρωση $MgCl_2$: Η πολυμεράση χρησιμοποιεί ιόντα Mg^{2+} ως μεταλλικό συμπράγοντα. Αυξημένη συγκέντρωση ιόντων οδηγεί σε μη ειδική αντίδραση και άρα σε μη ειδικό προϊόν, ενώ όσο μειώνεται η συγκέντρωση μειώνεται η ποσότητα του προϊόντος.

Εκκινητές: ο σωστός σχεδιασμός τους είναι απαραίτητος για μια σωστή αντίδραση PCR. Πρέπει οι εκκινητές να μην εμφανίζουν σημαντική δευτεροταγή δομή, να μην είναι ιδιαίτερα συμπληρωματικοί μεταξύ τους για να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών, να μην έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης και να μην έχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Η θερμοκρασία υβριδισμού τους έχει μεγάλο ρόλο στην αντίδραση καθώς όσο μεγαλύτερη είναι αυτή τόσο πιο ειδικά-καλύτερα είναι τα προϊόντα της αντίδρασης. Η θερμοκρασία

υβριδισμού υπολογίζεται προσεγγιστικά με τον τύπο: $T_m = (A+T) \times 2^\circ \text{C} + (G+C) \times 4^\circ \text{C}$

Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) : Τα dNTPs (δηλ. dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR. Τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα Mg^{2+} και συνεπώς το ποσό των dNTPs προσδιορίζει και το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου Mg^{2+} . Έτσι αν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάξει σημαντικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και μια αλλαγή στη συγκέντρωση του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{2+} δηλ. η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} θα πρέπει να γίνεται παράλληλα με την συγκέντρωση των dNTPs.

Αριθμός κύκλων: Ο βέλτιστος αριθμός κύκλων σε μία PCR πρέπει να προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την επιθυμητή παραγωγή προϊόντος αλλά και την αποφυγή σχηματισμού μη ειδικού προϊόντος. Μετά από κάποιους κύκλους, η εκθετική ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του DNA-στόχου σταδιακά σταματά και μετά διέρχεται σε μια στατική φάση. Αυτή η 2η φάση λέγεται πλατό αύξησης (amplification plateau). Το σημείο στο οποίο η αντίδραση της PCR πλησιάζει στο πλατό εξαρτάται αρχικώς από τον αριθμό των αντιγράφων του DNA στόχου (που θέλουμε να ενισχύσουμε) που υπήρχαν στο αρχικό δείγμα και από το ολικό ποσό του DNA που συντέθηκε. Την εμφάνιση του πλατό προκαλούν ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες όπως: εξάντληση του εκκινητή ή των dNTPs. Αδρανοποίηση του ενζύμου της πολυμεράσης. Συναγωνισμός με μη ειδικά προϊόντα. Σ' αυτήν την περίπτωση τα ανεπιθύμητα προϊόντα της PCR συναγωνίζονται με το επιθυμητό προϊόν για το ένζυμο και τα λοιπά αντιδραστήρια .

Μέγεθος DNA στόχου: όταν ο στόχος ανιχνεύεται σε γονιδιωματικό DNA και μάλιστα πρόκειται για μονό αντίγραφο τότε χρειάζεται υψηλότερη ποσότητα δείγματος για την ανίχνευση του σε αντίθεση με στόχο που ανιχνεύεται σε πλασμίδιο (και συνεπώς βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα και είναι μικρότερος σε μέγεθος).

Παράδειγμα αντίδρασης PCR:

Υπολογίζουμε ανάλογα με της οδηγίες που μας δίνει η εκάστοτε εταιρία τις ποσότητες από τα παρακάτω: DNA στόχο, buffer της αντίδρασης, $MgCl_2$, dNTPs, εκκινητές πρόσθιοι και ανάστροφοι, ένζυμο και H_2O .

Αποστειρώνουμε τον πάγκο εργασίας και φοράμε γάντια μιας χρήσεως. Τοποθετούμε σε δοχείο από φελιζόλ πάγο και αναμειγνύουμε όλα τα υλικά πλην του ενζύμου σε σωληνάριο PCR. Ανάλογα αν έχουμε πάνω από ένα δείγμα DNA ή ζευγάρι εκκινητών ή ένζυμο μπορεί να έχουμε πάνω από ένα σωληνάριο αντίδρασης η και να χρειάζεται ξεχωριστή προετοιμασία. Ακολουθεί προετοιμασία του θερμοκυκλοποιητή (εισαγωγή προγράμματος και έλεγχος της συσκευής). Έπειτα εισάγουμε το ένζυμο στο μείγμα και εισάγουμε το/τα σωληνάριο/α στην συσκευή και εκκινούμε το πρόγραμμα.

*Εδώ δίνεται παράδειγμα μιας αντίδρασης. Στα αποτελέσματα αναγράφονται πλήρως οι συνθήκες για καθεμία αντίδραση που πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά.

Παρασκευή γέλης αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

- Παρασκευάζουμε 0,5x διαλύματος TBE από το αρχικό 5x.
- Υπολογίζουμε πόσο μεγάλη χρειάζεται να είναι η γέλη (ανάλογα με τον αριθμό δειγμάτων που θα ηλεκτροφορήσουμε) και πόσο πυκνή χρειάζεται να είναι (πυκνότερη για μικρά κομμάτια αραιότερη για μεγαλύτερα)
- Ζυγίζουμε την ανάλογη ποσότητα αγαρόζης και προσθέτουμε ανάλογη ποσότητα TBE 0,5x.
- Θερμαίνουμε το μείγμα σε σημείο βρασμού μέχρι οι κρύσταλλοι της αγαρόζης να μην είναι διακριτοί.
- Παγώνουμε το μείγμα σε σημείο να είναι ανεκτό στο δέρμα της παλάμης προσέχοντας να μην πήξει ωστόσο.
- Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο ανάλογα την ποσότητα γέλης που παρασκευάσαμε. (κατά την προσθήκη του βρ.αιθιδίου φοράμε γάντια διότι η ουσία αυτή είναι αναστολέας της τελομεράσης συνεπώς μπορεί να καταστρέψει τα κύτταρα αν κατά λάθος πέσει πάνω μας)
- Αναδεύουμε και αποχύνουμε το μείγμα στο καλούπι. Μόλις πήξει η γέλη είναι έτοιμη προς χρήση.

Ηλεκτροφόρηση

Προσθέτουμε χρωστική (μείγμα Κυανού της ξυλόλης και Μπλε της βρωμοφαινόλης) στα σωληνάρια με τα δείγματα ανάλογα με την ποσότητα που θα ηλεκτροφορήσουμε. Τοποθετούμε την γέλη στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και την εμβαπτίζουμε σε TBE 0,5x. Τοποθετούμε τα δείγματά μας στα ειδικά διαμορφωμένα πηγάδια της

γέλης και σε ένα γειτονικό τους πηγάδι τοποθετούμε και μια ποσότητα μείγματος σημασμένων μορίων με γνωστό μοριακό βάρος ώστε να χρησιμεύσει ως χάρακας για τα δείγματά μας.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτοπαρατηρήθηκε ως φαινόμενο το 1807 από τον Reuss στο πανεπιστήμιο της Μόσχας.

Απομόνωση DNA από γέλη ηλεκτροφόρησης

Χρησιμοποιούμε το kit : "Gel Clean Up System" της εταιρίας Promega

To Nucleasis Free Water να είναι προθερμασμένο στους 55-60 °C

To Membrane wash solution περιέχει αιθανόλη

Σκοπός μας είναι να καθαρίσουμε το DNA από την γέλη ηλεκτροφόρησης

- Αρχικά αποκόπτουμε την ζώνη ή τις ζώνες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον από την γέλη ηλεκτροφόρησης και την/τις φυλάσσουμε σε σωληνάριο τύπου erpendorf
- Υπολογίζουμε το βάρος της αποκομμένης ζώνης. Εάν αυτό υπερβαίνει τα 500ng χωρίζουμε την ζώνη σε 2 μέρη.
- Προσθέτουμε membrane binding solution σε κάθε σωληνάριο με αναλογία 10μl διαλύματος/10mg γέλης. Κάνουμε ελαφρά ανάδευση στη συσκευή Vortex και επωάζουμε στους 50-65 °C μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Ανά διαστήματα το ελέγχουμε και υποβοηθούμε ανάλογα με ελαφρά ανάδευση.
- Όταν διαλυθεί πλήρως το βάζουμε στο SV mini column. Το SV mini column είναι τοποθετημένο μέσα στο tube collection. Επωάζουμε για 1 λεπτό.
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις μέγιστες στροφές και απορρίπτουμε το υγρό.
- Προσθέτουμε 700μl Membrane wash Solution και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό.
- Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε 500μl Membrane wash solution και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υγρό και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό με ανοικτό το καπάκι της φυγοκέντρου για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.

- Μεταφέρουμε το SV mini column σε καθαρό σωληνάριο (στο οποίο θα συλλέξουμε το δείγμα μας) και προσθέτουμε 25μl nucleasis free water στο κέντρο χωρίς να αγγίξουμε το φίλτρο.
- Επωάζουμε για 1 λεπτό και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις μέγιστες στροφές.
- Ομοίως προσθέτουμε άλλα 25μl nucleasis free water επωάζουμε για 1 λεπτό και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις μέγιστες στροφές.
- Απορρίπτουμε το SV mini column και αποθηκεύουμε το δείγμα μας στους 4 °C.

Κατακρήμνιση DNA/RNA

Για RNA χρησιμοποιούμε αντί CH₃COONa το αντιδραστήριο CH₃COONH₂

Στόχος είναι να κατακρημνίσουμε το DNA από ένα δείγμα.

- Προσθέτουμε H₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 300μl.
- Προσθέτουμε CH₃COONa ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0,3M διότι είναι ασθενές άλας του οποίου το φορτισμένο ιόν Na⁺ θα συνδεθεί με το αρνητικά φορτισμένο DNA ώστε να κατακρημνιστεί αυτό.
- Προσθέτουμε 100%καθαρή αιθανόλη 2-2,5 φορές τον όγκο του διαλύματος του DNA. Έτσι απομακρύνεται το νερό, το θετικά φορτισμένο ιόν συνδέεται με το αρνητικά φορτισμένο DNA και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να πλησιάζουν μεταξύ τους και να κατακρημνίζονται στο διάλυμα.
- Προσθέτουμε 0,5μl γλυκογόνο το οποίο είναι μεγαλομόριο και παρασύρει το DNA.
- Το τοποθετούμε στους -80 °C για 2 ώρες (η ακόμα καλύτερα για 12 ώρες)
- Φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές για 15-20 λεπτά.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο.
- Προσθέτουμε διάλυμα αιθανόλης 70% όση το μισό του αρχικού όγκου και ανακινούμε ελαφρώς το σωληνάριο.
- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις μέγιστες στροφές.
- Αφαιρούμε το υγρό προσεκτικά με την βοήθεια πιπέτας.
- Αφήνουμε να στεγνώσει και το αναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο νερού.

Απομόνωση ολικού RNA με χρήση TRIZOL

Φοράμε γάντια για να προστατεύσουμε το RNA από ριβονουκλεάσες

Αποστειρώνουμε τα πάντα

Το RNA αν υπάρχει προστατεύεται από το TRIZOL

Ομογενοποίηση

Ομογενοποιούμε τον ιστό σε 1ml TRIZOL ανά 50-100 mg (ο όγκος του ιστού πρέπει να είναι λιγότερο από 10% του όγκου του TRIZOL). Βάζω αρχικά 100μl,ομογενοποιώ και μετά ακόμη 100μl TRIZOL για έκπλυση του εμβόλου. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (έχουμε διάχυση των νουκλεοτιδίων στο διάλυμα).

Διαχωρισμός φάσης

Φυγοκεντρούμε στους 4 °C στις 12000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωληνάριο τύπου errendorf με πιπέτα μέγιστης χωρητικότητας 200μl. Προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο για 1ml TRIZOL. Ανακινούμε ελαφρώς με το χέρι και όχι με συσκευή Vortex. Επωάζουμε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στους 4 °C στις 12000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά. Παρατηρούμε 3 φάσεις: στον πάτο του σωληναρίου μια σκούρα ροζ που περιέχει πρωτεΐνες, μια μεσόφαση που περιέχει το DNA και την άνω φάση χρώματος κίτρινου που περιέχει το RNA.

RNA κατακρήμνιση

Μεταφέρουμε την άνω φάση που περιέχει το RNA σε καθαρό σωληνάριο τύπου errendorf με χρήση πιπέτας μέγιστης χωρητικότητας 200μl προσέχοντας να μην πάρουμε καθόλου από την μεσόφαση που περιέχει το DNA. Προσθέτουμε 0,5ml ισοπροπανόλης για 1 ml TRIZOL και ανακινούμε με το χέρι και όχι με συσκευή Vortex. Επωάζουμε τα δείγματα στους -80 °C για 10-60 λεπτά (εμείς προτιμήσαμε τα 30). Φυγοκεντρούμε στους 4 °C στις 12000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και παρατηρούμε ότι το ίζημα έχει μορφή γέλης.

Καθαρισμός RNA

Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και κάνουμε πλύσιμο του ιζήματος με διάλυμα αιθανόλης 75% για 1ml TRIZOL. Αναδεύουμε ελαφρά με χρήση συσκευής Vortex και φυγοκεντρούμε στους 4 °C στις 7500 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο με χρήση πιπέτας μέγιστης χωρητικότητας 200μl.

Αναδιάλυση του RNA

Στεγνώνουμε το δείγμα για 10 λεπτά (προσοχή όχι παραπάνω από αυτό το χρονικό διάστημα) και παρατηρούμε ότι το ίζημα γίνεται από άσπρο διαφανές. Αναδιαλύουμε σε H₂O σε όποιο όγκο επιθυμούμε (μπορούμε να υποβοηθήσουμε την διαδικασία με χρήση πιπέτας) και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 55-60 °C για πλήρη αναδιάλυση. Το δείγμα φυλάσσεται στους -80 °C.

PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (RT PCR)

Σκοπός είναι να παράγουμε cDNA από δείγμα RNA. Για να πραγματοποιηθεί αυτό χρησιμοποιούμε ένα ένζυμο που λέγεται αντίστροφη μεταγραφάση και έχει την ικανότητα με την βοήθεια εκκινητών να χρησιμοποιεί το RNA ως καλούπι για την σύνθεση cDNA. Οι εκκινητές αυτοί μπορεί να είναι είτε ειδικοί για το κομμάτι που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, είτε τυχαίοι όταν θέλουμε να ενισχύσουμε όλο το δείγμα μας, είτε εκκινητές oligo dT οι οποίοι προσδένουν στην poly A ουρά των mRNAs.

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση RT PCR χρειαζόμαστε δείγμα RNA, εκκινητές, ρυθμιστικό διάλυμα, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.

*Εδώ δίνονται γενικές οδηγίες, οι ακριβείς αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται στο τμήμα των Αποτελεσμάτων

Poly A tailing

Είναι μια διαδικασία κατά την οποία προσθέτουμε μια poly A ουρά στο εμπρόσθιο τμήμα του cDNA μειώνοντας έτσι τους απαιτούμενους εκκινητές πριν την διαδικασία της RACE PCR. Επίσης βοηθάει κατά την διαδικασία της κλωνοποίησης του τμήματος καθώς τα τμήματα αυτά παράγουν τυφλά άκρα και έτσι μειώνεται η προεργασία του δείγματος.

*Εδώ δίνονται γενικές οδηγίες, οι ακριβείς αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται στο τμήμα των Αποτελεσμάτων

RACE PCR

Το mRNA που λαμβάνουμε από διαδικασίες απομόνωσης είναι πού πιθανό να είναι ημιτελές ή κομματιασμένο. Προς αποφυγήν αυτού του γεγονότος πραγματοποιούμε την καλούμενη RACE PCR η οποία δύναται να ενισχύσει και το 5' αλλά και το 3' άκρο του mRNA επιτρέποντας μας να λάβουμε ολοκληρωμένη την πληροφορία στο cDNA.

Η διαδικασία αυτή χωρίζεται στην 5' RACE και την 3' RACE ανάλογα ποιό άκρο επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Στην 3' RACE χρησιμοποιούμε έναν εσωτερικό εκκινητή μαζί με εκκινητή oligo-dT, ο οποίος προσδένεται στην poly-A ουρά που φέρει το mRNA. Έτσι μπορούμε να ανακτήσουμε την πληροφορία στο 3' άκρο. Στην 5' RACE κατασκευάζουμε έναν cDNA κλώνο με την βοήθεια ενός εσωτερικού εκκινητή προς το 3' άκρο. Έπειτα αποδιατάσσουμε το mRNA και με την βοήθεια του ενζύμου terminal transferase, η οποία μπορεί να προσθέτει μια poly-A ουρά στο 3' άκρο μορίων DNA, έχουμε ένα cDNA το οποίο φέρει 2 γνωστές περιοχές και συνεπώς μπορεί να αλληλουχηθεί.

*Εδώ δίνονται γενικές οδηγίες, οι ακριβείς αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται στο τμήμα των Αποτελεσμάτων

Στύπωμα κατά Southern

Σκοπός μας είναι η ανίχνευση του στόχου από ηλεκτροφορημένα δείγματα σε γέλη αγαρόζης. Η μέθοδος ανακαλύφθηκε από τον Edward Southern (Southern 1975)

Μεταφορά από την γέλη στη μεμβράνη

- Εμβαπτίζουμε την ηλεκτροφορημένη γέλη σε δοχείο που περιέχει διάλυμα αποδιάταξης για 15 λεπτά.
- Ξεπλύνουμε με απιονισμένο νερό για 1 λεπτό.

Η διαδικασία αυτή γίνεται 2 φορές.

- Εμβαπτίζουμε την ηλεκτροφορημένη γέλη σε δοχείο που περιέχει διάλυμα εξουδετέρωσης για 10 λεπτά.
- Ξεπλύνουμε με απιονισμένο νερό για 1 λεπτό.

Η διαδικασία αυτή γίνεται 2 φορές.

- Τοποθετούμε την γέλη σε διάλυμα μεταφοράς (SSC 6x) το οποίο είναι ουδέτερο (μέχρι να κόψουμε τις μεμβράνες)
- Τοποθετούμε τις μεμβράνες σε απιονισμένο νερό, κατόπιν σε SSC 6x και τέλος στην γέλη (Προσοχή διότι έχουμε μόνο μία ευκαιρία στην τοποθέτηση της μεμβράνης πάνω στην γέλη. Η μεμβράνη τοποθετείται στην πλευρά της γέλης ώστε τα σχηματισμένα πηγάδια να βρίσκονται απέναντι της και όχι στην ίδια με αυτά πλευρά. Αυτό γίνεται ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται εγγύτερα στο DNA).
- Βρέχουμε 2 χαρτιά τύπου Watman και τα βάζουμε πάνω στην μεμβράνη και πάνω τους βάζουμε άλλα 2 τέτοια χαρτιά στεγνά.
- Τοποθετούμε απλά χαρτιά πάνω στα στεγνά Watman (περίπου 10cm ύψος απλών χαρτιών)
- Βάζουμε λίγο SSC 6x περιμετρικά της γέλης και τοποθετούμε βάρους πάνω στην κατασκευή.

Η μεταφορά διαρκεί 2 ώρες. Μετά το πέρας αυτών σημειώνουμε την θέση των πηγαδιών στην μεμβράνη και την ψήνουμε στους 80 °C για 2 ώρες.

Προϋβριδοποίηση

- Ετοιμάζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία βρασμού.
- Τοποθετούμε το διάλυμα υβριδοποίησης στο υδατόλουτρο έως ότου αυτό διαλυθεί.
- Σε μεγάλο σωλήνα τοποθετούμε 65ml διάλυμα υβριδοποίησης και 650 μl salmon sperm (Το salmon sperm έχει τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο που βράζει για 10 λεπτά και κατόπιν σε πάγο για 2 λεπτά).
- Οι σωλήνες επωάζονται στους 58 °C για 2 ώρες υπό κυκλική ανάδευση.

Υβριδοποίηση

- Μετά τις 2 ώρες τοποθετούμε τα μόρια ανιχνευτές μας σε υδατόλουτρο που βράζει για 10 λεπτά και μετά σε πάγο για 2 λεπτά. Έτσι αποδιατάσσονται (=γίνονται μονόκλωνοι).
- Αφαιρούμε από τους σωλήνες 35 ml από το περιεχόμενό τους.
- Προσθέτουμε τους ανιχνευτές και την μεμβράνη στους σωλήνες και αναδεύουμε (προσέχουμε ώστε η πλευρά της μεμβράνης που φέρει το DNA να είναι εσωτερική του σωλήνα).
- Επωάζουμε για 12 ή 16 ώρες υπό κυκλική ανάδευση στους 55 °C.
- Βάζουμε το διάλυμα Wash 2 στο υδατόλουτρο στους 58 °C.

- Αδειάζουμε το περιεχόμενο των σωλήνων σε σωληνάρια τύπου falcon τα σημειώνουμε και τα αποθηκεύουμε στους -20 °C.
- Προσθέτουμε λίγο διάλυμα Wash 1 στους σωλήνες ώστε να ξεκολλήσουν οι μεμβράνες .
- Τοποθετούμε τις μεμβράνες στο ίδιο δοχείο (η διαδικασία από αυτό το σημείο χρησιμοποιεί ίδια διαλύματα και δεν επηρεάζεται από τον αριθμό των μεμβρανών ούτε και από το είδος των μορίων στόχων αν αυτά είναι περισσότερα του ενός)
- Πραγματοποιούμε 2 πλύσεις με διάλυμα Wash 1 (καλύπτουμε με το υγρό τις μεμβράνες και τις αφήνουμε 5 λεπτά υπό ανάδευση)
- Ανάβουμε το φούρνο στους 58 °C.
- Πραγματοποιούμε 2 πλύσεις με διάλυμα Wash 2 (αφού αφαιρέσουμε το Wash 1 και το επωάζουμε στους 58 °C για 20 λεπτά).

Παρατηρούμε ότι ακολουθείται μια σειρά εκπλύσεων με σταδιακώς αυστηρότερες συνθήκες από το SSC στο Wash 1 και τέλος στο Wash 2.

- Τοποθετούμε τις μεμβράνες υπό ανάδευση με διάλυμα A μέχρι να παρασκευάσουμε το διάλυμα B.
- Αφαιρούμε το διάλυμα A και προσθέτουμε διάλυμα B για 30 λεπτά υπό ανάδευση.
- Αφαιρούμε το διάλυμα B και προσθέτουμε διάλυμα B με ανιχνευτή (ανιχνευτής: Streptavidin Alkaline Phosphatase σε συγκέντρωση 5μl/10ml).
- Επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
- Αφαιρούμε το διάλυμα B και το αποθηκεύουμε σε σημειωμένο σωληνάριο στο ψυγείο στους 4 °C.
- Κάνουμε 2 πλύσεις με διάλυμα A για 15 λεπτά υπό ανάδευση.
- Αφαιρούμε το διάλυμα A και προσθέτουμε διάλυμα C για εξισορρόπηση για 2 λεπτά.
- Αφαιρούμε το διάλυμα C και προσθέτουμε μείγμα διαλύματος C 30 ml + MBT 300μl +BCIP 225μl.

Εμφάνιση

- Βάζουμε τις μεμβράνες σε μείγμα διαλύματος C με NBT και X-phosphate (NBT: σε 10 ml διαλύματος προσθέτουμε C 50μl NBT και X-phosphate: σε 10 ml C διαλύματος προσθέτουμε 37,5μl X-phosphate).
- Τοποθετούμε τις μεμβράνες σε σκοτεινό μέρος και ελέγχουμε περιοδικά για εμφάνιση κηλίδων.

Κλωνοποίηση ενθέματος στόχου σε πλασμιδιακό φορέα και καθαρισμός

Στόχος μας είναι η κλωνοποίηση ενός DNA μορίου στόχου, το οποίο έχουμε προηγουμένως επιτυχώς πολλαπλασιάσει με μέθοδο PCR, μέσω ενός μορίου φορέα –εμείς χρησιμοποιήσαμε πλασμίδιο. Αρχικά πρέπει να προετοιμάσουμε κύτταρα κατάλληλα για τον σκοπό αυτό.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούμε είναι E.coli DH5α στέλεχος και ο φορέας πλασμίδιο pBluescriptII SK.

Προετοιμασία κυττάρων

- Φυγοκεντρούμε τα σωληνάρια που είχαμε αφήσει στο προηγούμενο στάδιο να κατακρημνιστούν για 20 λεπτά ώστε να καθιζάνει το DNA.
- Προσθέτουμε αιθανόλη όση ο μισός αρχικός όγκος στο σωληνάριο ώστε να απομακρυνθεί το άλας από το βήμα της κατακρήμνισης.
- Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Αφήνουμε ανοικτά τα σωληνάρια ώστε να στεγνώσουν.
- Αφού στεγνώσουν προσθέτουμε το ένζυμο λιγάση και ρυθμιστικό διάλυμα ανάλογα με τις οδηγίες της εταιρίας και αποθηκεύουμε στο ψυγείο.
- 2-3 ώρες πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα προσθέτουμε την καλλιέργεια που είχαμε αφήσει όλη την νύχτα στην κωνική φιάλη που περιέχει υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.
- Λαμβάνουμε δείγμα από την καλλιέργεια που είχαμε αφήσει όλη την νύχτα και το φωτομετρούμε στα 600nm. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι μεταξύ 0,45 και 0,55.
- Ετοιμάζουμε σωληνάρια με κύτταρα που θα υποστούν ηλεκτροδιάτρηση (EC για συντομία) και τα τοποθετούμε στον καταψύκτη να παγώσουν. Περίπου αντιστοιχούν 20 σωληνάρια για 100 ml καλλιέργειας.
- Μοιράζουμε την καλλιέργεια στα παγωμένα σωληνάρια.
- Φυγοκεντρούμε τους σωλήνες με την καλλιέργεια στις 4200 στροφές ανά λεπτό στους 4 °C για 15 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε αποσταγμένο νερό. Αρχικά από 500μl σε κάθε σωλήνα και όταν επαναδιαλυθούν τα κύτταρα προσθέτουμε νερό ως τα 50ml.
- Φυγοκεντρούμε τους σωλήνες με την καλλιέργεια στις 4200 στροφές ανά λεπτό στους 4 °C για 15 λεπτά.

- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο γρήγορα και προσεκτικά (τα κύτταρα ενδεχομένως να ξεκολλήσουν). Επαναδιαλύουμε σε αποσταγμένο νερό. Αρχικά από 500μl σε κάθε σωλήνα και όταν επαναδιαλυθούν τα κύτταρα προσθέτουμε νερό ως τα 50ml.
- Φυγοκεντρούμε τους σωλήνες με την καλλιέργεια στις 4200 στροφές ανά λεπτό στους 4 °C για 15 λεπτά.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο γρήγορα και προσεκτικά (τα κύτταρα ενδεχομένως να ξεκολλήσουν). Επαναδιαλύουμε σε αποσταγμένο νερό. Αρχικά από 500μl σε κάθε σωλήνα και όταν επαναδιαλυθούν τα κύτταρα προσθέτουμε νερό ως τα 50ml.
- Μοιράζουμε το περιεχόμενο από τους σωλήνες ομοιόμορφα στα σωληνάρια.

Ηλεκτροδιάτρηση και καλλιέργεια

- Θα δουλέψουμε στον πάγο. Το διάλυμα θρεπτικού υλικού SOC τοποθετείται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσει. Οι κυβέτες ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται στον καταψύκτη μέχρι να έρθει η ώρα να χρησιμοποιηθούν.
- Αραιώνουμε 1 προς 10 το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης (μεταξύ του προϊόντος PCR μας και του φορέα) και τοποθετούμε 2μl από το αραιωμένο μέσα σε σωληνάριο που περιέχει κύτταρα EC. Αναδεύουμε ελαφρά και τοποθετούμε το σωληνάριο στον πάγο για 1 λεπτό.
- Τοποθετούμε το περιεχόμενο του σωληναρίου στο κέντρο της κυβέτας.
- Σκουπίζουμε την κυβέτα πολύ καλά και την τοποθετούμε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πραγματοποιούμε την ηλεκτροδιάτρηση.
- Μέσα στο επόμενο λεπτό προσθέτουμε στην κυβέτα 700μl διαλύματος SOC και αναδεύουμε 2-3 φορές.
- Τοποθετούμε το περιεχόμενο της κυβέτας σε αποστειρωμένο σωλήνα.
- Τοποθετούμε τους σωλήνες σε επωαστήρα για 45 λεπτά στους 37 °C στις 180 στροφές ανά λεπτό.
- Στη συνέχεια ετοιμάζουμε σωληνάρια τύπου erpendorf όπου βάζουμε 30μl XGal + 3μl IPTG + 150μl από το επωασμένο υλικό και στρώνουμε τρυβλία petri (με γκαζάκι για συνεχή αποστείρωση).
- Περιμένουμε να στεγνώσουν τα τρυβλία και τα τοποθετούμε σε επωαστήρα στους 37 °C.

- Ετοιμάζουμε τρυβλία control με αραιώση 1ml κύτταρα σε 100ml H₂O. Έπειτα βάζουμε σε σωληνάρια 2, 4, 8μl και προσθέτουμε νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200μl.
- Μετράμε τις αποικίες και υπολογίζουμε τον μέσο όρο. Αυτός πρέπει να πλησιάζει το νούμερο 1,9x10⁹ για να είναι αποδεκτός.

Διαλογή αποικιών

- Μετά από 12 ώρες ελέγχουμε τα τρυβλία για ύπαρξη μπλε-άσπρων αποικιών. Αν δεν παρατηρήσουμε ορατές αποικίες ή είναι πολύ μικρές μπορούμε να τα αφήσουμε μέχρι τις 16 ώρες. Αν παρατηρήσουμε ορατές αποικίες τοποθετούμε τα τρυβλία στο ψυγείο για 3-4 ώρες ώστε να σταθεροποιηθεί καλύτερα το χρώμα των αποικιών.
- Μοιράζουμε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε αποστειρωμένους και σημασμένους σωλήνες.
- Πραγματοποιούμε διαλογή άσπρων αποικιών υπό άσηπτες συνθήκες με την βοήθεια οδοντογλυφίδων και φλόγιστρου.
- Επωάζουμε τους σωλήνες με τις οδοντογλυφίδες για 12 ώρες στους 37 °C στις 210 στροφές ανά λεπτό.

Mini Preps

- Αναδεύουμε ήπια τον σωλήνα με την καλλιέργεια.
- Τοποθετούμε 1,5ml κορεσμένης καλλιέργειας σε σωληνάριο τύπου erpendorf.
- Φυγοκεντρούμε τα σωληνάρια για 3 λεπτά στις 3000 στροφές ανά λεπτό. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις μέγιστες στροφές ώστε να κολλήσει καλύτερα το ίζημα.
- Προσθέτουμε 100μl παγωμένου διαλύματος GET σε κάθε σωληνάριο και αναδεύουμε σε συσκευή Vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Τα αφήνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον πάγο και προσθέτουμε στο καθένα από αυτά 200μl διαλύματος alkali lysis. Ανακινούμε και αφήνουμε τα σωληνάρια για 7-8 λεπτά στον πάγο.
- Προσθέτουμε 150μl παγωμένου CH₃COOK σε κάθε σωληνάριο ώστε να σταματήσει η λύση των κυττάρων. Ανακινούμε δυνατά και αφήνουμε τα σωληνάρια για 7-8 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε 9 λεπτά στις μέγιστες στροφές και φυλάμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο.
- Προσθέτουμε στο καθένα 2 φορές τον αρχικό όγκο καθαρής 100% αιθανόλη και καταψύχουμε στους -20 °C για 15 λεπτά.

- Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις μέγιστες στροφές και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Στο ίζημα προσθέτουμε αιθανόλη 70% όση ο μισός αρχικός όγκος. Αναδεύουμε αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο.
- Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές απορρίπτουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το σωληνάριο να στεγνώσει.
- Αναδιαλύουμε σε 50μl TE-RNase και φυλάμε στο ψυγείο (μπορούμε να υποβοηθήσουμε με συσκευή Vortex και υδατόλουτρο).

Καθαρισμός φαινόλη-χλωροφόρμιο

- Προσθέτουμε H₂O στα σωληνάρια ώστε ο τελικός όγκος να είναι 400μl.
- Προσθέτουμε 200μl φαινόλη και άλλο τόσο χλωροφόρμιο.
- Ανακινούμε και φυγοκεντρούμε 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές. Μεταφέρουμε την υδατική φάση (είναι η άνω φάση) σε καθαρό σημασμένο σωληνάριο και προσθέτουμε 400μl χλωροφόρμιο.
- Επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο στάδιο 2 φορές. Στο τέλος φυλάμε την υδατική φάση σε καθαρό σημασμένο σωληνάριο.
- Προσθέτουμε CH₃COONa ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 0,3M
- Προσθέτουμε 2,5 φορές τον αρχικό όγκο παγωμένη 100%καθαρή αλκοόλη.
- Αναδεύουμε ήπια σε συσκευή Vortex και τοποθετούμε τα δείγματα για 20 λεπτά στους -20 °C. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις μέγιστες στροφές.
- Απορρίπτω προσεκτικά το υπερκείμενο και προσθέτω όσο ο μισός αρχικός όγκος αιθανόλη 70%. Φυγοκεντρώ για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές.
- Απορρίπτω το υπερκείμενο και αφήνω το σωληνάριο να στεγνώσει.
- Αναδιαλύουμε σε 30 μl H₂O.

Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων:

Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB-Broth:

Για 1L θρεπτικού υποστρώματος θα χρειαστούμε 15gr σκόνης LB-Broth και 5gr NaCl. Τοποθετούμε τα υλικά σε πυρίμαχο δοχείο, αναδεύουμε και αποστειρώνουμε.

Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-Agar:

Το κάθε τρυβλίο petri χωράει περίπου 25ml θρεπτικού υποστρώματος, συνεπώς υπολογίζουμε πόσο θα παρασκευάσουμε. Για 1L χρειαζόμαστε 40gr σκόνης LB-Agar. Αναμειγνύουμε σε πυρίμαχο σκεύος και αποστειρώνουμε. Αφήνουμε να κρυώσει στον πάγκο και προσέχουμε να μην πέσει τόσο η θερμοκρασία του ώστε να στερεοποιηθεί. Αν ωστόσο συμβεί κάτι τέτοιο επαναλαμβάνουμε την αποστείρωση. Μόλις η θερμοκρασία του σκεύους γίνει ανεκτή στο γυμνό χέρι προσθέτουμε 1μl διαλύματος αμπικιλίνης για κάθε ml θρεπτικού και μοιράζουμε στα τρυβλία με την χρήση φλόγιστρου για άσηπτες συνθήκες. Περιοδικά σκουπίζουμε την υγρασία στα καπάκια των τρυβλίων, πάντα με χρήση φλόγιστρου. Όταν δεν παρατηρούμε πλέον άλλη υγρασία είναι έτοιμα να στρώσουμε την καλλιέργειά μας. Αφού στεγνώσει και η καλλιέργεια τότε τα τρυβλία είναι έτοιμα να τοποθετηθούν στον επωαστήρα.

Πέψη και διαλογή πλασμιδίων φερόντων ένθεμα

Στόχος μας είναι να κάνουμε μια διαλογή από τα απομονωμένα πλέον πλασμίδια που αποκτήσαμε από την προηγούμενη μέθοδο, ώστε να ξεχωρίσουμε εκείνα τα οποία φέρουν το σωστό ένθεμα από εκείνα που δεν το φέρουν. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα πριν τον καθαρισμό με φαινόλη χλωροφόρμιο και μετά τα mini preps.

Η διαδικασία ξεκινάει με την πραγματοποίηση πέψης σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ορίζει η εταιρία που παράγει το ένζυμο. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση μικροποσότητας από το καθένα δείγμα. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε ποια δείγματα φέρουν ένθεμα και ποια εξ αυτών φέρουν ένθεμα στο μέγεθος που αναμένουμε.

Ακολουθεί διαλογή των επιθυμητών δειγμάτων και καθαρισμός τους με φαινόλη χλωροφόρμιο ώστε να απαλλαχθούν από τα υπολείμματα του ενζύμου και του ρυθμιστικού του διαλύματος. Σημαίνουμε τα σωληνάρια και τα αποστέλλουμε για αλληλούχιση.

Επεξεργασία Δεδομένων

Τα πειραματικά αποτελέσματα επεξεργάζονται με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων. Τέτοια είναι τα προγράμματα OMIGA, ChromasLite, SPDB και οι ιστότοποι BLAST, Protein Data Bank. Το θεωρητικό υπόβαθρο του homology modeling που πραγματοποιήθηκε αναλύεται στο Παράρτημα που επισυνάπτεται στο τέλος αυτής της εργασίας.

3.Αποτελέσματα

Πειραματική Διαδικασία

Παρασκευή cDNA από απομονωμένο RNA δάκου.

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
RNA	8
primers	1
Mastermix	10
Ενζυμικό mix	1

Χρησιμοποιήθηκε το ΚΙΤ της εταιρίας Stratagene. Αρχικά τοποθετήθηκαν το RNA και οι εκκινήτες σε θερμαινόμενη συσκευή στους 70 °C για 10 λεπτά και κατόπιν στον πάγο για 5 λεπτά. Τέλος

προστέθηκαν τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και το δείγμα τοποθετήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή.

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (minutes)
1	25	5:00
2	42	45:00
3	95	5:00
4	4	forever

Ακολούθησε RNAase treatment με RNAase H για την πλήρη αποδιάταξη του RNA. Το δείγμα τοποθετήθηκε με 1μl ενζύμου στους 30°C για 1 ώρα.

Ακολούθησε poly A Tailing της εταιρίας Invitrogen.

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	15
buffer	4
TdT	0,5
dATP	0,8

Το δείγμα τοποθετείται στους 37°C για 15 λεπτά και έπειτα στους 70°C για 10 λεπτά.

Race PCR για την υπομονάδα α7

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	0/0,5/1/3
Buffer	2,5
dNTPs	2
MgCl ₂	1,5
oligo dT	0,9
adap DT	1,8
GSP ₂	1,8
Taq	0,3
H ₂ O	14,2/13,7/13,2/10,2

Πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις. Ο τελικός όγκος παραμένει σταθερός (25μl) και αλλάζει μόνο η ποσότητα του προστιθέμενου cDNA.

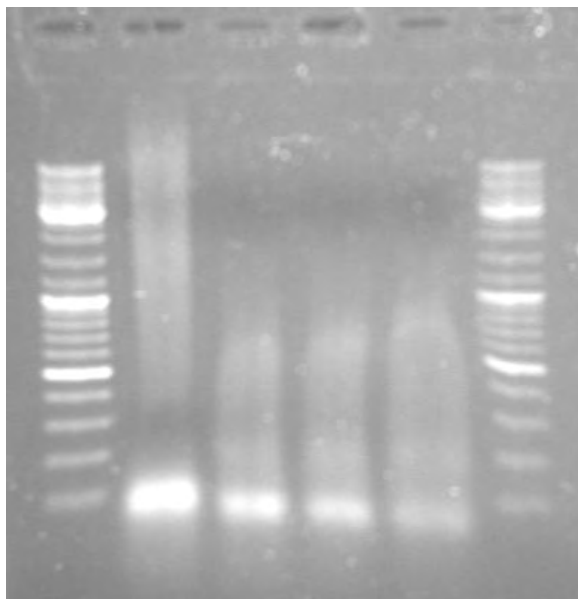
Εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν: α7 F, α7R

Ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε: BioTaq της εταιρίας Bioline.

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (minutes)
1	94	5:00
2	50	5:00
3	72	30:00
4	94	0:30
5	50	0:45
6	72	2:00
7	Επανάληψη βημάτων 4,5 και 6 30φορές	
8	94	0:40
9	50	0:45
10	72	15:00
11	4	forever

Φωτογραφία ηλεκτροφορημένης γέλης:



Σειρά φόρτωσης γέλης από τα αριστερά στα δεξιά: Ladder / αρνητικό control / Race(0,5μl) / Race(1μl) / Race(3μl) / Ladder

Παρατηρείται έντονο smear στα δείγματα, αλλά και στο αρνητικό control.

Έπειτα ακολούθησε re PCR για την υπομονάδα α7 (ίδια διαδικασία με την προηγούμενη RACE αλλά λαμβάνω 1μl από το κάθε αρχικό δείγμα και επαναλαμβάνω την PCR)

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	1
Buffer	2,5
dNTPs	2
MgCl ₂	1,5
oligo dT	0,9
adap DT	1,8
GSP ₂	1,8
Taq	0,3
H ₂ O	13,2

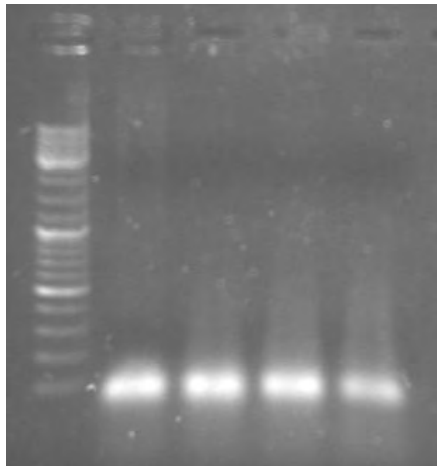
Πραγματοποιήθηκαν 4 αντιδράσεις. Ο τελικός όγκος παραμένει σταθερός (25μl).

Primers που χρησιμοποιήθηκαν:

Ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε: BioTaq της εταιρίας Bioline.

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

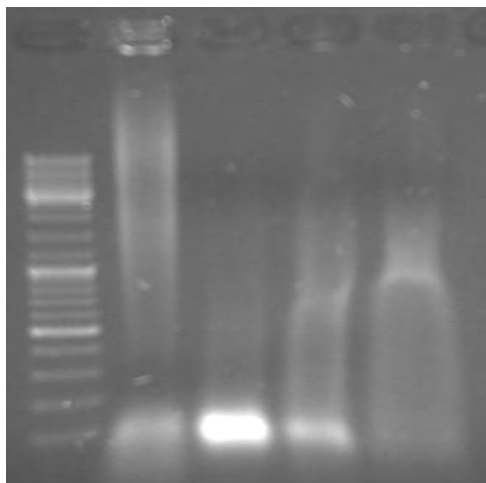
Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (minutes)
1	94	5:00
2	50	5:00
3	72	30:00
4	94	0:30
5	50	0:45
6	72	2:00
7	Επανάληψη βημάτων 4,5 και 6 30φορές	
8	94	0:40
9	50	0:45
10	72	15:00
11	4	forever



Φωτογραφία ηλεκτροφορημένης γέλης:

Σειρά φόρτωσης γέλης από τα αριστερά στα δεξιά: Ladder/αρνητικό control/Race (0,5μl)/Race (1μl)/Race (3μl)/Ladder

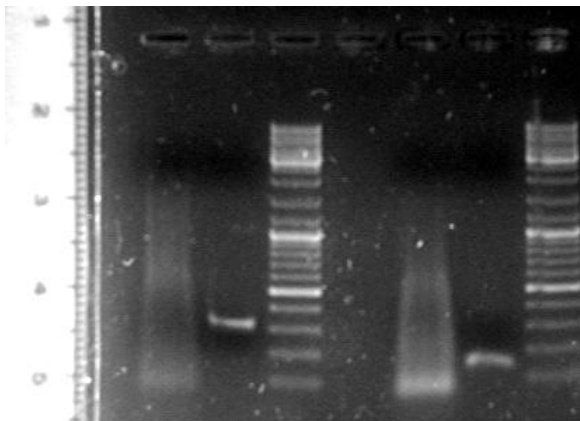
Δεν παρατηρείται κάποια διακριτή ζώνη στην γέλη.



Επανάληψη της αρχικής RACE με τις ίδιες συνθήκες

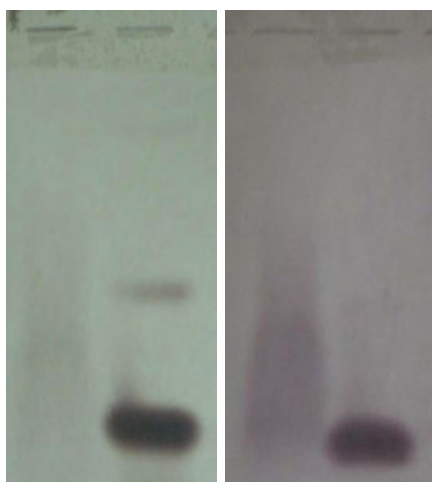
Παρατηρείται μια ζώνη στην περιοχή των ~750 bp για τα δείγματα RACE(1μl) και RACE(3μl).

Έπειτα πραγματοποιήθηκε στύπωμα κατά Southern για να διαπιστωθεί εάν το γονίδιο στόχος έχει πολλαπλασιαστεί στο δείγμα μας.



Φωτογραφία ηλεκτροφορημένης γέλης με χάρακα πριν το στύπωμα κατά Southern.

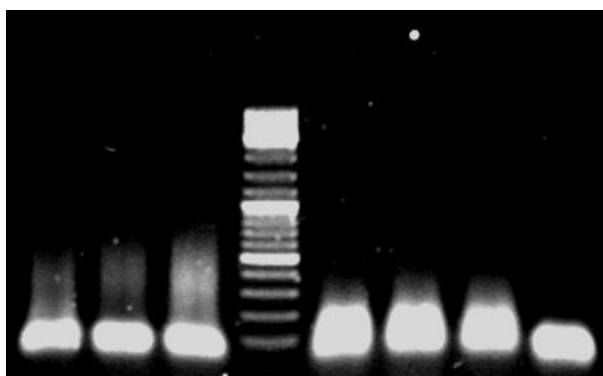
Σειρά φόρτωσης από αριστερά στα δεξιά υπομονάδα α1/θετικό control υπ.α1/Ladder/κενό/ υπομονάδα α7/θετικό control υπ.α7/Ladder



Αποτελέσματα εμφάνισης της διαδικασίας. Υπάρχει σήμα στα θετικά control αλλά όχι στα δείγματα. Αριστερά βρίσκεται το δείγμα της υπομονάδας α1 και δεξιά της α7.

Κατόπιν έγινε νέα απομόνωση RNA από 5 αρσενικά και 5 θηλυκά άτομα. Ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA, RT PCR και RNAase H treatment και poly A tailing όπως στο αρχικό δείγμα.

Κάναμε RACE PCR στοχεύοντας τις υπομονάδες α1 και α7 με ίδιες συνθήκες με την αρχική RACE.

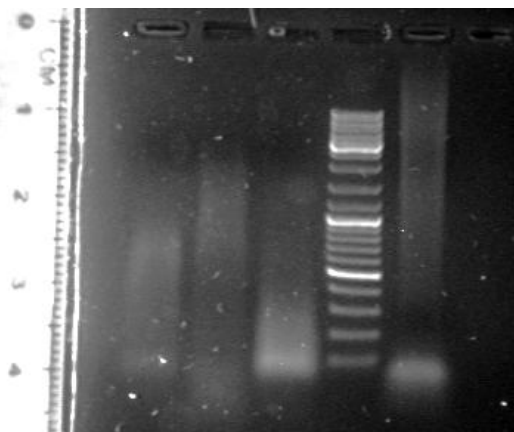


Σειρά ηλεκτροφόρησης:

RACE α1 (0,5μl) / RACE α1 (1μl) / RACE α1 (3μl) / Ladder / RACE α7 (0,5μl) / RACE α7 (1μl) / RACE α7 (3μl) / αρνητικό control

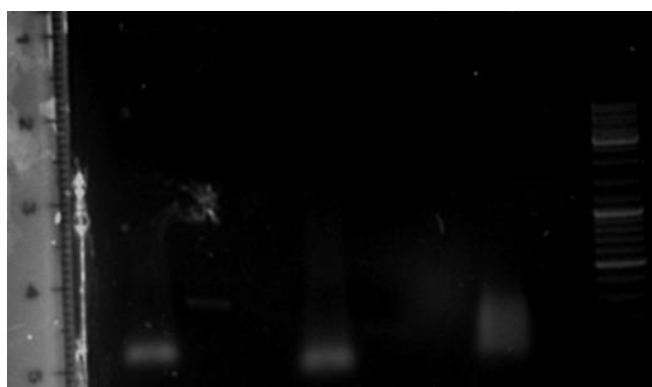
Παρατηρείται μια ζώνη στο δείγμα RACE α1(3μl) και στο δείγμα RACE α1(5μl)

Κάναμε RACE για τις υπομονάδες α1,α6 και α7 με ίδιες συνθήκες με τις αρχικές παραλείποντας τα δείγματα 0,5μl και 3μl σε όλες τις υπομονάδες.



Σειρά φόρτωσης γέλης: RACE α1(1μl)/ RACE α6(1μl)/ RACE α7(1μl)/Ladder/ αρνητικό control

Ακολούθησε rePCR (όπως η αρχική rePCR)



Δεν παρατηρείται κάποιο αξιόλογο αποτέλεσμα.

Έχοντας παρατηρήσει μη σαφή αποτελέσματα από τις προηγούμενες διαδικασίες αποφασίστηκε να εγκαταλειφθεί η προηγούμενη διαδικασία και να ακολουθηθεί νέα.

Έγινε νέα απομόνωση RNA από 8 θηλυκά άτομα και ακολούθως παρασκευή cDNA.

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
RNA	5
Random primers	5
DTT	5
Buffer	10
dNTPs	20
Inhibitor	0,5
Transcriptase	0,7
MgCl ₂	6
H ₂ O	47,8

Το ένζυμο είναι η goscript reverse transcriptase της εταιρίας Promega.

Προεργασία του RNA: 10 λεπτά στους 70°C.

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (minutes)
1	25	10:00
2	42	50:00
3	70	15:00
4	4	forever

Έγινε PCR για τις υπομονάδες α1, α6 και α7. Το cDNA αραιώθηκε σε αναλογία 1:1 και οι εκκινητές 1:10 πριν χρησιμοποιηθούν. Η πρώτη είχε τα την θερμοκρασία των εκκινητών και η δεύτερη έγινε στους 40°C για να χαμηλώσει η ειδίκευση της αντίδρασης.

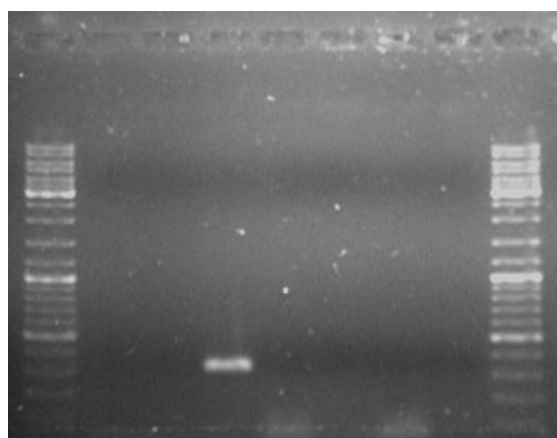
Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	2
buffer	2
MgCl ₂	0,6
dNTPs	1,6
Primer F	0,7
Primer R	0,7
Taq	0,2
H ₂ O	13,2

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν: (AChE), (α1ex7 F/R), (α1ex7 F/R GSP), (α6F/R), (α6 F/R GSP₂), (α7F/R), (α7F/R GSP₂)

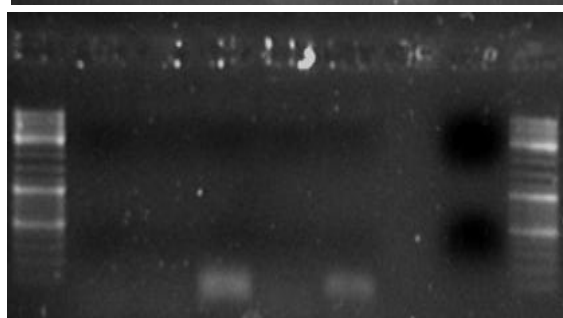
Ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε: BioTaq της εταιρίας Boline.

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (minutes)
1	94	3:00
2	94	0:30
3	Ta	0:30
4	72	1:30
5	Επανάληψη βημάτων 2,3 και 4 30φορές	
6	72	5:00
7	4	forever

Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή



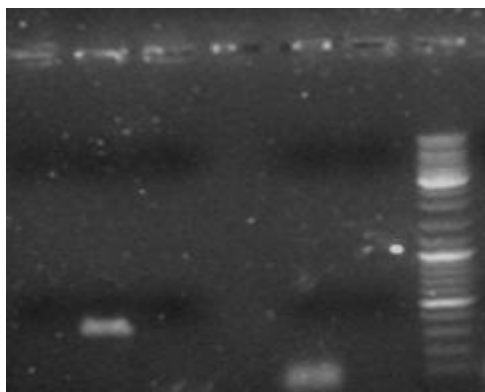
1η PCR Σειρά ηλεκτροφόρησης:
Ladder/ (AChE)/ (α1ex7F/R)/ (α1ex7 F/R GSP)/ (α6F/R)/ (α6 F/R GSP₂) / (α7F/R)/ (α7F/R GSP₂)/Ladder



2η PCR Σειρά ηλεκτροφόρησης:
Ladder/ (AChE)/ (α1ex7F/R)/ (α1ex7 F/R GSP)/ (α6F/R)/ (α6 F/R GSP₂) / (α7F/R)/ (α7F/R GSP₂)/Ladder

Έπειτα δοκιμάστηκαν οι εξής συνδυασμοί εκκινήτων για τον υποδοχέα α6 με τη θερμοκρασία 49°C και ένζυμο την Biotaq ίδια διαδικασία με την ανωτέρω PCR:

1. 9F/12R
2. 9F/10R
3. 6F/6R
4. 6F/12R
5. 6F/10R



Σειρά ηλεκτροφόρησης:
3/4/5/κενό/1/2 Ladder

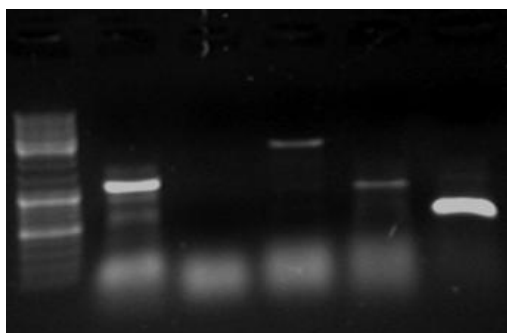
Παρασκευάστηκε εκ νέου cDNA από το απομονωμένο RNA και έγινε PCR με εκκινήτες τους FORO (με αναμενόμενο μέγεθος ~2200 bp) για έλεγχο του μεγέθους cDNA που παρασκευάστηκε και για τον α6 τους Bda6FR (με αναμενόμενο μέγεθος ~1400 bp) και 8F/10R (με αναμενόμενο μέγεθος ~400 bp).

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	2
buffer	2
MgCl ₂	0,6
dNTPs	1,6
Primer F	0,7
Primer R	0,7
Taq	0,2
H ₂ O	13,2

Ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε:
BioTaq της εταιρίας Biotline.

Σειρά ηλεκτροφόρησης:

Ladder/παλαιό δείγμα/αρνητικό control/FORO/Bda6FR/8F10R



Ακολούθησε αποκοπή της ζώνης του Bda6FR, gel extraction και φύλαξη του δείγματος.

Έπειτα από το ίδιο δείγμα cDNA πραγματοποιήθηκαν PCR με διάφορα ένζυμα και εκκινητές τους Bda6FR καθώς και rePCR του δείγματος Bda6FR. Η θερμοκρασία Τα των εκκινητών για όλες τις PCR ήταν 49°C.

Ένζυμο onetaq Hotstart της εταιρίας New England Biolabs

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	2,5
buffer	5
dNTPs	0,125
Primer F	0,7
Primer R	0,7
Taq	0,125
H ₂ O	15,85

Ένζυμο Maximo Taq της εταιρίας GeneOn

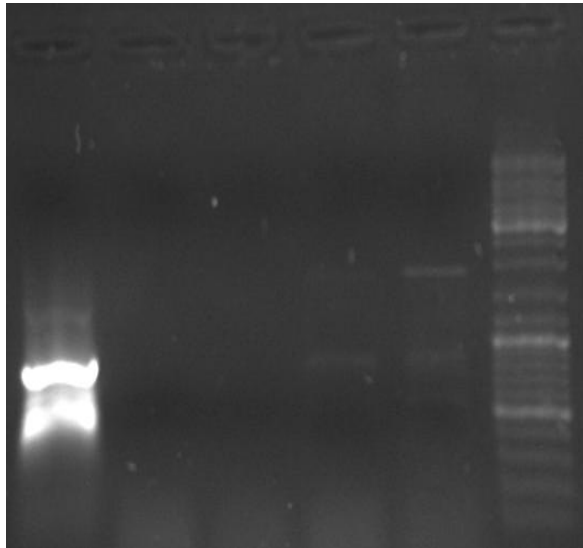
Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	2,5
buffer	2
MgCl ₂	0,3
dNTPs	0,4
Primer F	0,7
Primer R	0,7
Taq	0,2
H ₂ O	13,2

Ένζυμο LongAmp Taq της εταιρίας New England Biolabs

Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	2,5
buffer	5
dNTPs	0,2
Primer F	1
Primer R	1
Taq	1
H ₂ O	14,3

Ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε: BioTaq της εταιρίας Boline.

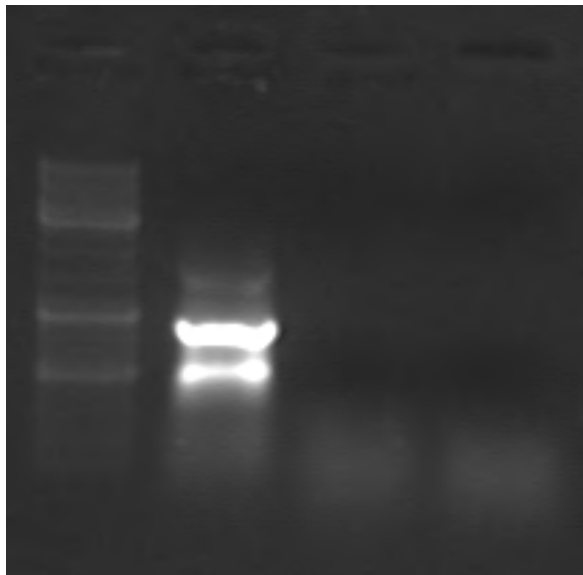
Συστατικά	Ποσότητες(μl)
cDNA	2
buffer	2
MgCl ₂	0,6
dNTPs	1,6
Primer F	0,7
Primer R	0,7
Taq	0,2
H ₂ O	13,2



Σειρά ηλεκτροφόρησης:
RePCR/Taq/Maximo/LongAmp/
Hotstart/Ladder

Παρατηρούνται μη ειδικές ζώνες στην rePCR, ζώνη στις ~900bp για την LongAmp και ζώνες στις ~2000bp και ~900bp για την Hotstart.

Ακολούθησε κόψιμο των ζωνών και gel extraction. Έπειτα έγινε rePCR με θερμοκρασία αναδιάταξης 49° C και ένζυμο BioTaq.



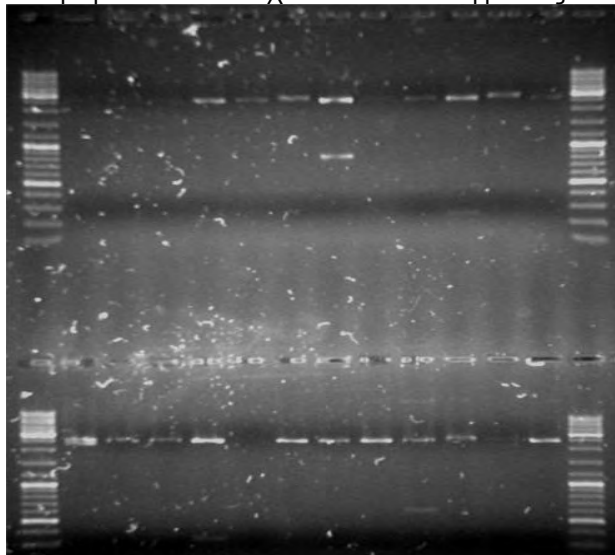
Σειρά ηλεκτροφόρησης:
Ladder/rePCR/
LongAmp/Hotstart

Παρατηρείται ότι η rePCR δίνει 2 καθαρές ζώνες και όχι πολλές μη ειδικές, ενώ τα προϊόντα από τις LongAmp και Hotstart δεν ενισχύθηκαν.

Ακολούθησε αποκοπή της ζώνης, gel extraction και αποστολή για αλληλούχιση. Λόγω μη καθαρού αποτελέσματος στο μέσο του τμήματος ακολούθησε ligation

του δείγματος με πλασμιδιακό φορέα και κλωνοποίηση του σε δεκτικό στέλεχος βακτηρίων.

Ηλεκτροφόρηση πέψης με ένζυμο PvuII της εταιρίας Fermentas (τα νούμερα αντιστοιχούν σε επιλεγμένες λευκές βακτηριακές αποικίες)



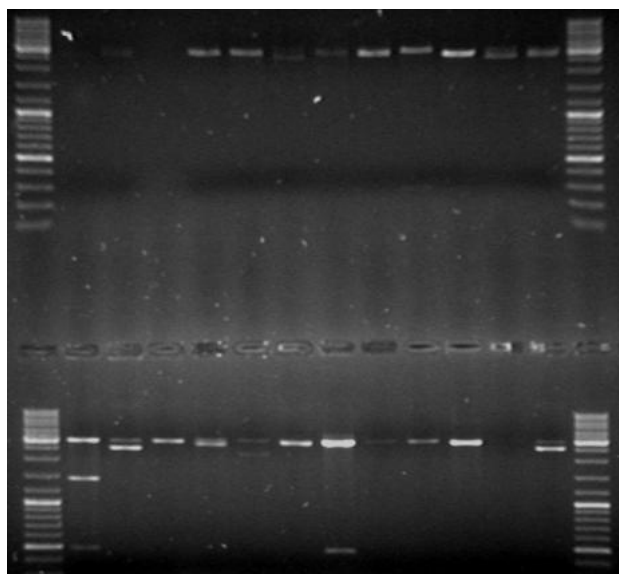
Άνω σειρά:

Ladder/1.1.1/1.1.2/1.1.3/1.4.1
/1.4.2/1.4.3/2.3.1/2.3.2/2.3.3/1
.2.1/1.2.2/1.2.3/Ladder

Κάτω σειρά:

Ladder/2.1.1/2.1.2/2.1.3/2.4.1
/2.4.2/2.4.3/1.3.1/1.3.2/1.3.3/2
.2.1/2.2.2/2.2.3/Ladder

Επαναλήφθηκε η πέψη με 2 ένζυμα αυτή τη φορά NotI και XhoI (αμφότερα της εταιρίας TAKARA).



Άνω σειρά:

Ladder/1.1.1/1.1.2/1.1.3/1.2.2
/1.2.1/1.2.3/1.3.1/1.3.2/1.3.3/1
.4.1/1.4.2/1.4.3/Ladder

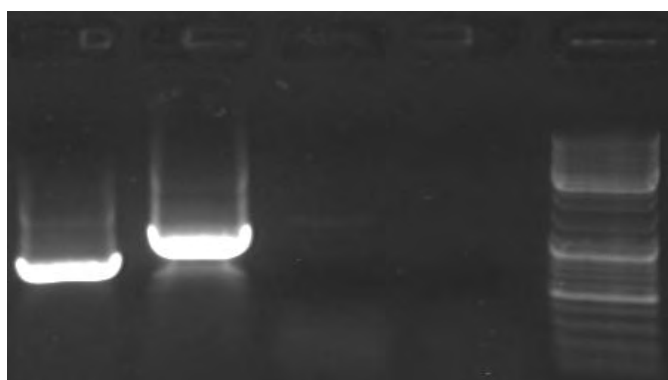
Κάτω σειρά:

Ladder/2.1.1/2.1.2/2.1.3/2.2.1
/2.2.2/2.2.3/2.3.1/2.3.2/2.3.3/2
.4.1/2.4.2/2.4.3/Ladder

Παρατηρείται ότι τα δείγματα 2.2.1, 2.1.2, 2.2.2, 2.3.1, 2.4.1 φέρονται να φέρουν ένθεμα.

Η αλληλούχιση των τμημάτων που στάλθηκαν ήταν ασαφής και περιορισμένου μήκους (τμήματα 100-200 bp) οπότε η διαδικασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές και ανεπιτυχώς.

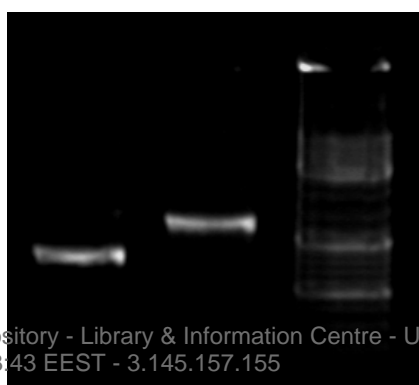
Εντέλει σχεδιάστηκαν εκκινήτες εκατέρωθεν του προβληματικού τμήματος οι Bo.a6F1/ Bo.a6R1 / Bo.a6F2/ Bo.a6R2 οι οποίοι ανά ζεύγος (F1R1 και F2R2) δίνουν αντίστοιχα τμήμα ~700 bp και ~1100bp. Ακολούθησε rePCR από το αρχικό απομονωμένο τμήμα των 2000bp με Τα 50°C, ένζυμο BioTaq και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:



Σειρά ηλεκτροφόρησης:

Bo.a6F1R1/
Bo.a6F2R2/αρνητικό
control 1/ αρνητικό
control 2/Ladder

Αποκόπηκαν αμφότερες οι ζώνες και έγινε gel extraction για τον καθαρισμό τους. Έπειτα έγινε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για να εξακριβωθεί ο καθαρισμός και να γίνει ποσοτικοποίηση για να αποσταλούν για αλληλούχιση.

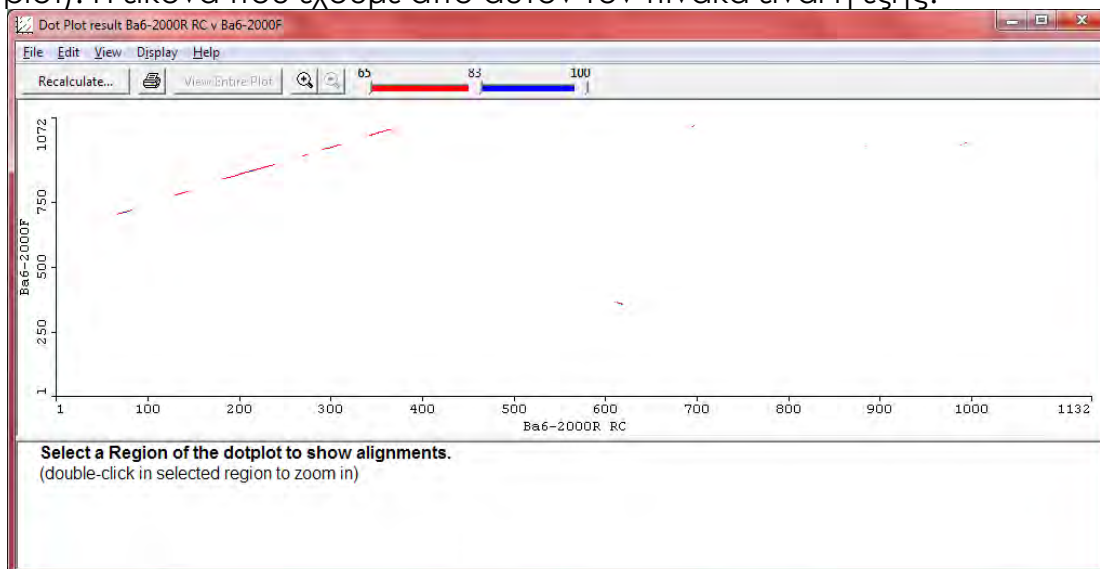


Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ήταν θετικά για το κομμάτι των 700 bp οπότε προχώρησε η επεξεργασία τους για να λάβουμε τελικά το ολοκληρωμένο μετάγραφο της υπομονάδας.

Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση βιοπληροφορικών προγραμμάτων και ιστοτόπων.

Σε κάθε αλληλούχιση που αποστέλλεται επιστρέφει ένα διάγραμμα της αλληλουχίας από το εμπρόσθιο και ένα από το οπίσθιο τμήμα. Με την χρήση του προγράμματος OMIGA το οπίσθιο τμήμα αντιστράφηκε και επίσης έγινε συμπληρωματικό από μια διαδικασία γνωστή ως reverse complement. Έπειτα αφαιρέθηκαν οι εκκινήτες από το εμπρόσθιο και από το οπίσθιο τμήμα και έγινε σύγκριση των 2 με στιγμοπίνακα (dot plot). Η εικόνα που έχουμε από αυτόν τον πίνακα είναι η εξής:



όπου παρατηρούμε την περιοχή όπου αλληλεπικαλύπτονται οι 2 αλληλουχίες. Μπορούμε έτσι να κατασκευάσουμε το σύνθετο μόριο το οποίο έχει αλληλουχία

```
TGKGTATTTSTMGTCCTTCATTTCTTGYAGACGCTCATCATCATCSTGCTTGT  
GTGTATCCAAAGCTGTCAATACTRTACTCAGATTAGKGCAGCATAACC  
GCTTTTGCMAΤΑΤΑΑΤΑΤCTATCAACGAAARACMACGGATCTCGYCKAT  
CCGGYACCTTATCTTCCAGCACCTGTAGGCTTGCGGCTAATTGTATTGAA  
TCAACATCGTCTCATCCGCAAATATATACATACATACTTGTACCCACCC  
GCCCAACAATCGACAACAGTTGTACGTGTGTTATTGCTCGGTAGCTG  
AAATCTAAGGACATGGA CCCGTCGCTGCTTGTCTGT TGATCTTTCTTGTG  
ATAATTAAGAAAGCTGCCAAGGACCACACGAAAAACGTCTACTTAA  
CCACCTACTATCCACCTATAATACACTCGAGCGACCCGTAGCAAACG  
AATCGGAACCGCTGGAAGTCAAATTCGGTTPAACGCTGCAACAAATPAT  
TGATGTGGACGARAGAATCAACTTCTTATAACCAATCTTTGGCTTTCGTT  
GGAGTGGAATGACTATAATTTACGATGGA ATGAATCGGAATATGGAGG
```



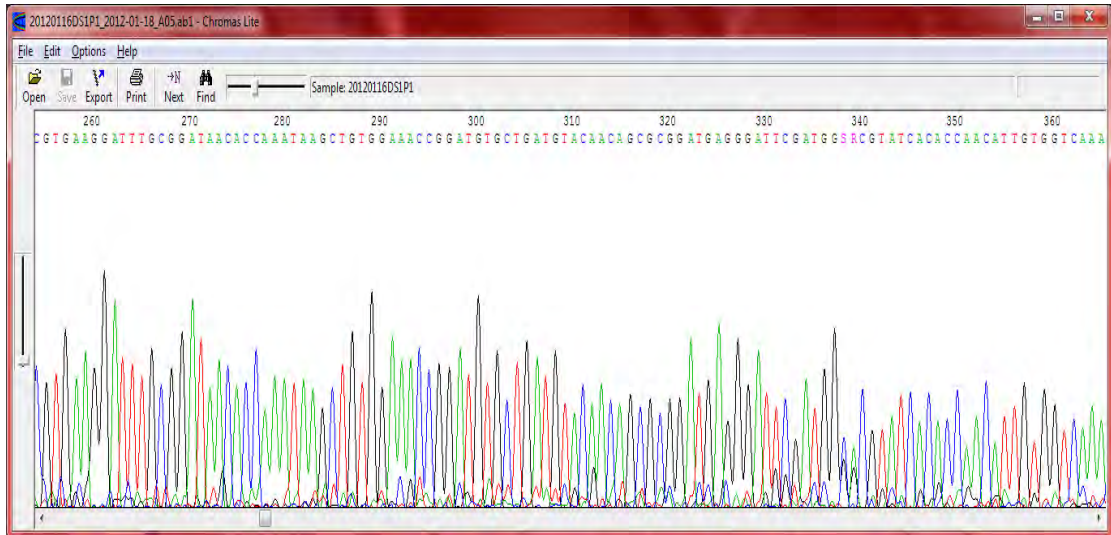
```
CTGCCCGGAACCCTACGTGGACGTCACATTCACGATACAAATCCGA
CGACGTACATTATATTATTTTTCAATTAATTGTGCCGTGTGTGCTGATATC
ATCGATGGCTTTATTAGGATTTACACTACCTCCCGATTCGGGCGAAAAA
CTAACATTAGGMGTWACTATWCTTCTATCCYTMACAGTATTTCTMAAYCTT
GTMGCTGAAWCCATGCCSACAAYRTC GGACGCTRTCCCCCTTATAGG
CACCTACTTCAATTGCATCATGTTTATGGTGGCATCATCGGTGGTGCTGA
CGGKTGTTGTGCTCAACTATCATCATCGCACGGCGGATATACMCGAAA
WGCCG CCTGGATAAATCCGT TTCCTGCAAWGGCTGCCATGGATTT
ACGTATGGGTGTYGTCCGGGCCGTAATAACACMCGAAAAACAATTYTACT
AAGTAATCGCATGAAGGAATTGGAATTAAGGAACGTTYTCCAAATCM
CTACTAGCC AATGTGCTGGATATCGAT GATGATTCGGGCATACGATYTC
CGGTCACAAACGGCGATCGGTCATCAGCAAGTTCGGTCSCCCCM
CAACGGKGGAGGAGCATCATAACMCAATAGGTTGCAATCATAAAGAT
TTACATTTGATTYTTAAARAATTACAATTCATCMCATCACGTATGCGTAAATC
CGAWGATGAGGCGGAATTGATAARCGATTGGAAATTCGCGGCAAWG
GTTGTGGATAGATTTGTTTAAATTGTTTTACGCTCTTTCGATTATCGCMACM
GTGRCCGTTYTGCTGTTCGGCTCCCCMCCAAATTAATMRRCCAATAGT
```

Ομοίως οι ανάστροφοι εκκινητές σημειώνονται με κόκκινο. Με την χρήση του προγράμματος θα βάλουμε την καλά πλέον διαβασμένη εσωτερική περιοχή στο κομμάτι. Η εσωτερική περιοχή που διαβάστηκε καλά ήταν το κομμάτι των 700 περίπου βάσεων και η αλληλουχία είναι αυτή:

```
AACCGGATGTGCTGATGTACAACAGCGCGGATGAGGGATTGATGG
CACGTATCACACCAACATTGTGGTCAAACATGGCGGCAGTTGTCTGTA
CGTGCCCCCTGGTATCTTCAAGAGCACATGCAAGATGGACATCACGT
GGTCCCATTGATGACCAACACTGCGAAATGAAATTCGGTAGTTGGAC
TTACGATGGAAATCAGTTGGATTTGGTTTTGARTTCCGAAGATGGAGGGG
ATCTTCCGATTCATAACAAATGGCGAGTGGTATCTGCTTGCAATGCCT
GGGAAGAAGAATACTATTGTCTACGCGTGCTGCCCGGAACCCTACGT
GGACGTACATTCACGATACAAATCCGACGACGTACATTATATTATTTT
CAATTAATTGTGCCGTGTGTGCTGATATCATCGATGGCTTTATTAGGATTA
CACTACCTCCCGATTCGGGCGAAAACTAACATTAGGMGTAACTATW
CTTCTATCCTTMACAGTRTTTCTMAATCTTGTGCTGAATCCWTGCCGACA
ACRTCKGACGCTGTCCCCCTTATAGGCACCTACTTCAATTGCATCATGTT
ATGGTGGCATCATCGGTGGTGTGCTGACGGTGTGTGCTCAACTATCATC
ATCGCACGG
```

Έπειτα με την χρήση του προγράμματος εντοπίστηκε η θέση του στο ενωμένο τμήμα οπότε και αντικαταστάθηκε η προβληματική αλληλουχία με το νέο τμήμα.

Παρακάτω βλέπουμε μια εικόνα από το πρόγραμμα ChromasLite με μια καλά διαβασμένη περιοχή από το τμήμα των 700 περίπου βάσεων (ο «θόρυβος» που φαίνεται στο κάτω μέρος του γραφήματος είναι ελάχιστος).



Εικόνα 3.1 Χρωματογράφημα από το πρόγραμμα ChromasLite

Αρα το τελικό κομμάτι διαμορφώνεται ως εξής:

```

TGKGTATTTTSTMGTCTTCATTTTCTTGYAGACGCTCATCATCATCSTGCTTGT
GTGTATCCAAAGCTGTCAATACTRTACTCAGATTAGKGACAGCATAACC
GCTTTTTGCMATATAATATCTATCAACGAAARACMACGGATCTCGYCKAT
CCGGYACCTTATCTTCCAGCACCTGTAGGCTTGCGGCTAATTGTATTGAA
TCAACATCGTCTCATCCGCAAATATACATACTTGTACCCACCC
GCCCACAACATCGACAACAGTTGTACGTGTGTTTATTGCTCGGTAGCTG
AAATCTAAGGACATGGACCCGTCGCTGCTTGTCTGTTGATCTTCTTGTG
ATAATTAAGAAAGCTGCCAAGGACCACACGAAAACGTCTACTTAA
CCACCTACTATCCACCTATAACTACTCGAGCGACCCGTAGCAAACG
AATCGGAACCGCTGGAAGTCAAATTCGGTTAACGCTGCAACAAATTAT
TGATGTGGACGARAAGAATCAACTTCTTATAACCAATCTTGGCTTTCGTT
GGAGTGGAATGACTATAATTTACGATGGAATGAATCGGAATATGGAGG
CGTGAAGGATTTGCGGATAACACCAAATAAGCTGTGGAAACCGGATG
TGCTGATGTACAACAGCGCGGATGAGGGATTCGATGGCACGTATCAC
ACCAACATTGTGGTCAAACATGGCGGCAGTTGTCTGTACGTGCCCCCT
GGTATCTTCAAGAGCACATGCAAGATGGACATCACGTGGTCCCATTG
ATGACCAACACTGCGAAATGAAATTCGGTAGTTGGACTTACGATGGAA
ATCAGTTGGATTGGTTTTGARTTCCGAAGATGGAGGGGATCTTCCGATT
CATAACAAATGGCGAGTGGTATCTGCTTGCATGCCTGGGAAGAAGA
ATACTATTGTCTACGCGTGCTGCCCGGAACCCTACGTGGACGTCACAT
TCACGATACAAATCCGACGACGTACATTATATTATTTTCAATTTAATTGTG
CCGTGTGTGCTGATATCATCGATGGCTTATTAGGATTACACTACCTCCC
GATTCGGGCGAAAACTAACATTAGGMGTAACATWCTTCTATCCTTMA
CAGTRTTCTMAATCTTGTGCTGAATCCWTGCCGACAACRTCKGACGC
TGCCCCCTATAGGCACCTACTTCAATTGCATCATGTTATGGTGGCATC
ATCGGTGGTGTGCTGACGGTGTGTGCTCAACTATCATCATCGCACGGC

```



```

GGATATACMCGAAAWGCCCGCCTTGGATTAATCCGTTTTCTGCAAWG
GCTGCCATGGATTTACGATGGGTYGTCCGGGCGTAAAATCACMCG
AAAAACAATTYTACTAAGTAATCGCATGAAGGAATTGGAATPAAAGGAA
CGTYTTCCAAATCMCTACTAGCCAATGTGCTGGATATCGATGATGATTC
CGGCATACGATYTCCGGTTCACAAACGGCGATCGGTTTCATCAGCAAG
PTCGGTCSCCCCMCAACGGKGGAGGAGCATCATAACMCAATAGGTT
GCAATCATAAAGATTTACATTTGATTYTTAAARAATPACAATTCATCMCATCA
CGTATGCGTAAATCCGAWGATGAGGCGGAATTGATAARCGATTGGAA
ATTCGCGGCAAWGGTTGTGGATAGATTTGTTAATTGTTTTACGCTCTTTW
CGATTATCGCMACMGTGRCCGTYTGCTGTCGGCTCCCCMCCAAATTA
ATMRRCCAATAGT

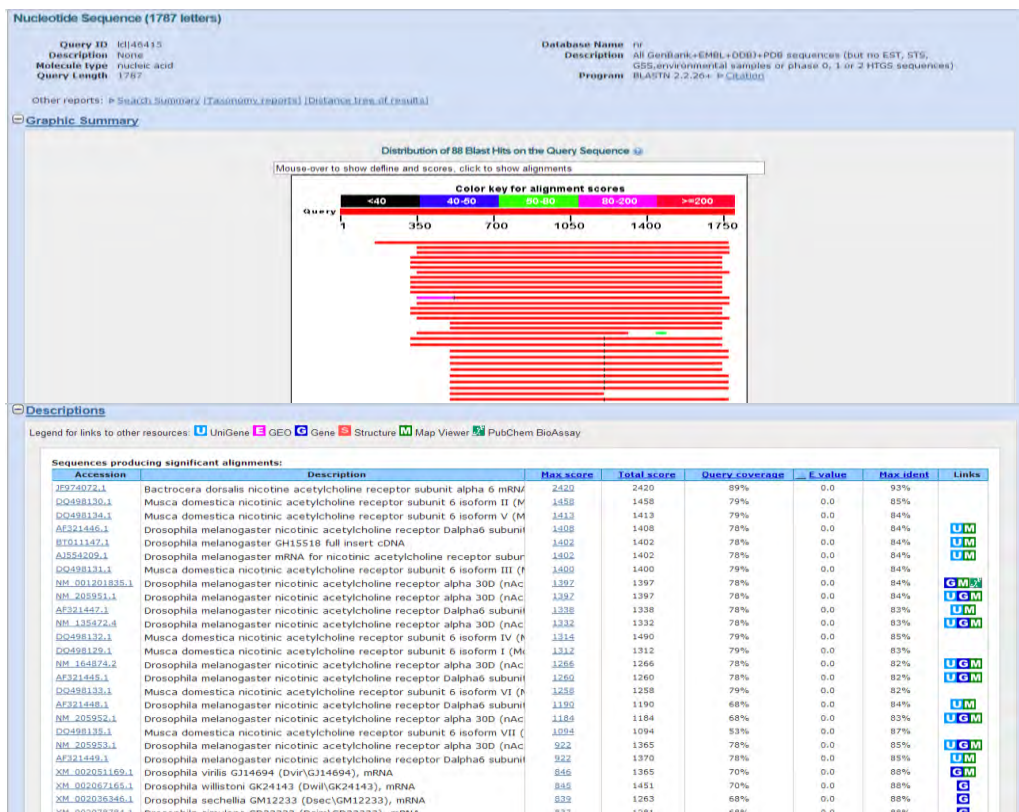
```

Με πράσινο χρώμα είναι το εσωτερικό κομμάτι όπου επαναλήφθηκε η αλληλούχιση.

Επόμενο βήμα είναι η αντιπαραβολή του αλληλουχθέντος κομματιού με διαδικτυακές βάσεις δεδομένων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο ιστότοπος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και συγκεκριμένα το nucleotide BLAST το οποίο εμπεριέχει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Ορίσαμε βάση δεδομένων OTHERS και επιλογή για Optimize for Highly similar sequences (megablast).

Παρατηρείται ότι 1^ο αποτέλεσμα είναι από συγγενικό είδος του *Bactrocera oleae* το *Bactrocera dorsalis*. Η κάλυψη που επετεύχθη είναι 89% και το E-value (στατιστική τυχαιότητα) 0,0.

Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα επιχειρήθηκε η μετάφραση του κομματιού σε πρωτεΐνη.



Εικόνες 3.2 και 3.3
Αποτελέσματα BLAST

Ο ιστότοπος embi-ebi (European Bioinformatics Institute) μετέφρασε το κομμάτι με εξής αλληλουχία αμινοξέων:

```
>EMBOSS_001_1
XVIXXSSFSRCRRSSSSCLLCIQSCQYXQTQIXDSITAFXCXIIISINEXXRISXIRXLIFQHL
*ACG*LY*INIVSSANIYIHTCTHPPTTSTTVVRFVIAR*LKSKMDPSSLVVLIFLVI I
KESCQGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESSEPLEVKFGLTLQQIIDVDEKNQLLITNLW
LSLEWNDYNLRWNESEYGGVKDLRITPNKLNKPDVLMYNSADEGFDGTYHTNIVVKHGGG
CLYVPPGIFKSTCKMDITWFPFDDQHCEMKFGSWTYDGNQLDLVLXSEGGDLSDFITNG
EWYLLAMPKKNITVYACCPYVDVFTTIQIRRRTLYYFFNLIVPCVLISSMALLGFTL
PPDSGEKLTIGVTXLLSXTVFLNLVAESXPPTSDAVPLIGTYFNCIMFMVASSVVLTVVV
LNYHHRTADIXEPPWIKSVFLQXLPWILRMGXPGRKITRKTIXLSNRMKELELKERXSK
SLLANVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFGXPXTXEEHHNXIGCNHKDLHLIXKXIQFI
XSRMRKXSDEAELIXDWKFAAXVDRFCLIVFTLFXIIATVXVXLSAPXQINXPIV
```

Ο ιστότοπος <http://insilico.ehu.es/translate/index2.php> μπορεί να μας δώσει μερικές πληροφορίες παραπάνω για την αλληλουχία μας:

Optimized for [Mozilla/Firefox](#)

Click the arrows to see DNA and protein sequences
 Minimum number of aminoacids: 50 (go back to change)
 Length of DNA sequence: 1787 nt

Save the source of this file to your computer in order to save this information.
[Show all frames](#)
[Show translations alignment](#)
[Hide](#)

LKSKMDPSSLVVLIFLVI	IKESCQGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESSEPLEVKFGL	60
TLQQIIDVDXNKQLLITNLWLSLEWNDYNLRWNESEYGGVKDLRITPNKLNKPDVLMYNS	120	
ADEGFDGTYHTNIVVKHGGCLVFPISFKSTCKMDITWFPFDDQHCEMKFGSWTYDGNQ	180	
LDLVLXSEGGDLSDFITNGEWYLLAMPKKNITVYACCPYVDVFTTIQIRRRRLYYF	240	
FNLIVPCVLISSMALLGFTLPPDSGEKLTIGVTXLLSXTVFLNLVAESXPPTSDAVPLIG	300	
TYFNCIMFMVASSVVLTVVVVNYHHRTADIXEPPWIKSVFLQXLPWILRMGXPGRKITR	360	
KTIXLSNRMKELELKERXSKSLLANVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFGXPXTXEEH	420	
NKIGCNHKDLHLIXKXIQFISXSRMRKXSDEAELIXDWKFAAXVDRFCLIVFTLFXIIAT	480	
VXVXLSAPXQINXPIV	496	

TGKGTATATT	ISMTGCTTC	ATTTTCTIGY	AGACGCTCAT	CATCATCTG	CTTGITGTG	60
ATCCAAAGCT	GTCATAACTR	TACTCAGATT	AGKGCAGCA	TAACCGCTTT	TTGCMATATA	120
ATATCTATCA	ACGAARACM	ACGGATCTCG	YKATCCGGY	ACCTTATCTT	CCAGCACCTG	180
TAGCGTCCG	GCTATATGTA	TTGATCAGC	ATCGTCTCAT	CCGCAATAT	ATACATAGAT	240
ACTGTACCC	ACCCGCCAC	AACATCGACA	ACAGTTGTAC	GTGTGTTAT	TGCTCGGTAG	300

Εικόνα 3.4 Αποτελέσματα ιστοτόπου insilico. Τα βέλη συμβολίζουν τα πλαίσια ανάγνωσης. Στο μέσο η μεταφρασμένη αλληλουχία και κάτω η νουκλεοτιδική (με μαύρο όσα νουκλεοτίδια δεν περιλαμβάνονται στο πλαίσιο μετάφρασης και κόκκινο όσα περιλαμβάνονται

Παρατηρούμε ότι εμπεριέχονται και κωδικόνια τερματισμού στην αλληλουχία οπότε πρέπει να την επανεξετάσουμε. Από το BLAST είχαμε δει ότι οι ομοιότητα της αλληλουχίας μας με του *B.dorsalis* ξεκινάει από το 163^ο νουκλεοτίδιο για την δική μας και από το 40^ο του *B.dorsalis* και τελειώνει στο 1763^ο του δικού μας και στο 1654^ο του *B.dorsalis*. Οπότε πήραμε το κομμάτι αυτό και το επανεξετάσαμε.

```
CTATCTTCCAGCACCTGTAGGCTTGCGGCTAATTGATTTGAATCAACATC
GTCTCATCCGCAAATATATACATACATACTGTACCCACCCGCCCA
ACATCGACAACAGTTGTACGTGTGTTATTGCTCGGTAGCTGAAATCTAA
GGACATGGACCCGCTGCTGCTGTTGATCTTTCTTGATGATAATTA
AGAAAGCTGCCAAGGACCACACGAAAAACGCTACTTAACCACCTA
CTATCCACCTATAATACACTCGAGCGACCCGTAGCAAACGAATCGGA
ACCGCTGGAAGTCAAATTCGGTTAACGCTGCAACAAATATTGATGTG
GACGARAAGAATCAACTTCTTATAACCAATCTTTGGCTTTCGTTGGAGTG
GAATGACTATAATTTACGATGGAATGAATCGGAATATGGAGGCGTGAA
GGATTTGCGGATAACACCAAATAAGCTGTGGAAACCGGATGTGCTGAT
GTACAACAGCGCGGATGAGGGATTCGATGGCACGTATCACACCAAC
```

```

ATTGTGGTCAAACATGGCGGCAGTTGTCTGTACGTGCCCCCTGGTATCT
TCAAGAGCACATGCAAGATGGACATCACGTGGTCCCATTGATGACC
AACTGCGAAATGAAATCGGTAGTTGGACTACGATGGAAATCAGTT
GGATTTGGTTTGARTCCGAAGATGGAGGGGATCTTCCGATTTCATAAC
AAATGGCGAGTGGTATCTGCTTGCAATGCCTGGGAAGAAGAATACTATI
GTCTACGCGTGTGCTGCCCGGAACCCTACGIGGACGTCACATTCACGAT
ACAAATCCGACGACGTACATTATAATTTTTCAATTAATGTGCCGTGTG
TGCTGATATCATCGATGGCTTATAGGATTACACTACCTCCCGATTCGG
GCGAAAACTAACATTAGGMGTAACATWCTTCTATCCTMACAGTRTTT
CTMAATCTGTGCTGAATCCWTGCCGACAACRTCKGACGCTGTCCCC
CTATAGGCACCTACTTCAATTGCATCATGTTATGGTGGCATCATCGGTG
GTGCTGACGGTGTGTGCTCAACTATCATCATCGCACGGCGGATATAC
MCGAAAWGCCGCCTTGGATTAATCCGTTTTCCCTGCAAWGGCTGCCA
TGGATTTACGTATGGGYGTCCGGGGCCGTAAAATCACMCGAAAAACA
ATYTACTAAGTAATCGCATGAAGGAATTGGAATTAAGGAACGTTYTTCC
AAATCMCTACTAGCCAATGTGCTGGATATCGATGATGATTCCGGGCATA
CGATYTCGGTTCACAAACGGCGATCGGTCATCAGCAAGTTCCGGTC
SCCCCMCAACGGKGGAGGAGCATATAACMCAATAGGTTGCAATCA
TAAAGATTACATTTGATTYPTAAARAATTACAATCATCMCATCACGTATGC
GTAAATCCGAWGATGAGGCGGAATTGATAARCGATTGGAAATTCGCG
GCAAWGGTTGTGGATAGATTTGTTTAAATGTTTTACGCTCTTWCATTATC
GCMACMGTGRCCGTTYTGCTGTCCGGCTCC

```

Με την χρήση των ίδιων ιστότοπων με πριν τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

Embl-ebi

```

LIFQHL*ACG*LY*INIVSSANIYIHTCTHPPTTSTTVVRVFIAR*LKSKDMDPSLLVVL
IFLVIIEKESCQGPHEKRLLNHLLSTYNTLERPVANESPLEVKFGLTLQQIIDVDEKNQL
LITNLWLSLEWNDYNLRWNESEYGGVKDLRITPNKLWKPDVLMYNSADEGFDGTYHTNIV
VKHGGSCLYVPPGIFKSTCKMDITWFPDDQHCEMKFGSWTYDGNQLDLVLXSEGGDLS
DFITNGEWYLLAMPKKNITIVYACCPYVDVTFITQIRRRTLYYFFNLIVPCVLISSMA
LLGFTLPPDSGEKLTLGVTXLLSXTVFLNLVAESXPPTS DAVPLIGTYFNCIMFMVASSV
VLTVVVVLNYHHRITADIXEPPWIKSVFLQXLPWILRMGXPRKIIRKTIKXLSNRMKELEL
KERXSKSLLANVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFGXPXTXEEHHNXIGCNHKDLHLIX
KXLQFIXSRMRKSDXAELIXDWKFAAXVDRFCLIVFTLFXIIATVXVXLSAP

```

Παρατηρούμε 4 κωδικόνια λήξης συμβολισμένα με αστερίσκους οπότε τα επανεξετάζουμε αντιπαραβάλλοντας τα με την αλληλουχία του *B.dorsalis*. Υπάρχουν και 4 στην αλληλουχία του *B.dorsalis*. Πιθανόν να συμβαίνει αλλαγή αναγνωστικού πεδίου κατά την μεταγραφή οπότε να παρακάμπτονται. Εφόσον δεν παρατηρείται αλλαγή στα κωδικόνια λήξης η ανάλυση συνεχίζεται με βάση την αρχική μετάφραση που πραγματοποιήθηκε.

Structure Entity Query: Your search is an entity-based query. The 86 entities (unique chains) map to 79 PDB entries (structures).

Query Parameters: [Query Details](#) | [Save Query to MyPDB](#)

Sequence Search:
 XTIXSSFFCGRSSSSLLCTQSCQVTKQIKDSTAFACIKIISINEXKRIKIKLIFQHL *ACG-LV*INIVSSAMVHTCTHPTTSTTVVVFVFIAR*LNKXMDPSLLVULFLVLI
 KESCCQFHEKRLINRLLSTYNLLEPVAESEPLEVFKGLTQQIIVDENKLLINLW LSELENDINLRWSEIPGGVLDLITPKLWKPVLMNNSADSGFDGTHYHNIIVRGGG
 CLIVFPFIFKSTCKNDITWFFDQHCMEFSGSWTYDGNQLDLVLAESDGGDLSDFITNG EYLLAMPKKNITVYACCEPFDVDTFTIQIRRTLYFFNLIIVPCLVLISSHALLGFTL
 PFDGKELTGLVTKLXSVFLVFLVAESKPTSDAVPLIGTYFCIMPMVASVVLIVV LNYHRTADIKEXFPWIKSVFLQKLPWILRMGKPKRITRKTIXLNSPMKLELKERKSK
 SLALVLDIDDDFRHTISGSQTAIGSSASFGKFKTKEHHNIXICNKHDLHLIKKLGFTI XSPMRKSDREARLIXMKFAKXVDFPFLVFTLFAITATVWKLAFKQINAPIV
 Expectation Value = 0.01, Search Tool = blast, Mask Low Complexity=yes

Query Refinements: [Select an item or pie chart](#)

Organism
 Taxonomy
 Experimental Method
 X-Ray Resolution
 Release Date

- Organism:**
 - Aplysia californica (40)
 - Lymanaea stagnalis (14)
 - Torpedo marmorata (10)
 - Gloeobacter violaceus PCC 7421 (8)
 - Gloeobacter violaceus (6)
 - Caenorhabditis elegans (4)
 - Homo sapiens (3)
 - Other (2)
- Taxonomy:**
 - Eukaryota (71)
 - Bacteria (14)
 - Unassigned (1)
- Experimental Method:**
 - X-RAY (74)
 - Electron Microscopy (8)
 - Solution NMR (4)
- X-Ray Resolution:**
 - 1.5 - 2.0 Å (7)
 - 2.0 - 2.5 Å (23)
 - 2.5 - 3.0 Å (15)
 - 3.0 and more Å (29)
 - more choices...
- Release Date:**
 - 2000 - 2005 (8)
 - 2005 - 2010 (33)
 - 2010 - today (45)
 - this year (2)
 - more choices...

Polymer Type
 Sequence length
 SCOP Classification

- Polymer Type:**
 - Protein (86)
- Sequence length:**
 - less than 50 (1)
 - 100 - 200 (3)
 - 200 - 300 (60)
 - 300 - 500 (22)
 - more choices...
- SCOP Classification:**
 - All beta proteins (5)
 - Membrane and cell surface prote ... (4)
 - Small proteins (2)

Display/Download:

Displaying results 1 - 25 of 86 total | Page 1 of 4 | Jump to page:

2BG9 REFINED STRUCTURE OF THE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR AT 4A RESOLUTION.
 Chain(s): A,D
 Authors: Unwin, N. P.
 Release: 2005-02-16
 Experiment: ELECTRON MICROSCOPY
 Compound: 4 Polymers [[Display Full Polymer Details](#) | [Display for All Results](#)]
 Alignment: E-Value: 3.53252E-65 Score: 629 [[Display Full Alignment](#) | [Display for All Results](#)]
 Citation: Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4A Resolution (2005) J.Mol.Biol. 346: 967 [[Display Full Abstract](#) | [Display for All Results](#)]
 Molecule of the Month: Molecule of the Month: Acetylcholine Receptor

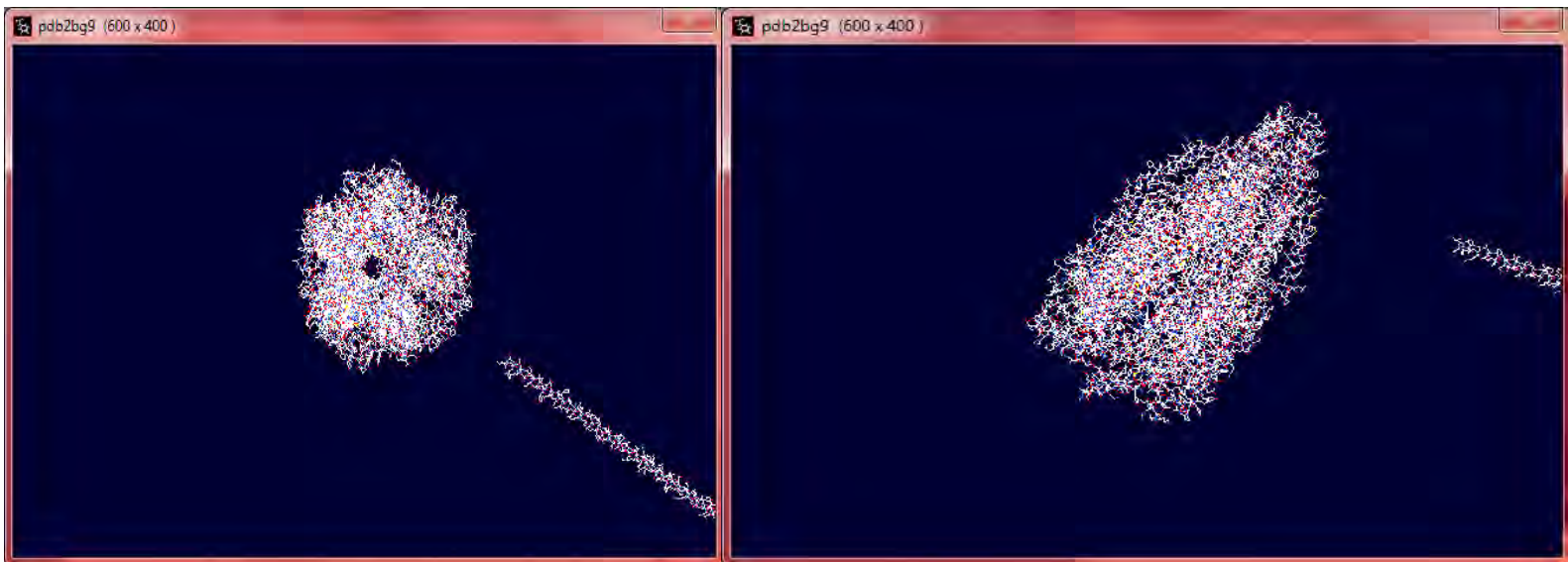
2BG9 REFINED STRUCTURE OF THE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR AT 4A RESOLUTION.
 Chain(s): E
 Authors: Unwin, N. P.
 Release: 2005-02-16
 Experiment: ELECTRON MICROSCOPY
 Compound: 4 Polymers [[Display Full Polymer Details](#) | [Display for All Results](#)]
 Alignment: E-Value: 9.88671E-55 Score: 539 [[Display Full Alignment](#) | [Display for All Results](#)]
 Citation: Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4A Resolution (2005) J.Mol.Biol. 346: 967 [[Display Full Abstract](#) | [Display for All Results](#)]
 Molecule of the Month: Molecule of the Month: Acetylcholine Receptor

Εικόνες 3.5 και 3.6 Αποτελέσματα αναζήτησης Protein Data Bank

Στη συνέχεια αντιπαραβλήθηκε το μεταφρασμένο πλέον κομμάτι με τις αλληλουχίες της Protein Data Bank.

Το 1^ο αποτέλεσμα είναι νικοτινικός υποδοχέας του είδους *Torpedo marmorata* (είδος σαλαχιού) με E-value εξαιρετικά χαμηλό. Το αποτέλεσμα είναι περίεργο δεδομένης της εξελικτικής απόστασης που χωρίζει τα είδη γι αυτό και αντιπαραβάλαμε και την πρωτεϊνική αλληλουχία του *B.dorsalis* με τον ίδιο τρόπο προσπαθώντας να εξακριβώσουμε τα αποτελέσματα που λάβαμε. Περιέργως τα αποτελέσματα ήταν ίδια ακριβώς οπότε η ανάλυση προχώρησε με τον νικοτινικό υποδοχέα του *T.marmorata*. Η τρισδιάστατη δομή του μορίου στο χώρο είναι διαθέσιμη στον ιστότοπο και την «κατεβάσαμε» για τα επόμενα βήματα.

Με την βοήθεια του προγράμματος DeepView/Swiss-PDBViewer ανοίχθηκε αρχικά το μοντέλο γνωστής δομής και έπειτα φορτώθηκε η δική μας αμινοτελική αλληλουχία. Με την χρήση του Magic Fit αναδιπλώθηκε η αλληλουχία μας με γνώμονα το γνωστό πρότυπο.



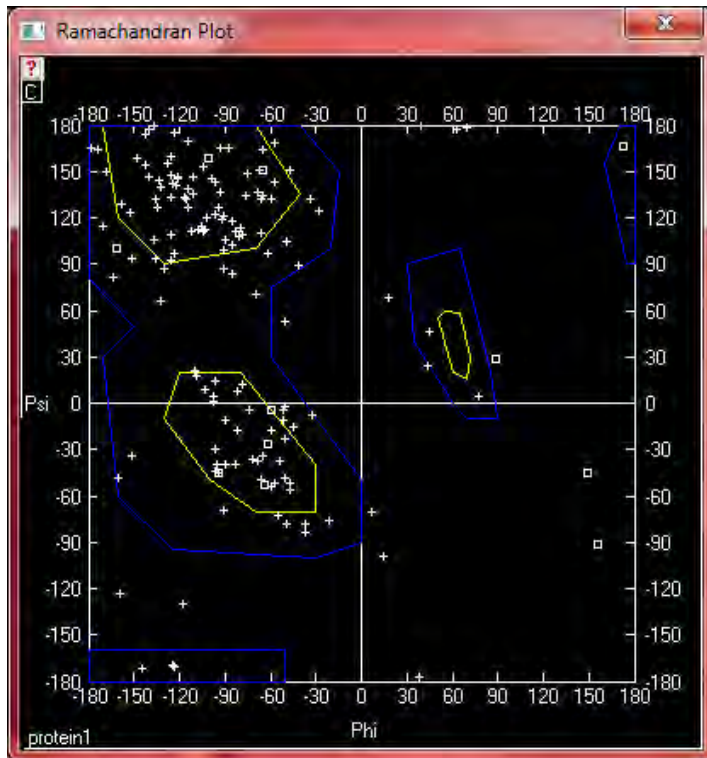
Εικόνες 3.7 και 3.8 Απεικόνιση στο ίδιο παράθυρο του γνωστού νικοτινικού υποδοχέα (σε τρισδιάστατη μορφή) και της αμινοτελικής αλληλουχίας μας (το ευθύ μόριο

protein1	visible	can move
group	show side	label
h ILE106	v	
h LYS107	v	
h GLU108	v	
h SER109	v	
h CYS110	v	
h GLN111	v	
h GLY112	v	
h PRO113	v	
h HIS114	v	
h GLU115	v	
h LYS116	v	
h ARG117	v	
h LEU118	v	
h LEU119	v	
h ASN120	v	
h HIS121	v	
h LEU122	v	
h LEU123	v	
h SER124	v	
h THR125	v	
h TYR126	v	
h ASN127	v	
h THR128	v	
h LEU129	v	
h GLU130	v	
h ARG131	v	
h PRO132	v	
h VAL133	v	
h ALA134	v	
h ASN135	v	
h GLU136	v	
h SER137	v	
h GLU138	v	
h PRO139	v	
h LEU140	v	
h GLU141	v	
h VAL142	v	
h LYS143	v	
h PHE144	v	
h GLY145	v	
h LEU146	v	
h THR147	v	
h LEU148	v	
h GLN149	v	
h GLN150	v	
h ILE151	v	
h ILE152	v	

Εικόνα 3.9(αριστερά) Το control panel μας πληροφορεί ότι μετά το Magic Fit τα αμινοξέα της αλληλουχίας μας από την γλυκίνη 112 και έπειτα συμμετέχουν (με κόκκινο χρώμα)

protein1	visible	can move
group	show side	label
h PHE390	v	
h MET391	v	
h VAL392	v	
h ALA393	v	
h SER394	v	
h SER395	v	
h VAL396	v	
h VAL397	v	
h LEU398	v	
h THR399	v	
h VAL400	v	
h VAL401	v	
h VAL402	v	
h LEU403	v	
h ASN404	v	
h TYR405	v	
h HIS406	v	
h HIS407	v	
h ARG408	v	
h THR409	v	
h ALA410	v	
h ASP411	v	
h ILE412	v	
h GLU413	v	
h PRO414	v	
h PRO415	v	
h TRP416	v	
h ILE417	v	
h LYS418	v	
h SER419	v	
h VAL420	v	
h PHE421	v	
h LEU422	v	
h GLN423	v	
h LEU424	v	
h PRO425	v	
h TRP426	v	
h ILE427	v	
h LEU428	v	
h ARG429	v	
h MET430	v	
h GLY431	v	
h PRO432	v	
h GLY433	v	
h ARG434	v	
h LYS435	v	
h ILE436	v	

Εικόνα 3.10(δεξιά) Το control panel μας πληροφορεί ότι μετά το Magic Fit τα αμινοξέα της αλληλουχίας μας μέχρι και την λευκίνη 403 και έπειτα συμμετέχουν (με κόκκινο χρώμα)



Εικόνα 3.11
Ramachadran Plot

Το Ramachadran plot έχει 39 αμινοξέα εκτός αυστηρών ορίων (οι κίτρινες γραμμές) και η αλληλουχία μας περιλαμβάνει 11 γλυκίνες. Άρα το score της αλληλουχίας μας είναι: 82,82%.

Ακολουθήσε έλεγχο του μοντέλου στον ιστότοπο
<http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.cgi>

SBC STOCKHOLM BIOINFORMATICS CENTER

ProQ - Results

Prediction not using predicted secondary structure
(OBS: By using predicted secondary structure the prediction will be more reliable)

Predicted LGscore: **1.756**
Predicted MaxSub: **0.153**

Different ranges of quality:
LGscore>1.5 fairly good model
LGscore>2.5 very good model
LGscore>4 extremely good model

MaxSub>0.1 fairly good model
MaxSub>0.5 very good model
MaxSub>0.8 extremely good model

Paper about quality measures:
A study of quality measures for protein threading models.
Cristobal S, Zemla A, Fischer D, Rychlewski L, Elofsson A.
BMC Bioinformatics 2001,2(1):5<i>j>

Εικόνα 3.12
Αποτελέσματα μοντέλου

4.Συζήτηση

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που αποκτήθηκε από την ανωτέρω διαδικασία όπως δείξαμε είναι αρκετά καλή. Αυτό στηρίζεται στα

γεγονότα ομοπαράθεσης της αλληλουχίας τόσο σε νουκλεοτιδική μορφή, όσο και μεταφρασμένη σε πρωτεΐνη. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις δείξαμε ότι η αλληλουχία αντιστοιχεί σε νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης και μάλιστα συγγενικού είδους στην περίπτωση της νουκλεοτιδικής. Χρηστό θα ήταν να υπήρχε ένα τρισδιάστατο μοντέλο του υποδοχέα από κάποιο συγγενικό είδος ή έστω από κάποιο αρθρόποδο για καλύτερη μοντελοποίηση. Το Ramachandran plot που προέκυψε είναι 82,82% και είναι μικρότερο από το αναμενόμενο για καλό μοντέλο το οποίο απαιτεί ποσοστό άνω του 90% για τα αυστηρά όρια του plot. Τα αμέσως επόμενα όρια απαιτούν 98% και το μοντέλο μας έχει 94,16%. Αυτό δείχνει ότι ίσως αν κρυσταλλοποιηθεί καλά ένας νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης από συγγενές είδος το μοντέλο θα γίνει αρκετά καλό ώστε να πληροί τα τις προϋποθέσεις του Ramachandran plot καθότι οι διαφορές μεν υπάρχουν αλλά δεν αποκλίνει πάρα πολύ. Εξάλλου και τα αποτελέσματα από τον ιστότοπο του Βιοπληροφορικού Κέντρου της Στοκχόλμης συμφωνούν ότι πρόκειται για ένα σχετικά καλό μοντέλο αλλά έχει περιθώρια βελτιστοποίησης.

Μελλοντικά θα ήταν χρήσιμη η μελέτη του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του δάκου σε ανθεκτικά έντομα ώστε να εντοπιστούν διαφορές στο γονίδιο που ίσως καταδεικνύουν πιθανά αίτια ανθεκτικότητας του είδους στο νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο Spinosad. Επιπρόσθετα θα πρέπει να γίνει μια έρευνα πάνω στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου, αλλά και αν υπάρχουν και άλλα ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται σε απομακρυσμένη θέση στο γονιδίωμα. Θα ήταν χρήσιμη η επανάληψη των πειραμάτων προς ανάκτηση καλύτερης αλληλουχίας ώστε να εξαιρεθούν τα κωδικόνια λήξης που βρίσκονται στην αρχή και να εντοπιστεί η θέση της Μεθειονίνης που σηματοδοτεί την έναρξη σε κάθε μετάγραφο mRNA. Έπειτα θα πρέπει να γίνει ανάλυση του γονιδιώματος σε επίπεδο DNA ώστε να προσδιοριστούν τα ιντρόνια και αν αυτά έχουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο (πχ RNAi) αρχικά και μετά να συνεχιστεί η έρευνα με αλληλούχιση των γειτονικών περιοχών έχοντας αφητηρία το γονίδιο της υπομονάδας α6 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Σε επόμενο επίπεδο θα πρέπει να γίνει μια προσπάθεια κρυστάλλωσης όλου του υποδοχέα ώστε να προσδιοριστεί επακριβώς η τρισδιάστατη δομή του και γιατί αυτή η δομή δεν ομοιάζει με κάποια από άλλο έντομο, αλλά μοιάζει με εκείνην του *T.marmorata* και στις δύο περιπτώσεις (*B.oleae* και *B.dorsalis*). Ασφαλώς η ίδια έρευνα πρέπει να γίνει και σε ανθεκτικά άτομα του είδους.

Το Spinosad όπως προαναφέρθηκε είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης παραγόμενος από ένα είδος Ακτινοβακτηρίου. Η δομή του συνεπώς μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας υπολογιστικά προγράμματα ώστε αυτό να εμφανίζει υψηλότερη δράση ανάλογα με το είδος που στοχεύεται και χαμηλότερη τοξικότητα σε μη στοχευόμενα είδη. Επίσης θα ήταν χρήσιμη μια έρευνα σχετικά με την δράση του Spinosad και σε μη συμβατικούς στόχους όπως στην περίπτωση των Ισόποδων που ταλανίζουν τις ιχθυοκαλλιέργειες, λαμβάνοντας υπόψη την χαμηλή προς μεσαία τοξικότητα που εμφανίζει το Spinosad στα ψάρια.

Βιβλιογραφία

Agrosciences, D., Naturalyte * Fruit Fly Bait.

Allen, N.J. & Barres, B.A., 2009. Neuroscience: Glia [mdash] more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), pp.675-677. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/457675a>.

Azevedo, F. a C. et al., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology*, 513(5), pp.532-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226510> [Accessed July 18, 2011].

Balavoine, G. & Adoutte, A., 2003. The segmented urbilateria: a testable scenario. *Integrative and comparative biology*, 43(1), pp.137-47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680418>.

Bayer, POTATO Neonicotinoid Insecticides.

Benjamin, D.K. & Scarborough, B., 2012. Colony CollaPsE disoRdER : The maRKET REsPonse To bEE disEasE Recent eSSAyS PERC PoliCy SERIES. *Distribution*.

Burn, P.-j H., 1934. Proceedings of the Royal Society of Medicine Vol . 319 of the Royal Society of Medicine. *Medicine*, 319.

Cavalier-Smith, T., 2004. Only six kingdoms of life. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 271(1545), pp.1251-62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1691724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2011].

Clarke, B. & Work, F., 1988. *JAM. Pacific Science*, 42, pp.150-153.

Corbel, V. et al., 2004. Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. *Journal of medical entomology*, 41(4), pp.712-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311465>.

Daly, H., Doyen, J. & Purcells, A., *Introduction to Insect Biology and Diversity*,

- Fayyazuddin, A. et al., 2006. The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ is required for an escape behavior in *Drosophila*. *PLoS biology*, 4(3), p.e63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1382016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2011].
- Finnerty, J.R., 2003. The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *The International journal of developmental biology*, 47(7-8), pp.523-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756328>.
- Finnerty, J.R. et al., 2004. Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675), pp.1335-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131263>.
- Gao, J.-R., Deacutis, J.M. & Scott, J.G., 2007. The nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 6$ from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification. *Insect molecular biology*, 16(3), pp.325-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439546> [Accessed January 26, 2012].
- Gundelfinger, E.D., 1992. How complex is the nicotinic receptor system of insects? *Trends in neurosciences*, 15(6), pp.206-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378663>.
- Harzsch, S., 2006. Neurophylogeny: Architecture of the nervous system and a fresh view on arthropod phylogeny. *Integrative and comparative biology*, 46(2), pp.162-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672733> [Accessed July 17, 2011].
- Itier, V. & Bertrand, D., 2001. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS letters*, 504(3), pp.118-25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532443>.
- Jacobs, D.K. et al., 2007. Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integrative and comparative biology*, 47(5), pp.712-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669752> [Accessed July 15, 2011].
- Kahle, W., 2003. *Color Atlas of Human Anatomy*,

- Kandel, E.J. [Main author] et al., *Principles of neural science*, New York : McGraw-Hill, Health Professions Division. Available at: <http://www.loc.gov/catdir/description/mh023/99044479.html>.
- Karlin, A., 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(2), pp.102-14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836518> [Accessed June 13, 2011].
- Langman, 2010. *Medical Embryology. Medical Embryology 11th edition*.
- Lansdell, S.J. & Millar, Neil S, 2004. Molecular characterization of Dalpha6 and Dalpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from Drosophila: formation of a high-affinity alpha-bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras. *Journal of neurochemistry*, 90(2), pp.479-89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228604> [Accessed January 26, 2012].
- Lukas, R.J. et al., 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological reviews*, 51(2), pp.397-401. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353988>.
- Matthews, G.G., 2001. *Evolution of nervous systems*,
- Mayr, E., 1998. Perspective Two empires or three ? *Comparative and General Pharmacology*, 95(August), pp.9720-9723.
- Millar, N S, 2003. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Society transactions*, 31 (Pt 4), pp.869-74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887324>.
- Millar, Neil S & Denholm, I., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate neuroscience : IN*, 7(1), pp.53-66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17216290> [Accessed October 9, 2011].
- Pedigo, L., *Entomology and Pest Management*,
- Perry, T., McKenzie, J. a & Batterham, P., 2007. A Dalpha6 knockout strain of Drosophila melanogaster confers a high level of resistance to spinosad. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(2),

pp.184-8. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244547> [Accessed January 26, 2012].

Phuc, H.K. et al., 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC biology*, 5, p.11. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1865532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 6, 2011].

Prabhaker, N. et al., 2007. Assessment of cross-resistance potential to neonicotinoid insecticides in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 95(06), pp.535-543. Available at:
http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007485305000532 [Accessed February 3, 2012].

Purves, D., 2004. *Neuroscience*,

Ruiz-Trillo, I. et al., 2002. A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), pp.11246-51. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=123241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ruppert EE, Fox RS, B.R., 2004. *Invertebrate Zoology*,

Sakarya, O. et al., 2007. A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PloS one*, 2(6), p.e506. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1876816&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 24, 2011].

Sanes DH, Reh TA, H.W., 2006. *Development of the nervous system*,

Sattelle, D.B. et al., 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(4), pp.366-76. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770687> [Accessed January 26, 2012].

Sawruk, E. et al., 1988. Characterization of an invertebrate nicotinic acetylcholine receptor gene: the *ard* gene of *Drosophila*

melanogaster. *FEBS letters*, 235(1-2), pp.40-6. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136037>.

Sawruk, E. et al., 1990. Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated alpha-subunit. *The EMBO journal*, 9(9), pp.2671-7. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=551970&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Southern, E., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3).

Stent, G., 1985. CELL LINEAGE IN THE SYSTEMS. *Molecular Biology*, pp.45-70.

Tomizawa, M & Casida, J E, 2001. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest management science*, 57(10), pp.914-22. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11695184> [Accessed January 6, 2012].

Tomizawa, Motohiro & Casida, John E, 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, 48, pp.339-64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208819> [Accessed September 21, 2011].

VACELET, J., 2008. A new genus of carnivorous sponges (Porifera: Poecilosclerida, Cladorhizidae) from the deep N-E Pacific, and remarks on the genus. *Zootaxa*, 65(March), p.5326.

Vanengelsdorp, D. et al., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), p.e6481. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2715894&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 12, 2011].

Wang, Hong et al., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), pp.384-8. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508119>.

Watson, G.B. et al., 2010. A spinosyn-sensitive *Drosophila melanogaster* nicotinic acetylcholine receptor identified through chemically induced target site resistance, resistance gene identification, and heterologous expression. *Insect biochemistry and molecular*

biology, 40(5), pp.376-84. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944756> [Accessed
January 26, 2012].

Webster, R.A. ed., 2001. *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*,
Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1002/0470846577>.

Zhu, B. et al., 2008. Drosophila neurotrophins reveal a common
mechanism for nervous system formation. *PLoS biology*, 6(11),
p.e284. Available at:
[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25863
62&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2586362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract) [Accessed October 16,
2011].

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ-

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ:

**«Σχεδιασμός δομής πρωτεΐνης με βάση την ομοιότητα της
ακολουθίας της με
πρωτεΐνες γνωστής δομής (Homology Modeling)»**

ΦΟΙΤΗΤΗΣ : ΚΟΥΙΜΑΝΗΣ ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗΣ

Ο όρος σχεδιασμός δομής πρωτεΐνης (η αλλιώς protein modeling) αναφέρεται στην πρόβλεψη της τεταρτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης με δεδομένη την ακολουθία των αμινοξέων της. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιούμε διάφορα υπολογιστικά προγράμματα τα οποία βασίζονται σε αλγορίθμους οι οποίοι αναλαμβάνουν την αναδίπλωση της ακολουθίας στο χώρο. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι που μπορεί να γίνει αυτό και η στρατηγική που ακολουθείται στον καθένα διαφέρει. Τέτοιοι τρόποι είναι οι εξής :

Ab initio protein modeling: Εδώ ο αλγόριθμος προσπαθεί να αναδιπλώσει την πρωτεΐνη από την αρχή βασιζόμενος σε φυσικοχημικές ιδιότητες και στην αρχή ότι τα μόρια τείνουν σε καταστάσεις ελάχιστης ενέργειας για να είναι πιο σταθερά και όχι σε ήδη γνωστές δομές. Απαιτεί πολύ μεγάλα ποσά υπολογιστικής ισχύος και μέχρι την εύρεση καλύτερων αλγορίθμων είναι κατάλληλος μόνο για μικρές ακολουθίες.

Comparative protein modeling: Χρησιμοποιεί ήδη γνωστές δομές για να αναδιπλώσει πρωτεΐνες βασιζόμενος στον πεπερασμένο αριθμό τριτοταγών δομών που μπορούν να λάβουν οι αλυσίδες αμινοξέων (πχ α-έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες). Χωρίζεται σε δύο κατηγορίες α) Homology modeling και β) Protein threading.

Στην παρούσα εργασία θα δουλέψουμε με comparative protein modeling και πιο συγκεκριμένα με homology modeling δηλαδή θα προσπαθήσουμε να αναδιπλώσουμε μια πρωτεΐνη με βάση μια ομόλογη της με βάση ότι η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών τείνει να συντηρείται περισσότερο από την ίδια την αλληλουχία.

Για το σκοπό αυτό θα προβούμε στα εξής βήματα:

Εύρεση καταλλήλου προτύπου (template):

- Αποστολή της ακολουθίας στόχου για Blast έναντι της PDB.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (η ακολουθία που μας ενδιαφέρει είναι η Bovine Lysozyme C) τα αποτελέσματα που παίρνουμε είναι τα εξής:

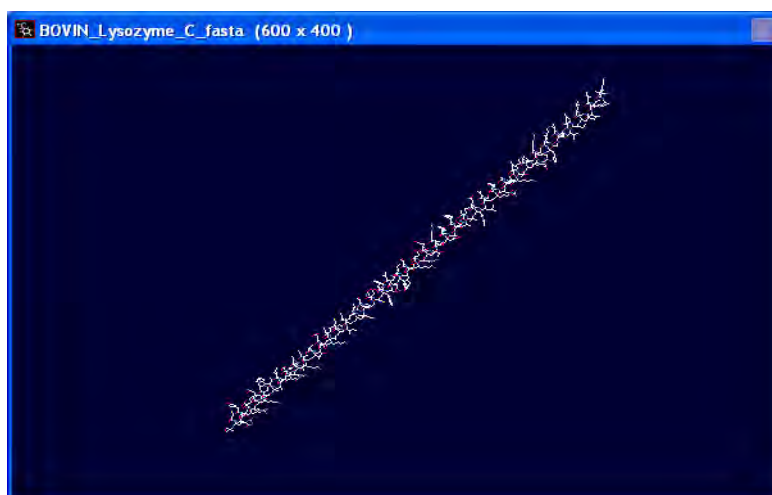
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Links
1C46_A	Chain A, Mutant Human Lysozyme With Foreign N-Terminal Residues	232	232	88%	5e-62	S
1TDY_A	Chain A, Dissection Of The Functional Role Of Structural Elements Of Tyrosine-6	232	232	87%	5e-62	S
1C7P_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme With Four Extra Residues	231	231	89%	7e-62	S
1GFG_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	231	231	87%	9e-62	S
1GF8_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	231	231	87%	1e-61	S
1OUG_A	Chain A, Contribution Of Hydrophobic Residues To The Stability Of Human Lysoz	231	231	87%	1e-61	S
1GFE_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	231	231	87%	1e-61	S
1GFA_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	230	230	87%	1e-61	S
1YAN_A	Chain A, Contribution Of Hydrophobic Residues To The Stability Of Human Lysoz	230	230	87%	2e-61	S
1GB2_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	230	230	87%	2e-61	S
1GAY_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	230	230	87%	2e-61	S
1IP7_A	Chain A, G129a Human Lysozyme >pdb 1IP7 B Chain B, G129a Human Lysozyme	230	230	87%	2e-61	S
1IP4_A	Chain A, G72a Human Lysozyme	230	230	87%	2e-61	S
1GF9_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	230	230	87%	2e-61	S
134L_A	Chain A, Role Of Arg 115 In The Catalytic Action Of Human Lysozyme. X-Ray St	230	230	87%	2e-61	S
1IOC_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme, Eaea-156t	230	230	89%	2e-61	S
1LZS_A	Chain A, Structural Changes Of The Active Site Cleft And Different Saccharide E	230	230	87%	2e-61	S
1GB3_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	229	229	87%	2e-61	S
1B7O_A	Chain A, Verification Of Spmp Using Mutant Human Lysozymes	229	229	87%	2e-61	S
1GB0_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	229	229	87%	2e-61	S
1GAZ_A	Chain A, Crystal Structure Of Mutant Human Lysozyme Substituted At The Surf	229	229	87%	2e-61	S
133L_A	Chain A, Role Of Arg 115 In The Catalytic Action Of Human Lysozyme. X-Ray St	229	229	87%	2e-61	S
1B5X_A	Chain A, Contribution Of Hydrogen Bonds To The Conformational Stability Of Hu	229	229	87%	2e-61	S
1TCY_A	Chain A, Dissection Of The Functional Role Of Structural Elements Of Tyrosine-6	229	229	87%	3e-61	S
1LHK_A	Chain A, Role Of Proline Residues In Human Lysozyme Stability: A Scanning Calo	229	229	87%	3e-61	S
1IP1_A	Chain A, G37a Human Lysozyme	229	229	87%	3e-61	S

Ελέγχοντας τις ομοπαράθεσεις των προτεινομένων από το blastp δομών διαπιστώνετε, ότι η ανθρώπινη λυσοζύμη είναι το καταλληλότερο πρότυπο, αφού η ομοπαράθεση δεν εμφανίζει κενά και ο βαθμός είναι πολύ καλός, συνεπώς θα συνεχίσουμε με την 1TDY A.

Χρήση του προγράμματος SPDB για την προσαρμογή της ακολουθίας στόχου στην δομή πρότυπο.

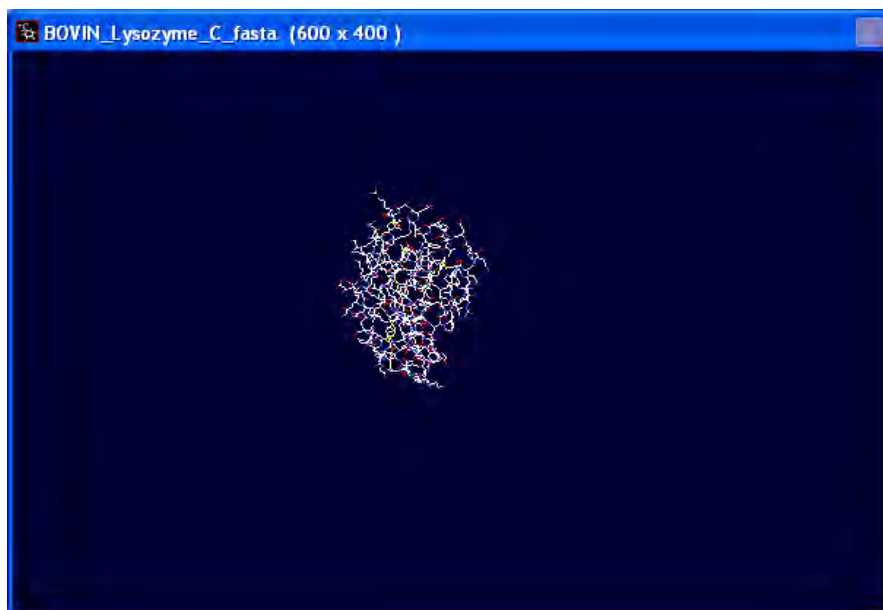
Η πρωτεΐνη μας σε μορφή αλυσίδας αμινοξέων: SwissModel →Load Raw Sequence to Model



Η πρωτεΐνη μαζί με την αναδιπλωμένη 1TDY: File → Open PDB file



Με την χρήση του Fit→Magic Fit παίρνουμε την παρακάτω εικόνα:
Όπου κάνουμε προσαρμογή της πρωτεΐνης στόχου στο πρότυπο



Μετατρέπουμε σε ενεργό το επίπεδο με : Window→Layer infos και κάνουμε κλικ στην πρωτεΐνη στόχο ώστε να κοκκινίσει:

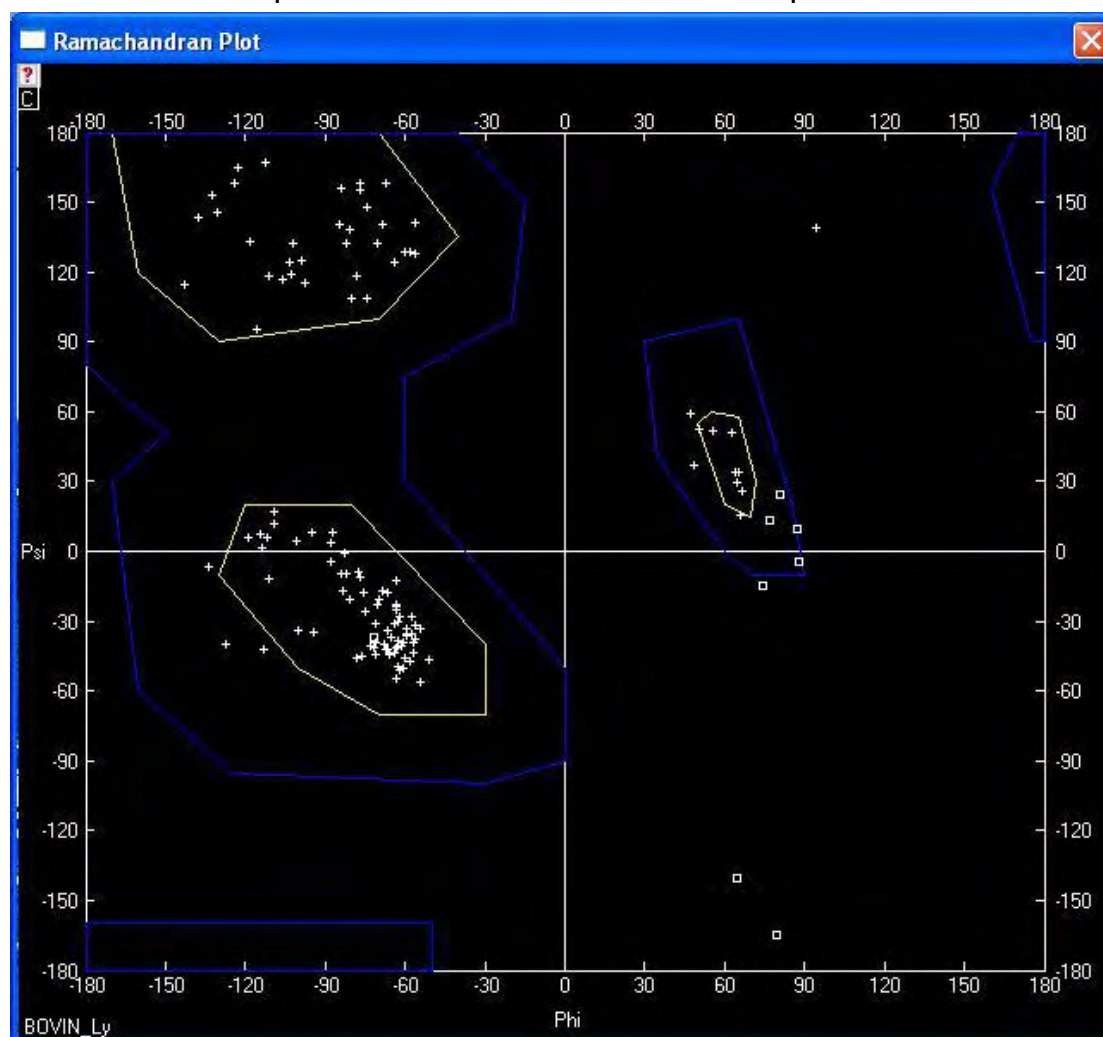
Layer	vis	mov	axis	CA	O	H	Hbnd	Hdst	side	HOH	cyc	Sel
BOVIN_Lyso	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	130
1TDY	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	130

Ανοίγουμε το Control Panel: Window →Control Panel

group	show	side	labl	ribn	col	B S
MET1	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LYS2	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ALA3	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU4	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU5	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ILE6	<input checked="" type="checkbox"/>					
h VAL7	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLY8	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU9	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU10	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU11	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU12	<input checked="" type="checkbox"/>					
h SER13	<input checked="" type="checkbox"/>					
h VAL14	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ALA15	<input checked="" type="checkbox"/>					
h VAL16	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLN17	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLY18	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LYS19	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LYS20	<input checked="" type="checkbox"/>					
h PHE21	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLN22	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ARG23	<input checked="" type="checkbox"/>					
h CYS24	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLU25	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU26	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ALA27	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ARG28	<input checked="" type="checkbox"/>					
h THR29	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU30	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LYS31	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LYS32	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU33	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLY34	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU35	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ASP36	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLY37	<input checked="" type="checkbox"/>					
h TYR38	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ARG39	<input checked="" type="checkbox"/>					
h GLY40	<input checked="" type="checkbox"/>					
h VAL41	<input checked="" type="checkbox"/>					
h SER42	<input checked="" type="checkbox"/>					
h LEU43	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ALA44	<input checked="" type="checkbox"/>					
h ASN45	<input checked="" type="checkbox"/>					
h TRP46	<input checked="" type="checkbox"/>					
h VAL47	<input checked="" type="checkbox"/>					
h CYS48	<input checked="" type="checkbox"/>					

Παρατηρούμε ότι επιλέγει τα κατάλοιπα από την Lys19 και έπειτα διότι από εκείνο το σημείο και έπειτα η πρωτεΐνη μας είναι ίδια με την πρωτεΐνη πρότυπο 1TDY A.

Προχωράμε σε έλεγχο πιστότητας του μοντέλου με χρήση του Ramachandran plot: Window→ Ramachandran plot:



Τα τετράγωνα είναι γλυκίνες οι οποίες λόγω έλλειψης πλευρικής ομάδας μπορούν να βρεθούν οπουδήποτε. Η πρωτεΐνη μας έχει 160 αμινοξέα εκ των οποίων 9 γλυκίνες** οι οποίες δεν λαμβάνονται υπόψη και θέλουμε το 90% των αμινοξέων στα αυστηρά καθορισμένα όρια του plot* (δηλαδή τα κίτρινα). Το plot λαμβάνει υπόψη του μόνο τα ίδια αμινοξέα (τα κόκκινα από προηγούμενο βήμα).

Άρα σύμφωνα με τα παραπάνω: μετράμε τα εξωτερικά αμινοξέα και είναι 7. Τα εσωτερικά αμινοξέα είναι $160-18(\text{ανόμοια αμινοξέα})=142-8(\text{γλυκίνες})=134-7(\text{εξωτερικά αμινοξέα})=127$ Άρα $127/134=0,94776119402985074626865671641791$ περίπου 94,78% άρα το μοντέλο μας είναι πολύ καλό.

*Για να θεωρηθεί καλό το μοντέλο πρέπει να έχει > 90% των καταλοίπων του στα πλαίσια των στενά επιτρεπτών περιοχών του Ramachandran plot και >98% στις ευρύτερα επιτρεπτές.

**Η πρωτεΐνη έχει 9 γλυκίνες αλλά στους υπολογισμούς συμπεριελήφθησαν μόνο οι 8. Η μία που περισσεύει βρίσκεται στην περιοχή των 18 πρώτων αμινοξέων που δεν είναι όμοια με τις πρωτεΐνης στόχου και άρα δεν λαμβάνονται υπόψη στο Ramachandran plot.

Πηγαίνοντας στο ProQ: <http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.cgi>

και επικολλώντας τις συντεταγμένες παίρνουμε τα εξής αποτελέσματα



ProQ - Results

Prediction not using predicted secondary structure
(OBS: By using predicted secondary structure the prediction will be more reliable)

=====
Predicted LGscore : **4.567**

Predicted MaxSub : **0.566**
=====

Different ranges of quality:

LGscore>1.5 fairly good model

LGscore>2.5 very good model

LGscore>4 extremely good model

MaxSub>0.1 fairly good model

MaxSub>0.5 very good model

MaxSub>0.8 extremely good model

Paper about quality measures:

A study of quality measures for protein threading models.

Cristobal S, Zemla A, Fischer D, Rychlewski L, Elofsson A.

BMC Bioinformatics 2001;2(1):5</i>

Όπου επαληθεύεται η πιστότητα του μοντέλου.

ΠΗΓΕΣ

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.cgi>

καθώς και τα help sheets αυτών και το help sheet του Deep View-Swiss PDB Viewer.

Επίσης για πληροφορίες περί του protein modeling και του Ramachandran plot

χρησιμοποιήθηκε το www.google.com και το <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

