Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής

Τμήματα Βιολογίας και Ιατρικής - Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - ΙΤΕ

In vivo λειτουργική αξιολόγηση σημειακών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου οι οποίες έχουν βρεθεί στα είδη *Aedes aegypti* και *Tetranychus urticae*

In vivo functional validation of target site resistance mutations identified in *Aedes aegypti* and *Tetranychus urticae* species

Ιάσων Κωνσταντίνος Χρήστου

Ηράκλειο Κρήτης

Μάρτιος 2017

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής

Τμήματα Βιολογίας και Ιατρικής - Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - ΙΤΕ

In vivo λειτουργική αξιολόγηση σημειακών μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου οι οποίες έχουν βρεθεί στα είδη *Aedes aegypti* και *Tetranychus urticae*

In vivo functional validation of target site resistance mutations identified in *Aedes aegypti* and *Tetranychus urticae* species

Ιάσων Κωνσταντίνος Χρήστου

Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας

Τριμελής επιτροπή:

Ιωάννης Βόντας

Χρήστος Δελιδάκης

Γεώργιος Χαλεπάκης

Περιεχόμενα

Συντομογραφίες **1**
Περίληψη **2**
Abstract **3**
I. Εισαγωγή **4**
I. 1. Επιβλαβή έντομα 4
I. 1.1. Έντομα φορείς ασθενειών 4
I. 1.1.1. Aedes aegypti 4
I. 1.2. Εχθροί καλλιεργειών 5
I. 1.2.1. Tetranychus urticae 5
I. 2. Έλεγχος επιβλαβών εντόμων 5
I. 2.1. Χημικά μέσα 6
I. 2.1.1. Πυρεθροειδή 6
I. 2.1.1. Τρόπος δράσης 7
I. 2.1.2. Αβερμεκτίνες 8
I. 2.1.2. Τρόπος δράσης 8
I. 3. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα 10
I. 3.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας 12
I. 3.1.A. Ανθεκτικότητα στόχου στα πυρεθροειδή 13
I. 3.1.B. Ανθεκτικότητα στόχου στις αβερμεκτίνες 15
I. 3.1.B.2. G323D και G326E στο γονίδιο GluClalpha 15
I. 4. Προσεγγίσεις και μέθοδοι για τη μελέτη της ανθεκτικότητας 16
I.4.1. Ορισμός ανθεκτικού φαινοτύπου 16
I.4.1.a Βιοδοκιμές 16
I.4.1.b Βιοχημικές μέθοδοι 17
I.4.2 Μελέτες συσχέτισης ανθεκτικότητας με μοριακούς δείκτες 17
I.4.2.a Αναγνώριση γονιδιακών μεταλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα 17
I.4.2.c Γονιδιακή έκφραση 17
I.4.2.c: Γενετική χαρτογράφηση και μελέτες γενετικής συσχέτισης 18
I.4.3 Αξιολόγηση συσχέτισης μεταξύ γονιδιακών δεικτών και ανθεκτικών φαινοτύπων 18
I. 5. Χρήση του εντόμου Drosophila melanogaster ως μοντέλο για τη μελέτη της ανθεκτικότητας 19
I. 5.1. Σύστημα CRISPR/Cas9 20
I. 5. Αντικείμενο μελέτης 21

Μ. Υλικά μέθοδοι **22**
M. 1. Στελέχη D. melanogaster 22
M. A. in vivo λειτουργική μελέτη της σημειακής μεταλλαγής V1016G, στο γονίδιο para της Drosophila melanogaster, η οποία συσχετίζεται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στόχου, στα πυρεθροειδή στο είδος Aedes aegypti 23
M.A.1 Αλληλούχηση στελέχους nos.Cas9 23
M. A.2 Σχεδιασμός πλασμιδίου δότη (donor plasmid) 24
M. A.3 Σχεδιασμός των gRNAs 24
M. A.3.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNAs 24
M. A.3.2 Μικροενέσεις εμβρύων Drosophila melanogaster nos.Cas9 25
M. A.4 Μοριακός έλεγχος 25
M. A.5 Διασταυρώσεις 26
M. A.6 Βιοδοκιμή στο στέλεχος με τη μεταλλαγή V1016G 28
M. A.6.1 Εντομοκτόνα 28
M. A.6.2 Βιοδοκιμές με δελταμεθρίνη 28
M. A.7 Ανάλυση δεδομένων 28
M. B in vivo λειτουργική μελέτη των σημειακών μεταλλαγών G326D και G326E, που ανήκουν στο γονίδιο GluClalpha της Drosophila melanogaster, οι οποίες συσχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στόχου, στην αμπαμεκτίνη στο είδος Tetranychus urticae 29
M. B.1 Σχεδιασμός πλασμιδίου δότη (donor plasmid) 29
M. B.2 Σχεδιασμός των gRNAs 29
M. B.2.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNAs 30
M. B.3 Μικροενέσεις εμβρύων Drosophila melanogaster nos.Cas9 30
M. B.4 Μοριακός έλεγχος 30
M. B.5 Διασταυρώσεις 31
R. Αποτελέσματα **32**
R. A. V1016G γονίδιο para 32
R. A.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNAs 32
R. A.2 Διασταυρώσεις 34
R. A.3 Βιοδοκιμή επαφής με δελταμεθρίνη 36
R. B. G323D και G326E 38
R. B.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNA GluCl 38
R. B.1 Διασταυρώσεις 39
D. Συζήτηση **42**

D. A. V1016G 42
D. A.1 Συνεντοπισμός V1016G με άλλες μεταλλαγές στο VSGC 42
D. A.2 Μελλοντικά πειράματα - συνδυασμός ανθεκτικότητας στόχου (V1016G) και μεταβολικής (P450s) 43
D. B. G323D και G326E 43
D. B.1 Μη ομοζύγωση μεταλλαγών G323D και G326E 43
D. B.2 Μελλοντικά πειράματα διερεύνησης μεταλλαγών G323D και G326E 46
S. Συμπληρωματικές πληροφορίες 47
S. I. Πίνακας εκκινητών και μορίων gRNAs που χρησιμοποιήθηκαν 47
S. II. Γενετικοί χάρτες πειραμάτων 48
S. II.a. V1016G 48
S. II.b. G323D 51
S. II.c. G326E 52
S. III. Πρωτόκολλα - Αντιδράσεις 53
S. III.a. Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA 53
S. III.b Πίνακες συνθηκών αντιδράσεων PCR 53
S. III.c. Συνθήκες αντιδράσεων περιοριστικής πέψης 54
Βιβλιογραφία 55

Συντομογραφίες

WHO	World Health Organization
FAO	Food and Agriculture Organization
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
PCR	Polymerase Chain Reaction
NGS	Next Generation Sequencing
MS	Mass Spectrometry
P450	Cytochrome P450
GSTs	Glutathione - S – transferases
VGSC	Voltage Gated Sodium Channel
GluCl	Glutamate gated chloride channel
DEF	S,S,S-tributyl phosphorotrithioate
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
LC_{50}	Lethal Concentration 50
METI	Mitochondrial Electron Transport Inhibitor
RR	Resistance Ratio
UAS	Upstream Activator Sequence
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
NHEJ	Non-Homologous End Joining
HDR	Homology Directed Repair
DSB	Double-Strand Break
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms

Περίληψη

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα αποτελεί μία μακροχρόνια και κλιμακούμενη παγκόσμια απειλή που θίγει άμεσα τον τομέα της υγείας αλλά και τον τομέα της γεωργίας καθώς θέτει ένα σημαντικό εμπόδιο για τον αποτελεσματικό έλεγχο των επιβλαβών εντόμων. Η μακροχρόνια, μαζική και αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων επιδείνωσε τους ρυθμούς εμφάνισης ανθεκτικότητας με αποτέλεσμα σήμερα να έχουν καταγραφεί περισσότερα από 550 ανθεκτικά είδη εντόμων και ακάρεων. Η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι απαραίτητη για την περαιτέρω ανάπτυξη εργαλείων και παρεμβάσεων που μπορούν να βελτιώσουν τον έλεγχο των επιβλαβών εντόμων. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των εντόμων είναι η ανθεκτικότητα στόχου η οποία είναι αποτέλεσμα μεταλλαγών στο μόριο-στόχο του εντομοκτόνου. Η Δροσόφιλα, αν και δεν είναι επιβλαβές είδος, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως πειραματικό μοντέλο στην έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα.

Το πρώτο σκέλος της παρούσας διατριβής εστιάζει στη μελέτη του ρόλου της σημειακής μεταλλαγής V1016G η οποία έχει βρεθεί σε ανθεκτικούς πληθυσμούς του *Aedes aegypti*, ενός από τους σημαντικότερους φορείς ασθενειών. Με εργαλείο το σύστημα CRISPR/Cas και μία σειρά διαδοχικών διασταυρώσεων κατασκευάστηκαν στελέχη *Drosophila melanogaster* ομόζυγα για την μεταλλαγή V1016G. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με το εντομοκτόνο δελταμεθρίνη σε άτομα αγρίου τύπου και σε ομόζυγα για τη μεταλλαγή (V1016G). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρουσία της μεταλλαγής, V1016G στο τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου, καθιστά τα μεταλλαγμένα στελέχη έως και 25 φορές πιο ανθεκτικά στη δελταμεθρίνη.

Η δεύτερη ενότητα αφορά τις μεταλλαγές, G323D και G326E, που έχουν βρεθεί σε ανθεκτικούς πληθυσμούς του είδους *Tetranychus urticae*. Το άκαρι αυτό προσβάλει ένα μεγάλο αριθμό φυτών και έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους πιο ανθεκτικούς οργανισμούς παγκοσμίως. Οι δύο αυτές μεταλλαγές που εντοπίζονται σε δύο από τα πέντε γονίδια *GluCl* του *T. urticae,* τα *GluCl1* και *GluCl3*, μοιράζονται την ίδια γονιδιακή θέση στο μοναδικό ορθόλογο γονίδιο, *DrosGluClalpha*, της *Drosophila melanogaster*. Αυτή λοιπόν η ενότητα αποτελείται από δύο αυτοτελή πειράματα με το πρώτο να αφορά την κατασκευή ομόζυγων στελεχών με τη μεταλλαγή G323D και το δεύτερο την κατασκευή ομόζυγων στελεχών με τη μεταλλαγή G326E. Κατά τη διαδικασία των διασταυρώσεων και στα δύο παραπάνω πειράματα τα στελέχη ήταν αδύνατο να φέρουν την εκάστοτε μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση. Στα κεφάλαια D.B.1 και D.B.2 αναλύονται οι πιθανές αιτίες στις οποίες πιθανώς οφείλεται η αδυναμία ομοζύγωσης καθώς και μελλοντικές πειραματικές κατευθύνσεις με σκοπό τη μελέτη της φύσης αυτών των μεταλλαγών.

Abstract

Resistance to insecticides is a long-term and staggering global threat directly affecting the health and agricultural sectors as it poses a significant obstacle to effective control of harmful insects. The long-term and frequent use of insecticides has exacerbated the frequency of resistance, with more than 550 resistant insect and mite species being recorded so far. Understanding insecticide resistance mechanisms is essential to further develop tools and interventions that can improve pest control. One of the main mechanisms of insect resistance is target site resistance resulting from mutations in the target molecule of the insecticide. *Drosophila melanogaster*, although not a harmful species, has been extensively used as an experimental model in research to understand insecticide resistance mechanisms.

The first part of this thesis focuses on the study of the role of the point mutation V1016G found in resistant populations of *Aedes aegypti*, a major disease vector. With the usage of CRISPR/Cas system and a series of successive crosses, *Drosophila* melanogaster homozygous strains were constructed with the V1016G mutation. Bioassays with the insecticide deltamethrin were then performed on wild-type and homozygous mutants (V1016G). The results show that the presence of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel renders the mutant strains up to 25 times more resistant to deltamethrin.

The second section concerns the mutations G323D and G326E found in resistant populations of *Tetranychus urticae*. This mite affects a large variety of plants and is characterized as one of the most insecticide resistant organisms in the world. These two mutations are found in two of the five *T. urticae GluCl* genes, *GluCl1* and *GluCl3*, and share the same genomic position as the *D. melanogaster* orthologue *DrosGluClalpha*. This chapter consists of two independent experiments. The first of concerns the construction of homozygous strains with the G323D mutation and the second the construction of homozygous strains with the G326E mutation. In the crossing process, both strains were unable to carry the mutation in a homozygous state. Chapters D.B.1 and D.B.2 analyze the possible causes that may underpin the lethality as well as future experimental directions which could be pursued in order to study the nature of these mutations.

I. Εισαγωγή

I. 1. Επιβλαβή έντομα

Τα έντομα αποτελούν την πιο ποικιλόμορφη πανίδα πάνω στη γη. Τα διαφορετικά είδη τους καταλαμβάνουν χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα με ενδιαιτήματα από τους τροπικούς ως τους πόλους (Bale, 2002). Οργανισμοί όπως τα έντομα, που ανήκουν στην συνομοταξία των αρθροπόδων είναι φίλοι μας μέχρι το σημείο που απειλούν την υγεία μας και ανταγωνίζονται με εμάς για πόρους όπως η τροφή· από αυτό το σημείο γίνονται επιβλαβή (pest insects) (Casida, 2009). Τα παραπάνω έντομα αποτελούν απειλή για τον άνθρωπο καθώς πλήττουν άμεσα την υγεία αλλά και τον αγροτικό τομέα.

I. 1.1. Έντομα φορείς ασθενειών

Ένας αριθμός από παθογόνα και παράσιτα που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο μεταδίδονται από έντομα φορείς. Κάθε χρόνο αναφέρονται πάνω από ένα δισεκατομμύριο περιπτώσεις μετάδοσης και καταγράφονται περίπου ένα εκατομμύριο θάνατοι που οφείλονται σε ασθένειες μεταδιδόμενες από έντομα (Hay et al., 2005; Snow et al., 2005). Ασθένειες που μεταδίδονται, από τους φορείς αυτούς, αποτελούν η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός, η σχιστοσωμίαση, η τρυπανοσωμίαση, η λεϊσμανίαση, η ασθένεια Chagas, ο κίτρινος πυρετός, η Ιαπωνική εγκεφαλίτιδα, η ογκοκέρκωση, ο ιός Ζίκα κ.ά. (Simmons et al., 2012; Jentes et al., 2011; Leparc-Goffart et al., 2014). Οι φορείς ασθενειών που μεταδίδουν μολυσματικές ασθένειες μεταξύ των ανθρώπων ή από τα ζώα στον άνθρωπο είναι σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα τσιμπούρια, οι μύγες, οι σκνίπες, οι ψύλλοι, τα σκαθάρια της υπο-οικογένειας Triatominae και κάποια υδρόβια σαλιγκάρια. Ο πιο γνωστός όμως φορέας ασθενειών είναι τα κουνούπια. Τα γένη των κουνουπιών *Aedes*, *Anopheles* και *Culex* ευθύνονται για τη μετάδοση ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Hemingway et al., 2000; WHO, 2016).

I. 1.1.1. *Aedes aegypti*

Το είδος *Aedes aegypti* πιθανότατα προέρχεται από την αφρικανική ήπειρο. Παρόλα αυτά μέχρι σήμερα έχει μεταφερθεί σε όλο τον κόσμο, μέσω του παγκόσμιου εμπορίου και των πλοίων, από τις τροπικές και υποτροπικές έως και τις εύκρατες περιοχές (Powell & Tabachnick, 2013). Μία πτυχή της οικολογίας του *Ae. aegypti*, η οποία συμμετέχει στην αποτελεσματικότητά του ως φορέα ασθενειών αποτελεί η στενή σύνδεση των πληθυσμών του με την παρουσία του ανθρώπου. Τα κουνούπια εισέρχονται στις κατοικίες για να τραφούν και να ξεκουραστούν. Τα ενήλικα θηλυκά τρέφονται κατά προτίμηση με το αίμα των ανθρώπων, ενώ τα άλλα είδη σπονδυλωτών αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό των γευμάτων τους (Scott et al., 2000; Ponlawat et al., 2005). Σε αντίθεση με πολλά άλλα είδη κουνουπιών, το *Ae. aegypti,* αποτελεί ένα είδος που τρέφεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και συνήθως από ένα μεγάλο αριθμό ξενιστών κατά τη διάρκεια του γονοτροφικού του κύκλου. Τα θηλυκά γεννούν κατά προτίμηση αυγά σε τεχνητές δεξαμενές και πιο σπάνια σε φυσικά διαμορφωμένα περιβάλλοντα κοντά σε κατοικίες ανθρώπων (Gubler 1989a, b; Kittayapong & Strickman 1993). Τα αυγά εναποτίθενται πάνω ή κοντά στην επιφάνεια του νερού και αφού γονιμοποιηθούν μπορεί να αντέξουν σε συνθήκες ξηρασίας έως και ένα έτος (Russell et al., 2001).

Εξαιτίας του ρόλου που έχει στη μετάδοση σημαντικών ιικών παθογόνων, την κοντινή οικοθέση του με αυτήν του ανθρώπου και τη σχετική ευκολία με την οποία μπορεί να μελετηθεί στο εργαστήριο και στο πεδίο, το είδος *Ae. aegypti* αποτελεί το πιο διεξοδικά μελετημένο, συσχετιζόμενο με την υγεία, αρθρόποδο (Christophers 1960; Focks et al. 1993a, b). Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας το είδος *Aedes aegypti* αποτελεί τον κύριο φορέα ασθενειών όπως ο δάγκειος πυρετός αλλά και άλλων ιικών ασθενειών όπως ο κίτρινος πυρετός, η νόσος chikungunya και ο ιός Zika, οι οποίες αποτελούν προβλήματα δημόσιας υγείας σε πολλές χώρες παγκοσμίως (WHO, 2012; Weaver SC et al., 2016; Gubler 1997, Rodhain & Rosen 1997). Με δεδομένη την έλλειψη εμβολίων για τον άνθρωπο, εκτός από την ασθένεια του κίτρινου πυρετού, μονόδρομος για τον έλεγχο της μετάδοσης αυτών των ασθενειών αποτελεί η διαχείριση των περιοχών αναπαραγωγής και η χρήση ουσιών που θανατώνουν τις λάρβες (όπως κόκκοι άμμου με το εντομοκτόνο τεμεφώς) ή/και τα ενήλικα άτομα (π.χ. ψεκασμοί νέφους και υπερ-χαμηλού όγκου). Ο έλεγχος των πληθυσμών του

είδους αυτού στηρίχθηκε κυρίως στη χρήση πυρεθροειδών, εξαιτίας της υψηλής και γρήγορης δράσης τους και τις χαμηλής τοξικότητάς τους στα θηλαστικά. Παρόλα αυτά, η εντατική και συχνή χρήση πυρεθροειδών είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικών πληθυσμών *A. aegypti* (Hemingway J et al., 2004; Vontas J et al., 2012).

I. 1.2. Εχθροί καλλιεργειών

Εκτός των παραπάνω φορέων, μία άλλη μεγάλη κατηγορία αρθροπόδων, αποτελούν εκείνα που βλάπτουν τις καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες αντιμετωπίζουν πολυάριθμους επιβλαβείς οργανισμούς όπως μύκητες, ζιζάνια αλλά και αρθρόποδα τα οποία επιτίθενται στις καλλιέργειες καταστρέφοντάς τις (Salma Mazid et al., 2011)· αποτελούν για αυτό το λόγο απειλή για τον αγροτικό τομέα, την ασφάλεια των τροφίμων και γενικότερα την παγκόσμια οικονομία (FAO, 2010; http://www.irac-online.org/pests/). Μεταξύ των οργανισμών που καταστρέφουν τις καλλιέργειες είναι και τα είδη *Trialeurodes vaporariorum, Tuta absoluta, Plutella xylostella, Musca domestica, Bemisia tabaci, Bactrocera oleae* κ.ά..

I. 1.2.1. *Tetranychus urticae*

Τα ακάρεα αποτελούν τον πιο ποικιλόμορφο εκπρόσωπο από το φύλο των αρθροπόδων. Μεταξύ των αραχνοειδών, τα ακάρεα προσβάλλουν καλλιέργειες φρούτων, λαχανικών, καλλωπιστικών φυτών αλλά και άλλα είδη καλλιεργειών. Ένας χαρακτηριστικός εκπρόσωπος αποτελεί το είδος *Tetranychus urticae*. Το είδος αυτό αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς πολυφάγους, φυτοφάγους οργανισμούς έχοντας πάνω από 1100 είδη φυτών ως ξενιστές, εκ των οποίων περισσότερα από 150 είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας (Dermauw et al., 2012; Jeppson et al., 1975). Το παράσιτο αυτό τρέφεται μέσω διάτρησης των ιστών των φυτών από τη χλωροφύλλη και το εσωτερικό περιεχόμενο των κυττάρων προκαλώντας συμπτώματα όπως κιτρίνισμα των φύλλων, μείωση της χλωροφύλλης και διαταραχή της φωτοσύνθεσης με αποτέλεσμα τη νέκρωση του φυλλώματος και τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και εν τέλει την καταστροφή των φυτών (Kropczynska & Tomczyk, 1989). Υπολογίζεται ότι 18 με 22 κύτταρα καταστρέφονται ανά λεπτό από το συγκεκριμένο άκαρι. Εάν δεν ελεγχθούν εγκαίρως τα επίπεδα του πληθυσμού του συνήθως προκύπτει πλήρης αποφύλλωση και καταστροφή του φυτού (Tehri, 2014). Δυστυχώς ο οργανισμός *T. urticae* έχει τεκμηριωθεί ότι αναπτύσσει πολύ γρήγορα ανθεκτικότητα στα ακαρεοκτόνα. Η ταχύτατη ανάπτυξη ανθεκτικότητας δεν προκαλείται μόνο λόγω της εκτεταμένης έκθεσής του σε ακαρεοκτόνα, αλλά επιδεινώνεται από χαρακτηριστικά της βιολογίας του όπως η εξαιρετικά σύντομη διάρκεια ζωής του σε συνδυασμό με τη σχετικά υψηλή γονιμότητα και την αρρενοτόκο αναπαραγωγή του (Grbic, M. et al, 2011; Van Leeuwen et al., 2010). Αυτά τα χαρακτηριστικά τον καθιστούν έναν από τα πιο ανθεκτικούς οργανισμούς αναφορικά με το συνολικό αριθμό ακαρεοκτόνων στα οποία οι πληθυσμοί του είναι ανθεκτικοί (Thomas Van Leeuwen et al., 2010).

I. 2. Έλεγχος επιβλαβών εντόμων

Ο έλεγχος των επιβλαβών εντόμων κρίθηκε απαραίτητος ήδη από τον 18ο αιώνα. Οι βασικές στρατηγικές που εφαρμόζονται με σκοπό τον έλεγχο των πληθυσμών τους κατηγοριοποιούνται σε μεθόδους βιολογικής, χημικής και βιοτεχνολογικής προσέγγισης. Πιο συγκεκριμένα ο βιολογικός έλεγχος ορίζεται ως η μείωση ή ο έλεγχος επιβλαβών πληθυσμών που επιτελείται με τη χρήση φυσικών εχθρών όπως για παράδειγμα με τη χρήση θηρευτών (π.χ. είδος *Coccinella septempunctata*), παρασιτοειδών (π.χ. είδος *Gonatocerus ashmeadi*), και παθογόνων (βακτήρια, μύκητες, και ιών) (Kalia, Anu et al., 2011). Η πιο αποτελεσματική και ευρείας χρήσης μέθοδος είναι η χρήση χημικών ουσιών που έχει ως στόχο την πρόληψη, την καταστροφή, ή την απώθηση των παρασιτικών πληθυσμών. Η χρήση χημικών εντομοκτόνων αποτελεί μία από τις κύριες μεθόδους καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων. Αποτελέσματα της χρήσης αυτής μπορεί να είναι η θανάτωση του εντόμου, η αδυναμία ενηλικίωσης ή η παρεμπόδιση άσκησης βλαβερών συμπεριφορών (http://npic.orst.edu/ingred/ptype/insecticide.html, http://ipmworld.umn.edu/ware-introinsecticides). Διαφορετικής προσέγγισης μέθοδοι με σκοπό την καταπολέμηση επιβλαβών οργανισμών αποτελούν οι τεχνικές SIT (Knipling, E. F., 1955) και RIDL (Thomas et al., 2000). Οι καινοτόμες και φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν την απελευθέρωση, στείρων αρσενικών (SIT) ή πληθυσμών με επικρατή θνησιγόνα γονίδια (RIDL), με σκοπό τη μείωση του πληθυσμού ενός συγκεκριμένου επιβλαβούς είδους.

I. 2.1. Χημικά μέσα

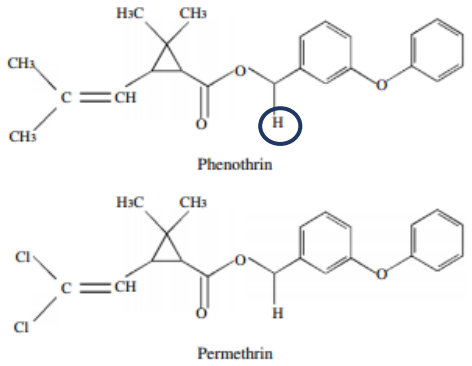
Οι τρέχουσες μέθοδοι ελέγχου βασίζονται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων, τα οποία αποτελούν το πιο αποτελεσματικό εργαλείο για την διαχείριση επιβλαβών πληθυσμών (Harein & Davis,1992, Perez-Mendoza, 1999). Τα σύγχρονα εντομοκτόνα έχουν μία ευρεία γκάμα στόχων στα έντομα. Σύμφωνα με την επιτροπή δράσης για την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (IRAC) (http://www.irac-online.org/modes-of-action/) τα εντομοκτόνα ανάλογα με το μηχανισμό δράσης, των χημικών ουσιών τους, κατηγοριοποιούνται σε αναστολείς της κυτταρικής αναπνοής (όπως τα diafenthiuron, propargite), αναστολείς της ανάπτυξης (όπως τα ανάλογα ορμόνης νεότητας, fenoxycarb, pyriproxyfen), εκείνα που δρουν στο πεπτικό σύστημα των εντόμων (όπως οι τοξίνες *Bacillus thuringiensis)*, ουσίες με άγνωστο ακόμη μηχανισμό δράσης καθώς και εντομοκτόνα που δρουν στο νευρικό σύστημα. Τα εντομοκτόνα που δρουν στο νευρικό σύστημα έχουν ως μοριακό στόχο πέντε συγκεκριμένα κανάλια των νευρικών κυττάρων. Τα κανάλια αυτά είναι, πρώτον, ο υποδοχέας γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) με υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το γονίδιο rdl (στόχος των κυκλοδιενίων και του fipronil), δεύτερον, ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (nAChR) (στόχος για τα νεονικοτινοειδή και τις σπινοσίνες), τρίτον, ο υποδοχέας ρυανοδίνης (στόχος της ρυανοδίνης και των διαμιδίων). Τέταρτος στόχος των εντομοκτόνων αποτελούν το ελεγχόμενο από γλουταμικό κανάλι χλωρίου (στόχος αβερμεκτινών) και πέμπτον το τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου (στόχος του DDT και των πυρεθροειδών) (ffrench-Constant et al., 2016).

Περαιτέρω αναλυτική παρουσίαση των επιβλαβών οργανισμών αλλά και των τρόπων δράσης των εντομοκτόνων βρίσκονται στην ιστοσελίδα (http://www.irac-online.org/modes-of-action/).

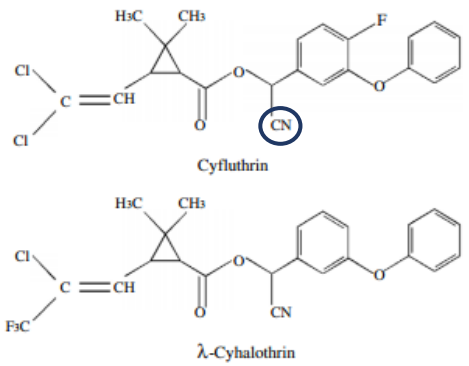
Μία κατηγορία εντομοκτόνων, από τις παραπάνω κλάσεις ουσιών, τα πυρεθροειδή καθώς και η αμπαμεκτίνη (αβερμεκτίνες) δρουν στο νευρικό σύστημα, μεταβάλλοντας τη φυσιολογική λειτουργία των τασεο-ελεγχόμενων διαύλων νατρίου (VGSC) και των ελεγχόμενων από γλουταμικό καναλιών χλωρίου (GluCls) αντίστοιχα, προκαλώντας στα έντομα παράλυση και εν τέλει το θάνατο (Ilias, et al., 2016). Τα δύο αυτά είδη ουσιών παρουσιάζονται παρακάτω.

I. 2.1.1. Πυρεθροειδή

Τα πυρεθροειδή αποτελούν μία κατηγορία εντομοκτόνων που προέρχονται από ενώσεις που παράγονται φυσικά από το γένος των φυτών *Chrysanthemum,* τις πυρεθρίνες (Casida, 1980). Οι φυσικές πυρεθρίνες έχουν εντομοκτόνο δράση, παρόλα αυτά είναι εγγενώς ασταθείς στο ηλιακό φως. Η δομή των πυρεθρινών για αυτό το λόγο τροποποιήθηκε με σκοπό να παράγει περισσότερο σταθερές ενώσεις, τα συνθετικά πυρεθροειδή, διατηρώντας τις επιθυμητές εντομοκτόνες ιδιότητες (Valentine, 1990; Gosselin et al., 1984). Το πρώτο συνθετικό πυρεθροειδές, η αλεθρίνη η οποία ανήκει στα πυρεθροειδή τύπου I, συντέθηκε το 1949. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τα πυρεθροειδή phenothrin και permethrin, με κοινό χαρακτηριστικό την δομή ενός καρβοξυλικού εστέρα κυκλοπροπανίου. Η εντομοκτόνος δράση των παραπάνω πυρεθροειδών ενισχύθηκε περισσότερο με την προσθήκη μίας κυανο-ομάδας που αποτελεί χαρακτηριστικό των πυρεθροειδών τύπου II, όπως τα cyfluthrin και k-cyhalothrin (Anadón et al., 2009).



Εικόνα I1.a Δομή πυρεθροειδών τύπου



Εικόνα I1.b Δομή πυρεθροειδών τύπου II

Κοινό γνώρισμα όλων των πυρεθροειδών ουσιών είναι η παρουσία μιας χαρακτηριστικής ομάδας οξέος, ενός κεντρικού εστέρα και μίας ομάδας αλκοόλης (Anadón et al., 2009).

Σήμερα τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται σε τομείς της γεωργίας, της δασοκομίας, στην κηπουρική αλλά και για οικιακή χρήση (Feo et al., 2010). Επίσης ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, με στόχο τον έλεγχο εντόμων φορέων ασθενειών, προτείνει τη χρήση συγκεκριμένων πυρεθροειδών όπως τα bifenthrin, cyfluthrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin για εσωτερικούς ψεκασμούς κτηρίων (Walker, 2000; Raghavendra et al., 2011), τη χρήση εμβαπτισμένων κουνουπιέρων (Raghavendra et al., 2011; WHOPES, 2005) και ψεκασμούς μεγάλων εκτάσεων από αεροσκάφη (Rayman, 2006).

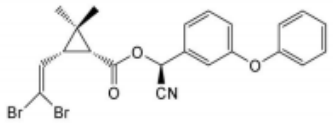
I. 2.1.1. Τρόπος δράσης

Τα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια νατρίου είναι υπεύθυνα για την έναρξη και διάδοση του δυναμικού ενέργειας στα νευρικά και τα ηλεκτρικά διεγέρσιμα κύτταρα (Dong et al., 2014). Τα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια νατρίου εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη των νευρώνων και είναι υπεύθυνα για την έναρξη και τη διάδοση των δυναμικών ενέργειας κατά μήκος του νευρικού άξονα. Τα κανάλια αυτά μεσολαβούν στην αύξηση της διαπερατότητας του νατρίου στην αρχική φάση της ραγδαίας αύξησης του δυναμικού ενέργειας. Καθώς τα κανάλια αυτά αποτελούν το κλειδί στη διαδικασία της διεγερσιμότητας, στα βιολογικά συστήματα, το τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου αποτελεί στόχο πολλών νευροτοξινών (Catterall., 1980; Zlotkin, 1999).

Όταν ένα έντομο έρθει σε επαφή με ένα πυρεθροειδές ο άμεσος φαινότυπος είναι η υπερδιέγερση και το τρέμουλο το οποίο ακολουθείται από ένα φαινότυπο παράλυσης. Αυτά τα συμπτώματα δηλώνουν ότι τα πυρεθροειδή δρουν κυρίως στο νευρομυϊκό σύστημα (Narahashi, 1971). Τα πυρεθροειδή αναστέλλουν τη φυσιολογική δράση του περιφερικού νευρικού συστήματος, μέσω της δράσης τους στα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια νατρίου των νευρικών κυττάρων. Μετά την πρόσδεση του πυρεθροειδούς, το τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου παραμένει ανοιχτό, καθώς το εντομοκτόνο αποτρέπει το κλείσιμό του, είτε μέσω αδρανοποίησης ή είτε μέσω απενεργοποίησης, και με αυτό τον τρόπο το κανάλι διατηρεί συνεχόμενα την ικανότητα αγωγής ιόντων νατρίου. Ο κύριος τρόπος λοιπόν δράσης των πυρεθροειδών συντελείται μέσω μεταβολής της κινητικής των καναλιών νατρίου με αποτέλεσμα την καθυστέρηση του κλεισίματός τους και επαναπόλωσης της μεμβράνης, η οποία οδηγεί στην επαναλαμβανόμενη πυροδότηση των νευρώνων, σπασμούς, παράλυση και εν τέλει το θάνατο του εντόμου (Soderlund & Bloomquist, 1989, Zlotkin et al., 1999; Davies et al., 2007;).

Ένα από τα γνωστά πυρεθροειδή ευρείας χρήσης είναι και η δελταμεθρίνη. Η πρώτη σύνθεση της δελταμεθρίνης (εικόνα I2) πραγματοποιήθηκε το 1974 και από τότε αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές ουσίες της ομάδας των πυρεθροειδών. Χρησιμοποιείται ενάντια σε έντομα που είναι καταστρεπτικά για τις καλλιέργειες και αποτελούν φορείς ασθενειών.

Δελταμεθρίνη



Deltamethrin

Εικόνα I2. Δομή της δελταμεθρίνης.

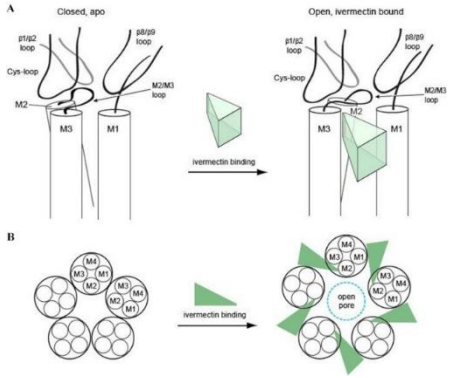
Η δελταμεθρίνη είναι μία άχρωμη και άοσμη ουσία που ως λιπόφιλη δεν είναι διαλυτή στο νερό και ως εκ τούτου είναι εξαιρετικά σταθερή στο φυσικό περιβάλλον. Σε αντίθεση με πολλά πυρεθροειδή, είναι επίσης σταθερή στον αέρα και το φως του ήλιου και εμφανίζει χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά (http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Deltamethrin).

I. 2.1.2. Αβερμεκτίνες

Οι αβερμεκτίνες αποτελούν μία οικογένεια από μακροκυκλικές λακτόνες, που παράγονται από τον ακτινομύκητα του εδάφους *Streptomyces avermitilis* (Clark. et al., 1994; Van Leeuwen et al., 2009). Οι χημικές αυτές ενώσεις ανακαλύφθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1970 ως φυσικά προϊόντα με ανθελμινθικές ιδιότητες (ουσίες κατά παρασιτικών οργανισμών) (Lasota & Dybas, 1991). Κατά τη ζύμωση παράγονται τέσσερα ζεύγη από ομόλογες παρόμοιες ουσίες: οι αβερμεκτίνες A_1, A_2, B_1 και B_2. Η αβερμεκτίνη B_1 (αμπαμεκτίνη, MK-936) είναι το κύριο προϊόν της ζύμωσης και αποτελείται από ένα μίγμα ομόλογων αβερμεκτινών (80% κατ΄ελάχιστο αβερμεκτίνη B_{1a} και 20% αβερμεκτίνη B_{1b}).Οι αβερμεκτίνες χρησιμοποιούνται ως αντιπαρασιτικά φαρμακευτικά προϊόντα σε ανθρώπους και ζώα αλλά και για τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων που ανήκουν σε διάφορες τάξεις όπως τα κολεόπτερα, ισόπτερα, ημενόπερα, δίπτερα και λεπιδόπτερα (McKellar & Benchaoui, 1996; Putter et al., 1981). Οι αβερμεκτίνες έχουν τοξική επίδραση απέναντι σε νηματώδεις, ακάρεα και έντομα (Lasota & Dybas, 1991) και σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο ως παράγοντες προστασίας από είδη νηματωδών, εντόμων και ακαρέων με χρήση τους στις καλλιέργειες, την κτηνοτροφία και ως φαρμακευτικοί παράγοντες για τον άνθρωπο και τα ζώα (Egerton et al., 1979; Campbell et al., 1983; James et al., 1980; Putter et al., 1981).

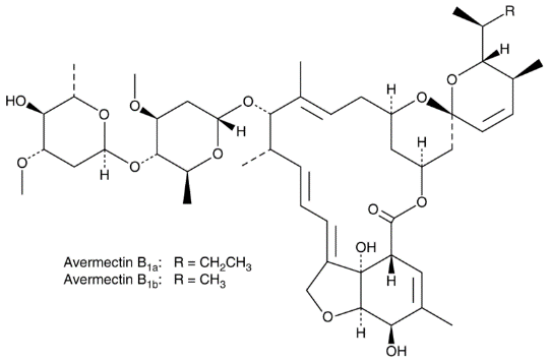
I. 2.1.2. Τρόπος δράσης

Τα ελεγχόμενα από γλουταμικό κανάλια χλωρίου GluCl έχει δειχθεί ότι εκφράζονται, στα έντομα και στα ακάρεα, σε νευρικά και μυϊκά κύτταρα (Adrian J. Wolstenholme, 2012; Shoop et al., 1995). Τα κανάλια GluCl ανήκουν στην οικογένεια καναλιών ιόντων (Cys-loop ligand-gated) τα οποία διαμεσολαβούν στη ανασταλτική συναπτική διαβίβαση σημάτων στο νευρικό σύστημα των ασπονδύλων (Wolstenholme et al., 2012). Τα κανάλια αυτά βρίσκονται αποκλειστικά στα ασπόνδυλα και για αυτό το λόγο αποτελούν εξαιρετικά ειδικούς στόχους πολλών ουσιών. Ουσίες όπως μακροκυκλικές λακτόνες (αβερμεκτόνες και μιλμπεμεκτίνες) χρησιμοποιούνται με σκοπό τον έλεγχο νηματωδών, ακάρεων και εντόμων. Τα κανάλια GluCls αναγνωρίζονται ως ο πρωταρχικός στόχος των αβερμεκτινών σε νηματώδεις και έντομα (Cully et al., 1994, 1996). Η δράση της ιβερμεκτίνης, μίας άλλης αβερμεκτίνης, στο κανάλι GluCl είναι αργή αλλά αποτελεσματική και μη αντιστρεπτή καθιστώντας έτσι το κανάλι ουσιαστικά μη-λειτουργικό. Οι μακροκυκλικές λακτόνες δρουν στα κανάλια GluCls, είτε ενεργοποιώντας τά άμεσα είτε ενισχύοντας την απόκρισή τους στο γλουταμικό (Cully et al., 1994; 1996). Δρουν ως αλλοστερικοί ρυθμιστές καθώς προσδένονται σε διαμεμβρανική περιοχή διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης του L-γλουταμικού, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση μίας δομής ανοιχτού πόρου. Συνοπτικά πρόσδεση μορίων αβερμεκτίνης στο GluCl προκαλεί μη αντιστρεπτό άνοιγμα των καναλιών (εικόνα I3) το οποίο οδηγεί σε εισροή ιόντων χλωρίου, υπερπόλωση και τελικά παράλυση (Mounsey et al., 2007).



Εικόνα I3. Τα κανάλια GluCls είναι γνωστό ότι αποτελούν στόχους μακροκυκλικών λακτονών, αβερμεκτινών (όπως η αμπαμεκτίνη) και ιβερμεκτινών (Piraneo et.al, 2015; Wolstenholme, 2012).

Μία ημισυνθετική αβερμεκτίνη, η ιβερμεκτίνη, χρησιμοποιείται ως φάρμακο (MECTIZAN ®) για τον έλεγχο του νηματώδους *Onchocerca volvulus* που προκαλεί την ασθένεια ογκοκέρκωση, γνωστή επίσης και ως τύφλωση των ποταμών (Greene et al., 1989). Στην κατηγορία των αβερμεκτινών ανήκει και η αμπαμεκτίνη η οποία χρησιμοποιείται παγκοσμίως για τον έλεγχο φυτοφάγων ακαρέων και επιβλαβών εντόμων, γεωργικών και κηπευτικών καλλιεργειών. Λόγω της χαμηλής τοξικότητάς της σε ωφέλιμα αρθρόποδα χρησιμοποιείται πλέον σε προγράμματα Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Παρασίτων (Integrated Pest Management - IPM) (Lasota & Dybas, 1991). Η αμπαμεκτίνη αποτελεί ένα φυσικό προϊόν ζύμωσης του βακτηρίου *Streptomyces avermitilis*(εικόνα Ι4). Η ουσία είναι ιδιαίτερα ασταθής στο ηλιακό φως και διασπάται γρήγορα στα φυτά στο χώμα και το νερό ύστερα από την εφαρμογή της. Μέρος στην αποδόμησή της παίζουν και οι μικροοργανισμοί του εδάφους. Η έκθεση του ανθρώπου είναι σχεδόν μηδαμινή λόγω της μικρής δόσης, περίπου 0,025ppm, που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες (Lasota JA et al., 1990). Η χρήση της αμπαμεκτίνης γίνεται με σκοπό τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων και ακάρεων που προσβάλλουν τις καλλιέργειες καθώς και εντόμων που έχουν σημασία για τη δημόσια υγεία (έντομα φορείς) αλλά και για την καταπολέμηση των ζωικών ενδοπαρασίτων (Riga, M et al., 2014).



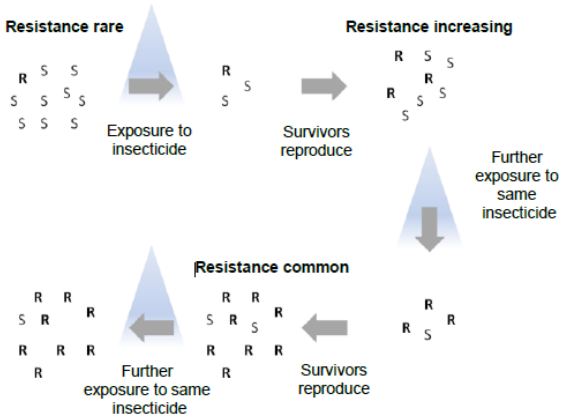
Αμπαμεκτίνη

Εικόνα Ι4. Η δομή της αμπαμεκτίνης. Η αμπαμεκτίνη αποτελείται από ένα μίγμα αβερμεκτινών > 80% αβερμεκτίνης B1a και < 20% αβερμεκτίνη B1b. Αυτές οι δύο ουσίες, B1a και B1b, έχουν παρόμοιες βιολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες (www.caymanchem.com/product/19201/image).

Σχετικά γρήγορα μετά την έναρξη εφαρμογής εντομοκτόνων, όπως η αμπαμεκτίνη, στις καλλιέργειες τεκμηριώθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *T. urticae* σε αυτά τα ακαρεοκτόνα, φαινόμενο που είχε αντίκτυπο στον έλεγχο του πληθυσμού του.

I. 3. Ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα

Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας ορίζει την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα ως τις αλλαγές σε ένα έντομο που αυξάνουν την ικανότητά του να ανθίσταται ή και να ξεπεράσει τις επιπτώσεις από ένα ή περισσότερα εντομοκτόνα. Όταν η συχνότητα των ανθεκτικών εντόμων σε έναν πληθυσμό αυξάνεται (π.χ. μέσω χαρακτηριστικών μηχανισμών ανθεκτικότητας που μεταβιβάζονται από τη μια γενιά στην άλλη), η αποτελεσματικότητα χρήσης ενός εντομοκτόνου τίθεται σε κίνδυνο. Όπως φαίνεται και στην εικόνα I5 η συνεχής εφαρμογή του ίδιου εντομοκτόνου δρα ως παράγοντας επιλογής για τα άτομα ενός πληθυσμού εκείνα που είναι σε θέση να επιβιώσουν, από τις συνιστώμενες συγκεντρώσεις εντομοκτόνου, λόγω της ενυπάρχουσας γενετικής ποικιλομορφίας. Με την πάροδο του χρόνου η πίεση της επιλογής θα οδηγήσει στην εγκαθίδρυση ενός ανθεκτικού πληθυσμού.



Εικόνα I5. Σενάριο ανάπτυξης ανθεκτικότητας πληθυσμού κουνουπιών (IRAC, 2010)

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα υπήρξε καθοριστικής σημασίας παράγοντας που επηρεάζει τον έλεγχο πληθυσμών επιβλαβών οργανισμών για περισσότερο από μισό αιώνα (Sparks et al., 2015). Η πρώτη μελέτη που τεκμηριώνει την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνο δόθηκε στη δημοσιότητα από τους A.L. Melander et al., 1914, πριν από 100 χρόνια με τον εκκεντρικό για την εποχή τίτλο «Can insects become resistant to sprays?» όπου βρήκαν ότι υπήρχαν έντομα της τάξης των ημιπτέρων και αραχνίδια τα οποία ήταν εμφανώς λιγότερο ευαίσθητα, σε σχέση με παλαιότερες μελέτες, στο εντομοκτόνο θειικό ασβέστιο (lime Sulphur) (Melander et al., 1914). Ακολούθως υπήρξαν ορισμένες σποραδικές αναφορές ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα από τα μέσα της δεκαετίας του 1940. Η εποχή αυτή απετέλεσε όμως αφετηρία χρήσης συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων όπως τα DDT, κυκλοδιένια και οργανοφοσφωρικά εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα τη βελτίωση των εντομοκτόνων ως προς την αποτελεσματικότητα αλλά και το εύρος δράσης τους. Λόγω της ευρείας κλίμακας αλλά και επαναλαμβανόμενης χρήσης των παραπάνω «νέων» εντομοκτόνων δεν άργησε και πάλι η εμφάνιση ανθεκτικών πληθυσμών, στις συγκεκριμένες νέες ουσίες, μέσα στα επόμενα χρόνια (εικόνα I6).

Όπως ειπώθηκε και παραπάνω η εξέλιξη ανθεκτικότητας, από τα επιβλαβή έντομα,, αποτελεί ένα συνεχώς αυξανόμενο κίνδυνο που απειλεί την ανθρώπινη υγεία αλλά και τις αγροτικές καλλιέργειες παγκοσμίως (Enayati και Hemingway 2010, Powles και Yu 2010, Wolstenholme και Kaplan 2012, Coetzee και Koekemoer 2013).

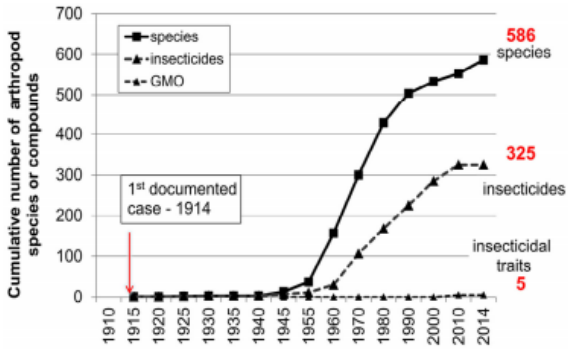
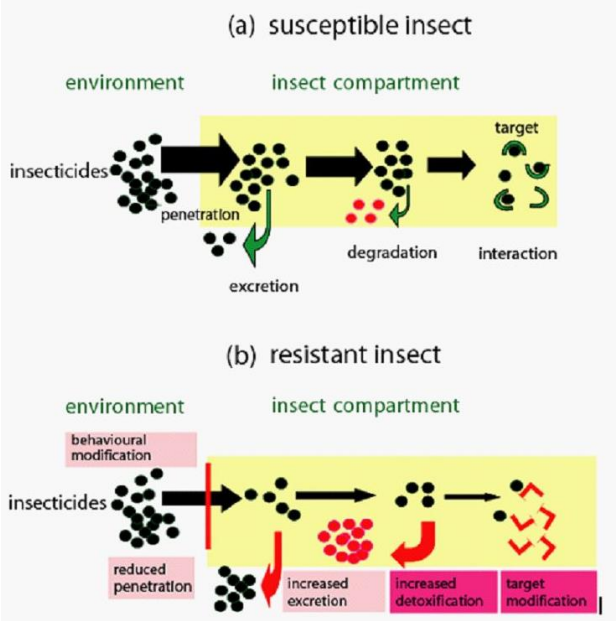


Fig. 1. Cumulative increase in (a) the number of species resistant to one or more insecticides, (b) number of insecticides for which one or more species has shown resistance, and (c) number of GMO traits for which resistance has been reported.Data adapted from: [2,3,47–50] and David Mota-Sanchez, Michigan State University, personal communication, 2014.

Εικόνα Ι6. Αθροιστική αύξηση του αριθμού των ειδών αρθροπόδων τα οποία είναι ανθεκτικά σε ένα ή περισσότερα εντομοκτόνα, (β) αριθμός εντομοκτόνων για τα οποία ένα ή περισσότερα είδη εμφάνισαν ανθεκτικότητα (Thomas C. Sparks et al., 2015).



Εικόνα Ι7. Σχηματική απεικόνιση πιθανών αλλαγών στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά ενός εντόμου που σχετίζονται με ανθεκτικούς φαινότυπους (το παράδειγμα αφορά την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα εντόμων-φορέων ελονοσίας) (Lapied et al., 2009).

Η βάση δεδομένων (http://www.pesticideresistance.org/) αποτελεί την πιο ενημερωμένη πύλη για πληροφορίες σχετικά με την ανθεκτικότητα αρθροπόδων απέναντι στα εντομοκτόνα.
Τα έντομα διαθέτουν ένα σύνολο από μηχανισμούς (εικόνα Ι7) που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα απέναντι στα εντομοκτόνα οι οποίοι αναλύονται εν συντομία παρακάτω.

I. 3.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

1. Ανθεκτικότητα διαπερατότητας

Τροποποιήσεις στο επιδερμίδιο των εντόμων ή στα τοιχώματα του πεπτικού συστήματος που εμποδίζουν ή επιβραδύνουν την απορρόφηση ή διείσδυση των εντομοκτόνων μπορεί να βρεθούν σε μερικά ανθεκτικά έντομα. Αυτός ο μηχανισμός αντίστασης δεν είναι εξειδικευμένος και μπορεί να συσχετίζεται με εμφάνιση ανθεκτικότητας απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων.

2. Συμπεριφορική ανθεκτικότητα

Ανθεκτικά έντομα μπορεί να ανιχνεύσουν ή αναγνωρίσουν έναν κίνδυνο και να αποφύγουν την τοξίνη. Αυτός ο μηχανισμός ανθεκτικότητας έχει αναφερθεί για αρκετές κατηγορίες εντομοκτόνων, συμπεριλαμβανομένων των οργανοχλωρινών, οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και των πυρεθροειδών. Η ανθεκτικότητα απέναντι στα εντομοκτόνα μέσω συγκεκριμένης συμπεριφοράς δεν έχει την ίδια σημασία όπως η ανθεκτικότητα που προκύπτει από τη φυσιολογία του εντόμου, αλλά μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ένας συμπαράγοντας που οδηγεί στην αποφυγή των θανατηφόρων δόσεων ενός εντομοκτόνου. Η ανθεκτικότητα που οφείλεται σε συμπεριφορά (αποτροπή) περιγράφεται ως η ικανότητα ενός εντόμου να απομακρύνεται (διαφυγή) από μία περιοχή η οποία έχει ψεκαστεί με εντομοκτόνο. Αυτός ο τύπος απόκρισης μπορεί να διαχωριστεί σε άμεση επαφή-διέγερση (συχνά αναφερόμενο ως ερεθισμός) και στην μη επαφή-απωθητική δράση.

3. Η μεταβολική ανθεκτικότητα:

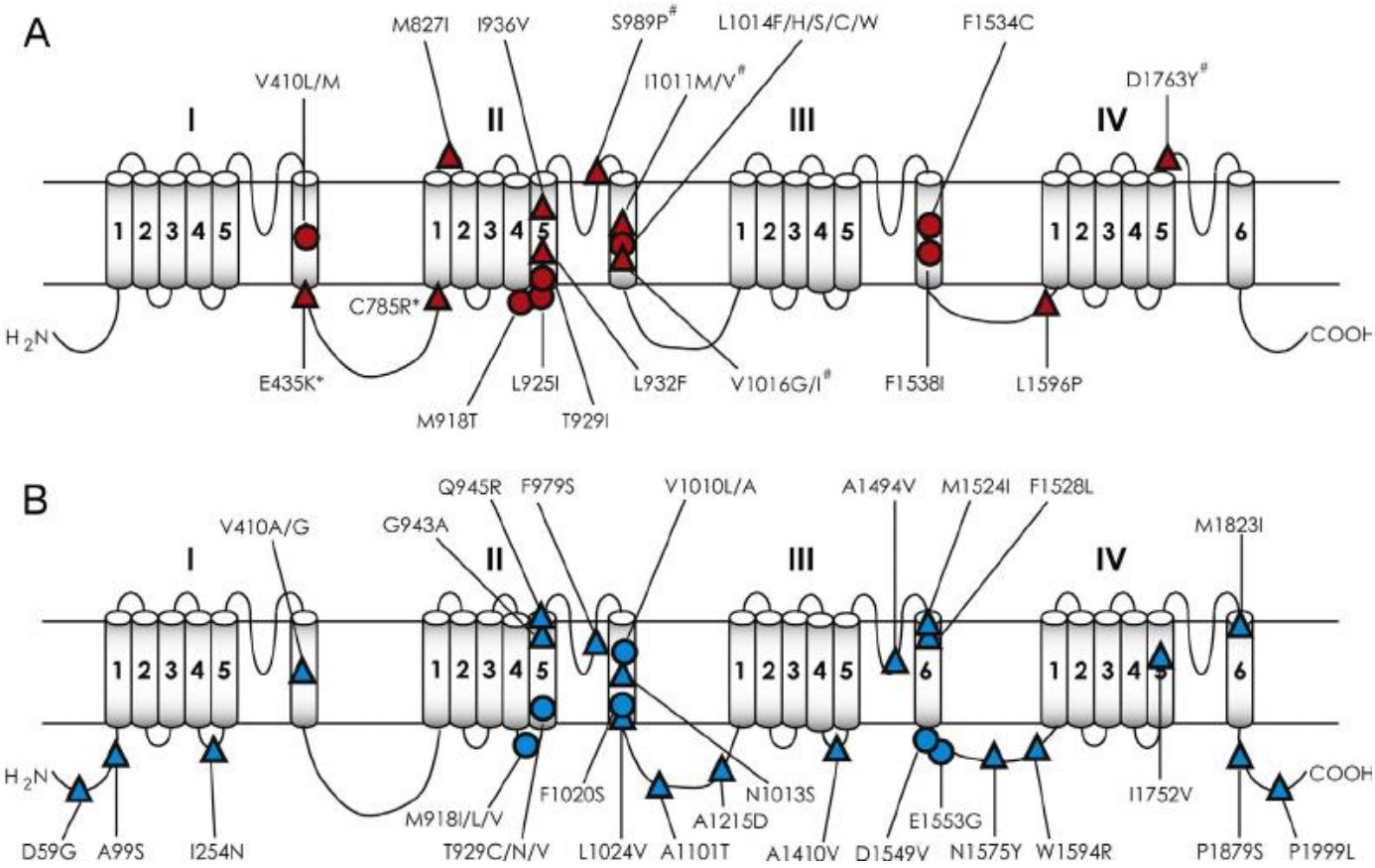
Η μεταβολική ανθεκτικότητα αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό ανθεκτικότητας στα έντομα. Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στα ενζυμικά συστήματα των εντόμων τα οποία βοηθούν στην αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών-εντομοκτόνων. Αρκετά ένζυμα αποτοξικοποίησης έχουν συσχετισθεί με την αποτοξίνωση των φυτικών τοξινών και όλα τα είδη των χημικών ουσιών συμπεριλαμβανομένων των εντομοκτόνων. Τρεις μεγάλες ομάδες ενζύμων είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της μεταβολικής ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα όπως οι οργανοχλωρίνες, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθροειδή, αυτές είναι οι καρβοξυλικές εστεράσες (CES), οι μονοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 καθώς και οι τρανφεράσες γλουταθειόνης (GST).

4. Ανθεκτικότητα στόχου:

Ο δεύτερος πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας των εντόμων είναι η ανθεκτικότητα στόχου. Τα εντομοκτόνα, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, έχουν συγκεκριμένους μοριακούς στόχους που συνήθως βρίσκονται στο νευρικό σύστημα (παραδείγματος χάριν τα πυρεθροειδή στοχεύουν το τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου). Ο μοριακός αυτός στόχος (π.χ. πρωτεϊνικό κανάλι) του εντομοκτόνου, μπορεί να φέρει ορισμένες μεταλλαγές, σε ανθεκτικά στελέχη εντόμων, αποτρέποντας έτσι την πρόσδεση ή την αλληλεπίδραση του εντομοκτόνου με το στόχο του, με αποτέλεσμα τη μείωση ή και εξάλειψη της δράσης του εντομοκτόνου.

I. 3.1.A. Ανθεκτικότητα στόχου στα πυρεθροειδή

Ένας σημαντικός μηχανισμός ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή συνδέεται με μεταλλαγές στόχου στο τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου (VGSC), γνωστές με το όνομα knock-down resistance (kdr ή super-kdr). Μεταλλαγές στο κανάλι VGSC έχουν βρεθεί σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών : *M. domestica* (Ingles et al., 1996), *Heliothis virescens* (Park et al., 1999), *Haematobia irritans* (Guerrero et al., 1997), *Plutella xylostella* (Schuler et al., 1998), *Sitophilus zeamais* (Araujo et al., 2011), *Pediculus capitis* (Lee et al., 2000), *Frankliniella occidentalis* (Forcioli et al., 2002), *Ctenocephalides felis* (Bass et al., 2004), *Rhipicephalus microplus* (He et al., 1999) *Tetranychus urticae* (Tsagkarakou et al., 2009), *Drosophila melanogaster* (Pittendrigh B et al., 1997) και στα κουνούπια *An. gambiae* (Pinto et al., 2006), του γένους *Culex* (T. G. Davies et al., 2007a) αλλά και το είδος *Ae. aegypti* (Brengues et al., 2003; Harris et al., 2010; Martins et al., 2009a, b; Saavedra-Rodriguez et al., 2007) (εικόνα I8).

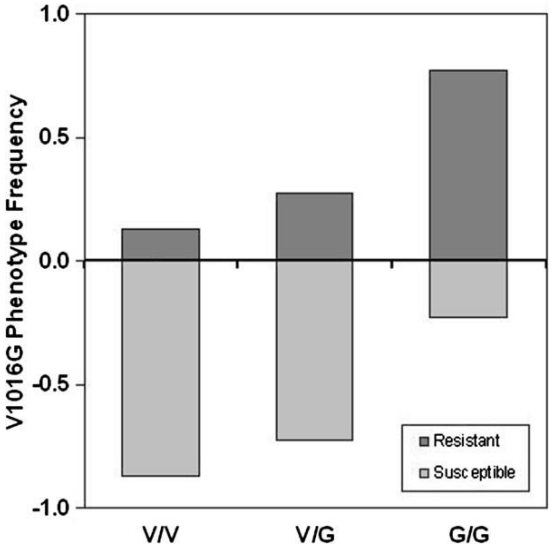


Εικόνα I8. Απεικόνιση των μεταλλαγών του καναλιού VGSC οι οποίες σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε πυρεθροειδή. Στην εικόνα Α βρίσκονται οι μεταλλαγές που έχουν εξεταστεί με την τεχνική voltage-clamp σε ωοκύτταρα του βατράχου *Xenopus*. (Β) μεταλλαγές που δεν έχουν εξεταστεί. Μεταλλαγές που έχουν βρεθεί σε πάνω από ένα είδη σημειώνονται με κύκλους σε αντίθεση με αυτές που σημειώνονται με τρίγωνα και έχουν βρεθεί σε ένα μόνο είδος. Μεταλλαγές με το σύμβολο #, όπως η S989P, δεν είχαν κάποιο αποτέλεσμα μείωσης ευαισθησίας του καναλιού στα εντομοκτόνα περμεθρίνη και δελταμεθρίνη (Οι μεταλλαγές είναι αριθμημένες με βάση την αμινοξική θέση στην πρωτεΐνη AaNav (GenBank accession no. EU399181). Έτσι οι μεταλλαγές S996P, I1018V/M και V1023G/I αντιστοιχούν στις μεταλλαγές S989P, I1011V/M, και V1016G/I του καναλιού νατρίου της οικιακής μύγας (Du et al., 2013)).

Από το σύνολο των μεταλλαγών που έχουν αναφερθεί για το γονίδιο του καναλιού VGSC, του *Ae. aegypti*, λίγες έχουν επιβεβαιωθεί ότι σχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας απέναντι στα πυρεθροειδή.

Μεταλλαγές σε αυτή την πρωτεΐνη (VGSC) την καθιστούν λιγότερο ευαίσθητη στην πρόσδεση πυρεθροειδών και DDT (Soderlund DM et al., 2003). Σημαντική παρατήρηση στην περίπτωση αυτή είναι ότι ο ανθεκτικός αυτός φαινότυπος δεν επηρεάζεται από αναστολείς ενζύμων που εμπλέκονται στη μεταβολική ανθεκτικότητα. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία των μεταλλαγών στο κανάλι νατρίου είναι ικανή για την έκφραση ανθεκτικών φαινοτύπων στα παραπάνω εντομοκτόνα. Οι σημειακές μεταλλαγές στο κανάλι νατρίου που σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία του νευρικού συστήματος στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (αλλά και το DDT) είναι γνωστές με το όνομα knockdown resistance (kdr).

Από τις παραπάνω kdr μεταλλαγές η μεταστροφή του αμινοξέος βαλίνη προς γλυκίνη, στην επικράτεια II, της πρωτεΐνης VGSC (V1016G) του είδος *Ae. aegypti* έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή περμεθρίνη και δελταμεθρίνη (Brengues et al., 2003) (εικόνα Ι9). Η μεταλλαγή αυτή φαίνεται να περιορίζεται σε πληθυσμούς της Ασίας (Rajatileka S et al., 2008; Kawada H et al. 2009 ; Srisawat R et al., 2010 ; Kawada H et al., 2014 ; Stenhouse SA et al., 2013 ; Wuliandari J et al., 2015). Επίσης και άλλες μεταλλαγές όπως οι F1534C, V1016I, S989P και άλλες έχουν συσχετιστεί με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή.



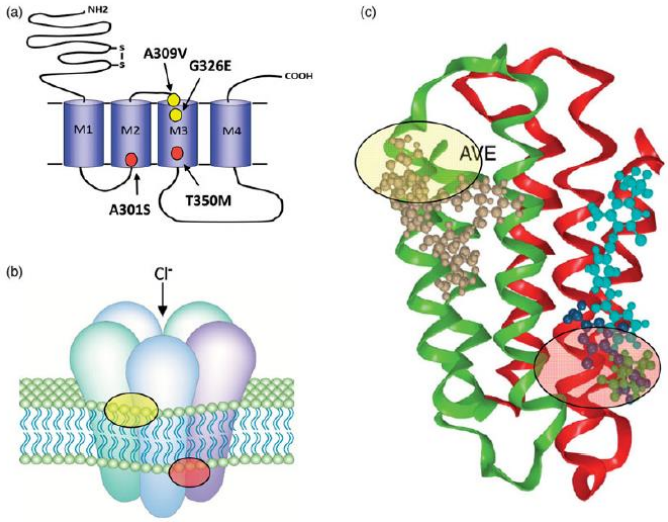
Εικόνα Ι9. Συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων V1016G και των φαινοτύπων ανθεκτικότητας στη δελταμεθρίνη σε κουνούπια του είδους *Ae. aegypti* (Stenhouse et al., 2013).

Στην εργασία των Du et al., 2013 πραγματοποιήθηκε λειτουργικός χαρακτηρισμός της μεταλλαγών V1016G/I, I1011M/V, S989P, και D1763Y, σε ωοκύτταρα *Xenopus* με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας (εικόνα Ι8). Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν ότι η μεταλλαγή V1016G μειώνει την ευαισθησία του καναλιού AaNav1-1 σε δύο πυρεθροειδή εντομοκτόνα, την περμεθρίνη και τη δελταμεθρίνη. Φαίνεται ότι η θέση V1016 βρίσκεται μέσα στη θέση δέσμευσης των πυρεθροειδών επομένως παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην πρόσδεσή τους στο κανάλι VGSC. Μία άλλη μεταλλαγή στην ίδια θέση, η μεταλλαγή V1016I, δε βρέθηκε να έχει τον ίδιο φαινότυπο με αυτόν της V1016G (Du et al., 2013). Ενδεχομένως άλλες πυρεθροειδείς ουσίες ή το εντομοκτόνο DDT να επηρεάζονται από τη μεταλλαγή V1016I.

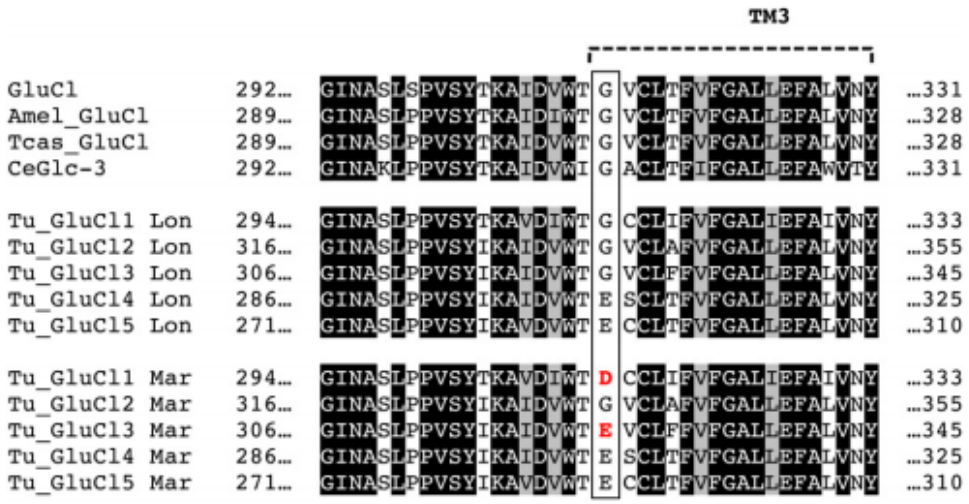
I. 3.1.B. Ανθεκτικότητα στόχου στις αβερμεκτίνες

I. 3.1.B.2. G323D και G326E στο γονίδιο *GluClalpha*

Μεταλλαγές στο κανάλι GluCl σχετίζονται με ανθεκτικότητα στις αβερμεκτίνες σε αρκετά ασπόνδυλα. Η πρώτη μεταλλαγή στόχου (P299S) που σχετίστηκε με ανθεκτικότητα στην ιβερμεκτίνη βρέθηκε στο κανάλι GluClalpha της *Drosophila melanogaster*. Η συσχέτιση της μεταλλαγής P299S με την ανθεκτικότητα στην ιβερμεκτίνη επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας, σε ωοκύτταρα *Xenopus* (Kane et al., 2000). Μεταλλαγές στα κανάλια GluCla1, GluCla2 και GluCla3 έχουν βρεθεί και σε στελέχη του είδους *Caenorhabditis elegans* ανθεκτικά στην ιβερμεκτίνη (Dent et al., 2000). Μεταλλαγή στο κανάλι GluCl έχει επίσης βρεθεί στο είδος *P. xylostella* η οποία σχετίζεται με ανθεκτικότητα στην αμπαμεκτίνη (Wang et al., 2016). Μοντελοποίηση ομολογίας (homology modeling) έδειξε ότι η μεταλλαγή που βρέθηκε στην *P. xylostella* δεν αλλάζει κάποια θέση κλειδί του εντομοκτόνου αλλά αλλάζει την πρόσδεση της αμπαμεκτίνης μέσω αλλοστερικού μηχανισμού (Wang et al., 2016). Στο είδος *T. urticae* οι Kwon et al, (2010) ανακάλυψαν τη σημειακή μεταλλαγή G323D στο γονίδιο GluCl1. Η μεταλλαγή αυτή συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα ανθεκτικότητας στην αμπαμεκτίνη (17,9 fold). Η έρευνα των Dermauw et. al (2012) έφερε στο φως και μία επιπλέον σημειακή μεταλλαγή, που σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε αμπαμεκτίνη, την G326E στο GluCl3. Οι δύο αυτές μεταλλαγές G323D και G326E, στα GluCl1 και GluCl3, βρέθηκαν σε ένα εξαιρετικά ανθεκτικό στέλεχος τετρανύχου (>2000 φορές) (εικόνες I10, I11)(Dermauw et. al, 2012).



Εικόνα I10. a). Τα κανάλια GABA και GluCl έχουν παρόμοιες δομές. Κάθε υπομονάδα των καναλιών έχει ένα μεγάλο αμινοτελικό άκρο (πρόσδεση συνδέτη) και τέσσερις διαμεμβρανικές επικράτειες (M1–M4). Η λειτουργική διάταξη του υποδοχέα αποτελείται από ένα πενταμερές το οποίο σχηματίζει ένα ειδικό για το χλώριο κανάλι το οποίο ανοίγει ύστερα από την πρόσδεση (GABA)/ γλουταμικού. Οι κίτρινοι κύκλοι υποδεικνύουν τις θέσεις των μεταλλαγών στο κανάλι GluCl που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στην αβερμεκτίνη. b). η αντίστοιχη θέση των μεταλλαγών στον λειτουργικό, πενταμερή υποδοχέα. c). δομικό μοντέλο όπου παρουσιάζεται η θέση πρόσδεσης της αβερμεκτίνης (AVE, avermectin και FIP, fipronil)(Casida & Durkin, 2015).



Εικόνα Ι11.. Στοίχιση αμινοξικής αλληλουχίας της διαμεμβρανικής επικράτειας 3 (MT3) του καναλιού GluCl από τα είδη *D. melanogaster* (GluCl), *A. mellifera* (Amel_- GluCl), *T. castaneum* (Tcas_GluCl), *C. elegans* (CeGlc-3) και τα στελέχη London (Lon) και MAR-AB (Mar) του *T. urticae* (Tu_GluCl1, Tu_GluCl2, Tu_GluCl3, Tu_GluCl4, Tu_GluCl5). Με κόκκινο υποδεικνύεται η παρουσία των μεταλλαγών G323D και G326E που βρέθηκαν σε ένα ανθεκτικό στέλεχος τετρανύχου.

Ι. 4. Προσεγγίσεις και μέθοδοι για τη μελέτη της ανθεκτικότητας

Η ανάλυση φαινοτύπων ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα και η σύνδεσή τους με τους μηχανισμούς μεταβολικής ή/και μηχανισμούς ανθεκτικότητας στόχου, όπως και η συσχέτισή τους με συγκεκριμένα γονίδια και μεταλλαγές, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέσα από διάφορες προσεγγίσεις και τεχνικές, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω:

Ι.4.1. Ορισμός ανθεκτικού φαινοτύπου

Ι.4.1.α Βιοδοκιμές

Μία από τις βασικές μεθόδους, μέσω της οποίας είναι δυνατή η ανίχνευση και η μέτρηση των επιπέδων ανθεκτικότητας αλλά και η συσχέτιση με πιθανούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας, είναι οι βιοδοκιμές τοξικότητας. Οι κλασικές βιοδοκιμές αποτελούν το πρώτο βήμα με σκοπό τη σύγκριση των επιπέδων ανθεκτικών φαινοτύπων μεταξύ ενός ανθεκτικού στελέχους και ενός ευαίσθητου, που πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ή περισσότερων εντομοκτόνων. Η χρήση ουσιών που έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης ή/και ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες μπορεί να διαλευκάνει τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του προς μελέτη ανθεκτικού στελέχους. Παραδείγματος χάριν όπως αναφέρει και το κεφάλαιο (Ι. 3.1.4.1. V1016G), βρέθηκε ότι παρουσία μεταλλαγών kdr (ανθεκτικότητα στόχου), η χρήση των ουσιών DDT και πυρεθροειδών, είναι ικανή να προσδώσει ανθεκτικότητα απέναντι στα πυρεθροειδή και το DDT παρόλο που αυτές οι δύο ουσίες ανήκουν σε διαφορετική εντομοκτόνο κλάση (φαινόμενο διασταυρωτής ανθεκτικότητας (cross-resistance), Soderlund & Bloomquist, 1990; Soderlund, 1997). Βιοδοκιμές στα προς μελέτη ανθεκτικά στελέχη με τη χρήση των δύο διαφορετικών ουσιών μπορεί να εξακριβώσει τη συμμετοχή μηχανισμών ανθεκτικότητας στόχου.

Ένα άλλο είδος βιοδοκιμών αποτελούν οι συνδυαστικές βιοδοκιμές με τη χρήση συνεργιστών. Οι συνεργιστές αποτελούν μη τοξικές ουσίες που ενισχύουν την τοξικότητα των εντομοκτόνων, καθώς αναστέλλουν τη δράση των μεταβολικών ενζύμων (π.χ. P450). Η χρήση των συνεργιστών σε βιοδοκιμές είναι ένας σχετικά απλός τρόπος για τη διερεύνηση του

ρόλου διαφορετικών ενζύμων στη μεταβολική ανθεκτικότητα. Γνωστοί συνεργιστές είναι το verapamil ως αναστολέας των αντλιών εκροής P-γλυκοπρωτεΐνης, οι ουσίες EN 16-5 και DEF ως αναστολείς καρβοξυλεστερασών, το piperonyl butoxide (PBO) ως αναστολέας των ενζύμων P450s (Chouaïbou et al., 2014). Εάν, σε ένα προς μελέτη ανθεκτικό στέλεχος, ο φαινότυπος ανθεκτικότητας βασίζεται σε κάποιο ποσοστό σε μεταβολικά ένζυμα, το στέλεχος που εκτίθεται πριν τη βιοδοκιμή σε συνεργιστές θα εμφανίζει μειωμένα επίπεδα ανθεκτικότητας.

I.4.1.b Βιοχημικές μέθοδοι

Με σκοπό τη μελέτη συνεισφοράς της μεταβολικής ανθεκτικότητας, σε ένα ανθεκτικό στέλεχος, έχουν αναπτυχθεί μία σειρά από κιτ τα οποία παρέχουν πληροφορίες για την ενζυμική δραστικότητα, σε ομογενοποιημένους ιστούς του προς μελέτη στελέχους. Τα κιτ αυτά χρησιμοποιούν διάφορα μελετημένα υποστρώματα μεταβολικών ενζύμων, π.χ. P450s, όπως τα coumarin, resorufin, και fluorescein για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας (Wheelock & Scott 1992, Donato et al. 2004). Η μέθοδος αυτή είναι ποσοτική αλλά όχι ποιοτική, παρέχοντας πληροφορία για το ποσοστό συνεισφοράς των μεταβολικών ενζύμων σε ανθεκτικά στελέχη.

I.4.2 Μελέτες συσχέτισης ανθεκτικότητας με μοριακούς δείκτες

I.4.2.a Αναγνώριση γονιδιακών μεταλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα

Σύγκριση στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών σε γονίδια που σχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένα εντομοκτόνα μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων μεταλλαγών ανθεκτικότητας.

Παραδείγματος χάριν από πειράματα φυσιολογίας ήταν γνωστό ότι τα πυρεθροειδή επηρεάζουν τη λειτουργία των τασεο-ελεγχόμενων καναλιών νατρίου (Lund & Narahashi, 1983). Ο φαινότυπος ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή και το DDT είχε βρεθεί ήδη από το 1954 στη *Musca domestica* (Milani, 1954). Παρόλα αυτά από το 1996 και μετά βρέθηκαν συγκεκριμένες μεταλλαγές στο τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου της *Musca domestica*, που συσχετίζονται με το φαινότυπο ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή και το DDT (Williamson et al., 1996a). Επίσης πειράματα των Pauron et al., το 1989 ανέδειξαν ότι, παρουσία των μεταλλαγών kdr, τα πυρεθροειδή εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για το κανάλι νατρίου. Με βάση αυτά τα στοιχεία συνέκριναν ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη *A. gambiae* και βρήκαν συγκεκριμένες μεταλλαγές δείκτες των ανθεκτικών στελεχών. Αυτό το αποτέλεσμα τελικά οδήγησε στην ανάπτυξη ενός διαγνωστικού, με βάση την τεχνική PCR, μέσω του οποίου είναι δυνατή η ανίχνευση ανθεκτικών αλληλομόρφων στο πεδίο.

I.4.2.c Γονιδιακή έκφραση

Τεχνικές μικροσυστοιχιών, NGS ή αλληλούχησης RNA αποτελούν εργαλεία με σκοπό την ανίχνευση των μεταβολικών ενζύμων που συμμετέχουν σε ανθεκτικούς φαινοτύπους. Τα επίπεδα έκφρασης (qPCR) των γονιδίων αυτών συγκρίνονται με ευαίσθητα (μη ανθεκτικά) στελέχη. Για παράδειγμα οι David et al., 2005 κατασκεύασαν μία μικροσυστοιχεία με στόχο την εποπτεία των επιπέδων έκφρασης μεταβολικών ενζύμων μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών του *Anopheles gambiae*.

Αντίστοιχα, σε πειράματα με χρήση της τεχνικής qPCR αποδείχθηκε ότι ένα συγκεκριμένο γονίδιο (CYP4G61) υπερ-εκφράζεται σε ανθεκτικά στο Pyriproxyfen στελέχη του είδους *Trialeurodes vaporariorum* (Karatolos et al., 2012). Τελευταία πειράματα με NGS στο είδος *Aedes albopictus* αποκάλυψαν την υπερ-έκφραση εστερασών σε ανθεκτικά στο τεμεφώς στελέχη (Grigoraki et al., 2015).

I.4.2.c: Γενετική χαρτογράφηση και μελέτες γενετικής συσχέτισης

Η ύπαρξη γονιδιακής πληροφορίας για ένα οργανισμό δίνει τη δυνατότητα χαρτογράφησης συγκεκριμένων περιοχών (genetic loci) του γονιδιώματος. Μέσω αυτής της προσέγγισης είναι δυνατή η διερεύνηση της γενετικής δομής ενός φαινοτυπικού χαρακτηριστικού, η εύρεση-αναγνώριση υποψήφιων γονιδίων υπεύθυνων για ένα συγκεκριμένο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό δύναται επίσης η πληροφορία για τον τρόπο με τον οποίο ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό εξελίσσεται (QTL mapping) (Hawthorne, 2003; Heckel, 2003). Σε αρκετές μελέτες γίνεται χρήση γνωστών δεικτών με σκοπό την αναγνώριση γενομικών περιοχών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα (QTL – Quantitative Trait Loci). Σε αυτές τις μελέτες κατασκευάζεται ένας χάρτης σύνδεσης-συσχέτισης με πειράματα διασταυρώσεων μεταξύ στελεχών που διαφέρουν σε ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά. Μία ακόμη προσέγγιση χαρτογράφησης (QTL mapping) είναι και η τεχνική Bulk Segregant Analysis (BSA). Σε αυτή την τεχνική ομάδες ατόμων, ιδανικά γενετικά πανομοιότυπων (inbred lines), μελετώνται σε μία κοινή και συγκεκριμένη γενωμική περιοχή, η οποία ευθύνεται για ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό διαφορετικό μεταξύ των ομάδων. Τα δείγματα ελέγχονται με διάφορους δείκτες (RFLP, RAPD) και αυτοί που εμφανίζονται πολυμορφικοί συνδέονται με τη συγκεκριμένη γενετική περιοχή (Michelmore et al., 1991).
Η συμβολή γνωστών μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα (target site mutations) ελέγχονται με γενετικές μελέτες συσχέτισης, π.χ. με τη χρήση ατόμων ίδιου γενετικού υποβάθρου (isogenic lines) ή την εισαγωγή μεταλλαγών σε ένα ευαίσθητο γενετικό υπόβαθρο.

I.4.3 Αξιολόγηση συσχέτισης μεταξύ γονιδιακών δεικτών και ανθεκτικών φαινοτύπων

i). Οι μελέτες in silico αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο με σκοπό τη διευκρίνιση της στερεοδιάταξης που απαιτείται για την πρόσδεση των εντομοκτόνων με τα ένζυμα αποτοξικοποίησης ή/και τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες-στόχους των εντομοκτόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κατασκευή ενός ομόλογου μοντέλου για το τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου της οικιακής μύγας που βασίστηκε σε κρυσταλλικές δομές καναλιού καλίου από κύτταρα εγκεφάλου αρουραίου (O'Reilly et al., 2006; Long et al, 2005a;b).
ii). Οι μέθοδοι in vitro περιλαμβάνουν την ετερόλογη έκφραση ενζύμων αποτοξικοποίησης σε βακτήρια, βακιλοϊούς, αλλά και στις ζύμες, με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητάς τους στο μεταβολισμό εντομοκτόνων. Χρήση τεχνικών ανάλυσης φασματοσκοπίας μάζας (mass spectrometry, MS) βοηθά στην εξακρίβωση της μοριακής θέσης των εντομοκτόνων την οποία υδροξυλιώνουν τα ένζυμα P450 (X Li et al., 2007).

iii). Μία ακόμη μέθοδο αποτελεί η εφαρμογή μελετών ηλεκτροφυσιολογίας η οποία έχει αναφερθεί στην παρούσα εργασία (ενότητα I.3.1.4.1. V1016G), μέσω της οποίας είναι δυνατή η μελέτη μεταλλαγμένων πρωτεϊνών - στόχων εντομοκτόνων, σε εντομοκτόνες ουσίες, in vitro σε ωοκύτταρα *Xenopus* (Du et al., 2013).

iv). Μέθοδοι λειτουργικής ανάλυσης **in vivo** : αποτελούν εξαιρετικής σημασίας μεθόδους αφού είναι δυνατή η μελέτη ενός μηχανισμού ανθεκτικότητας άμεσα in vivo στο ίδιο οργανισμό ή μέσω εκτοπικής έκφρασης.

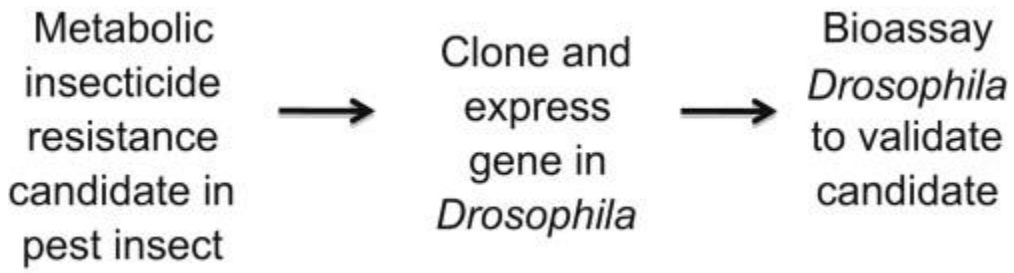
iv.a). RNAi: η μέθοδος σίγησης RNA έχει ως στόχο τη μείωση έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταβολική ανθεκτικότητα. Μέσω της μεθόδου αυτής μπορεί να εκτιμηθεί η συνεισφορά των μεταβολικών ενζύμων ανθεκτικών στελεχών. Παρόλο που η χρήση της in vivo στα έντομα εμφανίζει προβλήματα (τραυματισμός εντόμου, ελλιπή διασυστηματική κατανομή, έλλειψη ιστοειδικότητας) νέες μέθοδοι πρόσληψης όπως μέσω διαγονιδιακών φυτών (τροφής) εμφανίζονται περισσότερο αποτελεσματικές (Price et al., 2008).

iv.b). Διαγονίδια: η εκτοπική έκφραση γονιδίων αποτοξικοποίησης επιβλαβών εντόμων στη *Drosophila melanogaster* αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Daborn et al., 2012; Riveron et al., 2013; Zhu et al., 2010; N. Pavlidi et al, 2012, Riga et al. 2015).

Ιδιαίτερης σημασίας για την in vivo λειτουργική μελέτη μεταλλαγών, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στόχου σε εντομοκτόνα, αποτελεί και η χρήση της τεχνικής CRISPR/Cas9 στη *Drosophila melanogaster* η οποία αναλύεται παρακάτω (Somers et al., 2015; Zimmer et al., 2016; Douris et al., 2016, 2017).

I. 5. Χρήση του εντόμου *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο για τη μελέτη της ανθεκτικότητας

Η πρώτη καταγεγραμμένη εργαστηριακή χρήση της *Drosophila* είναι από την ομάδα του William Castle στο Harvard το 1901, παρόλα αυτά ο «πατέρας» της μελέτης της *Drosophila* αδιαμφισβήτητα είναι ο Thomas Hunt Morgan (R.E. Kohler et al., 1994). Από τις αρχές του 20ού αιώνα λοιπόν ο οργανισμός *Drosophila melanogaster* χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα όχι μόνο με σκοπό τη διεύρυνση των γνώσεων που αφορούν τον καθεαυτό οργανισμό αλλά με στόχο τη διερεύνηση των αρχών που διέπουν βασικές βιολογικές διαδικασίες (Roberts et al., 2006). Με σκοπό τη διαλεύκανση των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα των εντόμων ο Wilson (1988) πρότεινε τον οργανισμό *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο μελέτης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα (Wilson et al., 1988). Ανακαλύψεις μεταλλαγών ανθεκτικότητας στόχου στη δροσόφιλα βοήθησαν στο χαρακτηρισμό μηχανισμών ανθεκτικότητας των επιβλαβών-παρασιτικών ειδών (ffrench-Constant et al., 1992; Morton, 1993; Perry et al., 2007). Επίσης πολλά γονίδια μεταβολικών ενζύμων, όπως των P450 και GSTs, που σχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας έχουν βρεθεί και μελετηθεί από πληθυσμούς της *D. melanogaster* (εικόνα I12) (Bogwitz et al., 2005; Daborn et al., 2002).



Εικόνα I12. Η *Drosophila melanogaster* ως μοντέλο για τη μεταβολική (αντίστοιχα και για την στόχου) ανθεκτικότητα (Daborn 2012)

Ακόμη πιο πρόσφατα οι μελέτες των Somers et al., 2015, Christoph T. Zimmer et al., 2016 και Vassilis Douris et al., 2016, 2017 αναδεικνύουν τη χρησιμότητα του μοντέλου *Drosophila melanogaster* με σκοπό τη μελέτη μηχανισμών ανθεκτικότητας, σε ένα ορισμένο γενετικό υπόβαθρο. Το είδος *Drosophila melanogaster* έχει ήδη χρησιμοποιηθεί από το 2015 ως μοντέλο με σκοπό την αναγνώριση και τη λειτουργική μελέτη μεταλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Jason Somers et al., 2015, Christoph T. Zimmer et al., 2016, Vassilis Douris et al., 2016). Η πρόοδος της γενετικής μηχανικής σε συνδυασμό με την αυξανόμενη διαθεσιμότητα αλληλουχιών γονιδιώματων των παρασίτων αύξησε την προγνωστική και διαγνωστική ικανότητα του πειραματικού μοντέλου *Drosophila*. Το μοντέλο της *Drosophila* μπορεί να επεκταθεί με σκοπό τη διερεύνηση της βασικής βιολογίας που διέπει την αλληλεπίδραση εντομοκτόνων και πρωτεϊνών στόχων (Somers et al., 2015).

Η λειτουργική ανάλυση μεταλλαγών που έχουν βρεθεί σε έντομα είναι βασικής σημασίας μιας και συχνά είναι ένα στοιχείο που λείπει από πολλές έρευνες, κυρίως λόγω δυσκολιών στην έκφραση μορίων-στόχων με μεταλλαγές (ανθεκτικότητας στόχου) in vivo. Σε αυτή την κατεύθυνση η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 στη *Drosophila* αποτελεί μία άμεση και οικονομική προσέγγιση με στόχο την αξιολόγηση πιθανών μεταλλαγών ανθεκτικότητας.

I. 5.1. Σύστημα CRISPR/Cas9

Η γενετική μηχανική αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη διερεύνηση βιολογικών μηχανισμών. Η ικανότητα επεξεργασίας των γονιδιωμάτων αυξήθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη των προγραμματιζόμενων νουκλεασών οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν στοχευμένα (DSBs) στο DNA (Bibikova et al. 2002; Bassett et al. 2013; Gratz et al. 2013a).

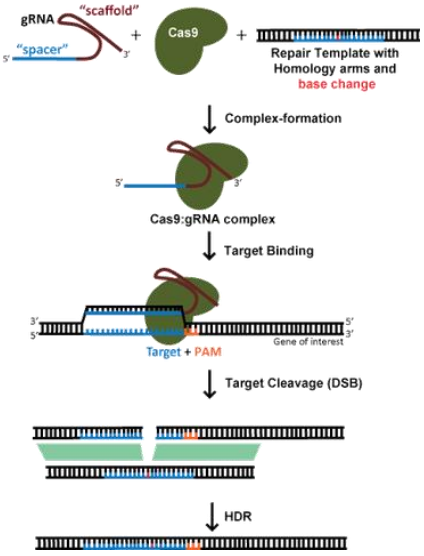
Η επανάσταση στο χώρο των ενζύμων με σκοπό τη γονιδιωματική τροποποίηση ήρθε από μια οικογένεια ενζύμων τα οποία αποτελούν μηχανισμό προσαρμοστικής ανοσίας στα βακτήρια. Το σύστημα αυτό ονομάζεται CRISPR/Cas9 και εμφανίζεται στα βακτήρια και τα αρχαία ως μηχανισμός άμυνας (Chandrasegaran et.al, 2016). Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί λοιπόν έναν ανοσοποιητικό μηχανισμό ο οποίος περιλαμβάνει μία «χορογραφία» τριών μερών: 1. DNA κωδικοποίησης, 2. RNA διαμεσολαβούμενη, στόχευση νουκλεϊκού οξέος και 3. κοψίματος δίκλωνης αλυσίδας του DNA από ενδονουκλεάση π.χ. Cas9 (Barrangou *et al*., 2016).

Η Cas9 μπορεί δηλαδή να προγραμματιστεί ώστε να στοχεύσει και να κόψει, θεωρητικά, οποιαδήποτε αλληλουχία, ύστερα από σχεδιασμό ενός μορίου gRNA, με μόνη προϋπόθεση η αλληλουχία αυτή να ακολουθείται από ένα μοτίβο NGG το οποίο είναι γνωστό ως protospacer adjacent motif (PAM). Η πιθανότητα εμφάνισης αυτού του μοτίβου σε μία ομοιογενή αλληλουχία εκπροσωπείται-εμφανίζεται με μία συχνότητα περίπου κάθε 64bp, συνεπάγεται λοιπόν ότι είναι δυνατόν να στοχευθεί σχεδόν κάθε επιθυμητή αλληλουχία που κωδικοποιεί π.χ. για πρωτεΐνη (Kondo, Shu., 2014).

Πιο αναλυτικά το σύστημα αποτελείται από δύο παράγοντες την ενδονουκλεάση Cas9 και ένα χιμαιρικό μόριο-οδηγό RNA (gRNA). Τα μόρια gRNA αναγνωρίζουν μία αλληλουχία στόχο 20 νουκλεοτιδίων δίπλα από την αλληλουχία PAM, καθοδηγώντας την ενδονουκλεάση Cas9 στο τοποειδικό σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA (Jinek et al. 2012).

Το σπάσιμο της διπλής έλικας του ενεργοποιεί δύο κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό τη γονιδιωματική τροποποίηση. Η μη ομόλογη ένωση των άκρων (NHEJ) αποτελεί μία διαδικασία επιδιόρθωσης επιρρεπή σε σφάλματα (error-prone ligation) που εν τέλει προκαλεί τη δημιουργία προσθήκης ή εξάλειψης βάσεων (indels) στο σημείο του αρχικού DSB. Στοχεύοντας ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης αυτό το μονοπάτι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή ενός γονιδίου μέσω π.χ. frame shifting mutations. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HDR) χρησιμοποιεί ομόλογες αλληλουχίες DNA σαν υποστρώματα με στόχο την ακριβή επιδιόρθωση (εικόνα Ι13). Με την παροχή ενός δότη ως υπόστρωμα για την επιδιόρθωση αυτό το μονοπάτι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία γονιδιακών αλληλουχιών με ακρίβεια (π.χ. εισαγωγή στοχευμένης σημειακής μεταλλαγής).

Με σκοπό λοιπόν την εισαγωγή σημειακών μεταλλαγών σε επιθυμητά γονίδια χρησιμοποιείται ο ομόλογος ανασυνδυασμός, για την επιδιόρθωση του DSB, παρέχοντας μία ομόλογη αλληλουχία από ένα πλασμίδιο δότη (συχνά χρησιμοποιούνται και μόρια ssOligo). Σύμφωνα με τους Beumer KJ et al., 2013 για την αποτελεσματικότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού στα κύτταρα της *Drosophila melanogaster* απαιτούνται τουλάχιστον 700bp ομόλογων άκρων, εκατέρωθεν του DSB (Beumer KJ et al., 2013). Η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 με σκοπό τη γονιδιακή τροποποίηση του γονιδιώματος της *D. melanogaster* έχει ήδη αναφερθεί από τους Port et al., 2014. Στο πεδίο της ανθεκτικότητας έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία αυτή με σκοπό την εισαγωγή μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικούς φαινοτύπους σε ελεγχόμενο γενετικό υπόβαθρο (Somers et al., 2015; Zimmer et al., 2016; Douris et al., 2016, 2017).



Εικόνα Ι13.

Εισαγωγή σημειακής/ών μεταλλαγών με τη χρήση του εργαλείου CRISPR/Cas9 (μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (https://www.addgene.org/crispr/guide/)

I. 5. Αντικείμενο μελέτης

Η συγκεκριμένη διατριβή έχει ως αντικείμενο τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας στόχου που συσχετίζεται με την παρουσία των σημειακών μεταλλαγών. Η πρώτη προς μελέτη σημειακή μεταλλαγή V1023G (V1016G στη *Drosophila melanogaster*) εντοπίζεται στο γονίδιο AaNaV του *Aedes aegipty* (γονίδιο *para* στη *Drosophila melanogaster*). Εξετάζονται επίσης και οι σημειακές μεταλλαγές G326D και G326E οι οποίες εντοπίζονται στα γονίδια του οργανισμού *Tetranychus urticae,* στα γονίδια *GluCl1* και *GluCl3* αντίστοιχα (*GluClalpha* της *Drosophila melanogaster*). Οι σημειακές μεταλλαγές έχουν συσχετιστεί από πολλές μελέτες, όπως προαναφέρθηκε, με φαινοτύπους ανθεκτικότητας σε πυρεθροειδή και αμπαμεκτίνη αντίστοιχα.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η λειτουργική μελέτη μεταλλαγών που συσχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας in vivo στο πειραματικό μοντέλο *Drosophila melanogaster*. Η γονιδιακή τροποποίηση, στα ορθόλογα γονίδια της *Drosophila melanogaster*, κατέστη δυνατή με τη χρήση της τεχνικής CRISPR/Cas9.

Στην πρώτη ενότητα αναλύεται η in vivo λειτουργική μελέτη της σημειακής μεταλλαγής V1016G, στο γονίδιο *para* της *Drosophila melanogaster*, η οποία συσχετίζεται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στόχου, στα πυρεθροειδή στο είδος *Aedes aegypti*.

Στη δεύτερη ενότητα αναλύεται η in vivo λειτουργική μελέτη των σημειακών μεταλλαγών G326D και G326E, που ανήκουν στο γονίδιο *GluClalpha* της *Drosophila melanogaster*, οι οποίες συσχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στόχου, στην αμπαμεκτίνη στο είδος *Tetranychus urticae*.

Μ. Υλικά μέθοδοι

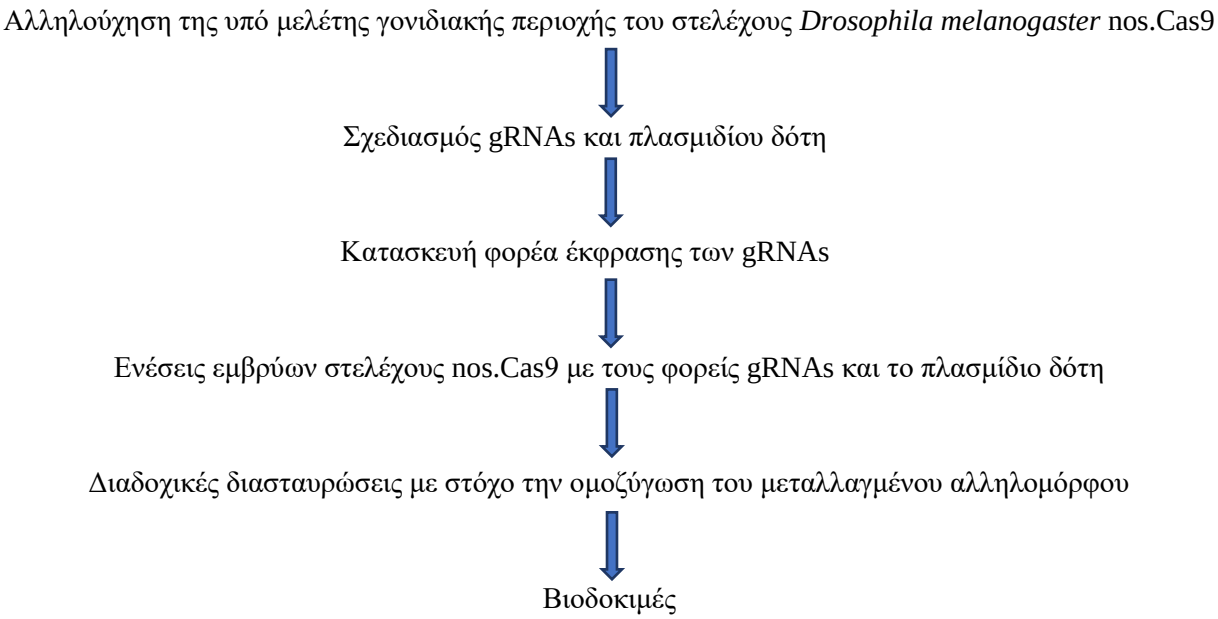
Μ. 1. Στελέχη *D. melanogaster*

Στέλεχος	Γονότυπος	Πηγή	Χαρακτηριστικά στελέχους
nos.Cas9	y 1 M{nos-Cas9.P}ZH-2A w*	#54591 Bloomington Stock Center	Το στέλεχος αυτό φέρει μία μη σημασμένη, και βελτιστοποιημένη με βάση τα ανθρώπινα κωδικόνια αλληλουχία της πρωτεΐνης Cas9 από το Church lab (Addgene 41815) ενσωματωμένη δίπλα σε ένα nanos υποκινητή και 3'UTR ώστε να υπάρχει ιστοειδική έκφρασή του στο στα γαμετικά κύτταρα (Port et al. 2014)
FM7	(FRT)w+ / FM7 Hw WB	Delidakis Lab stock IMBB/ FORTH	Balancer (FM7)* για το X χρωμόσωμα Φαινοτυπικός δείκτης Bar eye (νευφροειδές σχήμα ματιού)
TM3/TM6B	yw; $_{TM3}$ Sb e/TM6B Tb Hu e	Delidakis Lab stock IMBB/ FORTH	Balancer (TM3 και TM6)* για το 3° χρωμόσωμα Φαινοτυπικοί δείκτες stubble (κοντές σμήριγγες) και Tubby (βαρελοειδές σχήμα σώματος)

Πίνακας Μ.1 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη

* Τα στελέχη balancer φέρουν τεχνητά χρωμοσώματα τα οποία αποτρέπουν το γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση θνησιγόνων μεταλλαγών σε ετεροζυγωτία και βοηθούν στη διαδικασία ομοζύγωσης επιθυμητών αλληλομόρφων. Τα χρωμοσώματα αυτά φέρουν συγκεκριμένους φαινοτυπικούς δείκτες όπως το Bar eye (FM7), stubble (TM3), Tubby (TM6B).

Τα στελέχη *D. melanogaster* διατηρήθηκαν στους 25ºC σε ποσοστό υγρασίας 60-70%, με φωτοπερίοδο 12/12 ώρες φωτοπερίοδο, και σε πλαστικά φιαλίδια με τροφές που αποτελούνταν από καλαμποκάλευρο, άγαρ και μαγιά.



Εικόνα Μ.1 Διαγραμματική απεικόνιση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν

Μ. Α. in vivo λειτουργική μελέτη της σημειακής μεταλλαγής V1016G, στο γονίδιο *para* της *Drosophila melanogaster*, η οποία συσχετίζεται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στόχου, στα πυρεθροειδή στο είδος *Aedes aegypti*

Μ. Α.1 Εντοπισμός θέσης σημειακών μεταλλαγών στα ορθόλογα γονίδια της *Drosophila melanogaster*

Μέσω του προγράμματος BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), με βάση τη θέση της μεταλλαγής, V1016G του *Aedes aegypti*, βρέθηκε η ομόλογη νουκλεοτιδική θέση της μεταλλαγής στο γονίδιο *para* της *D.melanogaster*.

Μ.Α.1 Αλληλούχηση στελέχους nos.Cas9

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα Ι.5.1 της εισαγωγής, οι βέλτιστες συνθήκες για την πραγματοποίηση του ανασυνδυασμού απαιτούν την ύπαρξη ομόλογων άκρων κατ' ελάχιστο 700bp. Για το σχεδιασμό του πλασμιδίου δότη (donor plasmid) λοιπόν είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της γενωμικής αλληλουχίας (σε ένα εύρος 2500bp -με κέντρο το σημείο DSB), του πειραματικού στελέχους nos.Cas9 #54591. Με βάση την πληροφορία θέσης της μεταλλαγής V1016G στο γονίδιο *para* της *Drosophila melanogaster* σχεδιάστηκαν οι εκκινητές KDRFw, KDRRv, KDRExFw, KDRExRv (ενότητα S. I) με σκοπό την αλληλούχηση. Απομονώθηκε το γενωμικό DNA (πρωτόκολλο S.III.a) από 5-10 τυχαία επιλεγμένα άτομα του στελέχους nos.Cas9. Το προϊόν της PCR (πρωτόκολλο S.III.b) καθαρίστηκε με χρήση του κιτ NucleoSpin® Gel και PCR Clean-up (MACHEREY NAGEL) και στάλθηκε για αλληλούχηση στη Macrogen, (Ολλανδία).

Μ. Α.2 Σχεδιασμός πλασμιδίου δότη (donor plasmid)

Με βάση την παραπάνω πληροφορία της αλληλουχίας, του στελέχους nos.Cas9, κατασκευάστηκε ένας γενετικός χάρτης με το πρόγραμμα BioEdit (Tom Hall, 2013) (εικόνες S.II.a.i και S.II.a.ii). Με βάση αυτό το χάρτη σχεδιάστηκε το σύνολο των επιθυμητών αλλαγών που θα υπήρχαν στο πλασμίδιο δότη και κατ' επέκτασιν στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Παρακάτω παρατίθενται οι μεταλλαγές που εισήχθησαν στο πλασμίδιο δότη.

1. Η αλληλουχία του πλασμιδίου δότη περιέχει δύο ομόλογα άκρα περίπου 1000bp, ανοδικά και καθοδικά της θέσης του DSB.
2. Η μεταλλαγή V1016G εισάγεται μέσω της αλλαγής του κωδικονίου GTA προς GGA, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση του αμινοξέος βαλίνη (V) προς γλυκίνη (G).
3. Δύο σιωπηλές μεταλλαγές, η TGG → TTG και η CCG → TCG, με σκοπό την απαλοιφή των δύο αλληλουχιών-μοτίβων PAM, εισήχθησαν στην αλληλουχία του πλασμιδίου δότη, ώστε να αποφευχθεί η επαναστόχευση από το σύστημα gRNA-Cas9-πλασμιδίου δότη.
4. Εισήχθησαν και δύο ακόμη σιωπηλές μεταλλαγές, για την πραγματοποίηση του μοριακού ελέγχου:
    - Μεταλλαγή που καταστρέφει μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (HaeII)
    - Μεταλλαγή που δημιουργεί μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (HindIII)

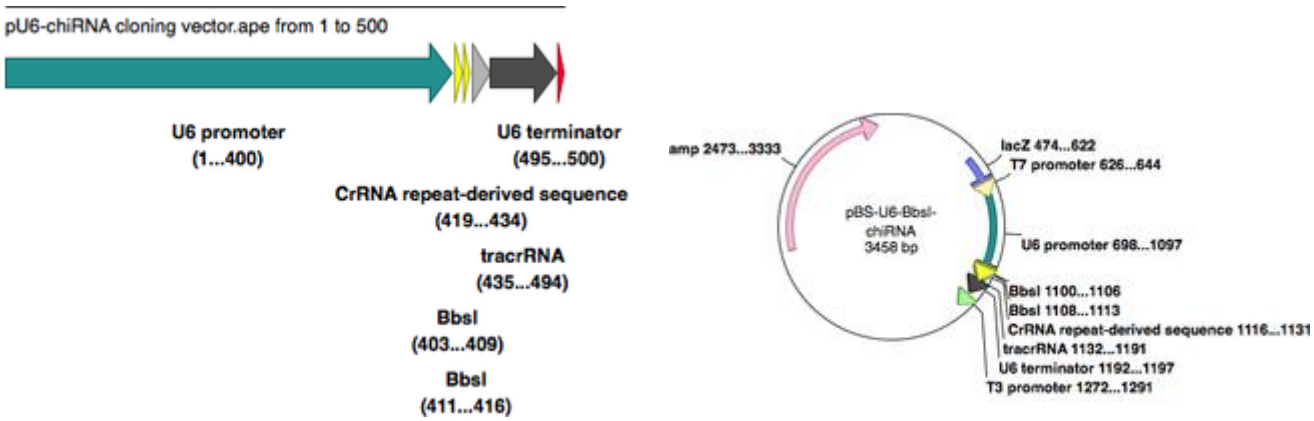
Η τελική αλληλουχία, με όλες τις παραπάνω επιθυμητές (μετ)αλλαγές (εικόνα S.II.a.iii), συντέθηκε *de novo* στο φορέα pUC57 από τη GenScript. Η προετοιμασία του πλασμιδίου δότη, για τις ενέσεις, γίνεται μέσω βακτηριακής κλωνοποίησης και καθαρισμού του (QIAGEN® Plasmid Purification). Στα τρία πειράματα πραγματοποιήθηκε μία απλή διαλυτοποίηση του φορέα, με ddH2O, στη μορφή που ήρθε από την εταιρία.

Μ. Α.3 Σχεδιασμός των gRNAs

Για το σχεδιασμό των μορίων gRNA χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Optimal Target Finder που παρέχεται από την ιστοσελίδα (http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/, Gratz et al., 2014). Το πρόγραμμα προτείνει έναν αριθμό από gRNAs με βάση ορισμένα κριτήρια αυστηρότητας. Ο κύριος παράγοντας επιλογής, για τα gRNAs που χρησιμοποιήθηκαν στο V1016G, ήταν η απουσία θέσεων στόχευσης (δημιουργίας DSBs) εκτός της επιθυμητής αλληλουχίας (off targets) καθώς και η κοντινή απόσταση από τη θέση της μεταλλαγής (τα σημεία μεταλλαγής (V1016G) και στόχευσης (DBS) των gRNAs να απέχουν το πολύ 50bp) (εικόνα S.II.a). Επιλέχθηκαν τελικά δύο μόρια gRNAs εκατέρωθεν της θέσης V1016G (εικόνα S.I). Τα επιθυμητά gRNAs παραγγέλθηκαν ως δύο συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια, φωσφορυλιωμένα στο 5' άκρο τους (Invitrogen). Τα ολιγονουκλεοτίδια, εκτός από την αλληλουχία στόχευσης από τον παραπάνω σχεδιασμό, σχεδιάστηκαν με άκρα συμβατά προς συγκόλληση στο φορέα κλωνοποίησης pU6-BbsI-chiRNA (Addgene plasmid # 45946) (εικόνα Μ.2).

Μ. Α.3.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNAs

Τα δύο μονόκλωνα και συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια αρχικά διαλυτοποιήθηκαν και αναμείχθηκαν σε τελική ισομοριακή αναλογία 20μΜ, σε διάλυμα 1X NEB3.1 (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl2, 100μg/ml BSA, pH 7.9, at 25°C). Στη συνέχεια επωάστηκαν τους 95ºC και αφέθηκαν να φθάσουν αργά στη θερμοκρασία δωματίου, διαδικασία που είχε ως αποτέλεσμα τη συμπληρωματική σύνδεση των δυο ολιγονουκλεοτιδίων και τη διαμόρφωση δίκλωνων μορίων DNA. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pU6-BbsI-chiRNA (Addgene plasmid # 45946) (εικόνα Μ.2) με το ένζυμο BbsI (αφήνει άκρα μη συμβατά για επανακυκλοποίηση, παρόλα αυτά έγινε και αποφωσφορυλίωση των άκρων του).



Εικόνα Μ.2. Ο φορέας pU6-BbsI-chiRNA (Addgene plasmid # 45946) φέρει δίπλα από τις δύο αλληλουχίες αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BbsI την αλληλουχία του U6 υποκινητή, που επάγει τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση III (Gratz et al, 2013).

Ο κομμένος φορέας αναμίχθηκε με περίσσεια των δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, με τα κολλώδη άκρα (BbsI), στην αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 4°C και χρόνο περίπου 24 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε σε 100μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5α, μέσω πρωτοκόλλου μετασχηματισμού - heat-shock. Τα πιθανά μετασχηματισμένα βακτήρια στρώθηκαν σε τρυβλία petri και επωάστηκαν στους 37°C για 16-18 ώρες. Ακολούθησε έλεγχος 12 αποικιών μέσω colony PCR (πρωτόκολλο S.III.b) με στόχο την εξακρίβωση εισαγωγής της αλληλουχίας του gRNA στο φορέα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την αντίδραση ήταν το ολιγονουκλεοτίδιο #406 και το ολιγονουκλεοτίδιο #205 (ενότητα S. I) και ο T7 εκκινητής (ενότητα S. I) που βρίσκεται στο φορέα (ενότητα Μ.1).
Από τέσσερις θετικές αποικίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και στάλθηκε για αλληλούχηση (Macrogen) όπου ελέγχθηκε ο τρόπος εισδοχής του insert – gRNA (π.χ. απουσία ομοπολυμερών κτλ.) στο φορέα.
Το πλασμιδιακό DNA, από τους δύο επιθυμητούς κλώνους, κλωνοποιήθηκε, καθαρίστηκε (QIAGEN® Plasmid Purification) και ήταν έτοιμο για την πραγματοποίηση των ενέσεων.

Μ. Α.3.2 Μικροενέσεις εμβρύων *Drosophila melanogaster* nos.Cas9

Το μείγμα αποτελείται από το πλασμίδιο δότη (100 ng/μl) και τα δύο πλασμίδια gRNAs (75 ng/μl) τα οποία είναι διαλυτοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα (2 mM Sodium phosphate pH 6.8-7.8, 100 mM KCl). Το παραπάνω μείγμα μικροενέθηκε στο οπίσθιο άκρο (γαμετικό πόλο) εμβρύων, του στελέχους nos.Cas9 (#54591). Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν από τον κ. Ιωάννη Λειβαδάρα (IMBB/FORTH).

Μ. Α.4 Μοριακός έλεγχος

Με δεδομένο την επιτυχή πραγματοποίηση του ομόλογου ανασυνδυασμού ένα ποσοστό των ενεθέντων ατόμων G_0 θα φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε κάποιο αριθμό των γαμετικών κυττάρων του. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μετά από την επαγωγή δίκλωνων θραύσεων από την λειτουργία της Cas9 πρωτεΐνης η οποία εκφράζεται ιστοειδικά στα γαμετικά κύτταρα κάτω από τη ρύθμιση του υποκινητή nanos. Τα άτομα αυτά της G_0 μπορούν να δώσουν ετερόζυγους απογόνους (γενιάς G_1). Η ανίχνευση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου είναι δυνατή μέσω μοριακού ελέγχου. Το πλασμίδιο δότης σχεδιάστηκε έτσι ώστε να είναι δυνατόν, σε κάθε στάδιο των διασταυρώσεων κατά το μοριακό έλεγχο, να αναγνωριστεί η ταυτότητα του αλληλομόρφου Χ. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η αναγνώριση του μεταλλαγμένου ή του αγρίου τύπου αλληλομόρφου. Η στρατηγική μοριακού ελέγχου αναλύεται συνοπτικά παρακάτω:

Αρχικά πραγματοποιείται απομόνωση γενωμικού DNA τμήμα του οποίου ενισχύεται με τη χρήση γενικών εκκινητών-μοριακού ελέγχου (εικόνα S.I) οι οποίοι πολλαπλασιάζουν και το μεταλλαγμένο αλλά και το αγρίου τύπου αλληλόμορφο (εικόνα S.II.a). Το προϊόν που προκύπτει από την PCR (πρωτόκολλο S.III.b), με μήκος 516bp, στη συνέχεια χρησιμοποιείται σε διαγνωστικές πέψεις.

Όπως φαίνεται στην εικόνα S.II.a, κατά το σχεδιασμό του πλασμιδίου δότη δημιουργήθηκε μία θέση περιορισμού για το ένζυμο HindIII και εξαλείφθηκε η θέση περιορισμού για το ένζυμο HaeII (που υπάρχει στο αγρίου τύπου αλληλόμορφο). Επομένως το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο πρόκειται να εμφανίζει, στο ενισχυμένο (μέσω PCR) τμήμα των 516bp μία θέση για το περιοριστικό ένζυμο HindIII, ενώ η αλληλουχία αυτή θα απουσιάζει από το αγρίου τύπου αλληλόμορφο. Αντίδραση περιοριστικής πέψης, με το ένζυμο HindIII, στο τμήμα των 516bp θα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας ζώνης (516bp) στα ομόζυγα για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο, δύο ζωνών(324bp και 192bp) στα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο και τριών ζωνών (324bp, 192bp και η άκοπη 516bp) στα ετερόζυγα άτομα. Εμφάνιση, κατά το στάδιο του μοριακού ελέγχου, αυτού του προτύπου σημαίνει και παρουσία μεταλλαγμένου αλληλομόρφου.

Στην περίπτωση του πρώτου μοριακού ελέγχου πραγματοποιείται και μία επιπλέον πέψη με HaeII. Το ένζυμο HaeII χρησιμοποιείται αποκλειστικά στον πρώτο μοριακό έλεγχο των 30 ατόμων, G_1 γενιάς. Λόγω της φύσης της πρώτης διασταύρωσης αλλά και της αποτελεσματικότητας του CRISPR-ομόλογου ανασυνδυασμού, το αγρίου τύπου αλληλόμορφο υπερεκπροσωπείται με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κατά τον πρώτο μοριακό έλεγχο. Η πέψη με HaeII μειώνει το «θόρυβο», του σε περίσσεια αλληλομόρφου αγρίου τύπου, με αποτέλεσμα να ενισχύονται μέσω της PCR πιο πολύ (αν όχι σχεδόν μόνο) τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, εφόσον υπάρχουν. Τα βήματα μοριακού ελέγχου μετά την πρώτη διασταύρωση είναι τα ακόλουθα:

Συνοπτικά η μεθοδολογία του μοριακού ελέγχου κάθε γενιάς ήταν:

1. Απομόνωση DNA
2. Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HaeII – (μόνο στο πρώτο screening της G_1)
3. PCR με γενικούς εκκινητές μοριακού ελέγχου
4. Περιοριστική πέψη με το ένζυμο HindIII
5. Ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη – διάγνωση τύπου αλληλομόρφων (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένο)

Μ. Α.5 Διασταυρώσεις

Μετά την πραγματοποίηση των ενέσεων στα έμβρυα της nos.Ca9 (#54591) λάρβες πρώτου σταδίου μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τροφής (medium vials). 9-15 μέρες μετά τα ενήλικα άτομα, γενιάς G_0, τα οποία επιβίωσαν των ενέσεων και έφτασαν στο στάδιο του ενηλίκου, συλλέχθηκαν και διασταυρώθηκαν με το στέλεχος nos.Cas9 (#54591) – background στέλεχος. Ένα μέρος της γενιάς G_1, περίπου 30 άτομα, ελέγχθηκαν «μαζικά» μοριακά ώστε να εξακριβωθεί εάν φέρουν τα ίδια και κατ' επέκτασιν και τα πατρικά τους άτομα (γενιάς G_0), το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Άτομα G_1, απόγονοι θετικών γονέων G_0, διασταυρώθηκαν έπειτα με το στέλεχος balancer FM7. Τα άτομα (G_1 γενιάς) που διασταυρώθηκαν ελέγχθηκαν μοριακά, ατομικά αυτή τη φορά. Οι απόγονοι (γενιά G_2), των θετικών διασταυρώσεων, επιλέχθηκαν με βάση την παρουσία φαινοτύπου bar eye, προς διασταύρωση. Ακολούθησε μοριακός έλεγχος, των γονέων G_2 γενιάς, και από τις θετικές διασταυρώσεις, τα άτομα γενιάς G_3 επιλέχθηκαν με βάση το φαινότυπο του κόκκινου ματιού. Να σημειωθεί ότι το χρωμόσωμα Χ από στέλεχος balancer FM7 έχει φαινότυπο λευκού ματιού ενώ το στέλεχος στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις (nos.Cas9) άρα και η πιθανή παρουσία της μεταλλαγής θα βρίσκεται σε χρωμόσωμα Χ με φαινότυπο κόκκινου ματιού. Επιλέχθηκαν τα αρσενικά που έφεραν το Χ χρωμόσωμα μεταλλαγμένο (κόκκινο) και τα θηλυκά με το ένα Χ χρωμόσωμα μεταλλαγμένο (επίσης κόκκινου χρώματος) και τα αδερφικά αυτά άτομα διασταυρώθηκαν μεταξύ τους. Οι απόγονοι, γενιάς G_4, μετά από αρνητική επιλογή για το φαινότυπο bar eye (FM7 φαινότυπος), μπήκαν σε διασταυρώσεις μεταξύ τους. Η τελική αυτή διασταύρωση, ατόμων ομόζυγων για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, εγκαθιδρύει τον ομόζυγο, μεταλλαγμένο πληθυσμό (V1016G/V1016G).

Από τα ομόζυγα αυτά άτομα απομονώθηκε DNA και στάλθηκε προς αλληλούχηση όπου και επιβεβαιώθηκε ότι φέρουν το επιθυμητό αλληλόμορφο (παρουσία μεταλλαγής V1016G, των σιωπηλών μεταλλαγών που είχαν σχεδιαστεί καθώς και απουσία οποιασδήποτε άλλης, μη σχεδιασμένης εξ αρχής και άρα ανεπιθύμητης, μεταλλαγής.

Η ομοζύγωση της επιθυμητής μεταλλαγής περιλαμβάνει μία σειρά διασταυρώσεων οι οποίες απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Γενιά	Διασταύρωση
Διασταύρωση G_0 γενιάς	$\frac{1016G/X}{X}$ X $\frac{X}{Y}$
Απόγονοι (G_1) θετικών διασταυρώσεων	$\frac{1016G}{X}$, $\frac{X}{X}$, $\frac{1016G}{Y}$ $\frac{X}{Y}$
Διασταύρωση G_1 γενιάς	$\frac{1016G/X}{X}$ X $\frac{FM7}{Y}$
Απόγονοι (G_2) θετικής διασταύρωσης	$\frac{1016G}{FM7}$, $\frac{X}{FM7}$, $\frac{1016G}{Y}$, $\frac{X}{Y}$
Διασταύρωση G_2 γενιάς	$\frac{1016G/X}{FM7}$ X $\frac{FM7}{Y}$
Απόγονοι (G_3) θετικών διασταυρώσεων	$\frac{1016G}{Y}$, $\frac{FM7}{FM7}$, $\frac{1016G}{FM7}$, $\frac{FM7}{Y}$
Διασταύρωση G_3 γενιάς	$\frac{1016G}{FM7}$ X $\frac{1016G}{Y}$
Απόγονοι (G_4) θετικών διασταυρώσεων	$\frac{1016G}{Y}$, $\frac{1016G}{1016G}$, $\frac{1016G}{FM7}$, $\frac{FM7}{Y}$
Διασταύρωση G_4 γενιάς	$\frac{1016G}{1016G}$ X $\frac{1016G}{Y}$

Γενιά	Διασταύρωση
Διασταύρωση G_0 γενιάς	$\frac{1016G/X}{Y}$ X $\frac{X}{X}$
Απόγονοι (G_1) θετικών διασταυρώσεων – επιλογή μόνο θηλυκών	$\frac{1016G}{X}$, $\frac{X}{X}$

Πίνακας Μ.2 Αλληλουχία διασταυρώσεων με σκοπό την ομοζύγωση της μεταλλαγής. Αριστερά φαίνεται η ακολουθία των διασταυρώσεων αν το ενεθέν άτομο είναι θηλυκού φύλου και δεξιά αν είναι αρσενικού φύλου. Το 1016G αντιπροσωπεύει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Μ. Α.6 Βιοδοκιμή στο στέλεχος με τη μεταλλαγή V1016G

Μ. Α.6.1 Εντομοκτόνα

Το εντομοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η δελταμεθρίνη (Deltamethrin) (CAS # 52918-63-5) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Για την δημιουργία διαφορετικών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε ακετόνη (CAS # 67-64-1) ως διαλύτης.

Μ. Α.6.2 Βιοδοκιμές με δελταμεθρίνη

Τα επίπεδα ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων μυγών (nos.Cas9 #54591) εξετάστηκαν μέσω βιοδοκιμών επαφής. Άτομα αγρίου τύπου nos.Cas9 #54591 αποτέλεσαν το control στέλεχος. Κάθε συγκέντρωση δελταμεθρίνης ελέγχθηκε σε τρεις επαναλήψεις.

20 άτομα (10 άτομα από κάθε φύλο), ομόζυγα για τη μεταλλαγή V1016G καθώς και του στελέχους nos.Cas9 (αγρίου τύπου), 3-5 ημερών συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια (scintillation vials). Κάθε τριπλέτα είχε διαφορετική συγκέντρωση εντομοκτόνου, σε ένα εύρος από 0ppm έως και 1000ppm. Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των 0ppm, 4ppm, 8ppm, 40ppm, 200ppm, 1000ppm.

Ομοιόμορφη επικάλυψη του κάθε διαλύματος ακετόνης – εντομοκτόνου (τελικού όγκου 0.5ml) στα τοιχώματα του φιαλιδίου επετεύχθη ύστερα από την εξάτμιση της ακετόνης με την περιστροφική κίνηση των φιαλιδίων για 30 λεπτά σε ειδική συσκευή. Η έκθεση των μυγών έγινε για 90 min. Στη συνέχεια τα άτομα μεταφέρθηκαν πάλι σε πλαστικά φιαλίδια με πώμα βαμβακιού εμποτισμένου με σουκρόζη 5%. Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής καταμετρήθηκαν 24 ώρες μετά την έκθεση των μυγών στο εντομοκτόνο, όπου σημειώθηκαν τα νεκρά και ζωντανά άτομα.

Μ. Α.7 Ανάλυση δεδομένων

Η ανθεκτικότητα υπολογίστηκε συγκρίνοντας τις τιμές LC_{50} των control μυγών σε σχέση με των μεταλλαγμένων (V1016G). Η τιμή LC_{50} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του εντομοκτόνου η οποία είναι ικανή να θανατώσει το 50% του πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής αναλύθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό των τιμών LC_{50} με τη χρήση του προγράμματος PoloPlus (2002; LeOra Software, Berkeley, 167CA). Ο δείκτης ανθεκτικότητας, Resistance Ratio (RR), αντιπροσωπεύει το λόγο της τιμής LC_{50} του μεταλλαγμένου στελέχους (ανθεκτικού) σε σχέση με το LC_{50} του control στελέχους (ευαίσθητου).

M. Β *in vivo* λειτουργική μελέτη των σημειακών μεταλλαγών G326D και G326E, που ανήκουν στο γονίδιο *GluClalpha* της *Drosophila melanogaster*, οι οποίες συσχετίζονται με φαινοτύπους ανθεκτικότητας στόχου, στην αμπαμεκτίνη στο είδος *Tetranychus urticae*

M. Β Αμπαμεκτίνη

M. Β.1 Σχεδιασμός πλασμιδίου δότη (donor plasmid)

Όπως και στην περίπτωση του πειράματος με τη μεταλλαγή V1016G με παρόμοια βήματα σχεδιάστηκε και ο φορέας δότης για τα G323D και G326E.

- Η αλληλουχία του συντέθηκε με βάση την αλληλουχία της nos.Cas9, για το γονίδιο *GluClalpha* 2.500bp πέριξ της θέσης G323D (ομόλογο υπόστρωμα). Η πληροφορία της αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό και των δύο donor plasmids καθώς και οι δύο μεταλλαγές βρίσκονται στην ίδια θέση.
- Η μεταλλαγή G323D πραγματοποιείται μέσω της αλλαγής του κωδικονίου GGC προς GAC, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη (G) προς ασπαρτικό οξύ (D).
- Επίσης μεταλλαγή G326E πραγματοποιείται μέσω της αλλαγής του κωδικονίου GGC προς GAG, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση του αμινοξέος γλυκίνη (G) προς γλουταμικό οξύ (E).
- Η απαλοιφή του PAM μοτίβου πραγματοποιήθηκε με τις καθεαυτές μεταλλαγές. Το ένα gRNA μόριο σχεδιάστηκε έτσι ώστε η PAM αλληλουχία του να συμπίπτει με τη θέση της μεταλλαγής G323D (εννοείται και G326E).
- Οι σιωπηλές μεταλλαγές που εισήχθησαν εξυπηρετούσαν στην πραγματοποίηση της διαδικασία του μοριακού ελέγχου (screening).

G323D:

1. Μεταλλαγή G323D με ταυτόχρονη καταστροφή του μοτίβου PAM
2. Μεταλλαγές που θα καταστρέφουν μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (ClaI)
3. Μεταλλαγές που θα δημιουργούν μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (MluI)

G326E:

1. Μεταλλαγή G326E με ταυτόχρονη καταστροφή του μοτίβου PAM
2. Μεταλλαγές που θα καταστρέφουν μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (XhoI)
3. Μεταλλαγές που θα δημιουργούν μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (AccI)

Και στις δύο περιπτώσεις το μοναδικό gRNA είχε την αλληλουχία PAM ακριβώς πάνω στη μεταλλαγή G323D (αντίστοιχα και στο G326E), με αυτό τον τρόπο στο φορέα δότη η παρουσία της μεταλλαγής G323D καταστρέφει ταυτόχρονα και την αλληλουχία PAM.

Ο παραπάνω σχεδιασμός απεικονίζεται για τις δύο μεταλλαγές στις εικόνες S.II.b και S.II.c.

M. Β.2 Σχεδιασμός των gRNAs

Καθώς και στα δύο πειράματα οι μεταλλαγές G323D και G326E βρίσκονταν στην ίδια γονιδιακή θέση σχεδιάστηκε ένα μόριο gRNA, το gRNA GluCl (S.I), και για τα δύο πειράματα. Το μόριο gRNA σχεδιάστηκε με την ίδια στρατηγική του πειράματος στόχευσης του γονιδίου *para*. Τα επιθυμητά gRNA/s παραγγέλθηκαν ως δύο ολιγονουκλεοτίδια, τα 886-F και 886-R (S.I), φωσφορυλιωμένα στο 5’ άκρο (Invitrogen) με τα απαραίτητα συμβατά με το φορέα έκφρασης άκρα BbsI.

Μ. Β.2.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNAs

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την κατασκευή του φορέα έκφρασης- gRNA GluCl. Μετά την επιλογή του θετικού κλώνου το πλασμιδιακό DNA κλωνοποιήθηκε, καθαρίστηκε (QIAGEN® Plasmid Purification) και ήταν έτοιμο για την πραγματοποίηση των ενέσεων.

Μ. Β.3 Μικροενέσεις εμβρύων *Drosophila melanogaster* nos.Cas9

Το μείγμα των ενέσεων, με το πλασμίδιο δότη (100 ng/μl) και το πλασμίδιο έκφρασης του gRNA (75 ng/μl), διαλυτοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα (2 mM Sodium phosphate pH 6.8-7.8, 100 mM KCl) μικροενέθηκε στο οπίσθιο άκρο εμβρύων, του στελέχους δροσόφιλας nos.Cas9 (#54591).

Μ. Β.4 Μοριακός έλεγχος

Τα βήματα ήταν πανομοιότυπα και στη στρατηγική μοριακού ελέγχου για τα δύο πειράματα των G323D και G326E μεταλλαγών. Ο σχεδιασμός του μοριακού ελέγχου, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και τα ένζυμα, που χρησιμοποιήθηκαν στα δύο πειράματα, απεικονίζονται στις εικόνες SI, SII.b, SII.c. Το προϊόν της αντίδρασης PCR έχει συνολικό μήκος 489bp. Πέψη του προϊόντος αυτού με το ένζυμο MluI (S.III.c) θα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στην ηλεκτροφόρηση δύο ζωνών των 381bp και 108bp. Αντίστοιχα στο πείραμα G326E, μετά την PCR (S.III.b), πέψη με το ένζυμο AccI (S.III.c) θα προκύψουν δύο ζώνες των 403bp και 86bp (εικόνες SII.b, SII.c).

Η μεθοδολογία του screening κάθε γενιάς συνοπτικά ήταν η παρακάτω:

G323D - (G326E)

Απομόνωση DNA

↓

Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο ClaI - (XhoI)

↓

PCR με εκκινητές Glu-Cl_Fw και Glu-Cl_Rv

↓

Περιοριστική πέψη με το ένζυμο MluI - (AccI)

↓

Έλεγχος ζωνών στην ηλεκτροφόρηση

Εικόνα Μ.3 Ακολουθία μοριακού ελέγχου για τα πειράματα των μεταλλαγών στο γονίδιο *GluClalpha*

Μ. Β.5 Διασταυρώσεις

Η ίδια στρατηγική διασταυρώσεων πραγματοποιήθηκε και για την ομοζύγωση της μεταλλαγής G323D αλλά και για τη G326E. Παρόλα αυτά το στέλεχος balancer ήταν διαφορετικό καθώς οι μεταλλαγές εντοπίζονται στο γονίδιο *GluClalpha* που στη Δροσόφιλα είναι στο χρωμόσωμα 3. Το στέλεχος balancer που χρησιμοποιήθηκε για τις διασταυρώσεις αυτές ήταν το TM3/TM6B.

Γενιά	Διασταύρωση
Διασταύρωση G_0 γενιάς	$\frac{D/wt}{wt}$ x $\frac{wt}{wt}$
Απόγονοι (G_1) θετικών διασταυρώσεων	$\frac{D}{\mathrm{wt}}$, $\frac{wt}{\mathrm{wt}}$
Διασταύρωση G_1 γενιάς	$\frac{D/wt}{wt}$ x $\frac{wt}{wt}$
Απόγονοι (G_2) θετικής διασταύρωσης	$\frac{D}{\mathrm{wt}}$, $\frac{wt}{\mathrm{wt}}$
Διασταύρωση G_2 γενιάς	$\frac{\mathrm{D/wt}}{\mathrm{wt}}$ x $\frac{TM3}{TM6B}$
Απόγονοι (G_3) θετικών διασταυρώσεων	$\frac{D}{TM3}$, $\frac{D}{TM6B}$, $\frac{wt}{TM3}$, $\frac{wt}{TM6B}$
Διασταύρωση G_3 γενιάς	$\frac{D/wt}{TM3}$ x $\frac{TM3}{TM6B}$
Απόγονοι (G_4) θετικών διασταυρώσεων	$\frac{TM3}{TM6B}$, $\frac{D}{TM3}$, $\frac{D}{TM6B}$
Διασταύρωση G_4 γενιάς	$\frac{D}{TM3}$ x $\frac{D}{TM3}$

Πίνακας Μ.3

Αλληλουχία διασταυρώσεων με σκοπό την ομοζύγωση της μεταλλαγής. Με D συμβολίζεται το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο 323D.

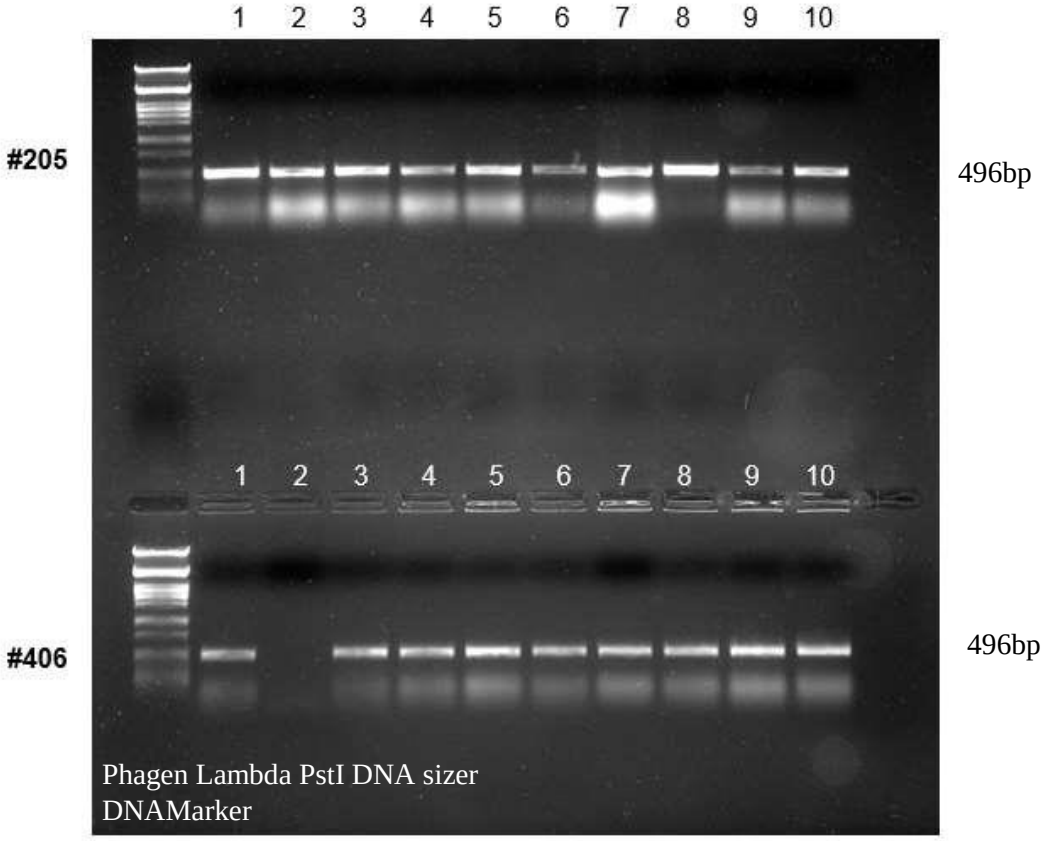
R. Αποτελέσματα

R. A. V1016G γονίδιο *para*

R. A.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNAs

Ένας αριθμός 12 αποικιών ελέγχθηκε μέσω colony PCR με χρήση του εκκινητή T7, η αλληλουχία του οποίου βρίσκεται στο φορέα pU6-BbsI-chiRNA, και των ολιγονονουκλεοτιδίων 205-R και 406-R αντίστοιχα. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε 1.2% πήκτωμα αγαρόζης, το αποτέλεσμα βρίσκεται στην εικόνα R.1.a

Colony PCR-φαίνονται οι κλώνοι οι οποίοι έχουν ενσωματώσει στο φορέα pU6-BbsIchiRNA το oligo #205 ή #406.



Εικόνα R.1.a. Όπως φαίνεται όλοι οι κλώνοι ήταν θετικοί και για τα δύο gRNAs (**#205 και #406**).

Η παρουσία μορίου gRNA στο φορέα είναι υποχρεωτική ώστε η PCR να δώσει προϊόν (διαγνωστική PCR), παρόλα αυτά δεν επιβεβαιώνει 100% την σωστή εισδοχή του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου στο φορέα. Για αυτό το λόγο απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από τους επιθυμητούς κλώνους και στάλθηκε για αλληλούχηση. Τελικά όπως απεικονίζεται και παρακάτω οι κλώνοι 205_1 και 406_5 είχαν τη σωστή εισδοχή της αλληλουχίας του gRNA και επιλέχθηκαν για την διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας (εικόνα R.1.b.).

Εικόνα R.1.b. Αποτέλεσμα αλληλούχησης κλώνων μετασχηματισμένων με τα μόρια gRNA 205_1 και 406_5.

HindIII – EcoRI in pBS

Εκκινητής snRNA:U6:96Ab

Αλληλουχία gRNA με τα άκρα BbsI

crRNA repeat-derived αλληλουχία

tracrRNA

U6 τερματισμός μεταγραφής

>205_1

AAGCTTGATGTTCGACTTGCAGCCTGAAATACGGCACGAGTAGGAAAAGCCGAGTCAAATGCCGAATGCAGAGTCTCATTACAGCA
CAATCAACTCAAGAAAAACTCGACACTTTTTTACCATTTGCACTTAAATCCTTTTTTATTCGTTATGTATACTTTTTTTGGTCCCT
AACCAAAACAAAACCAAACTCTCTTAGTCGTGCCTCTATATTTAAAACTATCAATTTATTATAGTCAATAAATCGAACTGTGTTTT
CAACAAACGAACAATAGGACACTTTGATTCTAAAGGAAATTTTGAAAATCTTAAGCAGAGGGTTCTTAAGACCATTTGCCAATTCT
TATAATTCTCAACTGCTCTTTCCTGATGTTGATCATTTATATAGGTATGTTTTCCTCAATACTTCGCCAATTCGATTGAAGGCCTG
TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTATCGA
ATTC

>406_5

AAGCTTGATGTTCGACTTGCAGCCTGAAATACGGCACGAGTAGGAAAAGCCGAGTCAAATGCCGAATGCAGAGTCTCATTACAGCA
CAATCAACTCAAGAAAAACTCGACACTTTTTTACCATTTGCACTTAAATCCTTTTTTATTCGTTATGTATACTTTTTTTGGTCCCT
AACCAAAACAAAACCAAACTCTCTTAGTCGTGCCTCTATATTTAAAACTATCAATTTATTATAGTCAATAAATCGAACTGTGTTTT
CAACAAACGAACAATAGGACACTTTGATTCTAAAGGAAATTTTGAAAATCTTAAGCAGAGGGTTCTTAAGACCATTTGCCAATTCT
TATAATTCTCAACTGCTCTTTCCTGATGTTGATCATTTATATAGGTATGTTTTCCTCAATACTTCGACTTGTAAACGATGTTTACG
TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTATCGA
ATTC

Υπήρχαν βέβαια κα κλώνοι οι οποίοι έφεραν μη επιθυμητές εισδοχές της αλληλουχίας του gRNA όπως οι παρακάτω δύο οι οποίοι απορρίφθηκαν:

>205_5

AAGCTTGATGTTCGACTTGCAGCCTGAAATACGGCACGAGTAGGAAAAGCCGAGTCAAATGCCGAATGCAGAGTCTCATTACAGCA
CAATCAACTCAAGAAAAACTCGACACTTTTTTACCATTTGCACTTAAATCCTTTTTTATTCGTTATGTATACTTTTTTTGGTCCCT
AACCAAAACAAAACCAAACTCTCTTAGTCGTGCCTCTATATTTAAAACTATCAATTTATTATAGTCAATAAATCGAACTGTGTTTT
CAACAAACGAACAATAGGACACTTTGATTCTAAAGGAAATTTTGAAAATCTTAAGCAGAGGGTTCTTAAGACCATTTGCCAATTCT
TATAATTCTCAACTGCTCTTTCCTGATGTTGATCATTTATATAGGTATGTTTTCCTCAATACTTC-CCAATTCGATTGAAGG

CCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTA
TCGAATTC

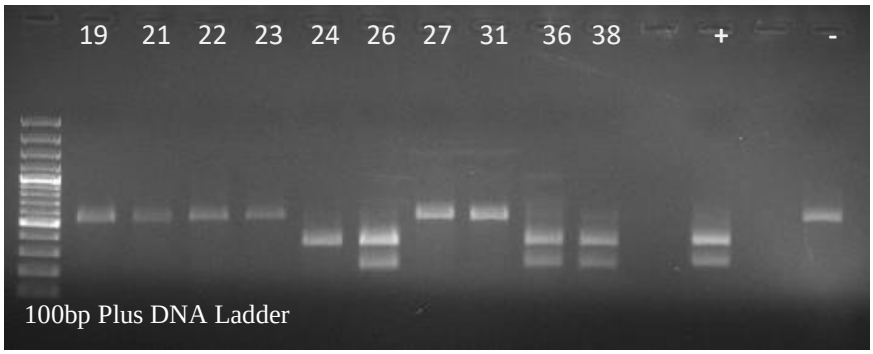
>406_9

AAGCTTGATGTTCGACTTGCAGCCTGAAATACGGCACGAGTAGGAAAAGCCGAGTCAAATGCCGAATGCAGAGTCTCATTACAGCA
CAATCAACTCAAGAAAAACTCGACACTTTTTTACCATTTGCACTTAAATCCTTTTTTATTCGTTATGTATACTTTTTTTGGTCCCT
AACCAAAACAAAACCAAACTCTCTTAGTCGTGCCTCTATATTTAAAACTATCAATTTATTATAGTCAATAAATCGAACTGTGTTTT
CAACAAACGAACAATAGGACACTTTGATTCTAAAGGAAATTTTGAAAATCTTAAGCAGAGGGTTCTTAAGACCATTTGCCAATTCT
TATAATTCTCAACTGCTCTTTCCTGATGTTGATCATTTATATAGGTATGTTTTCCTCAATACTTCGACTTGTAAACGATGTTTACG
TTTCTTCGACTTGTAAACGATGTTTACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTATCGAATTC

R. Α.2 Διασταυρώσεις

Μετά την πραγματοποίηση των ενέσεων σε έμβρυα στελέχους nos.Ca9 (#54591) λάρβες πρώτου σταδίου (ενέθηκαν περίπου 400 λάρβες) μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τροφής. Ύστερα από 9-15 μέρες συλλέχθηκαν ενήλικα άτομα, τα οποία επιβίωσαν των ενέσεων και κατάφεραν να εκκολαφθούν,. Επιλέχθηκαν όλα τα αρσενικά και τα θηλυκά, τα οποία διασταυρώθηκαν ατομικά με 3 άτομα, αντίθετου φύλου, του στελέχους nos.Cas9 (πιθανά χρωμοσώματα είναι το αγρίου τύπου- X - ή το μεταλλαγμένο V1016G – 1016G).

Από τα άτομα που επιβίωσαν των ενέσεων και ενηλικιώθηκαν τα 38 άφησαν εν τέλει απογόνους (γενιά G_1). Το αποτέλεσμα του μοριακού ελέγχου έδειξε την παρουσία 9 θετικών διασταυρώσεων, που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Τα θετικά άτομα προέρχονται από τις διασταυρώσεις 13, 15, 21, 23, 25, 26, 29, 36 και 38.



516bp αγρίου τύπου X
324bp
192bp → HindIII

100bp Plus DNA Ladder

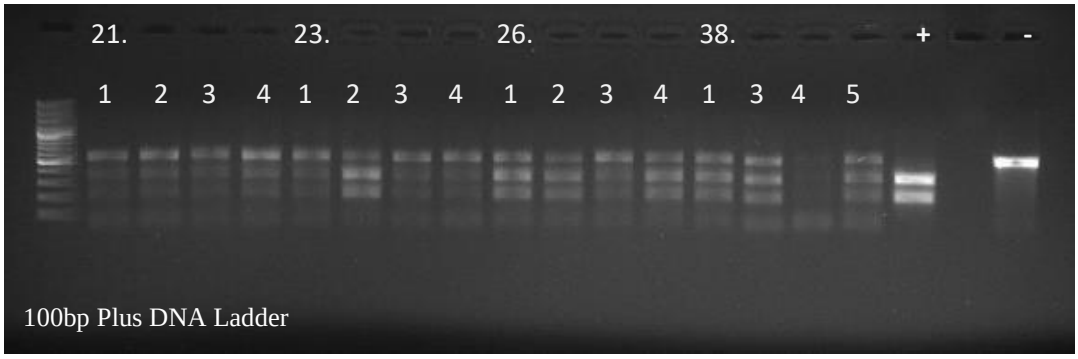
Εικόνα R.2. Μοριακός έλεγχος 1ης διασταύρωσης ατόμων G_0.

Από αυτά ενδεικτικά παρουσιάζεται το αποτέλεσμα του μοριακού ελέγχου όπου θετικά άτομα είναι τα 26, 36 και 38 (εικόνα R.2). Ένας αριθμός από αυτές τις διαγονιδιακές σειρές, θετικά άτομα, θα φτάσουν ως στην τελική ομοζύγωση καθώς μερικά όπως π.χ. αυτή του 36 ενδέχεται να πεθάνουν ή να είναι στείρα.

Ο πρώτος μοριακός έλεγχος έδειξε την παρουσία 9 θετικών σειρών από τις 38 γόνιμες διασταυρώσεις, που σημαίνει ότι το ποσοστό επιτυχούς CRISPR-ομόλογου ανασυνδυασμού ήταν της τάξης του 24%.

Τα άτομα G_1, από τις παραπάνω 9 θετικές διασταυρώσεις, επιλέγονται και διασταυρώνονται ατομικά με τρία άτομα (αντίστοιχα του αντίθετου φύλου) από το στέλεχος balancer FM7.

Ακολούθησε μοριακός έλεγχος για κάθε άτομο-γονέα γενιάς G_1 της παραπάνω διασταύρωσης. Το αποτέλεσμα του διαγνωστικού έδειξε ότι οι θετικές διασταυρώσεις ήταν οι 15.(3, 4, 6), 21(1-4), 23 (1 και 2), 25.19, 26 (1, 2, 4), 29.3 και 38 (1, 3 και 5) (εικόνα R.3).

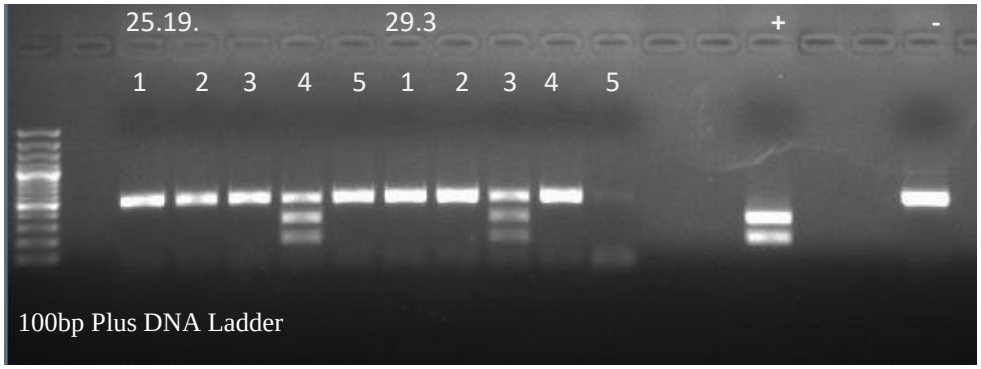


516bp αγρίου τύπου X
324bp
192bp → HindIII

Εικόνα R.3. Μοριακός έλεγχος 2ης διασταύρωσης ατόμων G_1.

Τα άτομα γενιάς G_2, απόγονοι «θετικών» διασταυρώσεων, επιλέγονται με βάση το φαινότυπο του FM7 (επιλογή ατόμων που φέρουν φαινότυπο bar eye) και διασταυρώνονται ξανά με το στέλεχος FM7.

Ύστερα από περίπου 5 ημέρες, εναπόθεση αυγών (G_3), οι ετερόζυγοι γονείς της διασταύρωσης ελέγχονται για την παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Ο μοριακός έλεγχος έδειξε ότι οι θετικές διασταυρώσεις ήταν οι 15.3 (1, 2, 4), 15.4.2, 15.6.4, 21.(1.1, 2.1), 23.(1.2, 1.3, 2.1), 25.19.4, 26.4.1, 26.5.2, 29.3.3 και 38.5.1. (εικόνα R.4).

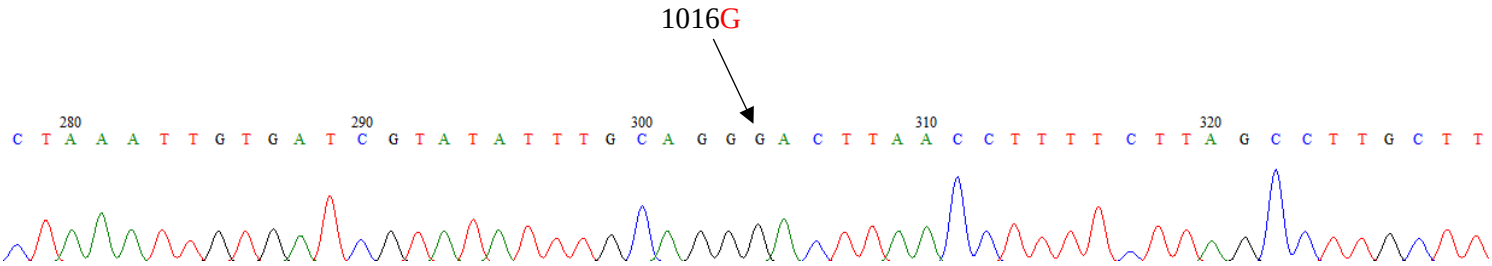


516bp αγρίου τύπου X
324bp
192bp → HindIII

Εικόνα R.4. Μοριακός έλεγχος 3ης διασταύρωσης ατόμων G_2.

Απόγονοι των θετικών διασταυρώσεων, γενιάς G_3 διασταυρώθηκαν με τα αδερφικά άτομα. Συγκεκριμένα τα αρσενικά επιλέγονται με αρνητική επιλογή φαινοτύπου FM7. Τα άτομα που δε φέρουν το φαινότυπο bar eye και έχουν κόκκινο μάτι επιλέγονται (αρσενικά άτομα $\frac{1016G}{Y}$). Τα θηλυκά που έχουν φαινότυπο FM7 και κόκκινο μάτι επιλέγονται για τη διασταύρωση $\frac{1016G}{FM7}$. Για τη διασταύρωση αυτή δεν απαιτείται μοριακός έλεγχος καθώς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ξεχωρίζει από το αλληλόμορφο FM7. Επιλέχθηκαν οι απόγονοι, γενιάς G_4, με αρνητική επιλογή για το φαινότυπο του balancer FM7 (απόρριψη ατόμων με φαινότυπο bar ματιού) και πραγματοποιήθηκε η τελική διασταύρωση ομοζύγωσης.

Οι απόγονοι της διασταύρωσης αυτής είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο όπως επιβεβαιώθηκε και από αλληλούχηση (Macrogen).



Εικόνα R.5 Χρωματογράφημα αλληλούχησης ομόζυγου ατόμου ως προς τη μεταλλαγή V1016G (GTA → GGA).

R. A.3 Βιοδοκιμή επαφής με δελταμεθρίνη

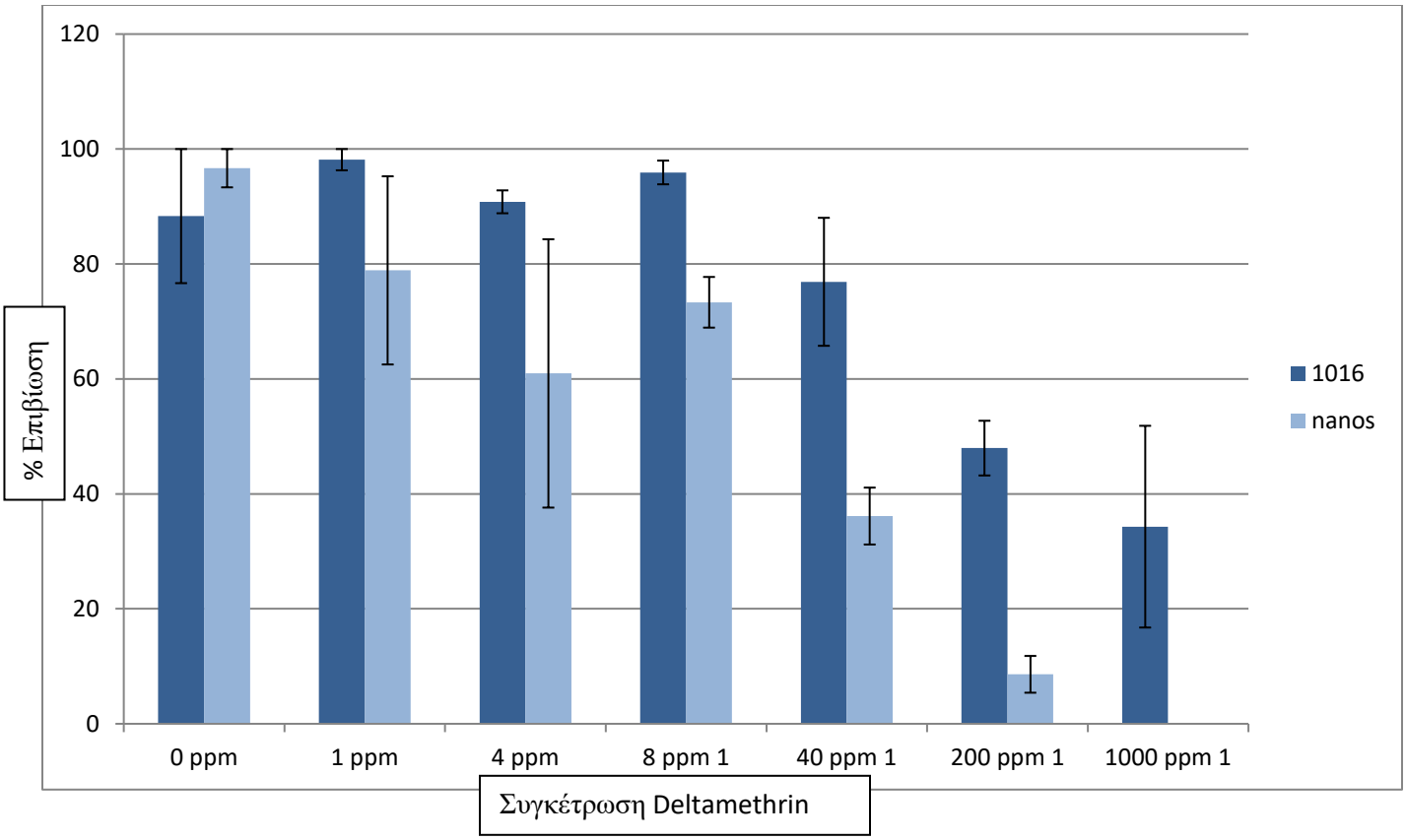
Ο τύπος της βιοδοκιμής που χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της συνεισφοράς της μεταλλαγής V1016G στο φαινότυπο της ανθεκτικότητας ήταν βιοδοκιμές επαφής (contact bioassays). Αυτό καθορίστηκε από το είδος του εντομοκτόνου. Από πολυάριθμες μελέτες έχει καθοριστεί ότι η επίδραση των πυρεθροειδών μελετάται μέσω της χρήσης βιοδοκιμών επαφής, που σημαίνει ότι το έντομο έχει την ικανότητα να εκτεθεί και να προσλάβει το εντομοκτόνο που βρίσκεται στα τοιχώματα του vial. Αυτό δεν ισχύει για όλα τα είδη εντομοκτόνων καθώς π.χ. για εντομοκτόνα όπως η αμπαμεκτίνη ο βέλτιστος τρόπος βιοδοκιμών αποτελεί η διάλυσή του στην τροφή (feeding bioassays). Τα παραπάνω εξαρτώνται σαφώς από τη φύση αλλά κυρίως από τον τρόπο δράσης του κάθε εντομοκτόνου. Είναι γνωστό λοιπόν ότι τα πυρεθροειδή μπορούν μέσω επαφής, κυρίως μέσω των ποδιών του εντόμου, να φτάσουν στο στόχο τους που είναι τα νευρικά κύτταρα του εντόμου.

Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής με το εντομοκτόνο Deltamethrin έδειξαν ξεκάθαρα πως η μεταλλαγή V1016G είναι ικανή να μειώσει την ευαισθησία του εντόμου στο συγκεκριμένο πυρεθροειδές.

Πιο αναλυτικά όπως φαίνεται και παρακάτω από τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής προέκυψε μία τιμή LC_{50} για το αγρίου τύπου στέλεχος nos.Cas9 (#54591) καθώς και για το μεταλλαγμένο (V1016G).

Στέλεχος	LC_{50} (mg/L)	95% CI	Slope ± SE	χ2 (DF)	RR
Control – nos.Cas9	15.66	3.10 - 41.29	1.107 ± 0.13	65.441 (16)	1
V1016G	387	232.02 - 746.42	0.961 ± 0.11	16.131 (16)	**24.712**

Πίνακας R.1. Βιοδοκιμή επαφής με το εντομοκτόνο δελταμεθρίνη. Οι βιοδοκιμές κάθε στελέχους πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες. Η τιμή LC_{50} αντιπροσωπεύει τη θνησιγόνο συγκέντρωση του εντομοκτόνου στην οποία σκοτώνεται ο μισός πληθυσμός των εκτεθειμένων ατόμων. CI: διάστημα εμπιστοσύνης. DF: βαθμοί ελευθερίας και RR: λόγος ανθεκτικότητας. Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται το ποσοστό επιβίωσης για τις αγρίου τύπου μύγες control – nos.Cas9 και τις μεταλλαγμένες V1016G. Οι control μύγες επιβιώνουν έως και τα 200 mg/L σε αντίθεση με τις μεταλλαγμένες που επιβιώνουν, ακόμη και στη συγκέντρωση των 1000ppm, σε σχετικά μεγάλο ποσοστό της τάξης του 33%.



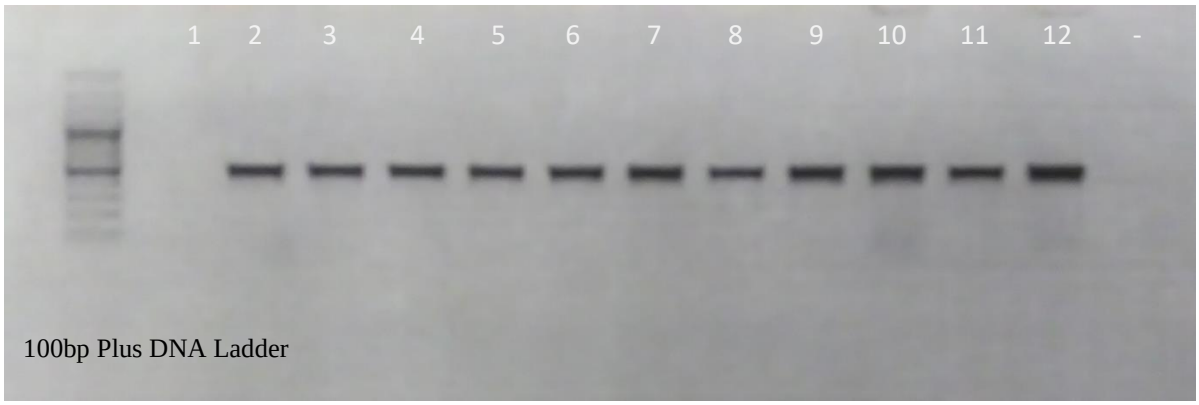
Διάγραμμα βιοδοκιμής επαφής με Deltamethrin.

R. B. G323D και G326E

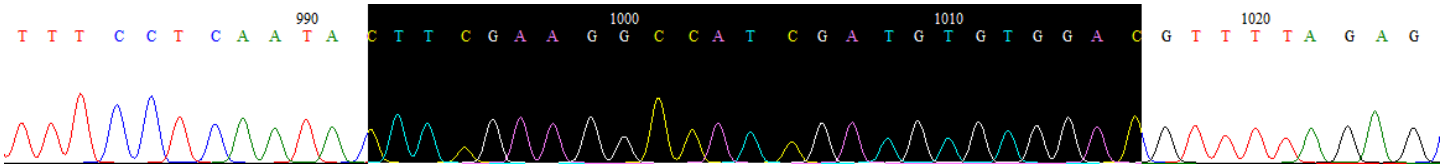
R. B.1 Κατασκευή φορέα έκφρασης gRNA GluCl

Ένας αριθμός 12 αποικιών ελέγχθηκε μέσω colony PCR με χρήση του εκκινητή T7, η αλληλουχία του οποίου βρίσκεται στο φορέα pU6-BbsI-chiRNA, και του ολιγονονουκλεοτιδίου 886-R (S.I). Το προϊόν της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκε σε 1.2% πήκτωμα αγαρόζης, το αποτέλεσμα βρίσκεται στην εικόνα R.6.

Colony PCR-φαίνονται οι κλώνοι οι οποίοι έχουν ενσωματώσει στο φορέα pU6-BbsIchiRNA το επιθυμητό gRNA GluCl .



Εικόνα R.6 Όπως φαίνεται 11 στους δώδεκα κλώνους ήταν θετικοί για την εισδοχή του gRNA GluCl. Η παρουσία μορίου δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου στο φορέα είναι υποχρεωτική ώστε η PCR να δώσει προϊόν (διαγνωστική PCR), παρόλα αυτά δεν επιβεβαιώνει 100% την σωστή εισδοχή του στο φορέα. Για αυτό το λόγο απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA από τους επιθυμητούς κλώνους gRNA GluCl 3, 4, 5, 7 στάλθηκε για αλληλούχηση. Τελικά και οι τέσσερις αυτοί κλώνοι είχαν τη σωστή εισδοχή της αλληλουχίας του gRNA. Παρακάτω παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αλληλούχησης για τον κλώνο gRNA GluCl 5 που επιλέχθηκε τελικά για την διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας.



Εικόνα R.7 Με μαύρη σκίαση απεικονίζεται η αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου 886-F ενσωματωμένη με τον επιθυμητό τρόπο στο φορέα έκφρασης pU6-BbsI-chiRNA.

R. B.1 Διασταυρώσεις

Το γονίδιο *GluClalpha* εδράζεται στο χρωμόσωμα 3. Το στέλεχος balancer που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TM3/TM6B.

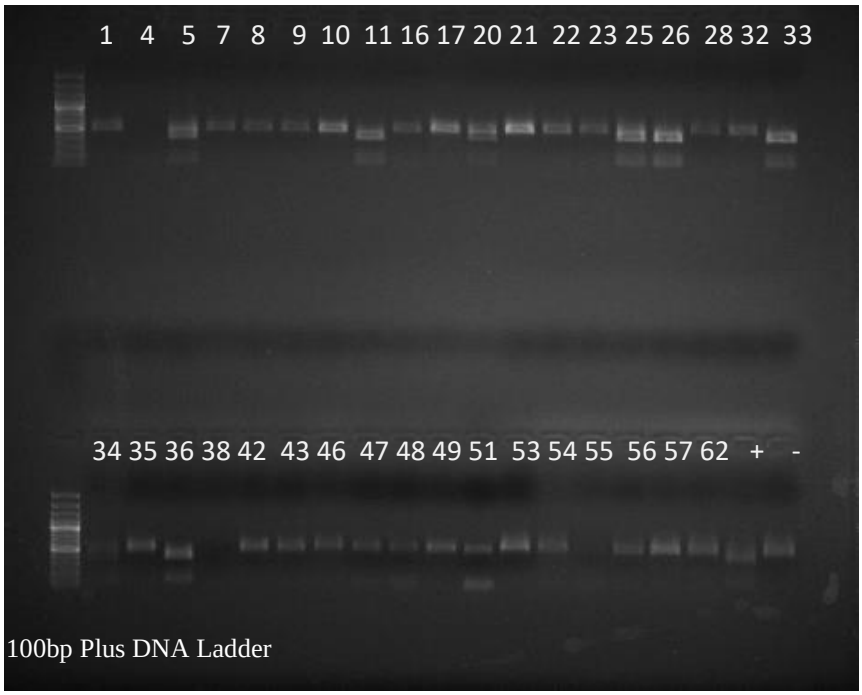
Παρακάτω παρατίθεται η αλληλουχία διασταυρώσεων κοινή και για τα δύο στελέχη (χάριν απλούστευσης απεικονίζεται η διαδικασία μόνο για τη μεταλλαγή G323D).

Ενέθηκαν περίπου 300 λάρβες για το πείραμα G323D και επίσης 300 περίπου λάρβες για το πείραμα G326E. Μετά την πραγματοποίηση των ενέσεων σε έμβρυα στελέχους nos.Ca9 (#54591) λάρβες πρώτου σταδίου μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τροφής (medium vials). 9-15 μέρες μετά συλλέχθηκαν ενήλικα άτομα, τα οποία επιβίωσαν των ενέσεων και κατάφεραν να εκκολαφθούν,. Επιλέχθηκαν όλα τα αρσενικά και τα θηλυκά και διασταυρώθηκαν ατομικά με τρία άτομα, του στελέχους nos.Ca9 (#54591), του αντίθετου φύλου.

Για το στέλεχος με τη μεταλλαγή G323D, 39 άτομα που επιβίωσαν έδωσαν απογόνους στην πρώτη διασταύρωση. Ο αριθμός αυτός για το στέλεχος G326E ήταν 17 γόνιμα ενήλικα άτομα.

Για κάθε μία από τις παραπάνω διασταυρώσεις οι απόγονοι, γενιάς G1, ελέγχθηκαν μοριακά. το αποτέλεσμα του ελέγχου έδειξε πως οι «θετικοί» απόγονοι προέρχονται από τις διασταυρώσεις 5, 11, 25, 26, 33, 34, 36, 59, 61 και 65 για το G323D (ποσοστό ομόλογου ανασυνδυασμού 26%) (εικόνα R.8).

Στο πείραμα G326E θετικές διασταυρώσεις ήταν οι 3, 5, 9, 13, 14, 20 και 21 (ποσοστό ομόλογου ανασυνδυασμού 41%).

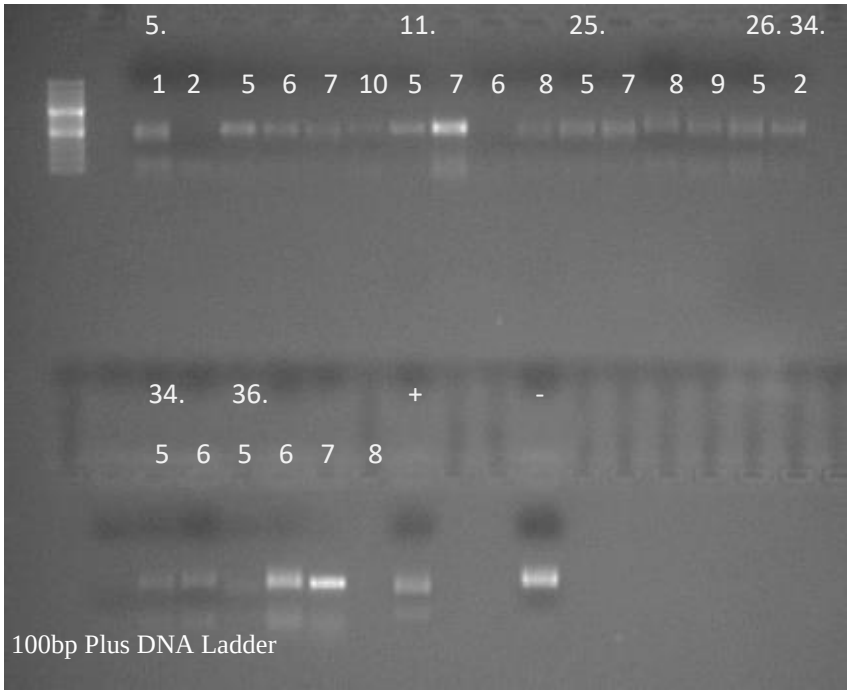


489bp αγρίου τύπου
381bp
108bp → MluI

489bp αγρίου τύπου
381bp
108bp → MluI

Εικόνα R.8 Μοριακός έλεγχος 1ης διασταύρωσης ατόμων G_0 (G323D).

Μετά την εύρεση των 10 «θετικών» διασταυρώσεων για το G323D (7 για το G326E) περίπου 10-15 ενήλικα άτομα, γενιάς G1, διασταυρώθηκαν ατομικά με στελέχη nos.Ca9 (#54591) ξανά. Ύστερα από την παρέλευση περίπου 5 ημερών, μετά την παρατήρηση ύπαρξης απογόνων, τα άτομα G_1 που είχαν διασταυρωθεί ελέγχθηκαν μοριακά. Από το διαγνωστικό, θετικοί γονείς για το G323D, προέκυψαν οι 5.(1,4), 11.(3, 7), 25.1, 26.(1, 2, 3), 34.(2, 5, 6), 36.(1, 7, 8), 59.3, 65(1, 2, 7). Αντίστοιχα για το G326E θετικές ήταν οι διασταυρώσεις με γονείς τους 3.(2, 3, 4, 5), 9.(1, 2, 3, 6), 13, 14, 21. (εικόνα R.9).



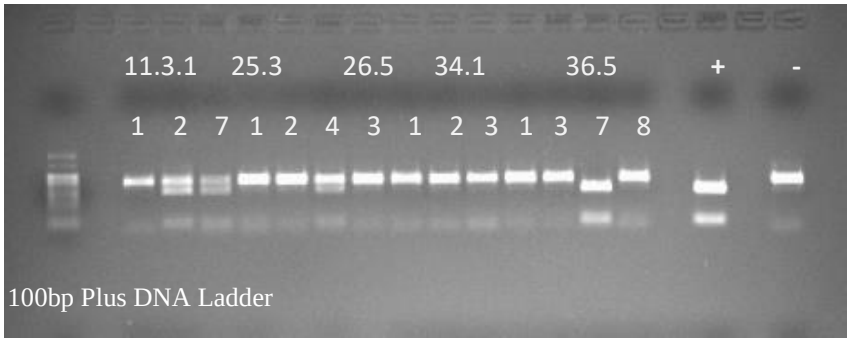
489bp αγρίου τύπου
381bp
108bp → MluI

489bp αγρίου τύπου
381bp
108bp → MluI

Εικόνα R.9 Μοριακός έλεγχος 2ης διασταύρωσης ατόμων G_1 (G323D).

Οι απόγονοι των παραπάνω θετικών διασταυρώσεων, γενιάς G_2 διασταυρώθηκαν με το στέλεχος balancer TM3/TM6B. Ακολούθησε μοριακός έλεγχος με θετικές διασταυρώσεις για το G323D οι 11.3.1.(2, 7), 25.6.4, 36.(5.4, 7.7, 7.10), 59.5.4, 65.1.4. αντίστοιχα για το G326E οι E3.9.5.(1, 6) και E9.4.2.6 (εικόνα R.10).

Στη συνέχεια με επιλογή βάση του φαινοτύπου του balancer χρωμοσώματος TM3 (φαινοτυπικά κοντότριχα άτομα, stubble) τα άτομα γενιάς G3, απόγονοι των θετικών διασταυρώσεων, διασταυρώθηκαν ξανά με το στέλεχος TM3/TM6B.



489bp αγρίου τύπου
381bp
108bp → MluI

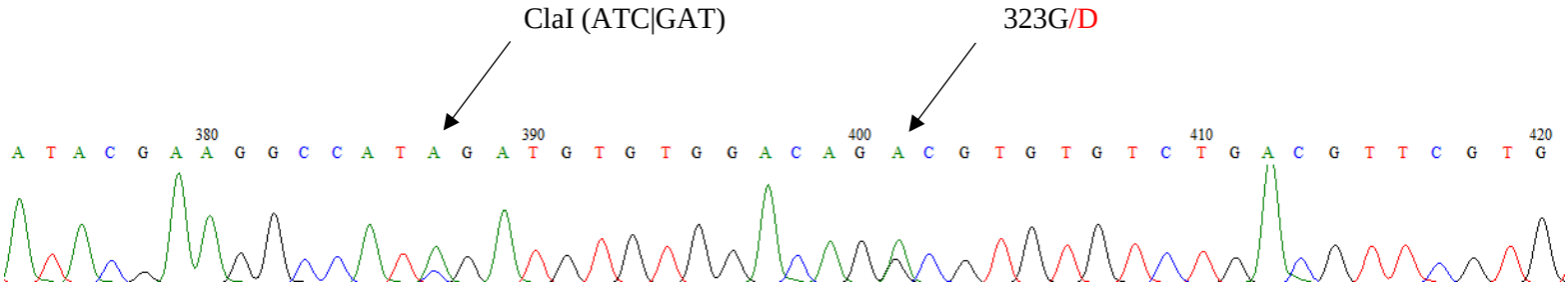
Εικόνα R.10 Μοριακός έλεγχος 3ης διασταύρωσης ατόμων G_2 (G323D).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επιλογή των επιθυμητών απογόνων με αρνητική επιλογή για το φαινότυπο tubby (TM6B) και τα άτομα $\frac{D}{TM3}$ (stubble) διασταυρώθηκαν μεταξύ τους. Οι ετερόζυγοι γονείς σε διασταύρωση σε αυτό το στάδιο ήταν για το G323D τα 11.3.1.7, 25.6.4, 36.7.10, 59.5.4 και 65.1.4. και αντίστοιχα για το G326E ήταν το 3.9.5.1

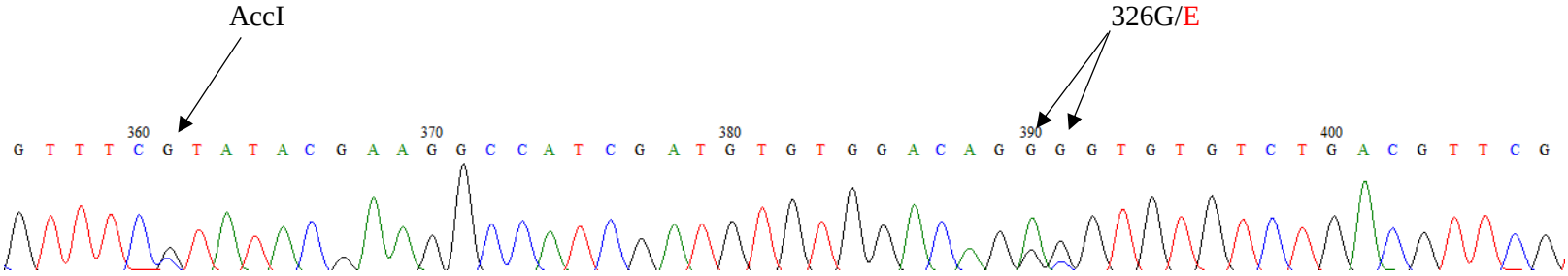
Το αποτέλεσμα της διασταύρωσης $\frac{D}{TM3}$ X $\frac{D}{TM3}$ θα περιμέναμε έχει τους εξής παρακάτω απογόνους: $\frac{D}{TM3}$ και $\frac{D}{D}$.

Οι μόνοι απόγονοι όμως που προέκυπταν ήταν αυτοί της ετερόζυγης μορφής: $\frac{D}{TM3}$

Από την τελική διασταύρωση $\frac{D}{TM3}$ X $\frac{D}{TM3}$ ομόζυγα άτομα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αναμένονται να εμφανιστούν σε ένα ποσοστό 1/3. Παρόλα αυτά κατά την πρώτη φορά διεξαγωγής του πειράματος δεν εμφανίστηκαν άτομα ομόζυγα. Όταν η παραπάνω διασταύρωση αφέθηκε για πολλές γενιές στην ετερόζυγη κατάσταση με το balancer TM3, τελικά ανά κάποια διαστήματα κάποια άτομα, πολύ λίγα στο ποσοστό, είχαν φαινότυπο παρόμοιο με του ομόζυγου για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (άτομα μακρύτριχα, απουσία του αλληλομόρφου TM3). Αυτά τα "escaper" άτομα sub-lethal καταφέρνουν να φτάσουν στο επίπεδο του ενήλικου παρόλα αυτά εμφάνιζαν συνήθως μικρότερο μέγεθος σώματος και ήταν όλα στείρα. Παρακάτω στις εικόνες R.11 και R.12 φαίνονται και τα αποτελέσματα της αλληλούχησης όπου είναι ξεκάθαρο ότι τα στελέχη μας είναι ετερόζυγα (παρουσία δύο κορυφών στο χρωματογράφημα).



Εικόνα R.11 Χρωματογράφημα αλληλούχησης ετερόζυγου ατόμου (μεταλλαγή GGC→GAC (G323D). Όπως φαίνεται στη θέση αυτή η αντίδραση έδειξε και την παρουσία του αγρίου τύπου αλληλομόρφου GGC (323G). Επίσης το δεύτερο βέλος δείχνει την παρουσία, στο αγρίου τύπου αλληλόμορφο, της αλληλουχίας αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου ClaI (ATC|GAT). Παράλληλα στη θέση αυτή φαίνεται και η μεταλλαγή του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (ATA|GAT) που απαλείφει τη θέση ClaI.



Εικόνα R.12 Χρωματογράφημα αλληλούχησης ετερόζυγου ατόμου ως προς τις μεταλλαγές GGC→GAG (G326E). Όπως φαίνεται στη θέση αυτή η αντίδραση έδειξε και την παρουσία του αλληλομόρφου αγρίου τύπου GGC (326G). Επίσης το δεύτερο βέλος δείχνει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που υπήρχε φυσιολογικά στο αγρίου τύπου αλληλόμορφο (CTA|TAC) η οποία μεταλλάχθηκε με στόχο τη δημιουργία μίας θέσης αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο AccI (GTA|TAC) στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

D. Συζήτηση

D. A. V1016G

Με στόχο να αποδείξουμε αν η μεταλλαγή V1016G, στο τασεο-ελεγχόμενο κανάλι νατρίου (*para* στη δροσόφιλα), έχει άμεσο ρόλο στην ανθεκτικότητα στη δελταμεθρίνη, όπως είχε προταθεί και από πολυάριθμες έρευνες (Brengues et al., 2003; Stenhouse et al.,2013; Hirata et al., 2014 και άλλες που αναφέρονται στην παρούσα εργασία) εισαγάγαμε την ομόλογη μεταλλαγή στο κανάλι *para* στη *Drosophila melanogaster* με τη χρήση του συστήματος-εργαλείου CRISPR/Cas9 και συγκρίναμε τα επίπεδα ανθεκτικών φαινοτύπων μεταξύ του μεταλλαγμένου και του αγρίου τύπου/background στελέχους.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε το έντομο *Drosophila melanogaster* που αποτελεί ένα εύχρηστο και καλά μελετημένο οργανισμό μοντέλο στον οποίο το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα σε πειράματα γονιδιωμακής τροποποίησης. Η χρήση της *Drosophila* ως μοντέλο σε αυτό το πλαίσιο είναι απολύτως θεμιτή καθώς το ορθόλογο γονίδιο του τασεο-ελεγχόμενου καναλιού νατρίου βρίσκεται σε όλα τα γονιδιώματα των εντόμων με εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία (Doyle et al., 1991).
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταλλαγή V1016G είναι ικανή να προσδώσει ένα ισχυρό φαινότυπο ανθεκτικότητας στη *Drosophila melanogaster*, με την τιμή του LC_{50} να αυξάνει από τα 15mg/L στα 387mg/L.
Τα επίπεδα ανθεκτικότητας που βρέθηκαν, στο in vivo μοντέλο *Drosophila melanogaster,* αποδεικνύουν ότι η παρουσία της μεταλλαγής V1016G και μόνο είναι ικανή να αποτελέσει ένα παράγοντα αποτυχίας ελέγχου (φαινότυπος ανθεκτικότητας) στους ψεκασμούς με δελταμεθρίνη.
Η παρουσία kdr μεταλλαγών, στην πλειοψηφία των κουνουπιών, σχετίζονται με ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή. Με βάση τον παραπάνω συσχετισμό στην εργασία των Raweewan S et al., 2010, πραγματοποιήθηκε τεχνητή επιλογή με δελταμεθρίνη, στο στέλεχος Khu Bua, του είδους *Ae. aegypti*, η οποία οδήγησε σε πολύ υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Ενώ αρχικά τα πατρικά στελέχη έφεραν τις μεταλλαγές S989P και V1016G σε ετερόζυγη κατάσταση μέσω τις τεχνητής επιλογής, μετά από κάποιες γενιές, εμφάνισαν 11 φορές πιο ανθεκτικό φαινότυπο, από τα αρχικά στελέχη και έφεραν τις δύο μεταλλαγές σε ομόζυγη κατάσταση. Επίσης αυτό που προέκυψε κατά τη διάρκεια της μελέτης ήταν ότι οι δύο αυτές μεταλλαγές είχαν ένα φαινότυπο ατελώς υπολειπόμενο, γεγονός που καθιστά αυτές τις μεταλλαγές χρήσιμες ως μοριακούς δείκτες ανθεκτικότητας στα πυρεθροειδή.

D. A.1 Συνεντοπισμός V1016G με άλλες μεταλλαγές στο VSGC

Η μεταλλαγή V1016G συνεντοπίζεται συχνά με μία άλλη μεταλλαγή στο ίδιο κανάλι την S989P, που αναφέρθηκε και παραπάνω. Παρόλα αυτά η τελευταία μεταλλαγή δεν έχει βρεθεί ποτέ μόνη της (δίχως την παρουσία της V1016G) (Kawada et al., 2014; Srisawat et al. 2010; Stenhouse et al.,2013 Kasai et al., 2014). Επίσης μία ακόμη μεταλλαγή που έχει βρεθεί σε πληθυσμούς του *Aedes aegypti* να εμπλέκεται σε ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή τύπου I είναι η F1534C (Yanola J et al, 2014).
Μελέτες νευροφυσιολογίας που πραγματοποιήθηκαν από τους Du et al., 2013 και Hirata K et al., 2014 έδειξαν ότι η μεταλλαγή V1016G μειώνει την ευαισθησία στα εντομοκτόνα περμεθρίνη και δελταμεθρίνη ενώ η μεταλλαγή F1534C μόνο στην περμεθρίνη. Επίσης η μεταλλαγή S989P δε φάνηκε να εμφανίζει κάποιο φαινότυπο ευαισθησίας στην περμεθρίνη (μόνη της ή και σε συνδυασμό με την V1016G). Οι Du et al. δε βρήκαν κάποιο προσθετικό αποτέλεσμα παρουσία των μεταλλαγών V1016G + S989P αναφορικά με την ευαισθησία στη δελταμεθρίνη και υποστήριξαν ότι η παρουσία της μεταλλαγής S989P ίσως συμβάλλει στη μείωση του κόστους αρμοστικότητας που μπορεί να οφείλεται στην παρουσία της μεταλλαγής V1016G. Αντίθετα οι Hirata et al. έδειξαν ότι οι μεταλλαγές V1016G + S989P δρουν συνεργιστικά μειώνοντας δραστικά την ευαισθησία του καναλιού στη δελταμεθρίνη. Επίσης βρήκαν ένα πολύ ισχυρό ανθεκτικό φαινότυπο όταν ήταν παρούσες και οι τρεις μεταλλαγές S989P + V1016G + F1534C αποκαλύπτοντας την ύπαρξη ενός συνεργιστικού τρόπου δράσης στο συνδυασμό των παραπάνω μεταλλαγών. Σε φυσικούς πληθυσμούς *Ae. aegypti* παρόλα αυτά τριπλά ομόζυγα στελέχη για τις παραπάνω μεταλλαγές είναι πολύ σπάνια ή απουσιάζουν, το οποίο μάλλον οφείλεται στο κόστος αρμοστικότητας (fitness) ή στη έλλειψη εμφάνισης, μέχρι σήμερα, κάποιου γεγονότος ανασυνδυασμού που θα φέρει και τις τρεις μεταλλαγές V1016G + S989P και F1534C στο ίδιο αλληλόμορφο-απλότυπο (Koichi Hirata et al., 2014).

Από τα παραπάνω είναι ξεκάθαρο πως σε ένα επόμενο βήμα από την παρούσα εργασία θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον να μελετηθούν οι παραπάνω μεταλλαγές, S989P και F1534C, σε συνδυασμό με τη V1016G για τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης τους στα πυρεθροειδή με τη χρήση του in vivo συστήματος της δροσόφιλα. Επίσης θα ήταν δυνατή η διερεύνηση της φύσης κάθε μεταλλαγής ξεχωριστά και σε συνδυασμό αναφορικά με το τελικό κόστος τους στην αρμοστικότητα in vivo.

D. A.2 Μελλοντικά πειράματα - συνδυασμός ανθεκτικότητας στόχου (V1016G) και μεταβολικής (P450s)

Η χρήση του μοντέλου *Drosophila melanogaster* με σκοπό την μελέτη σημειακών μεταλλαγών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα έρχεται να προστεθεί σε μία γκάμα από εργαλεία (κλασσικές προσεγγίσεις, γενετική χαρτογράφηση, τεχνολογία ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, RNAi, ετερόλογη έκφραση γονιδίων) που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των μοριακών μηχανισμών ανθεκτικότητας.

Σύμφωνα με τους N. Pavlidi et al, 2012, η ικανότητα εκτοπικής έκφρασης γονιδίων αποτοξικοποίησης σε μύγες *Drosophila melanogaster*, με γενετικό υπόβαθρο μίας σημειακής μεταλλαγής που σχετίζεται με ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, π.χ. V1016G, θα βοηθήσει στη μελέτη της συνεισφοράς των δύο κύριων μηχανισμών ανθεκτικότητας (Hardstone et al., 2008). Επίσης θα βοηθήσουν στην κατανόηση ορισμένων πολύ υψηλά ανθεκτικών στελεχών κουνουπιών που εμφανίζονται τα τελευταία χρόνια. Οι Hardstone et al., το 2008, μελέτησαν το αποτέλεσμα που είχε η παρουσία των δύο κύριων μηχανισμών ανθεκτικότητας, παρουσία μεταλλαγών στόχου kdr αλλά και μεταβολικών ενζύμων P450. Μέσω βιοδοκιμών σε ετερόζυγα αλλά και ομόζυγα κουνούπια του γένους *Culex* βρήκαν ότι η παρουσία και των δύο μηχανισμών δύναται να οδηγήσει, όχι μόνο σε προσθετικό αλλά σε ένα πολλαπλασιαστικό φαινότυπο ανθεκτικότητας στην περμεθρίνη (Hardstone et al., 2008).

Σε άμεση συσχέτιση με το παραπάνω σχεδιάζεται η δημιουργία ενός στελέχους *Drosophila melanogaster*, γενετικού υποβάθρου V1016G, το οποίο θα συνδυάζει, εκτός από τη μεταλλαγή ανθεκτικότητας στόχου, και την έκφραση ενός ενζύμου P450, του CYP9J28. Το ένζυμο αυτό έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται σε στελέχη του είδους, *Ae. aegypti,* ανθεκτικά στα πυρεθροειδή. Επίσης είναι γνωστή η ικανότητά του να μεταβολίζει πυρεθροειδή in vitro. Η ιστοειδική έκφραση του ενζύμου CYP9J28 είναι δυνατή μέσω του συστήματος GAL4-UAS σύμφωνα και με παλιότερη μελέτη (N Pavlidi et al., 2012). Με την κατασκευή αυτού του διπλού στελέχους θα ερευνηθεί το μέγεθος της πιθανής προσθετικής ή πολλαπλασιαστικής αλληλεπίδρασης των δύο μηχανισμών στον τελικό φαινότυπο ανθεκτικότητας.

D. B. G323D και G326E

D. B.1 Μη ομοζύγωση μεταλλαγών G323D και G326E

Η «αποτυχία» των ετερόζυγων ατόμων $\frac{D}{TM3}$ και $\frac{E}{TM3}$ στο να δώσουν ομόζυγους απογόνους από τις διασταυρώσεις $\frac{D}{TM3}$ X $\frac{D}{TM3}$ καθώς και $\frac{E}{TM3}$ X $\frac{E}{TM3}$ μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η μεταλλαγή G323D καθώς και η G326E είναι θνησιγόνες για τη Δροσόφιλα.

Οι λόγοι αποτυχίας του στελέχους να φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο 323D σε ομόζυγη κατάσταση μπορεί να οφείλεται πρώτον στη φύση του αμινοξέος D (ασπαρτικό). Η μεταλλαγή που προκλήθηκε μέσω του μηχανισμού CRISPR/Cas9 – ομόλογου ανασυνδυασμού - στο στέλεχος δροσόφιλα nos.Cas9, αντικατέστησε το αμινοξύ γλυκίνη με το αμινοξύ ασπαρτικού οξέος D (G323D). Αντίστοιχα για τη μεταλλαγή G326E το αμινοξύ γλυκίνη αντικαταστάθηκε με αυτό του γλουταμικού οξέος E. Κοινό γνώρισμα και των δύο αμινοξέων είναι ότι φέρουν ηλεκτρικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες. Σε αντίθεση με το αρχικό αμινοξύ στην ίδια θέση που ήταν αυτό της γλυκίνης, το οποίο έχει μία μη πολική πλευρική ομάδα. Μία λοιπόν εξήγηση, για την αδυναμία ομοζύγωσης αυτών των δύο μεταλλαγών, μπορεί ίσως να δοθεί από τη φύση των νέων αμινοξέων, του ασπαρτικού οξέος και γλουταμικού οξέος, που εισήχθησαν στο γονίδιο *GluClalpha*. Η παρουσία των ηλεκτρικά φορτισμένων πλευρικών ομάδων, των αμινοξέων D και E, δύναται να είναι κρίσιμη για το δίπλωμα της πρωτεΐνης, *GluClalpha*, επηρεάζοντας το σχηματισμό

της τριτοταγούς δομής της. Αποτέλεσμα η δημιουργία μίας πρωτεΐνης μη λειτουργικής με αποτέλεσμα ένα φαινότυπο θνησιγόνο.

Τα κανάλια GluCls παρουσιάζουν μία μεγάλη γκάμα από λειτουργίες στο νευρικό σύστημα των ασπονδύλων. Οι λειτουργίες αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρείς ομάδες: τον έλεγχο και τη ρύθμιση της κίνησης, τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και τη διαμεσολάβηση αισθητηριακών σημάτων. Αγωγή με ιβερμεκτίνη στους νηματώδεις έχει αντίκτυπο στην αναπαραγωγή και τη γονιμότητα, υποδεικνύοντας το ρόλο των καναλιών GluCls σε αυτές τις λειτουργίες. Στην εργασία του. Wolstenholme 2012, αναφέρεται ότι στο είδος *D. melanogaster*, τα κανάλια GluCls εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου των πλάγιων νευρώνων στις λάρβες όπου και συντονίζονται συμπεριφορές ρυθμικής αποφυγής του φωτός αλλά και στους πλαγιοκοιλιακούς νευρώνες (LN_vS) στον εγκέφαλο των ενηλίκων που ελέγχει την ξεκούραση και την εγρήγορση. Οι καταστρεπτικές, για την πρωτεΐνη GluClalpha, μεταλλαγές δύναται να βλάπτουν αναπτυξιακά στάδια και τη ρύθμιση πρόσληψης τροφής των λαρβών με αποτέλεσμα τη μη επιβίωση ομόζυγων ατόμων. Επίσης τα ομόζυγα, sub-lethal, άτομα μπορεί να εμφανίζουν όπως είδαμε προβλήματα στη γονιμότητα.

Μία δεύτερη πιθανή εξήγηση για την αδυναμία ομοζύγωσης των μεταλλαγών δύναται να ήταν η παρουσία κάποιων μεταλλαγών συνδεδεμένων με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφό μας. Πιο συγκεκριμένα κατά την πραγματοποίηση των ενέσεων η στόχευση των μορίων gRNAs μπορεί να γίνει και σε περιοχές εκτός των επιθυμητών, για τις οποίες σχεδιάστηκαν. Μία πιθανή στόχευση αυτού του τύπου, αναφερόμενη ως off-target, μπορεί να δημιουργήσει στο γονιδίωμα ανεπιθύμητες μεταλλαγές. Μετά το σπάσιμο της διπλής έλικας, ο μηχανισμός του μη ομόλογου ανασυνδυασμού, θα επαχθεί προς επιδιόρθωση της βλάβης (ο ομόλογος δε δύναται να πραγματοποιηθεί καθώς απαιτεί ομόλογη περιοχή μεταξύ πλασμιδίου δότη και χρωμοσώματος). Μέσω όμως του μη ομόλογου ανασυνδυασμού πολύ συχνά οι δύο έλικες του DNA ενώνονται με εμφάνιση πολλών μεταλλαγών στο σημείο του DSB. Αυτές οι μεταλλαγές, συνήθως της μορφής διαγραφής ή εισδοχής νουκλεοτιδικών βάσεων (indels), είναι πολύ πιθανόν να καταστρέψουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μίας πρωτεΐνης. Αν αυτή λοιπόν η πρωτεΐνη είναι βασική για την επιβίωση του ατόμου, τότε θα προσδίδει στον οργανισμό ένα θνησιγόνο φαινότυπο. Με αυτό τον τρόπο η επιθυμητή μεταλλαγμένη περιοχή, π.χ. της G323D, του αλληλομόρφου, είναι ισχυρά συνδεδεμένη γενετικά με μία θνησιγόνο μεταλλαγή σε κοντινή απόσταση του ίδιου αλληλομόρφου. Διευκρινιστικά το μόνο χρωμόσωμα το οποίο μπορεί να φέρει το θνησιγόνο μεταλλαγή, που αναφέρεται παραπάνω είναι το χρωμόσωμα 3 και συγκεκριμένα το ίδιο ομόλογο στο οποίο βρίσκεται και η μεταλλαγή G323D (αντιστοίχως και το για τη μεταλλαγή G326E). Και αυτό γιατί κατά τη διάρκεια των διασταυρώσεων γίνεται επιλογή μόνο του επιθυμητού αλληλομόρφου π.χ. G323D. Οποιαδήποτε λοιπόν άλλο αλληλόμορφο είχε στοχευθεί εξ αρχής, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θνησιγόνου μεταλλαγής, θα εξαλείφθηκε μέσω της τεχνητής επιλογής που ασκήθηκε για την ομοζύγωση.

Για την αποφυγή του παραπάνω φαινομένου είχε δωθεί ιδιαίτερη προσοχή κατά το σχεδιασμό των gRNAs, μέσω του προγράμματος (http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/), με βάση αυστηρά κριτήρια που δεν επέτρεπαν την ύπαρξη off-targets θέσεων στόχευσης.

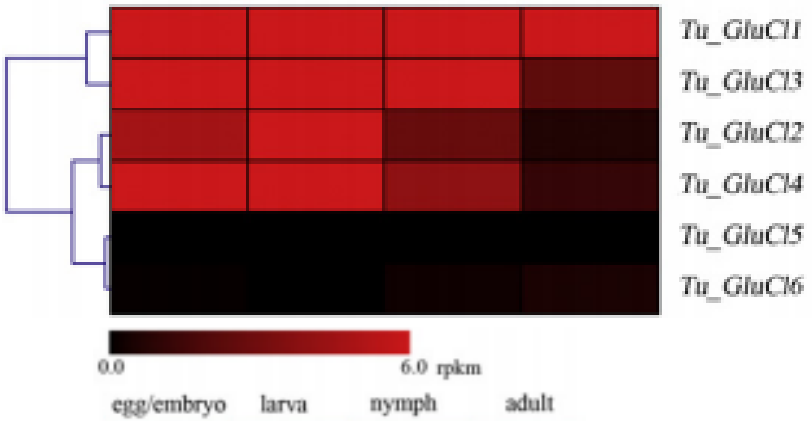
Επιπρόσθετα τα αποτελέσματα της αλληλούχησης για τα ετερόζυγα άτομα $\frac{D}{TM3}$ και $\frac{E}{TM3}$ έδειξαν ότι εκτός από τις προβλεπόμενες και επιθυμητές μεταλλαγές των αλληλομόρφων η προς εξέταση περιοχή του αλληλομόρφου δεν έφερε οποιαδήποτε άλλη αλλαγή-μεταλλαγή που θα μπορούσε να προκαλέσει το θνησιγόνο φαινότυπο. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε σε μία εκτεταμένη περιοχή πέριξ της μεταλλαγής αφού χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Glu-Cl_Fw και Glu-Cl_Rv.

Ένα στοιχείο που αποκλείει την παραπάνω υπόθεση αποτελεί το αποτέλεσμα διασταυρώσεων που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ διαφορετικών σειρών για το στέλεχος που φέρει τη μεταλλαγή G323D και G326E. Κάθε μία διαφορετική σειρά προέρχεται από ένα διαφορετικό γεγονός στόχευσης-ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι

διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς μεταξύ ακόμη και μεταξύ σειρών D και E. Πιο συγκεκριμένα κάθε σειρά προέρχεται από διαφορετικό injection event. Αυτό σημαίνει ότι αν σε κάποιο injection event πραγματοποιήθηκε με τον παραπάνω μηχανισμό κάποιο off-target στο χρωμόσωμα 3 θα μεταφέρεται μαζί με τη μεταλλαγή G323D (καθώς τα στελέχη balancer δεν επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό). Παρόλα αυτά η εξέταση 6 διαφορετικών σειρών, έδειξε αδυναμία ομοζύγωσης, που σημαίνει ότι και τις έξι φορές (για τη μεταλλαγή G323D) πραγματοποιήθηκε κάποιο off-target που είναι σχεδόν απίθανο. Το ίδιο φαινόμενο προέκυψε και μετά τη διασταύρωση στελεχών τα οποία ήταν ετερόζυγα για τη μεταλλαγή D με στελέχη ετερόζυγα για τη μεταλλαγή E.

Σε έντομα όπως η *Drosophila melanogaster, Apis mellifera* και *Tribolium castaneum* υπάρχει μόνο ένα γονίδιο *GluCl* (Jones & Sattelle, 2007; Knipple & Soderlund, 2010). Αντίστοιχα στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* και στο άκαρι *Tetranychus urticae* έχουν αναγνωριστεί 5 ορθόλογα *GluCl* γονίδια (Wolstenholme & Rogers, 2005; Dermauw et al., 2012). Στα έντομα όπως η *Drosophila melanogaster* το μοναδικό γονίδιο κωδικοποιεί πέντε υπομονάδες οι οποίες τελικά διαμορφώνουν έναν ομο-πενταμερή υποδοχέα, που είναι και το λειτουργικό κανάλι GluCl (Dermauw et al., 2012; Jones, A.K. & Sattelle, D.B., 2007). Η σύσταση των υπομονάδων στα κανάλια GluCls σε αρθρόποδα-μη έντομα- όπως τα ακάρεα είναι άγνωστη (Wolstenholme et al., 2012).

Μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας, σε ωοκύτταρα *Xenopus*, έδειξαν ότι το γονίδιο *DrosGluClalpha* παράγει ένα μονομερές κανάλι χλωρίου το οποίο ελέγχεται από το γλουταμικό αλλά και από αβερμεκτίνη (Cully et al., 1996). Με βάση τα παραπάνω η παρουσία πέντε γονιδίων (εικόνα 14) μπορεί να προσφέρει τη δυνατότητα στο μεταλλαγμένο G323D αλληλόμορφο να λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό του πενταμερούς καναλιού GluCl στα κύτταρα του *Tetranichus urticae*. Η παρουσία αυτής της μεταλλαγής μπορεί να αποτρέπει την πρόσδεση της αμπαμεκτίνης με αποτέλεσμα την έκφραση του ανθεκτικού φαινοτύπου (17.9 folds) στην αμπαμεκτίνη. Παράλληλα βέβαια το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο μπορεί μην έχει την ικανότητα να δημιουργήσει μία λειτουργική υπομονάδα με σκοπό το σχηματισμό ενός λειτουργικού καναλιού, η οποία όμως συμπληρώνεται από την ύπαρξη των άλλων, αγρίου τύπου αλληλομόρφων. Με αυτό το σκεπτικό μπορεί να αποτρέπεται ο σχηματισμός ενός λειτουργικού καναλιού με την παρουσία μόνο του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (G323D) σε ένα ομοπενταμερές στη *Drosophila melanogaster* (παρουσία ενός μόνο γονιδίου για το κανάλι GluCl).



Εικόνα D.1

Έκφραση γονιδίων *Tu_GluCl* στα στάδια ανάπτυξης του *T. urticae*.

D. Β.2 Μελλοντικά πειράματα διερεύνησης μεταλλαγών G323D και G326E

Σε ένα επόμενο βήμα θα μελετηθεί ο λόγος αδυναμίας ομοζύγωσης των μεταλλαγών G323D και G326E στο γονίδιο *GluClalpha*. Για το σκοπό αυτό ένα πείραμα γονιδιακής συμπλήρωσης θα πραγματοποιηθεί με τη χρήση ενός στελέχους το οποίο φέρει τη διαγραφή μίας εκτεταμένης περιοχής στο χρωμόσωμα 3 η οποία περιλαμβάνει και κωδικές αλληλουχίες του γονιδίου *GluClalpha*. Το στέλεχος (#25726) παραγγέλθηκε ειδικά από το Bloomington Stock Center ώστε να φέρει έλλειψη στις περιοχές του τρίτου χρωμοσώματος (3R:19761483;3R:19981896). Η περιοχή της έλλειψης εμπεριέχει και την γονιδιακή περιοχή της μεταλλαγής G323D (και άρα και της G326E). Στην περίπτωση που από τη διασταύρωση του ετερόζυγου στελέχους ($\frac{D}{TM3}$) με το παραπάνω στέλεχος προκύψουν φυσιολογικοί, όσον αφορά τον αριθμό και το φαινότυπο, απόγονοι σημαίνει ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο συμπληρώνει το στέλεχος #25726. Δηλαδή η περιοχή του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου και άρα και η καθεαυτή μεταλλαγή είναι βιώσιμες στον οργανισμό *D.melanogaster*.

Σε περίπτωση που η διασταύρωση δε δώσει απογόνους σημαίνει ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο δεν μπορεί να συμπληρώσει γενετικά (λειτουργικά) το στέλεχος #25726. Η παρουσία κάποιας μεταλλαγής δηλαδή, που είναι πιθανό να είναι η G323D (αντίστοιχα και η G326E), είναι μη επιτρεπτή για τη βιωσιμότητα της *D.melanogaster*.

Σύμφωνα με τους Zimmer et al.(2016) η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 στη *D.melanogaster* αποτελεί μία άμεση και οικονομική προσέγγιση με στόχο την αξιολόγηση πιθανών μεταλλαγών ανθεκτικότητας. Παρόλα αυτά στην προσέγγιση αυτή απαιτείται προσοχή καθώς, η εισαγωγή σημειακών μεταλλαγών (SNP), στα ορθόλογα γονίδια της *D.melanogaster,* δε σημαίνει ότι θα έχει ακριβώς τον ίδιο φαινότυπο με αυτό των οργανισμών στόχων. Η επιτυχία πιθανώς εξαρτάται από τη γονιδιακή θέση του SNP αλλά βεβαίως και το βαθμό συντήρησης μεταξύ των ορθόλογων γονιδίων οργανισμών στόχων και οργανισμών μοντέλων (Zimmer et al., 2016). Επίσης, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, πολλές φορές είναι πιθανόν μία σημειακή μεταλλαγή να μην είναι επιτρεπτή. Ενώ οι μεταλλαγές G323D και G326E εμφανίζονται σε φυσικούς πληθυσμούς τετρανύχου στο πεδίο κατά την προσπάθεια κατασκευής ομόζυγων στελεχών *D.melanogaster*, με τις παραπάνω μεταλλαγές, αποκαλύφθηκε ότι είναι αδύνατο. Είναι πολύ πιθανόν αυτές οι μεταλλαγές που βρέθηκαν στη φύση να είναι βιώσιμες σε ομόζυγη κατάσταση ενώ να έχουν θνησιγόνο φαινότυπο όταν εισαχθούν στη *D.melanogaster*. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από το βαθμό συντήρησης-ομοιότητας της αλληλουχίας του γονιδίου μεταξύ του οργανισμού που βρέθηκε και της *D.melanogaster*. Πιο αναλυτικά διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των παραπάνω οργανισμών, καθώς ο τετράνυχος είναι άκαρι (αραχνίδιο) το οποίο απέχει εξελικτικά από τα έντομα (συγκεκριμένα τη *D.melanogaster*), σε επίπεδο αλληλουχίας DNA και κατ' επέκτασιν και αμινοξέων δύναται να επιτρέπουν στον οργανισμό *T. urticae* να εκφράσει μια λειτουργική πρωτεΐνη λόγω γειτονικών αμινοξέων που τελικά να σταθεροποιούν τη δομή της πρωτεΐνης, παρουσία του νέου αμινοξέος. Η διαφορετική αμινοξική αλληλουχία παρόλα αυτά στο γονίδιο *GluClalpha* (στη *D.melanoaster*) πιθανώς τελικά να μην επιτρέπει το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο στη συγκεκριμένη αυτή θέση.

Τέλος μελλοντικά σχεδιάζεται να πραγματοποιηθούν βιοδοκιμές στα ετερόζυγα στελέχη με σκοπό την μελέτη της φύσης των μεταλλαγών όσον αφορά το χαρακτήρα της επικράτειας-υποτέλειας στον ανθεκτικό φαινότυπο καθώς στην εργασία των W. Dermauw et al., το 2012, διασταυρώσεις μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών τετρανύχου έδειξαν ότι ο ανθεκτικός φαινότυπος εμφάνιζε χαρακτήρα ατελώς υπολειπόμενο.

S. Συμπληρωματικές πληροφορίες

S. I. Πίνακας εκκινητών και μορίων gRNAs που χρησιμοποιήθηκαν

Εκκινητές αλληλούχησης *para* γονιδίου	
KDRFw	5’-TCGCTCCAAATCCAACTGAT-3’
KDRRv	5’-ACCGACTTTATGCACAGCTT-3’
KDRExFw	5’-AATTTGCCATGTGGGAGTTGC-3’
KDRExRv	5’-GATCGATCGCATCCTCAACT-3’
Εκκινητές μοριακού ελέγχου V1016G	
KDRFw	5’-TCGCTCCAAATCCAACTGAT-3’
KDRRv	5’-ACCGACTTTATGCACAGCTT-3’
gRNAs V1016G	
gRNA 205	5’ -GCCAATTCGATTGAAGGCCTCGG- 3’
gRNA 406	5’ -GACTTGTAAACGATGTTTACTGG- 3’

Εκκινητές αλληλούχησης *DrosGluClalpha* γονιδίου	
GluExFw	5' -TGGATGGCATTTCTCTGTACCT- 3'
GluExRv	5' -GCAAGGAACCGAACAAATCGT- 3'
GluInFw	5' -ACCTAACCCCTTTTGCAGGT- 3'
GluInRv	5' -ATGCATAGTTCACCAGGGCG- 3'
Εκκινητές μοριακού ελέγχου G323D και G326E	
Glu-Cl_Fw	5’- TCAGCATTAAAGAACCAGCGT- 3’
Glu-Cl_Rv	5’ -ATGCATAGTTCACCAGGGCG- 3’
gRNA GluCl	
gRNA GluCl - 886-F*	5’ – GAAGGCCATCGATGTGTGGACAGG- 3’

* Το 886-F αποτελεί το ολιγονουκλεοτίδιο (5’- CTTCGAAGGCCATCGATGTGTGGAC-3’) καθώς και το 886-R ολιγονουκλεοτίδιο (5’- AAACGTCCACACATCGATGGCCTTC-3’) που παραγγέλθηκαν από την Invitrogen, φωσφωρυλιωμένα στο 5’ και με τα άκρα BbsI συμβατά για συγκόλληση προς το φορέα έκφρασης pU6-BbsI-chiRNA.

S. II. Γενετικοί χάρτες πειραμάτων

S. II.a. V1016G

Εικόνα S1. Εκτεταμένη περιοχή 2.500bp του γονιδίου *para* του στελέχους nos.Cas9 (*Drosophila melanogaster*). Απεικονίζονται οι εξωτερικοί εκκινητές αλληλούχησης, η μεταλλαγή V1016G, οι εκκινητές μοριακού ελέγχου και τα δύο μόρια gRNAs. Με κόκκινα ▭ και μπλε → απεικονίζονται οι εκκινητές (KDRFw, KDRRv, KDRExFw, KDRExRv) που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση της χρωμοσωμικής περιοχής. Με τα πλαίσια ▭ παρουσιάζονται τα gRNAs μόρια που χρησιμοποιήθηκαν. Και το σχήμα ◯ εμφανίζει την καθεαυτή (επιθυμητή) μεταλλαγή 1016G.

```
>X dna:chromosome chromosome:BDGP5:X:16378800:16382400:1
CAACAGTGGGCGGATAGGTCGTTTCCACCACACCCGCACCAGTGTTGCCAACTAATGAAC
GTAACTGAGCAATTAATTGAATAAGCTGATGAGCCGTTAATAACCAAAGTGTTTCCACCA
GCTGGCATCAGTGTAGACATACTGTTTCCGCTGAGCGCCAGTCAGTGGATGCAACTTAAG
GTGACGGATGATTCGAGTTGCTAAGGTTTAAACAAAAATCCATACATATTACTAATACAC
AGACAGTAAATCGAACAAATAAAAATTCGAATAACGAGAGTAAGAAAAGTTCATAACACT
ATGAAGGATCAAATCCACTGTTTTACTTTCAATTTATATAATTCCACATTACAATGCGAG
TCTAATACTGTTTTCGCTTATTTATGTTTCGTTTTCGATAATGTCAGCTAGACACATAAT
TCAAATTTGCCATGTGGGAGTTGCTTTTTATTCGAAATATTGAAATCTTTTTCGTTTCGG        KDRExFw
CTCGGCCAATTAATCTCCGCTTGCGATGCCAGCGAGGAATATTGAAAATGCAAATGTACA
AGGATGTGGGGAAGTGGTTGTTGTTAAACCAAAACCATTAACCTAGGTCCGAAATCAAAA
GGGTGAGGTAAAACAAGGCTTACTAATTTTAATCTAGATTCAAAGAACTCAACCAAAGTC
ATAAATATTCAATTGCTAACAGTATTGACGACGAGGATCAAACTAGTTTATAAAAATGTT
TAGAAACTTGAATAATATGTATCTAAGGAAAATACGTATAAGAGTACAATATACTTGGTT
TTTGGATTACTGGTACTGGTACTGATACTGTTACTTTCGTTTCAGCTAAATACAGACTAT
CTAAGTAATGCTAAAGATTATGACGGATACGGTTACGGTTACGATTTGTTTTAGTTGTTT
GTTGGGTATGATGTGATCGGAAATGGCACGGCACGGCACAGTTCCCTCAGTGCGACTCAC
ATTGGTCAGAGGAGGTCTCAGGTCTGAGGTCTGAGGTCTGAGGTCTGAGGTCTGAGGTCT
GAGGTCAGAGTTCAGAGGATCACTGACCGGCTGAAGAACAACAACACTTAGGTTCAAATC
GAACGGGAACCGATACAAACAAACCAAAGAAATGGAAGCAATCTCTCGATCGAATATGAA
TACCAGGATGAATACTTTTTGGCTTTACAGATACATGTTCTGGTGAGTGGCTTGAATGGC
TGAGTCTGAGGCTGAGGTCGAGGTTAAAAGGTCTAGGTCTAGGTCTAGAGGGCGGGGGAA
GAGGTATACTTGAAACTAACTAAAGAGAATTTGCAAATTGTCAGCTAAGAACGTATTTTT
AGTTTTTGGGGGATATTTCCTTTTACAATTAGTATACAGAATGCGAATTGGGTTTGATTT
GATTTTTGGTATTTGCAATTGATTTAGATACTGATATTTGGTTTTAGATCGATTACGCAA
TTCAATTACTGGCCAATAGTGAGTTGAAGTTAACGTTAACGGTATACGCAATTATATCGT
TGGCAATATACGAGTATTACGAGTATCATATAATTAAAAGTAGTTTAGTAATTGGAAAAC
AAGTGGATAAAAACCTTCGCTCCAAATCCAACTGATCTGGTTGGTCCTCTCACCTGATGG        KDRFw
TTGATCACTTATTTGATTTGTCAATTTGTTACGTATTAACTTGAAACAATCAGCAATATT        exon 20
ACGCTTAACCCAACTTTTAAATCGGCCAATTCGATTGAAGGTCCTCGGCTATTTTATTCGT
ATCGTTATCGGCAGTCGGCGCTGATAAGCTAGATGAGCCAAAATTGGACAAAAGCAAGGC
TAAGAAAAGGTTAAGTACTGCAAATATACGATCACAATTTAGTTATCTACATCTACAAT
GCGATGCTTAAAGCCATGGTTAGAGGCGATAAGTCAGCATTATAGCCAGTAAAACATC
GTTTACAAGTCAGCAGTTCGATAAGAGTACTCACCACAAGATTGCCGATGACAACGGTGGCCA
AGAAGAAGGGAATGCACGAGACATCGCCCACGTACATGCAGTCCCACATGGACTCGATCC        exon 19
ATTCTCCGCAGAGCACCCGGAACACGATCATGAGCTGTGCATAAAGTCGGCTGAAGTTCC        KDRRv
AGCGCGGCAGGTCGCCATCCGGAAAGCGGTCCTTGTGATCTGTCGATGGTTTGGCATTAA
TTAGCAATAGTTTCTAGCTCGATTCGTTTTCTACGAGTATAGTTTATGTTTTGGGGATAT
TTGGACACAGTTTCAATTGTTTTAATTGATTTTTATTTTGGTTTGGTTTGATTTGCTGTC
AAGCCACATACAAAAGCGTGTGCAAACGGTGTTCAGCGCAGCGAGCACTCACAAAAAAAC
GGTGTGTTACAAGTTAAAATGCCAGAAAAATCGTACACAAAAAAAAAAAGAGTGAACCAA
AAAGTATCGCACGCCTCATCTGCATCAACATCATTTGATTTTATCGAGTTCTTCAGGCTA
TAGAGCTACGAAAGTGTGTAGCTAAACAAAGTTTACGCTTGCGATCGCATATACAAAATG
CTTAGGAAGGAAAAAAAAATCAAATAGACGAGCTTGGAGTAAATTAGCTAGGAGAAAAGT
TACTTGCCGCACCTTCGCTGGCAGGTGTACTTACGGAGGACACGGGCACTCAATGATCCA
AAGATCTTGAGCTCCAAGTAAATCATAAACCATTCTTATAGTCGCTAGATATCGACTATG
```

```
CTGGATTGCTTAGGAGGGGCGGCGGCTTGGTTTTATTCGGATACACGGACTGGTGAGCTA
AGCAGGCCACAAAAGTAACGAATTCTCAATGTGGGTGTGAAAGAAATTATAAGGTAGCAT
GGTTATATCTGTCTCGAAGGAATCCAAATGGATGGCATAGCTTTCAGTTGTCCGCAATCC
ATTTGGATTCCGATTCCGAGTTTGGTGAACACAAACACAAACGCAATAGCAGTACATACA
GACAGGTGGGTCTAAATAAATTGGCATTACAATGGTTCCCAGGACGCATAGACACGAATA
CGTTACGTTTACTAATACGTACATTTAGTGAACAGAACACACACATAATACACATAACAC
ACAAATCGAATTAAGTCTGATATGATAGTTGAGGATGCGATCGATCTTGCACTTACCATG
ATAATTCTTTCCGAACAGTTGCATTCCCATCACCGCAAAGATGAAGATGATAATGCAAAG
TACAAATGTCAGATTACCCAAAGCGCCCATGGTGCGTCCCATAATCGAAATGAGTAAATT
AAGTGTGGGCCAAGACTTGGCCAGTTTGAATACACGCAGCTGCAGTTAGCGAATTGATTT
CGATTCGATTTGATTTGATTTGATTTATTTTTGAGGGATCATTCACAGTTCAATTGGCAA
TTGGTGTATGGGAAGTTGATTCAATTAGATCGGTTTATCGATTATGTTGTTTATTTAGTT
AGGATTTCATTTGATTCGATTCGATTTTGATTTGATTTAATTGGTTTTGTTTTGAAAGCC
GGGCAAAGCATTAGAAAAAATATAGTGGAAAAAAGTCGTATTTAGGTTATATAGAATTA
ATCCAAAAAACAATCGATCTAAAGATTAAAGTCAAATATCAACGTATATCACCGATATCA
A
```

KDRExRv

Το παρακάτω αποτελεί την επεξεργασμένη αλληλουχία (BioEdit) όπου απεικονίζονται τα:
Η μεταλλαγή V106G
Τα δύο gRNAs (gRNA406 και gRNA205)
Οι general primers KDRFw και KDRRv
Και οι συνόνιμες μεταλλαγές στα:

- PAM αλληλουχίες (NGG)
- Καταστροφή θέσης περιοριστικού ενζύμου HaeII
- Δημιουργία θέσης περιοριστικού ενζύμου HindIII

```
                    KDRRv
          N  F  T  D  F  M  H  S  F  M  I  V  F  R  V  L  C  G  E  W  I  E  S  M  W  D
961     GAACTTCACCGACTTTATGCACAGCTTCATGATCGTGTTCCGGGTGCTCTGCGGAGAATGGATCGAGTCCATGTGGGACT   1040
961     CTTGAAGTGGCTGAAATACGTGTCGAAGTACTAGCACAAGGCCCACGAGACGCCTCTTACCTAGCTCAGGTACACCCTGA   1040
                                  BspHI

        C  M  Y  V  G  D  V  S  C  I  P  F  F  L  A  T  V  V  I  G  N  L  V
1041    GCATGTACGTGGGCGATGTCTCGTGCATTCCCTTCTTCTTGGCCACCGTTGTCATCGGCAATCTTGTGgtgagtactctt   1120
1041    CGTACATGCACCCGCTACAGAGCACGTAAGGGAAGAAGAACCGGTGGCAACAGTAGCCGTTAGAACACcactcatgagaa   1120
                          BssSI                   MscI                              ScaI

                                  *t
                        gRNA 406
1121    atcgaactgctgacttgtaaacgatgtttactggctataatgctgacttatcgcctctaaccatggctttaagcatcgca   1200
1121    tagcttgacgactgaacatttgctacaaatgacccgatattacgactgaatagcggagattggtaccgaaattcgtagcgt   1200
                                                                                 NcoI

                                  (GTA→GGA, V1016G = Aedes 1023)
                                          G
                                          V  L  N  L  F  L  A  L  L  L  S  N  F
1201    ttgtagatgtagataactaaattgtgatcgtatatttgcagGTACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTGTCCAATTTT   1280
1201    aacatctacatctattgatttaacactagcatataaacgtcCATGAATTGGAAAAGAATCGGAACGAAAACAGGTTAAAA   1280

                HindIII
                AAGCTT      C                           *T        gRNA 205
         G  S  S  S  L  S  A  P  T  A  D  N  D  T  N  K  I  A  E  A  F  N  R  I  G  R  F
1281    GGCTCATCTAGCTTATCAGCGCCGACTGCCGATAACGATACGAATAAAATAGCCGAGGCCTTCAATCGAATTGGCCGATT   1360
1281    CCGAGTAGATCGAATAGTCGCGGCTGACGGCTATTGCTATGCTTATTTTATCGGCTCCGGAAGTTAGCTTAACCGGCTAA   1360
                          HaeII                                   StuI
HaeII
```

```
          K  S  W  V  K  R  N  I  A  D  C  F  K  L  I  R  N  K  L  T  N  Q  I  S  D  Q
1361    TAAAAGTTGGGTTAAGCGTAATATTGCTGATTGTTTCAAGTTAATACGTAACAAATTGACAAATCAAATAAGTGATCAAC   1440
1361    ATTTTCAACCCAATTCGCATTATAACGACTAACAAAGTTCAATTATGCATTGTTTAACTGTTTAGTTTATTCACTAGTTG   1440
         DraI                  SspI                      SnaBI                      BclI


        P  S  G  E  R  T  N  Q  I  S  W  I  W  S  E (G)
1441    CATCAGGTGAGAGGACCAACCAGATCAGTTGGATTTGGAGCGAAGgtttttatccacttgttttccaattactaaactac   1520
1441    GTAGTCCACTCTCCTGGTTGGTCTAGTCAACCTAAACCTCGCTTCcaaaaataggtgaacaaaaggttaatgatttgatg   1520
```

Εικόνα S3. Τα μόρια gRNAs και οι αλληλουχίες των εκκινητών για το πείραμα της μεταλλαγής V1016G.

KDRFw

Τελική παραγγελία πλασμιδίου δότη (παραγγελία στην GeneScript):

Με κόκκινο τονίζονται οι περιοχές donor που διαφέρουν από το nos.Cas9 στέλεχος

```
>VGSCV1016G (2160 bp)
tcggaatccaaatggattgcggacaactgaaagctatgccatccatttggattccttcgagacagatataaccatgctac
cttataatttctttcacacccacattgagaattcgttacttttgtggcctgcttagctcaccagtccgtgtatccgaata
aaaccaagccgccgcccctcctaagcaatccagcatagtcgatatctagcgactataagaatggtttatgatttacttgg
agctcaagatctttggatcattgagtgcccgtgtcctccgtaagtacacctgccagcgaaggtgcggcaagtaacttttc
tcctagctaatttactccaagctcgtctatttgatttttttttccttcctaagcattttgtatatgcgatcgcaagcgta
aactttgtttagctacacactttcgtagctctatagcctgaagaactcgataaaatcaaatgatgttgatgcagatgagg
cgtgcgatacttttttggttcactctttttttttttgtgtacgatttttctggcattttaacttgtaacacaccgttttt
ttgtgagtgctcgctgcgctgaacaccgtttgcacacgcttttgtatgtggcttgacagcaaatcaaaccaaaccaaaaa
aaaaaaatcaattaaaacaattgaaactgtctccaaatatccccaaaaaactataaactatactcgtagaaaacgaagcg
agctagaaactattgctaattaatgccaaaccatcgacagATCACAAGGACCGCTTTCCGGATGGCGACCTGCCGCGCTG
GAACTTCACCGACTTTATGCACAGCTTCATGATCGTGTTCCGGGTGCTCTGCGGAGAATGGATCGAGTCCATGTGGGACT
GCATGTACGTGGGCGATGTCTCGTGCATTCCCTTCTTCTTGGCCACCGTTGTCATCGGCAATCTTGTGgtgagtactctt
atcgaactgctgacttgtaaacgatgtttactgctataatgctgacttatcgcctctaaccatggctttaagcatcgca
ttgtagatgtagataactaaattgtgatcgtatatttgcagGGACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTGTCCAATTTT
GGCTCATCAAGCTTATCAGCCCCGACTGCCGATAACGATACGAATAAAATAGCTGAGGCCTTCAATCGAATTGGCCGATT
TAAAAGTTGGGTTAAGCGTAATATTGCTGATTGTTTCAAGTTAATACGTAACAAATTGACAAATCAAATAAGTGATCAAC
CATCAGGTGAGAGGACCAACCAGATCAGTTGGATTTGGAGCGAAGgtttttatccacttgttttccaattactaaactac
ttttaattatatgatactcgtaatactcgtatattgccaacgatataattgcgtataccgttaacgttaacttcaactca
ctattggccagtaattgaattgcgtaatcgatctaaaaccaaatatcagtatctaaatcaattgcaaataccaaaaatca
aatcaaacccaattcgcattctgtatactaattgtaaaaggaaatatcccccaaaaactaaaaatacgttcttagctgac
aatttgcaaattctctttagttagtttcaagtatacctcttcccccgccctctagacctagacctagacctttttaacctc
gacctcagcctcagactcagccattcaagccactcaccagaacatgtatctgtaaagccaaaaagtattcatcctggtat
tcatattcgatcgagagattgcttccatttctttggtttgtttgtatcggttcccgttcgatttgaacctaagtgttgtt
gttcttcagccggtcagtgatcctctgaactctgacctcagacctcagacctcagacctcagacctcagacctgagacct
cctctgaccaatgtgagtcgcactgagggaactgtgccgtgccgtgccatttccgatcacatcatacccaacaaacaact
aaaacaaatcgtaaccgtaaccgtatccgtcataatctttagcattacttagatagtctgtatttagctgaaacgaaagt
```

S. II.b. G323D

Χάρτης της περιοχής γονιδίου *GluClalpha* του στελέχους nos.Cas9 (54591), όπου εμφανίζονται οι εκκινητές μοριακού ελέγχου, η μεταλλαγή G323D, οι αλληλουχίες θέσεων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στο μοριακό έλεγχο, το μόριο gRNA και οι

4. Μεταλλαγή που καταστρέφει μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (ClaI)
5. Μεταλλαγή που δημιουργεί μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (MluI)

```
                                                                                GluClFw
401     TTCCTTTTTGCCATTTCTAAAATGACGGCTTAATAACAAGGAAATAATATTACCATCAATTCAGCATTAAAGAACCAGCGT   480
401     AAGGAAAAACGGTAAAGATTTTACTGCCGAATTATTGTTCCTTTATTATAATGGTAGTTAGTCGTAATTTCTTGGTCGCA   480
                                                        SspI


481     TATATTACACAAAAAATTATTTTCAGAAGTTCCAATAATACAAATAGAATATCTCTATTGATCTATCAAAAAACTTAACT   560
481     ATATAATGTGTTTTTTAATAAAAGTCTTCAAGGTTATTATGTTTATCTTATAGAGATAACTAGATAGTTTTTTGAATTGA   560


561     TAAATCAATCTTCTTTGAAGATATTGTTTTCACCAGACGCTTTTTAAGCTAATCGACGCACTTTACTTTAATTATAAAAT   640
561     ATTTAGTTAGAAGAAACTTCTATAACAAAAGTGGTCTGCGAAAAATTCGATTAGCTGCGTGAAATGAAATTAATATTTTA   640
                                                                                    PsiI


641     AGTCAAGAAACAAAGTTAATATTTTGAAAAAGTAGTAGGTATTAAATATACACTCCAACCTTACCAAATCTGATGCTAGT   720
641     TCAGTTCTTTGTTTCAATTATAAAACTTTTTCATCATCCATAATTTATATGTGAGGTTGGAATGGTTTAGACTACGATCA   720
                          SspI


721     CCTTGGAGCCCGTCCTTCTTCATAGTCTAGAACACCAGTTTGTTGGGCACTACTCCATTACCTCTTTTGCAGGTGTCACC   800
721     GGAACCTCGGGCAGGAAGAAGTATCAGATCTTGTGGTCAAACAACCCGTGATGAGGTAATGGAGAAAACGTCCACAGTGG   800
                                XbaI


                                                                                (ClaI)
801     ACCCTGCTGACCATGGCCACCCAGACGTCGGGCATAAACGCGTCCCTGCCGCCCGTTTCCTATACGAAGGCCATAGATGT   880
801     TGGGACGACTGGTACCGGTGGGTCTGCAGCCCGTATTTGCGCAGGGACGGCGGGCAAAGGATATGCTTCCGGTATCTACA   880
                  NcoI            ZraI         MluI                        gRNA GluCl
                        MscI         AatII


            D=GAC
881     GTGGACAGACGTGTGTCTGACGTTCGTGTTCGGGGCCCTGCTCGAGTTCGCCCTGGTGAACTATGCATCCCGATCAGGTT   960
881     CACCTGTCTGCACACAGACTGCAAGCACAAGCCCCGGGACGAGCTCAAGCGGGACCACTTGATACGTAGGGCTAGTCCAA   960
                  BmgBI                    PspOMI   XhoI        GluClRv        BfrBI
                                               ApaI                            NsiI
```

S. II.c. G326E

Χάρτης περιοχής γονιδίου *GluClalpha* του στελέχους nos.Cas9 (54591), όπου εμφανίζονται οι εκκινητές μοριακού ελέγχου, η μεταλλαγή G326D, οι αλληλουχίες θέσεων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στο μοριακό έλεγχο, το μόριο gRNA και οι μεταλλαγές μοριακού ελέγχου

4. Μεταλλαγή που καταστρέφει μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (XhoI)
5. Μεταλλαγή που δημιουργεί μία θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου (AccI)

```
                                                                                GluClFw
401     TTCCTTTTTGCCATTTCTAAAATGACGGCTTAATAACAAGGAAATAATATTACCATCAATCAGCATTAAAGAACCAGCGT   480
401     AAGGAAAAACGGTAAAGATTTTACTGCCGAATTATTGTTCCTTTATTATAATGGTAGTTAGTCGTAATTTCTTGGTCGCA   480
                                                        SspI

481     TATATTACACAAAAAATTATTTTCAGAAGTTCCAATAATACAAATAGAATATCTCTATTGATCTATCAAAAAACTTAACT   560
481     ATATAATGTGTTTTTTAATAAAAGTCTTCAAGGTTATTATGTTTATCTTATAGAGATAACTAGATAGTTTTTTGAATTGA   560


561     TAAATCAATCTTCTTTGAAGATATTGTTTTCACCAGACGCTTTTTAAGCTAATCGACGCACTTTACTTTAATTATAAAAT   640
561     ATTTAGTTAGAAGAAACTTCTATAACAAAAGTGGTCTGCGAAAAATTCGATTAGCTGCGTGAAATGAAATTAATATTTTA   640
                                                                                    PsiI


641     AGTCAAGAAACAAAGTTAATATTTTGAAAAAGTAGTAGGTATTAAATATACACTCCAACCTTACCAAATCTGATGCTAGT   720
641     TCAGTTCTTTGTTTCAATTATAAAACTTTTTCATCATCCATAATTTATATGTGAGGTTGGAATGGTTTAGACTACGATCA   720
                        SspI


721     CCTTGGAGCCCGTCCTTCTTCATAGTCTAGAACACCAGTTTGTTGGGCACTACTCCATTACCTCTTTTGCAGGTGTCACC   800
721     GGAACCTCGGGCAGGAAGAAGTATCAGATCTTGTGGTCAAACAACCCGTGATGAGGTAATGGAGAAAACGTCCACAGTGG   800
                                XbaI


801     ACCCTGCTGACCATGGCCACCCAGACGTCGGGCATAAACGCCTCCCTGCCGCCCGTTTCGTATACGAAGGCCATCGATGT   880
801     TGGGACGACTGGTACCGGTGGGTCTGCAGCCCGTATTTGCGGAGGGACGGCGGGCAAAGCATATGCTTCCGGTAGCTACA   880
                NcoI            ZraI                                  BstZ17I      ClaI
                      MscI          AatII                            AccI  gRNA GluCl


          E=GAG                                   (XhoI)
881     GTGGACAGAGGTGTGTCTGACGTTCGTGTTCGGGGCCCTGCTGGAGTTCGCCCTGGTGAACTATGCATCCCGATCAGGTT   960
881     CACCTGTCTCCACACAGACTGCAAGCACAAGCCCCGGGACGACCTCAAGCGGGACCACTTGATACGTAGGGCTAGTCCAA   960
                                        PspOMI                  GluClRv      BfrBI
                                            ApaI                              NsiI
```

S. III. Πρωτόκολλα - Αντιδράσεις

S. III.a. Πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA

Η απομόνωση DNA από στελέχη nos.Cas9 είτε με σκοπό την αλληλούχηση της εκτεταμένης γενωμικής περιοχής (2.500 bp) είτε σε κάθε βήμα του μοριακού ελέγχου πραγματοποιήθηκε με τη βάση το πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA (DNAzol® Reagent - Thermo Fisher Scientific).

1. Λύση κυττάρων/ομογενοποίηση	200 μl DNAzol® Reagent + 1-30 ενήλικα άτομα ή/και λάρβες
2. Φυγοκέντρηση	10,000rpm για 10 λεπτά
3. Κατακρήμνιση DNA	κυτταρόλυμα + 250 μl 100% ethanol
4. Φυγοκέντρηση	13,000rpm για 20 λεπτά
5. Ξέπλυμα πελέτας	1 ml 75% ethanol
6. Φυγοκέντρηση	13,000rpm για 5 λεπτά
5. Διαλυτοποίηση DNA	40-50 μl TE ή ddH2O

S. III.b Πίνακες συνθηκών αντιδράσεων PCR

Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο PCR της NEB (https://www.neb.com/protocols/1/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273)

Συστατικό	**25 μl αντίδραση**	**Τελική συγκέντρωση**
10X Standard *Taq* Reaction Buffer	2.5 μl	1X
10 mM dNTPs	0.5 μl	200 μM
10 μM Forward εκκινητής	0.5 μl	0.2 μM (0.05–1 μM)
10 μM Reverse εκκινητής	0.5 μl	0.2 μM (0.05–1 μM)
Template DNA	10-80 ng	<300 ng
Taq DNA Polymerase	0.125 μl	1.25 units/50 μl PCR
Nuclease-free water	18.8 μl	

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	30’’
30-32 κύκλοι	95°C 54°C * 72°C	30’’ 15’’ 1 minute/kb
Τελική επέκταση	72°C	5 minutes
Διατήρηση	4	

* Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών κατά το μοριακό έλεγχο στο πείραμα της μεταλλαγής V1016G όπως επίσης και το πείραμα των μεταλλαγών στο κανάλι GluClalpha ήταν 54oC.

S. III.c. Συνθήκες αντιδράσεων περιοριστικής πέψης

Περιοριστικό ένζυμο π.χ. MluI	10 units
DNA	προϊόν PCR
10X NEBuffer	2 μl (1X)
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20 μl
Χρόνος επώασης	1-4 ώρες
Θερμοκρασία επώασης	37ºC

Βιβλιογραφία

Barrangou, Rodolphe, and Jennifer A. Doudna. "Applications of CRISPR technologies in research and beyond." *Nature Biotechnology* 34, no. 9 (2016): 933-941.

Bass, Chris, Alin M. Puinean, Melanie Andrews, Penny Cutler, Miriam Daniels, Jan Elias, Verity Laura Paul et al. "Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae." *Bmc Neuroscience* 12, no. 1 (2011): 51.

Bassett, Andrew R., Charlotte Tibbit, Chris P. Ponting, and Ji-Long Liu. "Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system." *Cell reports* 4, no. 1 (2013): 220-228.

Beumer, Kelly J., Jonathan K. Trautman, Kusumika Mukherjee, and Dana Carroll. "Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases." *G3: Genes| Genomes| Genetics* 3, no. 4 (2013): 657-664.

Bibikova, Marina, Mary Golic, Kent G. Golic, and Dana Carroll. "Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases." *Genetics* 161, no. 3 (2002): 1169-1175.

Bogwitz, Michael R., Henry Chung, Lorin Magoc, Sheena Rigby, Wayn Wong, Melanie O'Keefe, John A. McKenzie, Philip Batterham, and Phillip J. Daborn. "Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of Drosophila melanogaster." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, no. 36 (2005): 12807-12812.

Brengues, Cécile, Nicola J. Hawkes, Fabrice Chandre, L. McCarroll, Stéphane Duchon, Pierre Guillet, Sylvie Manguin, J. C. Morgan, and Janet Hemingway. "Pyrethroid and DDT cross-resistance in Aedes aegypti is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene." *Medical and veterinary entomology* 17, no. 1 (2003): 87-94.

Brogdon, William G., and Janet C. McAllister. "Insecticide resistance and vector control." *Emerging infectious diseases* 4, no. 4 (1998): 605.

Casida, John E. "Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action." *Chemical research in toxicology* 22, no. 4 (2009): 609-619.

Catterall, William A. "Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 20, no. 1 (1980): 15-43.

Chandrasegaran, Srinivasan, and Dana Carroll. "Origins of programmable nucleases for genome engineering." *Journal of molecular biology* 428, no. 5 (2016): 963-989.

Chouaïbou, Mouhamadou, Georgina Bingham Zivanovic, Tessa B. Knox, Helen Pates Jamet, and Bassirou Bonfoh. "Synergist bioassays: A simple method for initial metabolic resistance investigation of field Anopheles gambiae sl populations." *Acta tropica* 130 (2014): 108-111.

Christophers, S. "Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure." *Aëdes aegypti (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure*. (1960).

Claudianos, Charles, Robyn J. Russell, and John G. Oakeshott. "The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly." *Insect biochemistry and molecular biology* 29, no. 8 (1999): 675-686.

Coetzee, Maureen, and Lizette L. Koekemoer. "Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector Anopheles funestus." *Annual review of entomology* 58 (2013): 393-412.

Cully, D. F., H. Wilkinson, D. K. Vassilatis, A. Etter, and J. P. Arena. "Molecular biology and electrophysiology of glutamategated chloride channels of invertebrates." *Parasitology* 113, no. S1 (1996): S191-S200.

Daborn, Phillip J., Christopher Lumb, Thomas WR Harrop, Alex Blasetti, Shivani Pasricha, Shai Morin, Sara N. Mitchell, Martin J. Donnelly, Pie Müller, and Philip Batterham. "Using Drosophila melanogaster to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests." *Insect biochemistry and molecular biology* 42, no. 12 (2012): 918-924.

David, Jean-Philippe, Clare Strode, John Vontas, Dimitra Nikou, Ashley Vaughan, Patricia M. Pignatelli, Christos Louis, Janet Hemingway, and Hilary Ranson. "The Anopheles gambiae detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, no. 11 (2005): 4080-4084.

Davies, T. G. E., L. M. Field, P. N. R. Usherwood, and M. S. Williamson. "DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels." *IUBMB life* 59, no. 3 (2007): 151-162.

Dhiraj Saha (2016). Biochemical Insecticide Resistance in Tea Pests, Insecticides Resistance, Prof. Stanislav Trdan (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61949. Available from: http://www.intechopen.com/books/insecticides-resistance/biochemical-insecticide-resistance-in-tea-pests

Donato, M. Teresa, Nuria Jiménez, José V. Castell, and M. José Gómez-Lechón. "Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes." *Drug Metabolism and Disposition* 32, no. 7 (2004): 699-706.

Dong, Ke, Yuzhe Du, Frank Rinkevich, Yoshiko Nomura, Peng Xu, Lingxin Wang, Kristopher Silver, and Boris S. Zhorov. "Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance." *Insect biochemistry and molecular biology* 50 (2014): 1-17.

Douris, Vassilis, Denise Steinbach, Rafaela Panteleri, Ioannis Livadaras, John Anthony Pickett, Thomas Van Leeuwen, Ralf Nauen, and John Vontas. "Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2016): 201618258.

Doyle, Kevin E., and Douglas C. Knipple. "PCR-based phylogenetic walking: isolation of para-homologous sodium channel gene sequences from seven insect species and an arachnid." *Insect biochemistry* 21, no. 6 (1991): 689-696.

Du, Yuzhe, Yoshiko Nomura, Gul Satar, Zhaonong Hu, Ralf Nauen, Sheng Yang He, Boris S. Zhorov, and Ke Dong. "Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 29 (2013): 11785-11790.

Enayati, A., and Janet Hemingway. "Malaria management: past, present, and future." *Annual review of entomology* 55 (2010): 569-591.

ffrench-Constant, Richard H., Martin S. Williamson, TG Emyr Davies, and Chris Bass. "Ion channels as insecticide targets." *Journal of Neurogenetics* 30, no. 3-4 (2016): 163-177.

Focks, D. Ae, D. G. Haile, E. Daniels, and G. Ae Mount. "Dynamic life table model for Aedes aegypti (Diptera: Culicidae): analysis of the literature and model development." *Journal of medical entomology* 30, no. 6 (1993): 1003-1017.

Gratz, Scott J., Alexander M. Cummings, Jennifer N. Nguyen, Danielle C. Hamm, Laura K. Donohue, Melissa M. Harrison, Jill Wildonger, and Kate M. O'Connor-Giles. "Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease." *Genetics* 194, no. 4 (2013): 1029-1035.

Grbić, Miodrag, Thomas Van Leeuwen, Richard M. Clark, Stephane Rombauts, Pierre Rouzé, Vojislava Grbić, Edward J. Osborne et al. "The genome of Tetranychus urticae reveals herbivorous pest adaptations." *Nature* 479, no. 7374 (2011): 487-492.

Hardstone, M. C., C. A. Leichter, and J. G. Scott. "Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes." *Journal of evolutionary biology* 22, no. 2 (2009): 416-423.

Harein, P. K., and R. Davis. "Control of stored-grain insects." *Storage of cereal grains and their products* 4 (1992): 491-534.

Hemingway, Janet, and Hilary Ranson. "Insecticide resistance in insect vectors of human disease." *Annual review of entomology* 45, no. 1 (2000): 371-391.

Hirata, Koichi, Osamu Komagata, Kentaro Itokawa, Atsushi Yamamoto, Takashi Tomita, and Shinji Kasai. "A single crossing-over event in voltage-sensitive Na+ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides." *PLoS Negl Trop Dis* 8, no. 8 (2014): e3085.

Ilias, Aris, Vassilis A. Vassiliou, John Vontas, and Anastasia Tsagkarakou. "Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and abamectin resistance mutations in Tetranychus urticae." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 135 (2017): 9-14.

Inceoglu, A. B., T. D. Waite, J. A. Christiansen, R. D. McAbee, S. G. Kamita, B. D. Hammock, and A. J. Cornel. "A rapid luminescent assay for measuring cytochrome P450 activity in individual larval Culex pipiens complex mosquitoes (Diptera: Culicidae)." *Journal of medical entomology* 46, no. 1 (2009): 83-92.

J Wolstenholme, Adrian, and Ray M Kaplan. "Resistance to macrocyclic lactones." *Current pharmaceutical biotechnology* 13, no. 6 (2012): 873-887.

Jeppson, Lee R., Hartford H. Keifer, and Edward William Baker. *Mites injurious to economic plants*. Univ of California Press, 1975.

Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. "A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* 337, no. 6096 (2012): 816-821.

Jones, Andrew K., and David B. Sattelle. "The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the honeybee, Apis mellifera." *Invertebrate Neuroscience* 6, no. 3 (2006): 123-132.

Jones, Andrew K., and David B. Sattelle. "The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, Tribolium castaneum." *BMC genomics* 8, no. 1 (2007): 327.

Kalia, Anu et al., 2011) and Rajinder K. Mudhar. "Biological control of pests." In *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*, pp. 223-240. Springer Berlin Heidelberg, 2011.

Karatolos, Nikos, Martin S. Williamson, Ian Denholm, Kevin Gorman, and Chris Bass. "Over-expression of a cytochrome P450 is associated with resistance to pyriproxyfen in the greenhouse whitefly Trialeurodes vaporariorum." *PLoS One* 7, no. 2 (2012): e31077.

Kasai, Shinji, Osamu Komagata, Kentaro Itokawa, Toshio Shono, Lee Ching Ng, Mutsuo Kobayashi, and Takashi Tomita. "Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, Aedes aegypti: target site insensitivity, penetration, and metabolism." *PLoS Negl Trop Dis* 8, no. 6 (2014): e2948.

Kawada, Hitoshi, Sai Zaw Min Oo, Sein Thaung, Emiko Kawashima, Yan Naung Maung Maung, Hlaing Myat Thu, Kyaw Zin Thant, and Noboru Minakawa. "Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant Aedes aegypti populations in Myanmar." *PLoS Negl Trop Dis* 8, no. 7 (2014): e3032.

Kawada, Hitoshi, Yukiko Higa, Osamu Komagata, Shinji Kasai, Takashi Tomita, Nguyen Thi Yen, Luu Lee Loan, Rodrigo AP Sánchez, and Masahiro Takagi. "Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant Aedes aegypti populations in Vietnam." *PLoS Negl Trop Dis* 3, no. 10 (2009): e527.

Knipling, E. F. "Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males." *Journal of Economic Entomology* 48, no. 4 (1955): 459-462.

Knipple, Douglas C., and David M. Soderlund. "The ligand-gated chloride channel gene family of Drosophila melanogaster." *Pesticide biochemistry and physiology* 97, no. 2 (2010): 140-148.

Kondo, Shu. "New horizons in genome engineering of Drosophila melanogaster." *Genes & genetic systems* 89, no. 1 (2014): 3-8.

Kwon, Deok Ho, Kyong Sup Yoon, J. Marshall Clark, and Si Hyeock Lee. "A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch." *Insect molecular biology* 19, no. 4 (2010): 583-591.

Lasota, J. A., and R. A. Dybas. "Abamectin as a pesticide for agricultural use." *Acta Leidensia* 59, no. 1-2 (1989): 217-225.

Li, Xianchun, Mary A. Schuler, and May R. Berenbaum. "Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics." *Annu. Rev. Entomol.* 52 (2007): 231-253.

LIU, NANNAN, QIANG XU, FANG ZHU, and L. E. E. Zhang. "Pyrethroid resistance in mosquitoes." *Insect Science* 13, no. 3 (2006): 159-166.

Long, Stephen B., Ernest B. Campbell, and Roderick MacKinnon. "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K+ channel." *Science* 309, no. 5736 (2005): 897-903.

Long, Stephen B., Ernest B. Campbell, and Roderick MacKinnon. "Voltage sensor of Kv1. 2: structural basis of electromechanical coupling." *Science* 309, no. 5736 (2005): 903-908.

Lund, Albert E., and Toshio Narahashi. "Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20, no. 2 (1983): 203-216.

Martinez-Torres, David, Fabrice Chandre, M. S. Williamson, Frédéric Darriet, Jean B. Berge, Alan L. Devonshire, Pierre Guillet, Nicole Pasteur, and David Pauron. "Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae ss." *Insect molecular biology* 7, no. 2 (1998): 179-184.

Mazid, Salma, J. C. Kalida, and R. Ch Rajkhowa. "A review on the use of biopesticides in insect pest management." *Int J Sci Adv Technol* 1, no. 7 (2011): 169-178.

McCaffery, Alan, and Ralf Nauen. "The insecticide resistance action committee (IRAC): public responsibility and enlightened industrial self-interest." *Outlooks on Pest Management* 17, no. 1 (2006): 11-14.

Melander, Ai L. "Can insects become resistant to sprays." *J. Econ. Entomol* 7, no. 1 (1914): 167.

Milani, R. I. C. C. A. R. D. O. "Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT; correlazione tran abbatimento e mortalia in Musca domestica L." *Riv Parasitol* 15 (1954): 513-42.

Mitchell, Sara N., Daniel J. Rigden, Andrew J. Dowd, Fang Lu, Craig S. Wilding, David Weetman, Samuel Dadzie et al. "Metabolic and target-site mechanisms combine to confer strong DDT resistance in Anopheles gambiae." *PLoS One* 9, no. 3 (2014): e92662.

Mounsey, Kate E., Joseph A. Dent, Deborah C. Holt, James McCarthy, Bart J. Currie, and Shelley F. Walton. "Molecular characterisation of a pH-gated chloride channel from Sarcoptes scabiei." *Invertebrate Neuroscience* 7, no. 3 (2007): 149-156.

Narahashi, T. "Mode of action of pyrethroids." *Bulletin of the World Health Organization* 44, no. 1-2-3 (1971): 337.

Nauen, Ralf. "Insecticide resistance in disease vectors of public health importance." *Pest management science* 63, no. 7 (2007): 628-633.

Newcomb, Richard D., P. M. Campbell, D. L. Ollis, E. Cheah, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott. "A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, no. 14 (1997): 7464-7468.

O'Reilly, Andrias O., Bhupinder PS Khambay, Martin S. Williamson, Linda M. Field, B. A. Wallace, and TG Emyr Davies. "Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel." *Biochemical Journal* 396, no. 2 (2006): 255-263.

Pauron, David, Jacques Barhanin, Marcel Amichot, Madeleine Pralavorio, Jean Baptiste Berge, and Michel Lazdunski. "Pyrethroid receptor in the insect Na sup+ channel: Alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies." *Biochemistry;(USA)* 28, no. 4 (1989).

Pavlidi, N., M. Monastirioti, P. Daborn, I. Livadaras, Thomas Van Leeuwen, and J. Vontas. "Transgenic expression of the Aedes aegypti CYP9J28 confers pyrethroid resistance in Drosophila melanogaster." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, no. 2 (2012): 132-135.

Perez-Mendoza, Joel. "Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)." *Journal of Stored Products Research* 35, no. 1 (1999): 107-115.

Piraneo, Tara G., Jon Bull, Mariany A. Morales, Laura C. Lavine, Douglas B. Walsh, and Fang Zhu. "Molecular mechanisms of Tetranychus urticae chemical adaptation in hop fields." *Nature Publishing Group. Scientific Reports* 5 (2015): 17090.

Ponlawat, Alongkot, and Laura C. Harrington. "Blood feeding patterns of Aedes aegypti and Aedes albopictus in Thailand." *Journal of medical entomology* 42, no. 5 (2005): 844-849.

Port, Fillip, Hui-Min Chen, Tzumin Lee, and Simon L. Bullock. "Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in Drosophila." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, no. 29 (2014): E2967-E2976.

Powles, Stephen B., and Qin Yu. "Evolution in action: plants resistant to herbicides." *Annual review of plant biology* 61 (2010): 317-347.

Price, Daniel RG, and John A. Gatehouse. "RNAi-mediated crop protection against insects." *Trends in biotechnology* 26, no. 7 (2008): 393-400.

Price, Daniel RG, and John A. Gatehouse. "RNAi-mediated crop protection against insects." *Trends in biotechnology* 26, no. 7 (2008): 393-400.

Rajatileka, Shavanthi, William C. Black, Karla Saavedra-Rodriguez, Yuwadee Trongtokit, Chamnarn Apiwathnasorn, P. J. McCall, and Hilary Ranson. "Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of Aedes aegypti." *Acta tropica* 108, no. 1 (2008): 54-57.

Raymond, Valérie, and David B. Sattelle. "Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels." *Nature reviews. Drug discovery* 1, no. 6 (2002): 427.

Riga, M., D. Tsakireli, A. Ilias, E. Morou, A. Myridakis, E. G. Stephanou, R. Nauen et al. "Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in Tetranychus urticae." *Insect biochemistry and molecular biology* 46 (2014): 43-53.

Riveron, Jacob M., Helen Irving, Miranda Ndula, Kayla G. Barnes, Sulaiman S. Ibrahim, Mark JI Paine, and Charles S. Wondji. "Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles funestus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 1 (2013): 252-257.

Russell, B. M., B. H. Kay, and W. Shipton. "Survival of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) eggs in surface and subterranean breeding sites during the northern Queensland dry season." *Journal of medical entomology* 38, no. 3 (2001): 441-445.

Scott, Thomas W., Amy C. Morrison, Leslie H. Lorenz, Gary G. Clark, Daniel Strickman, Pattamaporn Kittayapong, Hong Zhou, and John D. Edman. "Longitudinal studies of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: population dynamics." *Journal of medical entomology* 37, no. 1 (2000): 77-88.

Soderlund, D. M., and D. C. Knipple. "The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides." *Insect biochemistry and molecular biology* 33, no. 6 (2003): 563-577.

Somers, Jason, Joseph Nguyen, Chris Lumb, Phil Batterham, and Trent Perry. "In vivo functional analysis of the Drosophila melanogaster nicotinic acetylcholine receptor Dα6 using the insecticide spinosad." *Insect biochemistry and molecular biology* 64 (2015): 116-127.

Sparks, Thomas C., and Ralf Nauen. "IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management." *Pesticide biochemistry and physiology* 121 (2015): 122-128.

Srisawat, Raweewan, Narumon Komalamisra, Yuki Eshita, Mingqi Zheng, Katsushige Ono, Taichi Q. Itoh, Akira Matsumoto, Songsak Petmitr, and Yupha Rongsriyam. "Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)." *Applied Entomology and Zoology* 45, no. 2 (2010): 275-282.

Stenhouse, Steven A., Suriya Plernsub, Jintana Yanola, Nongkran Lumjuan, Anchalee Dantrakool, Wej Choochote, and Pradya Somboon. "Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand." *Parasites & vectors* 6, no. 1 (2013): 253.

Tehri, Kanika, Rachna Gulati, and Monika Geroh. "Damage potential of Tetranychus urticae Koch to cucumber fruit and foliage: Effect of initial infestation density." *Journal of Applied and Natural Science* 6, no. 1 (2014): 170-176.

Thomas, Dean D., Christl A. Donnelly, Roger J. Wood, and Luke S. Alphey. "Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system." *Science* 287, no. 5462 (2000): 2474-2476.

Tomczyk, A., and D. Kropczynska. "Some aspects of influence of two-spotted spider mite feeding on chrysanthemum plants [Tetranychus urticae Koch]." *Bulletin SROP (France). v. 12 (3).* (1989).

Valentine, William M. "Pyrethrin and pyrethroid insecticides." *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20, no. 2 (1990): 375-382.

Van Leeuwen, Thomas, John Vontas, Anastasia Tsagkarakou, Wannes Dermauw, and Luc Tirry. "Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: a review." *Insect biochemistry and molecular biology* 40, no. 8 (2010): 563-572.

Vontas, John G., J. Graham, and Janet Hemingway. "Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in Nilaparvata lugens." *Biochemical Journal* 357, no. 1 (2001): 65-72.

Weaver, Scott C., Federico Costa, Mariano A. Garcia-Blanco, Albert I. Ko, Guilherme S. Ribeiro, George Saade, Pei-Yong Shi, and Nikos Vasilakis. "Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control." *Antiviral research* 130 (2016): 69-80.

Wheelock, Geoffrey D., and Jeffrey G. Scott. "Anti-P450lpr antiserum inhibits specific monooxygenase activities in LPR house fly microsomes." *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 264, no. 2 (1992): 153-158.

Williamson, Martin S., David Martinez-Torres, Caroline A. Hick, and Alan L. Devonshire. "Identification of mutations in the houseflypara-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides." *Molecular and General Genetics MGG* 252, no. 1 (1996): 51-60.

Wilson, Thomas G. "Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae): a model insect for insecticide resistance studies." *Journal of economic entomology* 81, no. 1 (1988): 22-27.

Wolstenholme, A. J., and A. T. Rogers. "Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics." *Parasitology* 131, no. S1 (2005): S85-S95.

Wolstenholme, Adrian J. "Glutamate-gated chloride channels." *Journal of Biological Chemistry* 287, no. 48 (2012): 40232-40238.

Wuliandari, Juli Rochmijati, Siu Fai Lee, Vanessa Linley White, Warsito Tantowijoyo, Ary Anthony Hoffmann, and Nancy Margaret Endersby-Harshman. "Association between three mutations, F1565C, V1023G and S996P, in the voltage-sensitive sodium channel gene and knockdown resistance in Aedes aegypti from Yogyakarta, Indonesia." *Insects* 6, no. 3 (2015): 658-685.

Yanola, Jintana, Pradya Somboon, Catherine Walton, Woottichai Nachaiwieng, Puckavadee Somwang, and La-aied Prapanthadara. "High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant Aedes aegypti and the distribution of this mutation throughout Thailand." *Tropical Medicine & International Health* 16, no. 4 (2011): 501-509.

Zhu, Fang, R. Parthasarathy, Hua Bai, Katharina Woithe, Martin Kaussmann, Ralf Nauen, Douglas A. Harrison, and Subba R. Palli. "A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of Tribolium castaneum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, no. 19 (2010): 8557-8562.

Zimmer, Christoph T., William T. Garrood, A. Mirel Puinean, Manuela Eckel-Zimmer, Martin S. Williamson, TG Emyr Davies, and Chris Bass. "A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in Drosophila melanogaster." *Insect biochemistry and molecular biology* 73 (2016): 62-69.

Zlotkin, Eliahu. "The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides." *Annual review of entomology* 44, no. 1 (1999): 429-455.

Simmons, Cameron P., Jeremy J. Farrar, Nguyen van Vinh Chau, and Bridget Wills. "Dengue." *New England Journal of Medicine* 366, no. 15 (2012): 1423-1432.

Jentes, Emily S., Gilles Poumerol, Mark D. Gershman, David R. Hill, Johan Lemarchand, Rosamund F. Lewis, J. Erin Staples, Oyewale Tomori, Annelies Wilder-Smith, and Thomas P. Monath. "The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever." *The Lancet infectious diseases* 11, no. 8 (2011): 622-632.

Leparc-Goffart, Isabelle, Antoine Nougairede, Sylvie Cassadou, Christine Prat, and Xavier De Lamballerie. "Chikungunya in the Americas." *The Lancet* 383, no. 9916 (2014): 514.

Hay, Simon I., Carlos A. Guerra, Andrew J. Tatem, Peter M. Atkinson, and Robert W. Snow. "Tropical infectious diseases: Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa." *Nature Reviews Microbiology* 3, no. 1 (2005): 81-90.

Snow, Robert W., Carlos A. Guerra, Abdisalan M. Noor, Hla Y. Myint, and Simon I. Hay. "The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria." *Nature* 434, no. 7030 (2005): 214-217.

Hemingway, Janet, and Hilary Ranson. "Insecticide resistance in insect vectors of human disease." *Annual review of entomology* 45, no. 1 (2000): 371-391.

Gosselin, Robert E., Roger P. Smith, and Harold C. Hodge. *Clinical toxicology of commercial products*. Williams & Wilkins, 1984.

Anadón, A., M. R. Martínez-Larrañaga, and M. A. Martínez. "Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine." *The Veterinary Journal* 182, no. 1 (2009): 7-20.

Egerton, J. R., D. A. Ostlind, L. S. Blair, C. H. Eary, D. Suhayda, S. Cifelli, RF and Riek, and W. C. Campbell. "Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15, no. 3 (1979): 372-378.

Campbell, W. C., M. H. Fisher, E. O. Stapley, G. Albers-Schonberg, and T. A. Jacob. "Ivermectin: a potent new antiparasitic agent." *Science* 221, no. 4613 (1983): 823-828.

James, P. S., J. and Picton, and R. F. Riek. "Insecticidal activity of the avermectins." *Veterinary Record* 106, no. 3 (1980).

Putter, I., JG Mac Connell, F. A. Preiser, A. A. Haidri, S. S. Ristich, and R. A. Dybas. "Avermectins: novel insecticides, acaricides and nematicides from a soil microorganism." *Cellular and Molecular Life Sciences* 37, no. 9 (1981): 963-964.

Greene, Bruce M., Kenneth R. Brown, and Hugh R. Taylor. "Use of ivermectin in humans." In *Ivermectin and abamectin*, pp. 311-323. Springer New York, 1989.

Johnson, A. W. "Abamectin for tobacco insect control." *Tob. Sci* 29 (1985): 135-138.

Højland, Dorte H., Ralf Nauen, Stephen P. Foster, Martin S. Williamson, and Michael Kristensen. "Incidence, Spread and Mechanisms of Pyrethroid Resistance in European Populations of the Cabbage Stem Flea Beetle, Psylliodes chrysocephala L.(Coleoptera: Chrysomelidae)." *PloS one* 10, no. 12 (2015): e0146045.

Wang, X., R. Wang, Y. Yang, S. Wu, A. O. O'Reilly, and Y. Wu. "A point mutation in the glutamate-gated chloride channel of Plutella xylostella is associated with resistance to abamectin." *Insect molecular biology* (2015).

http://www.irac-online.org/pests/

http://www.irac-online.org/modes-of-action/

http://www.who.int/