ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
Γενικό Μεταπτυχιακό Χημείας
Τομέας Βιοχημείας

Ανάλυση και αντιμετώπιση ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα με χρήση βιοτεχνολογίας και φυτικών εκχυλισμάτων (Green Chemistry)

Παντελέρη Ραφαέλα
Βιολόγος

Υπεύθυνος Καθηγητής: Γανωτάκης Δημήτριος

Ηράκλειο 2017

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες 4
Συντομογραφίες 5
Περίληψη 6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Εισαγωγή 8
1.1 Εντομοκτόνα 8
1.1.1 Πυρεθροειδή 9
1.1.2 Ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (Insect growth regulators, IGRs) 9
1.2 Ανθεκτικότητα 10
1.2.1 Ανθεκτικότητα στόχου 12
1.2.2 Μεταβολική ανθεκτικότητα 13
1.3 Τρόποι ανάλυσης ανθεκτικότητας 14
1.3.1 Κλασικές τεχνικές για την αναγνώριση του ανθεκτικού φαινοτύπου 14
1.3.2 Συσχέτιση ανθεκτικότητας με συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες 14
1.3.3 Επιβεβαίωση σχέσης ανθεκτικότητας-μοριακών δεικτών 15
1.4 Τρόποι αντιμετώπισης ανθεκτικότητας 16
1.5 Συνεργιστές εντομοκτόνων 17
1.5.1 Τρόπος δράσης συνεργιστών 18
1.5.2 Ανάλυση και διαχείριση ανθεκτικότητας με χρήση συνεργιστών 19
1.5.3 Συνεργιστές από φυτικά εκχυλίσματα 20
1.6 Σκοπός εργασίας 22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Φυσικά προϊόντα ως συνεργιστές εντομοκτόνων (παρεμπόδιση ενζύμων αποτοξικοποίησης) 23
2.1 Εισαγωγή 23
2.2 Υλικά και Μέθοδοι 25
2.2.1 Λειτουργική έκφραση της πρωτεΐνης CYP9J32 25
2.2.2 Έλεγχος των μεμβρανών με τη διαφορά φάσματος CO για την παρουσία του κυτοχρώματος P450 27
2.2.3 Εκτίμηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης CPR 27
2.2.4 Μετρήσεις δραστικότητας του κυτοχρώματος P450 με υπόστρωμα το 7-ethoxycoumarin28
2.2.5 Δοκιμές παρεμπόδισης ενεργότητας (inhibition assays) κυτοχρωμάτων P450 29
2.3 Αποτελέσματα 32

2.3.1 Έλεγχος μεμβρανών για την παρουσία του κυτοχρώματος P450 και τη δραστικότητα της κυτοχρωμικής αναγωγάσης (CPR) 32
2.3.2 Πειράματα παρεμπόδισης κυτοχρωμάτων P450 από φυτικά εκχυλίσματα *in vitro* 33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila melanogaster* για την ανάλυση μηχανισμών ανθεκτικότητας και την αξιολόγηση εναλλακτικών εντομοκτόνων και συνεργιστών *in vivo* 37
3.1 Εισαγωγή 37
3.2 Υλικά και μέθοδοι 39
3.2.1 Δημιουργία γονιδιωματικά τροποποιημένων στελεχών *Drosophila melanogaster* 39
3.2.2 Κατασκευή στελεχών που υπερεκφράζουν κυτοχρώματα P450 σε γενετικό υπόβαθρο που φέρει τη σημειακή μεταλλαγή L1014F 46
3.2.3 Εντομοκτόνα 48
3.2.4 Βιοδοκιμές 48
3.2.5 Στατιστική ανάλυση 49
3.3 Αποτελέσματα 50
3.3.1 Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila melanogaster* με εισαγωγή μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότα σε εντομοκτόνα 50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συζήτηση – Συμπεράσματα 60
4.1 Φυσικά προϊόντα ως συνεργιστές εντομοκτόνων (παρεμπόδιση ενζύμων αποτοξικοποιήσης)60
4.2 Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *D. melanogaster* τα οποία φέρουν σημειακές μεταλλαγές και γονίδια ενζύμων αποτοξικοποίησης που σχετίζονται με ανθεκτικότητα 63
4.2.1 Εισαγωγή της μεταλλαγής I1056F στο γονίδιο *kkv* (αντίστοιχη της I1017F στην Chitin synthase 1 (*CHS1*) από το άκαρι *Tetranychus urticae*) 63
4.2.2 Δημιουργία διαγονιδιακού στελέχους *Drosophila* που φέρει τη σημειακή μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο *para* 66
4.2.3 Δημιουργία στελέχους που υπερεκφράζει ένζυμα αποτοξικοποίησης (κυτοχρώματα P450) σε γενετικό υπόβραθρο L1014F 67
Βιβλιογραφία 69
Παράρτημα 77

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Γανωτάκη Δημήτριο, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριό του ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια και ενέκρινε την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας (ΙΜΒΒ-ΙΤΕ). Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου και επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου Μοριακής Εντομολογίας, κ. Βόντα Ιωάννη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το θέμα αυτό καθώς και για την συνεχή υποστήριξή του όλο αυτό το διάστημα.

Ένα ευχαριστώ θα ήταν λίγο για τον supervisor μου Βασίλη Δουρή, για την τόσο πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Από την πρώτη στιγμή βρισκόταν πάντα δίπλα μου σε κάθε δυσκολία, υπενθυμίζοντάς μου να πιστεύω στον εαυτό μου. Η συμβολή του στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας ήταν καθοριστική.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας στο Τμήμα Χημείας καθώς και του εργαστηρίου Μοριακής Εντομολογίας στο Τμήμα Βιολογίας τόσο για το όμορφο κλίμα όσο και για τις συμβουλές τους. Ιδιαίτερα, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Αθανασία Ζαμπούκα, για την πολύτιμη βοήθειά της στην πραγματοποίηση των βιοδοκιμών. Παρά την μεγάλη κούραση και τις πολλές ώρες δουλειάς βοήθησε ώστε να κυλήσουν πολύ ευχάριστα!

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω ξεχωριστά τα μέλη του εργαστηρίου στο ΙΤΕ, την Ιουλιέττα, τον Ιάσονα, την Στέλλα, την Κέλλυ και το Γιώργο για το πραγματικά υπέροχο κλίμα στο εργαστήριο!

Δεν θα μπορούσα να μην πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες μου Πένη, Θεοδώρα, Μαρία και Ζωή για την κατανόηση και την υποστήριξή τους όλο αυτό το διάστημα, όπως επίσης Δήμητρα και Λήδα οι οποίες, αν και βρίσκονται μακριά, μου έδιναν ιδιαίτερη δύναμη. Τέλος, ευχαριστώ βαθιά τους γονείς και τα αδέρφια μου για την βοήθεια και στήριξή τους σε κάθε μου βήμα.

Συντομογραφίες

ALA	5-aminolevulinic acid
CO	Carbon monoxide
CPR	Cytochrome P450 reductase
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dNTP's	Deoxynucleosides
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DTT	Dithiotreiotol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO	Food and Agriculture Organisation
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
LB	Luria Bertani
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride
RT	Room Temperature
WHO	World Health Organisation

Περίληψη

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα τόσο στον τομέα της υγείας όσο και στον τομέα της γεωργίας. Η αυξημένη και αλόγιστη χρήση χημικών εντομοκτόνων, επιταχύνει τους ρυθμούς ανάπτυξης του φαινομένου, ενώ μπορεί να φανεί καταστροφική για την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε αναζήτηση εναλλακτικών ουσιών, φιλικών προς το περιβάλλον, που δρουν συνεργιστικά με εντομοκτόνα αυξάνοντας την δραστικότητά τους. Επιπλέον, κατασκευάστηκαν μοριακά εργαλεία με σκοπό τη χρήση τους στη διαλεύκανση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και την αξιολόγηση νέων εντομοκτόνων και συνεργιστών.

Συγκεκριμένα, στο πρώτο μέρος πραγματοποιήθηκε έλεγχος φυτικών εκχυλισμάτων για την ενδεχόμενη παρεμποδιστική δράση τους ενάντια σε κυτοχρώματα P450, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζονται σε ανθεκτικούς πληθυσμούς. Χρησιμοποιήθηκαν τα ανασυνδυασμένα ένζυμα CYP9J32 και CYP392A16, που μεταβολίζουν πυρεθροειδή εντομοκτόνα και αβερμεκτίνες, αντίστοιχα. Ως υποστρώματα των ενζύμων αυτών χρησιμοποιήθηκαν το 7-ethoxycoumarin και η προλουσιφερίνη ME-EGE. Οι δύο διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις, που βασίζονται στη μέθοδο του φθορισμού και της φωταύγειας αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών που εμφάνισαν τα φυτικά εκχυλίσματα. Επτά από αυτά παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό παρεμπόδισης στη δραστικότητα των ενζύμων υποδεικνύοντας ενδεχόμενη συνεργιστική δράση (*Potentilla recta* από τα πειράματα με την CYP9J32 και *Pyracantha coccinea*, *Rosa pulverulenta*, *Potentilla pedata*, *Rosa sempervirens*, *Prunus webii* και *Rubus sanctus* από τα πειράματα με την CYP392A16).

Στο δεύτερο μέρος κατασκευάστηκαν δύο στελέχη *D. melanogaster* που φέρουν σημειακές μεταλλαγές οι οποίες έχουν ανιχνευθεί σε ανθεκτικούς πληθυσμούς. Εξακριβώθηκε ότι οι μεταλλαγές αυτές είναι ικανές να επάγουν φαινοτύπους ανθεκτικότητας σε γενετικό υπόβαθρο που δεν περιέχει άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την αξιολόγηση εντομοκτόνων και συνεργιστών. Το πρώτο στέλεχος, το οποίο φέρει τη μεταλλαγή I1056F στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης (αντίστοιχη της I1017F του τετρανύχου), χρησιμοποιήθηκε σε βιοδοκιμές τοξικότητας όπου φάνηκε ότι τα εντομοκτόνα etoxazole, buprofezin, diflubenzuron και lufenuron, ο μηχανισμός δράσης των οποίων δεν είχε εξακριβωθεί, αλληλεπιδρούν με το μόριο της συνθάσης της χιτίνης. Το δεύτερο στέλεχος που κατασκευάστηκε φέρει τη μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο των τασεοελεγχόμενων καναλιών

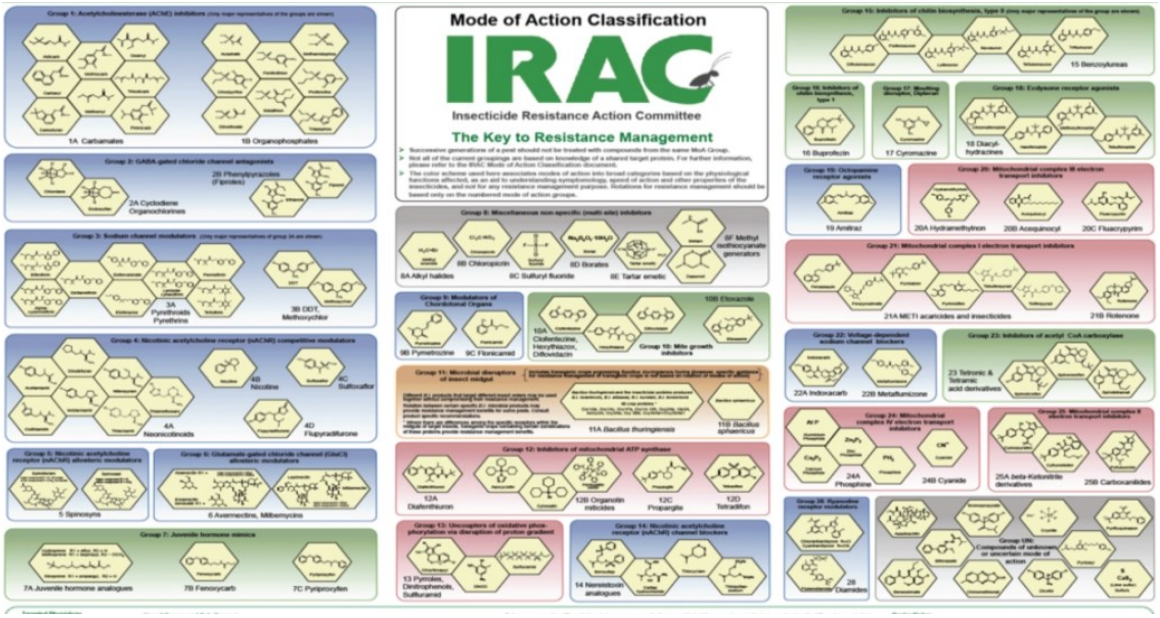
νατρίου (*para*) και χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία στελεχών που φέρουν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα, διασταυρώθηκε με στελέχη που φέρουν γονίδια μονοοξυγενασών (*Cyp9j28* και *Cyp6bq23*) υπό τον έλεγχο του συστήματος GAL4/UAS, προκειμένου τα δύο νέα στελέχη να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση νέων εντομοκτόνων και συνεργιστών. Η δημιουργία στελέχους που εκφράζει τον προαγωγό HRGAL4 σε γενετικό υπόβαθρο L1014F, το οποίο ήταν απαραίτητο για την διασταύρωση με τα στελέχη UAS για την έκφραση των εκάστοτε γονιδίων, δεν κατέστη εφικτή καθώς αποδείχθηκε ότι το διαγονίδιο *hrgal4* βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα και όχι στο τρίτο, σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Εισαγωγή

1.1 Εντομοκτόνα

Η χρήση χημικών εντομοκτόνων αποτελεί μία από τις κύριες μεθόδους καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων. Αποτελέσματα της χρήσης αυτής μπορεί να είναι η θανάτωση του εντόμου, η αδυναμία ενηλικίωσης ή η παρεμπόδιση άσκησης βλαβερών συμπεριφορών (http://npic.orst.edu/ingred/ptype/insecticide.html, http://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides). Με τα χρόνια έχει ανακαλυφθεί και συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός εντομοκτόνων, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν βάσει διαφόρων κριτηρίων. Η σημαντικότερη ίσως ταξινόμηση έχει γίνει βάσει του μοριακού μηχανισμού δράσης τους, από την επιτροπή δράσης για την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (IRAC) (http://www.irac-online.org/modes-of-action/).

Ως μοριακός μηχανισμός δράσης ενός εντομοκτόνου χαρακτηρίζεται ο τρόπος με τον οποίο προκαλεί διαταραχές σε μια συγκεκριμένη περιοχή του οργανισμού, δηλαδή στο σημείο-στόχο του. Σε μερικές περιπτώσεις η χημική δομή της ουσίας μπορεί να αποκαλύψει τόσο τον στόχο όσο και τον μηχανισμό δράσης, χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα (http://www.pctonline.com/article/pct1011-insecticide-information/). Οι κατηγορίες σύμφωνα με τον IRAC είναι οι εξής : 1) στόχευση σε νευρικό/μυϊκό, 2) στόχευση στην αύξηση και ανάπτυξη, 3) στόχευση στα συστήματα παραγωγής ενέργειας, 4) στόχευση σε μικροβιακής αιτιολογίας διαταραχή των μεμβρανών του μεσεντέρου και 5) μη ειδικής και αγνώστου δράσης. Όλες αυτές οι ομάδες παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1: Κατηγοριοποίηση εντομοκτόνων κατά IRAC. Οι μηχανισμοί δράσης είναι κωδικοποιημένοι χρωματικά ανάλογα με τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού που επηρεάζουν. Παρέχουν πληροφορίες για τη συμπτωματολογία, την ταχύτητα δράσης και άλλες ιδιότητες. Μπλε : νευρικό και μυικό, Πράσινο : ανάπτυξη, Κόκκινο: αναπνευστικό, Καφέ: μεσέντερο, Γκρι: άγνωστο

1.1.1 Πυρεθροειδή

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα εισήχθησαν τη δεκαετία του 1970 και για αρκετά χρόνια αποτελούσαν το 20-25% της παγκόσμιας αγοράς εντομοκτόνων, έχοντας χαρακτηριστεί ως τα πιο φιλικά προς το περιβάλλον (Khambay & Jewess, 2010). Είναι συνθετικά παράγωγα των εστέρων του χρυσανθεμικού (πυρεθρίνες I) και του πυρεθρικού οξέος (πυρεθρίνες II) που προέρχονται από το φυτό *Chrysanthemum cinerafolis* (Davies et al., 2007).

Στόχος των πυρεθροειδών αποτελεί το περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων, και συγκεκριμένα τα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου (voltage-gated sodium channels) (Davies et al., 2007). Ως αποτέλεσμα της εφαρμογής τους, οι μεμβράνες των ηλεκτρικά διεγερμένων κυττάρων μένουν διαρκώς εκπολωμένες, οδηγώντας το έντομο σε παράλυση και έπειτα στο θάνατο, ένα φαινόμενο γνωστό ως “knock down” (Field et al., 2017).

Τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στην καταπολέμηση των κουνουπιών όπως επίσης και ενάντια στα λεπιδόπτερα, τα ακάρεα και τις αφίδες (Khambay & Jewess, 2010).

1.1.2 Ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (Insect growth regulators, IGRs)

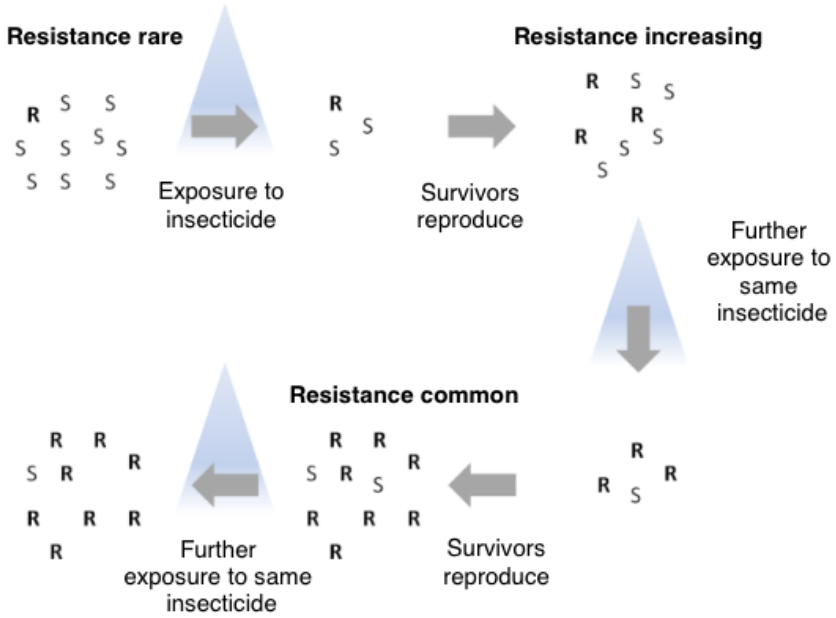
Η γνώση των βιολογικών λειτουργιών των εντόμων στόχων και κυρίως η ανάλυση της δομής της νεανικής ορμόνης (juvenile hormone, JH) αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη των ρυθμιστών ανάπτυξης εντόμων (IGRs) (Hammock & Quistad, 1981). Η κατηγορία αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή επιλεκτικότητα στόχου, εξειδίκευση και απουσία αρνητικών επιπτώσεων στον άνθρωπο και το περιβάλλον (Staal, 1975). Η χημική δομή των ουσιών που ανήκουν στους IGRs μπορεί να ποικίλει ιδιαίτερα (Εικόνα 1.1).

Οι IGRs δρουν μέσω της παρεμπόδισης σταδίων ανάπτυξης των εντόμων, και συγκεκριμένα στην έκδυση μεταξύ των διαφορετικών προνυμφικών σταδίων, στην εναπόθεση της χιτίνης και στην μεταμόρφωση (προνύμφη σε νύμφη, νύμφη σε ενήλικο άτομο) (Nauen & Bretschneider, 2002). Τρεις είναι οι κύριες υποκατηγορίες που διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο δράσης: 1) Μιμητές ή ανάλογα της νεανικής ορμόνης, 2) Παρεμποδιστές της συνθάσης της χιτίνης, 3) Άλλα (Graf, 1993). Ουσίες που ανήκουν στην ομάδα αυτή δεν είναι απαραίτητα τοξικές προς τους στόχους τους, αλλά μπορεί να οδηγούν σε δυσμορφίες οι οποίες εμποδίζουν την επιβίωσή τους (Siddall, 1976).

1.2 Ανθεκτικότητα

Παρόλο που τα εντομοκτόνα έχουν βελτιώσει την ποιότητα ζωής του ανθρώπου, η συνεχής και αλόγιστη χρήση τους έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Η κληρονομούμενη αυτή ιδιότητα, ορίζεται ως "η ικανότητα ενός πληθυσμού να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που υπό κανονικές συνθήκες θα ήταν θανατηφόρες" (Denholm et al., 2001). Η αυξημένη επιλεκτικότητα των νέων εντομοκτόνων όσον αφορά τα συστήματα-στόχους τους, μπορεί να επέτρεψε την ταχεία ανάπτυξη του φαινομένου (Georghiou, 1983, Mallet, 1989). Αποτέλεσμα του φαινομένου αυτού είναι η αύξηση της απαιτούμενης ποσότητας εντομοκτόνου και της συχνότητας εφαρμογής του, το αυξημένο κόστος και η περιβαλλοντική μόλυνση (Liu et al., 2006).

Τα εντομοκτόνα ασκούν ένα είδος επιλογής στους πληθυσμούς των εντόμων, επιτρέποντας έτσι σε ήδη υπάρχοντα αλληλόμορφα γονίδια που προσδίδουν προσαρμοστικότητα, να περάσουν στην επόμενη γενιά (http://www.irac-online.org/about/resistance/). Μία τυχαία μεταλλαγή σε άτομα του πληθυσμού, η οποία τα καθιστά ανθεκτικά σε κάποιο εντομοκτόνο, δεν θα είναι εμφανής μέχρι την ευρεία χρήση του και το αντίστοιχο αλληλόμορφο θα βρίσκεται σε μάλλον χαμηλή συχνότητα στον πληθυσμό. Μετά την εφαρμογή του, η μικρή ομάδα των ατόμων που φέρει τη μεταλλαγή θα είναι ικανή να επιβιώσει και να δώσει απογόνους, με αποτέλεσμα η επόμενη γενιά να έχει μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικών ατόμων και η αποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου να μειωθεί (Εικόνα 1.2) (Metcalf, 1989).



Εικόνα 1.2: Η συνεχής έκθεση του πληθυσμού στο ίδιο εντομοκτόνο έχει ως αποτέλεσμα την επιλογή του ανθεκτικού φαινοτύπου και την αύξηση του ποσοστού των ανθεκτικών εντόμων στις μετέπειτα γενιές. R: ανθεκτικό (resistant), S: ευαίσθητο (susceptible)

Η ανθεκτικότητα μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων γεγονότων όπως γίνεται στην έμμεση, την πολλαπλή και την πολλαπλασιαστική ανθεκτικότητα.

Η έμμεση ή διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (cross-resistance) επιτρέπει σε ανθεκτικά στελέχη να επιβιώνουν μετά από έκθεση σε διαφορετικά μεν, αλλά χημικά συγγενή εντομοκτόνα. Μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ενός κοινού μονοπατιού αποτοξικοποίησης ή μιας αλλαγής στον στόχο των εντομοκτόνων (Metcalf, 1989). Παράδειγμα αποτελεί το DTT και τα πυρεθροειδή, που έχουν ίδιο τρόπο δράσης. Έχει παρατηρηθεί ανθεκτικοί πληθυσμοί για το ένα, να εμφανίζουν ανθεκτικότητα και για το δεύτερο, ακόμα και αν δεν έχουν εκτεθεί ποτέ σε αυτό (Feng et al., 2010). Ως πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance) χαρακτηρίζεται η ύπαρξη διαφορετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας στο ίδιο άτομο. Ουσίες διαφορετικών τάξεων, μπορεί να είναι αναποτελεσματικές στην καταπολέμηση τέτοιων ατόμων (Perera, et al. 2008). Τέλος, στην πολλαπλασιαστική ανθεκτικότητα (multiplicative resistance), παραπάνω από ένας μηχανισμός βρίσκονται στο ίδιο άτομο, αλλά το επίπεδο ανθεκτικότητας είναι υψηλότερο από το άθροισμα των επιπέδων των δύο επιμέρους μηχανισμών (Hardstone et al., 2009).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ένα έντομο μπορεί να αναπτύξει ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα ταξινομούνται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: ηθολογική ανθεκτικότητα (behavioral resistance), φυσική ανθεκτικότητα ή ανθεκτικότητα διείσδυσης (penetration resistance), ανθεκτικότητα στόχου (target site resistance) και μεταβολική ή βιοχημική ανθεκτικότητα (metabolic resistance) (Πίνακας 1.1). Οι δύο τελευταίοι μηχανισμοί είναι οι περισσότερο μελετημένοι.

Πίνακας 1.1: Μηχανισμοί ανθεκτικότητας (*http://www.irac-online.org/about/resistance/mechanisms/*)

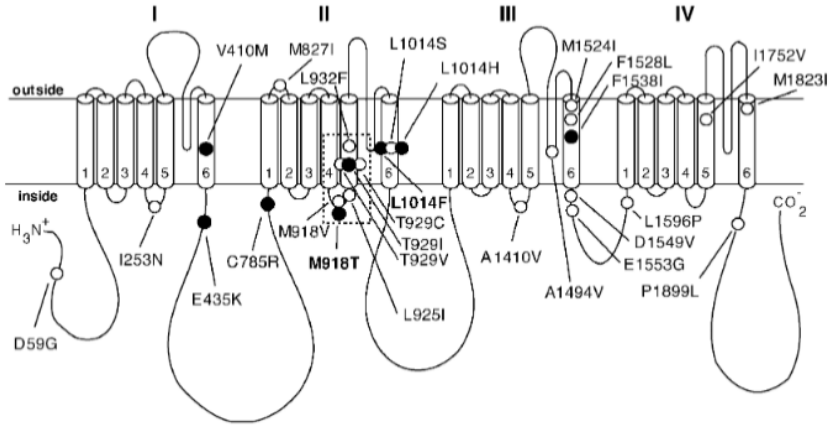
Ηθολογική ανθεκτικότητα	Ανάπτυξη συμπεριφορών που μειώνουν την έκθεση ενός ατόμου σε μια τοξική ουσία (Sparks et al., 1989) Τα έντομα μπορεί να αποφύγουν ή να σταματήσουν να τρέφονται από μια περιοχή που έχει διαποτιστεί με εντομοκτόνο.
Ανθεκτικότητα διείσδυσης	Ανάπτυξη φυσιολογικών μηχανισμών που μειώνουν την διείσδυση του τοξικού παράγοντα, αυξάνουν την δέσμευσή του, ή/και επιταχύνουν την έκκρισή του από τον οργανισμό.
Ανθεκτικότητα στόχου	Γενετικές αλλαγές στο σημείο στόχο του εντομοκτόνου στον οργανισμό του εντόμου δεν επιτρέπουν την πρόσδεσή του με αποτέλεσμα τη μείωση ή εξάλειψη της δράσης του.
Μεταβολική/βιοχημική ανθεκτικότητα	Τα ανθεκτικά άτομα είναι ικανά να αποτοξικοποιούν ή να αποβάλλουν γρήγορα τις τοξικές ουσίες από το σώμα τους.

1.2.1 Ανθεκτικότητα στόχου

Η τροποποίηση του σημείου στόχου ενός εντομοκτόνου, στον οργανισμό του εντόμου, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω μεταλλάξεων που τροποποιούν την αλληλουχία της πρωτεΐνης στόχου, είτε μέσω μηχανισμών που μεταβάλλουν την έκφρασή της (Van Leeuwen & Dermauw, 2016). Αποτέλεσμα των αλλαγών αυτών είναι η αδυναμία πρόσδεσης του εντομοκτόνου στο σημείο στόχο και η μείωση της αποτελεσματικότητάς του. Έχει ήδη χαρακτηριστεί μεγάλος αριθμός μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στόχου, σε γονίδια που κωδικοποιούν κανάλια νατρίου και χλωρίου, τη συνθάση της χιτίνης, νικοτινικούς υποδοχείς, υποδοχείς GABA, ρυανοδίνης και άλλα (Hollingworth & Dong 2008, Bass et al., 2011, Troczka et al., 2012).

Η λανθασμένη οργάνωση του επιδερμιδίου των εντόμων κατά τον σχηματισμό του, μπορεί να είναι θανατηφόρα για το έντομο. Κύριο συστατικό του αποτελεί η χιτίνη (30-60%), η σύνθεση της οποίας αποτελεί στόχο πολλών εντομοκτόνων (Dhadialla et al., 2012). Μία σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης (*CHS1*) του ακάρεος *Tetranychus urticae* βρέθηκε να σχετίζεται με ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο etoxazole, κύριο πρεσβευτή της ομάδας 10B των παρεμποδιστών ανάπτυξης ακάρεων, προτείνοντας άμεση επίδραση επί του μορίου της συνθάσης (Van Leeuwen et al., 2012).

Τα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούν στόχο πολλών πυρεθροειδών. Σημειακές μεταλλαγές στα γονίδια που τα κωδικοποιούν (Εικόνα 1.3), γνωστές ως μεταλλαγές knockdown (*kdr*), αποτελούν την πιο κοινή μορφή ανθεκτικότητας για νευροτοξικά εντομοκτόνα (Horstmann & Sonneck, 2016). Οι αλλαγές από λευκίνη (L) σε φαινυλαλανίνη (F), ιστιδίνη (H) ή σερίνη (S) (domain II segment 6, IIS6) είναι οι πιο κοινές και έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα εντόμων, υγειονομικής και γεωργικής σημασίας. Ο συνδυασμός αυτών με άλλες σημειακές μεταλλαγές σε διαφορετικές περιοχές (domains) των καναλιών, οδηγεί σε ιδιαίτερα ανθεκτικούς φαινοτύπους (super-kdr) (Dong, 2007).



Εικόνα 1.3 : Σημειακές μεταλλαγές που έχουν βρεθεί στην υπομονάδα α των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου. Με έντονα γράμματα παρουσιάζονται οι δύο μεταλλαγές που σχετίζονται με *kdr* και *super-kdr* χαρακτηριστικά στη μύγα (*Musca domestica*) (Soderlund, 2008).

1.2.2 Μεταβολική ανθεκτικότητα

Ο πιο συνήθης μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η αυξημένη αποτοξικοποίηση των ξενοβιωτικών ουσιών (Hemingway et al., 1998, Hemingway, 2000, Liu et al., 2006). Στις περισσότερες περιπτώσεις μεταβολικής ανθεκτικότητας μπορούν να ανιχνευθούν αυξημένες ποσότητες ενζύμων στα ανθεκτικά έντομα σε σύγκριση με τα ευαίσθητα (Brown & Brogdon 1987, Hemingway, 2000). Οι λιπόφιλες τοξικές ουσίες μετατρέπονται μέσω αυτών των ενζύμων σε υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες, που απεκκρίνονται εύκολα από τον οργανισμό. Τρεις ομάδες ενζύμων συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή: οι οξειδάσες, οι εστεράσες και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) (Liu et al., 2006).

Οι μονοξυγενάσες που εξαρτώνται από το κυτόχρωμα P450 ανήκουν στην πρώτη από τις παραπάνω ομάδες. Είναι μια ποικιλόμορφη οικογένεια υδρόφοβων ενζύμων, που περιέχουν αίμη και συμμετέχουν στον μεταβολισμό ενδογενών και εξωγενών ουσιών (Hemingway et al., 2004). Τα κυτοχρώματα P450 προσδένουν μοριακό οξυγόνο και προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια από το NADPH ώστε να εισαγάγουν ένα άτομο οξυγόνου στο υπόστρωμα που καταλύουν. Η αντίδραση είναι η εξής:

$$\textbf{substrate (S)} + (\textbf{NADPH}+\textbf{H}^{+}) + \textbf{O}_2 \rightarrow \textbf{S (O)} + \textbf{NADP}^{+}+\textbf{H}_2\textbf{O}$$

Μία NADPH-εξαρτώμενη αναγωγάση του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450 reductase, CPR) είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των απαραίτητων ηλεκτρονίων από το NADPH στο σύμπλοκο "υπόστρωμα – κυτόχρωμα P450". Ο μεγάλος αριθμός μονοξυγενασών σε κάθε οργανισμό έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη σημαντικά ποικίλων υποστρωμάτων (Berge et al., 1998).

Υπάρχουν πολλές αναφορές όπου παρουσιάζεται η αυξημένη δράση ορισμένων κυτοχρωμάτων P450 σε ανθεκτικά έντομα. Ο φαινότυπος αυτός προκαλείται από αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά και σπάνια από μεταλλαγές της αμινοξικής αλληλουχίας του ίδιου του ενζύμου (Van Leeuwen et al., 2005). Η πρώτη αναφορά που έγινε για τον ρόλο των μονοξυγενασών στην ανθεκτικότητα ήταν την δεκαετία του 1960, όταν παρατηρήθηκε ότι ένας παρεμποδιστής του κυτοχρώματος P450, μπορούσε να αναστείλει την ανθεκτικότητα της μύγας (housefly) στο carbaryl (Eldefrawi et al., 1960). Τα ένζυμα αυτά έχουν ιδιαίτερη σημασία στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας γιατί αφενός παρέχουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, και αφετέρου προκαλούν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε μη συγγενείς ουσίες (Liu et al., 2006).

1.3 Τρόποι ανάλυσης ανθεκτικότητας

Η ανθεκτικότητα είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, γεγονός που φαίνεται από τους πολλαπλούς μηχανισμούς που την προκαλούν. Οι γνώσεις που προέρχονται από την ανάλυση του φαινομένου αυτού αποτελούν σημαντικά εργαλεία για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του. Αρκετές προσεγγίσεις και τεχνικές χρησιμοποιούνται προκειμένου να αποσαφηνιστεί η σχέση ανθεκτικών φαινοτύπων με συγκεκριμένα γονίδια και μεταλλαγές.

1.3.1 Κλασικές τεχνικές για την αναγνώριση του ανθεκτικού φαινοτύπου

Βασική μέθοδος ανίχνευσης και μέτρησης της έντασης του φαινοτύπου, καθώς και συσχέτισής του με πιθανούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας, αποτελούν οι βιοδοκιμές με εντομοκτόνα. Στις κλασικές βιοδοκιμές γίνεται σύγκριση της απόκρισης ενός ανθεκτικού με ένα ευαίσθητο στέλεχος, σε ένα ή περισσότερα εντομοκτόνα. Με τη μέθοδο αυτή, προσδιορίζονται τα επίπεδα ανθεκτικότητας και παρέχονται πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης των ουσιών που χρησιμοποιούνται. Οι συνδυαστικές βιοδοκιμές με συνεργιστές (ουσίες που αυξάνουν την τοξικότητα ενός εντομοκτόνου, βλέπε παράγραφο 1.5) αποτελούν δείκτη για μεταβολική ανθεκτικότητα. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς οι συνεργιστές δρουν ως παρεμποδιστές ενζύμων αποτοξικοποίησης και η εφαρμογή τους σε συνδυασμό με κάποιο εντομοκτόνο μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ανθεκτικότητας.

Μία άλλη μέθοδος για την ανίχνευση μεταβολικής ανθεκτικότητας είναι οι βιοχημικές δοκιμές με χρήση διαγνωστικών υποστρωμάτων σε ομογενοποιήματα εντόμων. Με τις τεχνικές αυτές μπορεί να αναγνωριστεί αυξημένη ενεργότητα ενζύμων αποτοξικοποίησης, χωρίς όμως να παρέχονται πληροφορίες για το εκάστοτε ένζυμο (όπως ποιο συγκεκριμένο κυτόχρωμα/GST/εστεράση ευθύνεται για την ανθεκτικότητα).

1.3.2 Συσχέτιση ανθεκτικότητας με συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες

Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών ανάλυσης του γονιδιώματος έδωσε τη δυνατότητα για πιο λεπτομερή συσχέτιση του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας με μοριακούς δείκτες. Δοκιμές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιούνται για ανίχνευση μεταλλαγών, όπως οι kdr (Vontas et al., 2007). Γονίδια που πιθανώς κωδικοποιούν ένζυμα αποτοξικοποίησης ανιχνεύονται μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών (microarrays) (Vontas et al., 2007), αλληλούχησης νέας γενιάς (next generation sequencing) (Grigoraki et al., 2015) και αλληλούχησης RNA (RNA-seq). Μέσω της χαρτογράφησης γονιδίων παρέχονται πληροφορίες για το γενετικό υπόβαθρο ενός φαινοτύπου, και αναγνωρίζονται γονίδια που πιθανώς είναι υπεύθυνα για ανθεκτικότητα (Heckel, 2003).

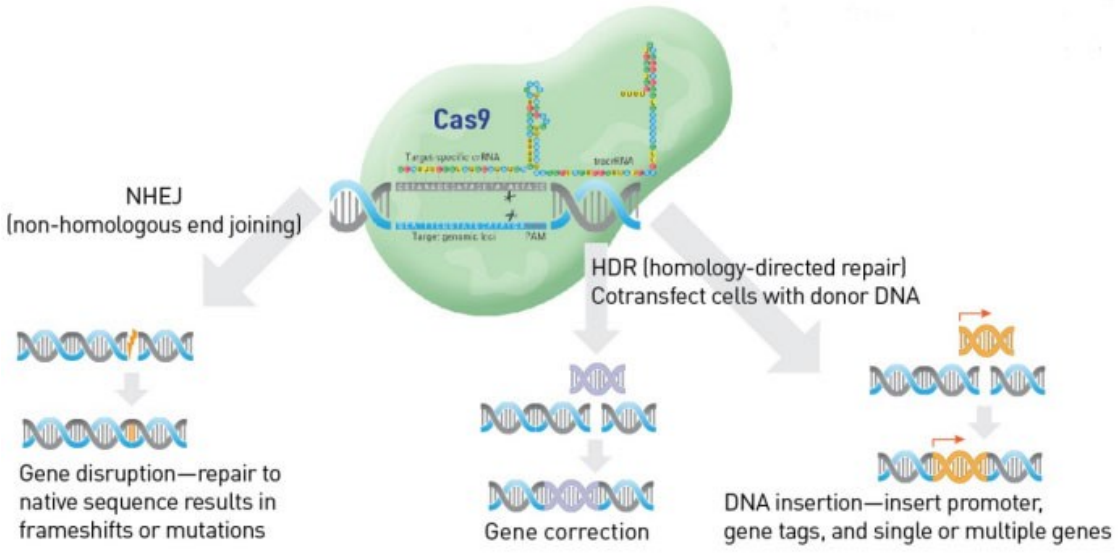
1.3.3 Επιβεβαίωση σχέσης ανθεκτικότητας-μοριακών δεικτών

Η τελική επιβεβαίωση για την σχέση των υποψήφιων μοριακών δεικτών και του φαινοτύπου της ανθεκτικότητας μπορεί να δοθεί μέσω διαφόρων τεχνικών. *In silico* μελέτες πραγματοποιούνται για τον έλεγχο πρόσδεσης του εντομοκτόνου στο σημείο στόχο ή στα ένζυμα αποτοξικοποίησης (O'Reilly et al., 2006). Η *in vitro* έκφραση ενζύμων αποτοξικοποίησης σε ετερόλογα συστήματα, όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες έχει στόχο τον έλεγχο της ικανότητας μεταβολισμού εντομοκτόνων (Riga et al., 2015). *In vivo* τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα μελέτης του ρόλου του υποψήφιου ενζύμου/μεταλλαγής άμεσα, είτε στον ίδιο οργανισμό (όπως RNA σίγηση), είτε μέσω εκτοπικής έκφρασης σε άλλον οργανισμό.

Η εκτοπική έκφραση γονιδίων αποτοξικοποίησης που προέρχονται από έντομα ιδιαίτερης σημασίας για την υγεία και την γεωργία, στον οργανισμό μοντέλο *Drosophila melanogaster*, είναι μία συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος (Daborn et al., 2012). Στην εργασία τους, οι Pavlidi et al. (2012) απέδειξαν την συμμετοχή του κυτοχρώματος AaegCYP9J28 στην ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή με εκτοπική έκφραση του γονιδίου στην *D. melanogaster*. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα GAL4/UAS, που έχει βρεθεί στους ζυμομύκητες, και το οποίο προσφέρει ελεγχόμενη γονιδιακή έκφραση (Perry et al., 2011). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει την πρωτεΐνη GAL4, και έναν κατά συνθήκη υποκινητή UAS (Upstream Artificial Sequence), ο οποίος βρίσκεται ανοδικά του υπό μελέτη διαγονιδίου. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης – οδηγού στον υποκινητή ενεργοποιεί την ελεγχόμενη έκφραση του διαγονιδίου (Fischer et al., 1988).

Η γενετική μηχανική αποτελεί ένα δυνατό εργαλείο για την ανάλυση των βιολογικών μηχανισμών. Νέες εξελίξεις στον τομέα αυτό, όπως η ανάπτυξη της τεχνολογίας γονιδιωματικής τροποποίησης δίνουν τη δυνατότητα εφαρμογής τεχνικών "αντίστροφης" γενετικής (reverse genetics), παρέχοντας πληροφορίες για τη σχέση γονοτύπου και φαινοτύπου (Douris et al., 2016). Το πιο δημοφιλές εργαλείο των τελευταίων ετών είναι το σύστημα CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Jinek et al., 2012). Ανιχνεύτηκε πρώτη φορά ως σύστημα άμυνας σε προκαρυωτικούς οργανισμούς, παρέχοντάς τους προστασία από την εισβολή ιών και πλασμιδίων (Ishino et al., 1987, Bassett et al., 2013). Σαν εργαλείο γενετικής μηχανικής δίνει τη δυνατότητα ακριβούς στόχευσης και επεξεργασίας του γονιδιώματος (Εικόνα 1.4). Βασίζεται στην RNA-κατευθυνόμενη στόχευση και δημιουργία θραυσμάτων από την ενδονουκλεάση Cas9 στην επιθυμητή περιοχή του γονιδιώματος, και την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του κυττάρου (Jinek et al., 2012, Gratz et al., 2014). Η χρήση του έχει συμβάλει στην απόδειξη της

συσχέτισης σημειακών μεταλλαγών με ανθεκτικούς φαινοτύπους (Douris et al., 2016, Zimmer et al., 2016).



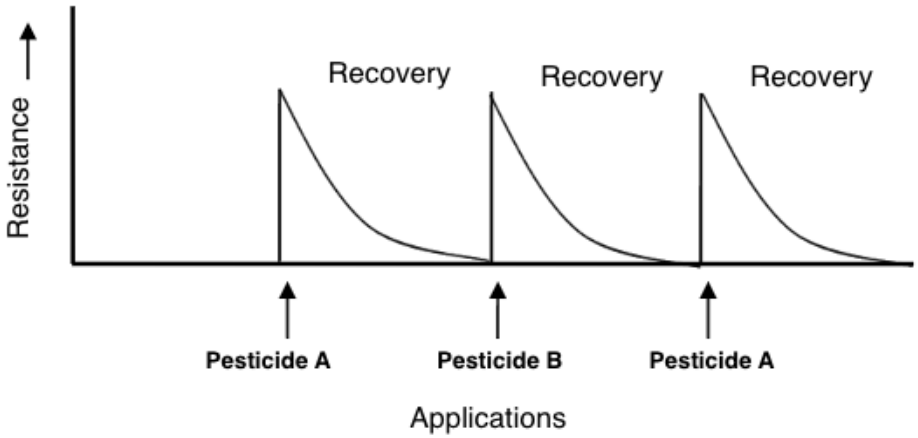
Εικόνα 1.4: Το σύστημα CRISPR/Cas9. Ένα μόριο RNA (guide RNA) οδηγεί την νουκλεάση Cas9 (πράσινο) στον στόχο. Η δημιουργία θραυσμάτων στο DNA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του κυττάρου. Η παροχή ενός DNA δότη οδηγεί στην εισαγωγή επιθυμητής αλληλουχίας στην περιοχή των θραυσμάτων μέσω του μηχανισμού ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR).

1.4 Τρόποι αντιμετώπισης ανθεκτικότητας

Η εκτεταμένη ανάπτυξη της ανθεκτικότητας εντόμων υγειονομικής και γεωργικής σημασίας σε εντομοκτόνα οδήγησε στον σχεδιασμό διαφόρων πρακτικών, με σκοπό την διαχείρηση και πρόληψη του φαινομένου. Οργανισμοί όπως ο Οργανισμός Γεωργίας και Τροφίμων (FAO), IRAC και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), έπειτα από πολύχρονη παρατήρηση του φαινομένου, έχουν προτείνει διάφορες στρατηγικές που βασίζονται στη βιολογία των εντόμων, τους μηχανισμούς δράσης των εντομοκτόνων και τους τρόπους ανάπτυξης της ανθεκτικότητας.

Οι πρακτικές αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση εναλλακτικών και όχι χημικών μεθόδων καταπολέμησης, όπως οι ανθεκτικές ποικιλίες καλλιεργειών, βιολογικός έλεγχος με έντομα θηρευτές και παρασιτοειδή καθώς και η εναλλαγή καλλιεργειών ανάλογα με τον κύκλο ζωής των εντόμων που τα προσβάλλουν. Όσον αφορά τη χρήση χημικών προϊόντων, οι στρατηγικές που προτείνονται είναι η εναλλαγή ουσιών με μη συγγενή δράση, ώστε η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας να μειωθεί (Εικόνα 1.5), η στόχευση σε ευαίσθητα στάδια του κύκλου ζωής των εντόμων, ενώ ο ρυθμός εφαρμογών και η ποσότητα προϊόντος που χρησιμοποιείται θα πρέπει να ακολουθεί τα επιτρεπτά όρια. Μείγματα εντομοκτόνων διαφορετικών μηχανισμών δράσης μπορούν

να αποτρέψουν την ανάπτυξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (cross-resistance), ενώ η χρήση συνεργιστών αποτελεί ένα δυνατό εργαλείο για την καταπολέμηση της μεταβολικής ανθεκτικότητας. Επιπλέον, οι χωρικά διαχωρισμένες εφαρμογές ("μωσαϊκές") με διαφορετικά είδη εντομοκτόνων μπορεί να μειώσει τον ρυθμό επιλογής της ανθεκτικότητας.



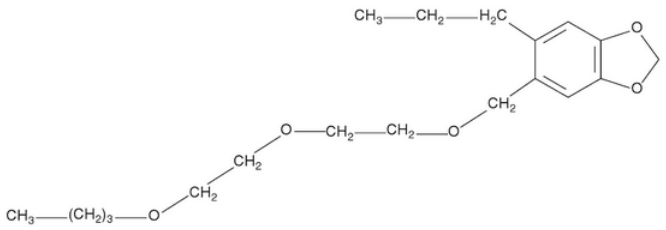
Εικόνα 1.5: Επίδραση εντομοκτόνων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης σε σύστημα εναλλαγής για την διαχείριση της ανθεκτικότητας

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρακολούθηση των πληθυσμών για παρουσία ανθεκτικότητας, σε πρώιμο στάδιο. Αυτό επιτυγχάνεται με διαγνωστικά εργαλεία (βιοδοκιμές, μοριακές μεθόδους και ανοσολογικές τεχνικές). Οι κατάλληλες στρατηγικές μπορούν να διατηρήσουν τα ευαίσθητα αλληλόμορφα στον πληθυσμό και να οδηγήσουν σε μείωση της πυκνότητας των ανθεκτικών (McCaffery & Nauen 2006, Food and Agriculture Organization FAO 2012).

1.5 Συνεργιστές εντομοκτόνων

Η ταχεία εξάπλωση του φαινομένου της ανθεκτικότητας σε συνδυασμό με την δυσκολία ανάπτυξης νέων αποτελεσματικών και ταυτόχρονα φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο εντομοκτόνων, δημιουργεί την ανάγκη για διατήρηση της αποτελεσματικότητας των ήδη υπάρχοντων (Baki et al., 2005). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ουσιών, γνωστές ως συνεργιστές, οι οποίες δεν έχουν τοξική δράση και όταν εφαρμόζονται σε συνδυασμό με εντομοκτόνα είναι ικανές να αυξήσουν τη δραστικότητά τους (Bernard & Philogène, 1993). Η πρώτη αναφορά για συνεργισμό έγινε το 1941 από τους Haller et al., οι οποίοι παρατήρησαν ότι με την χρήση σησαμέλαιου (sesame oil), μειώθηκε η ποσότητα εντομοκτόνου που απαιτούνταν για να προκαλέσει 100% θνησιμότητα στις μύγες (*Musca domestica*). Ωστόσο, η εφαρμογή μόνο του

σησαμέλαιου δεν προκαλούσε θνησιμότητα. Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο προϊόν με συνεργιστική δράση είναι το piperonyl butoxide (PBO) (Εικόνα 1.6) το οποίο αποτελεί ένα ημισυνθετικό παράγωγο της σαφρόλης. Χρησιμοποιείται ως ενισχυτής της δράσης της πυρεθρίνης, των πυρεθροειδών, της ροτενόνης και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων (Bernard & Philogène, 1993, http://npic.orst.edu/factsheets/pbogen.pdf).



Εικόνα 1.6: Η χημική δομή του συνεργιστή PBO (The Pesticide Encyclopedia)

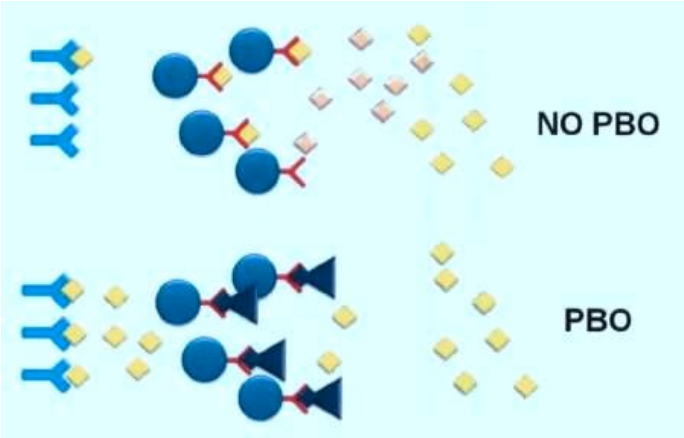
1.5.1 Τρόπος δράσης συνεργιστών

Οι συνεργιστές κατά κανόνα δεν παρουσιάζουν τοξικότητα στα έντομα, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται, αλλά η δραστικότητά τους βασίζεται στην παρεμβολή τους στην πορεία που ακολουθεί το εντομοκτόνο ώστε να επιτύχει το στόχο του (Bernard & Philogène, 1993). Συνεπώς, οι μηχανισμοί δράσης που εμφανίζουν είναι είτε η παρεμπόδιση της αποτοξικοποίησης των εντομοκτόνων, είτε η αύξηση της διείσδυσής τους στον οργανισμό (Tak & Isman, 2015) ή η επίδραση απευθείας στα σημεία πρόσδεσης του εντομοκτόνου στις πρωτεΐνες στόχους (Capinera, 2008).

Η πιο αποτελεσματική και πολυπληθής ομάδα συνεργιστών είναι οι παρεμποδιστές ενζύμων αποτοξικοποίησης. Οι ουσίες αυτές δρουν ως μεταβολικοί παρεμποδιστές με αποτέλεσμα η αποτοξικοποίηση των εντομοκτόνων να εξαλείφεται ή να υφίσταται σημαντική μείωση (Capinera, 2008). Τα ένζυμα των οποίων η δράση παρεμποδίζεται είναι κυρίως οξειδάσες μικτής λειτουργίας (Bernard & Philogène 1993, Capinera 2008), ενώ έχει αποδειχθεί και αλληλεπίδραση συνεργιστών με εστεράσες και GSTs (Capinera 2008, Pasay et al. 2009).

Η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ συνεργιστή και κυτοχρώματος P450, εμποδίζει την πρόσδεση του εντομοκτόνου στο ένζυμο, ένα βήμα ιδιαίτερα σημαντικό για την αποτοξικοποίησή του (Εικόνα 1.7) (Testa & Jenner, 1981). Η αναστολή της δράσης του ενζύμου μπορεί να είναι συναγωνιστική, παρουσιάζοντας αυξημένη K_m και σταθερή V_{max} στην κινητική της αντίδρασης, ή μη

συναγωνιστική, όπου η K_m παραμένει σταθερή με την V_{max} να μειώνεται (Bernard & Philogène, 1993). Ως αποτελέσμα της ενζυμικής παρεμπόδισης, η απαιτούμενη ποσότητα εντομοκτόνου μειώνεται, ενώ αυξάνεται η αποτελεσματικότητά του. Για το λόγο αυτό οι συνεργιστές θεωρούνται σημαντικά εργαλεία για την άμεση αντιμετώπιση της μεταβολικής ανθεκτικότητας ενώ ταυτόχρονα βοηθούν στην καθυστέρηση της εκδήλωσής της (Sarwar, 2016).



Εικόνα 1.7: Μηχανισμός δράσης παρεμποδιστών ενζύμων αποτοξικοποίησης. Η εφαρμογή ενός εντομοκτόνου χωρίς συνεργιστή (πάνω) έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση του πρώτου στα ένζυμα αποτοξικοποίησης (μπλε κύκλοι) εμποδίζοντάς το να φτάσει στο στόχο του. Στην περίπτωση που υπάρχει συνεργιστής στο μίγμα (κάτω), αυτός δημιουργεί σύμπλοκο με τα ένζυμα, και το εντομοκτόνο είναι ικανό να φτάσει στο στόχο του.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί αποτελεσματικός ένας συνεργιστής πρέπει να είναι ικανός να διεισδύσει στον οργανισμό του εντόμου και να μεταφερθεί στο ένζυμο στόχο σε λιγότερο χρόνο από αυτόν που απαιτείται για το εντομοκτόνο. Επιπλέον η συγγένεια συνεργιστή-ενζύμου θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη συγγένεια εντομοκτόνου-ενζύμου, ενώ ο ρυθμός μεταβολισμού του να είναι μικρότερος. Τα χαρακτηριστικά αυτά επηρεάζουν την ειδικότητα του συνεργιστή (Casida, 1970, Yamamoto ,1973).

1.5.2 Ανάλυση και διαχείριση ανθεκτικότητας με χρήση συνεργιστών

Οι συνεργιστές θεωρούνται από τα πιο σημαντικά εργαλεία για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, καθώς παρεμβαίνουν στον πιο συνήθη μηχανισμό, την αποτοξικοποίηση. Είναι ικανοί να δρουν με διάφορες ομάδες εντομοκτόνων, ενώ διαφορετικοί συνεργιστές μπορεί να αυξήσουν την δραστικότητα του ίδιου εντομοκτόνου, μέσω διαφορετικών μηχανισμών (Bernard & Philogène 1993, Capinera 2008). Ένας μεγάλος αριθμός ουσιών έχουν χαρακτηριστεί ως συνεργιστές και χρησιμοποιούνται ευρέως (Πίνακας 1.2). Παράδειγμα αποτελεί η προσθήκη PBO σε σαπούνια με πυρεθροειδή, για την καταπολέμηση της ψείρας που προσβάλλει το τριχωτό της κεφαλής (Pasay et al., 2009).

Πίνακας 1.2: Συνθετικοί συνεργιστές και το ενζυμικό σύστημα με το οποίο αλληλεπιδρούν (Kranthi, 2005)

Συνεργιστής	**Ενζυμικό σύστημα**	**Αναφορά**
Piperonylbutoxide (PBO)	Οξειδάσες μικτής λειτουργίας	Chadwick, 1963
Sesamex	Οξειδάσες μικτής λειτουργίας	Beroza and Barthel, 1957
Propargloxypthalimide (PGP)	Οξειδάσες μικτής λειτουργίας	Casida, 1970
1,2,4-trichloro-3-propynyloxybenzene (TCPB)	Οξειδάσες μικτής λειτουργίας	Casida, 1970
Triphenyl phosphate (TPP)	Εστεράσες	Casida, 1970
s,s,s-tributylphosphoro-trithioate (DEF)	Εστεράσες	Casida, 1970
Diethyl maleate (DEM)	Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης	Motoyama et al., 1991
4-4'-dichloro-α-methylbenzhydrol (DMC)	DDTασες	Casida, 1970

Οι συνεργιστές συμβάλλουν στη μείωση της πίεσης επιλογής των ανθεκτικών γονιδίων σε έναν πληθυσμό, κυρίως όταν δρουν σε ένα συγκεκριμένο μονοπάτι αποτοξικοποίησης ενός εντομοκτόνου (Bernard & Philogène, 1993). Σύμφωνα με τους Kumar et al. (2002) η χρήση PBO κατά την εφαρμογή του πυρεθροειδούς deltamethrin για 20 συνεχόμενες γενιές (F_{20}) σε προνύμφες κουνουπιών *Aedes aegypti*, μείωσε τα επίπεδα ανθεκτικότητας κατά 60% σε σχέση με προνύμφες F_{20} που είχαν επιλεγεί χωρίς τον συνεργιστή. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε η ικανότητα του PBO να "αναστρέφει" την ανθεκτικότητα. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας κουνουπιών που είχαν επιλεχθεί για 24 γενιές (F_{24}) μόνο με εντομοκτόνο, μειώθηκαν κατά 89% μετά από επιλογή μιας γενιάς με εντομοκτόνο και συνεργιστή.

Πέρα από την άμεση αντιμετώπιση του φαινομένου, η χρήση των συνεργιστών συνεισφέρει τόσο στην αναγνώριση των αιτιών που το προκαλούν, όσο και στην καθυστέρηση της εμφάνισής του ή ακόμα και την καταστολή του (Bernard & Philogène, 1993). Εμφανίζονται ιδιαίτερα χρήσιμα ως διαγνωστικά εργαλεία για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού ανθεκτικότητας που μπορεί να επικρατεί σε έναν πληθυσμό. Στην εργασία τους οι Yang et al. (2001), με τη χρήση τριών διαφορετικών συνεργιστών (TPP, DEM και PBO) διαπίστωσαν ότι και οι τρεις ομάδες ενζύμων, μονοξυγενάσες, εστεράσες και GSTs, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση του πυρεθροειδούς bifenthrin στον τετράνυχο (*Tetranychus urticae*).

1.5.3 Συνεργιστές από φυτικά εκχυλίσματα

Η ανάγκη για εύρεση λύσεων φιλικών προς το περιβάλλον, στο πρόβλημα της ανθεκτικότητας, έχει στρέψει την έρευνα στην αναζήτηση ουσιών από φυτικές πηγές, που θα βοηθήσουν στην αποτελεσματικότερη διαχείριση των επιβλαβών εντόμων (Andu Radhika & Sahayaraj, 2014). Οι

δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, που κατέχουν βασικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, έχει βρεθεί να αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης των εντόμων. Συχνά συνυπάρχουν στα φυτά, με ενώσεις που παρουσιάζουν εντομοκτόνο δράση, σχηματίζοντας την υπόθεση ότι λειτουργούν ως φυσικοί συνεργιστές των ενώσεων αυτών, προκειμένου να ενισχύσουν τη δράση τους ενάντια των φυτοφάγων εντόμων και άλλων εχθρών (Berenbaum & Neal, 1985, Hummelbrunner & Isman, 2001). Παράδειγμα συνεργισμού μεταξύ φυτικών προϊόντων αποτελεί η συνύπαρξη της σησαμίνης (sesamin) με πυρεθρίνες στα άνθη του φυτού *Chrysanthemum cinerariefolium* (Berenbaum & Neal, 1985).

Τα φυτικά προϊόντα και εκχυλίσματα εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, σύντομη παραμονή στο περιβάλλον και περίπλοκες χημικές δομές γεγονός που μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας εναντίον τους (Baki et al., 2005, George et al., 2014). Τα χαρακτηριστικά αυτά τα κατατάσσουν ιδιαίτερα χρήσιμα στην αντιμετώπιση των επιβλαβών εντόμων. Αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην ανίχνευση συνεργιστών φυτικής προέλευσης (Hummelbrunner & Isman, 2001, Baki et al., 2005, Andu Radhika & Sahayaraj, 2014, Faraone et al., 2015, Gomes et al., 2016).

1.6 Σκοπός εργασίας

Η ταχεία εξέλιξη του φαινομένου της ανθεκτικότητας καθιστά ως επιτακτική ανάγκη τόσο την εις βάθος κατανόηση των μηχανισμών που το προκαλούν όσο και την εύρεση νέων μεθόδων αντιμετώπισής του.

Σκοπός της εργασίας είναι να γίνει μια πρώτη προσπάθεια εύρεσης ουσιών που παρουσιάζουν συνεργιστική δράση με εντομοκτόνα και αυξάνουν τη δραστικότητά τους. Επιπλέον, να δημιουργηθούν μοριακά εργαλεία, με τη χρήση βιοτεχνολογικής μεθοδολογίας, που θα βοηθήσουν αρχικά στη διαλεύκανση μηχανισμών ανθεκτικότητας καθώς και στην αξιολόγηση νέων σκευασμάτων, με στόχο την ενίσχυση της ολοκληρωμένης διαχείρισης του φαινομένου. Συγκεκριμένα, επιχειρούνται :

1. **Η αναζήτηση ουσιών φυτικής προέλευσης οι οποίες είναι ικανές, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, να παρεμποδίζουν την δράση ενζύμων αποτοξικοποίησης** και συνεπώς να αναστέλλουν την ανθεκτικότητα. Εξετάστηκαν εκχυλίσματα φυτών σε πειράματα *in vitro*, για πιθανή παρεμπόδιση της δράσης δύο ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών P450s (CYP9J32 και CYP392A16) οι οποίες έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα αρθροπόδων (*Aedes aegypti* και *Tetranychus urticea* αντίστοιχα) σε εντομοκτόνα.

2. **Η δημιουργία μοριακού εργαλείου με χρήση μεθόδων βιοτεχνολογίας για τον έλεγχο νέων εντομοκτόνων και συνεργιστών *in vivo***. Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή σημειακών μεταλλαγών (I1056F στο γονίδιο *CHS1*, L1014F στο γονίδιο *para*) στον οργανισμό-μοντέλο *Drosophila melanogaster*, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα. Επιπλέον, δημιουργήθηκαν γονιδιωματικά τροποποιημένα στελέχη *Drosophila*, τα οποία συνδυάζουν τη μεταλλαγή L1014F με γονίδια κυτοχρωμάτων P450 που έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται σε ανθεκτικούς πληθυσμούς (CYP9J28 από το *Aedes aegypti* και CYP6BQ23 από το *Meligethes aeneus*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Φυσικά προϊόντα ως συνεργιστές εντομοκτόνων (παρεμπόδιση ενζύμων αποτοξικοποίησης)

2.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί, συνεργισμός χαρακτηρίζεται η διατήρηση της αποτελεσματικότητας ή η αύξηση της δραστικότητας μίας ένωσης όταν συνδυάζεται με μια μη τοξική ουσία (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007). Ουσίες που λειτουργούν ως συνεργιστές εντομοκτόνων συνήθως παρεμποδίζουν ένζυμα αποτοξικοποίησης ανθεκτικών εντόμων, και κατά συνέπεια αναστέλλουν την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα.

Η κυριότερη ομάδα ενζύμων αποτοξικοποίησης που αποτελεί στόχο των συνεργιστών είναι οι μονοοξυγενάσες (οξειδάσες) P450s. Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων που μπορεί να καταλύσει. Δύο πρωτεΐνες της οικογένειας των μονοοξυγενασών χρησιμοποιήθηκαν στο κεφάλαιο αυτό, οι CYP9J32 και CYP392A16.

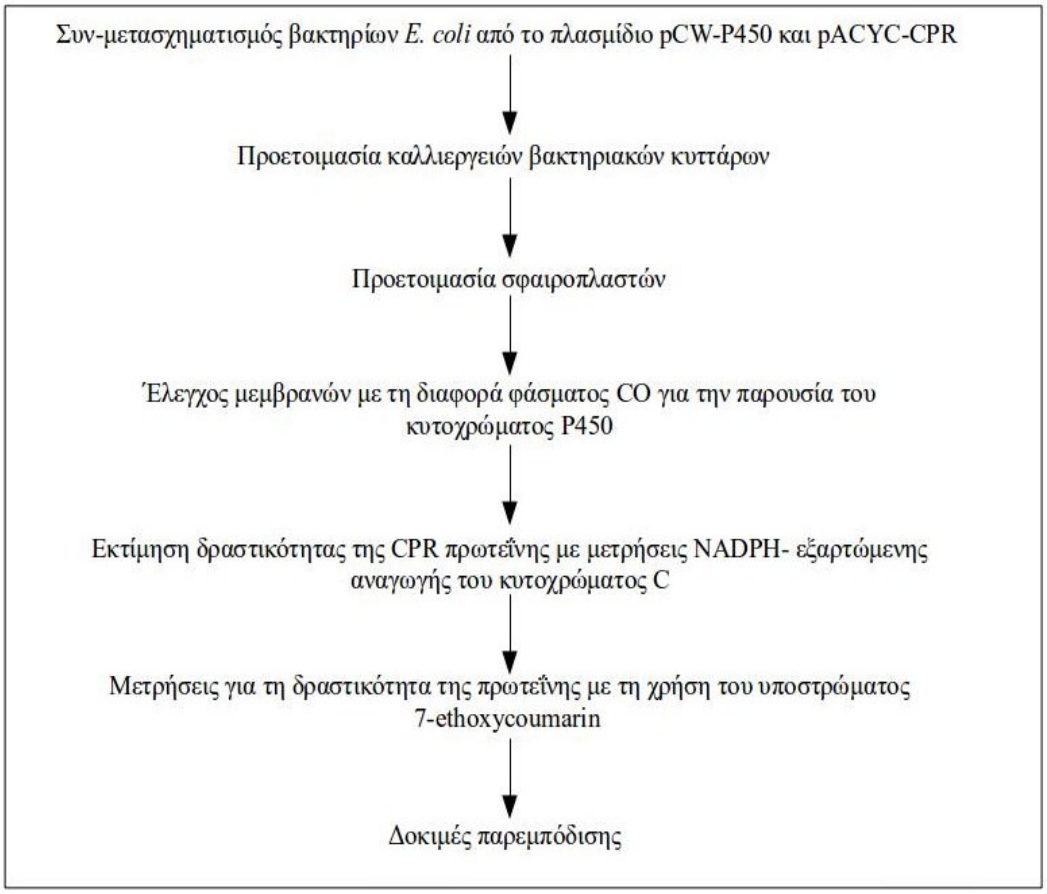
Το κυτόχρωμα CYP9J32 έχει συσχετιστεί με μεταβολική ανθεκτικότητα στον κύριο φορέα του δάγκειου πυρετού *Aedes aegypti*, σε πληθυσμούς που έχουν βρεθεί σε ιδιαίτερα απομακρυσμένες μεταξύ τους περιοχές (Strode et al. 2008, Bingham et al., 2011). Η ετερόλογη έκφρασή του στον οργανισμό *Escherichia coli* απέδειξε την ικανότητα να μεταβολίζει τα πυρεθροειδή deltamethrin και permethrin (Stevenson et al., 2012), ενώ σε βιοδοκιμές με ανθεκτικά κουνούπια ο συνεργιστής PBO φαίνεται να ενισχύει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του deltamethrin, σε δόσεις ισοδύναμες με αυτές που εφαρμόζονται στο πεδίο (Bingham et al., 2011). Επιπλέον, έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται και σε ανθεκτικά στελέχη κουνουπιών στο οργανοφωσφορικό temephos (Strode et al. 2012, Saavedra-Rodriguez et al., 2014).

Η δεύτερη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε, η CYP392A16, ανιχνεύθηκε πρώτη φορά σε ανθεκτικά στις αβερμεκτίνες (abamectin) στελέχη του οργανισμού *Tetranychus urticae*, έναν ιδιαίτερα σημαντικό εχθρό των καλλιεργειών (Dermauw et al., 2013, Riga et al., 2014). Στην εργασία τους οι Riga et al. (2014), πραγματοποίησαν έκφραση του κυτόχρωματος CYP392A16 σε κύτταρα *E. coli* και απέδειξαν ότι είναι υπεύθυνο για την υδροξυλίωση του abamectin, δίνοντας ως προϊόν μία λιγότερο τοξική ένωση.

Σκοπός του κεφαλαίου αυτού ήταν να μελετηθεί η πιθανή παρεμποδιστική δράση διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων έναντι των δύο ενζύμων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ο έλεγχος έγινε με πειράματα παρεμπόδισης (inhibition assays) κυτοχρωμάτων P450, *in vitro*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα, το 7-ethoxycoumarin για την CYP9J32 και το Luciferin ME-EGE για την CYP392A16. Ο μεταβολισμός του πρώτου υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός φθορίζοντος προϊόντος, ενώ του δεύτερου ένα φωτογόνου προϊόντος, και η ανίχνευσή τους οδηγεί στον προσδιορισμό της μεταβολικής δραστικότητας του εκάστοτε ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα επειδή ορισμένες από τις ουσίες παρουσίασαν αυτοφθορισμό, και δεν ήταν δυνατόν να μελετηθούν με το πρώτο υπόστρωμα (φθορισμός) οπότε χρησιμοποιήσαμε τη δεύτερη μέθοδο (φωταύγεια).

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης CYP9J32 σε βακτηριακές μεμβράνες, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα παρεμπόδισης. Η ροή της διαδικασίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1. Για την CYP392A16 χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες που ήδη είχαν παρασκευαστεί στο εργαστήριο.



Εικόνα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο

2.2.1 Λειτουργική έκφραση της πρωτεΐνης CYP9J32

<u>Προετοιμασία μεμβρανών pCW_CYP9J32 – AgCPR</u>

Για την λειτουργική έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης, επιδεκτικά για μετασχηματισμό βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21STAR συν-μετασχηματίζονται από τα πλασμίδια pCW_ompACYP9J32 και pACYC – AgCPR. Το πρώτο πλασμίδιο περιέχει την αλληλουχία του γονιδίου της CYP9J32, ενώ το δεύτερο περιέχει μια αναγωγάση της P450 (CPR) από τον οργανισμό *Anopheles gambiae* και μια αλληλουχία σηματοδότησης peIB που κατευθείνει την πρωτεΐνη στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη.

Ο μετασχηματισμός 100μl βακτηριακών κυττάρων BL21STAR έγινε με την εισαγωγή 57ng από το πλασμίδιο pCW_CYP9J32 και 114ng από το πλασμίδιο pACYC – AgCPR. Μετά το μετασχηματισμό, τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλία petri, τα οποία περιέχουν άγαρ Luria - Bertani (LB), αμπικιλλίνη (50μg/ml) και χλωραμφαινικόλη (34μg/ml). Η προσθήκη των δύο αυτών αντιβιοτικών γίνεται για να επιλεγούν μόνο τα κύτταρα που έχουν ενσωματώσει και τα δύο πλασμίδια. Το pCW_CYP9J32 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας για την αμπικιλλίνη, ενώ το pACYC_AgCPR γονίδιο ανθεκτικότητας για την χλωραμφαινικόλη. Τα τρυβλία παρέμειναν στους 37ºC για 12- 16 ώρες.

Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

Μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία petri επιλέχθηκε και με αποστειρωμένο ρύγχος πιπέτας μεταφέρθηκε σε falcon tube που περιείχε 5 ml θρεπτικού LB, αμπικιλλινη (50 μg/ml) και χλωραμφαινικόλη (34 μg/ml). Καλλιεργήθηκε όλη τη νύχτα (~16 ώρες) στους 37ºC στις 225-250 στροφές ανά λεπτό (rpm).

Για την αύξηση του μεγέθους της καλλιέργειας, γίνεται 1:100 επιμόλυνση 200ml θρεπτικού υλικού Terrific broth από την αρχική καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών που αναφέρθηκαν, σε φλάσκα του 1L. Το θρεπτικό υλικό προ-θερμαίνεται στους 37ºC, προς αποφυγή ενδεχόμενου θερμικού σοκ των βακτηρίων. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37ºC στα 150-200 rpm, έως ότου η οπτική απορρόφηση των κυττάρων σε μήκος κύματος 595nm φτάσει περίπου 0,8 (~ 4 ώρες). Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση για περίπου μισή ώρα στους 25ºC στα 200 rpm.

Για την επαγωγή (induction) της καλλιέργειας προστίθενται IPTG και ALA, σε τελική συγκέντρωση 1mM και 0.5mM αντίστοιχα. Το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου (το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή Lac που επάγεται παρουσία IPTG) ενώ το ALA είναι πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση της αίμης, η οποία περικλείεται στο μόριο της P450. Η καλλιέργεια παρέμεινε στους 25^0C υπό συνεχή ανάδευση στις 200 rpm για 24 ώρες.

Προετοιμασία σφαιροπλαστών και μεμβρανών

Η συλλογή των κυττάρων της καλλιέργειας γίνεται με φυγοκέντρηση στα 4000 rpm, στους 4^oC για 20 λεπτά. Ακολουθεί επαναιώρησή τους σε κρύο διάλυμα TSE (0,1M Tris- acetate pH 7,6, 0,5M sucrose και 0,5mM EDTA) και προσθήκη λυσοζύμης (τελική συγκέντρωση 0.25mg/ml) ώστε να

σπάσει το βακτηριακό τοίχωμα. Τα κύτταρα αφήνονται προς ελαφρά ανάδευση για 60 λεπτά στους 4^oC, προκειμένου να σχηματιστούν οι σφαιροπλάστες. Έπειτα φυγοκεντρούνται στα 2800g στους 4^oC για 25 λεπτά και το ίζημά τους επαναιωρείται σε διάλυμα SR (0,1M φωσφορικό κάλιο, pH 7,6, 6mM CH_3COOMg και 20% γλυκερόλη) παρουσία DTT (0,1mM), PMSF (1mM), aprotinin (10μgr/ml) και leupeptin (10μgr/ml). Ακολουθεί θραύση των κυττάρων με ηχοβολισμό (4×30¨, συνολικά 2 λεπτά, 4^0 C) ενώ τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (30.000g/20 λεπτά/ 4^0C). Γίνεται επαναφυγοκέντρηση του υπερκειμένου στις 70.000 rpm στους 4^0C για 30 λεπτά. Το ίζημα, το οποίο αποτελεί τις μεμβράνες, αναδιαλύεται σε κρύο διάλυμα 1x TSE και καταψύχεται στους – 80^0C.

2.2.2 Έλεγχος των μεμβρανών με τη διαφορά φάσματος CO για την παρουσία του κυτοχρώματος P450

Η μέθοδος διαφοράς φάσματος μονοξειδίου του άνθρακα (CO) βασίζεται στην ιδιότητα των ανηγμένων πρωτεϊνών P450 να σχηματίζουν σύμπλοκο με το CO και να δίνουν μία μοναδική κορυφή απορρόφησης στα 450 nm, διαφορετική από αυτή των ανηγμένων πρωτεϊνών P450 που δεν συμμετέχουν σε αντίστοιχο σύμπλοκο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ακριβή εκτίμηση του περιεχομένου σε P450 (Omura & Sato, 1964).

Σε πλαστική κυβέτα εισάγεται 1ml spectrum buffer (100mM Tris-HCl pH 7,4, 20% γλυκερόλη και 1mM EDTA), λίγη σκόνη από τον αναγωγικό παράγοντα υδροθειικό νάτριο (sodium hydrosulfate) και τουλάχιστον 25ml από το δείγμα των μεμβρανών. Ο αναγωγικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε, απαιτείται για την αναγωγή του αιμικού σιδήρου της P450 (Fe^{+3} προς Fe^{+2}). Με την κυβέτα αυτή μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο (ρυθμισμένο στα 400-500nm). Στη συνέχεια φυσαλίδες μονοξειδίου του άνθρακα διοχετεύονται στην κυβέτα για περίπου 45 δευτερόλεπτα και πραγματοποιείται η μέτρηση του φάσματος απορρόφησης.

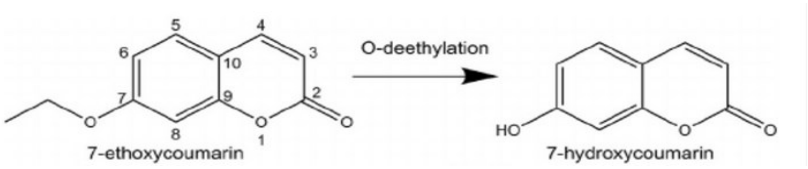
2.2.3 Εκτίμηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης CPR

Η αναγωγάση του κυτοχρώματος P450 (cytochrome P450 reductase, CPR) είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη που απαιτείται για την μεταφορά ηλεκτρονίων από τον συμπαράγοντα NADPH στο κυτόχρωμα P450. Για το λόγο αυτό, τα βακτηριακά κύτταρα συν-μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο που περιέχει την αλληλουχία της πρωτεΐνης P450 αλλά και το πλασμίδιο που περιέχει την CPR.

Η εκτίμηση της δραστικότητας της CPR γίνεται με μετρήσεις της NADPH-εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος c στα 550 nm. Σε πλαστική κυβέτα αναμιγνύονται 10μl δείγματος μεμβρανών και 1ml διαλύματος 50μM κυτοχρώματος C σε 0.3M φωσφορικό κάλιο pH 7.7. Στη φάση αυτή μετράται η κινητική απορρόφησης στα 550 nm για 1 λεπτό και το φωτόμετρο μηδενίζεται. Στη συνέχεια προστίθενται στην κυβέτα 10μl από 5mM NADPH διαλυμένο σε νερό, γίνεται ανάδευση με γρήγορες κινήσεις και μετράται η κινητική απορρόφησης στα 550nm για 1 λεπτό. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται προετοιμάζονται πάντα φρέσκα και διατηρούνται στον πάγο.

2.2.4 Μετρήσεις δραστικότητας του κυτοχρώματος P450 με υπόστρωμα το 7-ethoxycoumarin

Το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin (7-EC) μεταβολίζεται από ένα μεγάλο αριθμό κυτοχρωμάτων P450 και χρησιμοποιείται ευρέως στον έλεγχο της καταλυτικής δραστικότητας ενζύμων P450 που έχουν εκφραστεί *in vitro*. Ο έλεγχος αυτός βασίζεται στη δυνατότητα των P450 να μεταβολίζουν το υπόστρωμα, με την παροχή ενέργειας, δίνοντας το φθορίζον προϊόν 7-hydroxycoumarin, ο φθορισμός του οποίου μετράται με διέγερση στα 390 nm και εκπομπή στα 465 nm.



Εικόνα 2.2: Μεταβολισμός του υποστρώματος 7-ethoxycoumarin

Συγκεκριμένα, διαφορετικές συγκεντρώσεις των βακτηριακών μεμβρανών επωάζονται σε 96-well plates με το υπόστρωμα 7-EC (τελική συγκέντρωση 0.83mM), σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, pH 7, για 5 λεπτά στους 30°C. Η έναρξη των αντιδράσεων γίνεται με την προσθήκη NADPH τελικής συγκέντρωσης 1,25mM σε κάθε δείγμα, ενώ στις αντιδράσεις ελέγχου προστίθεται H_2O αντί ενέργειας. Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων είναι 120μl.

Προκειμένου να σταματήσει ο φθορισμός του NADPH προστίθεται στην αντίδραση το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, 0.125 units) και το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (glutathione disulfide GS-SG, 2.5mM τελική συγκέντρωση). Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 70mM Tris-HCl/Acetonitrile buffer pH 8.5 σε αναλογία 1:1 και μετράται ο φθορισμός.

2.2.5 Δοκιμές παρεμπόδισης ενεργότητας (inhibition assays) κυτοχρωμάτων P450

Στην προσπάθεια εύρεσης φυσικών προϊόντων που δρουν ως συνεργιστές εντομοκτόνων, ελέγχθηκαν *in vitro* 33 φυτικά εκχυλίσματα, που μας χορηγήθηκαν στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας μας από τον Καθ. κ. Σέρκο Χαρουτουνιάν, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Πίνακας 2.1). Ο έλεγχος έγινε με δοκιμές παρεμπόδισης κυτοχρωμάτων P450 με δύο διαφορετικά υποστρώματα, λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων ορισμένων εκχυλισμάτων. Το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin και το ένζυμο CYP9J32 χρησιμοποιήθηκαν για τις ουσίες που δεν είχαν αυτοφθορισμό. Για τις υπόλοιπες, χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα λουσιφερίνης (Luciferin ME-EGE) και το ένζυμο CYP392A16 που είναι γνωστό ότι μεταβολίζει το συγκεκριμένο υπόστρωμα (Riga et al., 2014).

Πίνακας 2.1: Φυτά των οποίων τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παρεμπόδισης κυτοχρωμάτων P450 (χορηγήθηκαν στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας μας από τον Καθ. κ. Σέρκο Χαρουτουνιάν, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

Plant	**Plant part**
Opuntia ficus-indica	Fruit
	Stems
	Fruit skin
Hylocereus undatus	Fruit
	Fruit skin
Passiflora edulis	Fruit
Rosa sempervivens	Fruit
Rosa canina	Fruit
Pyracantha coccinea	Seed
Pyrus spinosa	Seed
Lupinus albus	Seed
Lupinus angustifolius	Seed
Pyracantha coccinea	Aerial
Pyrus spinosa	Aerial
Rosa canina	Aerial
Crataegus orientalis	Aerial
Rubus sanctus	Aerial

Plant	**Plant part**
Prunus webii	Aerial
Rosa sempervivens	Aerial
Rosa pulverulenta	Aerial
Prunus mahaleb	Aerial
Potentilla recta	Aerial
Sorbus umbellata	Aerial
Aremonia agrimonoides	Aerial
Geum urbanum	Aerial
Potentilla pedata	Aerial
Alchemilla bulgarica	Aerial
Alchemilla xanthochlora	Aerial
Potentilla speciosa	Aerial
Fragaria vesca	Aerial
Rubus idaeus	Aerial
Prunus prostrata	Aerial
Potentilla hiyraldiana	Aerial

Δοκιμές παρεμπόδισης με το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin

Σε 96-well plates προστίθενται 40 pmole από τις μεμβράνες CYP9J32, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1M, pH 7.2 σε τελικό όγκο 90μl, και 10μl από διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, διαλυμένα σε MeOH. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται και μια αντίδραση στην οποία προστίθεται μόνο MeOH αντί για τον πιθανό συνεργιστή. Είναι σημαντικό η ποσότητα του οργανικού διαλύτη να μην ξεπερνά το 10% σε κάθε αντίδραση, καθώς καταστρέφει τη δραστικότητα των ενζύμων. Ακολουθεί επώαση του μίγματος για 5 λεπτά στους 30°C στο σκοτάδι. Προστίθενται 5μl από 20mM υποστρώματος 7-EC, και γίνεται ξανά επώαση για 5 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Για την έναρξη της αντίδρασης εισάγονται 15μl από 10mM NADPH, ενώ στις αντιδράσεις ελέγχου προστίθεται H_2O αντί για ενέργεια. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 30°C στο σκοτάδι. Προκειμένου να διακοπεί ο φθορισμός του NADPH προστίθεται στην αντίδραση το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, 0.125 units) και δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (glutathione disulfide, GS-SG, 2.5mM τελική συγκέντρωση). Το plate αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 70mM Tris-HCl/Acetonitrile buffer pH 8.5 σε αναλογία 1:1 και μετράται ο φθορισμός.

Δοκιμές παρεμπόδισης με το υπόστρωμα Luciferin ME-EGE

Τα υποστρώματα των δοκιμών φωταύγειας είναι προλουσιφερίνες (proluciferins), παράγωγα της λουσιφερίνης του σκαθαριού *Photinus pyralis*. Μέσω της ενζυμικής δραστικότητας των κυτοχρωμάτων P450, από τα παράγωγα αυτά σχηματίζεται D-λουσιφερίνη, η οποία μέσω μίας δεύτερης αντίδρασης με ένα αντιδραστήριο ανίχνευσης (detection reagent) παράγει φως, ανάλογο με την δραστικότητα του ενζύμου (P450 Glo Assay Technical bulletin Promega, Εικόνα 2.3). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα ME-EGE το οποίο έχει αποδειχθεί να μεταβολίζεται από την CYP392A16 (Riga et al. 2014).

Εικόνα 2.3: Μεταβολισμός του υποστρώματος λουσιφερίνης

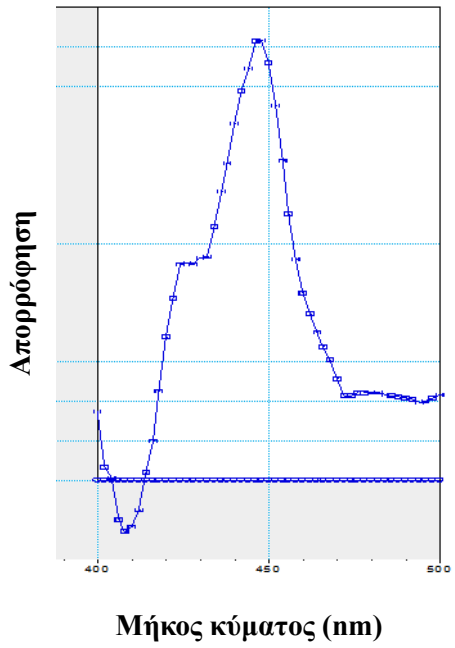
Τα φυτικά εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε MeOH και ακολούθησαν αραιώσεις σε H_2O μέχρι τις επιθυμητές συγκεντρώσεις, έτσι ώστε το ποσοστό του οργανικού διαλύτη στην τελική αντίδραση να είναι 1%. Σε διαφανείς σωλήνες eppendorf γίνεται επώαση της CYP932A16 (0.5 pmole) με το

υπόστρωμα ME-EGE (0.1mM) και το KPO_4 (1M) για 5 λεπτά στους 37°C. Έπειτα γίνεται προσθήκη του υπό μελέτη εκχυλίσματος και επωάση στις ίδιες συνθήκες. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται και μια αντίδραση στην οποία προστίθεται σκέτη MeOH (1% στην τελική αντίδραση) αντί για τον πιθανό συνεργιστή. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη του NADPH (0.2mM), ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιούνται αντιδράσεις ελέγχου στις οποίες προστίθεται H_2O. Το μείγμα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37°C. Τέλος, προστίθενται 50μl από το αντιδραστήριο ανίχνευσης και μετά από 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, γίνεται μέτρηση της φωταύγειας.

2.3 Αποτελέσματα

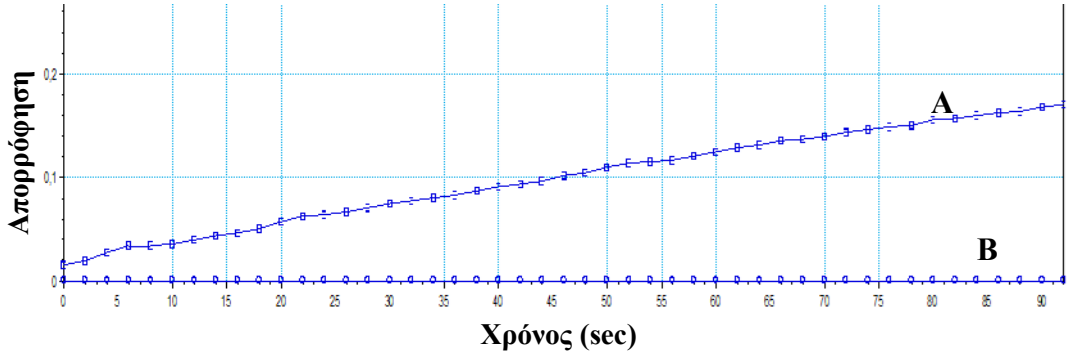
2.3.1 Έλεγχος μεμβρανών για την παρουσία του κυτοχρώματος P450 και τη δραστικότητα της κυτοχρωμικής αναγωγάσης (CPR)

Η λειτουργική έκφραση του κυτοχρώματος P450 CYP9J32 και της αναγωγάσης (CPR) έγινε σε κύτταρα *E. coli*. Οι πρωτεΐνες οδηγήθηκαν στις εσωτερικές βακτηριακές μεμβράνες μέσω των αλληλουχιών σήματος, ompA και peIB, αντίστοιχα. Ο έλεγχος μέσω της διαφοράς φάσματος CO που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι η CYP9J32 εκφράζεται σε μορφή P450, δίνοντας την χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450 nm (Εικόνα 2.4). Υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στις βακτηριακές μεμβράνες στα 39.5 μM.



Εικόνα 2.4: Η CO - διαφορά φάσματος των βακτηριακών μεμβρανών που περιέχουν την πρωτεΐνη CYP9J32 έδωσε τη χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450 nm, ένδειξη ενός σταθερού και καλής ποιότητας λειτουργικού ενζύμου.

Η δραστικότητα του ενζύμου CPR μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το κυτόχρωμα C, και αποδείχθηκε η ύπαρξή του στις βακτηριακές μεμβράνες (Εικόνα 2.3). Η καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε στα 172.5 μmol κυτοχρώματος C/ λεπτό / mg πρωτεΐνης.



Εικόνα 2.3: Διάγραμμα κινητικής της αναγωγάσης (CPR) στα 550 nm
A:Δείγμα με ενέργεια (NADPH)
B: Δείγμα χωρίς ενέργεια

Η μεταβολική απόδοση των βακτηριακών μεμβρανών εξετάστηκε με το φθορίζον υπόστρωμα 7 – ethoxycoumarin και υπολογίστηκε στα 0.950294 +_ 0.04307 7OH / λεπτό / pmole κυτοχρώματος P450.

2.3.2 Πειράματα παρεμπόδισης κυτοχρωμάτων P450 από φυτικά εκχυλίσματα *in vitro*

Στο πλαίσιο της αναζήτησης ουσιών με συνεργιστική δράση, τα φυτικά εκχυλίσματα του Πίνακα 2.1 χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές *in vitro* για τον έλεγχο της παρεμπόδισης της δράσης διαφόρων κυτοχρωμάτων P450. Εάν κάποιο από τα εκχυλίσματα προκαλέσει έντονη μείωση στη δραστικότητα του ενζύμου σε χαμηλές συγκεντρώσεις, είναι πιθανό να δρα και ως συνεργιστής εντομοκτόνων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ένζυμα, CYP9J32 και CYP392A16, με δύο διαφορετικά υποστρώματα, τα 7-ethoxycoumarin και ME – EGE αντίστοιχα.

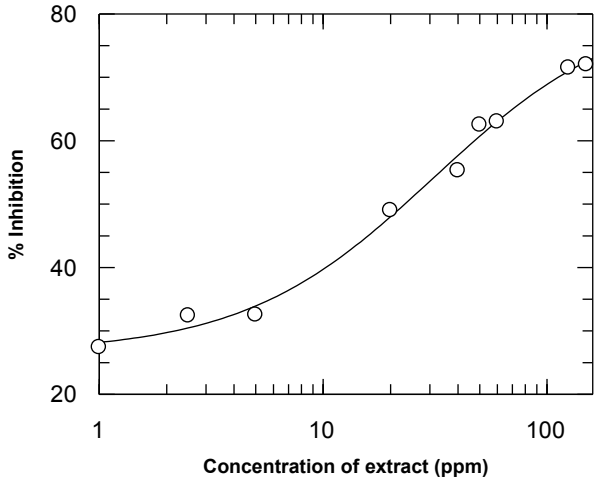
<u>CYP9J32 και υπόστρωμα 7 – ethoxycoumarin</u>

Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται τα φυτικά εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν με πειράματα παρεμπόδισης για το ένζυμο CYP9J32. Για κάθε εκχύλισμα υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 20 mg/L. Εννέα από αυτά δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στην δραστικότητα του ενζύμου, επτά φάνηκε να προκαλούν μείωση έως ~ 20%, και ένα προκάλεσε την υψηλότερη μείωση, ίση με 49%.

Πίνακας 2.2: Φυτά των οποίων τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παρεμπόδισης του ενζύμου CYP9J32 με το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin. Στη δεύτερη στήλη αναγράφονται τα ποσοστά αναστολής που παρατηρήθηκαν για κάθε εκχύλισμα, σε συγκέντρωση 20 mg/L. (Εντός των παρενθέσεων αναφέρονται τα τμήματα του φυτού από όπου προήλθαν τα εκχυλίσματα)

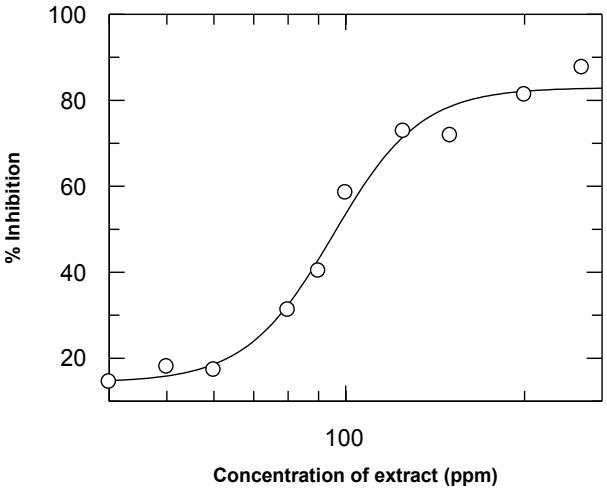
Plant	**% Inhibition at 20 mg/L**	**Plant**	**% Inhibition at 20 mg/L**
Opuntia ficus-indica (Fruit skin)	17.6%	*Lupinus albus* (Seed)	0%
Opuntia ficus-indica (Stems)	0%	*Lupinus angustifolius* (Seed)	0%
Hylocereus undatus (Fruit)	0%	*Pyrus spinosa* (Aerial)	15.2%
Hylocereus undatus (Fruit skin)	16.5%	*Potentilla recta* (Aerial)	49 %
Passiflora edulis (Fruit)	18.2%	*Geum urbanum* (Aerial)	15.6%
Rosa sempervivens (Fruit)	0%	*Alchemilla xanthochlora* (Aerial)	14.5%
Rosa canina (Fruit)	10.1%	*Potentilla speciosa* (Aerial)	0%
Pyracantha coccinea (Seed)	0%	*Potentilla hiyraldiana* (Aerial)	5%
Pyrus spinosa (Seed)	0%		

Περαιτέρω μελέτη πραγματοποιήθηκε για τα εκχύλισματα των φυτών *Potentilla recta* (Aerial) (Εικόνα 2.4) και *Alchemilla xanthochlora* (Aerial) (Εικόνα 2.5), καθώς έδωσαν μεγαλύτερα ποσοστά παρεμπόδισης της ενζυμικής δραστικότητας, 49% και 18.2% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση 20mg/L. Χαρακτηρίστηκε η τιμή IC_{50} (half maximal Inhibitory Concentration) η οποία αποτελεί την συγκέντρωση μιας ουσίας στην οποία μια βιολογική διαδικασία αναστέλλεται κατά το ήμισυ.



Variable	Value	Std Error
Y range	55.0118	9.2359
IC 50	31.0762	7.3275
Slope factor	-1.0260	0.2686
Background	26.6244	2.8272

Εικόνα 2.4: Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού παρεμπόδισης της δραστικότητας του ενζύμου CYP9J32 από το εκχύλισμα *Potentilla recta* (Aerial).



Variable	Value	Std Error
Y range	68.5628	5.3126
IC 50	95.1993	3.5592
Slope factor	-5.9094	1.2874
Background	14.3883	3.3942

Εικόνα 2.5: Διάγραμμα συσχέτισης του ποσοστού παρεμπόδισης της δραστικότητας του ενζύμου CYP9J32 από το εκχύλισμα του φυτού *Alchemilla xanthochlora* (Aerial)

Το εκχύλισμα του φυτού *P. recta* μειώνει την δραστικότητα του ενζύμου στο μισό, σε συγκεντρώσεις 31.07mg/L, ενώ αντίστοιχα από το φυτό *A. xanthochlora* απαιτείται τριπλάσια ποσότητα, και συγκεκριμένα 91.2mg/L.

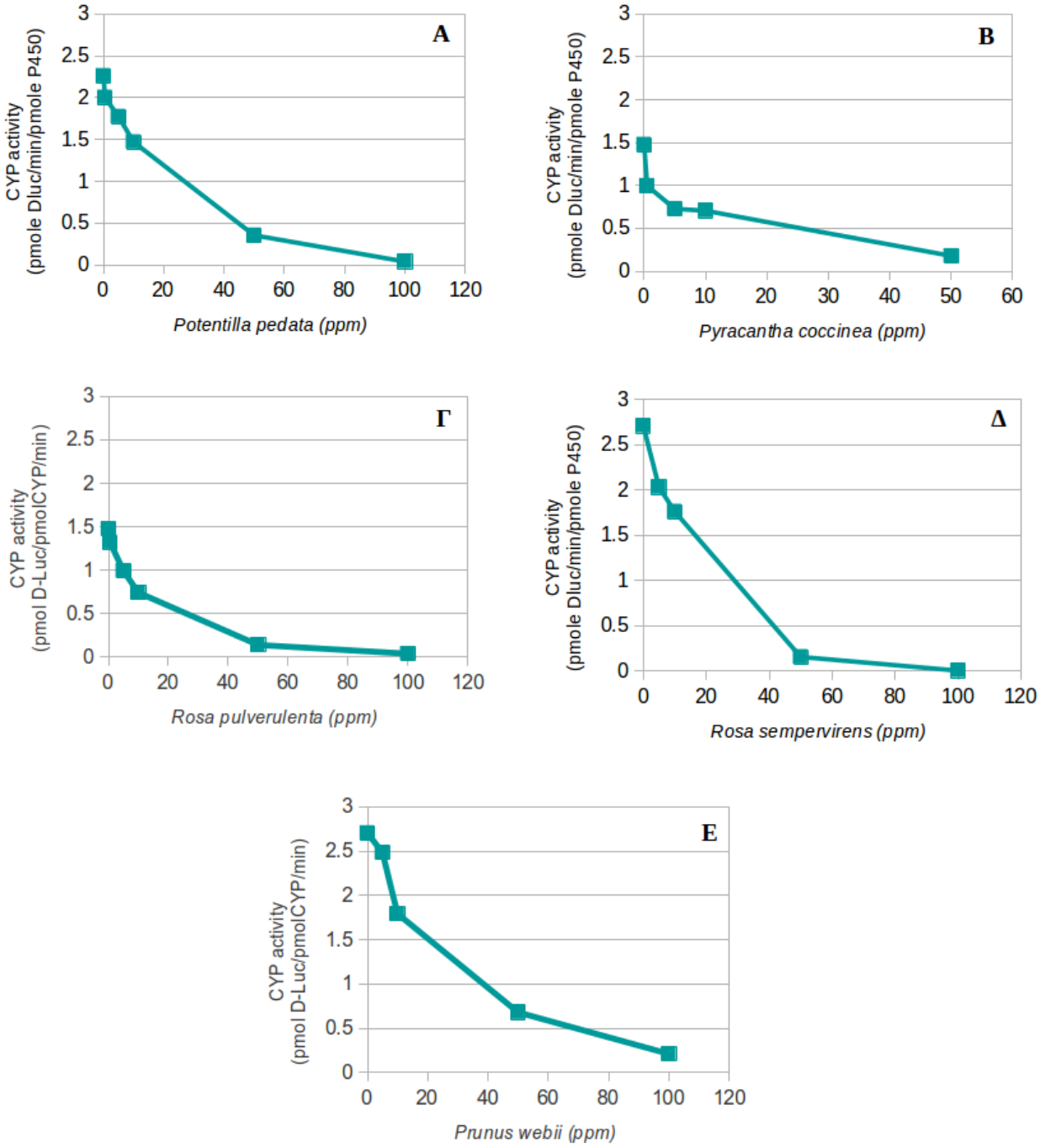
CYP392A16 και υπόστρωμα ME – EGE

Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται τα φυτικά εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν για παρεμποδιστική δράση με το ένζυμο CYP932A16 και το υπόστρωμα ME – EGE (μέθοδος φωταύγειας). Το γεγονός ότι παρουσιάζουν αυτοφθορισμό δεν επιτρέπει την μελέτη τους με το προηγούμενο υπόστρωμα. Για κάθε φυτό υπολογίστηκε το ποσοστό αναστολής του ενζύμου που παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 10 mg/L. Μόνο δύο από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου. Επτά εκχυλίσματα μείωσαν τη δραστικότητα της CYP932A16 κατά 10-30%, ενώ έξι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30%, σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 10 mg/L.

Πίνακας 2.3: Φυτά τα εκχυλίσματα των οποίων ελέγχθηκαν για συνεργιστική δράση με το υπόστρωμα ME - EGE και το κυτόχρωμα CYP932A16. Στη δεύτερη στήλη αναγράφονται τα ποσοστά αναστολής που παρατηρήθηκαν για κάθε εκχύλισμα, σε συγκέντρωση 10 mg/L. (Σε παρένθεση τα μέρη του φυτού από όπου προήλθε το εκχύλισμα)

Plant	**% Inhibition at 10 mg/L**	**Plant**	**% Inhibition at 10 mg/L**
Opuntia ficus – indica (Fruit)	0%	*Rosa pulverulenta* (Aerial)	49.7%
Pyracantha coccinea (Aerial)	52%	*Prunus mahaleb* (Aerial)	24.6%
Rosa canina (Aerial)	29%	*Sorbus umbellata* (Aerial)	13%
Crataegus orientalis (Aerial)	21.9%	*Aremonia agrimonoides* (Aerial)	29.5%
Rubus sanctus (Aerial)	30%	*Potentilla pedata* (Aerial)	35%
Prunus webii (Aerial)	34%	*Alchemilla bulgarica* (Aerial)	7.5%
Rosa sempervirens (Aerial)	35%	*Fragaria vesca* (Aerial)	14.1%
Rubus idaeus (Aerial)	10.7%	*Prunus prostrata* (Aerial)	3.5%

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Εικόνα 2.6) παρουσιάζεται η μείωση της δραστικότητας του ενζύμου CYP932A16 λόγω της εφαρμογής ορισμένων εκχυλισμάτων, και συγκεκριμένα αυτών που εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά παρεμπόδισης. Η δραστικότητα του ενζύμου έχει υπολογιστεί ως pmole D-luciferin που παράγονται ανά λεπτό ανά pmole κυτοχρώματος P450, και απεικονίζονται σε σχέση με τη συγκέντρωση του εκάστοτε φυτικού εκχυλίσματος.



Εικόνα 2.6: Διαγράμματα δραστικότητας του ενζύμου CYP392A16 σε σχέση με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη εκχυλίσματος. Η δραστικότητα χαρακτηρίζεται ως τα pmole D-luciferin/ λεπτό/ pmole κυτοχρώματος P450. Το D-luciferin είναι το προϊόν μεταβολισμού του υποστρώματος ME - EGE από το κυτόχρωμα P450. A: *Potentilla pedata* (Aerial) B: *Pyracantha coccinea* (Aerial) Γ: *Rosa pulverulenta* (Aerial) Δ: *Rosa sempervirens* (Aerial) E: *Prunus webii* (Aerial)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila melanogaster* για την ανάλυση μηχανισμών ανθεκτικότητας και την αξιολόγηση εναλλακτικών εντομοκτόνων και συνεργιστών *in vivo*

3.1 Εισαγωγή

Έναν από τους καλύτερα μελετημένους οργανισμούς μοντέλα αποτελεί το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster.* Η πληθώρα πλεονεκτημάτων που διαθέτει, όπως ο εύκολος χειρισμός, ο μεγάλος αριθμός απογόνων, ο μικρός κύκλος ζωής, η δυνατότητα ακριβούς γονιδιακής τροποποίησης και κυρίως η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος, το καθιστούν από τα πιο σημαντικά εργαστηριακά έντομα. Αν και δεν χαρακτηρίζεται ως επιβλαβές έντομο, είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της ανθεκτικότητας (βιοχημικής και στόχου) στα εντομοκτόνα (Perry et al., 2011).

Η ταχεία ανάπτυξη εργαλείων γενετικής μηχανικής έδωσε πολλά εφόδια για την ανάλυση των μηχανισμών ανθεκτικότητας (Oakeshott et al., 2003). Προσέγγισεις αντίστροφης γενετικής (reverse genetics) όπως η γονιδιωματική τροποποίηση με το σύστημα CRISPR/Cas9 παρέχουν πληροφορίες για τη σχέση ενός συγκεκριμένου γονοτύπου με ένα φαινότυπο *in vivo* και έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη ανθεκτικότητας στόχου (Somers et al., 2015, Zimmer et al., 2016, Douris et al., 2016). Η εκτοπική έκφραση γονιδίων αποτοξικοποίησης, όπως τα κυτοχρώματα P450, δίνει ισχυρά στοιχεία για την συμμετοχή των συγκεκριμένων στην εμφάνιση μεταβολικής ανθεκτικότητας (Daborn et al., 2012, Pavlidi et al., 2012). Η μελέτη της μοριακής βάσης του φαινομένου μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο δράσης του εντομοκτόνου, οδηγώντας στην ανάπτυξη νέων ουσιών καταπολέμησης και σε αποτελεσματικότερο έλεγχο της ανθεκτικότητας (Perry et al., 2011).

Στη συγκεκριμένη ενότητα, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή δύο σημειακών μεταλλαγών που φαίνεται να σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε στελέχη *D. melanogaster.* Η πρώτη μεταλλαγή (I1056F) έχει βρεθεί στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης σε ανθεκτικά άτομα *Tetranychus urticae* και *Plutella xylostella*, για το ακαρεοκτόνο etoxazole και τα εντομοκτόνα της ομάδας των βενζοϋλουριών (Van Leeuwen et al., 2012, Douris et al., 2016). Η αδυναμία πραγματοποίησης μελετών *in vitro* με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη στοιχείων ικανών για την άμεση συσχέτιση της μεταλλαγής αυτής με το μηχανισμό της ανθεκτικότητας. Η δεύτερη σημειακή μεταλλαγή (L1014F) έχει ανιχνευθεί σε μια πληθώρα εντόμων, στο γονίδιο των

τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου (VGSC), και φαίνεται πως ευθύνεται για το φαινόμενο που είναι γνωστό ως knock-down resistance (kdr) προσδίδοντας ανθεκτικότητα σε μια από τις μεγαλύτες τάξεις εντομοκτόνων, τα πυρεθροειδή. Στόχος ήταν η μελέτη του κατά πόσο κάθε μία από αυτές τις μεταλλαγές είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει τον φαινότυπο της ανθεκτικότητας.

Στη συνέχεια, στελέχη που φέρουν τη μεταλλαγή I1056F χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία για την μελέτη εντομοκτόνων, ο μηχανισμός δράσης των οποίων δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Ακόμη, με σκοπό τη διερεύνηση της ενδεχόμενης συμβολής δύο διαφορετικών τύπων ανθεκτικότητας (βιοχημικής και στόχου) στο ίδιο άτομο, αλλά και της δημιουργίας ενός "εντόμου-εργαλείου" για την αξιολόγηση νέων ουσιών καταπολέμησης, κατασκευάστηκαν στελέχη που υπερεκφράζουν γονίδια μονοοξυγενασών P450 και ταυτόχρονα είναι φορείς της σημειακής μεταλλαγής L1014F. Τα δύο γονίδια P450 είναι το *Cyp9j28* από τον κουνούπι *Aedes aegypti* και το *Cyp6bq23* από το κολεόπτερο *Meligethes aeneus*.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Δημιουργία γονιδιωματικά τροποποιημένων στελεχών *Drosophila melanogaster*

Πίνακας 3.1: Στελέχη *D. melanogaster* που χρησιμοποιήθηκαν στην ενότητα αυτή. (Χρωμόσωμα balancer: ειδικά τροποποιημένο χρωμόσωμα που χρησιμοποιείται για να εμποδίσει τον ανασυνδυασμό μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων, και βοηθά στην επιλογή των ετερόζυγων ατόμων. Περιέχει αλληλουχίες που προσδίδουν συγκεκριμένο φαινότυπο, και βοηθά στην αναγνώριση των ατόμων (φαινοτυπικός δείκτης /marker).

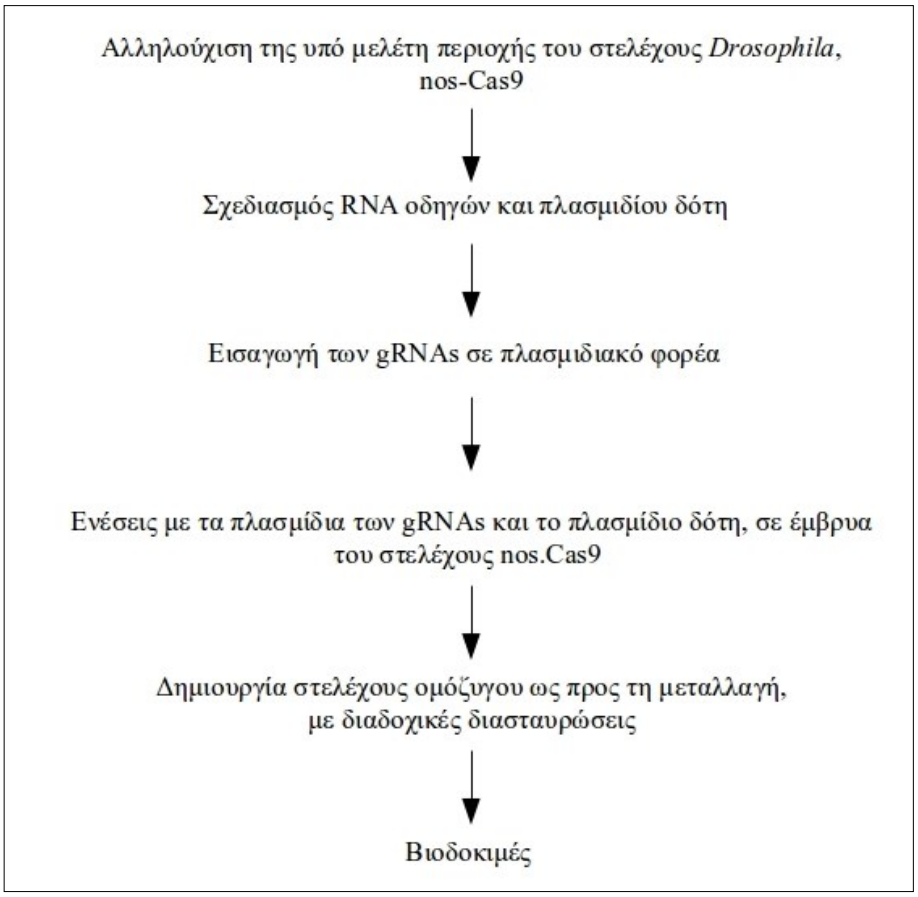
Στέλεχος	Περιγραφή	Πηγή
y^1 M{nos-Cas9.P}ZH-2A w*	Εκφράζει την πρωτεΐνη Cas9 στα γαμετικά κύτταρα υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nos*	Bloomington (BL: 54591) Port et al., 2014
yw; TM3 *Sb e*/TM6B *Tb Hu e*	Στέλεχος που φέρει χρωμοσώματα balancer στο τρίτο ζεύγος (TM3 και TM6) και τους φαινοτυπικούς δείκτες Stubble (κοντές σμύριγγες) και Tubby (βαρελοειδές σχήμα σώματος)	Delidakis Laboratory stock
(FRT)w^+ / FM7 Hw WB	Στέλεχος που φέρει χρωμόσωμα balancer (FM7) στο πρώτο ζεύγος (X) και το φαινοτυπικό δείκτη Bar (ραβδοειδές μάτι)	Delidakis Laboratory stock

CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR/Cas9 δίνει τη δυνατότητα γονιδιωματικής τροποποίησης *in vivo*, στοχεύοντας ειδικά επιθυμητές θέσεις στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Βασίζεται στην εισαγωγή θραύσεων στη διπλή έλικα του DNA, από την RNA-κατευθυνόμενη πρωτεΐνη Cas9, που έχει δράση ενδονουκλεάσης, και την ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης των κυττάρων (Jinek et al., 2012).

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα διαγονιδιακό στέλεχος *Drosophila* (nos.Cas9), που εκφράζει ειδικά την Cas9 στα γαμετικά κύτταρα υπό τον έλεγχο του υποκινητή *nos* του γονιδίου *nanos*. Για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Cas9 απαιτείται ένα μόριο CRISPR RNA (tracrRNA) trans-ενεργοποίησης, και ένα δεύτερο CRISPR RNA (crRNA) μόριο που την οδηγεί στη θέση κοπής μέσω ομολογίας ~20 νουκλεοτιδίων με την περιοχή-στόχο. Τα δύο αυτά μόρια κατά κανόνα συναποτελούν ένα χιμαιρικό RNA οδηγό (guide RNA, gRNA). Για τη σωστή στόχευση είναι απαραίτητα τρία νουκλεοτίδια που γειτνιάζουν με το 20νουκλεοτίδιο-στόχο του gRNA στο γενωμικό DNA. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται PAM (Protospacer Adjacent Motif) και για την Cas9 που προέρχεται από τον οργανισμό *S. pyogenes* είναι -NGG (Jinek et al., 2012). Η εισαγωγή μίας μεταλλαγής γίνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό μέσω ενός πλασμιδίου-δότη, που φέρει την

μεταλλαγή καθώς και εκτεταμένα ομόλογα άκρα ώστε να είναι εφικτός ο ομόλογος ανασυνδυασμός κατά την επιδιόρθωση. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην ενότητα αυτή

Απομόνωση γενωμικού DNA - Αλληλούχηση υπό μελέτη περιοχής στελέχους nos.Cas9

Απομονώθηκε γενωμικό DNA από στέλεχος nos.Cas9 *D. melanogaster* με τη χρήση του αντιδραστηρίου DNAzol (MRC). Περίπου πέντε τυχαία άτομα ομογενοποιήθηκαν σε 200μl αντιδραστηρίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 10 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf, όπου έγινε προσθήκη 100μl αιθανόλης 100%. Μετά από έντονη ανάμιξη, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 13.000rpm για 10 λεπτά. Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε με 1ml 75% αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση ξανά στα 13.000rpm για 5 λεπτά και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50μl TE buffer ή H_2O.

Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών (CHS11F/CHS11R, CHS12F/CHS12R, CHS20F/CHS20R για το γονίδιο *kkv* και paraInF, paraInR, KDRF, KDRR, exoR για το γονίδιο *para*, βλέπε Παράρτημα Πίνακας 1) προκειμένου να ενισχυθούν τμήματα της εκάστοτε περιοχής στην οποία θα γίνει εισαγωγή της επιθυμητής μεταλλαγής. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση (Macrogen) των επικαλυπτόμενων τμημάτων που δημιουργήθηκαν (3R: 5380505:5383684 για το γονίδιο *kkv* και X: 16485746:16487819 για το γονίδιο *para*, σύμφωνα με τη flybase.org) με σκοπό να ελεγχθεί για πιθανές διαφορές (SNPs, single nucleotide polymorphisms, insertions/deletions) από την δημοσιευμένη αλληλουχία. Οι συγκεντρώσεις του δείγματος DNA καθώς και των εκκινητών ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της εταιρίας.

Σχεδιασμός και δημιουργία οδηγών RNA (gRNAs)

Η αλληλουχία των gRNAs σχεδιάστηκε με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου Optimal Target Finder (http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/ , Gratz et al., 2014). Με κριτήριο την έλλειψη δημιουργίας θραύσεων εκτός στόχου (off-target effects), επιλέγονται δύο gRNAs που θα οδηγήσουν την πρωτεΐνη να προκαλέσει δίκλωνες θραύσεις εκατέρωθεν της μεταλλαγής. Για την κατασκευή του κάθε gRNA δημιουργήθηκαν δύο συμπληρωματικά μεταξύ τους 20νουκλεοτίδια, (Invitrogen), με ελεύθερα (5' φωσφορυλιωμένα) άκρα συμπληρωματικά για το πλασμίδιο-δέκτη pU6.BbsI.chiRNA που έχει κοπεί με *BbsI* (βλ. παρακάτω). Τα συμπληρωματικά 20νουκλεοτίδια αναμίχθηκαν σε ισομοριακή τελική συγκέντρωση 20 mM (10μl από κάθε ένα ολιγονουκλεοτίδιο συγκέντρωσης 100μM σε 5μl NEB3 buffer και 25μl H_2O), αποδιατάχθηκαν στους 95°C για περίπου 5 λεπτά και αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αναδιαταχθούν αργά προκειμένου να σχηματιστούν δίκλωνα μόρια.

Ακολούθησε η εισαγωγή του σχηματισθέντος δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου σε αποφωσφορυλιωμένο πλασμιδιακό φορέα pU6-*BbsI*-chiRNA, ο οποίος έχει κοπεί προηγουμένως με το ένζυμο *BbsI* ώστε τα ελεύθερα άκρα του να είναι συμπληρωματικά με αυτά του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου. Τα κλωνοποιημένα gRNAs θα βρίσκονται έτσι υπό τον έλεγχο του υποκινητή U6 ο οποίος αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση III που μεταγράφει μικρά πυρηνικά RNA. Για την ένθεσή τους (ligation) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA λιγάση και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε αναλογία 1:3 (πλασμίδιο:ένθεμα) στους 4^oC για 24 ώρες. Στην συνέχεια ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5alpha, με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει τα gRNAs. Εξετάστηκαν με PCR, αποικίες από μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο κύτταρα, για την σωστή εισαγωγή του ενθέματος (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Ποσότητες αντιδραστηρίων και το πρόγραμμα της PCR που πραγματοποιήθηκε

		Program		
H_2O	16.72 μl			
10x Buffer	2 μl	95°C	2’	
10mM dNTPs	0.4 μl	95°C	30’’	30 cycles
10μM F primer T7	0.4 μl	50°C	30’’	
10μM Reverse	0.4 μl	72°C	1’	
KapaTaq (5 units/μl)	0.08 μl	72°C	5’	
Total volume	20 μl	4°C	∞	

Από τις θετικές για το ένθεμα αποικίες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA (mini-prep, Qiagen) και αλληλουχήθηκε (Macrogen) για τον τελικό έλεγχο.

Σχεδιασμός πλασμιδίου-δότη για ομόλογο ανασυνδυασμό

Σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε *de novo* (Genscript) ένα πλασμίδιο που θα αποτελέσει τον δότη για τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Το πλασμίδιο πέρα από την επιθυμητή μεταλλαγή, περιλαμβάνει συνώνυμες τροποποιήσεις σε σχέση με την αλληλουχία του αρχικού στελέχους, οι οποίες θα βοηθήσουν στην μοριακή ανίχνευση των τροποποιημένων ατόμων. Επίσης, μπορεί να περιλαμβάνει τροποποιήσεις στη θέση PAM ή στην αλληλουχία στόχο, ώστε να μην αναγνωρίζεται από την Cas9 και καταστρέφεται κατά τη διαδικασία CRISPR.

Συγκεκριμένα, για την μεταλλαγή L1014F, μια συνώνυμη μετάπτωση C → T δημιουργεί μια θέση περιορισμού για το ένζυμο *NsiI*, ενώ μια δεύτερη συνώνυμη μετάπτωση C → T καταργεί την υπάρχουσα θέση κοπής του ενζύμου *MscI*. Η L1014F δημιουργείται από την μετάπτωση C → T, με μετατροπή του κωδικονίου από CTT → TTT. Συνώνυμες μεταλλαγές εισήχθησαν και στις αλληλουχίες-στόχους των gRNAs για να αποφευχθεί η αναγνώριση και πέψη του πλασμιδίου δότη από την πρωτεΐνη Cas9 (Παράρτημα, Εικόνα 2). Το πλασμίδιο - δότης για την μεταλλαγή I1056M σχεδιάστηκε όπως αναφέρεται στο Douris et al. (2016) (Παράρτημα, Εικόνα 1).

Μικροενέσεις – Μοριακή ανίχνευση τροποποιημένων ατόμων

Έμβρυα από το στέλεχος nos.Cas9 ενέθηκαν στον γαμετικό πόλο με το μείγμα των πλασμιδίων που περιείχε 75ng/μl από κάθε gRNA και 100ng/μl από το πλασμίδιο δότη (Ren et al., 2014), διαλυμένα σε injection buffer (2mM sodium phosphate, pH 6.8-7.8, 100mM KCl). Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν από τον κ. Λειβαδάρα (IMBB-FORTH).

Τα ενεθέντα άτομα G_0, ακόμα και αν έχει πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός, δεν φέρουν την εκάστοτε μεταλλαγή στα σωματικά κύτταρα, παρά μόνο στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, όπου εκφράζεται η Cas9. Μπορούν όμως, αν έχει πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός σε κάποια γαμετικά κύτταρα, να δώσουν ετερόζυγους ως προς τη μεταλλαγή απογόνους. Η ανίχνευση για την ύπαρξη της μεταλλαγής γίνεται μόνο με μοριακό έλεγχο, ο οποίος βασίζεται στις τροποποιήσεις που έγιναν στο πλασμίδιο δότη, σε σχέση με την αρχική αλληλουχία του γονιδίου. Οι στρατηγικές για τον μοριακό έλεγχο είναι οι εξής:

- Έλεγχος με ειδικούς εκκινητές: Αρχικά, πραγματοποιείται απομόνωση DNA από μεμονωμένα άτομα, είτε από ~30 νύμφες/προνύμφες μαζικά (μόνο για τον πρώτο έλεγχο, ο οποίος γίνεται δειγματοληπτικά, βλ. επόμενη παράγραφο). Ακολουθεί ενίσχυση ~30ng από το DNA με PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές που προσδένονται ειδικά στην τροποποιημένη αλληλουχία (ETXSM για το *kkv* και 1014UP/1014DOWN για το *para*). Οι εκκινητές αυτοί δεν μπορούν να προσδεθούν στην αλληλουχία των ατόμων αγρίου τύπου. Στον τελικό έλεγχο σε πηκτή αγαρόζης, θα παρουσιαστούν ζώνες μόνο στα δείγματα που προέρχονται από άτομα που έχουν ενσωματώσει την αλληλουχία του πλασμιδίου δότη.

- Έλεγχος με ένζυμα περιορισμού: Πραγματοποιείται και πάλι απομόνωση DNA από μεμονωμένα άτομα, είτε από ~30 νύμφες/προνύμφες μαζικά (μόνο για τον πρώτο έλεγχο, ο οποίος γίνεται δειγματοληπτικά, βλ. επόμενη παράγραφο). Στην αλληλουχία του πλασμιδίου-δότη έχει καταργηθεί η θέση κοπής ενός ενζύμου περιορισμού (NcoI για το *kkv*, MscI για το *para*, στο εξής θα ονομάζονται "Ομάδα 1") ενώ έχει δημιουργηθεί θέση κοπής για ένα άλλο (FokI για το *kkv* και NsiI για το *para*, στο εξής θα ονομάζονται "Ομάδα 2"). Η ενίσχυση του DNA με γενικούς εκκινητές (που προσδένονται τόσο στο τροποποιημένο όσο και στο αγρίου τύπου αλληλόμορφο) θα δώσει προϊόν που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πέψη με μία από τις δύο ομάδες ενζύμων που αναφέρθηκαν. Η πέψη με την Ομάδα 1 θα έχει ως αποτέλεσμα τα αγρίου τύπου αλληλόμορφα να παρουσιάζουν δύο ζώνες στην πηκτή αγαρόζης, ενώ τα τροποποιημένα μόνο μία (το τροποποιημένο αλληλόμορφο δεν πέπτεται από τα ένζυμα). Τα αποτελέσματα της πέψης με την δεύτερη ομάδα θα είναι τα αντίστροφα.

Οι δύο παραπάνω στρατηγικές μοριακού ελέγχου μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά προκειμένου να γίνει επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Γενετικές διασταυρώσεις για τη δημιουργία ομόζυγου ως προς τη μεταλλαγή στελέχους

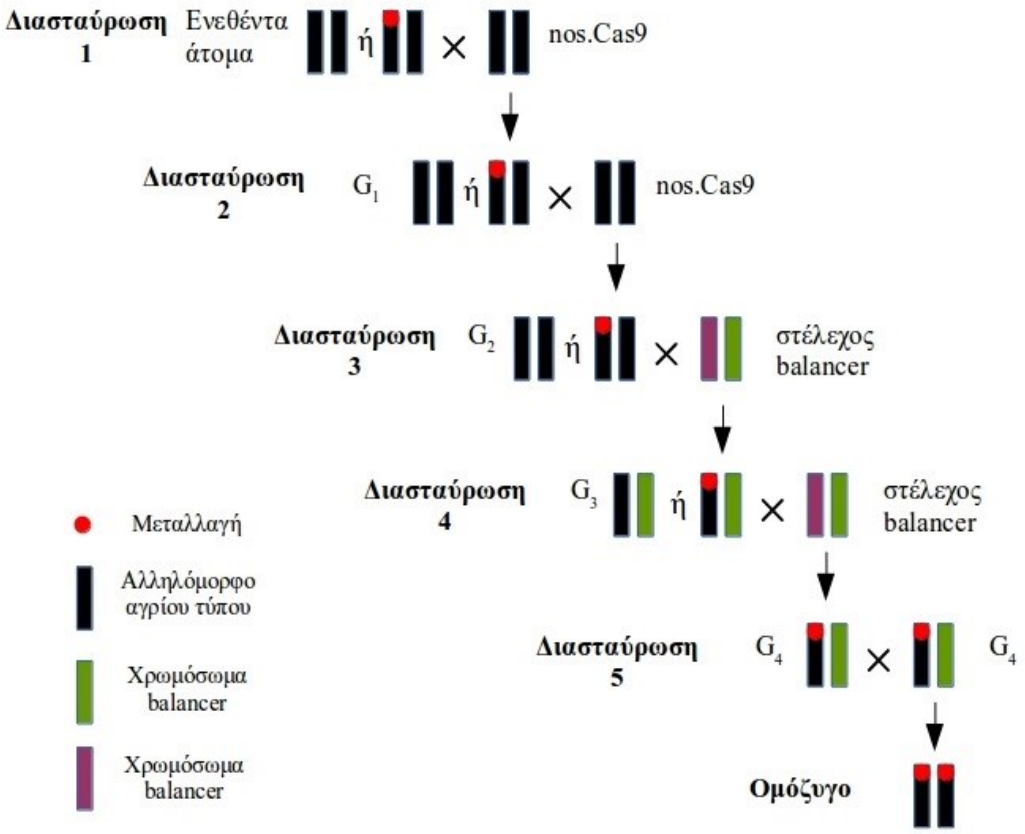
Προκειμένου να διασωθεί το τροποποιημένο αλληλόμορφο και να βρεθεί σε ομόζυγη κατάσταση ακολουθείται μια σειρά από διασταυρώσεις και μοριακούς ελέγχους.

1η Διασταύρωση: Ενεθέντα ενήλικα (G_0) διασταυρώνονται με άτομα του αρχικού στελέχους nos.Cas9 και οι απόγονοι της επόμενης γενιάς (G_1) ελέγχονται δειγματοληπτικά για την ύπαρξη της μεταλλαγής (~30 νύμφες/προνύμφες από κάθε διασταύρωση).

2η Διασταύρωση: Απόγονοι G_1 από θετικές ως προς την εισαγωγή της μεταλλαγής διασταυρώσεις G_0, διασταυρώνονται ξανά με άτομα nos.Cas9 και αφού δώσουν απογόνους (G_2) ελέγχονται οι ίδιοι ένας προς ένας για την ύπαρξη της μεταλλαγής, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Όσα είναι αρνητικά, απορρίπτονται οι αντίστοιχες διασταυρώσεις.

3η Διασταύρωση: Από όσες διασταυρώσεις περιέχουν το τροποποιημένο αλληλόμορφο, άτομα G_2 ετερόζυγα διασταυρώνονται με κατάλληλο στέλεχος που περιέχει χρωμόσωμα balancer, αντίστοιχο με το χρωμόσωμα στο οποίο έχει γίνει η γονιδιωματική τροποποίηση (Πίνακας 3.1). Ένα χρωμόσωμα balancer είναι το προϊόν πολλαπλών χρωμοσωμικών αναστροφών ώστε να διαταράσσονται οι συνάψεις μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων, διασφαλίζοντας έτσι την ακέραια ύπαρξη της μεταλλαγής στη θέση όπου βρίσκεται καθιστώντας αδύνατο τον ανασυνδυασμό. Ακολουθεί μοριακός έλεγχος των ατόμων G_2, το 50% των οποίων αναμένεται να φέρουν τη μεταλλαγή.

4η Διασταύρωση: Απόγονοι των θετικών ατόμων G_2, διασταυρώνονται ξανά (ανάδρομη διασταύρωση) με το αρχικό στέλεχος balancer. Από αυτή τη διασταύρωση, όσα άτομα προέρχονται από θετικούς γονείς φέρουν τώρα το τροποποιημένο αλληλόμορφο απέναντι από balancer, οπότε αν διασταυρωθούν μεταξύ τους επιτρέπουν να πάρουμε απογόνους ομόζυγους ως προς τη μεταλλαγή. Τέλος, τα ομόζυγα άτομα διασταυρώνονται μεταξύ τους για τη διατήρηση του γονιδιωματικά τροποποιημένου στελέχους και ελέγχονται με αλληλούχηση.



Εικόνα 3.2: Παρουσιάζεται η ροή των γενετικών διασταυρώσεων προκειμένου να δημιουργηθεί ομόζυγο άτομο ως προς τη μεταλλαγή. Απεικονίζονται τα αλληλόμορφα αγρίου τύπου (μαύρο), το στέλεχος balancer που φέρει δύο χρωμοσώματα balancer και δύο διαφορετικούς φαινοτυπικούς δείκτες (πράσινο και μωβ) και η μεταλλαγή (κόκκινη κουκίδα). Οι απόγονοι της πρώτης διασταύρωσης ελέγχονται μαζικά για την ύπαρξη της μεταλλαγής. Στις επόμενες διασταυρώσεις ελέγχεται η πατρική γενιά αφού δώσει απογόνους, και χρησιμοποιούνται μόνο οι απόγονοι που έχουν προέλθει από θετικούς γονείς. Από τη διασταύρωση 3 και έπειτα, επιλέγεται ένας από τους δύο φαινοτυπικούς δείκτες, συνήθως όποιος είναι πιο ευκρινής. Οι διασταυρώσεις που παρουσιάζονται αφορούν αλληλόμορφα που βρίσκονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα.

3.2.2 Κατασκευή στελεχών που υπερεκφράζουν κυτοχρώματα P450 σε γενετικό υπόβαθρο που φέρει τη σημειακή μεταλλαγή L1014F

Πίνακας 3.4: Στελέχη *D. melanogaster* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την ενότητα

Στέλεχος	Περιγραφή	Πηγή
L1014F	Στέλεχος που φέρει τη σημειακή μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο *para*	Παρούσα εργασία
UAS.CYP9J28	Στέλεχος που φέρει το διαγονίδιο *Cyp9j28* στο 2° χρωμόσωμα υπό τον έλεγχο του UAS	Pavlidi et al, 2012
UAS.CYP6BQ23	Στέλεχος που φέρει το διαγονίδιο *Cyp6bq23* στο 2° χρωμόσωμα υπό τον έλεγχο του UAS	Σ. Κουνάδη, εργασία ΜΔΕ
HRGAL4	Στέλεχος που φέρει το διαγονίδιο *hrgal4* στο 3° χρωμόσωμα	Chung et al. (2007)
FM7 ScW/ y oc ; TM3 / Ly	Στέλεχος με δύο χρωμοσώματα balancer στο πρώτο και τρίτο ζεύγος, και τους φαινοτυπικούς δείκτες Bar (ραβδοειδές μάτι), Stubble (κομμένες σμήριγγες) και Ly (ορθογώνια φτερά)	Delidakis Laboratory Stock
FM7 ; CyO / Sp	Στέλεχος με δύο χρωμοσώματα balancer στο πρώτο και δεύτερο ζεύγος, και τους φαινοτυπικούς δείκτες Bar (ραβδοειδές μάτι), Curly (κατσαρά φτερά) και Sp (αυξημένος αριθμός σμηριγγών πλευρικά του στέρνου)	Delidakis Laboratory Stock

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά από διαδοχικές διασταυρώσεις με σκοπό την κατασκευή στελέχους το οποίο υπερεκφράζει κάποιο κυτόχρωμα P450 και φέρει την μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαγονιδιακά εργαστηριακά στελέχη τα οποία φέρουν στο δεύτερο χρωμόσωμα τα *Cyp9j28* και *Cyp6bq23* καθώς και το στέλεχος που φέρει το τροποποιημένο γονίδιο *para* με τη μεταλλαγή L1014F (X χρωμόσωμα). Προκειμένου τα δύο επιθυμητά γονίδια (κυτόχρωμα P450 και τροποποιημένο γονίδιο *paralytic*) να βρεθούν στο ίδιο άτομο, πραγματοποιήθηκαν οι διασταυρώσεις του Πίνακα 3.5 με στελέχη που διαθέτουν δύο διαφορετικά χρωμοσώματα balancer και συγκεκριμένους φαινοτυπικούς δείκτες, οι οποίοι επιτρέπουν τον εντοπισμό του επιθυμητού γονιδίου με βάση το φαινότυπο του εντόμου (Πίνακας 3.4).

Τα δύο γονίδια P450 που συνδυάστηκαν με την L1014F βρίσκονται υπό τον έλεγχο των ανοδικών αλληλουχιών UAS του συστήματος GAL4/UAS. Το σύστημα αυτό δίνει τη δυνατότητα για στοχευμένη γονιδιακή έκφραση (Fischer et al., 1988). Για την έκφραση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η διασταύρωση των στελεχών UAS με άτομα που εκφράζουν κάποια πρωτεΐνη GAL4.

Για το λόγο αυτό, επιχειρήθηκε η δημιουργία στελέχους, το οποίο φέρει τον driver (προαγωγός) HRGAL4 και τη μεταλλαγή L1014F. Ο driver HRGAL4 καθοδηγεί την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου στα μαλπιγγιανά σωληνάρια, στον λιπιδικό ιστό και στο μεσέντερο (Chung et al., 2007). Άτομα από το στέλεχος αυτό (L1014F/L1014F ; HRGAL4/HRGAL4) θα διασταυρωθούν με άτομα του στελέχους που περιγράφηκε παραπάνω (L1014F/L1014F ; UAS.P450/UAS.P450), ώστε οι απόγονοι να εκφράζουν το εκάστοτε γονίδιο P450, σε γενετικό υπόβαθρο L1014F.

Πίνακας 3.5: Ροή διασταυρώσεων για την κατασκευή στελέχους ομόζυγου ως προς ένα γονίδιο κυτοχρώματος P450 και του γονιδίου para που φέρει τη μεταλλαγή L1014F. Το χρωμόσωμα X που φέρει το τροποποιημένο γονίδιο para συμβολίζεται ως X^{L1014F}. (Για επεξηγήσεις φαινοτύπων βλ. Πίνακα 3.4).

	Διασταυρώσεις	Επιθυμητοί απόγονοι	Σχόλια
1	$\frac{X^{L1014F}}{X^{L1014F}};\frac{+}{+} \times \frac{FM7}{\neg};\frac{CyO}{Sp}$	$\frac{X^{L1014F}}{FM7};\frac{CyO}{+}$ $\frac{X^{L1014F}}{FM7};\frac{Sp}{+}$	Στόχος της διασταύρωσης αυτής είναι να βρεθεί το γονίδιο *para* που περιέχει τη μεταλλαγή L1014F απέναντι από χρωμόσωμα balancer (FM7). Επιλέγονται μόνο θηλυκοί απόγονοι που έχουν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους (Curly φτερά, Sternopleural (Sp)) (Βλ. Πίνακα 3.4)
2	$\frac{X^{L1014F}}{FM7};\frac{Sp}{+} \times \frac{yw}{\neg};\frac{P450}{P450}$	$\frac{X^{L1014F}}{\neg};\frac{P450}{Sp}$	Θηλυκά με φαινότυπο Sp της Δ.1, διασταυρώνονται με αρσενικά που φέρουν το διαγονίδιο P450. Επιλέγονται μόνο αρσενικοί απόγονοι με κανονικό σχήμα ματιού (άρα περιέχουν το γονίδιο *para*) και το φαινότυπο Sp. Δεδομένου ότι στα αρσενικά δεν πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός δεν επιβάλεται η ύπαρξη χρωμοσώματος balancer απέναντι από το διαγονίδιο P450
3	$\frac{X^{L1014F}}{FM7};\frac{CyO}{+} \times \frac{X^{L1014F}}{\neg};\frac{P450}{Sp}$	$\frac{X^{L1014F}}{X^{L1014F}};\frac{P450}{CyO}$ $\frac{X^{L1014F}}{\neg};\frac{P450}{CyO}$	Διασταυρώνονται Curly θηλυκά από τη Δ.1 και τα αρσενικά της Δ.2. Επιλέγονται απόγονοι με κανονικό σχήμα ματιού (συνεπώς ομόζυγοι για το γονίδιο *para*) και Curly φτερά, αλλά όχι Sp (συνεπώς ετερόζυγοι ως προς το διαγονίδιο P450).
4	$\frac{X^{L1014F}}{X^{L1014F}};\frac{P450}{CyO} \times \frac{X^{L1014F}}{\neg};\frac{P450}{CyO}$	$\frac{X^{L1014F}}{\neg};\frac{P450}{P450}$ $\frac{X^{L1014F}}{X^{L1014F}};\frac{P450}{P450}$	Διασταυρώνονται μεταξύ τους οι συγκεκριμένοι απόγονοι της Δ.3 προκειμένου να βρεθεί και το διαγονίδιο της P450 σε ομόζυγη κατάσταση

Αντίστοιχες διασταυρώσεις με αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5 ακολουθήθηκαν και για τη δημιουργία στελέχους ομόζυγου ως προς το γονίδιο *hrgal4* και το τροποποιημένο γονίδιο *para*. Χρησιμοποιήθηκε στέλεχος με διπλά χρωμοσώματα balancer, στο πρώτο και τρίτο ζεύγος (Πίνακας 3.4) καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το γονίδιο *hrgal4* βρίσκεται στο τρίτο χρωμόσωμα (Chung et al., 2007).

3.2.3 Εντομοκτόνα

Χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σκευάσματα εντομοκτόνων για τις τοξικολογικές βιοδοκιμές διατροφής και συγκεκριμένα τα Borneo (11% w/v etoxazole; Hellapharm), Dimilin (48% w/v diflubenzuron; Syngenta), Match (50% w/v lufenuron; Syngenta), Trigard (75% w/v cyromazine; Syngenta) και Applaud (25% w/v buprofezine; Syngenta). Για τις βιοδοκιμές επαφής χρησιμοποιήθηκε δραστική ουσία Deltamethrin (99.9%, Sigma Aldrich). Οι χημικές δομές των ουσιών αυτών φαίνονται στο Παράρτημα, Εικόνα 3.

3.2.4 Βιοδοκιμές

Οι τοξικολογικές βιοδοκιμές αποτελούν ένα μέσο ελέγχου της απόκρισης ενός οργανισμού στην πίεση που του ασκείται από την προσθήκη μιας τοξικής ουσίας στο περιβάλλον του. Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης της ουσίας που εξετάζεται, χρησιμοποούνται διαφορετικές μέθοδοι βιοδοκιμών.

<u>Βιοδοκιμές διατροφής (feeding bioassays)</u>

Οι βιοδοκιμές αυτές χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ουσιών οι οποίες προσλαμβάνονται από τον οργανισμό κυρίως μέσω διατροφής και επηρεάζουν διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα αρχικά στάδια ζωής του εντόμου. Εφαρμόζεται σε προνύμφες *D. melanogaster* δευτέρου σταδίου, οι οποίες τοποθετούνται σε συμβατική τροφή Δροσόφιλας, εμποτισμένη με διάφορες συγκεντρώσεις της υπό μελέτη ουσίας και στη συνέχεια γίνεται καταμέτρηση αυτών που επιβίωσαν ως το στάδιο της νύμφης και του ενήλικου.

Συγκεκριμένα, συγκεντρώσεις της υπό μελέτη ουσίας, που προκαλούν 5-95% θνησιμότητα, δημιουργούνται με διαδοχικές αραιώσεις σε νερό. Σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας εντόμων προστίθενται 18 ml τροφής και 2 ml ουσίας (10x σε τροφή), αναμιγνύονται και στη συνέχεια οι σωλήνες καλύπτονται με βαμβάκι. Είκοσι προνύμφες δευτέρου σταδίου συλλέγονται και τοποθετούνται σε κάθε σωλήνα. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιούνται τρεις επαναλήψεις.

Ταυτόχρονα πραγματοποιούνται πειράματα ελέγχου στα οποία οι προνύμφες τοποθετούνται σε σωλήνες που περιέχουν μόνο τροφή. Οι ίδιες συγκεντρώσεις εξετάζονται τόσο στα γονιδιωματικά τροποποιημένα άτομα όσο και σε άτομα αγρίου τύπου.

Βιοδοκιμές επαφής (contact bioassays)

Οι βιοδοκιμές αυτές εφαρμόζονται για τη μελέτη ουσιών οι οποίες μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό μέσω επαφής του εντόμου με την ουσία, και έχουν ως στόχο βασικές λειτουργίες του οργανισμού. Εφαρμόζονται σε ενήλικα άτομα, 2- 4 ημερών, τα οποία τοποθετούνται σε γυάλινους σωλήνες τα τοιχώματα των οποίων έχουν καλυφθεί με την υπό μελέτη ουσία.

Συγκεκριμένα, διάφορες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου, που προκαλούν 5-95% θνησιμότητα, δημιουργούνται με διαδοχικές αραιώσεις σε ακετόνη. Στη συνέχεια, 500μl διαλύματος προστίθεται σε κάθε σωλήνα και αφήνονται υπό περιστροφική ανακίνηση μέχρι την πλήρη εξάτμιση της ακετόνης και την ομοιόμορφη κάλυψη των τοιχωμάτων από την ουσία. Κάθε συγκέντρωση μελετάται σε τρεις επαναλήψεις. Είκοσι άτομα, δέκα από το κάθε φύλο, τοποθετούνται σε κάθε σωλήνα, οι οποίοι καλύπτονται με βαμβάκι εμποτισμένο με 5% σουκρόζη. Η έκθεση των ατόμων στην ουσία γίνεται για 24 ώρες και έπειτα μετράται η θνησιμότητα.

3.2.5 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκαν ώστε να βρεθούν οι τιμές LC_{50} που αντιπροσωπεύουν την συγκέντρωση του εντομοκτόνου η οποία είναι ικανή να θανατώσει το 50% του πληθυσμού. Ο υπολογισμός των τιμών LC_{50}, έγινε με τη χρήση του προγράμματος PoLoPlus (2002; LeOra Software, Berkeley, 167CA). Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί ένα εξειδικευμένο μοντέλο παλινδρόμησης για την ανάλυση διωνυμικών μεταβλητών (Probit analysis). Ο δείκτης της ανθεκτικότητας (Resistance Ratio) υπολογίστηκε από τον λόγο του LC_{50} των ανθεκτικών ατόμων προς το LC_{50} των ευαίσθητων.

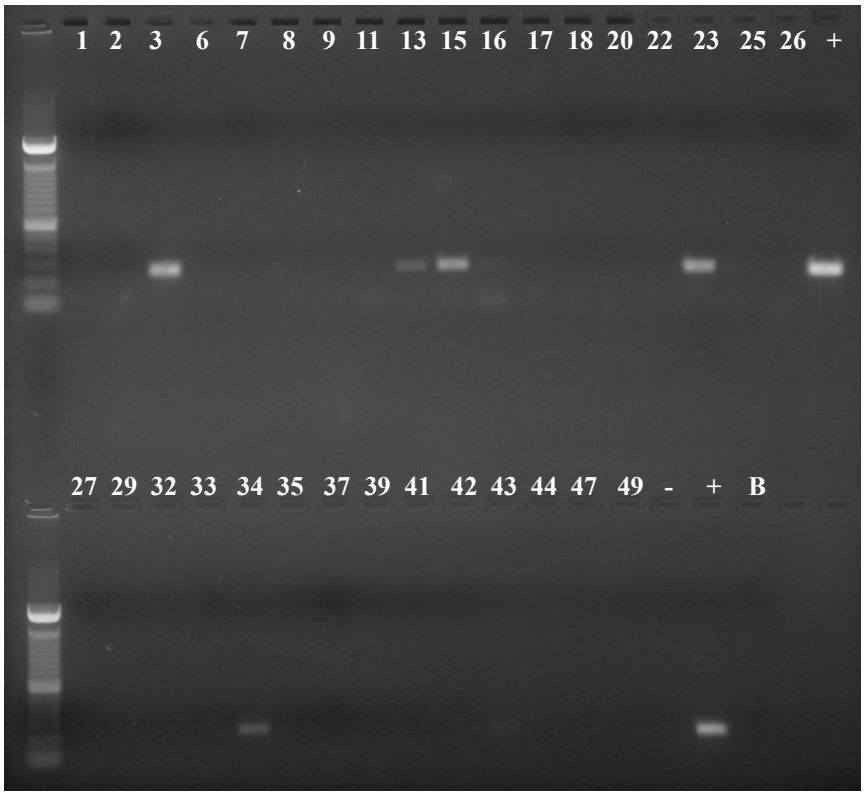
3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila melanogaster* με εισαγωγή μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότα σε εντομοκτόνα

Εισαγωγή της μεταλλαγής I1056F στο γονίδιο *kkv*, (αντίστοιχη της I1017F στην Chitin synthase 1 (*CHS1*) από το άκαρι *Tetranychus urticae*)

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση της περιοχής στην οποία θα γίνει εισαγωγή της μεταλλαγής σε γενωμικό DNA του στελέχους nos.Cas9. Δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στην αλληλουχία του στελέχους σε σχέση με την δημοσιευμένη αλληλουχία. Οι οδηγοί RNA και το πλασμίδιο δότης που χρησιμοποιήθηκε σχεδιάστηκαν όπως περιγράφεται στο Douris et al. (2016)(Παράρτημα, Εικόνα 1).

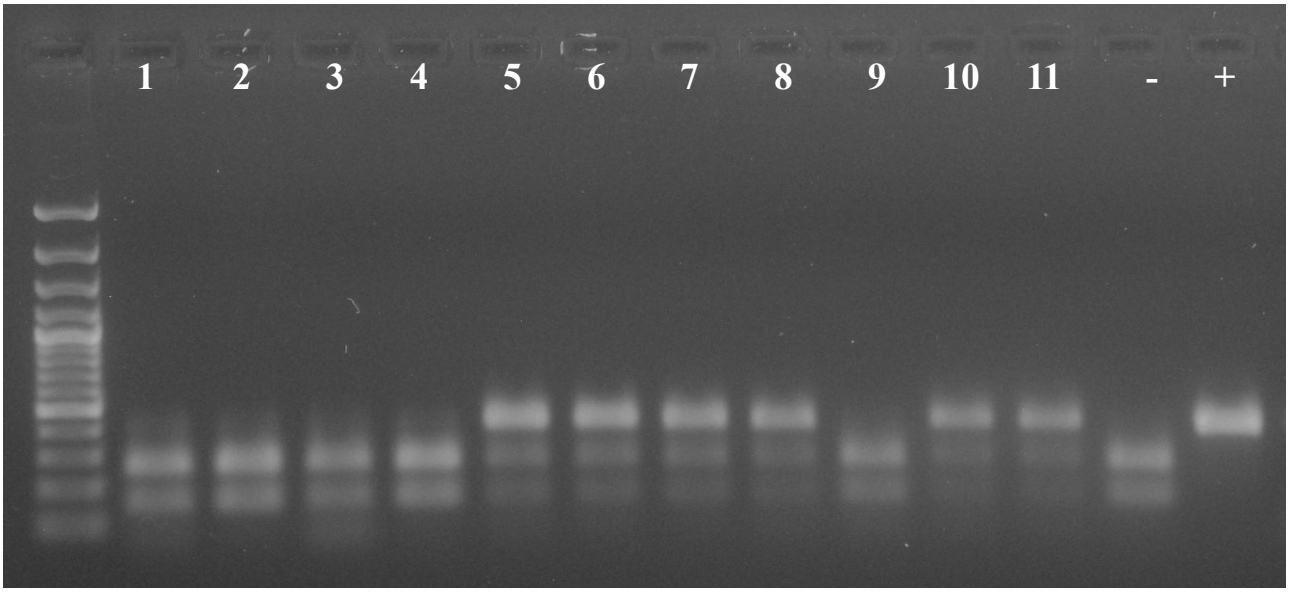
Αφού πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις στα έμβρυα, συλλέχθηκαν οι προνύμφες πρώτου σταδίου και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με τροφή. Τα άτομα που έφτασαν στο στάδιο του ενήλικου εντόμου (G_0) διασταυρώθηκαν με άτομα nos.Cas9 και ~30 απόγονοί τους (G_1) ελέγχθηκαν δειγματοληπτικά “en masse” με PCR ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου, χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα τη μεταλλαγή I1056F. Βρέθηκε να έχει γίνει εισαγωγή της μεταλλαγής σε 16 από τις 77 διασταυρώσεις που έδωσαν απογόνους G_1 (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Μοριακός έλεγχος "en masse" των απογόνων από τις διασταυρώσεις των G_0 ατόμων με nos.Cas9. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση PCR με εκκινητές ειδικούς ως προς τη μεταλλαγή I1056F. Θετικός μάρτυρας (+) ήταν το πλασμίδιο δότης και αρνητικός (-), DNA από άτομα nos.Cas9. Ως θετικές σειρές χαρακτηρίστηκαν οι 3, 13, 15, 16, 23 ,25, 34, 43

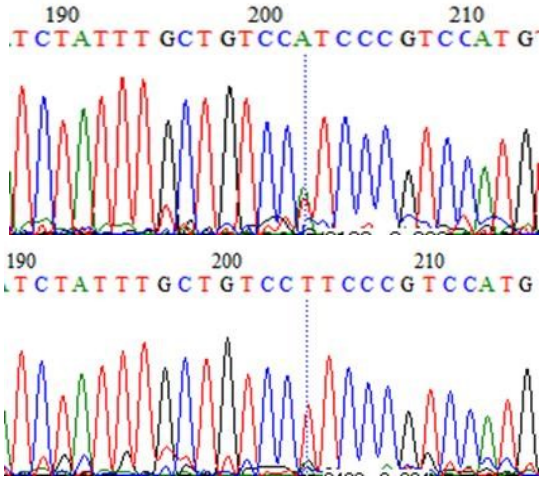
Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ροή των διασταυρώσεων όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.1. Το στέλεχος balancer που χρησιμοποιήθηκε στις διασταυρώσεις ώστε να αποφευχθεί ο ανασυνδυασμός μεταξύ των χρωμοσωμάτων, ήταν το yw; TM3 Sb e/TM6B Tb Hu e, που βρίσκεται στο τρίτο χρωμόσωμα, όπως και η μεταλλαγή που εισαγάγαμε.

Στην Εικόνα 3.4, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου μεμονωμένων ατόμων G_3. Το DNA έχει ενισχυθεί με γενικούς εκκινητές και το προϊόν (395 bp) της αντίδρασης έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο *NcoI* το οποίο αναγνωρίζει θέση κοπής μόνο στα αγρίου τύπου στελέχη (μη γονιδιωματικά τροποποιημένα). Τα άτομα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία η εισαγωγή της μεταλλαγής, βρίσκονται σε ετερόζυγη κατάσταση. Σε αυτά εμφανίζονται τρεις ζώνες, η μία του τροποποιημένου αλληλομόρφου στις 395 βάσεις, (που δεν πέπτεται από NcoI), και δύο μικρότερες που προέρχονται από το αλληλόμορφο που βρίσκεται στο χρωμόσομα balancer και είναι προϊόντα της πέψης με την *NcoI*. Άτομα που δεν έχουν τροποποιηθεί εμφανίζουν μόνο τις δυο μικρότερες ζώνες.



Εικόνα 3.4: Μοριακός έλεγχος μεμονωμένων ατόμων που προέρχονται από τη διασταύρωση G2 με TM3 Sb/ TM6 Tbe. Το DNA έχει ενισχυθεί με χρήση γενικών εκκινητών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο NcoI (θέση κοπής μόνο στο αγρίου τύπου αλληλόμορφο). Θετικός μάρτυρας (+) ήταν το πλασμίδιο δότης και αρνητικός (-) το DNA από άτομα nos.Cas9.

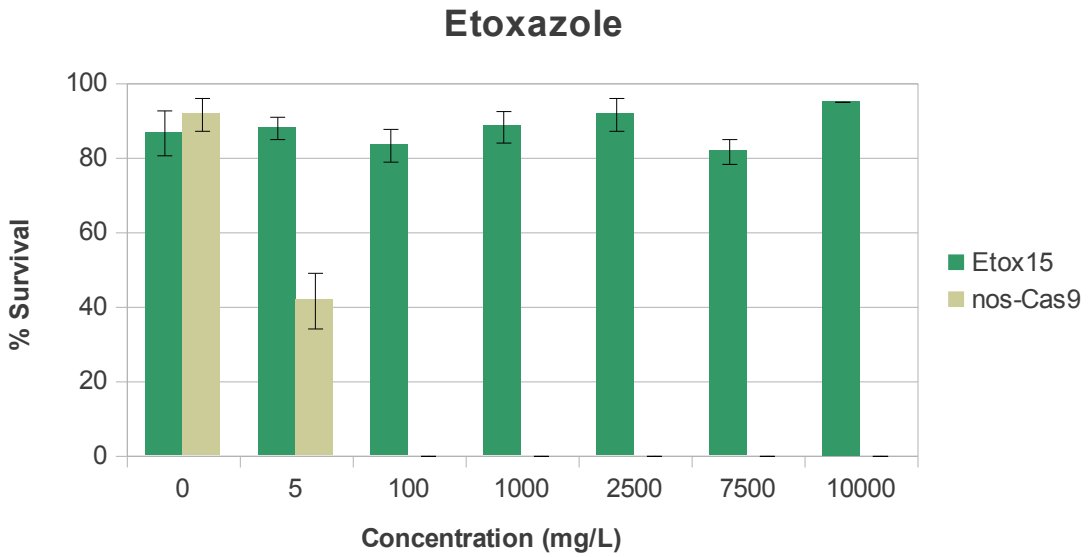
Μία σειρά από τις 16 που αποδείχθηκαν θετικές, η οποία ονομάστηκε Etox15, έφτασε στο στάδιο της ομοζύγωσης και διαπιστώθηκε η ύπαρξη της μεταλλαγής, πέρα από τους μοριακούς ελέγχους που αναφέρθηκαν, και με αλληλούχηση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδίου *kkv* (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5:
Πάνω: Χρωματογράφημα από την αλληλούχιση ετερόζυγου ατόμου Etox15/TM3 Sb, όπου φαίνεται η ύπαρξη και των δύο νουκλεοτιδίων (A και T, πράσινη και κόκκινη κορυφή αντίστοιχα) στη θέση 1056.
Κάτω: Χρωματογράφημα από την αλληλούχιση ομόζυγου ατόμου Etox15, όπου φαίνεται η ύπαρξη μόνο του νουκλεοτιδίου θυμίνη (T, κόκκινη κορυφή) στη θέση 1056.
Και στις δύο εικόνες η θέση 1056 επισημαίνεται με την διακεκομμένη γραμμή.

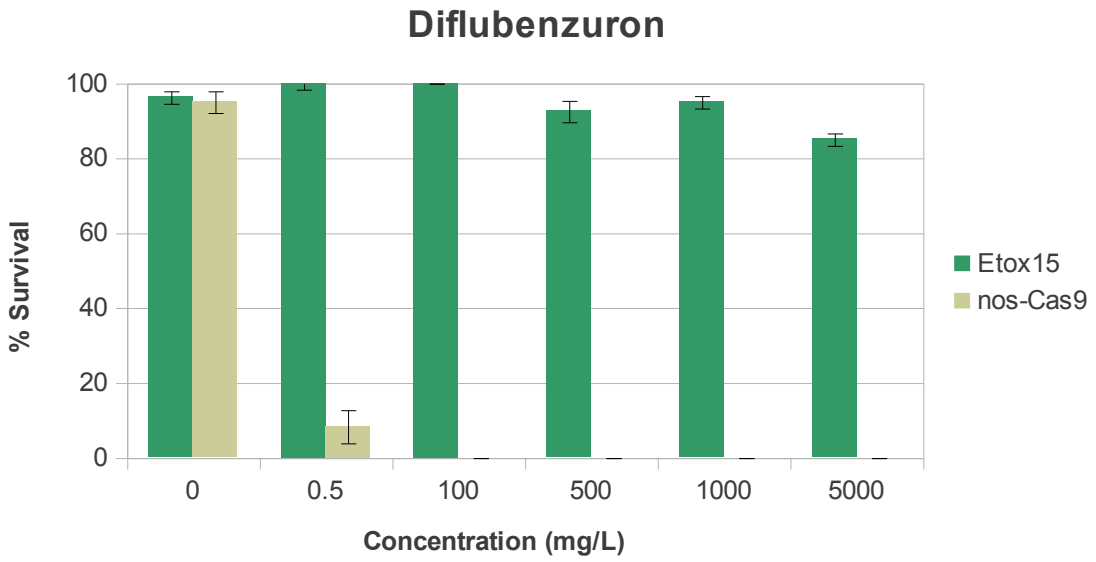
Βιοδοκιμές

Πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές διατροφής σε προνύμφες δευτέρου σταδίου του στελέχους Etox15 και ταυτόχρονα, στις ίδιες συνθήκες, ελέγχθηκαν άτομα αγρίου τύπου ως πειράματα ελέγχου. Επιλέγησαν τα στελέχη nos.Cas9 και yw, τα οποία συνεισφέρουν στο γενετικό υπόβαθρο του στελέχους Etox15 (στο nos.Cas9 πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις και το yw αποτελεί το υπόβαθρο του στελέχους balancer που χρησιμοποιήθηκε κατά τις διασταυρώσεις). Τα δύο αυτά στελέχη έδωσαν παρόμοια ποσοστά επιβίωσης στα πέντε υπό έλεγχο εντομοκτόνα, και για το λόγο αυτό παρουσιάζονται μόνο τα ποσοστά του nos.Cas9. Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης των ατόμων Etox15 και nos.Cas9 σε σχέση με την συγκέντρωση του εκάστοτε εντομοκτόνου.

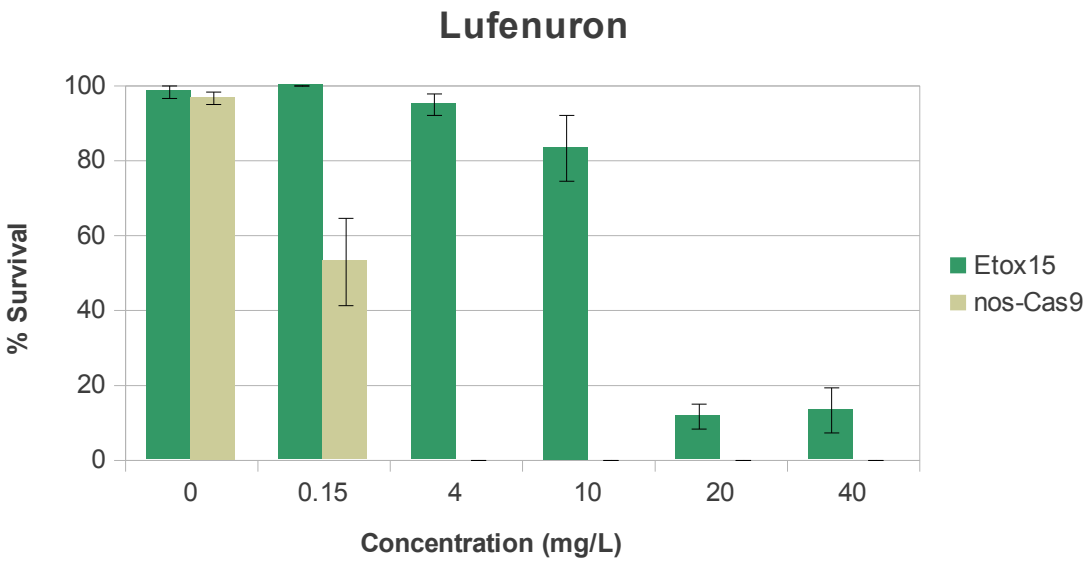


Γράφημα 3.1: Βιοδοκιμές διατροφής με το εντομοκτόνο Etoxazole. Τα αποτελέσματα είναι μέσοι όροι ±SEM. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (>1000mg/L) τα ενήλικα άτομα Etox15 πεθαίνουν αμέσως μετά την έκδυση.

Στο Γράφημα 3.1 παρουσιάζεται η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων του ακαρεοκτόνου etoxazole στο στέλεχος Etox15 (πράσινο χρώμα) και στο nos.Cas9 (λαδί χρώμα). Ως αποτέλεσμα της σημειακής μεταλλαγής I1056F, το Etox15 σχηματίζει νύμφες και φτάνει στο στάδιο του ενηλίκου μέχρι και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση που μελετήθηκε (10000mg/L) ενώ το nos.Cas9 δεν μπορεί να επιβιώσει σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10mg/L. Η μόνη επίδραση που παρατηρείται στο γονιδιωματικά τροποποιημένο στέλεχος είναι η θνησιμότητα αμέσως μετά την έκδυση, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1000mg/L.



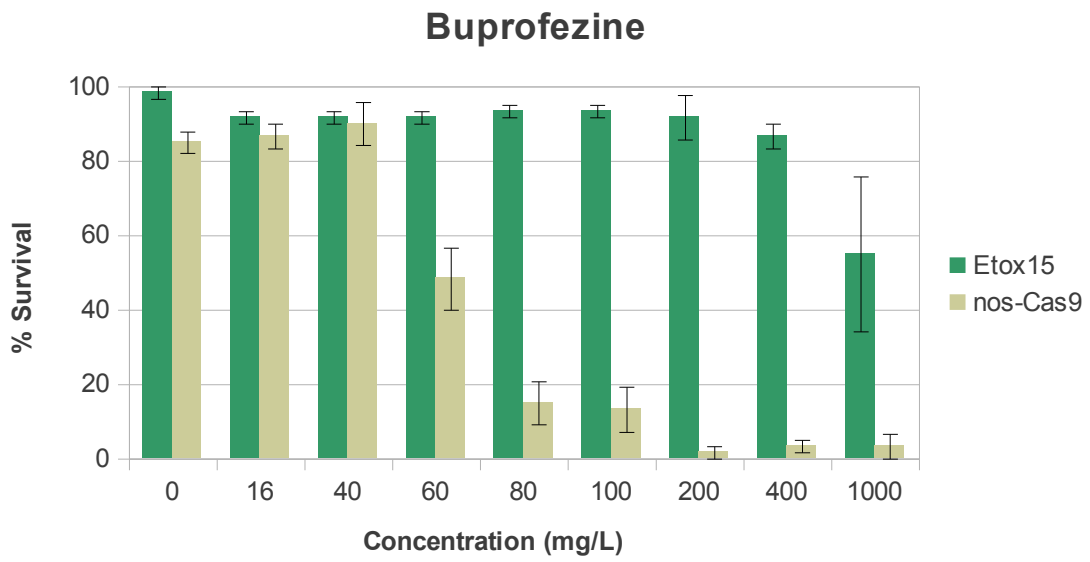
Γράφημα 3.2: Βιοδοκιμή διατροφής με το εντομοκτόνο Diflubenzuron. Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη εντομοκτόνου για κάθε ένα από τα δύο στελέχη. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο ±SEM.



Γράφημα 3.3: Βιοδοκιμή διατροφής με το εντομοκτόνο Lufenuron. Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη εντομοκτόνου για κάθε ένα από τα δύο στελέχη. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο ±SEM.

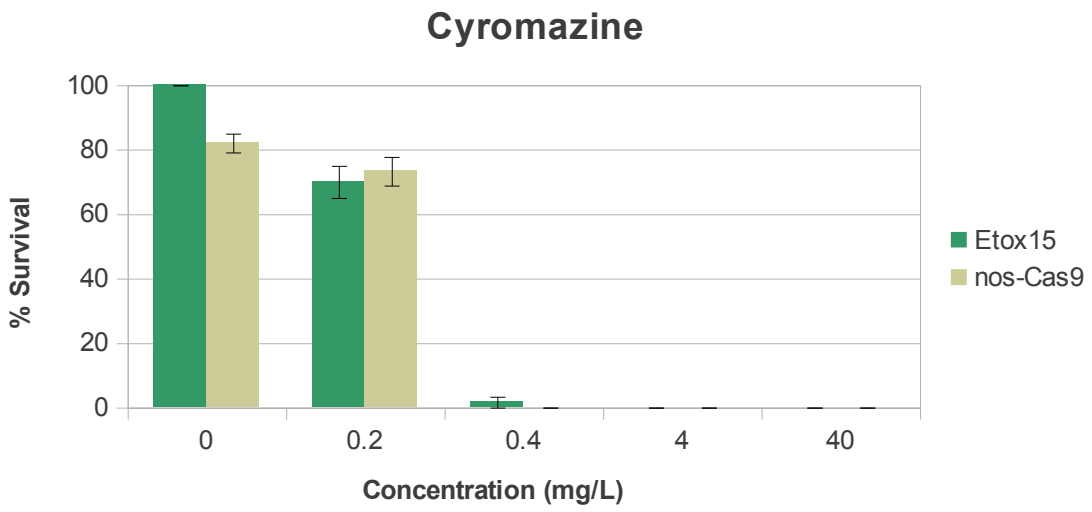
Τα επόμενα δύο εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές είναι το diflubenzuron (Γράφημα 3.2) και το lufenuron (Γράφημα 3.3). Η ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα φαίνεται να επηρεάζεται από την ύπαρξη ή όχι της μεταλλαγής I1056F στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης, καθώς, όπως φαίνεται και στα γραφήματα, το στέλεχος Etox15 επιβιώνει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το nos.Cas9.

Αυξημένη ανθεκτικότητα και ως προς το buprofezin (Γράφημα 3.4) παρουσιάζει το στέλεχος Etox15, το οποίο επιβιώνει σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1000mg/L. Παρατηρήθηκε όμως καθυστέρηση της έκδυσης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 600mg/L. Η εφαρμογή του εντομοκτόνου στο στέλεχος nos.Cas9 προκαλεί θνησιμότητα σε συγκεντρώσεις γύρω στα 50mg/L.



Γράφημα 3.4: Βιοδοκιμές διατροφής με το εντομοκτόνο Buprofezine. Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη εντομοκτόνου για κάθε ένα από τα δύο στελέχη. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο ±SEM. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>600mg/L) η έκδυση καθυστερεί (απαιτείται διπλάσιος αριθμός ημερών).

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του εντομοκτόνου cyromazine στο στέλεχος Etox15 (Γράφημα 3.5). Καμία σχεδόν διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ του ποσοστού επιβίωσης του γονιδιωματικά τροποποιημένου στελέχους και του στελέχους-ελέγχου.



Γράφημα 3.5: Βιοδοκιμή διατροφής με το εντομοκτόνο Cyromazine. Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη εντομοκτόνου για κάθε ένα από τα δύο στελέχη. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο ±SEM.

Με τη χρήση του προγράμματος PoLoPlus υπολογίστηκε η τιμή LC_{50} για κάθε εντομοκτόνο και κάθε στέλεχος καθώς επίσης και ο βαθμός ανθεκτικότητας (Resistance Ratio, RR), και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Το στέλεχος Etox15 παρουσιάζει υψηλό βαθμό ανθεκτικότητας για τα τέσσερα από τα εντομοκτόνα που μελετήθηκαν.

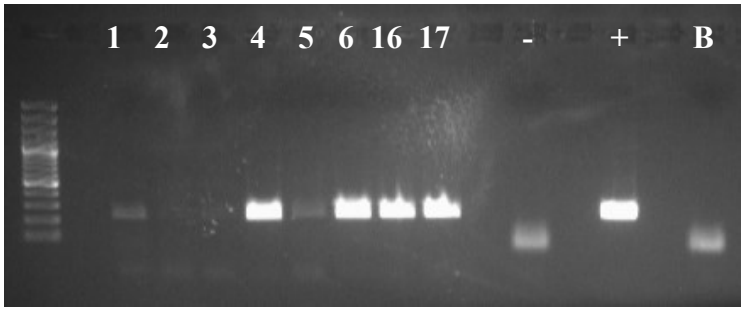
Πίνακας 3.6: Τιμές LC_{50} και RR των στελεχών Etox15 και nos.Cas9 για κάθε ένα από τα υπό μελέτη εντομοκτόνα

Insecticides	Strains	LC_{50}	Resistance Ratio (RR)	95% limits
Etoxazole	Etox15	>10000	>1077	n/a
	nos.Cas9	9.28	1	0.733 -14.003
Diflubenzuron	Etox15	>5000	>15625	n/a
	nos.Cas9	0.32	1	0.236 - 0.422
Lufenuron	Etox15	16.66	111.06	8.697 - 66.477
	nos.Cas9	0.15	1	0.113 - 0.177
Cyromazine	Etox15	0.23	0.747	0.211 - 0.251
	nos.Cas9	0.31	1	0.254 - 0.345
Buprofezin	Etox15	>1000	>18.79	n/a
	nos.Cas9	53.20	1	41.243 - 65.719

Εισαγωγή μεταλλαγής L1014F στο γονίδιο *para* της *Drosophila melanogaster*

Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση στην περιοχή του γονιδίου *para* όπου βρίσκεται η μεταλλαγή L1014F και ανιχνεύτηκαν τρεις νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και έξι εισαγωγές βάσεων (insertions) σε σχέση με την δημοσιευμένη αλληλουχία, τα οποία όμως δεν επηρεάζουν την περιοχή που μας ενδιαφέρει (Παράρτημα, Εικόνα 2). Έπειτα με βάση την αναθεωρημένη αλληλουχία, σχεδιάστηκαν τα gRNAs και το πλασμίδιο δότης όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1.

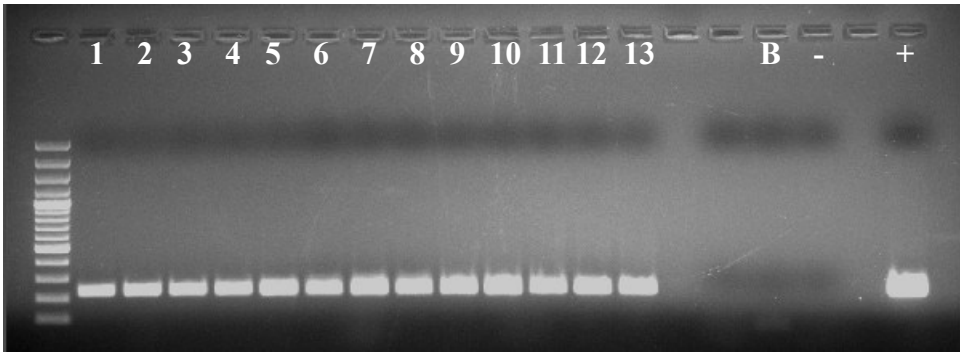
Αφού πραγματοποιήθηκαν ενέσεις σε έμβρυα nos.Cas9, προνύμφες πρώτου σταδίου μεταφέρθηκαν σε τροφή. Τα άτομα που έφτασαν στο στάδιο του ενήλικου εντόμου (G_0) διασταυρώθηκαν με nos.Cas9 και 33 από αυτά έδωσαν απογόνους (G_1). Αυτοί ελέγχθησαν μαζικά (Εικόνα 3.6). Αρχικά έγινε πέψη του DNA με το ένζυμο *MscI* για το οποίο υπάρχει θέση περιορισμού μόνο στα μη τροποποιημένα αλληλόμορφα, και στη συνέχεια έγινε ενίσχυση του κομμένου DNA με εκκινητές οι οποίο προσδένονται ειδικά στις τροποποιήσεις που έχουν εισαχθεί στις αλληλουχίες των gRNAs. Αναγνωρίστηκαν 13 θετικές διασταυρώσεις.



Εικόνα 3.6: Δειγματοληπτικός έλεγχος των απογόνων από τις διασταυρώσεις των ατόμων G_0 με nos.Cas9. Προηγήθηκε πέψη του DNA με το ένζυμο *MscI,* που πέπτει μόνο τα μη τροποποιημένα αλληλόμορφα, και στη συνέχεια έγινε ενίσχυση με εκκινητές που προσδένονται ειδικά στις τροποποιήσεις που έχουν εισαχθεί στις αλληλουχίες των gRNAs.

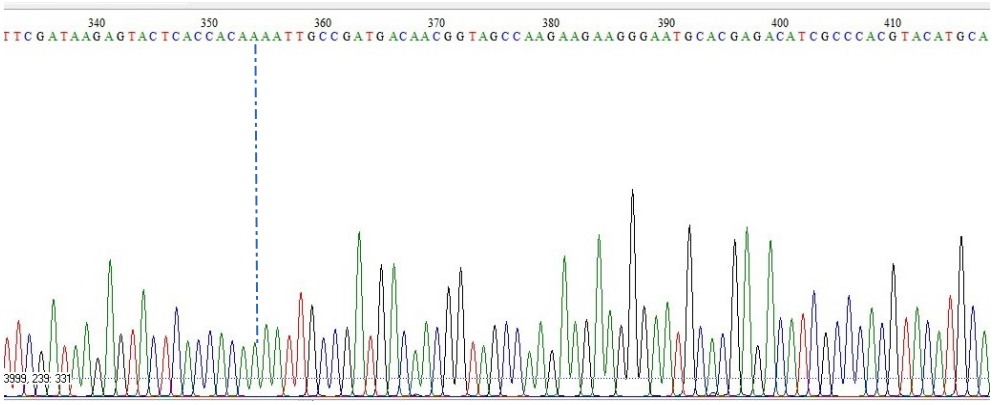
Κατά το σχεδιασμό του πλασμιδίου δότη, μέσω μιας συνώνυμης μεταλλαγής εισήχθη θέση περιορισμού για το ένζυμο *NsiI* ώστε να βοηθήσει στη μοριακή ανίχνευση των γονιδιωματικά τροποποιημένων ατόμων. Ωστόσο, η αντίδραση της πέψης με το ένζυμο αυτό ήταν μερική σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν και δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν τελικά για το μοριακό έλεγχο μόνο οι ειδικοί εκκινητές.

Το γονίδιο *para* βρίσκεται στο χρωμόσωμα X, και το στέλεχος balancer που χρησιμοποιήθηκε κατά τις διασταυρώσεις ήταν το (FRT)w^+ / FM7 Hw WB. Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές DNA από μεμονωμένα άτομα που προέρχονται από τη διασταύρωση των G_2 με το στέλεχος balancer.



Εικόνα 3.7: Μοριακός έλεγχος ατόμων G_3. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του DNA με ειδικούς εκκινητές. Θετικός μάρτυρας (+) ήταν το πλασμίδιο δότης και αρνητικός (-) DNA από άτομα του στελέχους nos.Cas9.

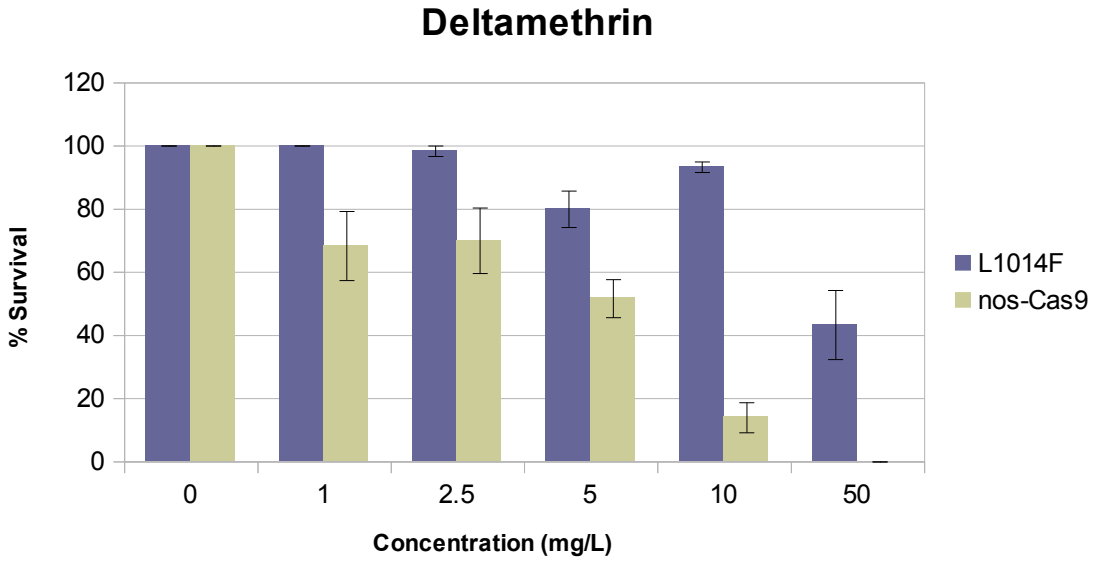
Συνολικά δημιουργήθηκαν τέσσερις σειρές ομόζυγες ως προς τη μεταλλαγή L1014F. Για την επιβεβαίωση της σωστής πραγματοποίησης του ομόλογου ανασυνδυασμού για την εισαγωγή της αλληλουχίας του πλασμιδίου δότη στο γονιδίωμα της *D. melanogaster* πραγματοποιήθηκε έλεγχος με αλληλούχηση της περιοχής (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8: Χρωματογράφημα από την αλληλούχηση ομόζυγου ατόμου ως προς την L1014F. Παρουσιάζεται η αντινοηματική αλληλουχία. Με διακεκομμένη γραμμή επισημαίνεται η περιοχή του κωδικονίου 1014, όπου υπάρχει το νουκλεοτίδιο αδενίνη (πράσινη κορυφή) που αντιστοιχεί στη θυμίνη στην νοηματική αλληλουχία.

<u>Βιοδοκιμές</u>

Πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές επαφής σε ενήλικα άτομα 2-4 ημερών, του στελέχους L1014F ενώ για τα πειράματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος nos.Cas9. Το εντομοκτόνο, η δράση του οποίου μελετήθηκε, ήταν το Deltamethrin και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αναφέρεται στην Παράγραφο 3.2.4. Στο Γράφημα 3.6 παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης των δύο στελεχών, στις διάφορες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου.



Γράφημα 3.6: Βιοδοκιμή επαφής με το εντομοκτόνο Deltamethrin. Παρουσιάζονται τα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη εντομοκτόνου για κάθε ένα από τα δύο στελέχη. Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο ±SEM.

Το στέλεχος που φέρει τη μεταλλαγή L1014F επιβιώνει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εντομοκτόνου, σε σχέση με το στέλεχος ελέγχου, nos.Cas9. Συγκεκριμένα, είναι 12.25 φορές πιο ανθεκτικό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.7, όπου παρουσιάζονται οι τιμές LC_{50} για τα δύο στελέχη και ο βαθμός ανθεκτικότητας (Resistance Ratio).

Πίνακας 3.7: Τιμές LC_{50} και RR των στελεχών L1014F και nos.Cas9 για το εντομοκτόνο Deltamethrin

Deltamethrin	LC50	Resistance Ratio (RR)	95% limits
L1014F	41.70	12.25	23.776 – 121.363
nos.Cas9	3.40	1	2.096 – 5.258

<u>Δημιουργία στελεχών που υπερεκφράζουν κυτοχρώματα P450 ενώ ταυτόχρονα φέρουν τη σημειακή μεταλλαγή L1014F</u>

Στην προσπάθεια δημιουργίας στελέχους το οποίο υπερεκφράζει κυτοχρώματα P450, ενώ ταυτόχρονα φέρει την μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο των καναλιών νατρίου, πραγματοποιήθηκαν οι διασταυρώσεις που αναφέρονται στην Παράγραφο 3.2.2. Δημιουργήθηκαν επιτυχώς δύο στελέχη τα οποία, σε γενετικό υπόβαθρο L1014F, φέρουν τα γονίδια *Cyp9j28* και *Cyp6bq23* αντίστοιχα, υπό τον έλεγχο του UAS.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια κατασκευής στελέχους που φέρει τον προαγωγό HRGAL4 ταυτόχρονα με τη μεταλλαγή L1014F, καθώς για την έκφραση των γονίδιων *Cyp9j28* και *Cyp6bq23* είναι απαραίτητη η διαστάυρωση των στελεχών αυτών με στέλεχος που εκφράζει κάποιον προαγωγό GAL4. Η δημιουργία τέτοιου στελέχους δεν κατέστη έγκαιρα εφικτή διότι μέσω των διαδοχικών διασταυρώσεων που πραγματοποιήθηκαν αποδείχθηκε ότι το διαγονίδιο *hrgal4* βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα και όχι στο τρίτο, σε αντίθεση με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Chung et al., 2007, flybase.org). Για την επιτυχή ολοκλήρωση της κατασκευής απαιτούνται νέες διασταυρώσεις με χρήση στελέχους που φέρει χρωμοσώματα balancer στο πρώτο και το δεύτερο ζεύγος (Πίνακας 3.4)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συζήτηση – Συμπεράσματα

4.1 Φυσικά προϊόντα ως συνεργιστές εντομοκτόνων (παρεμπόδιση ενζύμων αποτοξικοποιήσης)

Η ταχεία εξέλιξη του φαινομένου της ανθεκτικότητας οδηγεί στην χρήση ολοένα και μεγαλύτερων ποσοτήτων συνθετικών εντομοκτόνων που μπορεί να έχουν βλαβερές επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια η αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων, πιο φιλικών προς το περιβάλλον, γίνεται όλο και πιο έντονη. Οι συνεργιστές εντομοκτόνων αποτελούν ένα μέσο μείωσης της ποσότητας της δραστικής ουσίας που απαιτείται χωρίς να διακινδυνεύεται ο έλεγχος των βλαβερών εντόμων. Ο κύριος τρόπος δράσης τους είναι η παρεμπόδιση των ενζύμων αποτοξικοποίησης, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανθεκτικότητας (Capinera, 2008). Ο στόχος μας στην εργασία αυτή ήταν η ανίχνευση φυτικών εκχυλισμάτων που παρουσιάζουν αντίστοιχη δράση, με απώτερο σκοπό τον χαρακτηρισμό νέων ουσιών οι οποίες θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συνεργιστές εντομοκτόνων.

Μελετήσαμε 33 φυτικά εκχυλίσματα που χορηγήθηκαν στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας μας από τον Καθ. κ. Σέρκο Χαρουτουνιάν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρεμπόδισης (inhibition assays) *in vitro*, με βάση της πειραματικής δοκιμασίας δύο ανασυνδυασμένες κυτοχρωμικές οξειδάσες P450 γνωστές για τη συμβολή τους σε ανθεκτικούς φαινοτύπους. Οι δύο πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η CYP9J32 και η CYP392A16. Η πρώτη έχει απομονωθεί από το κουνούπι *Aedes aegypti* και σχετίζεται με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Stevenson et al., 2012). Η δεύτερη έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε ανθεκτικά στις αβερμεκτίνες στελέχη του ακάρεος *Tetranychus urticae* (Riga et al., 2014).

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε επιτυχή έκφραση του ενζύμου CYP9J32 μαζί με την αναγωγάση του κυτοχρώματος (CPR) του *Anopheles gambiae* (AgCPR) σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Οι δύο πρωτεΐνες ήταν ικανές να σχηματίσουν λειτουργικό σύμπλοκο και η μεταβολική δραστικότητα των μεμβρανών επαληθεύτηκε από τη δυνατότητα κατάλυσης του υποστρώματος 7-ethoxycoumarin. Έπειτα, ακολούθησαν δοκιμασίες παρεμπόδισης της δραστικότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τα φυτικά εκχυλίσματα. Η ενδεχόμενη μείωση στη δραστικότητα μπορεί να φανερώνει αλληλεπίδραση κάποιου/ων εκ των συστατικών των εκχυλισμάτων με το ένζυμο, με

αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η πρόσδεση του υποστρώματος σε αυτό, και συνεπώς η κατάλυσή του. Ως υπόστρωμα του κυτοχρώματος χρησιμοποιήθηκε το 7-ethoxycoumarin το οποίο δίνει το φθορίζον προϊόν 7 – hydroxycoumarin, ως αποτέλεσμα της κατάλυσής του από το ένζυμο (Stumpf & Nauen, 2001). Δεκαέξι από τα εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν παρουσίασαν αυτοφθορισμό με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εξακρίβωση της δράσης τους με τη συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση που περιλαμβάνει φθορισμό.

Συνολικά, από τα υπόλοιπα δεκαεπτά φυτικά εκχυλίσματα, τα εννέα δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στην δραστικότητα του κυτοχρώματος CYP9J32, επτά εκχυλίσματα προκάλεσαν μείωση της δραστικότητας κατά 10-20%, σε συγκέντρωση 20mg/L, ενώ το εκχύλισμα από το φυτό *Potentilla recta* προκάλεσε μείωση κατά 49%, στην ίδια συγκέντρωση (Πίνακας 2.2, Κεφάλαιο 2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφοροποίηση στα ποσοστά παρεμπόδισης που προκαλούν εκχυλίσματα που προέρχονται από διαφορετικά τμήματα του ίδιου φυτού. Σε συγκέντρωση 20mg/L, η μεταβολική δραστικότητα της CYP9J32 μειώθηκε κατά 17.6% από το εξωκάρπιο του φυτού *Opuntia ficus-indica*, ενώ εκχύλισμα του μίσχου δεν προκάλεσε παρεμπόδιση. Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσαν τα εκχυλίσματα από το εξωκάρπιο και τον καρπό του *Hylocereus undatus* και τα εναέρια μέρη και το σπέρμα του *Pyrus spinosa*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η χημική σύνθεση διαφέρει μεταξύ των διαφόρων τμημάτων των φυτών (Thiem et al., 2011).

Τα εκχυλίσματα των φυτών *Potentilla recta* και *Passiflora edulis*, έδωσαν τα υψηλότερα ποσοστά παρεμπόδισης, 49% και 18.2% αντίστοιχα, σε συγκέντρωση 20mg/L. Υπολογίστηκε η τιμή IC_{50} στα 31.07mg/L για το φυτό *P. recta* και για το *P. edulis* στα 95.19mg/L. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι συνεργιστές είναι σημαντικό να δρουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ώστε να μην αναπτύσσουν τοξική δράση, το εκχύλισμα του φυτού *P. recta* θα μπορούσε ενδεχομένως να χαρακτηριστεί ως πιο υποσχόμενο για ενδεχόμενη συνεργιστική δράση, σε σχέση με το εκχύλισμα του φυτού *P. edulis*.

Όσα εκχυλίσματα παρουσίασαν φθορισμό μελετήθηκαν με διαφορετική πειραματική προσέγγιση, με φωταύγεια (luminescence) και συγκεκριμένα με τη χρήση υποστρώματος Luciferin ME-EGE. Ο μεταβολισμός του υποστρώματος αυτού από κάποια κυτοχρωμική οξειδάση, που στην παρούσα εργασία ήταν η CYP392A16, δίνει ως αποτέλεσμα ένα φωτογόνο (luminescent) προϊόν το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί και η συγκέντρωσή του συσχετίζεται άμεσα με την δραστικότητα του ενζύμου. Από τα δεκαέξι φυτικά εκχυλίσματα που μελετήσαμε με το συγκεκριμένο υπόστρωμα, τρία δείγματα προκάλεσαν αναστολή της δράσης του ενζύμου σε ποσοστό μικρότερο του 10%, επτά δείγματα σε ποσοστό 10-30% και έξι δείγματα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30%, σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 10 mg/L (Πίνακας 2.3, Κεφάλαιο 2). Υψηλότερα ποσοστά

παρεμπόδισης παρουσίασαν τα εκχυλίσματα από υπέργεια τμήματα των φυτών *Pyracantha coccinea* (52%), *Rosa pulverulenta* (49.7%), *Potentilla pedata* (35%), *Rosa sempervirens* (35%), *Prunus webii* (34%) και *Rubus sanctus* (30%).

Στην ενότητα αυτή πραγματοποιήσαμε με επιτυχία τον έλεγχο των διαφόρων εκχυλισμάτων και αποδείξαμε τη σημαντική συμβολή των δοκιμασιών παρεμπόδισης *in vitro* ανασυνδυασμένων κυτοχρωμάτων P450, ως εργαλείο για την ανίχνευση ουσιών με πιθανή συνεργιστική δράση. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος και ταχύτητα διεξαγωγής, την ποικιλία υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των ουσιών που μελετούνται, καθώς και ο μεγάλος αριθμός ενζύμων P450 που μεταβολίζουν τα διάφορα υποστρώματα. Στις περισσότερες μελέτες συνεργιστικής δράσης, είτε χρησιμοποιούνται ένζυμα σε κλάσματα μικροσωμάτων που προέρχονται από ομογενοποιημένα έντομα (Bullangpoti et al., 2012, Tong & Bloomquist, 2013) είτε πραγματοποιούνται βιοδοκιμές με μείγματα εντομοκτόνων και συνεργιστών (Hummelbrunner & Isman, 2001, Baki et al., 2005).

Όπως αναφέρθηκε, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποτελούν ένα πρώτο στάδιο της αναζήτησης συνεργιστών εντομοκτόνων από φυτικά εκχυλίσματα. Το επόμενο βήμα στην προσπάθειά μας αυτή θα είναι η ανάλυση των κύριων συστατικών ορισμένων εκ των εκχυλισμάτων που παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις *(Potentilla recta* από τα πειράματα με την CYP9J32 και *Pyracantha coccinea*, *Rosa pulverulenta*, *Potentilla pedata*, *Rosa sempervirens*, *Prunus webii* και *Rubus sanctus* από τα πειράματα με την CYP392A16). Οι ουσίες που θα ανιχνευθούν θα χρησιμοποιηθούν εκ νέου σε πειράματα παρεμπόδισης *in vitro*. Όσες εμφανίσουν χαμηλή τιμή IC_{50}, είναι δηλαδή δραστικές σε χαμηλές συγκεντρώσεις, θα ελεγχθούν με βιοδοκιμές, ώστε να εξακριβωθεί αν παρουσιάζουν τοξικότητα στον οργανισμό μοντέλο, *D. melanogaster*. Τέλος, οι πλέον υποσχόμενες ουσίες θα ελεγχθούν για την πιθανή συνεργιστική τους δράση με βιοδοκιμές σε γονιδιωματικά τροποποιημένα στελέχη *Drosophila* τα οποία υπερεκφραζουν γονίδια αποτοξικοποίησης και ταυτόχρονα είναι φορείς σημειακών μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα. Στις βιοδοκιμές αυτές θα εφαρμόσουμε μείγματα των πιθανών συνεργιστών μαζί με εντομοκτόνα με σκοπό να διαπιστώσουμε αν οι ουσίες αυτές είναι ικανές να αναστέλλουν την ανθεκτικότητα και να αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου.

4.2 Δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *D. melanogaster* τα οποία φέρουν σημειακές μεταλλαγές και γονίδια ενζύμων αποτοξικοποίησης που σχετίζονται με ανθεκτικότητα

Ο στόχος του κεφαλαίου αυτού ήταν η διαλεύκανση της μοριακής βάσης συγκεκριμένων φαινοτύπων ανθεκτικότητας με τη δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών *Drosophila* χρησιμοποιώντας βιοτεχνολογική μεθοδολογία, και η περαιτέρω αξιοποίηση των μοριακών αυτών εργαλείων στην αξιολόγηση νέων εντομοκτόνων και συνεργιστών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της μεταλλαγής I1056F στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης (*kkv*) της *Drosophila.* Η μεταλλαγή αυτή έχει βρεθεί σε στελέχη του *Tetranychus urticae* ανθεκτικά στο ακαρεοκτόνο etoxazole, ο ακριβής τρόπος δράσης των οποίων δεν είχε ακόμα διαπιστωθεί (Van Leeuwen et al., 2012, Douris et al., 2016). Το δεύτερο στέλεχος που δημιουργήθηκε φέρει την μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο των καναλιών νατρίου (*para*), η οποία έχει ανιχνευτεί σε μια πληθώρα αρθροπόδων και σχετίζεται με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (Ranson et al. 2000, Soderlund 2008). Τα διαγονιδιακά αυτά στελέχη κατασκευάστηκαν με τη χρήση του συστήματος γονιδιωματικής τροποποίησης CRISPR/Cas9. Τέλος, δημιουργήθηκαν μέσω γενετικών διασταυρώσεων δύο διαγονιδιακές σειρές *Drosophila*, οι οποίες υπερεκφράζουν γονίδια κυτοχρωμάτων P450 τα οποία προκαλούν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (CYP9J28 από *Aedes aegypti* και CYP6BQ23 από *Meligethes aeneus*), σε γενετικό υπόβαθρο που φέρει την σημειακή μεταλλαγή L1014F.

4.2.1 Εισαγωγή της μεταλλαγής I1056F στο γονίδιο *kkv* (αντίστοιχη της I1017F στην Chitin synthase 1 (*CHS1*) από το άκαρι *Tetranychus urticae*)

Η μεταλλαγή I1017F βρέθηκε από τους Van Leeuwen et al. (2012) και αφορά μία μη συνώνυμη μεταλλαγή στο καρβοξυτελικό άκρο της διαμεμβρανικής περιοχής της συνθάσης της χιτίνης. Δεν είχε παρατηρηθεί ξανά σε άλλους οργανισμούς, όμως σε πρόσφατη έρευνα (Douris et al. 2016) ανακαλύφθηκε στην ίδια θέση μία μεταλλαγή από ισολευκίνη σε μεθειονίνη (I1042M αρίθμηση *P. xylostella*), καθώς και η I1042F, ταυτόσημη με την I1017F του τετρανύχου, σε ανθεκτικά στις βενζοϋλουρίες στελέχη *Plutella xylostella*. Η συμβολή των μεταλλαγών αυτών στην εμφάνιση ανθεκτικότητας δεν ήταν δυνατόν να αξιολογηθεί μέσω τεχνικών *in vitro*, λόγω της δυσκολίας για ετερόλογη έκφραση λειτουργικής πρωτεΐνης (Van Leeuwen et al., 2012, Merzendorfer et al., 2012). Όμως, η ανίχνευσή τους, οδήγησε στην υπόθεση ότι η συνθάση της χιτίνης αποτελεί τον στόχο

ουσιών που διαταράσσουν την βιοσύνθεση της χιτίνης με τρόπο ο οποίος δεν ήταν πλήρως γνωστός (Van Leeuwen et al., 2012, Douris et al., 2016).

Προκειμένου να διαλευκανθεί η υπόθεση ότι το etoxazole διαθέτει παρόμοιο τρόπο δράσης με εντομοκτόνα της ομάδας των βενζοϋλουριών (που είχε υποτεθεί ήδη από τους Nauen & Smagghe 2006), χρησιμοποιήσαμε το σύστημα γονιδιωματικής τροποποίησης CRISPR/Cas9 και καταφέραμε να εισαγάγουμε με επιτυχία τη μεταλλαγή I1056F (αρίθμηση Δροσόφιλας) στο γονίδιο *kkv* της *D. melanogaster*. Αφού πραγματοποιήθηκε έλεγχος των ομόζυγων ως προς τη μεταλλαγή ατόμων (στο εξής θα ονομάζονται Etox15) με αλληλούχηση της περιοχής όπου εντοπίζεται (Εικόνα 3.5), διενεργήθηκαν βιοδοκιμές διατροφής με τις ουσίες που αναφέρθηκαν (Παράγραφος 3.2.3), με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η συγκεκριμένη σημειακή μεταλλαγή είναι ικανή να επάγει φαινότυπο ανθεκτικότητας στα γονιδιωματικά τροποποιημένα άτομα.

Για τα πειράματα ελέγχου στις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη nos.Cas9 και *yw* που δεν φέρουν την μεταλλαγή, αλλά αποτελούν το γενετικό υπόβαθρο του στελέχους Etox15. Αποδείχθηκε ότι και τα δύο στελέχη είναι ευαίσθητα στην εφαρμογή και των πέντε υπό μελέτη σκευασμάτων (etoxazole, diflubezuron, lufenuron, cyromazine και buprofezin) χωρίς να παρουσιάζουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές στην θνησιμότητα. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών απέδειξαν ότι το στέλεχος Etox15 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα τέσσερα σκευάσματα από αυτά που μελετήθηκαν (etoxazole, diflubezuron, lufenuron και buprofezin) ενώ εμφανίζει παρόμοια ποσοστά θνησιμότητας με τα στελέχη nos.Cas9 και *yw* για το cyromazine (Γραφήματα 3.1-3.5).

Το etoxazole ανήκει στην ομάδα 10B σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά IRAC, και αποτελεί αναστολέα της ανάπτυξης ακάρεων. Οι Nauen και Smagghe (2006) πρότειναν ότι δρα παρεμποδίζοντας την βιοσύνθεση της χιτίνης. Εμείς, στην παρούσα εργασία, παρατηρήσαμε ότι το στέλεχος Etox15 ήταν περισσότερο από 1.077 φορές πιο ανθεκτικό (RR >1.077) από το nos.Cas9 στις βιοδοκιμές με το ακαρεοκτόνο. Μέχρι και την υψηλότερη συγκέντρωση που εφαρμόστηκε (10.000mg/L) τα άτομα Etox15 ήταν ικανά να περάσουν στο στάδιο του ενήλικου εντόμου, αν και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 1.000mg/L τα ενήλικα πέθαιναν αμέσως μετά την έκδυση.

Τα επόμενα δύο εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν σε βιοδοκιμές, το diflubenzuron και lufenuron, ανήκουν στην ομάδα των βενζοϋλουριών (ομάδα 15) και χαρακτηρίζονται ως αναστολείς της βιοσύνθεσης της χιτίνης (Τύπος 0) (IRAC). Αν και ο μοριακός τρόπος δράσης τους δεν έχει εξακριβωθεί, οι περισσότερες θεωρίες προτείνουν ότι δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση με την συνθάση της χιτίνης (Cohen, 2010). Όμως, μέσω των βιοδοκιμών που πραγματοποιήσαμε

αποδείχθηκε ότι για το diflubenzuron, το στέλεχος Etox15 παρουσιάζει LC_{50} μεγαλύτερο των 5.000 mg/L τη στιγμή που τα άτομα nos.Cas9 εμφανίζουν ευαισθησία γύρω στα 0.3mg/L. Αντίστοιχα, για το lufenuron, το LC_{50} του Etox15 υπολογίστηκε στα 16.65mg/L, ενώ για τα nos.Cas9 στα 0.15mg/L.

Το buprofezin (ομάδα 16) είναι το τέταρτο εντομοκτόνο που εφαρμόστηκε στις βιοδοκιμές, ο τρόπος δράσης του οποίου επίσης δεν ήταν πλήρως κατανοητός (Izawa et al., 1986). Ανήκει και αυτό στους αναστολείς της βιοσύνθεσης της χιτίνης (Τύπος 1). Όταν τα άτομα Etox15 εκτέθηκαν στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο δεν φάνηκε να επηρεάζονται μέχρι και σε συγκέντρωση 1.000mg/L (LC_{50} >1000mg/L). Η μόνη επίδραση που παρουσιάστηκε ήταν η καθυστέρηση της έκδυσης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 600mg/L. Σε αντίθεση με αυτά, για τα άτομα nos.Cas9 υπολογίστηκε η τιμή LC_{50} στα 53.2 mg/L.

Το cyromazine χαρακτηρίζεται ως παρεμποδιστής της έκδυσης των δίπτερων εντόμων. Σύμφωνα με μελέτη των Daborn et al. (2000), η ανθεκτικότητα στελέχους *Drosophila* στο εντομοκτόνο αυτό έχει συσχετιστεί με περιοχές του πρώτου (X) και δευτέρου χρωμοσώματος. Από τις βιοδοκιμές που πραγματοποιήσαμε η μεταλλαγή I1056F δεν φάνηκε να επηρεάζει την τοξικότητα του cyromazine. Το LC_{50} για το Etox15 υπολογίστηκε στα 0.23mg/L και για το nos.Cas9 στα 0.31mg/L.

Η επιτυχής δημιουργία του διαγονιδιακού στελέχους *Drosophila* που είναι φορέας της μεταλλαγής I1056F μας έδωσε τη δυνατότητα επικύρωσης, μέσω των τοξικολογικών βιοδοκιμών, ότι αυτή και μόνο η μεταλλαγή είναι ικανή να αποδώσει τον φαινότυπο ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκε στο άκαρι *T. urticae* (Van Leeuwen et al., 2012). Τα άτομα Etox15 που διαφέρουν μόνο ως προς τη μεταλλαγή αυτή από τα άτομα nos.Cas9 και *yw* παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές λόγου ανθεκτικότητας (RR, βλέπε Πίνακα 3.6) σε σχέση με τα τελευταία. Επιπλέον, ο έλεγχος των εντομοκτόνων/ακαρεοκτόνων με άγνωστο ως τώρα μηχανισμό δράσης που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτού του εντόμου – εργαλείου, οδήγησε στην εξακρίβωση του μοριακού στόχου των ουσιών αυτών. Αποδείξαμε την ύπαρξη άμεσης αλληλεπίδρασης των etoxazole, diflubenzuron, lufenuron και buprofezin, με το μόριο της συνθάσης της χιτίνης, όπως επίσης και ότι μία σημειακή μεταλλαγή είναι ικανή να οδηγήσει στην ανάπτυξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας μεταξύ εντομοκτόνων που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες. Αντίθετα, φάνηκε ότι το cyromazine διαθέτει διαφορετικό μηχανισμό δράσης από τα υπόλοιπα εντομοκτόνα. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν δημοσιευτεί πρόσφατα στο επιστημονικό περιοδικό PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences) (Douris et al., 2016).

4.2.2 Δημιουργία διαγονιδιακού στελέχους *Drosophila* που φέρει τη σημειακή μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο *para*

Η L1014F αποτελεί την πιο συχνά απαντώμενη μεταλλαγή σε οργανισμούς ανθεκτικούς στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, που εμφανίζουν το φαινόμενο knock-down resistance (kdr) (Ranson et al., 2000, Soderlund, 2008). Ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στη *Musca domestica* (Williamson et al., 1996) και έκτοτε έχει εντοπιστεί σε ένα μεγάλο αριθμό αρθροπόδων, συμπεριλαμβανομένων και κουνουπιών φορέων ασθενειών (Soderlund, 2008, Aïzoun et al., 2014). Η εκτοπική έκφραση καναλιών νατρίου από διάφορους οργανισμούς σε ωοκύτταρα *Xenopus* έχει αποτελέσει ως τώρα το βασικό εργαλείο για την εξακρίβωση της επίδρασης της L1014F στην ευαισθησία των καναλιών αυτών στα πυρεθροειδή (Smith et al., 1997, Vais et al., 2003, Tan et al., 2002).

Στην ενότητα αυτή θελήσαμε αρχικά να διαπιστώσουμε τί επίπτωση θα είχε στο φαινότυπο ενός οργανισμού που δεν διαθέτει κανέναν άλλο μηχανισμό ανθεκτικότητας (ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο) η εισαγωγή της μεταλλαγής L1014F στο γονίδιο των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου. Πραγματοποιήσαμε με επιτυχία τη δημιουργία διαγονιδιακού στελέχους *D. melanogaster* που φέρει τη μεταλλαγή στο γονίδιο *para*, με τη χρήση του συστήματος γονιδιωματικής τροποποίησης CRISPR/Cas9. Το ομόζυγο ως προς τη μεταλλαγή στέλεχος, ελέγχθηκε με αλληλούχηση της περιοχής του γονιδίου όπου έγινε η εισαγωγή (Εικόνα 3.8). Για να αξιολογήσουμε εάν η L1014F είναι ικανή να προσδώσει κάποιο φαινότυπο, πραγματοποιήσαμε βιοδοκιμές επαφής με το πυρεθροειδές deltamethrin. Στα πειράματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν άτομα του στελέχους nos.Cas9 τα οποία αποτελούν το γενετικό υπόβαθρο των L1014F τροποποιημένων ατόμων. Παρατηρήθηκε αύξηση στην ανθεκτικότητα κατά 12.25 φορές ως αποτέλεσμα της παρουσίας της μεταλλαγής. Η τιμή LC_{50} του στελέχους – ελέγχου υπολογίστηκε στα 3.4mg/L, ενώ του στελέχους L1014F στα 41.7mg/L. Παρόμοιες τιμές βαθμού ανθεκτικότητας παρουσιάζονται και από δοκιμές που έχουν γίνει σε ωοκύτταρα *Xenopus* που εκφράζουν κανάλια νατρίου διαφόρων αρθροπόδων τροποποιημένα ως προς τη θέση1014. Η ανθεκτικότητα στο deltamethrin των καναλιών νατρίου της *Drosophila* φαίνεται να αυξάνεται κατά 19 φορές περίπου, ενώ της *Blattella germanica* κατά 5 φορές περίπου ως αποτέλεσμα της μεταλλαγής L1014F (Vais et al., 2000a, Tan et al., 2001). Αυξημένη ανθεκτικότητα κατά 10 φορές ως προς το πυρεθροειδές cismethrin παρουσίασαν κανάλια νατρίου από τη *Musca domestica* (Smith et al., 1997).

Συμπερασματικά, από τις δύο παραπάνω ενότητες γίνεται σαφές ότι βιοτεχνολογικές μεθοδολογίες (CRISPR/Cas9) σε συνδυασμό με κλασικές τεχνικές (βιοδοκιμές) μπορούν να δώσουν σημαντικά

στοιχεία για τη μοριακή βάση ανθεκτικών φαινοτύπων και έμμεσα να συνδράμουν στην αντιμετώπιση του φαινομένου. Τεχνικές "αντίστροφης" γενετικής, όπως το σύστημα γονιδιωματικής τροποποίησης CRISPR/Cas9, δίνουν τη δυνατότητα μελέτης *in vivo* της συμβολής διαφόρων μεταλλαγών σε φαινοτύπους ανθεκτικότητας, σε γενετικό υπόβαθρο που δεν διαθέτει άλλους μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Zimmer et al., 2016, Douris et al., 2016) ενώ λόγω του μεγάλου αριθμού συντηρημένων περιοχών στα γονιδιώματα των αρθροπόδων καθίσταται δυνατή η διερεύνηση μεταλλαγών μεταξύ διαφορετικών ειδών. Επιπλέον, τα γονιδιακά τροποποιημένα έντομα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα ως εργαλεία για την αξιολόγηση εντομοκτόνων με άγνωστο μηχανισμό δράσης, όπως αποδείχθηκε. Η διαλεύκανση του τρόπου δράσης τους, οφελεί την ολοκληρωμένη διαχείριση της ανθεκτικότητας η οποία βασίζεται στην εναλλαγή των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται ανάλογα το μηχανισμό τους, προκειμένου να μην "επιλέγονται" αλληλόμορφα που φέρουν μεταλλαγές συσχετιζόμενες με ανθεκτικούς φαινοτύπους.

4.2.3 Δημιουργία στελέχους που υπερεκφράζει ένζυμα αποτοξικοποίησης (κυτοχρώματα P450) σε γενετικό υπόβραθρο L1014F

Κατασκευάσαμε δύο στελέχη τα οποία, σε γενετικό υπόβαθρο L1014F, υπερεκφράζουν γονίδια ενζύμων αποτοξικοποίησης και συγκεκριμένα κυτοχρωμάτων P450. Χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη που έχουν δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας και φέρουν το γονίδιο *Cyp9j28* από το κουνούπι *Aedes aegypti* (Pavlidi et al., 2012) και το γονίδιο *Cyp6bq23* από το σκαθάρι *Meligethes aeneus*, (Κουνάδη Σ. Εργασία ΜΔΕ) τα οποία έχει βρεθεί να υπερεκφράζονται σε πληθυσμούς που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Το γεγονός ότι το γονίδιο *para* βρίσκεται στο πρώτο χρωμόσωμα (X), και τα γονίδια των δύο οξειδασών έχουν εισαχθεί στο δεύτερο χρωμόσωμα, καθιστά δυνατό τον συνδυασμό τους μέσω γενετικών διασταυρώσεων όπως αυτές περιγράφονται στην Παράγραφο 3.2.2.

Τα δύο γονίδια οξειδασών βρίσκονται υπό τον έλεγχο του συστήματος GAL4/UAS. Για την έκφρασή τους είναι απαραίτητη η διασταύρωση του στελέχους UAS με στέλεχος που εκφράζει κάποιον προαγωγό (driver) GAL4. Έγινε προσπάθεια να εισαγάγουμε σε γενετικό υπόβαθρο L1014F (X χρωμόσωμα) τον driver HRGAL4 (3° χρωμόσωμα σύμφωνα με τους Chung et al., 2007) ο οποίος καθοδηγεί την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου στα μαλπιγγιανά σωληνάρια, τον λιπιδικό ιστό και το μεσέντερο , ιστοί οι οποίοι θεωρούνται κύρια όργανα αποτοξικοποίησης (Feyereisen, 2005). Η δημιουργία του στελέχους αυτού δεν κατέστη έγκαιρα εφικτή, καθώς όπως

αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα των διασταυρώσεων το διαγονίδιο *hrgal4* βρίσκεται στο δεύτερο χρωμόσωμα και όχι στο τρίτο, σε αντίθεση με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Chung et al., 2007, flybase.org). Το γεγονός αυτό επιτάσσει την αναδιαμόρφωση της στρατηγικής μας, και την πραγματοποίηση διασταυρώσεων με διαφορετικό στέλεχος που φέρει διπλά χρωμοσώματα balancers στο πρώτο και δεύτερο χρωμόσωμα αντίστοιχα, προκειμένου να δημιουργηθεί το επιθυμητό στέλεχος. Η κατασκευή αυτή βρίσκεται σήμερα σε εξέλιξη.

Ο συνδυασμός δύο μηχανισμών ανθεκτικότητας στο ίδιο γενετικό υπόβαθρο θα βοηθήσει στη διαλεύκανση της συνεισφοράς του κάθε μηχανισμού στον φαινότυπο, η οποία θα μπορούσε να είναι αθροιστική ή ακόμα και πολλαπλασιαστική. Επιπλέον, τα έντομα – εργαλεία αυτά θα φανούν ιδιαίτερα χρήσιμα για την ανίχνευση συνεργιστών και την εξέταση της αποτελεσματικότητας νέων εντομοκτόνων, έναντι φυσικών πληθυσμών που παρουσιάζουν ιδιαίτερα ισχυρούς φαινοτύπους ανθεκτικότητας που βασίζονται στην ύπαρξη πολλαπλών μηχανισμών (Koou et al., 2014).

Βιβλιογραφία

Aïzoun, N., Aïkpon, R. & Akogbéto, M., 2014. Evidence of increasing L1014F kdr mutation frequency in Anopheles gambiae s.l. pyrethroid resistant following a nationwide distribution of LLINs by the Beninese National Malaria Control Programme. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3), pp.239–243.

Andu Radhika, S. & Sahayaraj, K., 2014. Synergistic effects of monocrotophos with botanical oils and commercial neem formulation on Spodoptera litura (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Biopesticides*, 5(1), pp.1–16.

Baki, M. A., Akhtar, N., Rahman, M. M., Islam, M. N., Hossain, M., Islam, N., ... & Mondal, K. A. M. S. H. 2005. Synergistic Action of Wedelia calendulacea Less. Plant Extracts with Lamda Cyhalothrin on Adult Red Flour Beetle Tribolium castaneum Herbst. *Journal of Agronomy*, 4(1), pp.18–22.

Bass, C., Puinean, A.M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., Paul, V.L., Crossthwaite, A.J., Denholm, I., Field, L.M. and Foster, S.P., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae. *Bmc Neuroscience*, *12*(1), p.51.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P. and Liu, J.L., 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports*, *4*(1), pp.220-228.

Berenbaum, M. & Neal, J.J., 1985. Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant. *Journal of Chemical Ecology*, 11(10), pp.1349–1358.

Berge, J., Feyereisen, R. & Amichot, M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1376), pp.1701–1705.

Bernard, C.B. & Philogène, B.J.R., 1993. Insecticide synergists: Role, importance, and perspectives. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 38(2), pp.199–223.

Beroza, M. and Barthel, W.F., 1957. Insecticide synergists, chemical structure and activity of Pyrethrin and Allethrin synergists for control of the housefly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *5*(11), pp.855-859.

Bingham, G., Strode, C., Tran, L., Khoa, P.T. and Jamet, H.P., 2011. Can piperonyl butoxide enhance the efficacy of pyrethroids against pyrethroid- resistant Aedes aegypti?. *Tropical Medicine & International Health*, *16*(4), pp.492-500.

Brown, T.M. & Brogdon, W.G., 1987. Improved Detection of Insecticide Resistance Through Conventional and Molecular Techniques. *Annual Review of Entomology*, 32(1), pp.145–162.

Bullangpoti, V., Wajnberg, E., Audant, P. and Feyereisen, R., 2012. Antifeedant activity of Jatropha gossypifolia and Melia azedarach senescent leaf extracts on Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists. *Pest management science*, *68*(9), pp.1255-1264.

Capinera, J.L., 2008. *Encyclopedia of Entomology* J. L. Capinera, ed., Dordrecht: Springer Netherlands. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6359-6.

Casida, J.E., 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *Journal of agricultural and food chemistry*, 18(5), pp.753–72.

Chadwick, P.R., 1963. A comparison of MGK 264 and piperonyl butoxide as pyrethrum synergists. *Pyrethrum post*, *1*(1).

Chung, H., Bogwitz, M.R., McCart, C., Andrianopoulos, A., Batterham, P. and Daborn, P.J., 2007. Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the Drosophila melanogaster insecticide resistance gene Cyp6g1. *Genetics*, *175*(3), pp.1071-1077.

Cohen, E., 2010. Chitin Biochemistry: Synthesis, hydrolysis and inhibition. *Adv Insect Physiol*, eds Jerome C, Stephen JS (Academic, London), Vol 38, pp 5-74

Daborn, P.J., McKenzie, J.A. and Batterham, P., 2000. A genetic analysis of cyromazine resistance in Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). *Journal of economic entomology*, *93*(3), pp.911-919.

Daborn, P.J., Lumb, C., Harrop, T.W., Blasetti, A., Pasricha, S., Morin, S., Mitchell, S.N., Donnelly, M.J., Müller, P. and Batterham, P., 2012. Using Drosophila melanogaster to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests. *Insect biochemistry and molecular biology*, *42*(12), pp.918-924.

Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R. and Williamson, M.S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, *59*(3), pp.151-162.

Denholm, I and Devin, G. 2001. Insecticide resistance. In: Levin SA [ed.], Encyclopedia of Biodiversity. Academic Press, San Diego, pp. 465-477.

Dermauw, W., Wybouw, N., Rombauts, S., Menten, B., Vontas, J., Grbić, M., Clark, R.M., Feyereisen, R. and Van Leeuwen, T., 2013. A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite Tetranychus urticae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(2), pp.E113-E122.

Dhadialla, T.S., 2012. *Insect growth disruptors* (Vol. 43). Academic Press.

Dong, K., 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1), pp.17–30. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s10158-006-0036-9.

Douris, V., Steinbach, D., Panteleri, R., Livadaras, I., Pickett, J.A., Van Leeuwen, T., Nauen, R. and Vontas, J., 2016. Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, pp.14692–14697.

Eldefrawi, M.E., Miskus, R. & Sutcher, V., 1960. Methylenedioxyphenyl Derivatives as Synergists for Carbamate Insecticides on Susceptible, DDT-, and Parathion-resistant House Flies. *Journal of Economic Entomology*, 53(2), pp.231–234.

Faraone, N., Hillier, N.K. and Cutler, G.C., 2015. Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae). *PloS one*, *10*(5), p.e0127774.

Feng, Y., Wu, Q., Wang, S., Chang, X., Xie, W., Xu, B. and Zhang, Y., 2010. Cross- resistance study and biochemical mechanisms of thiamethoxam resistance in B- biotype Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest management science*, *66*(3), pp.313-318.

Feyereisen, R., 2005. Insect cytochrome P450. *Comprehensive molecular insect science*, *4*, pp.1-77.

Field, L.M., Davies, T.E., O'Reilly, A.O., Williamson, M.S. and Wallace, B.A., 2017. Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European Biophysics Journal*, pp.1-5.

Fischer, J.A., Giniger, E., Maniatis, T. and Ptashne, M., 1988. GAL4 activates transcription in Drosophila. *Nature*, *332*(6167), pp.853-856.

Food and Agriculture Organization FAO, 2012. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides*, Available at: http://www.who.int/whopes/resources/resources_2010/en/.

George, D.R., Finn, R.D., Graham, K.M. and Sparagano, O.A., 2014. Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites & vectors*, *7*(1), p.28.

Georghiou, G.P. ed., 2012. *Pest resistance to pesticides*. Springer Science & Business Media.

Gomes, E.O., Nunomura, S.M. and Marinotti, O., 2016. Synergistic Potential of Dillapiole Combined With Pyrethroids against Mosquitoes. *Vector Biology Journal*, *2016*.

Graf, J.-F., 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitology Today*, 9(12), pp.471–474.

Gratz, S.J., Ukken, F.P., Rubinstein, C.D., Thiede, G., Donohue, L.K., Cummings, A.M. and O'Connor-Giles, K.M., 2014. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in Drosophila. *Genetics*, *196*(4), pp.961-971.

Grigoraki, L., Lagnel, J., Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Labbé, P., Weill, M. and Vontas, J., 2015. Transcriptome profiling and genetic study reveal amplified carboxylesterase genes implicated in temephos resistance, in the Asian Tiger Mosquito Aedes albopictus. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(5), p.e0003771.

Haller, H.L., McGovran, E.R., Goodhue, L.D. and Sullivan, W.N., 1942. The synergistic Action of Sesamin with Pyrethrum Insecticides. *Journal of Organic Chemistry*, *7*(2).

Hammock, B.D. and Quistad, G.B., 1981. Metabolism and mode of action of juvenile hormone, juvenoids, and other insect growth regulators. *Progress in pesticide biochemistry*.

Hardstone, M.C., Leichter, C.A. & Scott, J.G., 2009. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(2), pp.416–423.

Heckel, D.G., 2003. Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology*, 48(1), pp.235–260.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. and Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, *34*(7), pp.653-665.

Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(11), pp.1009–1015.

Hemingway, J., Hawkes, N., Prapanthadara, L.A., Jayawardenal, K.I. and Ranson, H., 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *353*(1376), pp.1695-1699.

Hollingworth, R.M. and Dong, K., 2008. The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*, pp.40-89.

Horstmann, S. and Sonneck, R., 2016. Contact Bioassays with Phenoxybenzyl and Tetrafluorobenzyl Pyrethroids against Target-Site and Metabolic Resistant Mosquitoes. *PloS one*, *11*(3), p.e0149738.

Hummelbrunner, L.A. & Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, Spodoptera litura (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), pp.715–720.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, *169*(12), pp.5429-5433.

Izawa, Y., Uchida, M. & Yasui, M., 1986. Mode of Action of Buprofezin on the Twenty-eight-spotted Ladybird, Henosepilachna vigintioctopunctata Fabricius. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(5), pp.1369–1371.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), pp.816-821.

Khambay, B.P.S., Jewess, P.J., 2005. Pyrethroids. In: . In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science, first ed., vol. 6. Elsevier Ltd, pp. 1-29.

Koou, S.Y., Chong, C.S., Vythilingam, I., Lee, C.Y. and Ng, L.C., 2014. Insecticide resistance and its underlying mechanisms in field populations of Aedes aegypti adults (Diptera: Culicidae) in Singapore. *Parasites & vectors*, *7*(1), p.471.

K. R. Kranthi. 2005. 'Insecticide Resistance -Monitoring, Mechanisms and Management Manual'. Published by CICR, Nagpur, India and ICAC, Washington

Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T. and Pillai, M.K.K., 2002. Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever

mosquito, Aedes aegypti L.(Diptera: Culicidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, *50*(1), pp.1-8.

Van Leeuwen, T., Demaeght, P., Osborne, E.J., Dermauw, W., Gohlke, S., Nauen, R., Grbić, M., Tirry, L., Merzendorfer, H. and Clark, R.M., 2012. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(12), pp.4407-4412.

Van Leeuwen, T. & Dermauw, W., 2016. The Molecular Evolution of Xenobiotic Metabolism and Resistance in Chelicerate Mites. *Annual Review of Entomology*, 61(1), pp.475–498.

Van Leeuwen, T., Van Pottelberge, S. & Tirry, L., 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of Tetranychus urticae. *Pest management science*, 61(5), pp.499–507.

Liu, N., Xu, Q., Zhu, F. and Zhang, L.E.E., 2006. Pyrethroid resistance in mosquitoes. *Insect Science*, *13*(3), pp.159-166.

Mallet, J., 1989. The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? *Trends in Ecology & Evolution*, 4(11), pp.336–340.

McCaffery, A. & Nauen, R., 2006. The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): Public responsibility and enlightened industrial self-interest. *Outlooks on Pest Management*, 17(1), pp.11–14.

Merzendorfer, H., Kim, H.S., Chaudhari, S.S., Kumari, M., Specht, C.A., Butcher, S., Brown, S.J., Manak, J.R., Beeman, R.W., Kramer, K.J. and Muthukrishnan, S., 2012. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species Tribolium castaneum. *Insect biochemistry and molecular biology*, *42*(4), pp.264-276.

Metcalf, R.L., 1989. Insect resistance to insecticides. *Pest Management Science*, *26*(4), pp.333-358.

Motoyama, N., Nishizawa, Y., Nagakura, A., Takemasa, T. and Dauterman, W.C., 1991. Selective inhibition of the cytochrome P450-dependent monooxygenases from the rat liver and housefly abdomen. *Reviews in pesticide toxicology (USA)*.

Nauen, R. & Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. *The Royal Society of Chemistry*, 13(6), pp.241–245. Available at: http://xlink.rsc.org/?DOI=b211171n.

Nauen, R. & Smagghe, G., 2006. Mode of action of etoxazole. *Pest Management Science*, 62(5), pp.379–382. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/ps.1192.

O'Reilly, A.O., Khambay, B.P., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A. and Davies, T.E., 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal*, *396*(2), pp.255-263.

Oakeshott, J.G., Home, I., Sutherland, T.D. and Russell, R.J., 2003. The genomics of insecticide resistance. *Genome biology*, *4*(1), p.202.

Omura, T & Sato, R., 1964. The Carbon Monoxide-biding pigment of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7), pp.2370–2378.

Pasay, C., Arlian, L., Morgan, M., Gunning, R., Rossiter, L., Holt, D., Walton, S., Beckham, S. and McCarthy, J., 2009. The effect of insecticide synergists on the response of scabies mites to pyrethroid acaricides. *PLoS Negl Trop Dis*, *3*(1), p.e354.

Pavlidi, N., Monastirioti, M., Daborn, P., Livadaras, I., Van Leeuwen, T. and Vontas, J., 2012. Transgenic expression of the Aedes aegypti CYP9J28 confers pyrethroid resistance in Drosophila melanogaster. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(2), pp.132-135.

Perera, M.D.B., Hemingway, J. & Karunaratne, S.P., 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malaria journal*, 7, p.168.

Perry, T., Batterham, P. & Daborn, P.J., 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), pp.411–422. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.03.003.

Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J. and Collins, F.H., 2000. Identification of a point mutation in the voltage- gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect molecular biology*, *9*(5), pp.491-497.

Ren, X., Yang, Z., Xu, J., Sun, J., Mao, D., Hu, Y., Yang, S.J., Qiao, H.H., Wang, X., Hu, Q. and Deng, P., 2014. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in Drosophila. *Cell reports*, *9*(3), pp.1151-1162.

Riga, M., Tsakireli, D., Ilias, A., Morou, E., Myridakis, A., Stephanou, E.G., Nauen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., Paine, M. and Vontas, J., 2014. Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in Tetranychus urticae. *Insect biochemistry and molecular biology*, *46*, pp.43-53.

Riga, M., Myridakis, A., Tsakireli, D., Morou, E., Stephanou, E.G., Nauen, R., Van Leeuwen, T., Douris, V. and Vontas, J., 2015. Functional characterization of the Tetranychus urticae CYP392A11, a cytochrome P450 that hydroxylates the METI acaricides cyenopyrafen and fenpyroximate. *Insect biochemistry and molecular biology*, *65*, pp.91-99.

Saavedra- Rodriguez, K., Strode, C., Flores, A.E., Garcia- Luna, S., Reyes- Solis, G., Ranson, H., Hemingway, J. and Black, W.C., 2014. Differential transcription profiles in Aedes aegypti detoxification genes after temephos selection. *Insect molecular biology*, *23*(2), pp.199-215.

Sarwar, M., 2016. Potential Uses of Synergists in Insecticide Resistance Management Accompanied by Their Contributions as Control Agents and Research Tools. *Chemistry Research Journal*, 1(3), pp.21–26.

Siddall, J.B., 1976. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. *Environmental Health Perspectives*, vol.14(April), pp.119–126.

Smith, T.J., Lee, S.H., Ingles, P.J., Knipple, D.C. and Soderlund, D.M., 1997. The L1014F point mutation in the house fly Vssc1 sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. *Insect biochemistry and molecular biology*, *27*(10), pp.807-812.

Soderlund, D.M., 2008. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, 1106(December 2006), pp.1100–1106.

Somers, J., Nguyen, J., Lumb, C., Batterham, P. and Perry, T., 2015. In vivo functional analysis of the Drosophila melanogaster nicotinic acetylcholine receptor Dα6 using the insecticide spinosad. *Insect biochemistry and molecular biology*, *64*, pp.116-127.

Staal, G.B., 1975. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Annual review of entomology*, *20*(1), pp.417-460.

Stevenson, B.J., Pignatelli, P., Nikou, D. and Paine, M.J., 2012. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, Aedes aegypti: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(3), p.e1595.

Strode, C., de Melo-Santos, M., Magalhães, T., Araújo, A. and Ayres, C., 2012. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, Aedes aegypti. *PLoS One*, *7*(8), p.e39439.

Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Drane, D.R., Karunaratne, S.P., Hemingway, J., Black, W.C. and Ranson, H., 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito Aedes aegypti. *Insect biochemistry and molecular biology*, *38*(1), pp.113-123.

Stumpf, N. & Nauen, R., 2001. Cross-Resistance, Inheritance, and Biochemistry of Mitochondrial Electron Transport Inhibitor-Acaricide Resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(6), pp.1577–1583.

Tak, J.-H. & Isman, M.B., 2015. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in Trichoplusia ni. *Scientific Reports*, 5(April), p.12690.

Tan, J., Liu, Z., Tsai, T.D., Valles, S.M., Goldin, A.L. and Dong, K., 2002. Novel sodium channel gene mutations in Blattella germanica reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. *Insect biochemistry and molecular biology*, *32*(4), pp.445-454.

Testa, B. & Jenner, P., 1981. Inhibitors of Cytochrome P-450s and Their Mechanism of Action. *Drug Metabolism Reviews*, 12(1), pp.1–117.

Thiem, B., Kikowska, M., Kurowska, A. and Kalemba, D., 2011. Essential oil composition of the different parts and In Vitro shoot culture of Eryngium planum L. *Molecules*, *16*(8), pp.7115-7124.

Tong, F. & Bloomquist, J.R., 2013. Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 50(4), pp.826–832.

Troczka, B., Zimmer, C.T., Elias, J., Schorn, C., Bass, C., Davies, T.E., Field, L.M., Williamson, M.S., Slater, R. and Nauen, R., 2012. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect biochemistry and molecular biology*, *42*(11), pp.873-880.

Vais, H., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Warmke, J.W., Usherwood, P.N. and Cohen, C.J., 2000. Activation of Drosophila sodium channels promotes modification by deltamethrin. *The Journal of general physiology*, *115*(3), pp.305-318.

Vais, H., Atkinson, S., Pluteanu, F., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Williamson, M.S. and Usherwood, P.N.R., 2003. Mutations of the para sodium channel of Drosophila melanogaster identify putative binding sites for pyrethroids. *Molecular pharmacology*, *64*(4), pp.914-922.

Vontas, J., David, J.P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G.K., Louis, C. and Ranson, H., 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in Anopheles stephensi using cross-species microarray hybridization. *Insect molecular biology*, *16*(3), pp.315-324.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A. and Devonshire, A.L., 1996. Identification of mutations in the houseflypara-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics MGG*, *252*(1), pp.51-60.

Yamamoto, I., 1973. Mode of action of synergists in enhancing the insecticidal acitivity of pyrethrum and pyrethroids. *Pyrethrum the Natural Insecticide*.

Yang, X., Zhu, K.Y., Buschman, L. and Margolies, D., 2001. Comparative susceptibility and possible detoxification mechanisms for selected miticides in Banks grass mite and two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Experimental & applied acarology*, *25*(4), pp.293-299.

Zimmer, C.T., Garrood, W.T., Puinean, A.M., Eckel-Zimmer, M., Williamson, M.S., Davies, T.E. and Bass, C., 2016. A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in Drosophila melanogaster. *Insect biochemistry and molecular biology*, *73*, pp.62-69.

Ζιώγας, Β., & Μαρκόγλου, Α. 2007. Γεωργική Φαρμακολογία. Αθήνα.

Παράρτημα

Πίνακας 1: Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή

Εκκινητής	Αλληλουχία
444F	5’-CTTCGTAATGCACCAGAACTCTTG-3’
444R	5’-AAACCAAGAGTTCTGGTGCATTAC-3’
658F	5’-CTTCGCTTCCTTCAGAGTGGAATC-3’
658R	5’-AAACGATTCCACTCTGAAGGAAGC-3’
ETXSF	5′-CCTGTAAGTCGAACATCCAG-3′
ETXSR	5′-AGCTCAGCATGCTCTTCTGC-3′
ETXSM	5′-AGCAGGTACATGGACGGGAA-3′
CHS11F	5′-TCCTCCGACAACATCACACG-3′
CHS11R	5′-AACATGAAGGCCAGGATCGG-3′
CHS12F	5′-GGACCCGGAACCATTTTCCT-3′
CHS12R	5′-TGCTCCACGGGATCATTGTC-3′
CHS20F	5′-GTCGGACTCAGACACTTCGG-3′
CHS20R	5′-ACCGCGAAAATGCCAAGATG-3′
935F	5’-CTTCGCAGGTCGCCATCCGGAAAG-3’
935R	5’-AAACCTTTCCGGATGGCGACCTGC-3’
406F	5’-CTTCGACTTGTAACCGATGTTTAC-3’
406R	5’-AAACGTAAACATCGTTTACAAGTC-3’
KDRF	5’-TCGCTCCAAATCCAACTGAT-3’
KDRR	5’-ACCGACTTTATGCACAGCTT-3’
1014UP	5’-ACCGCTTTCCCGACGGAGAT-3’
1014DOWN	5’-GCATTATAGCCAGTAAGCATCGTA-3’
ParaIn-F	5’-GTTTGATTTGCTGTCAAGCC-3’
ParaIn-R	5’-CTGGCATTTTAACTTGTAACACAC-3’
exoR	5’-GATCGATCGCATCCTCAACT-3’

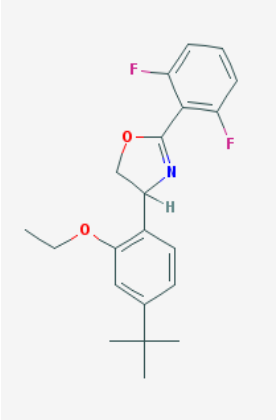
```
                                   ETXSF
241   TGGCCTTCATGTTTATCTGCTTCACCTGTAAGTCGAACATCCAGTTGTTCGTGGCCCAAGTCCTTTCGACGGCATATGCC   320
      L  A  F  M  F  I  C  F  T  C  K  S  N  I  Q  L  F  V  A  Q  V  L  S  T  A  Y  A

321   CTGATCATGATGGCGGTGATTGTGGGTACGGCCTTGCAGTTGGGAGAGGACGGAATAGGCTCCCCTTCGGCCATTTTCCT   400
       L  I  M  M  A  V  I  V  G  T  A  L  Q  L  G  E  D  G  I  G  S  P  S  A  I  F  L

                                                PAM      gRNA444
          T (abolishes NcoI)
401   GATATCCATGGTGGGCTCATTCTTCATAGCCGCATGTTTGCATCCACAAGAGTTCTGGTGCATTACATGCGGCCTAATCT   480
        I  S  M  V  G  S  F  F  I  A  A  C  L  H  P  Q  E  F  W  C  I  T  C  G  L  I

              (ATC→TTC, I1056F)
              T        ETXSM
481   ATTTGCTGTCCATCCCGTCCATGTACCTGCTGCTCATCTTGTACTCTATCATCAACCTAAACGTCGTCTCCTGGGGCACC   560
      Y  L  L  S  I  P  S  M  Y  L  L  L  I  L  Y  S  I  I  N  L  N  V  V  S  W  G  T

561   CGCGAGGTGGTGGCTAAGAAGACCAAGAAAGAACTGGAGGCGGAGAAGAAGGCCGCCGAGGAGGCCAAAAAGAGGGTGAA   640
       R  E  V  V  A  K  K  T  K  K  E  L  E  A  E  K  K  A  A  E  E  A  K  K  R  V  K

                          gRNA658        PAM
          ETXSR
641   GCAGAAGAGCATGCTGAGCTTCCTTCAGAGTGGAATCGGGGACAATGGCGACGAGGAGGGCTCCGTGGAGTTCTCTCTCG   720
        Q  K  S  M  L  S  F  L  Q  S  G  I  G  D  N  G  D  E  E  G  S  V  E  F  S  L

721   CTGGACTCTTCCGCTGCATATTCTGCACCCACGGAAAAACATCCGACGAGAAGCAGCAGCTGACCTCCATCGCCGAATCG   800
      A  G  L  F  R  C  I  F  C  T  H  G  K  T  S  D  E  K  Q  Q  L  T  S  I  A  E  S
```

Εικόνα 1: Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία τμήματος 800bp από το γονίδιο *kkv*, εξώνιο 6 (3R:5381406:5382206, flybase.org) που περιέχει την θέση 1056 της αλληλουχίας της Δροσόφιλας, αντίστοιχη με την 1017 στην αλληλουχία του τετρανύχου. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι οδηγοί RNA (gRNAs) και με κίτρινο οι αλληλουχίες PAM (-*NGG*). Τα κάθετα βέλη αντιπροσωπεύουν τις θέσεις θραύσης από την πρωτεΐνη Cas9. Με κύκλους σημειώνονται δύο τροποποιήσεις στην αλληλουχία, η πρώτη (C→T) αφορά την κατάργηση της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου *NcoI* και η δεύτερη (A→T) αφορά τη μη συνώνυμη μεταλλαγή που οδηγεί στην αλλαγή κωδικονίου (ισολευκίνη σε φαινυλαλανίνη, I1056F). Τέλος, με οριζόντια βέλη σημειώνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον μοριακό έλεγχο (βλ. Παράρτημα, Πίνακας 1).

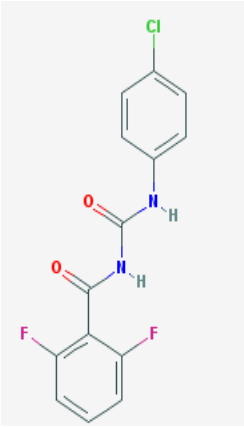
```
                                                                  paraInR
1      cgtgcgatacttttggttcactctttttttttttgtgtacgattttctggcattttaacttgtaacacaccgttttt

81     ttgtgagtgctcgctgcgctgaacaccgtttgcacacgcttttgtatgtggcttgacagcaaatcaaacaaaccaaaaa
                                                                  paraInF

161    aaaaaaatcaattaaaacaattgaaactgtctccaaatatccccaaaaaactataaactatactcgtagaaaacgaagcg

                                                                  C  C  A  T
                                                (D) H  K  D  R  F  P  D  G  D  L  P  R  W
241    agctagaaactattgctaattaatgccaaaccatcgacagATCACAAGGACCGCTTTCCGGATGGCGACCTGCCGCGCTG

                                kdrR T (CAC→CAT, generates NsiI)
        N  F  T  D  F  M  H  S  F  M  I  V  F  R  V  L  C  G  E  W  I  E  S  M  W  D
321    GAACTTCACCGACTTTATGCACAGCTTCATGATCGTGTTCCGGGTGCTCTGCGGAGAATGGATCGAGTCCATGTGGGACT
                                NsiI

                                (GCC→GCT, abolishes MscI) T                  T (CTT→TTT,L1014F)
       C  M  Y  V  G  D  V  S  C  I  P  F  F  L  A  T  V  V  I  G  N  L  V
401    GCATGTACGTGGGCGATGTCTCGTGCATTCCCTTCTTCTTGGCCACCGTTGTCATCGGCAATTTTGTGgtgagtactctt
                                                MscI
                                t       c
481    atcgaactgctgacttgtaaacgatgtttactggctataatgctgacttatcgcctctaaccatggctttaagcatcgca
                                gRNA 406
```

Εικόνα 2: Νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία τμήματος 560bp του γονιδίου *para* (X:16486626:16487179, flybase.org) που περιέχει τη θέση 1014. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι οδηγοί RNA (gRNAs) και με κίτρινο οι αλληλουχίες PAM (-*NGG*). Τα βέλη αντιπροσωπεύουν τις θέσεις θραύσης από την πρωτεΐνη Cas9. Με κύκλους σημειώνονται τρεις τροποποιήσεις στην αλληλουχία, η πρώτη (C→T) αφορά τη δημιουργία θέσης αναγνώρισης του ενζύμου *NsiI*, η δεύτερη (C→T) αφορά την κατάργηση της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου *MscI* και η τρίτη (C→T) τη μη συνώνυμη μεταλλαγή που οδηγεί στην αλλαγή κωδικονίου (λευκίνη σε φαινυλαλανίνη, L1014F). Έχουν εισαχθεί ακόμα έξι συνώνυμες μεταλλαγές στις περιοχές των gRNAs οι οποίες σημειώνονται πάνω από τις περιοχές αυτές. Η γκρι και οι κυανές περιοχές αντιπροσωπεύουν ορισμένους απο τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση ενώ οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον μοριακό έλεγχο έχουν σχεδιαστεί στις περιοχές των gRNAs (βλ. Παράρτημα, Πίνακας 1). Τέλος, τα πράσινα γράμματα αφορούν τις εισαγωγές (insertions) και τα μικρά κόκκινα τους πολυμορφισμούς που βρέθηκαν μετά την αλληλούχηση, οι οποίες αλλαγές δεν επηρεάζουν την περιοχή που μας ενδιαφέρει.

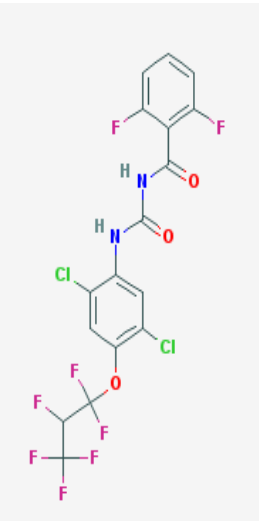
Etoxazole



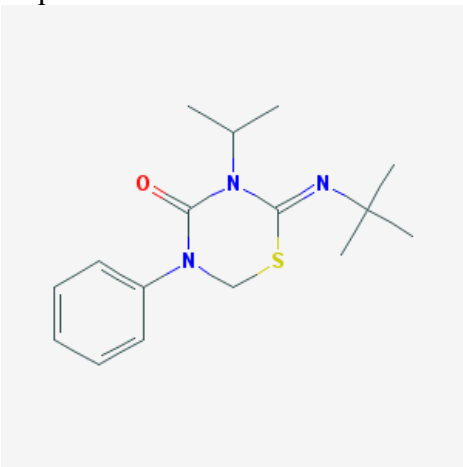
Diflubenzuron



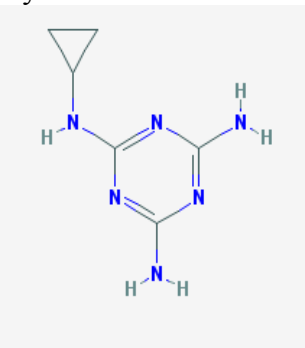
Lufenuron



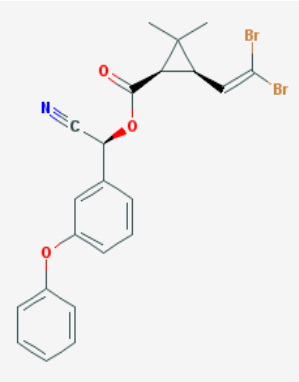
Buprofezin



Cyromazine



Deltamethrin



Εικόνα 3: Χημικές δομές των εντομοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή. Σύμφωνα με τον IRAC, το Etoxazole ανήκει στην ομάδα 10B (παρεμποδιστές ανάπτυξης ακάρεων), τα Diflubenzuron και Lufenuron στην ομάδα 15 (παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης, τύπος 0), το Buprofezin στην ομάδα 16 (παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης, τύπος 1) και το Cyromazine στην ομάδα 17 (διαταραχές στην έκδυση). Όλα τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές με το στέλεχος Etox15 που φέρει τη μεταλλαγή I1056F στο γονίδιο της συνθάσης της χιτίνης, *kkv*. Το Deltamethrin που χρησιμοποιήθηκε στις βιοδοκιμές με το στέλεχος που φέρει τη μεταλλαγή L1014F στο γονίδιο *para*, είναι πυρεθροειδές που ανήκει στην ομάδα 3A (ρυθμιστές των καναλιών νατρίου). Πηγή: PubMed.