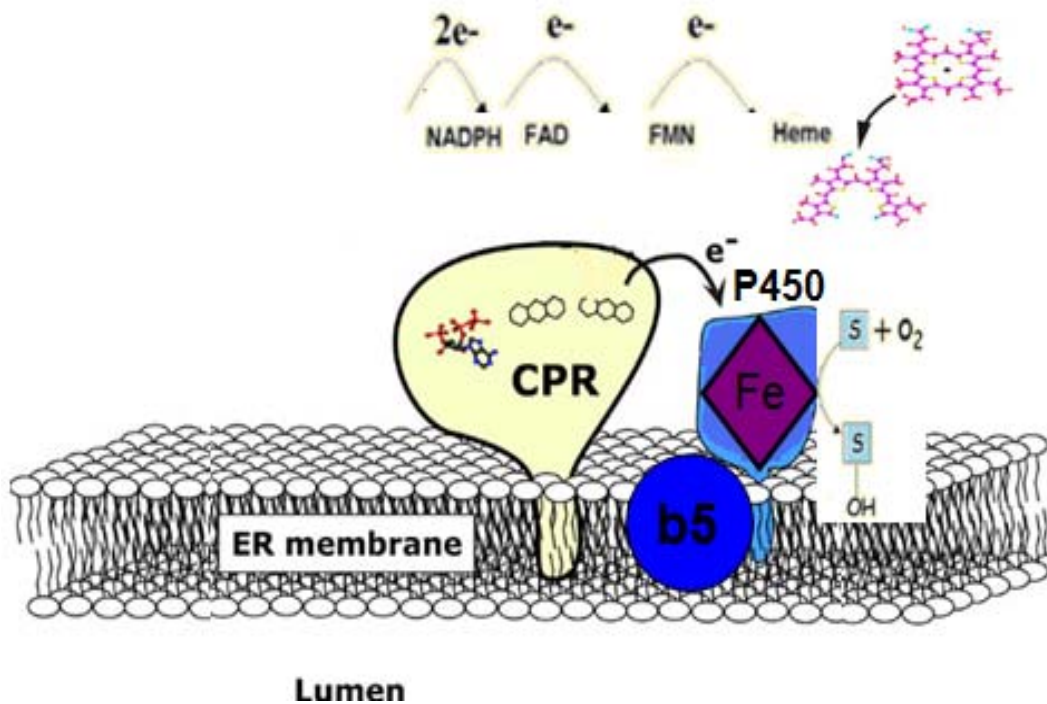




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ P450
ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ**



ΤΣΑΚΙΡΕΛΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Ιωάννης Βόντας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αυτή η μεταπτυχιακή εργασία για πολλούς από εσάς που τη διαβάσετε, μπορεί να αποτελεί ένα απλό έγγραφο, που αναφέρεται σε έντομα, μεθόδους και συμπεράσματα. Για μένα όμως αποτελεί κάτι πολύ παραπάνω από ένα απλό έγγραφο. Αποτελεί το πρώτο μου ουσιαστικό βήμα προς την επιστημονική σκέψη. Κι αυτό το πρώτο βήμα ποτέ κάνεις δεν το κάνει από μόνος του. Οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ πάνω από όλους στον καθηγητή μου, κύριο Ιωάννη Βόντα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε συμπεριλαμβάνοντας με στα μέλη του εργαστηρίου του και για την πολύτιμη βοήθεια του όλο αυτό το καιρό.

Θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ευαγγέλια Μώρου και τη Βασιλεία Μπαλαμπανίδου για την καθοδήγηση τους στην πορεία των πειραμάτων, την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και το χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αντώνη Χρυσσαργυρη, την αδυναμία μου σε αυτό το εργαστήριο, τον άνθρωπο που με έκανε να νιώσω άνετα και οικεία από τις πρώτες κιόλας μέρες που ήρθα στο εργαστήριο και που ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει και να με συμβουλέψει σε κάθε μου πρόβλημα κι ανησυχία, που στάθηκε δίπλα μου σαν πολύ κάλος φίλος.

Ευχαριστώ την Βάσια Μπαριάμη που πάντα ήταν πρόθυμη απέναντι μου να με βοηθήσει και να μου μεταδώσει τις γνώσεις της, που ήταν πολλές φορές το σωσίβιο μου ενώ πνιγόμεν, την ευχαριστώ για όλες τις ωραίες στιγμές.

Ευχαριστώ πολύ την Ντέμπορα Καπανταιδάκη, τον Άρη Ηλία (βεντέμα), τη Μαρία Ρίγα και τη Νένα Παυλίδη για τη βοήθειά τους σε ότι κι αν χρειαζόμουν και για όλες τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε κατά την παραμονή μας στο εργαστήριο.

Θα θελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής κ. Κοκκινίδη και κ. Τοκατλίδη για την συμμετοχή τους στην παρούσα εργασία. Επίσης θα θελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά από το εργαστήριο του κ. Καλαντιδη και του κ. Τοκατλίδη για την άριστη επαγγελματική και φιλική σχέση που αναπτύξαμε.

Ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου τους φίλους μου Χρήστο Αδαμάκη, Μανώλη Μαυρόκωστα, Έλενα Γρηγοριάδη, Εύη Δοριάκη, Κατερίνα Σαλαπάτα που με στηρίζουν πάντα σε ότι κι αν κάνω.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου, Αλέξανδρο και Κατερίνα Τσακιρέλη και τις αδελφές μου, Άννα Τσακιρέλη - Φωταρά και Ελένη Τσακιρέλη - Μπαντίνη που υπάρχουν πάντα δίπλα μου και αποτελούν την ώθηση για την επίτευξη του οποιοδήποτε

στόχου μου ως τώρα, στους οποίους και αφιερώνω τη παρούσα μεταπτυχιακή μου εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

1.1 Εντομολογικοί εχθροί καλλιεργειών και η καταπολέμηση τους

1.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα

1.2.1 Τα ένζυμα P450

1.3 Υπόβαθρο εργασίας

1.4 Αντικείμενο εργασίας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Διερεύνηση του πιθανού ρόλου των γονιδίων που υπερεκφράζονται σε ανθεκτικά στελέχη τετρανύχου (cyp392e10, cyp392e7, cyp392d2, cyp392d8 και cyp392d10) στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στα ακαρεοκτόνα.

2.Α ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.Β ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.Γ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Δομικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης CYP6CM1 του εντόμου *Bemisia tabaci*

3.Α ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.Β ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.Γ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΡΟΣΘΕΤΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ALA	5-aminolevulinic acid
APCI-MS	Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometer
bp	Base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CO	Carbon monoxide
CPR	Cytochrome P450 reductase
dNTP's	Deoxynucleosides
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GABA	Gamma aminobutyric acid
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HPLC	High pressure liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
METI	Mitochondrial electron transport inhibitor
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride
RT	Room Temperature
RNA	Ribonucleic acid
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Tetranychus urticae* και ο αλευρώδης *Bemisia tabaci* αποτελούν μείζονα επιβλαβή παράσιτα για τα καλλιεργούμενα φυτά. Ο έλεγχος τους βασίζεται κατά κύριο λόγο στη χρήση εντομοκτόνων με αποτέλεσμα τα παράσιτα αυτά να έχουν αναπτύξει υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών ανθεκτικότητας αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τη διαχείριση και την αντιμετώπιση του φαινομένου. Σε προηγούμενες εργασίες, έπειτα από ανάλυση με μικροσυστοιχίες DNA σε στελέχη *T.urticae* ανθεκτικά στις κετοενόλες προσδιορίστηκε ότι τα γονίδια *Cyp392e10* και *Cyp392e7* υπερεκφράζονται, ενώ τα γονίδια *Cyp392d2*, *Cyp392d8* και *Cyp392d10* υπερεκφράζονται σε στελέχη τερτρανόχου ανθεκτικά στα METI ακαρεοκτόνα. Στην παρούσα εργασία, κλωνοποιήσαμε σε κατάλληλους φορείς έκφρασης πρωτεϊνών τα γονίδια αυτά και εκφράσαμε τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες CYP392E10 και CYP392E7. Δείξαμε ότι η CYP392E10 είναι ικανή να μεταβολίζει το ακαρεοκτόνο spirodiclofen. Η CYP392E10 είναι το πρώτο ένζυμο από έντομο γεωπονικού ενδιαφέροντος που βρέθηκε να μεταβολίζει μέλος της νέας ομάδας εντομοκτόνων, των κετοενόλων.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια για την παραγωγή υδατοδιαλυτών μορφών της πρωτεΐνης CYP6CM1 (προκειμένου για την εν συνεχεία παραγωγή κρυστάλλων) του έντομου *Bemisia tabaci*, που σε προηγούμενες εργασίες είχε δειχθεί ότι μεταβολίζει το νεονικοτινοειδές εντομοκτόνο imidacloprid, το πρώτο σε πωλήσεις εντομοκτόνο της αγοράς.

SUMMARY

Tetranychus urticae and *Bemisia tabaci* are two major agricultural pests. Their control is largely based on insecticides. However, these pests have developed high levels of insecticides resistance. The elucidation of resistance mechanisms is an important pre-requirement for the management of resistance. In previous studies, microarray analysis of resistant *T.urticae* strains to the ketoenols has identified the over expression of *Cyp392e10* and *Cyp392e7* genes, while the *Cyp392d2*, *Cyp392d8* and *Cyp392d10* genes have overexpressed in resistant *T.urticae* strains to the METI's acaricides. In this study, we cloned these genes to the appropriate vectors for protein expression and we expressed the recombinant proteins CYP392E10 and CYP392E7. We have identified the capability of CYP392E10 to metabolize spiroadiclofen. The P450 CYP392E10 is the first enzyme from agricultural pests shown to metabolize members of the novel ketoenol class of insecticides.

In parallel, we tried to produce soluble forms of the protein CYP6CM1 (for further crystallization analysis), isolated from *Bemisia tabaci* that in previous studies it had been shown that this protein has the capability to metabolize the neonicotinoid imidacloprid, the number one insecticide in the world market.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά που αποτελούν τη βάση της τροφικής πυραμίδας προσβάλλονται από ένα μεγάλο αριθμό φυτοπαράσιτων και εντόμων. Για την προστασία της γεωργικής παράγωγης η χρησιμοποίηση χημικών ενώσεων, που μπορούν να θανατώσουν, να παρεμποδίσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των φυτοπαράσιτων είναι ο συνηθέστερος από όλους τους τρόπους καταπολέμησης τους, τουλάχιστον σε περιοχές με ανεπτυγμένη γεωργία (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση χημικών ενώσεων οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών φαινοτύπων. Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας αποτελεί σοβαρό εμπόδιο στην προσπάθεια ελέγχου των εντομολογικών εχθρών στη Γεωργία. Μειώνει δραματικά την αποτελεσματικότητα των εντομοκτόνων, ενώ η λαθεμένη αντιμετώπιση της (αύξηση της δόσης φυτοφαρμάκων) έχει ως επακόλουθο την επιβάρυνση του περιβάλλοντος (μόλυνση φυσικών πόρων, εξαφάνιση ωφέλιμων ειδών, επιπτώσεις στην υγεία αγροτών- καταναλωτών) (Βόντας, 2006).

1.1 Εντομολογικοί εχθροί καλλιεργειών και η καταπολέμηση τους

Ο *Tetranychus urticae* και ο αλευρώδης *Bemisia tabaci* αποτελούν μείζονα επιβλαβή παράσιτα για τα καλλιεργούμενα φυτά. Ο *T.urticae* ταξινομικά ανήκει στο φύλο *Arthropoda* στην κλάση *Arachnida* στην τάξη *Prostigmata* και στην οικογένεια *Tetranychidae*. Η κοινή του ονομασία ποικίλει, ωστόσο είναι ευρύτερα γνωστός ως τετράνυχος ο δύστηκτος λόγω δύο ευδιάκριτων στιγμάτων στο ιδίοςωμα (Εικ. 1). Είναι πολυφάγο φυτοφάγο άκαρι παγκόσμιας εξάπλωσης. Έχει μεγάλο εύρος ξενιστών, στην χώρα μας απαντάται σε κηπευτικές καλλιέργειες, βιομηχανικά και κτηνοτροφικά φυτά, ανθοκομικά και καλλωπιστικά φυτά, εσπεριδοειδή, οπωροφόρα δέντρα και αμπέλια (Saito, 1985). Ο τετράνυχος ζει συνήθως σε αποικίες αποτελούμενες από συγγενικά άτομα (Εικ.2Α). Τα θηλυκά που διασπείρονται μόλις φτάσουν σε ένα νέο φυτό αρχίζουν να τρέφονται πλέκοντας έναν ιστό σύνθετο και ανομοιόμορφο στον οποίο αφήνουν τα ωά τους (Εικ.2Β) (Saito, 1985).



Εικόνα 1. Ακμαίο θηλυκό άτομο με ευδιάκριτα στίγματα στο ιδίόσωμα (Κωβαίος, 2010)



Εικόνα 2. A: Αποικία σε φύλλα , B: Ιστός τετράνυχου (Κωβαίος, 2010)

Ο τετράνυχος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών. Προκαλεί ζημιές στα φυτά απομυζώντας χυμούς από το δυφρακτοειδές παρέγχυμα των φύλλων με την βοήθεια σιλέτων μειώνοντας έτσι τόσο την διαδικασία της φωτοσύνθεσης όσο και της διαπνοής. Ο τετράνυχος διανύει μικρές αποστάσεις βαδίζοντας ή μεταφέρεται παθητικά με τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις αναπτύσσοντας νέες προσβολές (Τζανακάκης, 1995).

Οι τρόποι αντιμετώπισης του τετράνυχου είναι με αρπακτικά ακάρεα ή με ακαρεοκτόνα σκευάσματα. Ο τετράνυχος έχει στη φύση πολλούς φυσικούς εχθρούς, αρπακτικά που μπορούν να ελέγξουν τους πληθυσμούς τους. Μεταξύ των φυσικών εχθρών του τετράνυχου τα αρπακτικά ακάρεα της οικογένειας *Phytoseiidae* αποτελούν αναμφισβήτητα τον πλέον επιτυχημένο παράγοντα βιολογικής καταπολέμησής τους (Εμμανουήλ και Παπαδούλης, 2000). Παρ' όλο που η βιολογική

καταπολέμηση κερδίζει έδαφος, η χρήση χημικών σκευασμάτων παραμένει ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης του τετράνυχου.

Για τη χημική καταπολέμηση του *T.urticae* υπάρχουν εντομοκτόνα με ακαρεοκτόνο δράση όπως ορυκτέλαια, οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές ενώσεις, χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, πυρεθρινοειδή, αβερμεκτίνες και εντομοκτόνα νέας γενιάς που χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών από φυτοφάγα ακάρεα. Η δράση των περισσότερων εντομοκτόνων εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα.

Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης (βασικό ένζυμο του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων και των ακάρεων) αναστέλλοντας την λειτουργία της με αποτέλεσμα την παράλυση του νευρικού συστήματος και το θάνατο των εντόμων (Ζιωγας και Μάρκογλου, 2007).

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και τα πυρεθρινοειδή δρουν στοχεύοντας στα διαμεμβρανικά κανάλια μεταφοράς ιόντων γλωρίου (GABA) και νατρίου (sodium channel) αποσυντονίζοντας έτσι την λειτουργία τους και τον έλεγχο ροής ιόντων κατά μήκος του νευρικού άξονα, οδηγώντας στην παράλυση και σταδιακά στο θάνατο των ατόμων (Ζιωγας και Μάρκογλου, 2007).

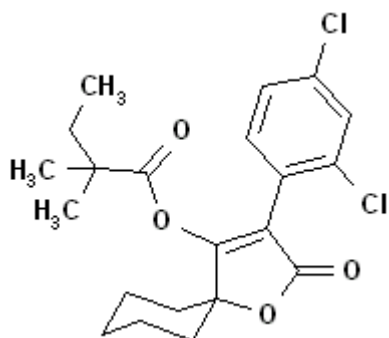
Οι αβερμεκτίνες είναι μείγμα φυσικών τοξικών ουσιών. Δρουν αυξάνοντας την έκλυση GABA και την ροή ιόντων γλωρίου στο νευρικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα υποκαθιστούν το γ-αμινοβουτυρικό οξύ στους υποδοχείς, προκαλώντας ανεξέλεγκτη ροή ιόντων γλωρίου, υπερδιέγερση, παράλυση και τελικά θάνατο (Γιαννοπολίτης, 2005).

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators) παρεμβαίνουν σε φυσιολογικές λειτουργίες των εντόμων όπως την βιοσύνθεση της χιτίνης, καθώς και την διαδικασία της έκδυσης και της μεταμόρφωσης (Τζανακάκης, 1995).

Έχουν αναπτυχθεί και δραστικές ουσίες που έχουν μόνο ακαρεοκτόνο δράση όπως είναι τα METI (mitochondrial electron transport inhibitor) ακαρεοκτόνα που δρουν σαν παρεμποδιστές μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια.

Τέλος, υπάρχει το νέο ακαρεοκτόνο Spirodiclofen με συντακτικό τύπο όπως φαίνεται στην εικόνα 3, που ανήκει στην ομάδα των κετοενόλων. Πρόκειται για μια ουσία που είναι παράγωγη του τετρονικού οξέος κι έχει αποτελεσματική δράση για ένα μεγάλο αριθμό φυτοφάγων ακάρεων σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης τους. Έχει περιορισμένη τοξικότητα σε ωφέλιμα έντομα και μέτρια τοξικότητα σε αρπακτικά ακάρεα. Δρα με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με άλλες ακαρεοκτόνες ουσίες, με

παρεμπόδιση της δράσης ενός ενζύμου (acetylcoenzyme A carboxylase) που ελέγχει τον σχηματισμό λιπαρών οξέων σε ακάρεα. Είναι χημικά συγγενής με ορισμένες ζιζανιοκτόνες ουσίες (1,3-dicetones) που δρουν ως παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης των λιπιδίων. Έχει μικρή περίοδο παρουσίας υπολειμμάτων στο περιβάλλον. Στη χώρα μας έχει έγκριση για χρήση σε δενδρώδεις καλλιέργειες (μηλιά, εσπεριδοειδή, αχλαδιά, ροδακινιά και αμπέλι) για την αντιμετώπιση τετρανύχων (Κωβαίος, 2010).



Εικόνα 3. Συντακτικός τύπος του εντομοκτόνου Spirodiclofen (Γιαννοπολίτης, 2005)

Παρόλα αυτά ο τετρανύχος είναι γνωστός για την ικανότητα του να αναπτύσσει ταχύτατα ανθεκτικότητα σε χημικές ουσίες (Van Leeuwen *et al.*, 2010). Η επιλογή ανθεκτικότητας επιταχύνεται από ορισμένα χαρακτηριστικά του είδους όπως το υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό, η υψηλή εκκολαψιμότητα των ωών, η αρρενοτόκος παρθενογένεση και ο σύντομος βιολογικός κύκλος που έχει ως αποτέλεσμα πολλές γενεές/έτος, ιδιαίτερα σε συνθήκες θερμοκηπίου (Cranham *et al.*, 1985). Τα επίπεδα ανθεκτικότητας ελληνικών πληθυσμών τετρανύχου σε ομάδες εντομοκτόνων, όπως τα πυρεθρινοειδή είναι από τα υψηλότερα παγκοσμίως και περιορίζουν σημαντικά τις επιλογές στην φυτοπροστασία (Tsagkarakou *et al.*, 2009).

Το *Bemisia tabaci*, όπως φαίνεται στην εικόνα 4, με κοινό όνομα αλευρώδης του καπνού, είναι ρυγχωτό της οικογένειας *Aleyrodidae*, ανήκει στη τάξη *Hemiptera*, στην υπόταξη *Homoptera* και στη σειρά *Sternorrhyncha* (Della Beffa, 1962). Ο αλευρώδης θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους εντομολογικούς εχθρούς παγκοσμίως, εξαιτίας της μεγάλης γεωγραφικής του εξάπλωσης, του μεγάλου εύρους φυτών-ξενιστών και της ικανότητάς του τόσο να μεταδίδει ιολογικές ασθένειες όσο και να αναπτύσσει ταχύτατα ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα (Εμμανουήλ, 1998).



Εικόνα 4. Ακμαίο του *B. tabaci* (Εμμανουήλ, 1998)

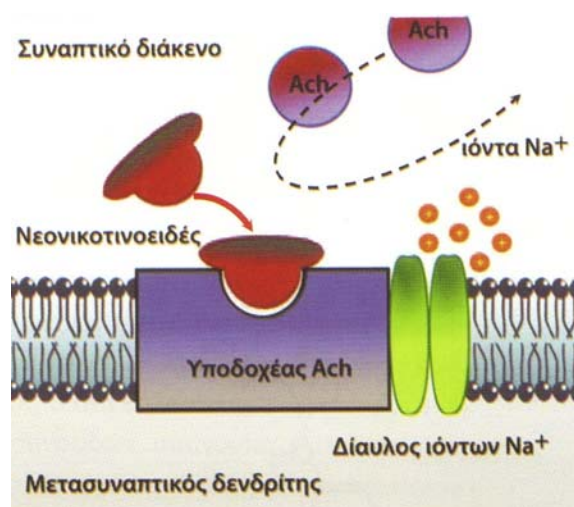
Η συνεχής χρήση παλαιότερων εντομοκτόνων, όπως των οργανοφωσφορικών, των καρβαμιδικών και άλλων, είχε οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλά είδη ακάρεων και εντόμων κάνοντας επιτακτική την ανάγκη για τη ανακάλυψη νέων εντομοκτόνων, όπως έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 90 με τα νεονικοτινοειδή.

Τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, όπως είναι η νικοτίνη, το imidacloprid ανήκουν στα νευροτοξικά εντομοκτόνα, που στόχος τους είναι οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης Η ακετυλοχολίνη (ACh), είναι ο σημαντικότερος νευροδιαβιβαστής στο νευρικό σύστημα των εντόμων αλλά και των θερμόαιμων θηλαστικών (Mahmood, 2007).

Σε αντίθεση με τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα που παρεμποδίζουν την ακετυλοχολινεστεράση (η οποία ελέγχει τη συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό διάκενο), τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα μιμούνται τη δράση της φυσικής ουσίας ακετυλοχολίνης με το να καταλαμβάνουν τη θέση της στους νικοτινεργικούς υποδοχείς της. Αποτέλεσμα της δέσμευσης των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης από τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα είναι η παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων μεταξύ των νευρικών κυττάρων, η διαρκής υπερδιέγερση, η πρόκληση νευρικών σπασμών, η παράλυση και τελικά ο θάνατος του εντόμου (εικόνα 5) (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007).

Παρόλο που η ανθεκτικότητα στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα αναπτύχθηκε με αργό ρυθμό, ένας αριθμός ειδών ανέπτυξε σχετικά γρήγορα ανθεκτικότητα, όπως τα ημίπτερα έντομα *Bemisia tabaci* και *Trialeurodes vaporariorum*, *Nilaparvata lugens*, *Leptinotarsa decemlineata* και άλλα (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007). Μερικοί από τους πλέον ανθεκτικούς πληθυσμούς παγκοσμίως υπάρχουν στα θερμοκήπια της

Ιεράπετρας, με αποτέλεσμα τα προβλήματα ανθεκτικότητας στην Κρήτη να είναι ιδιαίτερα σημαντικά (Roditakis et al., 2006).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της δέσμευσης των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στο μετασυναπτικό δενδρίτη από τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007)

1.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι η ικανότητα ενός πληθυσμού να αντέχει σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Οφείλεται στην επιλογή ανθεκτικών γονιδίων, που με την πάροδο των γενεών μετατρέπει αρχικά ευπαθείς πληθυσμούς σε ανθεκτικούς. Η κακή χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών (τρόπος-συχνότητα εφαρμογής) αφενός μειώνει την αποτελεσματικότητά τους (αυξημένο κόστος, αποτυχία καταπολέμησης) και επιβαρύνει το περιβάλλον (μόλυνση φυσικών πόρων, εξαφάνιση ωφέλιμων ειδών, επιβάρυνση αγροτών καταναλωτών), αφετέρου οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Mahmood, 2007).

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα έντομα και στα ακάρεα εμφανίζονται με διάφορες μορφές. Ανθεκτικότητα μπορεί να προκαλείται από επιδερμικές διαφοροποιήσεις κι αλλαγές στη συμπεριφορά τους που έχουν ως αποτέλεσμα είτε να εμποδίζεται η είσοδος είτε να αυξάνεται η απέκκριση των εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων. Αυτός ο τύπος ανθεκτικότητας ονομάζεται φυσιολογική ή ηθολογική ανθεκτικότητα.

Ο δεύτερος τύπος ανθεκτικότητας ονομάζεται ανθεκτικότητα στόχου. Αφορά διαφοροποιήσεις στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών στόχων που τις κάνουν λιγότερο ευαίσθητες στα τοξικά μόρια με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων (Bόντας κα., 2007).

Ο τρίτος τύπος ανθεκτικότητας ονομάζεται «βιοχημική ανθεκτικότητα». Συνίσταται από ένζυμα που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα προτού αυτά φτάσουν στους στόχους τους. Βασικά ένζυμα της βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι οι εστεράσες, οι μεταφοράσες της γλουταθειόνης και οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες (Bόντας κα., 2007).

Οι μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες ή μονοοξυγενάσες είναι ίσως η πιο σημαντική οικογένεια γονιδίων που προκαλεί βιοχημική ανθεκτικότητα

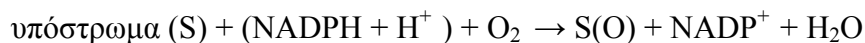
1.2.1 Τα ένζυμα P450

Τα κυτοχρώματα P450 (CYPs) είναι μια από τις μεγαλύτερες υπεροικογένειες ενζυμικών πρωτεϊνών. Τα P450 γονίδια συναντώνται από το γονιδίωμα των βακτηρίων μέχρι το γονιδίωμα των θηλαστικών. Οι αμινοξικές αλληλουχίες τους είναι πολύ διαφορετικές και σε μερικές περιπτώσεις τα επίπεδα ομοιότητας τους είναι χαμηλότερα από 16% , αλλά εξελικτικά η δομική τους αναδίπλωση παραμένει παντού η ίδια. Στους προκαρυώτες, τα ένζυμα P450 είναι διαλυτές πρωτεΐνες, ενώ στους ευκαρυώτες συχνά συνδέονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο ή με την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Berge et al., 1998)

Το ενεργό κέντρο των ενζύμων P450 περιέχει μια ομάδα άιμης στο εσωτερικό του, η οποία περικλείει ένα άτομο σιδήρου (κέντρο αιμικού σιδήρου) και γι αυτό το λόγο τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην υπεροικογένεια των αιμοπρωτεϊνών. Όταν ο αιμικός σίδηρος των ενζύμων P450 αναχθεί, σχηματίζει σύμπλοκο με το αέριο μονοξειδίο του άνθρακα (CO) με αποτέλεσμα το ένζυμο P450 να απορρόφα φως σε μήκος κύματος κοντά στα 450 nm. Αυτή η κορυφή απορρόφησης του φωτός που παρουσιάζουν τα ένζυμα P450 σε μήκος κύματος κοντά στα 450 nm, αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό τους που τους προσδίδει και την ονομασία τους (Omura and Sato, 1964).

Η λειτουργία των περισσότερων CYPs είναι να καταλύουν την οξείδωση οργανικών υποστρωμάτων, όπως λιπιδίων, φαρμάκων, διάφορων τοξικών χημικών κα. Συχνά σχηματίζουν μέρος από πολυσύνθετες αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα ένζυμα P450 καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων, όπως δείχνει ο

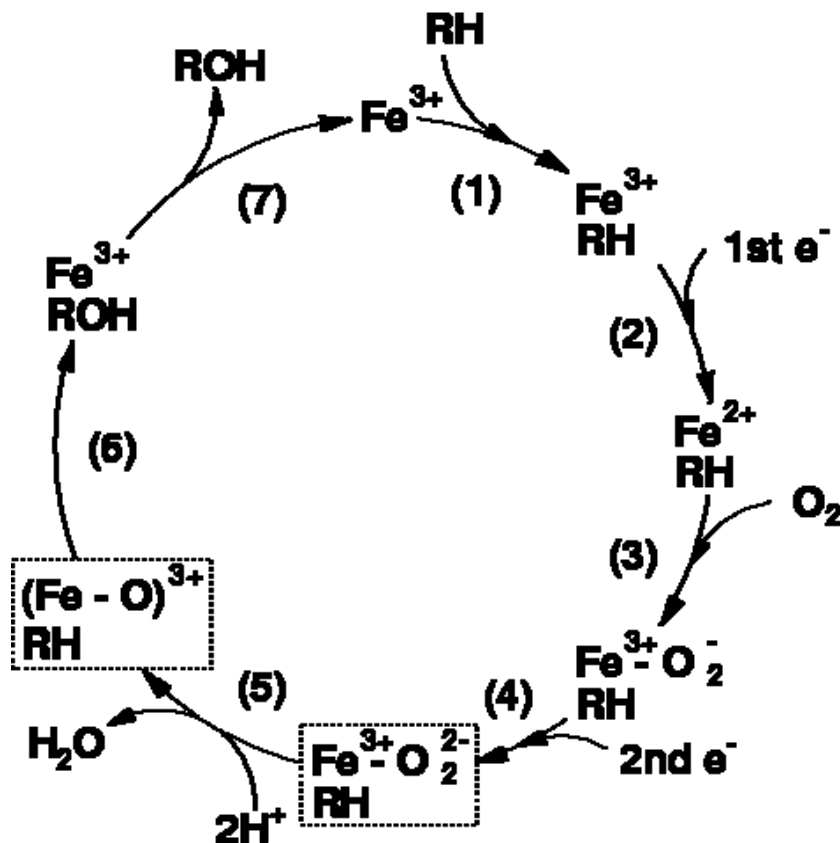
καταλυτικός τους κύκλος στην εικόνα 6, όμως η πιο κοινή αντίδραση που καταλύεται από αυτά είναι η αντίδραση μονοοξυγενάσης, δηλαδή τα ένζυμα P450 δεσμεύουν το μοριακό οξυγόνο και λαμβάνουν ηλεκτρόνια από το NADPH για να εισάγουν ένα άτομο οξυγόνου σε ένα οργανικό υπόστρωμα (S), ενώ το άλλο άτομο οξυγόνου ανάγεται σε νερό σύμφωνα με την αντίδραση :



Τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για αυτή την αντίδραση μεταφέρονται από το NADPH πάνω στο σύμπλοκο 'υπόστρωμα - P450' είτε από μια NADPH P450-reductase του κυτοχρώματος (CPR) είτε από το κυτόχρωμα b₅ (Berge *et al.*, 1998).

Αυτή η δραστικότητα μονοοξυγενάσης των P450 ενζύμων σχετίζεται επίσης με το μεταβολισμό των περισσότερων εντομοκτόνων, οδηγώντας κατά κύριο λόγο στην αποτοξικοποίηση τους (Scott *et al.*, 1999).

Για πολλά έντομα, η αποτοξικοποίηση είναι τόσο ενεργή που το εντομοκτόνο δεν φτάνει στο μοριακό του στόχο, προτού μεταβολιστεί κι αποικοδομηθεί από αυτά τα ένζυμα, καθιστώντας τα έντομα αυτά να είναι ανθεκτικά στα εντομοκτόνα (Berge *et al.*, 1998). Για την μειωμένη ευαισθησία των εντόμων ευθύνονται ποσοτικές αλλαγές μελών της οικογένειας των P450 που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα μόρια των εντομοκτόνων ουσιών και σπανίως ποιοτικές διαφοροποιήσεις (Van Leeuwen *et al.*, 2005, Scott *et al.*, 1999). Ανθεκτικότητα αναφέρεται σε όλες σχεδόν τις ομάδες εντομοκτόνων, όπως οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή, οργανοχλωριωμένα, νεονικοτινοειδή και αβερμεκτίνες και συχνά έχουν ευρύ χαρακτήρα (έμμεση-πολλαπλή ανθεκτικότητα), αφού ορισμένες P450 οξειδάσες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ως υπόστρωμα και να μεταβολίζουν πολύ διαφορετικά τοξικά μόρια (Daborn *et al.*, 2002)



Εικόνα 6. Καταλυτικός κύκλος των P450 ενζύμων (Shinkyō and Guengerich, 2011)

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 στους ευκαρυώτες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες και επομένως είναι δύσκολο να κρυσταλλωθούν. Πολύ λίγες κρυσταλλικές δομές είναι διαθέσιμες για αυτά τα ένζυμα. Η πρώτη κρυσταλλική δομή της P450 λύθηκε το 1985 από το οργανισμό *Pseudomonas putia* με ανάλυση 2.6 Å. Μετά από περίπου δυο δεκαετίες, το 2000 προσδιορίστηκε η πρώτη δομή P450 από θηλαστικά. Από τότε με κρυσταλλογραφία των ακτίνων X έχουν λυθεί κι άλλες κρυσταλλικές δομές από κυτοχρώματα θηλαστικών, παρουσιάζοντας αξιοσημείωτα υψηλή ομολογία με τις ανθρώπινες ισομορφές, που είχαν βρεθεί με βάση τις προηγούμενες δομές βακτηριακών ενζύμων, οδηγώντας γρήγορα σε μια νέα γενιά υπολογιστικών μοντέλων. Αυτά τα υπολογιστικά μοντέλα ακολουθήθηκαν στις αναφορές των κρυσταλλικών δομών για τις ανθρώπινες ισομορφές 2C9, 2C8, 3A4 και 2A6. Αυτό επιτεύχθηκε με την παράλειψη της N-τελικής μεμβρανικής περιοχής και σε ορισμένες περιπτώσεις με την εισαγωγή μερικών μικρών μεταλλάξεων που βοηθούσαν στην αύξηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης (Rowland et al., 2006).

Παρόλα αυτά, καμία τρισδιάστατη δομή από ένζυμα P450 των εντόμων δεν έχει λυθεί μέχρι τώρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλές αιτίες, όπως στη δυσκολία που παρουσιάζεται για την εξασφάλιση ικανοποιητικής ποσότητας των ενζύμων που εκφράζονται (*Budriang et al., 2011*)

1.3 Υπόβαθρο εργασίας

Για την ανάλυση ανθεκτικών σε ακαρεοκτόνα πληθυσμών του *T.urticae* πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενες εργασίες χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA. Με βάση τα δεδομένα από αυτή την ανάλυση, παρατηρήθηκε η υπερέκφραση των γονιδίων *Cyp392e10* και *Cyp392e7* σε στελέχη του *T.urticae* που είναι ανθεκτικά στο ακαρεοκτόνο spirodiclofen (κετοενόλη) και των γονιδίων *Cyp392d2*, *Cyp392d8* και *Cyp392d10* σε στελέχη του *T.urticae* που είναι ανθεκτικά στα METI ακαρεοκτόνα (*Van Leewen and Vontas, unpublished*).

Τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο imidacloprid και τα άλλα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, που ανέπτυξε σχετικά γρήγορα το *Bemisia tabaci*, βρέθηκε συμφωνά με βιοχημικές μελέτες που διεξήχθησαν, ότι σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση του εντομοκτόνου από τις μικτής λειτουργίας P450 οξειδάσες. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι ένα γονίδιο των P450's, το *cyp6cm1* υπερεκφράζεται στα ανθεκτικά στελέχη και μεταβολίζει το imidacloprid in vitro, συνδέοντας για πρώτη φορά την ανθεκτικότητα των εντόμων στο imidacloprid με μια πρωτεΐνη της οικογένειας των P450 (*Karunker et al., 2009*)

1.4 Αντικείμενο εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση του πιθανού ρόλου των γονιδίων που υπερεκφράζονται σε ανθεκτικά στελέχη τετρανύχου (*cyp392e10*, *cyp392e7*, *cyp392d2*, *cyp392d8* και *cyp392d10*) στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στα ακαρεοκτόνα. Για να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός απαιτείται η κλωνοποίηση των γονιδίων *Cyp392e10*, *Cyp392e7*, *Cyp392d2*, *Cyp392d8* και *Cyp392d10* που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του τετρανύχου στα ακαρεοκτόνα σε φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης, η παραγωγή ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και η μελέτη της ικανότητάς της να μεταβολίζει συγκεκριμένα ακαρεοκτόνα.

Παράλληλα, στόχος της εργασίας ήταν ο δομικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης CYP6CM1 του εντόμου *Bemisia tabaci*, που σε προηγούμενες εργασίες βρέθηκε να μεταβολίζει το εντομοκτόνο imidacloprid. Για την επίτευξη του δομικού χαρακτηρισμού αυτής της πρωτεΐνης απαιτείται η κλωνοποίηση του γονιδίου *cyp6cm1*, η παραγωγή υδατοδιαλυτών μορφών της πρωτεΐνης, η απομόνωση της και τέλος η κρυστάλλωση του ενζύμου.

Απώτερος στόχος του λειτουργικού και δομικού χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας είναι η ανάπτυξη ενζυμικών παρεμποδιστών ή βελτιωμένων εντομοκτόνων, για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας εντομοκτόνων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Διερεύνηση του πιθανού ρόλου των γονιδίων που υπερεκφράζονται σε ανθεκτικά στελέχη τετρανύχου (*cyp392e10*, *cyp392e7*, *cyp392d2*, *cyp392d8* και *cyp392d10*) στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στα ακαρεοκτόνα.

2.Α ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.Α.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων *Cyp392e10*, *Cyp392e7*, *Cyp392d2*, *Cyp392d8* και *Cyp392d10* σε φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης

2.Α.1.1 Πληθυσμοί *T. urticae*

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανθεκτικά στελέχη του *T. urticae*. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο πληθυσμός SR-VP, όπου τα στελέχη παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στο ακαρεοκτόνο spirodiclofen και ο πλυθισμός MR-VP, όπου τα στελέχη παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στα METI ακαρεοκτόνα.

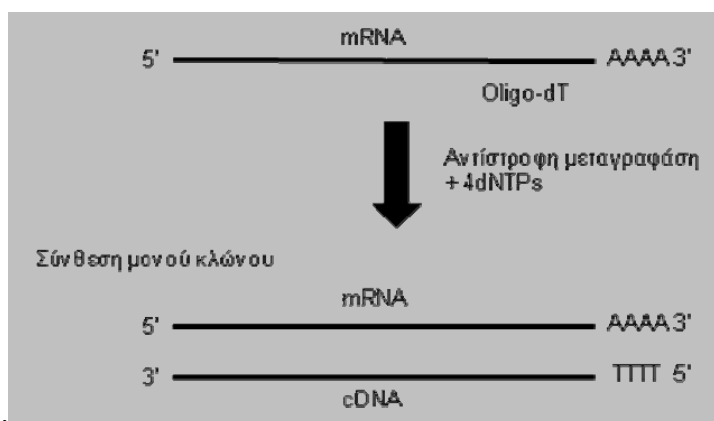
2.Α.1.2 Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση μονόκλωνου cDNA

Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν 200 ζωντανά άτομα *T. urticae*, τα οποία αφέθηκαν στο πάγο για περίπου μίση ώρα και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έγινε με τη χρήση του Rneasy Mini kit cat No 74104-QIAGEN, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της παρασκευάστριας εταιρείας. Το RNA παρασκευάστηκε σε τελικό όγκο 100μl. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA χρησιμοποιήθηκαν 5-10μl Τα προϊόντα της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1, 5%.

Σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA

Για τη σύνθεση μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο 2μg ολικού RNA, αντίστροφη μεταγραφάση Superscript III RNase H- (GIBCO) και ένα ολιγονουκλεοτίδιο (oligodT) συμπληρωματικό με την πολύ(A) ουρά του 3' άκρου του mRNA που υβριδίζεται με το RNA και δρα ως εκκινητής για την αντίστροφη μεταγραφάση (εικ.7)



Εικόνα 7. Σύνθεση μονόκλωνου cDNA

1. Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA στο Nanodrop σε αραιώση 1:10. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας (GIBCO):

Ολικό RNA (465,11ngr/μl)	4,3 μl
oligodT 50μM	1 μl
DEPC-H ₂ O μέχρι τα 11 μl	5,7 μl

Επώαση του δείγματος για 10 λεπτά στους 65°C.

2. Μεταφορά των δειγμάτων στο πάγο για 2 λεπτά και προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων:

5xFirst-StandBuffer (GIBCO-BRL)	4 μl
0,1M DTT	2 μl
10mM dNTP's	1 μl
RNAsin	1 μl

Επώαση του δείγματος για 2 λεπτά στους 50°C

3. Προσθήκη 1 μl Superscript III RNase H ανάστροφης μεταγραφάσης (200 units/μl) και επώαση του δείγματος στους 50°C για 50 λεπτά. Απενεργοποίηση της αντίδρασης στους 70°C για 15 λεπτά.

4. 2.A.1.3 PCR-check cDNA

Τα προϊόντα της αντίδρασης σύνθεσης του cDNA ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, αφού πραγματοποιήθηκε PCR-check με τη χρήση της αλληλουχίας εκκινητών για το γονίδιο της ακτίνης κι αναμενόμενο μέγεθος τα 800bp

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν :

Kappa Taq	0,5μl
10x Buffer A	3,0μl
10μM F actin	1,0μl
10μM R actin	1,0μl
cDNA (από SR-VP strains)	1,0μl
10mM dNTP 's	1,0μl
DEPC-H ₂ O (μέχρι τα 30 μl)	22,5

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα: **1.** T = 95°C για 2 min, **2.** T = 95°C για 30 sec, **3.** T = 50°C για 30 sec, **4.** T = 72°C για 1min 20sec, **5.** Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 34 φορές, **6.** T = 72°C για 2 min, **7.** Παραμονή στους 4°C.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

2.A.1.4 PCR για την ανάκτηση των υπό μελέτη γονιδίων

Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στον πίνακα 1 που ακολουθεί :

Primer Name	Sequence (5'-3')	Restriction site
CYP392E10_F	GCCGGC ATGCGTTTGTTCACACGA	NgoMIV
CYP392E10_R	GAGCTC TTAATCAACACTTTTGAATATCAAGTTAGG	SacI

CYP392E7_F	GCCGGC ATGCTTTTTGAAGGCTGCT	NgoMIV
CYP392E7_R	GAGCTC TTAATCGATGCTCTTGAAAATAAA	SacI
CYP392D2_F	GCCGGC ATGTTTCTCGATCATTTC	NgoMIV
CYP392D2_R	GAGCTC TTAGTTTTTCGTTTAAAGTGGGAAG	SacI
CYP392D8_F	GCCGGC ATGTTTCTCGATCATTTC AACG	NgoMIV
CYP392D8_R	GAATTC TTAATGCTTCAAAGTGTGAAAAATT	EcoRI
CYP392D10_F	GCCGGC ATGCTTCTCGATCATTTC AAATC	NgoMIV
CYP392D10_R	GAGCTC TTAAAGACTCAAATGTGAAAATG	SacI

Πίνακας 1 : Αλληλουχίες εκκινητών

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν :

Green GoTaq polymerase Master mix (2x)(Promega)	12,5μl
10μM CYPE10_F	1,25μl
10μM CYPE10_R	1,25μl
cDNA (από SR-VP strains)	0,5 μl
DEPC-H ₂ O (μέχρι τα 25 μl)	9μl

Το αναμενόμενο μέγεθος της αντίδρασης ήταν περίπου 1500bp για όλα τα υπό μελέτη γονίδια.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα: 1. T = 95°C για 2 min, 2. T = 94°C για 30 sec, 3. T = 57°C για 30 sec, 4. T = 72°C για 2 min, 5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 29 φορές, 6. T = 72°C για 5 min, 7. Παραμονή στους 4°C.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

2.A.1.5 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έγινε με τη χρήση του Gel extraction kit ,Cat. No 28706 –QIAGEN, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

2.A.1.6 Αντίδραση σύνδεσης οχήματος κλωνοποίησης και ενθέματος που καταλύεται από το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4

Σκοπός του σταδίου αυτού ήταν η εισαγωγή των τμημάτων DNA, που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν στην προηγούμενη φάση σε ένα κατάλληλο όχημα κλωνοποίησης (PGEM-Teasy vector-PROMEGA). Η σύνδεση του οχήματος κλωνοποίησης με τις επιθυμητές αλληλουχίες (inserts) πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T₄. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση της μοριακής αναλογίας φορέα-ενθέματος (insert-vector) στο διάλυμα της αντίδρασης. Μια αναλογία που δίνει καλά αποτελέσματα είναι η εξής 3(insert):1(vector). Για τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας (σε ng) insert εφαρμόστηκε η ακόλουθη

εξίσωση :

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

Χρησιμοποιήθηκε το μείγμα (ligation mix) :

Αντίδραση σύνδεσης	Όγκος
DNA (15ngr/μl)	5μl
2X Rapid ligation buffer	7,5μl
PGEM-Teasy vector (50 ng)	1 μl
T4 DNA Ligase (3 weiss u/μl)	1 μl
ddH ₂ O σε Vτελ=15μl	0,5μl

Επώαση των αντιδράσεων για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

2.A.1.7 Μεταφορά του πλασμιδίου που περιέχει την ένθετη αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα Escherichia coli (μετασχηματισμός- transformation)

- Για κάθε μετασχηματισμό χρειάστηκαν 50μl δεκτικά κύτταρα DH5a (home made), τα οποία αφέθηκαν να ξεπαγώσουν από τους -80 °C .
- Τα τρυβλία petri που χρησιμοποιήθηκαν, περιείχαν LB agar, αμπικιλίνη (50μg/ml), X-Gal(40μg/ml) και IPTG (0,15M).
- Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C overnight (12-16h) έως ότου έγιναν εμφανής οι αποικίες.

2.A.1.8 Σάρωση με PCR μονών αποικιών για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα (PCR-screening of single colonies)

Οι λευκές αποικίες που αναπτύσσονται στα τρυβλία φέρουν μεν κάποια ενσωματωμένη αλληλουχία στο όχημα κλωνοποίησης, ενδέχεται όμως να μην είναι η επιθυμητή. Με τη διαδικασία της σάρωσης μονών αποικιών με την βοήθεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, μπορούμε να εντοπίσουμε τις αποικίες εκείνες που πιθανόν φέρουν το επιθυμητό γονίδιο, ενισχύοντας την αλληλουχία που έχει ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με PCR και ελέγχοντας το μέγεθος του με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως φαίνεται στην εικόνα 9. Επομένως, για την ανάκτηση της επιθυμητής αλληλουχίας (insert) χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές για το κάθε γονίδιο, όπως έχουν δειχτεί προηγουμένως στον πίνακα 1.

Για την κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν :

10x Buffer A	2,5 μl
25 mM dNTPs	0,5 μl
5 mM CYPE10 F	1,0 μl
5 mM CYPE10 R	1,0 μl
5 u/μl Kapa Taq	0,5 μl
H ₂ O (μέχρι τα 25 μl)	19,5μl

Το μείγμα μοιράστηκε σε PCR tubes. Με καθαρό ακρορύγχιο πιπέτας (tip) επιλέχθηκε η μισή αποικία από το τρυβλίο και τοποθετήθηκε μέσα στο PCR tube, που περιείχε τα 20μl της αντίδρασης. Η αντίδραση διεξήχθη σε 20 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα: 1. T = 95°C για 2 min, 2. T = 96°C για 30 sec, 3. T = 55°C για 30 sec, 4. T = 72°C για 2min, 5. Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 19 φορές, 6. T = 72°C για 5min, 7. Παραμονή στους 4°C.

Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1 % w/v). Οι θετικές αποικίες, δηλαδή οι αποικίες που έφεραν το γονίδιο – ένθεμα μεταφέρθηκαν με καθαρό ακρορύγχιο πιπέτας σε falcon tubes που περιείχαν 5 ml LB και αμπικιλίνη (50 μg/ml) και καλλιεργήθηκαν overnight στους 37°C στα 225-250 rpm (στροφές ανά λεπτό).

2.A.1.9 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έγινε με τη χρήση του Qiaprep Spin, Miniprep kit, Cat. No 27106- QIAGEN, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

Σύμφωνα με την στρατηγική που ακολουθήθηκε για τις ανθρώπινες P450s (Pritchard, 1997) για την λειτουργική έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα E.coli, χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pCWompA. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει μια ompA αλληλουχία σηματοδότησης, απαραίτητη για την στόχευση των P450s στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη και συνεπώς στο σχηματισμό ενός λειτουργικού συμπλόκου μονοοξυγενάσης. Επομένως ακολουθεί πέψη του πλασμιδιακού DNA (PGEM-Teasy vector + insert) και πέψη του φορέα pCWompA, με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού NgoMIV και SacI.

2.A.1.10 Πέψη του πλασμιδιακού DNA (PGEM-Teasy vector + insert) και πέψη του φορέα pCWompA, με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού NgoMIV και SacI.

Έχουμε τις ακόλουθες αντιδράσεις (ενδεικτικά για το γονίδιο *cyp392e10*)

	Πλασμίδιο(PGEM-Teasy vector + <i>cyp392e10</i>)	Φορέας pCWompA
DNA (262,6ngr/μl)	(262,6ngr/μl)12 μl	(47ngr/μl) 20 μl
10X NEB 4 Buffer	3,0 μl	3,0 μl
10X BSA	0,5 μl	0,5 μl
Enzyme NgoMIV	2,0 μl	2,0 μl
Enzyme SacI	1,0 μl	1,0 μl
ddH2O σε Vτελ=30μl	11,5	3,5 μl

Επώαση των αντιδράσεων για 3 ώρες στους 37°C.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Οι επιθυμητού μοριακού βάρους μπάντες DNA, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν από το πήκτωμα της αγαρόζης, με το κατάλληλο εμπορικό kit.

2.A.1.11 Αντίδραση σύνδεσης του φορέα pCWompA και ενός από τα υπό μελέτη γονίδια, που καταλύεται από το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 (ενδεικτικά για το γονίδιο *cyp392e10*)

Σκοπός του σταδίου αυτού ήταν η εισαγωγή του τμήματος DNA, που κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, απομονώθηκε και καθαρίστηκε στην προηγούμενη φάση στον κατάλληλο φορέα pCWompA, έτσι ώστε να μπορέσουμε σε ακόλουθα πειράματα να εκφράσουμε λειτουργικά την P450 που μας ενδιαφέρει. Η σύνδεση του οχήματος κλωνοποίησης με τις επιθυμητή αλληλουχία (insert) πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Η αντίδραση ελέγχου πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί εάν ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να δώσει αποικίες απουσία του γονιδίου-ενθέματος. Αν δώσει αποικίες, αυτό σημαίνει ότι οι αποικίες από τη αντίδραση σύνδεσης δεν είναι όλες ανσυνδυασμένες και γι αυτό το λόγο γίνεται περαιτέρω έλεγχος των αποικιών με PCR.

Για τον υπολογισμό της κατάλληλης ποσότητας (σε ng) insert εφαρμόστηκε η

$$\text{ngr insert} = \frac{50\text{ngr vector} \times 1,5 \text{ kb insert}}{5.0} \times \frac{3}{1}$$

ακόλουθη εξίσωση :

Χρησιμοποιήθηκε το μείγμα (ligation mix) :

	Αντίδραση σύνδεσης
DNA (27,6ngr/μl)	3,5μl
pCWompA vector(50ng)	2μl
10XRapid ligation buffer	1,0 μl
T4 DNALigase (3 u/μl)	1,0 μl
ddH2O	2,5 μl
Τελικός όγκος	10,0μl

- Επάωση των αντιδράσεων για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου .
- Μεταφορά του πλασμιδίου που περιέχει την ένθετη αλληλουχία του επιθυμητού γονιδίου σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* (μετασηματισμός).
- Σάρωση με PCR μονών αποικιών για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για επαλήθευση ότι οι θετικές αποικίες που πήρα από το βήμα της σάρωσης, περιέχουν όντως το γονίδιο ένθεμα προχωράμε στα εξής :

- Επιλογή 2 με 3 από τις θετικές αποικίες που μας έδωσε το προηγούμενο βήμα της σάρωσης
- Μικρή καλλιέργεια των 5ml LB + ampicillin (50μgr/ml)
- Απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με το κατάλληλο εμπορικό κιτ.
- Για τον έλεγχο των αποικιών πραγματοποιούμε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, σύμφωνα με τη στρατηγική κλωνοποίησης .

Για την κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν :

DNA (125ngr/μl)	16μl
10X NEB 4 Buffer	3μl
10X BSA	0,5μl
Enzyme NgoMIV	2μl
Enzyme SacI	1μl
ddH ₂ O	7,5 μl
Τελικός όγκος	30 μl

Επάση των αντιδράσεων για 3 ώρες στους 37°C.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

2.A.2. Προετοιμασία μεμβρανών E.coli και λειτουργική έκφραση των πρωτεϊνών CYP392E10 και CYP392E7.

2.A.2.1 Καλλιέργειες για έκφραση των P450

2.A.2.1.1 Συν-μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων JM109

Για τη λειτουργική έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli JM109* συν-μετασηματίζονται από το πλασμίδιο pCW_TuCYP392E10(ή pCW_TuCYP392E7) και το πλασμίδιο pACYC- AgCPR, το οποίο περιέχει μια P450-reductase από τον οργανισμό *Anopheles gambiae* και μια pIB αλληλουχία σηματοδότησης στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη.

Συγκεκριμένα, για το μετασηματισμό 100μl βακτηριακών κυττάρων JM109 εισήχθη 1μl από το πλασμίδιο pCW_TuCYP392E10 με συγκέντρωση 146 ngr/μl και 2μl από το πλασμίδιο pACYC- AgCPR με συγκέντρωση 57,6 ngr/μl. Μετά το μετασηματισμό, τα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλία petri, τα οποία περιέχουν LB agar , αμικικιλίνη (50μg/ml) και χλωραφαινικόλη (34μg/ml). Το πλασμίδιο pCW_TuCYP392E10 έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη και το πλασμίδιο pACYC- AgCPR έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραφαινικόλη, γι αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε αυτά τα δυο αντιβιοτικά. Τα τρυβλία petri παρέμειναν στους 37°C για 12- 16 ώρες.

2.A.2.1.2 Μικρή καλλιέργεια

Μια από τις αποικίες που μεγάλωσαν στα τρυβλία petri με καθαρό ακρορύγχιο πιπέτας μεταφέρθηκε σε falcon tube που περιείχε 5 ml Terrific broth, αμικικιλίνη (50 μg/ml) και χλωραφαινικόλη (34 μg/ml) και καλλιεργήθηκε overnight στους 37°C στα 225-250 rpm (στροφές ανά λεπτό).

2.A.2.1.3 Μεγάλη καλλιέργεια

- Χρησιμοποιήθηκαν 2 ml από τη μικρή καλλιέργεια , που είχε μεγαλώσει όλη νύχτα στους 37°C, για την επιμόλυνση 200ml θρεπτικού υλικού Terrific broth σε φλάσκα του 1L, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών αμικικιλίνης (50 μg/ml) και χλωραφαινικόλης(34 μg/ml). Το θρεπτικό υλικό πρέπει να έχει προ-θερμανθεί στους 37°C, προς αποφυγή ενδεχόμενου σοκ των κυττάρων.

- Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C στα 150-200 rpm (στροφές ανά λεπτό), έως ότου η οπτική απορρόφηση των κυττάρων σε μήκος κύματος 595nm φτάσει περίπου 0,7 (~ 4 ώρες)
- Στη συνέχεια η καλλιέργεια επώαστηκε για περίπου μισή ώρα στους 25°C στις 200 rpm.
- Μετά από μισή ώρα στους 25°C (όπου έχει μειωθεί σχετικά η θερμοκρασία της καλλιέργειας μας), γίνεται επαγωγή της καλλιέργειας με τη χορήγηση IPTG και ALA σε τελική συγκέντρωση 1mM και 0.5mM αντίστοιχα. Το IPTG λειτουργεί ως επαγωγέας της μεταγραφής του γονιδίου- στόχου και το ALA είναι πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση της αίμης, όπου περικλείεται στο μόριο της P450. Η καλλιέργεια παρέμεινε στους 25°C με συνεχή ανάδευση στις 200 rpm για 24 ώρες.

2.A.2.2 Προετοιμασία σφαιροπλαστών και μεμβρανών

- Τα κύτταρα της καλλιέργειας, που είχε αφεθεί να επώάζεται για 24ώρες στους 25°C συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C.
- Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε κρύο διάλυμα TSE (0,1M Tris-acetate pH 7,6, 0,5M sucrose και 0,5mM EDTA) και ακολουθεί η προσθήκη λυσοζύμης σε τελική συγκέντρωση 0,25mg/ml., ώστε να σπάσει το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα. Τα κύτταρα αφέθηκαν προς ελαφρά ανάδευση για 60' στους 4°C, προκειμένου να σχηματιστούν οι σφαιροπλάστες.
- Οι σφαιροπλάστες φυγοκεντρήθηκαν στα 2800 x g για 25' στους 4°C. Το ίζημα των σφαιροπλαστών αναδιαλύεται σε διάλυμα SR (0,1M potassium phosphate, pH 7,6, 6mM CH₃COOMg και 20% γλυκερόλη) παρουσία DTT (0,1mM), PMSF (1mM), aprotinin (10μgr/ml) και leupeptin (10μgr/ml).
- Ακολουθεί ρήξη των κυττάρων με ηχοβολισμό (4×30", συνολικά 2 λεπτά, 4°C), Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση (30.000g/20 λεπτά/ 4°C). Ακολουθεί επαναφυγοκέντρηση του υπερκειμένου στις 70.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα, το οποίο αποτελεί τις μεμβράνες αναδιαλύεται σε κρύο διάλυμα 1x TSE και καταψύχεται στους - 80°C.

2.A.2.3 Έλεγχος των μεμβρανών για την παρουσία πρωτεΐνης P450 με τη διαφορά του φάσματος CO.

Τα ανηγμένα ένζυμα P450 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με το μονοξείδιο του άνθρακα, παράγοντας έτσι μια μοναδική κορυφή απορρόφησης στα 450 nm. Αυτή η φασματική ιδιότητα χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή εκτίμηση του περιεχομένου σε P450 (*Omura and Sato, 1964*). Τυπικά το σύμπλοκο ανηγμένου ενζύμου P450-CO εμφανίζει ένα φάσμα απορρόφησης διαφορετικό από αυτό που εμφανίζει το ανηγμένο ένζυμο P450 χωρίς το CO.

Επομένως, στις μεμβράνες που παρείχθησαν η εκτίμηση του περιεχομένου σε P450 έγινε με βάση την χαρακτηριστική φασματική ιδιότητα των ενζύμων P450 ακλουθώντας τα εξής βήματα :

- Για την αναγωγή του αιμικού σιδήρου της P450 (ο Fe^{+3} που βρίσκεται στο εσωτερικό της αίμης ανάγεται Fe^{+2}) χρησιμοποιήσαμε τον αναγωγικό παράγοντα sodium hydrosulfate. Σε μια πλαστική κυβέτα εισάγεται 1ml από το spectrum διάλυμα (100mM Tris-HCl pH =7,4, 20% γλυκερόλη και 1mM EDTA), λίγη σκόνη (στη μύτη του κουταλιού) από το sodium hydrosulfate και τουλάχιστον 25μl από το δείγμα των μεμβρανών.
- Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται στο spectrum 400-500nm και μηδενίζουμε με την κυβέτα (blank)
- Στη συνέχεια, φυσαλίδες CO διοχετεύονται στην κυβέτα για περίπου 45 sec και πραγματοποιείται η μέτρηση του φάσματος απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο.
- Εάν κατόπιν παρατήρησης του φάσματος, παρουσιαστεί μια χαρακτηριστική κορυφή στα 450nm , τότε αυτό αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι το δείγμα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε περιέχει σωστά αναδιπλωμένη P450 πρωτεΐνη.

2.A.2.4 Η δραστηριότητα της πρωτεΐνης CPR εκτιμήθηκε από μετρήσεις της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος C στα 550nm.

Η πρωτεΐνη CPR είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με διάφορες P450 και χρησιμεύει ως δότης ηλεκτρονίων. Γι αυτό το λόγο στην προσπάθεια έκφρασης

των P450 πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν εισάγαμε και το πλασμίδιο της CPR, για να είναι εφικτή η ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ των δυο πρωτεϊνών. Στις μεμβράνες που παρείχθησαν η εκτίμηση του περιεχομένου σε CPR έγινε από τις μετρήσεις της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος C στα 550nm, ως εξής :

Προετοιμάζονται φρέσκα διαλύματα από :1) 50μM (6,6mg/10ml) cytochrome c in 0,3M potassium phosphate pH= 7,7, 2) 5mM NADPH σε νερό (4,4mg/ml), (διατηρούνται στο πάγο).

- 1 ml από το διάλυμα 1 αναμιγνύεται με 10μl δείγματος μεμβρανών σε πλαστική μικροκυβέτα.
- Μετράτε η κινητική απορρόφησης στα 550nm για περίπου 1 λεπτό και μηδενίζουμε (blank)
- Στη συνέχεια 10μl από το διάλυμα 2 αναμιγνύονται με το περιεχόμενο της κυβέτας, γίνεται ανάδευση με γρήγορες κινήσεις και μετράται η κινητική απορρόφησης στα 550nm για περίπου 1 λεπτό
- Η δραστηριότητα της CPR μετράται χρησιμοποιώντας τον αρχικό ρυθμό αλλαγής πάνω από το σημείο που το διάγραμμα είναι γραμμικό.

2.A.2.5 Μετρήσεις για τη δραστηριότητα των P450 πρωτεϊνών με τη χρήση του υποστρώματος 7-ethoxycoumarin.

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, τα ένζυμα P450 καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων κι επομένως ως υπόστρωμα έχουν μια ποικιλία από μικρά και μεγάλα μόρια. Για να ελεγχθεί λοιπόν κατά πόσο οι μεμβράνες που παρείχθησαν περιέχουν ένα δραστικό ένζυμο P450, ικανό να καταλύει μια ενζυμική αντίδραση χρησιμοποιούμε ως υπόστρωμα το 7-ethoxycoumarin. Το ένζυμο P450 των μεμβρανών που παρείχθησαν με την παροχή ενέργειας (από την προσθήκη NADPH) είναι καταλυτικά ενεργό εφόσον διασπάει το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin και παράγει το φθορίζον προϊόν 7-hydroxy-coumarin, ο φθορισμός του οποίου μετράται με διέγερση στα 390nm κι εκπομπή στα 465nm. Οι αντιδράσεις ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιηθήκαν σε 96- well plates, ως εξής:

- Βακτηριακές μεμβράνες που περιέχουν CYP392E10/CPR (με ή χωρίς b₅) επώαστηκαν με φθορίζον υπόστρωμα σε 25mM Phosphate buffer, pH 7,6, σε τελικό όγκο αντίδρασης 120μl.
- Ακολούθως, προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin (7-EC) με τελική συγκέντρωση 0,83mM και το μείγμα προθερμαίνεται για 5΄ στους 30⁰C, προτού γίνει η έναρξη των αντιδράσεων με την προσθήκη NADPH τελικής συγκέντρωσης 1,25mM σε κάθε δείγμα.
- Ταυτόχρονα πραγματοποιούνται και οι αντιδράσεις ελέγχου, όπου στο δείγμα δεν έχει προστεθεί NADPH. Τα δείγματα επωάζονται για 30΄ στο σκοτάδι.
- Έπειτα ο φθορισμός του NADPH σταματάει με τη προσθήκη οξειδωμένης γλουταθειόνης σε τελική συγκέντρωση 2,5mM) και του ενζύμου glutathione reductase (0,125 units).
- Μετά από 10 λεπτά επώασης σε RT, η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος γλυκίνης-αιθανόλης σε αναλογία (1:1) και ο φθορισμός μετράται με διέγερση στα 390nm κι εκπομπή στα 465nm.

2.A.2.6 Πειραματικές δοκιμές μεταβολισμού με το ακαρεοκτόνο spirodiclofen.

- Επώαστηκε το υπόστρωμα spirodiclofen 98,6% (Bayer Crop science, technical) με την πρωτεΐνη b₅, με βακτηριακές μεμβράνες, που περιείχαν την πρωτεΐνη CYP392E10(είτε την πρωτεΐνη CYP392E7) και CPR δραστηριότητα σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris -HCl (0,2M, pH 7,4) παρουσία 0,25mM MgCl₂.
- Η επώαση έγινε με την παρουσία ή απουσία του αναγεννητικού συστήματος NADPH: 1mM glucose-6-phosphate, 0.1mM NADP⁺, 1unit/ml G6PDH. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 30⁰C με ανακίνηση στις 1200 rpm. Τα δείγματα προ-θερμάνθηκαν για 5 λεπτά, προτού στις αντιδράσεις προστεθούν τα μεμβρανικά δείγματα.
- Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, με την προσθήκη ακετονιτριλίου σε αναλογία 1:1. Το δείγμα επώαστηκε για 30 επιπλέον λεπτά υπό ανακίνηση, για να πραγματοποιηθεί η πλήρης διάλυση του ακαρεοκτόνου στον οργανικό διαλύτη.

- Στην συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000g για 10 λεπτά, το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε και μεταφέρθηκε στα γυάλινα φιαλίδια του HPLC.
- Στην ανάλυση με το HPLC εγχύθηκαν 100μl του υπερκειμένου με ρυθμό ροής $0,5\text{ml min}^{-1}$ στους 30°C . Οι αντιδράσεις στις διάφορες χρονικές στιγμές έτρεξαν με τη χρήση ισοκρατικής κινητής φάσης με 90% μεθανόλη σε νερό. Οι συγκεντρώσεις του spirodiclofen ανιχνεύτηκαν από το HPLC όπως περιγράφηκε παραπάνω.

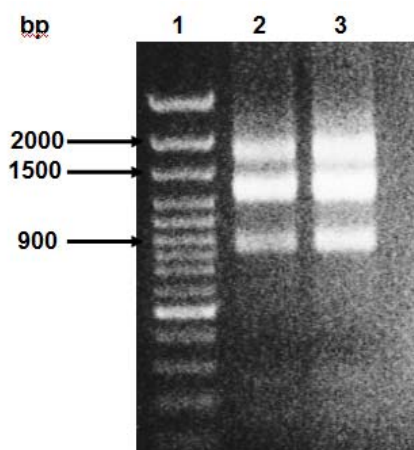
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Διερεύνηση του πιθανού ρόλου των γονιδίων που υπερεκφράζονται σε ανθεκτικά στελέχη τετρανύχου (*cyp392e10*, *cyp392e7*, *cyp392d2*, *cyp392d8* και *cyp392d10*) στην ανθεκτικότητα του τετρανύχου στα ακαρεοκτόνα.

2.B ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

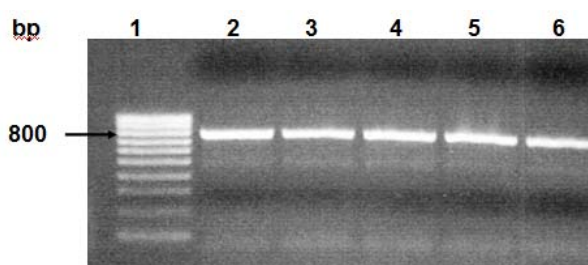
2.B.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων *Cyp392e10*, *Cyp392e7*, *Cyp392d2*, *Cyp392d8* και *Cyp392d10* σε φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης

2.B.1.1 Απομόνωση ολικού RNA και σύνθεση μονόκλωνου cDNA

Ο έλεγχος των προϊόντων από τις αντιδράσεις της απομόνωσης ολικού RNA και της σύνθεσης του μονόκλωνου cDNA, όπου έγινε PCR- check με τους εκκινητές της ακτίνης, έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπως φαίνονται στις εικόνες 8 και 9 αντίστοιχα.



Εικόνα 8. Ηλεκτοφόρημα από την απομόνωση του RNA. Lane 1: DNA Ladder GeneRuler Plus (Fermentas), Lane 2-3: Προϊόν από την απομόνωση του RNA

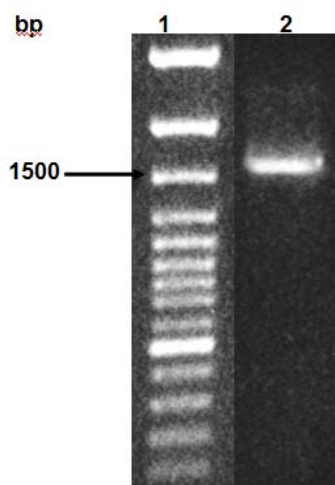


Εικόνα 9. Ηλεκτοφόρημα από PCR- check για να δούμε εάν το cDNA που πήραμε είναι στο επιθυμητό μέγεθος. Lane 1: DNA Ladder HyperLadder IV 1000bp (Biolabs), Lane 2-6: Προϊόν από PCR- check

Από την εικόνα 8, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το προϊόν από την απομόνωση του RNA που φαίνεται στο lane 2 και 3 έχει το αναμενόμενο μέγεθος κι επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για τη σύνθεση μονόκλωνου cDNA. Από την εικόνα 9 συμπεραίνεται ότι το προϊόν της PCR-check που φαίνεται στο lane 2 έως 6 έχει το αναμενόμενο μέγεθος των 800bp κι επομένως αποτελεί καλό δείγμα cDNA, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την απομόνωση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

2.B.1.2 PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για την ανάκτηση των υπό μελέτη γονιδίων.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για την ανάκτηση των γονιδίων στόχων, όπως για παράδειγμα το γονίδιο *cyp392e10* ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπως φαίνεται στην εικόνα 10.

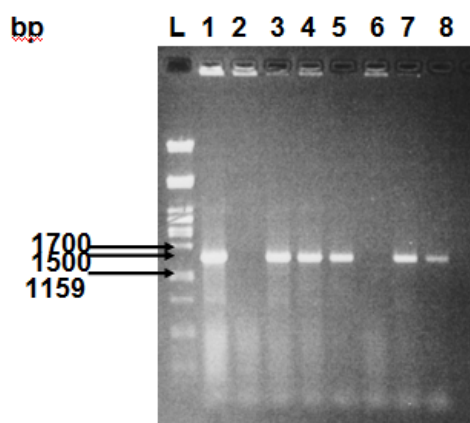


Εικόνα 10. Ενδεικτικό ηλεκτροφόρημα PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο *cyp392e10*. Lane 1: DNA Ladder GeneRuler Plus (Fermentas), Lane 2: Το προϊόν της PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο *cyp392e10*

Από την εικόνα 10 συμπεραίνεται ότι το προϊόν της PCR που φαίνεται στο lane 2 έχει το αναμενόμενο μέγεθος των 1533bp κι επομένως το γονίδιο *cyp392e10* έχει ανακτηθεί με επιτυχία. Ακολουθεί η απομόνωση από το πήκτωμα της αγαρόζης της μπάνας του γενετικού υλικού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen.

2.B.1.3 Σάρωση με PCR μονών αποικιών για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα (από ligation με τον φορέα PGEM-Teasy)

Αφού έχει γίνει η ένωση ενδεικτικά του γονιδίου *cyp392e10* με τον φορέα PGEM-Teasy με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4, το πλασμίδιο εισάγεται σε DH5a δεκτικά βακτηριακά κύτταρα (competent) και με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα αυτά μετασχηματίζονται. Ακολουθεί καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με Xgal/αμπικιλίνη για περίπου 16 ώρες, η λήψη λευκών αποικιών και η σάρωση τους, ώστε να εντοπιστούν οι αποικίες εκείνες που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα. Η σάρωση των μονών αποικιών γίνεται με PCR ενισχύοντας την αλληλουχία που έχει ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με τη χρήση ειδικών εκκινητών του γονιδίου-στόχου, για παράδειγμα των εκκινητών CYP392E10_F και CYP392E10_R (όπως φαίνεται η αλληλουχία τους στο κεφάλαιο 2A, πίνακας 1) για το γονίδιο *cyp392e10*. Τα προϊόντα της PCR μετά από τη σάρωση 8 λευκών αποικιών ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1 % w/v), όπως φαίνονται στην εικόνα 11.



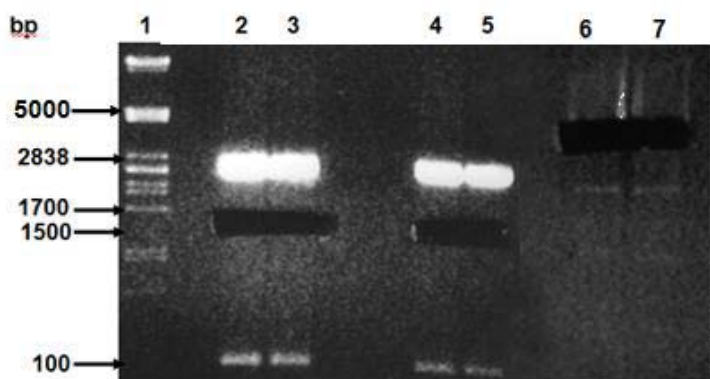
Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση μετά από τη σάρωση με PCR 8 λευκών αποικιών. Lane L: DNA Ladder PstI (Minotech), Lane 1-8: Προϊόν της PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο *cyp392e10*

Από την εικόνα 11 συμπεραίνεται ότι η μπάντα που φαίνεται στο lane 1, 3, 4, 5, 7, 8 είναι στο μέγεθος των 1500bp, όπου το μέγεθος των 1500bp είναι το αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου *cyp392e10*. Επομένως οι αποικίες αυτές θεωρείται ότι είναι θετικές, δηλαδή περιέχουν μέσα στο φορέα κλωνοποίησης PGem-Teasy το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα *cyp392e10*. Σε αντίθεση στο lane 2 και 6 δεν παρατηρείται καμία

μπάντα γενετικού υλικού κι επομένως οι αποικίες αυτές θεωρείται ότι είναι αρνητικές, δηλαδή δεν έχουν πάρει το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *cyp392e10*.

2.B.1.4 Πέψη του πλασμιδιακού DNA (PGEM-Teasy vector + insert) και του φορέα pCWompra, με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI.

Για την εισαγωγή του γονιδίου-στόχου στον φορέα κλωνοποίησης PCW_ompra είναι απαραίτητη η πέψη του πλασμιδιακού DNA (PGem-Teasy vector + *cyp392e10*) που φέρει και του φορέα pCWompra με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, όπως φαίνεται στην εικόνα 12. Τα προϊόντα από τις πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % w/v).

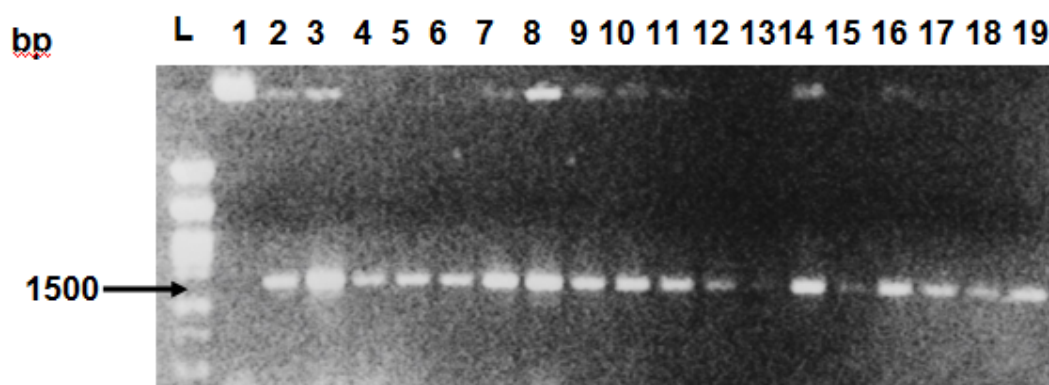


Εικόνα 12. Ενδεικτικό ηλεκτοφόρημα πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο *cyp392e10* και του φορέα pCWompra μετά από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI. Lane 1: DNA Ladder PstI (Minotech), Lane 2, 3: Προϊόν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI του πλασμιδιακού DNA της θετικής αποικίας 4. Lane 4, 5: Προϊόν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI του πλασμιδιακού DNA της θετικής αποικίας 5. Lane 6, 7: Προϊόν πέψης του φορέα pCWompra με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI

Από την εικόνα 12 οι κομμένες μπάντες του γενετικού υλικού στο lane 2, 3 και στο lane 4, 5 στα 1500 bp αποτελούν το γονίδιο-στόχο, το οποίο έχει ήδη απομονωθεί από το πήκτωμα της αγαρόζης, ώστε να καθαριστεί σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen. Στο lane 6 και 7 η κομμένη μπάντα αντιστοιχεί στο φορέα κλωνοποίησης pCWompra, όπου έχει ήδη απομονωθεί από το πήκτωμα της αγαρόζης, ώστε να καθαριστεί σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen. Μετά την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού ο φορέας κλωνοποίησης pCWompra έχει γίνει γραμμικός (linear vector) και είναι στο αναμενόμενο μέγεθος των 5000 bp.

2.B.1.5 Σάρωση με PCR μονών αποικιών για τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα (από ligation με τον φορέα pCWompra).

Αφού έχει γίνει η ένωση ενδεικτικά του γονιδίου *cyp392e10* με τον φορέα pCWompra με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4, το πλασμίδιο εισάγεται σε DH5a δεκτικά βακτηριακά κύτταρα (competent) και με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα αυτά μετασχηματίζονται. Ακολουθεί καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο LB με αμπικιλίνη για περίπου 16 ώρες, η λήψη αποικιών και η σάρωση τους, ώστε να εντοπιστούν οι αποικίες εκείνες που φέρουν το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα. Η σάρωση των μονών αποικιών γίνεται με PCR ενισχύοντας την αλληλουχία που έχει ενσωματωθεί στο πλασμίδιο με τη χρήση ειδικών εκκινητών του γονιδίου-στόχου, για παράδειγμα των εκκινητών CYP392E10_F και CYP392E10_R (όπως φαίνεται η αλληλουχία τους στο κεφάλαιο 2A, πίνακας 1) για το γονίδιο *cyp392e10*. Τα προϊόντα της PCR μετά από τη σάρωση 19 αποικιών ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1 % w/v), όπως φαίνονται στην εικόνα 13.



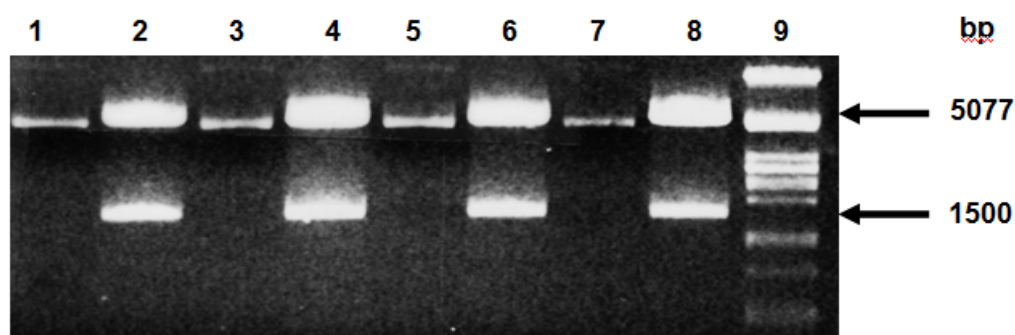
Εικόνα 13. Ενδεικτικό ηλεκτροφόρημα μετά από τη σάρωση με PCR 19 αποικιών για να δούμε εάν έχουν πάρει ή όχι το γονίδιο *cyp392e10*. Lane L: DNA Ladder PstI (Minotech), Lane 1-19: Προϊόν της PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών για το γονίδιο *cyp392e10*.

Από την εικόνα 13 συμπεραίνεται ότι η μπάντα που φαίνεται στο lane 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19 είναι στο μέγεθος των 1500bp, όπου το μέγεθος των 1500bp είναι το αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου *cyp392e10*. Επομένως οι αποικίες αυτές θεωρείται ότι είναι θετικές, δηλαδή περιέχουν μέσα στο φορέα κλωνοποίησης pCWompra το επιθυμητό γονίδιο-ένθεμα *cyp392e10*. Σε αντίθεση στο lane 1, 13 και 15

δεν παρατηρείται καμία μπάνα γενετικού υλικού κι επομένως οι αποικίες αυτές θεωρείται ότι είναι αρνητικές, δηλαδή δεν έχουν πάρει το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο *cyp392e10*.

2.B.1.6 Επαλήθευση με πέψη των θετικών αποικιών του βήματος 2.B.1.5 με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, με τα οποία πραγματοποιήθηκε όλη η στρατηγική κλωνοποίησης

Προτού τα πλασμίδια των θετικών αποικιών του βήματος 2.B.1.5 σταλούν για sequencing, 4 από τις θετικές αποικίες επαληθεύονται ότι είναι όντως θετικές, δηλαδή περιέχουν το επιθυμητό γονίδιο, για παράδειγμα το γονίδιο *cyp392e10* με πέψη του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA τους με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, όπως φαίνεται στην εικόνα 14.



Εικόνα 14. Ενδεικτικό ηλεκτοφόρημα πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο *cyp392e10*, μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI. Lane 1: Άκοπο πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 1, Lane 2: Πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 1 μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, Lane 3: Άκοπο πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 2, Lane 4: Πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 2 μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, Lane 5: Άκοπο πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 3, Lane 6: Πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 3 μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, Lane 7: Άκοπο πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 4, Lane 8: Πλασμιδιακό DNA της θετικής αποικίας 4 μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI, Lane 9: DNA Ladder (Minotech)

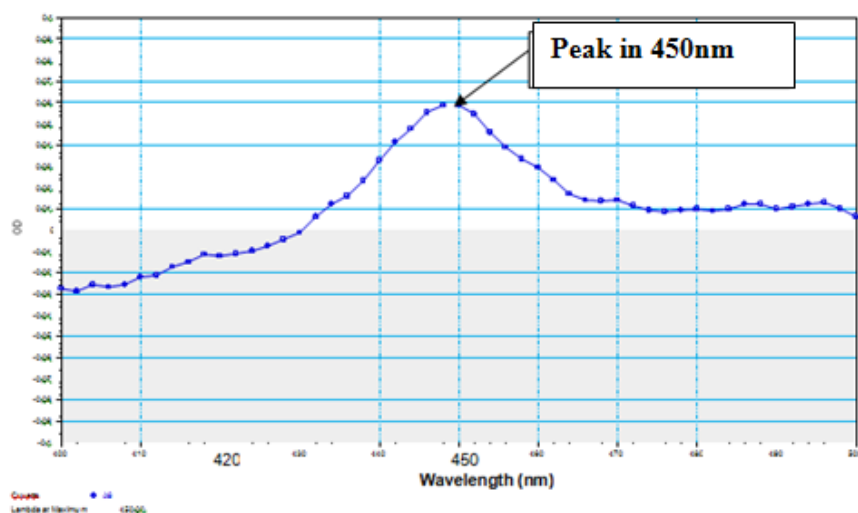
Από την εικόνα 14 στο lane 2, 4, 6, 8 όπου έχει γίνει πέψη με τα ένζυμα περιορισμού NgoMIV και SacI φαίνεται το αναμενόμενο μέγεθος του φορέα PCWompra στα 5000bp και του γονιδίου *cyp392e10* στα 1500bp. Αντίθετα, στο lane 1, 3, 5, 7 που υπάρχει άκοπο πλασμιδιακό DNA των θετικών αποικιών 1, 2, 3, 4

αντίστοιχα, παρατηρείται μόνο η μπάντα του φορέα κλωνοποίησης PCWompra (linear vector) στο αναμενόμενο μέγεθος των 5000bp .

2.B.2. Προετοιμασία μεμβρανών E.coli και λειτουργική έκφραση των πρωτεϊνών CYP392E10 και CYP392E7.

2.B.2.1 Έλεγχος των μεμβρανών για την παρουσία πρωτεΐνης P450 με τη διαφορά του φάσματος CO

Ο έλεγχος που έγινε στις βακτηριακές μεμβράνες των πρωτεϊνών CYP392E10 και CYP392E7 που απομονώθηκαν, έδειξε σύμφωνα με τη διαφορά του φάσματος CO που παρατηρήθηκε, ότι οι πρωτεΐνες CYP392E10 και CYP392E7 εκφράζονται επικρατέστερα σε μορφή P450. Η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450 nm φαίνεται στην εικόνα 15 για την πρωτεΐνη CYP392E10. Στις βακτηριακές μεμβράνες που απομονώθηκαν για την πρωτεΐνη CYP392E10 μετρήθηκε η συγκέντρωση της P450 και βρέθηκε 8,5μM και στις βακτηριακές μεμβράνες για την πρωτεΐνη CYP392E7 η συγκέντρωση της P450 βρέθηκε 2,24 μM.



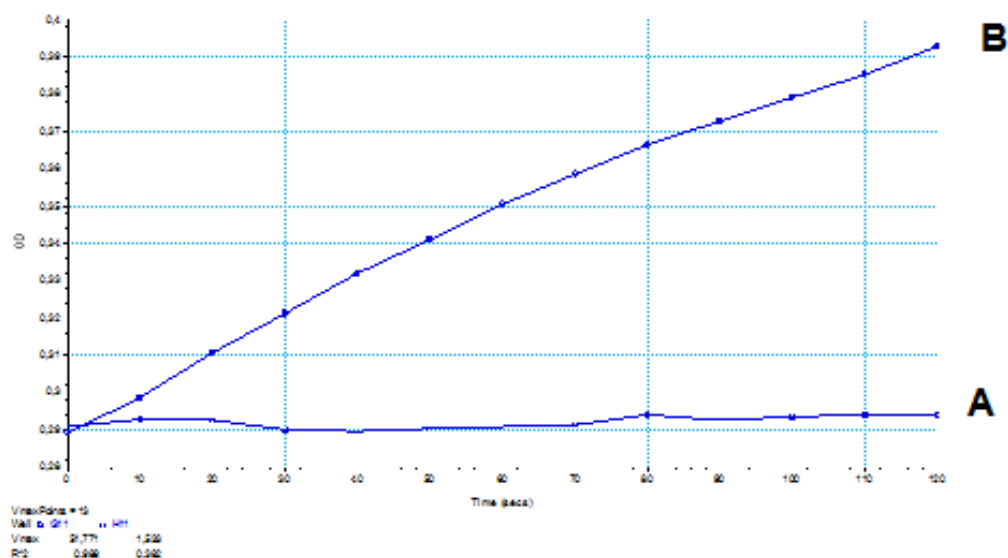
Εικόνα 15. Η CO-διαφορά φάσματος από E.coli μεμβράνες που εκφράζουν την πρωτεΐνη CYP392E10. Η επικρατέστερη έκφραση της CYP392E10 ως P450, με σχετικά χαμηλά επίπεδα σε P420 είναι ενδεικτικά ενός σταθερού και καλής ποιότητας λειτουργικού ενζύμου

2.B.2.2 Η δραστηριότητα της πρωτεΐνης CPR εκτιμήθηκε από μετρήσεις της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος C στα 550nm.

Για να ελεγχθεί στις μεμβράνες που παρείχθησαν εάν το ένζυμο CPR είναι καταλυτικά ενεργό, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το κυτόχρωμα C και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με την παροχή ενέργειας από την προσθήκη NADPH. Τα αποτελέσματα από τη φωτομέτρηση των δειγμάτων μας σε μήκος κύματος 550nm όπως φαίνονται στην εικόνα 16, έδειξαν την ύπαρξη της CPR μέσα στο μεμβρανικό παρασκεύασμα με καταλυτική ενεργότητα για την CYP392E10 92,9μmol κυτοχρώματος C / λεπτό / mg πρωτεΐνης. Η καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Καταλυτική ενεργότητα} = \frac{V_{\max} \text{ munits/min}}{21,4} \div \text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml)}$$

όπου : 21,4= σταθερά που σχετίζεται με τη διάμετρο της κβέτας



Εικόνα 16. Διάγραμμα κινητικής στα 550nm της CPR. A : Μεμβρανικό δείγμα χωρίς NADPH, B : Μεμβρανικό δείγμα παρουσία NADPH

2.B.2.3 Μετρήσεις για τη δραστηριότητα των P450 πρωτεϊνών με τη χρήση του υποστρώματος 7-ethoxycoumarin.

Με σκοπό να ελεγχθεί εάν τα μεμβρανικά δείγματα των πρωτεϊνών CYP392E10 και CYP392E7 περιέχουν ένζυμο P450 που να είναι καταλυτικά ενεργό, πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αντίδραση με παροχή ενέργειας από την προσθήκη NADPH και ως υπόστρωμα το 7-ethoxycoumarin . Από τη φωτομέτρηση των δειγμάτων μας σε μήκος κύματος 390- 465nm συμπεραίνεται ότι, το ένζυμο P450 των μεμβρανών που παρείχθησαν για τις πρωτεΐνες CYP392E10 και CYP392E7 είναι καταλυτικά ενεργό, εφόσον διασπάει το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin και παράγει το φθορίζον προϊόν 7-OHcoumarin (ο φθορισμός του οποίου μετράται με διέγερση στα 390nm κι εκπομπή στα 465nm). Συγκεκριμένα για τις μεμβράνες της πρωτεΐνης CYP392E10, η καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου είναι 216 ± 45 Funit/ mgr.

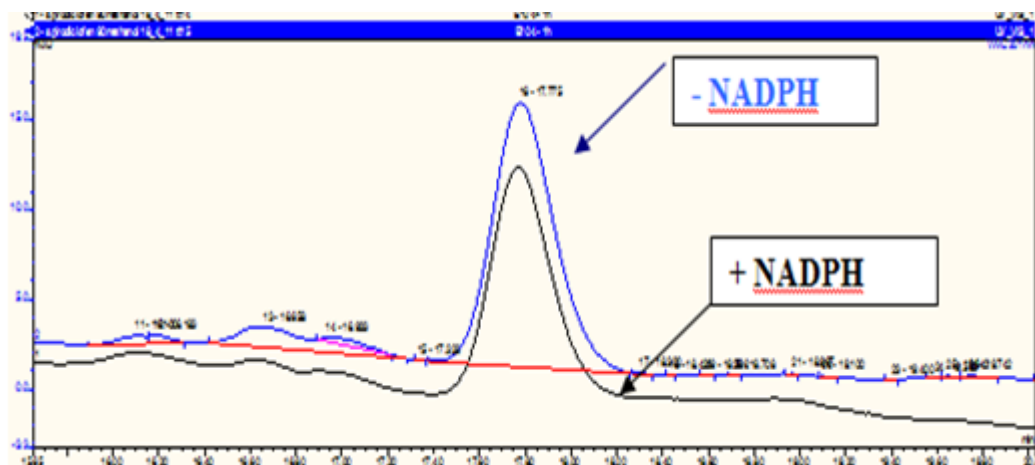
2.B.2.4 Πειραματικές δοκιμές μεταβολισμού με το ακαρεοκτόνο spirodiclofen.

Επώαστηκαν 80μM υποστρώματος spirodiclofen 98, 6 % (Bayer Crop science, technical) με βακτηριακές μεμβράνες, που περιείχαν 1,43μM από CYP392E10 και 7,14μM από b5 σε 182μl Tris -HCl buffer (0,2M, pH 7, 4), παρουσία 0,25mM MgCl₂. Η CPR δραστηριότητα των μεμβρανών ήταν 92,9μmol cytochrome c/λεπτό/mg πρωτεΐνης.

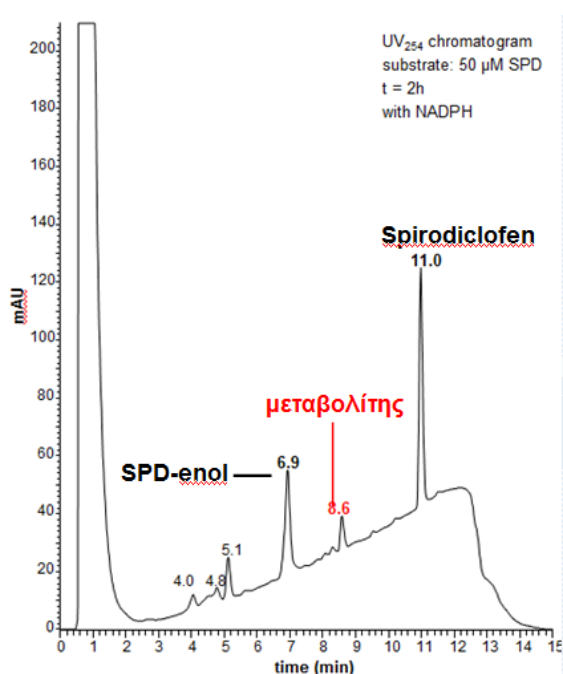
Η NADPH- εξαρτώμενη μείωση του spirodiclofen (εκλούεται στα 17,2 λεπτά), παρατηρήθηκε μετά από την επώαση του μείγματος με το P450 σύμπλοκο, όπως φαίνεται στην εικόνα 17. Η μείωση του spirodiclofen ήταν χρονοεξαρτώμενη και περίπου 2,5% του συνολικού μίγματος μεταβολίστηκε μέσα σε 60 λεπτά, 10% του συνολικού μίγματος μεταβολίστηκε μέσα σε 120 λεπτά και 17.3% του μίγματος μεταβολίστηκε μέσα σε 240 λεπτά. Ωστόσο, παρόλο που παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη μείωση του spirodiclofen όπως φαίνεται στην εικόνα 17, δεν ήταν εφικτή με τη χρήση του HPLC η ανίχνευση του μεταβολίτη, στον οποίο μετατρέπεται το αρχικό μόριο παρουσία της CYP392E10. Περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων με HPLC-APCI-MS πραγματοποιήθηκε στη Bayer (Γερμανία). Τα αποτελέσματα, όπως φαίνονται στην εικόνα 18, αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη CYP392E10 μεταβολίζει το

ακαρεοκτόνο spirodiclofen (όχι το spirodiclofen-enol) σε ένα υδροξυλιωμένο προϊόν. Η υδροξυλίωση πιθανόν συμβαίνει στο σπυροκυκλικό δακτύλιο.

Σε αντίθεση, η επώαση των βακτηριακών μεμβρανών για τη CYP392E7 με συγκέντρωση P450 2,24μΜ με το ακαρεοκτόνο spirodiclofen, έδειξε πως η πρωτεΐνη CYP392E7 δεν το μεταβολίζει.



Εικόνα 17. Χρωματογράφημα από το HPLC που δείχνει την NADPH-εξαρτώμενη μείωση του spirodiclofen (το οποίο εκλύεται στα 17, 2 λεπτά) μετά από 240 λεπτά επώασης στα 201 nm.



Εικόνα 18. Η ανάλυση με HPLC-APCI-MS των μεμβρανικών δειγμάτων της πρωτεΐνης CYP392E10

2.Γ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Κλωνοποιήσαμε πέντε (5) Cytochrome P450s του τετράνυχου (*cyp392e10*, *cyp392e7*, *Cyp392d2*, *Cyp392d8* και *Cyp392d10*), ενός πολύ σημαντικού εχθρού των καλλιεργειών, η έκφραση των οποίων είχε βρεθεί σε προηγούμενες εργασίες μικροσυστοιχιών να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, σε κατάλληλο φορέα έκφρασης P450 πρωτεϊνών (PCW_ompA). Εν συνεχεία, εκφράσαμε με επιτυχία δύο από αυτές, τις CYP392E10 και CYP392E7. Δείξαμε ότι η CYP392E10 είναι ικανή να μεταβολίζει το ακαρεοκτόνο spiroadiclofen

Συγκεκριμένα, πειράματα μεταβολισμού και ανάλυσης με HPLC-APCI-MS έδειξαν ότι, η P450 *T.u*CYP392E10 έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το ακαρεοκτόνο spiroadiclofen σε ένα λιγότερο τοξικό υδροξυλιωμένο προϊόν, κάτι που πιθανότατα εξηγεί την ανθεκτικότητα που παρατηρείται στα ακάρεα στα οποία υπερεκφράζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Αντίθετα, η P450 *T.u*CYP392E7 δεν έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το ακαρεοκτόνο spiroadiclofen.

Το ένζυμο *T.u*CYP392E10 που απομονώθηκε από ανθεκτικά στελέχη *Tetranychus urticae* στο ακαρεοκτόνο spiroadiclofen, είναι το πρώτο ένζυμο από άκαρι γεωπονικού ενδιαφέροντος που βρέθηκε να μεταβολίζει μέλος της νέας ομάδας εντομοκτόνων, των κετοενόλων. Αυτό αποτελεί σημαντικό εύρημα για την αποσαφήνιση του μηχανισμού ανθεκτικότητας στο άκαρι *Tetranychus urticae* σε σχέση με το ακαρεοκτόνο spiroadiclofen.

Η εργασία αυτή μπορεί να βοηθήσει μελλοντικά στην ανάπτυξη εφαρμογών για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στη συγκεκριμένη ομάδα εντομοκτόνων, όπως για παράδειγμα με την ανάπτυξη ενζυμικών παρεμποδιστών ή βελτιωμένων εντομοκτόνων το μόριο των οποίων να μην αποτελεί υπόστρωμα για τα ένζυμα αποτοξικοποίησης.

Η λειτουργική έκφραση των πρωτεϊνών CYP392D2, CYP392D8 και CYP392D10, που υπερεκφράζονται σε ανθεκτικά στελέχη του *T.urticae* σε METI ακαρεοκτόνα θα συνεχισθεί σε επόμενες εργασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – Δομικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης CYP6CM1 του εντόμου *Bemisia tabaci*

3.Α ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.Α.1 Κλωνοποίηση των *His₄.cyp6cm1* και *His₄.cyp6cm1δ(1-28)* γονιδίων

Η κλωνοποίηση των *His₄.cyp6cm1* και *His₄.cyp6cm1δ(1-28)* γονιδίων έγινε από τη Δρ. Β. Μπαλαμπανίδου ως εξής :

His₄.cyp6cm1: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη CYP6CM1 απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από τον πλασμιδιακό φορέα PCW_ompra χρησιμοποιώντας τον 6CM1 F 5' GGG AA TTC CATATG GAA CTG TTG GAC ATT GTT AAG 3' ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nhe* I και τέσσερις ουρές ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο και τον 6CM1 R 5' GTC GAC TCT AGA TCA ATG GTG ATG GTG TGG CGT CGA CGC CCT TC 3' ως οπίσθιο εκκινητή ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Xba*I στο αμινοτελικό άκρο. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 1560 bp κλωνοποιείται στο φορέα pGEM, έπειτα πέπτεται με τα *Nde*I και *Xba*I περιοριστικά ένζυμα και εν συνεχεία εισάγεται στις κατάλληλες θέσεις του φορέα PCW (φορέας έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών).

His₄.cyp6cm1δ (1-28): το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28), δηλαδή την πρωτεΐνη που έχουν παραλειφθεί από το αμινοτελικό της άκρο τα αμινοξέα 1-28, απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από τον πλασμιδιακό φορέα PCW_ompra χρησιμοποιώντας τον 6CM1Δ (1-28) F 5' GGG AA TTC CATATG GCC GTT TAC CGG GAC AAA TTC 3' ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nhe* I και τέσσερις ουρές ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο και τον 6CM1Δ (1-28) R 5' GTC GAC TCT AGA TCA ATG GTG ATG GTG TGG CGT CGA CGC CCT TC 3' ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Xba*I στο αμινοτελικό άκρο και παραλείπει τις μεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης (1-28, η πρόβλεψη των οποίων έγινε μέσω του υπολογιστικού προγράμματος Kyte-Doolittle). Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 1473bp κλωνοποιείται στο φορέα pGEM, έπειτα πέπτεται με τα *Nde*I και *Xba*I περιοριστικά

ένζυμα και εν συνεχεία εισάγεται στις κατάλληλες θέσεις του φορέα PCW (φορέας έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών).

3.A.2 Έκφραση κι απομόνωση των πρωτεϊνών CYP6CM1 και CYP6CM1Δ (1-28).

Για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κυρίως το PCW σύστημα. Ένας PCW φορέας είναι ένα βακτηριακό πλασμίδιο σχεδιασμένο να βοηθά τη γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε πρωτεΐνης, όταν τεθεί σε λειτουργία. Το πλασμίδιο αυτό φέρει κάποια πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά – γονίδιο *lac I* που κωδικοποιεί για το *lac* καταστολέα, T7 υποκινητή που είναι ειδικός μόνο για την T7 RNA πολυμεράση (μη βακτηριακή), *lac* χειριστή που μπορεί να μπλοκάρει τη μεταγραφή, έναν πολυσυνδέτη, fl σινιάλο έναρξης της αντιγραφής, γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη και ColE1 σινιάλο έναρξης της αντιγραφής. Για να αρχίσει η διαδικασία, το υπό μελέτη γονίδιο κλωνοποιείται στον PCW φορέα στην περιοχή του πολυσυνδέτη. Όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα και ο χειριστής δε βρίσκεται σε καταστολή, η μεταγραφή του γονιδίου προχωρά με πολύ γρήγορο ρυθμό. Επειδή ο T7 είναι ιικός υποκινητής μπορεί να μεταγράψει πολύ γρήγορα και ανεξέλεγκτα, αρκεί η T7 RNA πολυμεράση να είναι παρούσα. Η έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης αυξάνει, όσο αυξάνει και το μεταγραφόμενο mRNA. Μέσα σε λίγες ώρες η πρωτεΐνη αυτή θα αποτελεί το κύριο συστατικό του κυττάρου. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει το μετασχηματισμό του πιο πάνω πλασμιδιακού φορέα στον κατάλληλο βακτηριακό ξενιστή.

Στην παρούσα εργασία για την επιλογή του κατάλληλου βακτηριακού ξενιστή για την καλύτερη έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών μας, δοκιμάστηκαν τα ακόλουθα βακτηριακά στελέχη : 1) Το βακτηριακό στέλεχος BL21 (DE3) που φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης του φάγου στο γένωμά του (λDE3), το οποίο επίσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *lac* υποκινητή και χειριστή. 2) Το βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3)pLysS , που επιπρόσθετα φέρει και το πλασμίδιο pLysS, που φέρει γονίδιο που κωδικοποιεί τη λυσοζύμη, το φυσικό αναστολέα της T7 πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να έχουμε πιο αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει κάθε φορά. 3) Το βακτηριακό στέλεχος BL21 CodonPlus (DE3) που επιπρόσθετα φέρει παραπάνω αντίγραφα γονιδίων που

κωδικοποιούν tRNAs, τα οποία συχνά περιορίζουν τη μετάφραση των ετερόλογων πρωτεϊνών στα βακτήρια *E.coli*, 4) Το βακτηριακό στέλεχος Origami(DE3) που επιπρόσθετα φέρει μεταλλαγές στα γονίδια της thioredoxin reductase (*trxB*) και της glutathione reductase (*gor*), τα οποία προάγουν το σχηματισμό δισουλφικού δεσμού στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου *E.coli* και ενδείκνυται για την έκφραση πρωτεϊνών που ο σχηματισμός δισουλφικού δεσμού είναι απαραίτητος για τη σωστή αναδίπλωση τους (correct folding).

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι IPTG επαγόμενα. Με την προσθήκη IPTG απομακρύνεται ο *lac* καταστολέας από τον *lac* χειριστή και μέσω της δράσης της πολυμεράσης από το *E.coli* παράγεται η T7 πολυμεράση, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου.

Για την επιλογή του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους (από αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως) που παρουσιάζει την καλύτερη δυνατή έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ακολουθούν καλλιέργειες μικρής κλίμακας (20ml) παρουσία των αντιβιοτικών αμπικιλίνη (50μg/ml) και χλωραμφαινικόλη (34μg/ml) που αναπτύχθηκαν στους 30°C και η πρωτεϊνική σύνθεση ξεκίνησε με την προσθήκη IPTG (0.5mM, $A_{595}=0.5$, για 3 ώρες, 30°C).

Ολόκληρα κύτταρα πριν (- IPTG δείγμα) και μετά (+IPTG δείγμα) την επαγωγή της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοτύπωση με τη χρήση του αντισώματος ενάντια στη CYP6CM1 πρωτεΐνη (Western blot), έτσι ώστε να επιλεγεί το κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος για την έκφραση των πρωτεϊνών που μελετώνται.

Στο τελικό στάδιο πριν την παραγωγή και απομόνωση των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα, γίνονται δοκιμασίες με ανάπτυξη δοκιμαστικών καλλιεργειών μικρού όγκου για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες (κατάλληλη θερμοκρασία, συγκέντρωση IPTG, διάρκεια αύξησης των κυττάρων) για τη σταθερή έκφραση αλλά και τη μεγαλύτερη δυνατή διαλυτότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Όταν όλες οι υπόλοιπες συνθήκες καθοριστούν, προχωράμε στην ανάπτυξη μεγάλου όγκου καλλιεργειών για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης.

3.A.3 Έλεγχος για την παρουσία πρωτεΐνης P450 με τη διαφορά του φάσματος CO σε ολόκληρα κύτταρα

Η εκτίμηση του περιεχομένου σε P450 σε ολόκληρα κύτταρα μετά την επαγωγή της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών (+IPTG δείγμα) έγινε με βάση την χαρακτηριστική φασματική ιδιότητα των ενζύμων P450, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.A.2 του 2^{ου} κεφαλαίου με τη μόνη διαφορά ότι αντί για μεμβράνες σε αυτό το βήμα χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα κύτταρα.

3.A.4 Έλεγχος διαλυτότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών

Οι πλασμιδιακοί φορείς *pCW_cyp6cm1-full* και *pCW_cyp6cm1δ (1-28)* μετασχηματίστηκαν σε BL21-CodonPlus βακτηριακά κύτταρα. Καλλιέργειες (κλίμακας των 5ml) όπου προστέθηκαν τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (50μg/ml) και χλωραφαινικόλη (34μg/ml) μεγάλωσαν όλη νύχτα στους 37°C. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για 1% επιμόλυνση σε προθερμασμένο Terrific broth (100ml) όπου προστέθηκαν τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (50μg/ml) και χλωραφαινικόλη (34μg/ml). Όταν οι καλλιέργειες έφτασαν σε OD₅₉₅ ~ 0,5 στους 30°C, τότε έγινε επαγωγή της έκφρασης με την προσθήκη IPTG και ALA σε τελική συγκέντρωση 0,5mM. Η καλλιέργεια μετά την επώαση της όλη τη νύχτα (περίπου 12-15 ώρες) στους 28°C, φυγοκεντρήθηκε στις 4000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα από την κάθε καλλιέργεια αναδιαλύθηκε σε 10ml διαλύματος (resuspension buffer: 1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 10% glycerol) παρουσία 0,5mM EDTA και 2mM PMSF, που δρουν ως αναστολείς πρωτεασών. Στη συνέχεια το δείγμα υπέστη υπερήχους (sonication) σε συσκευή με ισχύ περίπου 70% για περίπου 15min. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρωση στα 4000rpm/20 λεπτά/ 4°C και φυγοκέντρωση στα 35.000g/30 λεπτά/ 4°C. Συλλέγονται το υπερκείμενο και το ίζημα κι ελέγχεται η διαλυτότητα των υπό μελέτη πρωτεϊνών με ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανοσοτύπωση με τη χρήση του αντισώματος ενάντια στη CYP6CM1 πρωτεΐνη (Western blot).

3.A.5 Απομόνωση των His-πρωτεϊνών με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας

Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο τον τετραϊστιδινυλικό επίτοπο. Ο επίτοπος αυτός έχει ένα τεράστιο πλεονέκτημα που αφορά την εύκολη και γρήγορη απομόνωση της πρωτεΐνης σε καθαρή μορφή με τη μέθοδο της χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA. Η ρητίνη που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, περιέχει αгарόζη ως προσροφητικό υλικό, το οποίο συνδέεται με το νικέλιο μέσω του νιτριλο-τριοξικού οξέος (NTA) που φέρει τρία καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης υποκαταστάτη στη σφαίρα συναρμογής του ιόντος Ni²⁺, αφήνοντας δύο θέσεις ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν με τον τετραϊστιδινυλικό επίτοπο των προς καθαρισμό πρωτεϊνών. Έτσι τρία ιόντα Ni²⁺ αντιστοιχούν σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο που φέρει 4 ιστιδίνες σε ένα από τα άκρα του. Η ρητίνη χρωματογραφίας θα κρατήσει μόνο την πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο και η τυχόν μη ειδική σύνδεση των μεμονωμένων ιστιδινών από άλλες πρωτεΐνες σχεδόν εξαλείφεται με τις εκπλύσεις της ρητίνης με ιμιδαζόλιο.

Πιο συγκεκριμένα ο πλασμιδιακός φορέας που εκφράζει την CYP6CM1Δ (1-28) από το *Bemisia tabaci* και φέρει τον τετραϊστιδινυλικό επίτοπο στο καρβοξυτελικό άκρο τους, μετασχηματίστηκε σε BL21-CodonPlus (DE3) βακτηριακά κύτταρα. Βακτηριακή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (4L) αναπτύχθηκε στους 30°C και η πρωτεϊνική σύνθεση ξεκίνησε με την προσθήκη IPTG (0.5mM, A₅₉₅=0.5, όλη νύχτα, 28°C). Με το τέλος της ολονύχτιας επαγωγής τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (4000rpm/15 λεπτά/4⁰C) και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε στο διάλυμα A (50mM Tris-HCl, pH:8.0, 1M NaCl, , 10% γλυκερόλη v/v). Στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται οι αναστολείς των πρωτεασών PMSF και EDTA σε τελική συγκέντρωση 2mM και 0,5mM αντίστοιχα. Ακολουθεί ρήξη των κυττάρων με ηχοβολισμό (10×3', συνολικά 30 λεπτά, 4⁰C), κατεβάζοντας σε κάθε στάδιο τη θερμοκρασία του κυτταρικού διαλύματος με ανάδευση σε διάλυμα αιθανόλης/ξηρού πάγου. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση στα 4000rpm/20 λεπτά/ 4⁰ C και φυγοκέντρηση στα 35.000g/30 λεπτά/ 4⁰ C (100.000g/30 λεπτά/ 4⁰C). Συλλέγουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 5mM ημιδαζόλιο και το φορτώνουμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιέχει την ρητίνη Ni²⁺-NTA, προεξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος A, ρυθμίζοντας το ρυθμό ροής ώστε αυτός να μην ξεπερνά το 1ml/min. Συλλέγουμε το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (Flow Through, FT) και

ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος A και 5mM ιμιδαζόλιο. Οι εκπλύσεις στη συνέχεια συνεχίζονται με 5 όγκους του διαλύματος B με χαμηλή περιεκτικότητα αλατιού (50mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη v/v) και τελικά η πρωτεΐνη εκλύεται με 5 όγκους διαλύματος με 500mM ιμιδαζόλιο. Η συλλογή των κλασμάτων έκλυσης γίνεται συνήθως σε μισό όγκο από αυτόν της ρητίνης και ακολουθεί ανάλυση της καθαρότητας των δειγμάτων με SDS-PAGE και ανίχνευση των πρωτεϊνών με χρώση Coomassie Brilliant Blue (R-250) που βάφει μπλε τις πρωτεϊνικές ζώνες και ανιχνεύει πρωτεΐνες μέχρι 0.5 μg και με ανοσοτύπωση (western blot) με τη χρήση ειδικού αντισώματος ενάντια στην πρωτεΐνη CYP6CM1.

3.A.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά με βάση το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πρωτεϊνικό μίγμα αρχικά επεξεργάζεται με ένα διάλυμα SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο σπάει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και οι πρωτεΐνες του μίγματος αποδιατάσσονται. Επίσης β-μερκαπτοαιθανόλη ή και DTT προστίθενται στο μίγμα ώστε να διασπαστούν και οι τυχόν δισουλφιδικοί δεσμοί. Περίπου ένα μόριο SDS αντιστοιχεί σε κάθε δύο αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεϊνικής αλυσίδας, οπότε τελικά καταλήγουμε σε ένα σύμπλοκο SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης με μεγάλο αρνητικό φορτίο, το οποίο κατά προσέγγιση είναι αναλογικό του μοριακού βάρους της κάθε πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με βάση τα πρωτόκολλα της BIORAD.

3.A.7 Ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση του αντισώματος ενάντια στην πρωτεΐνη CYP6CM1 (western blot)

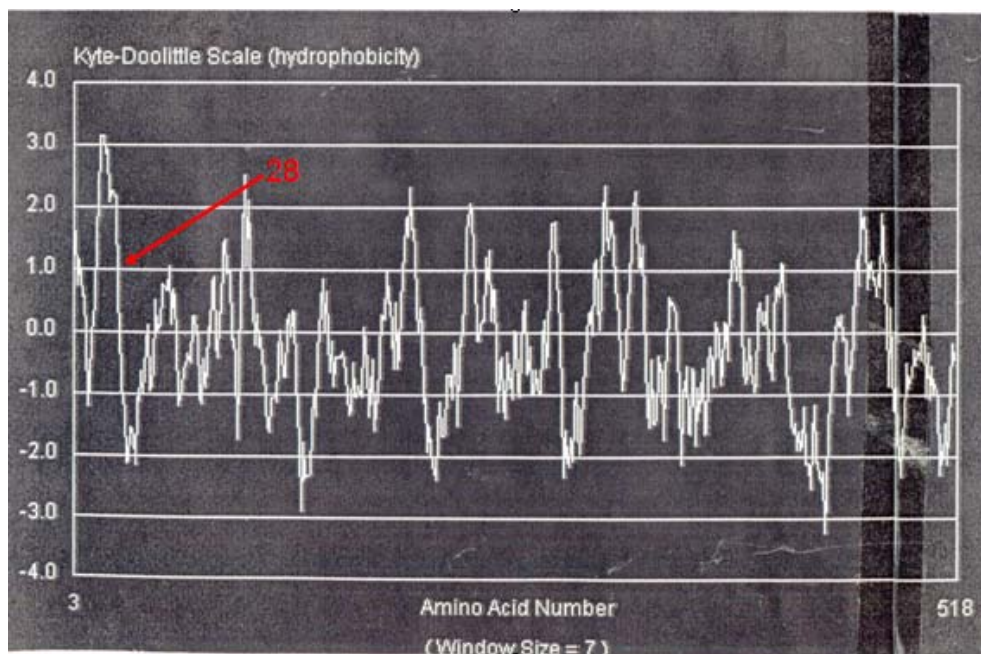
Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της BIORAD. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ειδικό ενάντια της πρωτεΐνης CYP6CM1. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι α-rabbit IgGs και είναι συζευγμένο με το ένζυμο της HRP το οποίο οξειδώνει το peracid salt (παρουσία λουμινόλης), γεγονός που οδηγεί σε μια ανώτερη οξειδωτική κατάσταση της ομάδας αίμης του HRP ενζύμου. Καθώς το μόριο επιστρέφει στην

κατώτερη ενεργειακά κατάσταση παράγονται ρίζες λουμινόλης, εκλύεται φως (χημειοφωταγεία), η μεμβράνη μαυρίζει και ανιχνεύονται έτσι μόνο οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από το πρώτο αντίσωμα. Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο του ECL από την Biolabs.

3.B ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.B.1. Πρόβλεψη των μεμβρανικών περιοχών της πρωτεΐνης CYP6CM1

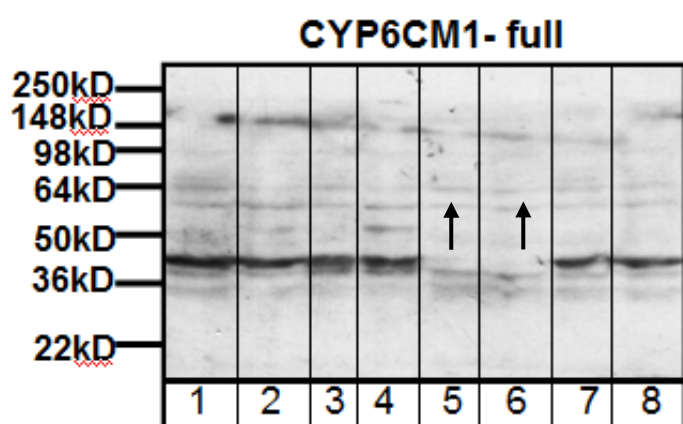
Με τη χρήση των υπολογιστικού προγράμματος Kyte-Doolittle έγινε η πρόβλεψη των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης BtCYP6CM1. Σύμφωνα με το εργαλείο αυτό οι περιοχές με τιμή μεγαλύτερη του 1 (>1) είναι μεμβρανικές. Στην εικόνα 19 τα πρώτα 28 αμινοξέα έχουν τιμή πολύ μεγαλύτερη της τιμής 1, άρα είναι υδρόφοβα προβλέποντας μεμβρανική περιοχή με αποτέλεσμα την αφαίρεση τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η παρεμπόδιση της σωστής αναδίπλωσης της υπό μελέτη πρωτεΐνης .



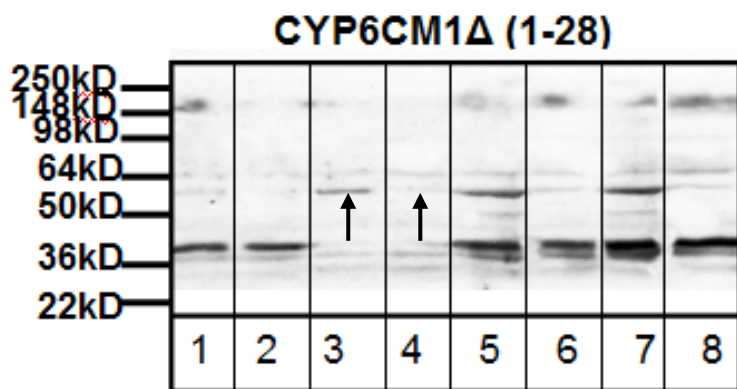
Εικόνα 19. Πρόβλεψη των υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης Bt CYP6CM1

3.B.2 Έκφραση κι απομόνωση των πρωτεϊνών CYP6CM1 και CYP6CM1Δ (1-28).

Για την επιλογή του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους, δηλαδή του στελέχους που παρουσιάζει την καλύτερη δυνατή έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών, τα δείγματα από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων BL21 (De3), BL21 (De3) pLysS, BL21-CodonPlus(De3) και Origami (De3) με τα πλασμίδια pCW_His₄cyp6cm1 και pCW_His₄cyp6cm1δ(1-28), αντίστοιχα, αναλύονται όπως φαίνεται στις εικόνες 20 και 21 με SDS-PAGE και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών γίνεται με ανοσοτύπωση με τη χρήση του α-CYP6CM1 αντισώματος.



Εικόνα 20. Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών με ανοσοτύπωση με τη χρήση του αντισώματος ενάντια στη πρωτεΐνη CYP6CM1. Lane 1: Ολόκληρα κύτταρα από BL21 (DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα -IPTG), Lane 2: Ολόκληρα κύτταρα από BL21 (DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα +IPTG), Lane 3: Ολόκληρα κύτταρα από Origami(DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 4: Ολόκληρα κύτταρα από Origami(DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 5: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 6: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 7: Ολόκληρα κύτταρα από BL21(DE3)pLysS His₄CYP6CM1 βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 8: Ολόκληρα κύτταρα από BL21(DE3)pLysS His₄CYP6CM1 βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG.



Εικόνα 21. Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών με ανοσοτύπωση με τη χρήση του αντισώματος ενάντια στη πρωτεΐνη CYP6CM1. Lane 1: Ολόκληρα κύτταρα από BL21(DE3) pLysS His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα +IPTG) , Lane 2: Ολόκληρα κύτταρα από BL21(DE3) pLysS His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα - IPTG), Lane 3: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 4: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 5: Ολόκληρα κύτταρα από Origami(DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 6: Ολόκληρα κύτταρα από Origami (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 7: Ολόκληρα κύτταρα από BL21 (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane 8: Ολόκληρα κύτταρα από BL21 (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG.

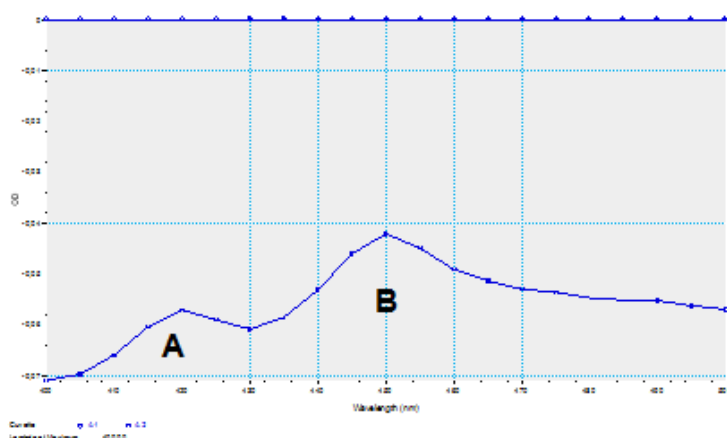
Από την εικόνα 20 παρατηρείται ότι, κάτω από τα 64kD οπου αναμένεται η πρωτεΐνη CYP6CM1, στο lane 2 και 3 ανιχνεύεται η ζώνη της πρωτεΐνης με μηδαμινή αποικοδόμηση (βελάκια), με μια υποτυπώδη διάφορα της έκφρασης πριν και μετά την επαγωγή της με IPTG. Σε αντίθεση, στα υπόλοιπα lane και μεν ανιχνεύεται η επιθυμητή πρωτεϊνική ζώνη, η οποία όμως εμφανίζεται έντονα αποικοδομημένη. Επομένως, συμπεραίνεται ότι για την καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης CYP6CM1 ενδείκνυται το βακτηριακό στέλεχος BL21-CodonPlus (DE3).

Από την εικόνα 21 παρατηρείται ότι, κάτω από τα 64kD οπου αναμένεται η πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28), στο lane 3 και 4 ανιχνεύεται η ζώνη της πρωτεΐνης με μηδαμινή αποικοδόμηση, με διάφορα της έκφρασης μετά και πριν την επαγωγή της με IPTG (βελάκια). Σε αντίθεση, στα υπόλοιπα lane και μεν παρατηρείται έκφραση

της πρωτεΐνης CYP6CM1Δ (1-28) και μάλιστα στα βακτηριακά στελέχη Origami(DE3) (lane 5, 6) και BL21 (DE3) (lane 7, 8) παρατηρείται μεγαλύτερη διαφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης πριν και μετά (πιο παχιές ζώνες) την επαγωγή της με IPTG απ' ότι εμφανίζεται στο βακτηριακό στέλεχος BL21-CodonPlus (DE3), όμως τα στελέχη αυτά εκφράζουν την υπό μελέτη πρωτεΐνη έντονα αποικοδομημένη. Επομένως, συμπεραίνεται ότι για την καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης CYP6CM1Δ (1-28) επίσης ενδείκνυται το βακτηριακό στέλεχος BL21-CodonPlus (DE3).

3.B3 Έλεγχος για την παρουσία πρωτεΐνης P450 με τη διαφορά του φάσματος CO σε ολόκληρα κύτταρα

Η φασματική ιδιότητα των ανηγμένων ενζύμων P450 να σχηματίζουν σύμπλοκο με το μονοξείδιο του άνθρακα, παράγοντας έτσι μια μοναδική κορυφή απορρόφησης στα 450 nm, χρησιμοποιήθηκε για την ακριβή εκτίμηση του περιεχομένου σε P450 σε ολόκληρα κύτταρα καλλιέργειας 16 ωρών στους 28°C, όπως φαίνεται στην εικόνα 22.



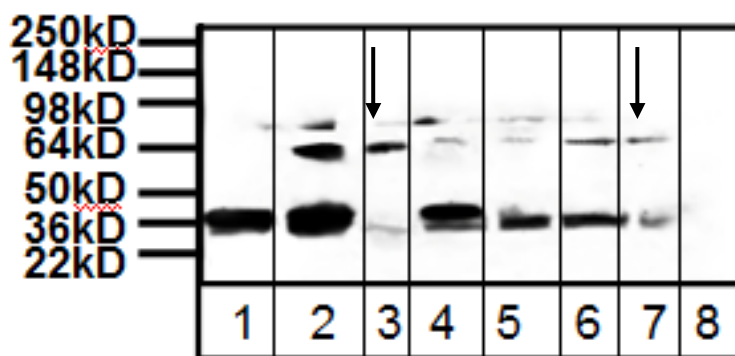
Εικόνα 22. Η CO-διαφορά φάσματος από ολόκληρα κύτταρα E.coli που εκφράζουν την πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28). Η επικρατέστερη έκφραση της CYP6CM1Δ (1-28) ως P450, με σχετικά χαμηλά επίπεδα σε P420 είναι ενδεικτικά ενός σταθερού και καλής ποιότητας λειτουργικού ενζύμου. A: Η κορυφή απορρόφησης στα 420nm, B: Η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης των P450 στα 450 nm.

Ο έλεγχος που έγινε σε ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα E.coli που εκφράζουν τις πρωτεΐνες CYP6CM1 και CYP6CM1Δ (1-28), έδειξε σύμφωνα με τη διαφορά του φάσματος CO που παρατηρήθηκε ότι οι υπό μελέτη πρωτεΐνες εκφράζονται

επικρατέστερα σε μορφή P450. Η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης των ενζύμων P450 στα 450 nm φαίνεται ενδεικτικά για την πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28) στην εικόνα 26.

3.B.4 Έλεγχος διαλυτότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών

Για τον έλεγχο της διαλυτότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών, τα πρωτεϊνικά δείγματα αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με ανοσοτύπωση με τη χρήση του αντισώματος εναντία στην πρωτεΐνη CYP6CM1 σε αραίωση 1 προς 8000 και μετά από έκθεση 30 λεπτών, όπως φαίνεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 23. Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για τον έλεγχο διαλυτότητας των πρωτεϊνών CYP6CM1 και CYP6CM1Δ(1-28) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοτύπωση με τη χρήση του α-CYP6CM1 αντισώματος, Lane 1: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα -IPTG), Lane 2: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα +IPTG), Lane 3: Υπερκείμενο από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτηρίων μετά από την επαγωγή της έκφρασης με 0,5mM IPTG και ALA, την επώαση της όλη τη νύχτα στους 28 ° C που έχει υποστεί έλεγχο διαλυτότητας (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.A.4), Lane 4: Δείγμα ιζήματος από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτηρίων μετά από την επαγωγή της έκφρασης με 0,5mM IPTG και ALA, την επώαση της όλη τη νύχτα στους 28 ° C που έχει υποστεί έλεγχο διαλυτότητας (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.A.4), Lane 5: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα -IPTG), Lane 6: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1 βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα +IPTG), Lane 7: Υπερκείμενο από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1 βακτηρίων μετά από την επαγωγή της έκφρασης με 0,5mM IPTG

και ALA, την επώαση της όλη τη νύχτα στους 28 °C που έχει υποστεί έλεγχο διαλυτότητας (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.A.4), Lane 8: Δείγμα ιζήματος από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1 βακτηρίων μετά από την επαγωγή της έκφρασης με 0,5mM IPTG και ALA, την επώαση της όλη τη νύχτα στους 28 °C που έχει υποστεί έλεγχο διαλυτότητας (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.A.4).

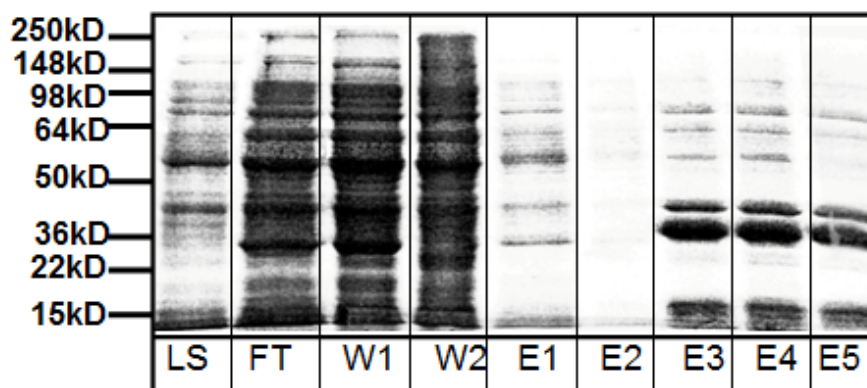
Από την εικόνα 23 παρατηρείται ότι, για την πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28) κάτω από τα 64kD, παρατηρείται μεγάλη διαφορά στις ζώνες μεταξύ του lane 1 και lane 2, που σημαίνει ότι μετά την επαγωγή της καλλιέργειας με IPTG η έκφραση της πρωτεΐνης CYP6CM1Δ (1-28) αυξάνει κατά πολύ. Στο lane 3 ανιχνεύεται η ζώνη της πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μέγεθος (βελάκι), δηλαδή κάτω από τα 64kD, σε αντίθεση με το lane 4 όπου ανιχνεύεται μια ζώνη κοντά στα 36kD, συμπεραίνοντας ότι η πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28) εμφανίζεται σε διαλυτή μορφή, αφού η πρωτεϊνική της ζώνη ανιχνεύεται στο δείγμα του υπερκειμένου κι όχι στο δείγμα του ιζήματος (lane4).

Για την πρωτεΐνη CYP6CM1 παρατηρείται πολύ μικρή διαφορά στις ζώνες που ανιχνεύονται μεταξύ του lane 5 και του lane 6, που σημαίνει ότι μετά την επαγωγή της καλλιέργειας με IPTG η έκφραση της πρωτεΐνης CYP6CM1 δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά. Στο lane 7 ανιχνεύεται η ζώνη της πρωτεΐνης στο αναμενόμενο μέγεθος (βελάκι), δηλαδή κάτω από τα 64kD, σε αντίθεση με το lane 8 όπου δεν ανιχνεύεται καμία ζώνη, συμπεραίνοντας ότι η πρωτεΐνη CYP6CM1 εμφανίζεται σε διαλυτή μορφή.

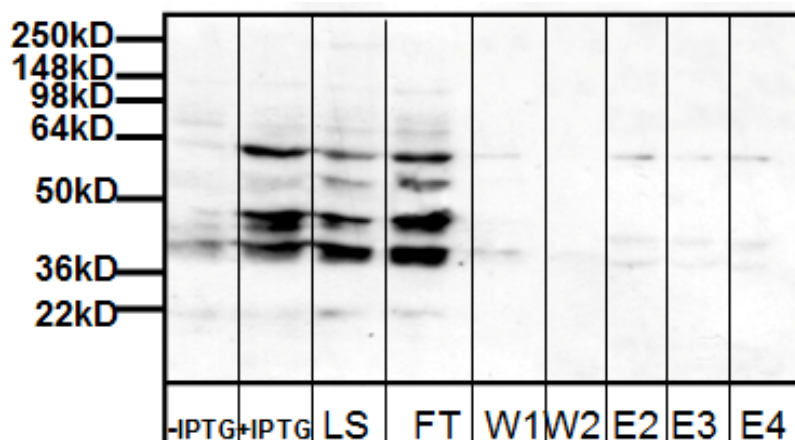
Συγκρίνοντας τις ζώνες μεταξύ των δυο πρωτεϊνών που απεικονίζονται στην εικόνα 23, οι ζώνες που αφορούν την πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28) παρουσιάζουν μεγαλύτερη ένταση (πιο ισχυρό σήμα) σε σχέση με τις ζώνες που αφορούν την πρωτεΐνη CYP6CM1, συμπεραίνοντας ότι η πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28) εκφράζεται καλύτερα και παρουσιάζεται πιο σταθερή από ότι η πρωτεΐνη CYP6CM1, όπου η έκφραση της δεν είναι ικανοποιητική. Η παρατήρησι αυτή ήταν αναμενόμενη, αφού στην πρωτεΐνη CYP6CM1Δ (1-28) έχουν παραλειφθεί οι μεμβρανικές περιοχές της, που δημιουργούν προβλήματα στη σωστή αναδίπλωση της.

3.B.5 Απομόνωση της πρωτεΐνης His₄-CYP6CM1Δ (1-28) με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας.

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα μετά τη Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας αναλύονται με SDS-PAGE και η ανίχνευση της πρωτεΐνης γίνεται με χρώση Coomassie Brilliant Blue (R-250), όπως φαίνεται στην εικόνα 24 και με ανοσοτύπωση (western blot) με τη χρήση ειδικού αντισώματος ενάντια στην πρωτεΐνη CYP6CM1, όπως φαίνεται στην εικόνα 25.



Εικόνα 24. Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης CYP6CM1Δ (1-28) με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. Lane LS: υλικό που φορτώθηκε στη στήλη χρωματογραφίας, Lane FT: υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη Ni²⁺-NTA, Lane W1: δείγμα από το πρώτο στάδιο έκπτυξης, Lane W2: δείγμα από το δεύτερο στάδιο έκπτυξης, Lane E1, E2, E3, E4, E5: δείγμα από το υλικό έκλουσης που εκλύεται πρώτο, δεύτερο, τρίτο και τέταρτο, πέμπτο, αντίστοιχα.



Εικόνα 25. Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης CYP6CM1Δ(1-28) με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοτύπωση

με τη χρήση του α-CYP6CM1 αντισώματος. Lane – IPTG: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια πριν την επαγωγή της έκφρασης με IPTG, Lane +IPTG: Ολόκληρα κύτταρα από BL21-CodonPlus (DE3) His₄CYP6CM1Δ (1-28) βακτήρια μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (δείγμα +IPTG), Lane LS: υλικό που φορτώθηκε στη στήλη χρωματογραφίας, Lane FT : υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη Ni²⁺-NTA, Lane W1: δείγμα από το πρώτο στάδιο έκλυσης, Lane W2: δείγμα από το δεύτερο στάδιο έκλυσης, Lane E2, E3,E4 : δείγμα από το υλικό έκλυσης που εκλύεται δεύτερο, τρίτο και τέταρτο, αντίστοιχα.

Από τις εικόνες 24 και 25 συμπεραίνεται ότι, η πρωτεΐνη CYP6CM1Δ(1-28) δεν παρουσιάζει ικανοποιητική έκφραση σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (4L) διότι εμφανίζεται αποικοδομημένη και πριν και μετά την επαγωγή της έκφρασης με IPTG (Lane – IPTG,+IPTG,). Η πρωτεΐνη είναι ήδη αποικοδομημένη (lane LS) ενώ φορτώνεται στην κολώνα. Η ζώνη της ανιχνεύεται ως επί το πλείστον στο υλικό που διαπέρασε στη ρητίνη (lane FT), ενώ μετά τις διαδοχικές εκπλύσεις και την έκλυση από τη στήλη χρωματογραφίας παρατηρείται υποτυπώδης ανίχνευση της πρωτεΐνης. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη CYP6CM1Δ(1-28) παρουσιάζει ανικανότητα να προσδεθεί στην κολώνα Ni²⁺-NTA μέσω της C-περιοχής της, που φέρει το τετραϊστιδινυλικό επίτοπο κι επομένως η απομόνωση υπό τις παραπάνω συνθήκες χρωματογραφίας δεν είναι δυνατή.

Για να επιτευχθεί η απομονώσει της εν λόγω πρωτεΐνης θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες καλλιέργειας της σε μεγάλη κλίμακα ((κατάλληλη θερμοκρασία, συγκέντρωση IPTG, διάρκεια αύξησης των κυττάρων) και οι συνθήκες απομόνωσης της μέσω της Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας (συγκεντρώσεις των αναστολέων πρωτεασών και του ιμιδαζολίου). Επίσης θα μπορούσε να δοκιμαστεί η ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στη κολώνα Ni²⁺-NTA με το τετραϊστιδινυλικό επίτοπο να βρίσκεται N-περιοχής της. Ίσως για την απομόνωση της να απαιτείται ένας επίτοπος είτε στη C- είτε στη N- περιοχή της πρωτεΐνης με περισσότερα από τέσσερα κατάλοιπα ιστιδίνης.

3.Γ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης CYP6CM1 του εντόμου *Bemisia tabaci* του πρώτου ενζύμου από έντομο γεωπονικού ενδιαφέροντος που βρέθηκε ότι μεταβολίζει – μετατρέπει σε μη τοξικό μεταβολίτη το νεονικοτινοειδες εντομοκτόνο imidacloprid, το πρώτο σε πωλήσεις εντομοκτόνο της αγοράς. Επιτεύχθηκε σε καλλιέργεια μικρής κλίμακας η παραγωγή των πρωτεϊνών CYP6CM1Δ (1-28) και CYP6CM1-full σε υδατοδιαλυτή μορφή κι επίσης έχει πραγματοποιηθεί προσπάθεια για την απομόνωση τους, όπου βρίσκεται στο στάδιο βελτιστοποίησης.

Η προσπάθεια για την κρυστάλλωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης βασίστηκε πάνω στην στρατηγική που ακολουθήθηκε για την κρυστάλλωση άλλων πρωτεϊνών P450, όπως της ανθρώπινης P450 2D6 (Rowland *et al.*, 2006) για το λόγο ότι η οικογένεια των P450 πρωτεϊνών παρουσιάζει ορισμένα κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Οι CYP πρωτεΐνες είναι ικανές να αφομοιώνουν ένα μεγάλο αριθμό συστατικών διότι έχουν 6 περιοχές πρόσδεσης υποστρώματος (SRS), δηλαδή μεγάλες κοιλότητες πρόσδεσης όλων των εξωγενών και ενδογενών υποστρωμάτων. Η περιοχή πρόσδεσης της αίμης είναι συντηρημένη παρουσιάζοντας ένα μοναδικό μοτίβο. Σημαντικά συντηρημένη είναι η περιοχή SRS3-5. Η συντήρηση αυτή παρατηρείται μέσα στην F/G περιοχή της έλικας που σχηματίζει την κύρια περιοχή πρόσδεσης (Rowland *et al.*, 2006).

Επομένως, η προσπάθεια για την κρυστάλλωση αυτής της πρωτεΐνης θα συνεχισθεί σε επόμενες εργασίες, αφού μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού ανθεκτικότητας στα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα. Επιπροσθέτως, θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάπτυξη μεθοδολογίας για την κρυστάλλωση άλλων P450s, συνδεδεμένων με παρόμοιο τρόπο στην μεμβράνη.

Επιπροσθέτως, η διαθεσιμότητα της κρυσταλλικής δομής της υπό μελέτη πρωτεΐνης θα μπορούσε να συμβάλλει στην προσπάθεια εξήγησης των αποτελεσμάτων του πολυμορφισμού και των αποτελεσμάτων από τις SDM (Signed Differential Mapping) μελέτες κι επίσης θα μπορούσε να δώσει απάντηση σε μερικά ερωτήματα που προκύπτουν από την *in silico* δουλειά μοντελοποίησης. Τέτοιες βελτιωμένες πληροφορίες θα βοηθούσαν με τη πάροδο του χρόνου στην έγκαιρη επίτευξη του τελικού στόχου, δηλαδή τη πρόβλεψη της μεταβολικής μοίρας των διαφόρων

εντομοκτόνων ή τη πρόβλεψη των ενώσεων που θα μπορούσαν να καταστείλουν τα ένζυμα P450 και θα οδηγούσαν τελικά στο βελτιωμένο σχεδιασμό εντομοκτόνων.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Berge J.B, Feyereisen R., Amichot M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Phil.Trans.R.Soc.Lond. B*, **353**, 1701-1705
- Budriang C., Rongnoparut P. and Yuvaniyama J., 2011. An Expression of an Insect Membrane-bound Cytochrome P450 CYP6AA3 in the Escherichia coli in Relation to Insecticide Resistance in a Malarial Vector. *Pakistan Journal of biological Sciences*. Volume **14**, 466-475
- Cranham, J. E. and W. Helle, 1985. Pesticide resistance in Tetranychidae. Pp 405-422 in Helle, W. and M.W. Sabelis (Eds.) Spider mites – Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. **1B**. Amsterdam, *Elsevier Science*
- Daborn P.J, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, Feyereisen R, Wilson TG, French-Constant RH (2002), A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*, *Science* **297**, 2253-2256
- Della Beffa G., 1962. Agricultural Entomology. Vol. **A**, Translation by Karamanou G. I. and Marselou S. P. M. C. Giourda Publ. Athens [in Greek].
- Karunker I., Morou E., Nikou D., Nauen R., Sertchook R., Stevenson B.J., Paine M.J.I., Morin S. and Vontas, J. (2009) Structural model functional characterization of the Bemisia tabaci CYP6CM1Vq, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39** 697-706.
- Mahmood Ahmad: Insecticide resistance mechanisms and their management in *Helicoverpa armigera* (Hubner) A Review. *J.Agric. Res.*, 2007, **45(4)**. 319-335
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–2378.

- Pritchard, M.P., Ossetian, R., Li, D.N., Henderson, C.J., Burchell, B., Wolf, C.R., Friedberg, T., 1997. A general strategy for the expression of recombinant human cytochrome P450s in *Escherichia coli* using bacterial signal peptides: expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **345**, 342–354
- Roditakis E., Tsagkarakou A., Vontas J., (2006) Identification of mutations in the para sodium channel of *Bemisia tabaci* from Crete, associated with resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **85**, 161-166
- Rowland Paul, Blaney Frank E., . Smyth Martin G, . Jones Jo J, Leydon Vaughan R., Oxbrow Amanda K., Lewis Ceri J., Tennant Mike G., Modi Sandeep, Eggleston Drake S., Chenery Richard J. and Bridges. Angela M., 2006. Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2D6. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 7614-7622.
- Saito Y (1985). Life types of spider mites. Spider Mites .In Their biology, natural enemies and control, Vol. **1A**. World Crop Pests, W. Helle and M. W. Sabelis (Eds) *Elsevier*, Amsterdam: 253-264
- Scott J.G. (1999), Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect.Biochem.Mol.Biol.***29**: 757-777
- Tsagkarakou A., Navajas M., Lagnel J., Gutierrez J and Pasteur N. (2009), Genetic Variability in *Tetranychus urticae* (Acari: *Tetranychidae*) from Greece: Insecticide Resistance and Isoenzymes. *Journal of Economic Entomology*, **89**:1354-1358.
- 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 Manag.Sci.* **61**: 499-507
- Van Leeuwen T., Vontas J., Tsagkarakou A., Tirry L. (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review *Insect Biochem Mol Biol* **40**, 563-572.

Βόντας Ι.,Ροδιτάκης Ε. και Τσαγκαράκου Α. (2007), Η Μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: παραδείγματα εντόμων και ακάρεων Ελληνικού ενδιαφέροντος, Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα, **18**: 60-68

Βόντας (2006). Σημειώσεις εργαστηρίου γεωργικής φαρμακολογίας ΓΠΑ

Γιαννοπολίτης Κ. Ν. (2005). Οδηγός γεωργικών φαρμάκων 2005: 195-326

Εμμανουήλ Ν. Γ. (1998), Γεωργική Ζωολογία, Ειδικό μέρος Α΄ Φυτοφάγα είδη :190-194

Εμμανουήλ Ν. Γ., Παπαδούλης Γ. Κ (2000), Τα ακάρεα ως μέσον βιολογικού ελέγχου επιβλαβών αρθροπόδων: 13-30

Ζιώγας Ν.Β., Μαρκόγλου Ν.Α.(2007). Γεωργική φαρμακολογία σελ.283-369

Κωβαίος ΔΣ (2010), Ακαρολογία σελ.79-80

Τζανακάκης Μ.Ε. (1995), Εντομολογία: 203-242

ΠΡΟΣΘΕΤΑ

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια

1. Πήκτωμα διαχωρισμού(separating gel): Το 10% αποτελείται από:4.1 ml mQ H₂O,2.5 ml 1.5M Tris-HCl pH 8.8,0.05 ml 10% w/v SDS,3.3 ml 0.8% w/v acrylamide Bis-acrylamide 30%, 0.05ml 10% w/v ammonium persulfate,0.005 ml TEMED.
2. Πήκτωμα πακεταρίσματος(stacking gel): Το 3,8 % αποτελείται από 2,05ml mQ H₂O,0,85ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8,0.025ml 20% w/v SDS,0.45ml 0.8%w/v acrylamide Bis-acrylamide 30%,0.025ml 10% w/v ammonium persulfate,0.005 ml TEMED. Το TEMED μπαίνει λίγο πριν την τοποθέτηση του μη πολυμερισμένου gel στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
3. Running buffer 1x (1L): 100ml running buffer 10x (60gr Tris, 288gr glycine 20gr SDS) + 900ml dH₂O 2x SDS(100 Mm Tris,pH 6.8,2% SDS,5% β-mercaptoethanol,10% glycerol
4. Transfer buffer (διάλυμα μεταφοράς) 1x (1000ml): 100ml από το Transfer buffer 10X και μέχρι τα 1000ml συμπληρώνουμε με νερό
5. Transfer buffer 10x (1000ml): 3,3g Tris-Base με 14,41g Glycine, 200ml bulk methanol και στη συνέχεια ογκομετρούμε μέχρι τα 1000ml με απιονισμένο νερό.
6. TBS-Tween 1x (1000ml): 100ml TBS 10x και 900ml dH₂O
7. TBS-Tween 10x (1000ml): 87.4g NaCl, 30ml Tween, 200ml Tris 1M pH =7, 5 και μέχρι τα 1000ml προσθέτω νερό.
8. Διάλυμα blocking: 2.5g από 5% w/v άπαχου γάλακτος σκόνη, TBS-Tween1X μέχρι τα 50ml.

9. Coomassie blue stain (1l): Coomassie blue R-250 1.0 g, Methanol 400 ml, Acetic Acid 100 ml

10. Destaining buffer (1 l): Methanol 400 ml, Acetic Acid 100ml

11. Luria Bertani LB (1l): Tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 10g, NaOH 1N to pH 7.2, Water milli-Q