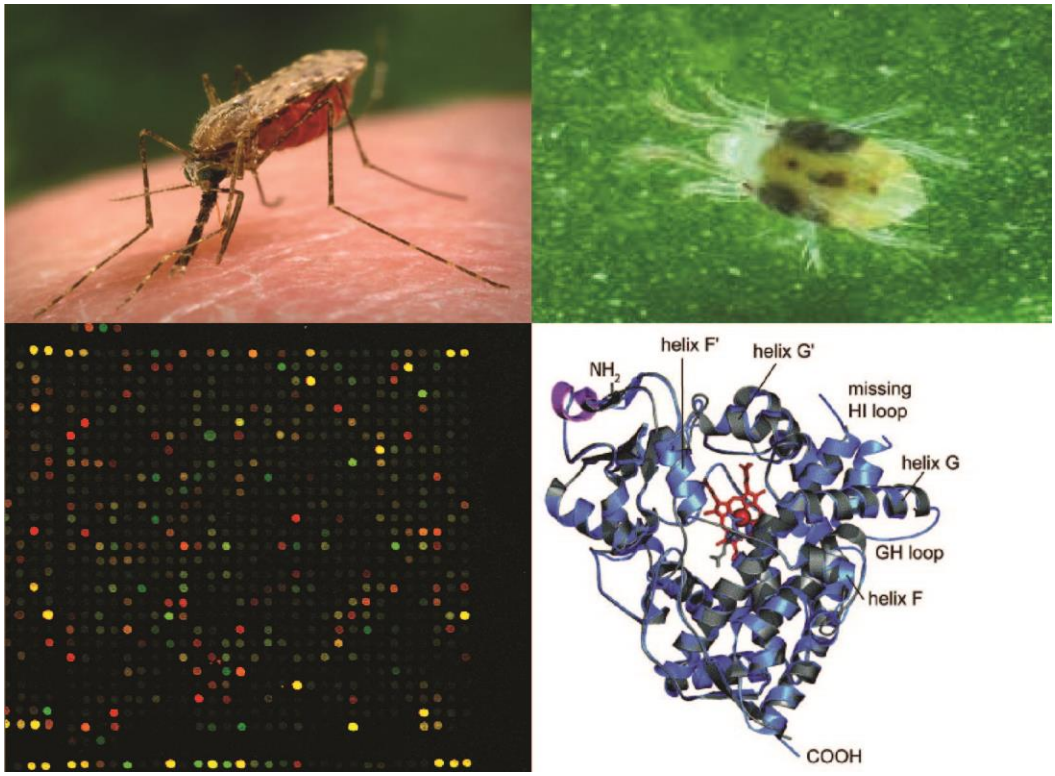
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Λειτουργική έκφραση και χαρακτηρισμός ενζύμων αποτοξυκοποίησης (Cytochrome P450) εντόμων- εχθρών καλλιερειών και φορέων ασθενειών στη ζύμη



Αναγνώστου Δημήτριος

Επιβλέπων Καθηγητής : Ιωάννης Βόντας

Ιούνιος 2017

ΠΕΡΙΕΧΌΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ……. 3
ABSTRACT ……. 4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ …… 5-21
1.1 Το άκαρι Tetranychus urticae και η γεωπονική σημασία του ……..... 5-6
1.2 Το κουνούπι Anopheles gambiae και το πρόβλημα της ελονοσίας …….. 6-8
1.3 Εντομοκτόνα – Ακαρεοκτόνα και οι μηχανισμοί δράσης τους ……..... 8-10
1.4 Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας ……. 11-14
1.4.1 Ανθεκτικότητα στόχου – Target site resistance ……. 11
1.4.2 Βιοχημική ανθεκτικότητα – Metabolic resistance …… 11-13
1.4.3 Επιδερμική ανθεκτικότητα – Cuticular resistance …… 13-14
1.5 Η οικογένεια πρωτεϊνών P450 ……..... 14-19
1.5.1 Κυτταρικός εντοπισμός των P450 ……...…… 16-19
1.6 Η χρήση του ζαχαρομύκητα Saccharomyces cerevisiae ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης …….. 19
1.7 Υπόβαθρο και σκοπός εργασίας ……..... 19-21

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ……..... 22-30
2.1 Μοριακή κλωνοποίηση ……. 22-25
2.2 Ανοσοαποτύπωση κατά Western …….. 25-26
2.3 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης ……..... 26
2.4 Παρασκευή μικροσωμάτων από κύτταρα ζύμης ……..... 26-27
2.5 Εξαγωγή πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης ……... 27
2.6 Έλεγχος των μεμβρανών για την παρουσία πρωτεΐνης P450 με τη διαφορά του φάσματος CO ……... 27
2.7 Η δραστικότητα της πρωτεΐνης CPR από μετρήσεις της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος C στα 550nm ……..... 28
2.8 Δοκιμή πρότυπου υποστρώματος 7-ethoxyxoumarin …… 28
2.9 Δοκιμή με τα πρότυπα υποστώματα Glo ……..... 29
2.10 Μεταβολικές δοκιμές και ανάλυση με HPLC ……..... 29
2.11 Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα ζύμης …….. 30

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ …….. 31-41
3.1 Έκφραση της BtCYP6CM1 στη ζύμη για έλεγχο του ετερόλογου συστήματος έκφρασης ……. 31-33
3.2 Έκφραση της TuCYP392D2 στη ζύμη και χαρακτηρισμός της …..... 33-35
3.3 Έκφραση της TuCYP392D8 στη ζύμη και χαρακτηρισμός της …..... 35-36
3.4 Έκφραση της TuCYR392D10 στη ζύμη και χαρακτηρισμός της …...…. 36-37
3.5 Έκφραση των AgCYP4G16 και AgCYP4G17 στη ζύμη και ανοσοεντοπισμός τους …… 38-41

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ …….. 42-43

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ …… 44-48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Tetranychus urticae αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εντομολογικούς εχθρούς των καλλιεργειών. Ο έλεγχος των πληθυσμών T. urticae γίνεται κυρίως με την χρήση εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων αλλά λόγο της μεγάλης ικανότητάς του να αναπτύσσει ανθεκτικότητα ο έλεγχος αυτός καθίσταται πολύ δύσκολος. Γι' αυτό υπάρχει μεγάλη ανάγκη αποσαφήνισης των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας. Σε ένα θερμοκήπιο από την περιοχή του Μαραθώνα απομονώθηκε ένας ανθεκτικός πληθυσμός που φέρει ανθεκτικότητα σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων. Από ανάλυση μικροσυστηχιών DNA βρέθηκε μια σειρά από ένζυμα αποτοξικοποίησης (P450 μονοοξυγενάσες, εστεράσες και μεταφεράσες της γλουταθιόνης) να υπερεκφράζονται στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε προσπάθεια λειτουργικής έκφρασης και χαρακτηρισμού τριών ενζύμων P450s (CYP392D2, CYP392D8 και CYP392D10) σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης Saccharomyces cerevisiae. Η CYP392D2 εκφράστηκε σε ενεργή μορφή αφού μεταβόλιζε το πρότυπο υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin. Παρόλα αυτά κανένα από τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα που δοκιμάστηκαν σε πειράματα μεταβολισμού δεν αποτελεί υπόστρωμα αυτού του ενζύμου.

Οι CYP4G16PA και PD1 (2 πιθανές ισομορφές) και CYP4G17 του Anopheles *gambiae* αποτελούν πρωτεΐνες P450 με πιθανό ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των υδρογονανθράκων του εξωσκελετού και οι οποίες έχει βρεθεί να υπερεκφράζονται σε ανθεκτικούς πληθυσμούς κουνουπιών. Η CYP4G16PA έχει καταλυτική ενεργότητα αποκαρβονυλάσης καθώς καταλύει *in vitro* την μετατροπή αλδεϋδών σε υδρογονάνθρακες. Σε πειράματα ανοσοφθορισμού η CYP4G16PA εντοπίστηκε στην πλασματική μεμβράνη των οινοκυττάρων (oenocytes) ενήλικων κουνουπιών ενώ η CYP4G17 στα ίδια κύτταρα εκφράζεται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ). Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια έκφρασης και ανοσοφθορισμού αυτών των πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης. Η CYP4G16 PD1 εντοπίστηκε στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων ζύμης. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την CYP4G17 αναγνωρίζει δυο ενδογενής πρωτεΐνες της ζύμης και συνεπώς δεν μπόρεσε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανοσοφθορισμού.

ABSTRACT

Tetranychus urticae is a major agricultural pest. Field populations of T. urticae are controlled basically with the use of insecticides and acaricides but due to their ability to develop resistance, their control becomes very difficult. So there is a great need to elucidate the molecular mechanisms underlying this process. A multiresistant population was isolated from a greenhouse in Marathon which showed high resistance to almost all known categories of insecticides and acaricides. From DNA microarray experiments it was found a series of detoxification enzymes (P450 monooxygenases, estereses and GSTs) that are overexpressed in this population in comparison with a susceptible population. In this study, attempt was made to functionally express and characterize three P450 enzymes (CYP392D2, CYP392D8 and CYP392D10) in the heterologous expression system Saccharomyces *cerevisiae*. CYP392D2 expressed in an active form since this enzyme metabolized *in vitro* the model substrate 7-ethoxycoumarin. However, none of the insecticides and acaricides that were tried in metabolic experiments, is not a substrate of this enzyme.

CYP4G16PA and PD1 (2 possible isoforms) and CYP4G17 of Anopheles *gambiae* are P450 proteins with possible role in the hydrocarbon biosynthesis pathway of epicuticular hydrocarbons and it was found that these proteins are overexpressed in resistant mosquito populations. CYP4G16PA has decarbonylase catalytic activity and catalyses *in vitro* the conversion of aldehydes in hydrocarbons. In immunofluorescence experiments CYP4G16PA localized in plasma membrane of oenocytes of adult mosquitoes while CYP4G17 localized at the same cells in the endoplasmic reticulum (ER). In the present study, an effort has been made to express and immunolocalize these proteins in yeast cells. CYP4G16 PD1 localized in the plasma membrane of yeast cells. The antibody that was used against CYP4G17, except from CYP4G17 also recognizes two endogenous protein of yeast, so this antibody couldn't be used in immunofluorescent experiments.

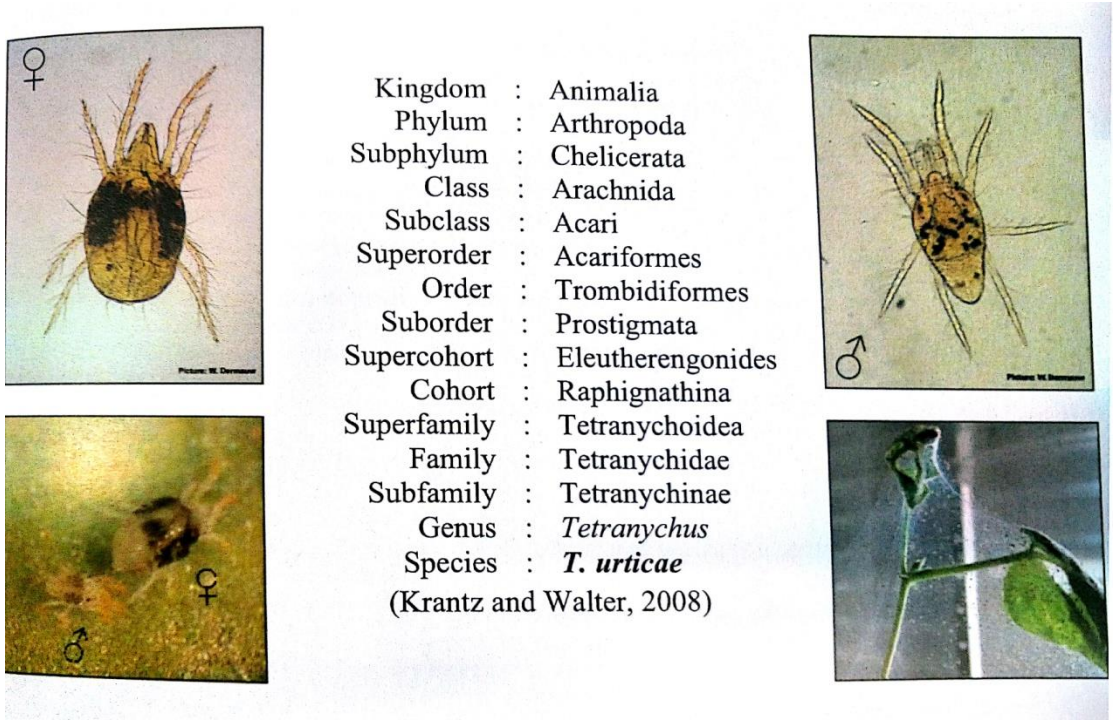
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το άκαρι Tetranychus urticae και η γεωπονική σημασία του.

Μέσα στην οικογένεια των Tetranychidae, το άκαρι Tetranychus urticae είναι από οικονομικής απόψεως το πιο σημαντικό εξαιτίας της καταστροφής που προκαλεί σε σημαντικά φυτά και έτσι έχει μελετηθεί κατα κόρων (Demaeght, 2015). Επίσης ο T. urticae είναι υπερβολικά πολυφάγος και μπορεί να προσβάλει πάνω από 1100 φυτά και επίσης έχει μια εξαιρετική ικανότητα να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα (Dermauw et al., 2013). Η κύρια καταστροφή που προκαλεί στα φυτά είναι μέσω της εκτροφής του. Τα ακάρεα αποικούν κυρίως το κάτω μέρος του φύλλου. Εκεί αυτά εισχωρούν την επιδερμίδα και τις μεσόφιλες στοιβάδες με τα στιλέτα τους και ρουφούν το κυτταρικό περιεχόμενο και κατά συνέπεια καταστρέφουν το σπογγώδες παρένχημα. Κατά την διαδικασία αυτή η χλωροφύλλη απομακρύνεται προκαλώντας το κιτρίνισμα του φύλλου. Τέλος το φύλλο οδηγείται στην νέκρωση και την αποκοπή (Demaeght, 2015). Ο T. urticae διαθέτει αδένες που παράγουν μετάξι, οι οποίοι βρίσκονται κοντά στο στόμα του ακάρεως(Van Pottelberge, 2008). Ο ιστός που παράγετε χρησιμοποιείτε ως φωλιά, ως προστατευτικό για τα ακάρεα και τα αυγά τους από θηρευτές, από την βροχόπτωση και από εφαρμογές εντομοκτόνου (Demaeght, 2015).

Μετά το κιτρίνισμα του φύλλου τα ακάρεα μετακινούνται σε νέα πράσινα φύλλα. Τα ακάρεα αποικούν νέα φυτά είτε με τον αέρα, είτε με επαφή φύλλου με φύλλου είτε με κάθε άλλο μέσο μεταφοράς. Οι γενιές είναι μικρές με διάρκεια δέκα με δεκατέσσερις μέρες και οι πληθυσμοί φτάνουν ταχύτατα καταστροφικά επίπεδα. Όσο υψηλότερη η θερμοκρασία τόσο πιο έντονη είναι οι ρυθμοί αναπαραγωγής και εκτροφής των ακάρεων. Συνεπώς τα ακάρεα γίνονται ιδιαίτερα καταστροφικά κατά τη διάρκεια ζεστών και ξηρών περιόδων αλλά παρόλα αυτά είναι καταστροφικά και κατά την διάρκεια πιο δροσερών περιόδων. Υπάρχουν τρία ενεργά στάδια ανάπτυξης, αυτά είναι η λάρβα που έχει έξι πόδια, η πρωτονύμφη που έχει οκτώ πόδια και η δευτερονύμφη με οκτώ πόδια επίσης. Μεταξύ αυτών των σταδίων μεσολαβούν τα στάδια ανάπαυσης χρησαλής (πρωτοχρησαλής, δευτεροχρησαλής και τελειοχρησαλής) πριν την τελική έκδυση σε ενήλικο άτομο (Van Pottelberge, 2008).

Ο έλεγχος του T. urticae γίνεται κυρίως με την χρήση ακαρεοκτόνων και εντομοκτόνων. Τα ακαρεοκτόνα έχουν μια μεγάλη δομική ποικιλομορφία και επιλεκτικότητα. Κάποια είναι γενικά μη επιλεκτικά και δρουν ενάντια και σε ακάρεα και έντομα και συχνά και σε άλλους οργανισμούς, για παράδειγμα τέτοια είναι τα εντομοκτόνα της κατηγορίας των οργανοφωσφορικών και των καρβαμικών. Άλλα έχουν μεγάλη επιλεκτικότητα και τοξικότητα ειδικά για τα ακάρεα ένα παράδειγμα είναι η κατηγορία των οργανοτηνών. Ένα άλλο ζήτημα με τα ακαρεοκτόνα είναι σε ποιο αναπτυξιακό στάδιο δρουν. Για παράδειγμα κάποια μπορεί να είναι τοξικά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (pyridaben), άλλα στα αυγά και στα μη ενήλικα άτομα (hexythiazox, clofentezine) και άλλα αποκλειστικά στα κινητικά στάδια(organophosphates) (Demaeght, 2015). Ο T. urticae έχει μια ιδιαίτερη ικανότητα να αναπτύσσει ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα. Η επιλογή του ανθεκτικού φαινοτύπου επιταχύνεται από την υψηλή γονιμότητα, τις ενδοδιασταυρώσεις, την αρρενοτοκία και τον πολύ μικρό κύκλο ζωής με αποτέλεσμα τις πάρα πολλές γενιές ανά χρόνο, ιδιαίτερα κατά τις θερμότερες περιόδους (Van Leeuwen, Vontas, Tsagkarakou, Dermauw, & Tirry, 2010).

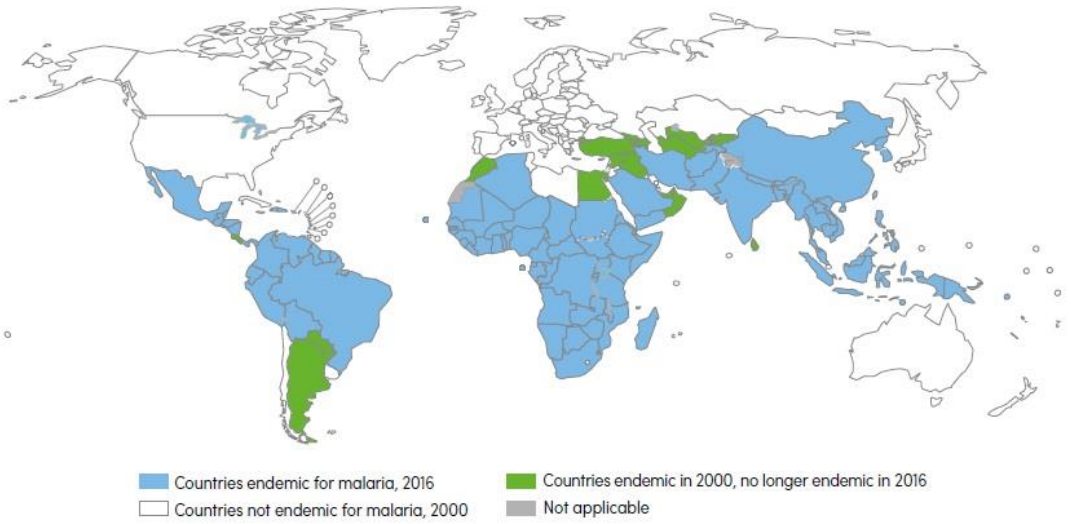


Εικόνα 1: Tetranychus urticae (Van Pottelberge, 2008).

1.2 Το κουνούπι Anopheles gambiae και το πρόβλημα της ελονοσίας.

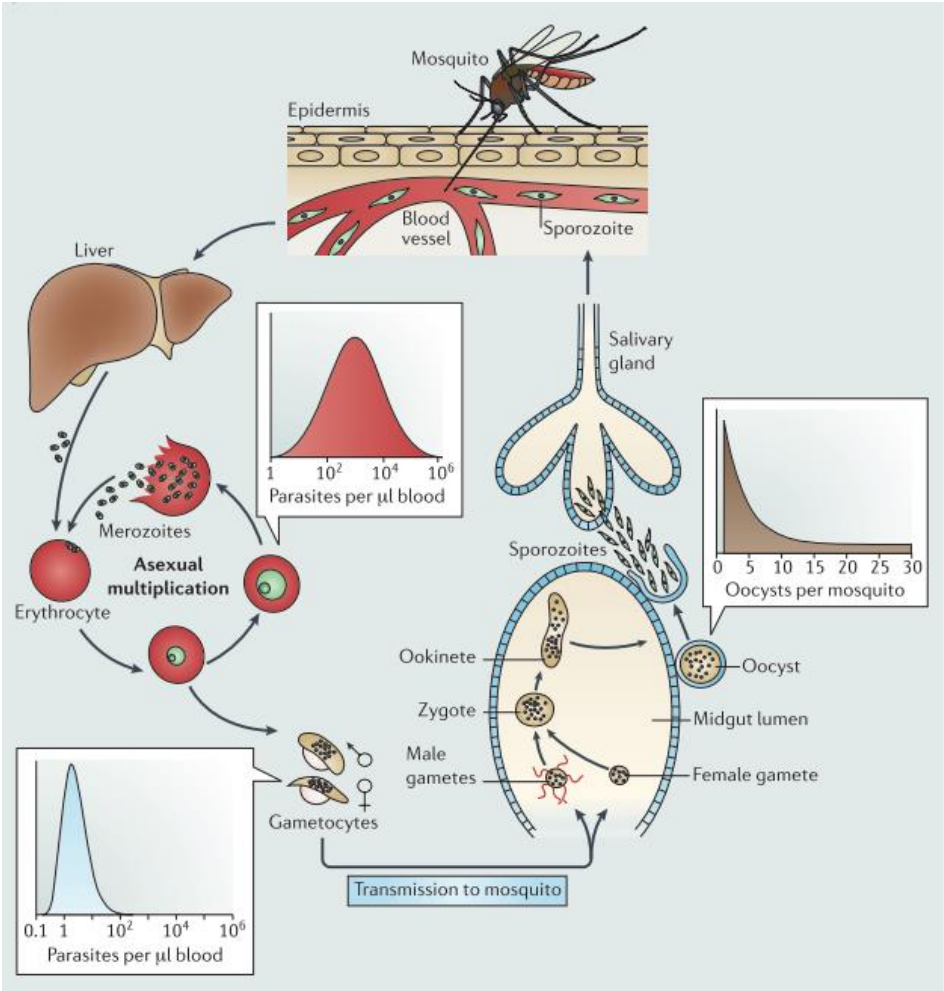
Τα κουνούπια είναι ικανά να επιβιώνουν σε μια ποικιλία από περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε ποικίλους κλιματικούς παράγοντες ή εναλλασσόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι εκπληκτική. Όπως όλα τα δίπτερα, τα κουνούπια παρουσιάζουν πλήρη μεταμόρφωση. Όλα τα κουνούπια χρειάζονται υδάτινα περιβάλλοντα για την ανάπτυξή τους. Μετά την εκκόλαψη του αυγού το κουνούπι περνάει από τέσσερα στάδια λάρβας και ένα στάδιο πούπας και στη συνέχεια γίνεται η μεταμόρφωση σε ενήλικο άτομο. Τα κουνούπια είναι 'μη αυτογενή', δηλαδή μετά την διασταύρωση με το αρσενικό, τα θηλυκά κουνούπια θα πρέπει να τραφούν με αίμα προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των αυγών. Τα θηλυκά κουνούπια γεννούν πενήντα με πεντακόσια αυγά, δύο με τέσσερις μέρες μετά την εκτροφή με αίμα (Becker, Norbert; Petric, Dusan; Zgomba, Marija; Boase, Clive; Madon, Minoo; Dahl, Christine; Kaiser, 2010).

Το κουνούπι Anopheles gambiae είναι ο κύριος φορέας της ελονοσίας. Στις αρχές του 2016, η ελονοσία θεωρήθηκε ενδημική σε 91 χώρες και περιοχές, 17 λιγότερες από το 2000 (δες εικόνα 2). Παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο που είχαμε τα τελευταία χρόνια, η ελονοσία συνεχίζει να έχει καταστροφικές συνέπειες για την υγεία και την καθημερινότητα των ανθρώπων. Ενημερωμένες εκτιμήσεις δείχνουν ότι το 2015 είχαμε 212 εκατομμύρια περιπτώσεις ατόμων που νόσησαν από ελονοσία, οδηγώντας σε 429 χιλιάδες θανάτους, οι περισσότεροι εκ των οποίων ήταν σε παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών στην Αφρική (WHO, 2016).



Εικόνα 2: Χώρες ενδημικές για την ελονοσία (WHO, 2016).

Το Plasmodium falciparum είναι ένα παράσιτο και ένα από τα είδη πρωτοζώων του γένους Plasmodium που προκαλεί την ελονοσία. Μεταδίδεται μέσω των θηλυκών κουνουπιών Anopheles. Όσον αναφορά τον κύκλο ζωής του P. falciparum ένα μέρος το περνάει στον άνθρωπο και ένα μέρος στο κουνούπι. Η μόλυνση του ανθρώπου ξεκινάει με την μεταφορά των σποροζωιτών στη κυκλοφορία του αίματος από το τσίμπημα ενός μολυσμένου θηλυκού κουνουπιού. Οι σποροζωίτες ταξιδεύουν μέσω του κυκλοφορικού στο συκώτι και αρχικά εισέρχονται στα ηπατοκύτταρα όπου και πολλαπλασιάζονται. Στη συνέχεια ακολουθεί η απελευθέρωση των μεροζωιτών στην κυκλοφορία του αίματος, η οποία σηματοδοτεί το στάδιο ασεξουαλικού πολλαπλασιασμού του παρασίτου (Bousema, Okell, Felger, & Drakeley, 2014). Ένα μέρος των μεροζωιτών σχηματίζουν γαμετοκύτταρα, τα οποία είναι οι μόνες μορφές του παρασίτου που έχουν την δυνατότητα μετάδοσης από τον άνθρωπο στο κουνούπι. Τα μη ώριμα γαμετοκύτταρα (στάδιο I-IV) απομονώνονται στον μυελό των οστών ενώ στο αίμα κυκλοφορούν μόνο τα ώριμα γαμετοκύτταρα (στάδιο V). Ο αριθμός των ώριμων γαμετοκυττάρων στο περιφερικό αίμα είναι λιγότερο από 100 γαμετοκύτταρα ανά μl αίματος (Drakeley, Sutherland, Bousema, Sauerwein, & Targett, 2006). Όταν μη μολυσμένα κουνούπια τσιμπήσουν αυτό το άτομο, κάθε γαμετοκύτταρο σχηματίζει ένα θηλυκό μακρογαμέτη ή μέχρι οκτώ αρσενικούς μικρογαμέτες. Στο έντερο του κουνουπιού, οι γαμέτες ενώνονται και σχηματίζουν ένα ζυγωτό το οποίο αναπτύσσετε σε κινητικά ωοκύτταρα (ookinetes), τα οποία μπορούν να διεισδύσουν το τοίχωμα του εντέρου και να σχηματίσουν ωοκύστες (oocysts). Κάθε μολυσμένο κουνούπι φέρει μια έως δέκα ωοκύστες (Muirhead-Thomson, 1954). Οι ωοκύστες μεγαλώνουν σε μέγεθος με το πέρασμα του χρόνου και τέλος από αυτές απελευθερώνονται οι σποροζωίτες που μεταναστεύουν στους σιελογόνους αδένες του κουνουπιού, από όπου θα μολύνουν ξανά ανθρώπους με το επόμενο γεύμα τους με αίμα (Bousema et al., 2014).



Εικόνα 3: Ο κύκλος ζωής του Plasmodium falciparum(Bousema et al., 2014).

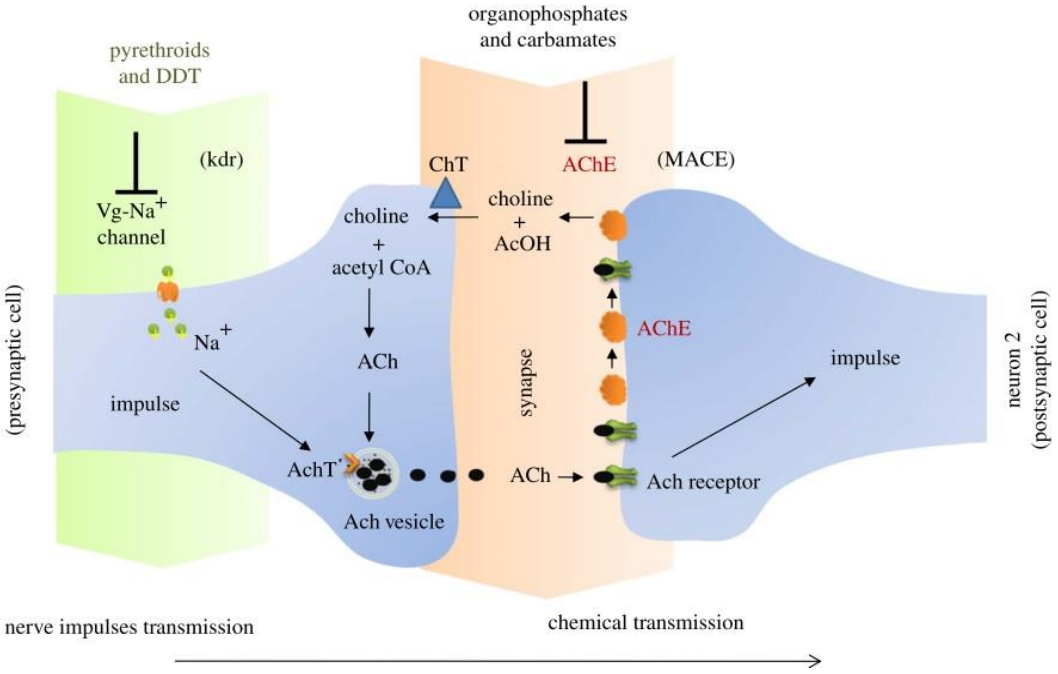
1.3 Εντομοκτόνα – Ακαρεοκτόνα και οι μηχανισμοί δράσης τους.

Ο κύριος τρόπος ελέγχου των πληθυσμών κουνουπιών και T. urticae γίνεται με χημικά σκευάσματα (εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα). Για τον έλεγχο του κουνουπιών χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα όπως οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά, οργανοχλωριωμένα και πυρεθροειδή. Για τον έλεγχο των πληθυσμών T. urticae χρησιμοποιούνται εκτός από τα εντομοκτόνα και μια σειρά από σκευάσματα με ακαρεοκτόνο δράση. Τα κύρια ακαρεοκτόνα που κυκλοφωρούν στην αγορά σήμερα είναι τα mitochondrial electron transport inhibitors (METIs), οι αβερμεκτίνες, τα νεονικοτινοειδή, οι οργανοτίνες, τα κυκλοδιενία και τετρονικά οξέα.

Η ακετυλοχοληνεστεράση (AChE) αποτελεί τον στόχο δράσης των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Φυσιολογικά η ακετυλοχοληνεστεράση διασπά τον νευροδιαβηβαστή ακετηλοχολήνη σε χολίνη και οξικό οξύ με αποτέλεσμα τον τερματισμό της νευρικής ώσης στις νευρομυικές συνάψεις. Η αναστολή του ενζύμου από τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα γίνεται μέσο της φωσφορυλίωσης μιας σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και αντίστοιχα από τα καρβαμιδικά με καρβαμυλίωση του ίδιου καταλήπου. Όταν η ακετυλοχοληνεστεράση απενεργοποιείτε, η συγκέντρωση της ακετυλοχολήνης στην συναπτική σχισμή παραμένει υψηλή με αποτέλεσμα την συνεχή πυροδότηση με

δυναμικά ενέργειας και τελικά την παράλυση του εντόμου και τον θάνατο (Ffrench-Constant, Daborn, & Le Goff, 2004; Fukuto, 1990; Hemingway, Hawkes, McCarroll, & Ranson, 2004; Liu, 2015).

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και τα πυρεθροειδή στοχεύουν στα τασεοελεγχόμενα κανάλια νατρίου, τα οποία αποτελούνται από τέσσερις δομικές επικράτειες (I-IV) με έξι διαμεμβρανικές έλικες η κάθε μια (S1–S6). Τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα τροποποιούν την κινητική του ανοίγματος και κλεισίματος των τασεοελεγχόμενων καναλιών νατρίου με το να καθυστερούν την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση του καναλιού. Έχει διαπιστωθεί ότι η πρόσδεση των πυρεθροειδών παρατείνει το άνοιγμα του καναλιού αναστέλλοντας την απενεργοποίηση του καναλιού και σταθεροποιώντας την ανοικτή διαμόρφωσή του. Έτσι το κανάλι ανοίγει σε δυναμικό ισορροπίας, με αποτέλεσμα την εκπόλωση της νευρικής μεμβράνης και την πυροδότηση επανειλημμένων δυναμικών στους κινητικούς και αισθητικούς άξονες οι οποίοι προκαλούν παράλυση και θάνατο (Dong, 2007; Ffrench-Constant, 2013; Hemingway et al., 2004; Hemingway & Ranson, 2000; Liu, 2015).



Εικόνα 4: Βιοχημικοί στόχοι των εντομοκτόνων (David et al., 2013).

Το 1990 τέσσερα νέα σκεβάσματα (pyridaben, fenpyroximate, tebufenpyrad, και fenazaquin) τα οποία ανήκουν στους αναστολείς μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (METIs) αναπτύχθηκαν ως ακαρεοκτόνα. Τα METI ακαρεοκτόνα δρούν αναστέλοντας το σύμπλοκο I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ATP και μορφολογικές αλλαγές στα μιτοχόνδρια (Lümmen, 2007; Stumpf & Nauen, 2001; Van Leeuwen, Tirry, Yamamoto, Nauen, & Dermauw, 2015).

Μια άλλη κατηγορία εντομοκτόνων είναι η υποοικογένεια των αβερμεκτινών των μακροκυκλικών λακτονών. Αυτές οι ουσίες παράγονται από τον μικροοργανισμό Streptomyces avermitilis. Ο στόχος δράσης των αβερμεκτινών είναι τα κανάλια χλωρίου που ενεργοποιούνται από το γλουταμικό (GluCls) (Dermauw et al., 2012; Riga et al., 2014; Wolstenholme & Rogers, 2005)

Το γ-αμινοβουτηρικό οξύ είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής τόσο στα έντομα όσο και στα θηλαστικά και δρα ως αγωνιστής στο άνοιγμα των πενταμερών διαμεμβρανικών καναλιών χλωρίου. Ο GABA υποδοχέας, ως τύπου άλφα υποδοχέας για τον νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτηρικού οξέος, είναι ο στόχος των εντομοκτόνων που ονομάζονται κυκλοδιένια (cyclodiene) όπως το dieldrin (Ffrench-Constant, 2013; Ffrench-Constant et al., 2004; Liu, 2015; Perry, Batterham, & Daborn, 2011).

Μια άλλη κατηγορία εντομοκτόνων είναι οι ρυθμιστές ανάπτυξης (Insect Growth Regulators, IGRs). Αυτοί παρεμποδίζουν την φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη του εντόμου. Υπάρχουν δυο κατηγορίες IGRs οι οποίες διαφέρουν στον τρόπο δράσης τους. Η πρώτη ανήκει στην κατηγορία αναστολέων της σύνθεσης χιτίνης. Αυτά είναι το diflubezuron, το cyromazine και το triflumuron τα οποία παρεμποδίζουν τον σχηματισμό της επιδερμίδας (cuticle) και δεν επιτρέπουν την έκδυση. Στη δεύτερη ανήκουν τα ανάλογα της ορμόνης juvenile, τα οποία παρεμποδίζουν την μεταμόρφωση του εντόμου (Becker, Norbert; Petric, Dusan; Zgomba, Marija; Boase, Clive; Madon, Minoo; Dahl, Christine; Kaiser, 2010).

Μια πιο πρόσφατη κατηγορία εντομοκτόνων είναι τα νεονικοτινοειδή. Τα νεονικοτινοειδή δρουν ως αγωνιστές στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs). Οι διαφορές στις ιδιότητες και στη δομή των υπομονάδων μεταξύ nAChRs από έντομα και θηλαστικά εξηγεί την υψηλή επιλεκτικότητα των νεονικοτινοειδών στα αρθρόποδα και την χαμηλή τοξικότητα στα σπονδυλωτά. Η αγωνιστική δραστηριότητα των νεονικοτινοειδών επάγει την συνεχή διέγερση των νευρικών μεμβρανών, προκαλώντας δυναμικά που οδηγούν στην παράλυση και στην κυτταρική ενεργειακή εξάντληση (Ffrench-Constant, 2013; Ffrench-Constant et al., 2004; Perry et al., 2011; Simon-Delso et al., 2015).

Τα παράγωγα τετρονικά οξέα, γνωστά και ως κυκλικές κετοενόλες, αποτελούνται από το spirodiclofen, το spiromesifen και το spirotetramat και είναι μια από τις πιο πρόσφατα αναπτυγμένες κατηγορίες εντομοκτόνων με νέο τρόπο δράσης. Αυτές οι ουσίες παρεμβαίνουν στην βιοσύνθεση των λιπιδίων και πιστεύετε ότι δρούν ως αναστολείς του ενζύμου acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCase). Το Spirodiclofen δρα κατά όλων των αναπτυξιακών σταδίων των ακάρεων συμπεριλαμβανομένων των αυγών. Επιπλέον μειώνει την γονιμότητα των ενήλικων θηλυκών ατόμων, μειώνοντας τον αριθμό αυγών που δίνουν (Bretschneider, Benet-Buchholz, Fischer, & Nauen, 2003; Demaeght et al., 2013; Van Leeuwen et al., 2015).

IRAC Group	Mode of action/target site	Active ingredients
1	Acetylcholinesterase inhibitors	carbamates, organophosphates
2	Chloride channel antagonists	cyclodiene organochlorines (endosulfan)
3	Sodium channel modulators	pyrethroids (bifenthrin)
6	Chloride channel activators	abamectin, milbemectin
10	Mite growth inhibitors targeting chitin synthase	clofentezine, hexythiazox, etoxazole
12	Inhibitors of mitochondrial ATP synthase	diafenthiuron, azocyclotin, cyhexatin, fenbutatin oxide, propargite, tetradifon
13	Uncoupler of oxidative phosphorylation	chlorfenapyr
15	Inhibitors of chitin synthesis, type 0	flucycloxuron, flufenoxuron
19	Octopamine receptor agonists	amitraz
20	Mitochondrial complex III electron transport inhibitors	acequinocyl, fluacrypyrim, bifenazate
21	Mitochondrial complex I electron transport inhibitors	fenazaquin, fenpyroximate, pyrimidifen, pyridaben, tebufenpyrad, tolfenpyrad
23	Inhibitors of acetyl Coenzyme A carboxylase	spirodiclofen, spiromesifen, spirotetramat
25	Mitochondrial complex II electron transport inhibitors	cyenopyrafen, cyflumetofen
UN	Compounds of unknown or uncertain mode of action	dicofol

Εικόνα 5: Κατηγορίες εντομοκτόνων/ακαρεοκτόνων και τρόποι δράσης τους (Van Leeuwen et al., 2015).

1.4 Μοριακοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας.

Με την πάροδο των χρόνων και με την εκτενή χρήση των εντομοκτόνων αναπτύχθηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί. Η ανθεκτικότητα έχει οριστεί από τον WHO το

1957 ως ‘η κληρονομήσιμη ικανότητα ενός στελέχους κάποιων οργανισμών να επιβιώνει σε δόσεις εντομοκτόνων που θα σκότωνε την πλειοψηφία των ατόμων σε φυσιολογικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους’. Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι ένα από τα κύρια εμπόδια στον έλεγχο των φορέων σημαντικών ασθενειών και εντομολογικών εχθρών για την γεωργία(Scott, 1999). Οι κύριες κατηγορίες ανθεκτικότητας είναι η ανθεκτικότητα στόχου (target site resistance), η βιοχημική ανθεκτικότηα (metabolic resistance), η ανθεκτικότητα επιδερμίδας (cuticular resistance) και η συμπεριφορική ανθεκτικότητα (behavioral resistance) (Hemingway et al., 2004).

1.4.1 Ανθεκτικότητα στόχου – Target site resistance.

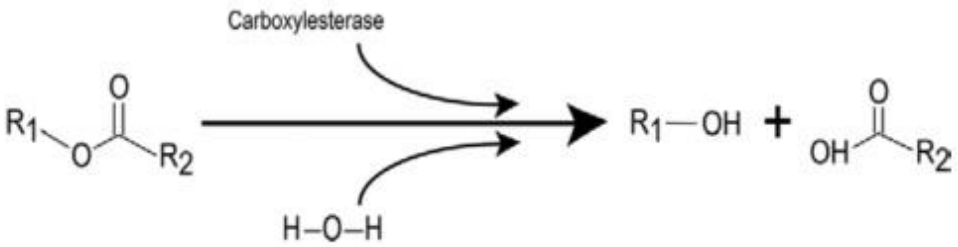
Η ανθεκτικότητα στόχου είναι αποτέλεσμα δομικών αλλαγών ή μεταλλάξεων (σημειακών μεταλλάξεων) γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλοεπιδρούν με εντομοκτόνα. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν οι μεταλλάξεις kdr (knockdown resistance). Αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στα κανάλια νατρίου τα οποία είναι στόχος των πυρεθροειδών και του DDT. Μια άλλη περίπτωση ανθεκτικότητας στόχου αποτελούν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την ακετυλοχολινεστεράση. Η ακετυλοχοληνεστεράση αποτελεί τον στόχο δράσης των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο που έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της συγγένειας των εντομοκτόνων με παράλληλη διατήρηση της ενζυμικής ενεργότητας ακετυλοχολινεστεράσης. Τέλος ένα άλλο παράδειγμα ανθεκτικότητας στόχου είναι η περίπτωση των υποδοχέων Α του γ- αμινοβουτηρικού οξέος. Οι μεταλλάξεις Rdl (Resistance to dieldrin) έχουν ταυτοποιηθεί σε αυτό το γονίδιο και μειώνουν την πρόσδεση των κυκλοδιενίων με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα του dieldrin (Ffrench-Constant et al., 2004; Hemingway et al., 2004; Hemingway & Ranson, 2000; Liu, 2015).

1.4.2 Βιοχημική ανθεκτικότητα – Metabolic resistance.

Σε βιοχημικό επίπεδο, η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα τυπικά εμπεριέχει αύξηση των μεταβολικών ικανοτήτων ενζύμων αποτοξικοποίησης. Γονίδια που σχετίζονται με την βιοχημική ανθεκτικότητα διαμεσολαβούν σε λειτουργίες περιβαλλοντικής ανταπόκρισης, οι οποίες έχουν σχετικά λιγότερες εγγενείς περιορισμούς και τείνουν να είναι πιο ανεκτικές σε γονιδιωματικές αλλαγές που αλλάζουν την λειτουργεία, την έκφραση ή και τα δυο. Πολλαπλασιασμός αλληλουχιών, μεταγραφική ενίσχυση και μεταλλάξεις σε κωδικές περιοχές γονιδίων που κωδικοποιούν εστεράσες (estereses), μεταφορείς της γλουταθιόνης (glutathione-S- transferases, GSTs) και μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 (cytochromeP450 monooxygenases, P450s) έχουν ταυτοποιηθεί ως μηχανισμοί ανθεκτικότητας (Li, Schuler, & Berenbaum, 2007).

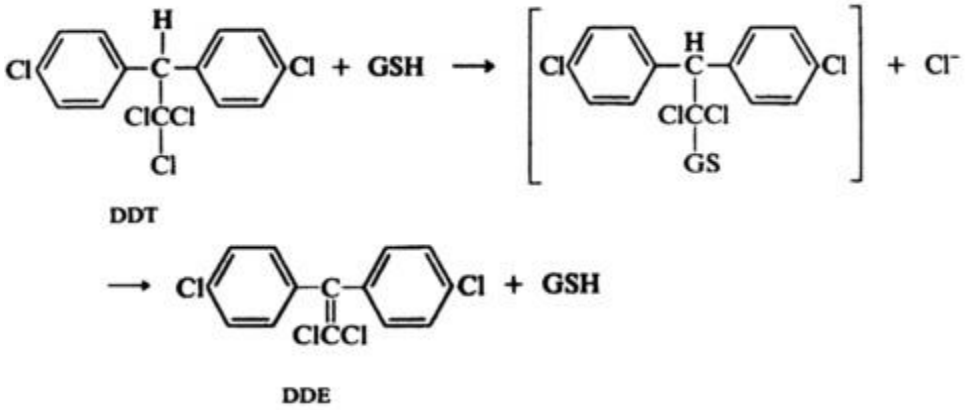
Αυξημένη παραγωγή εστερασών μέσω ενίσχυσης γονιδίου ή μεταγραφική υπερέκφραση έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά, καρβαμικά και πυριθροειδή εντομοκτόνα σε μια ποικιλία αρθροπόδων παρασίτων (Bass & Field, 2011). Η κυρίαρχη αιτία αυτής της υπέρμετρης ενζυμικής σύνθεσης οφείλετε στις περισσότερες περιπτώσεις σε πολλαπλασιασμό του/των γονιδίου/ων στο γονιδίωμα του εντόμου (Hemingway et al., 2004). Οι εστεράσες είναι ικανές να υδρολύσουν εστερικούς δεσμούς που πιθανών υπάρχουν στα εντομοκτόνα δημιουργώντας ένα οξύ και μια αλκοόλη ως μεταβολίτες (εικόνα 6). Ένας άλλος τρόπος δράσης των εστερασών εκτός από το να υδρολύουν εστερικούς δεσμούς είναι με το να απομονώνουν μέσο

δέσμευσης (sequestration) το εντομοκτόνο και να το εμποδίζουν να δράσει στον στόχο του (Montella, Schama, & Valle, 2012).



Εικόνα 6: Βασική αντίδραση υδρόλυσης με εστεράση (Montella et al., 2012)

Μια άλλη σημαντική κατηγορία μεταβολικών ενζύμων που συμβάλουν στην ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα είναι οι GSTs. Οι GSTs έχουν βρεθεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση στις κατηγορίες των οργανοφωσφορικών, οργανοχλωριωμένων και τα πυρεθροειδών εντομοκτόνων (Li et al., 2007). Υψηλή ενζυμική δραστικότητα οφείλετε σε αύξηση της ποσότητας του ενός ή περισσότερων ενζύμων GST, είτε ως αποτέλεσμα γονιδιακού πολλαπλασιασμού ή πιο συχνά μέσω αύξησης του μεταγραφικού ρυθμού (Hemingway et al., 2004). Οι GSTs πρωτίστως καταλύουν την σύνδεση ενός ηλεκτρόφιλου μορίου (π.χ. εντομοκτόνο) με τη θειολομάδα την ανοιγμένης γλουταθειόνης (GSH), κάνοντας το προϊόν πιο υδατοδιαλυτό και πιο εύκολα αποβαλλόμενο από το μη συνδεδεμένο εντομοκτόνο (Enayati, Ranson, & Hemingway, 2005). Επιπλέον, κάποιες GSTs καταλύουν την αποχλωριοποίηση του DDT σε DDE χρησιμοποιώντας ανοιγμένη γλουταθειόνη ως συμπαράγοντα παρά ως προσδέτη (Enayati et al., 2005; Ffrench-Constant, 2013).



Εικόνα 7: Μοντέλο αποχλωριοποίησης του DDT από GST (Enayati et al., 2005)

Οι P450s έχει δειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοχημική ανθεκτικότητα αρθρόποδων μεταβολίζοντας ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών κλάσεων εντομοκτόνων συμπεριλαμβανομένου των πυρεθροειδών, των οργανοχλωριομένων, των νεονικοτινοειδών, των οργανοφωσφορικών, των καρβαμικών και των ρυθμιστών ανάπτυξης. Βασικός μηχανισμός ανθεκτικότας στην περίπτωση αυτή είναι η υπερέκφρασή των γονιδίων P450, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα των αντίστοιχων P450 πρωτεϊνών και τελικά P450 δραστικοτήτων. Η μεταγραφική υπερέκφραση των P450 γονιδίων στα ανθεκτικά έντομα ρυθμίζεται από trans και/ή cis ρυθμιστικών γονιδίων/παραγόντων. Η υψηλότερη επαγόμενη έκφραση των μεταγράφων P450 γίνεται κυρίως λόγο μεταλλάξεων σε trans ρυθμιστικούς παράγοντες

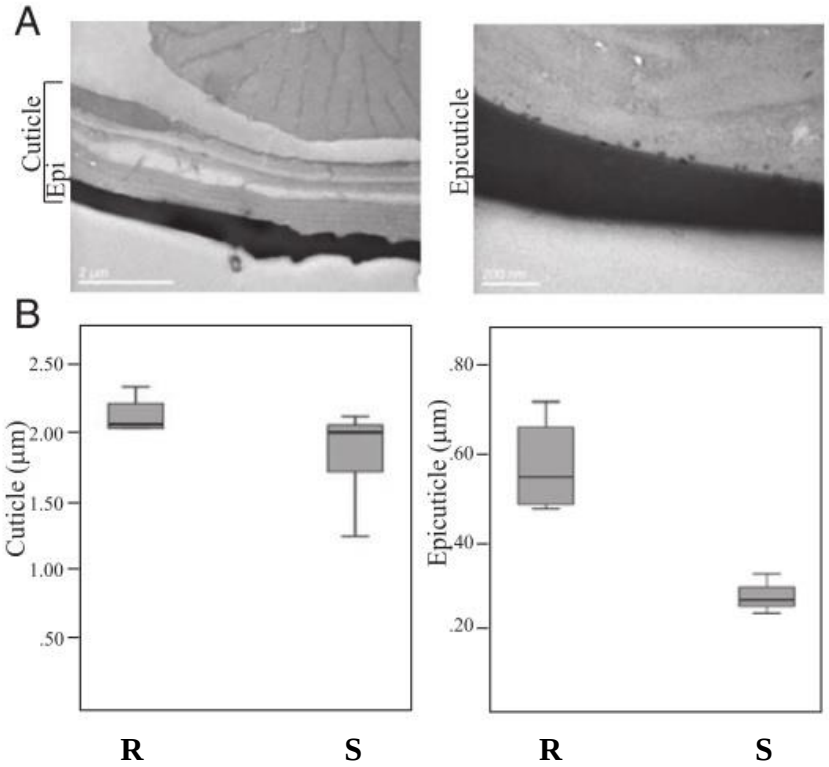
ή στους σηματοδοτηκούς τους καταρράκτες (Bass & Field, 2011; Liu, Li, Gong, Liu, & Li, 2015).

Οι P450s του κυτοχρώματος είναι αιμοπρωτεΐνες οι οποίες δρουν ως οι τελικές οξειδάσες σε συστήματα μονοοξυγενάσης. Οι ελάχιστες απαιτήσεις για να γίνει η οξείδωση μέσω μονοοξυγενάσης εκτός από το υπόστρωμα και το οξυγόνο είναι η P450, η αναγωγάση της P450 (CPR), το NADPH και σε κάποιες περιπτώσεις η πρωτεΐνη b5 (Scott, 1999). Η ανάλυση της αντίδρασης μονοοξυγενάσης θα γίνει στο κεφάλαιο 1.5.

Στην περίπτωση του T.urticae αρκετά είναι τα παραδείγματα βιοχημικής ανθεκτικότητας οφειλόμενης σε P450s. Σε ανθεκτικά στελέχη από το Μαραθώνα έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται η CYP392A16 μια P450 που μεταβολίζει το abamectin (Riga et al., 2014). Στο ίδιο στέλεχος υπερεκφράζεται και μια άλλη P450 η CYP392A11 που μεταβολίζει τα METIs ακαρεοκτόνα cyenopyrafen και fenpyroximate (Riga et al., 2015). Τέλος σε ανθεκτικά στελέχη έναντι του spirodiclofen βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται δυο P450s, η CYP392E7 και η CYP392E10. Από τις δυο η CYP392E10 μεταβολίζει το spirodiclofen με υδροξυλίωση (Demaeght et al., 2013). Μια άλλη περίπτωση βιοχημικής ανθεκτικότητας είναι αυτή του αλευρώδη Bemisia tabaci στα νεονικοτινοειδή και πιο συγκεκριμένα στο imidacloprid. Ανθεκτικά στελέχη στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο υπερεκφράζουν την CYP6CM1 ένα ένζυμο που μεταβολίζει in vitro το imidacloprid (Karunker et al., 2009).

1.4.3 Ανθεκτικότητα επιδερμίδας – Cuticular resistance.

Στην ανθεκτικότητα επιδερμίδας παρατηρείτε ενίσχυση του εξωσκελετού του εντόμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου του εντομοκτόνου σε αυτό. Σε πειράματα με την χρήση σημασμένου με ^{14}C εντομοκτόνου deltamethrin παρατηρήθηκε ότι η είσοδος του εντομοκτόνου ήταν 50% πιο αργή στα ανθεκτικά κουνούπια σε σχέση με τα ευαίσθητα (Balabanidou et al., 2016). Στην ίδια μελέτη έγινε ανάλυση του πάχους της πιο εξωτερικής στοιβάδας του εξωσκελετου (epicuticle), με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission electron microscopy, TEM) και βρέθηκε ότι είναι δυο φορές πιο παχιά στα ανθεκτικά κουνούπια σε σχέση με τα ευαίσθητα (εικόνα 8). Η στοιβάδα αυτή αποτελείται κυρίως από υδρογονάνθρακες (CHC), και όντως τα ανθεκτικά έντομα περιείχαν 29% περισσότερα CHCs από τα ευαίσθητα (Balabanidou et al., 2016).



Εικόνα 8: TEM απεικόνιση μιας χαρακτηριστικής τομής από πόδια κουνουπιών (A) και μέτρηση του πάχους του cuticle (B αριστερά) και epicuticle (B δεξιά) σε ευαίσθητα και ανθεκτικά κουνούπια (Balabanidou et al., 2016). R: Ανθεκτκά κουνούπια και S: Ευαίσθητα κουνούπια

Η σύνθεση των CHCs γίνεται στα οινοκυττάρα (oenocytes), κύτταρα που βρίσκονται κάτω από την κοιλιακή επιδερμίδα και είναι εξωδερμικής προέλευσης (Makki, Cinnamon, & Gould, 2014). Στη συνέχεια δεσμεύονται από την λυποφορίνη, κυκλοφορούν στην αιμόλεμφο και τελικά φτάνουν στην επιδερμίδα όπου εναποτίθενται στο epicuticle (Makki et al., 2014). Δυο είναι οι βασικοί ρόλοι την CHCs. Πρώτον αποτρέπουν την απώλεια νερού και προστατεύουν από την αφυδάτωση και δεύτερον δρουν ως φερομόνες για την εύρεση συντρόφου (Chung & Carroll, 2015; Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T, Taquet N, Blomquist G, 2012).

Σε microarray πειράματα βρέθηκε να υπερεκφράζονται στην κοιλιά ανθεκτικών κουνουπιών δυο P450s, η CYP4G16 και η CYP4G17 (Ingham et al., 2014). Η CYP4G17 εκφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των οινοκυττάρων (Ingham et al., 2014) ενώ η CYP4G16 στην πλασματική μεμβράνη των ίδιων κυττάρων (Balabanidou et al., 2016). Αυτές οι δυο P450s είναι ομόλογες με την CYP4G1 της Drosophila *melanogaster* ένα ένζυμο που καταλύει την οξειδωτική αποκαρβονυλίωση των μακριάς αλυσίδας αλδεϋδών σε υδρογονάνθρακες με την παράλληλη απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα (Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T, Taquet N, Blomquist G, 2012). Σε μια αντίστοιχη μελέτη για την CYP4G16 δείχθηκε ότι και αυτή φέρει την ίδια ενεργότητα αποκαρβονυλάσης (Balabanidou et al., 2016).

1.5 Η οικογένεια πρωτεϊνών P450.

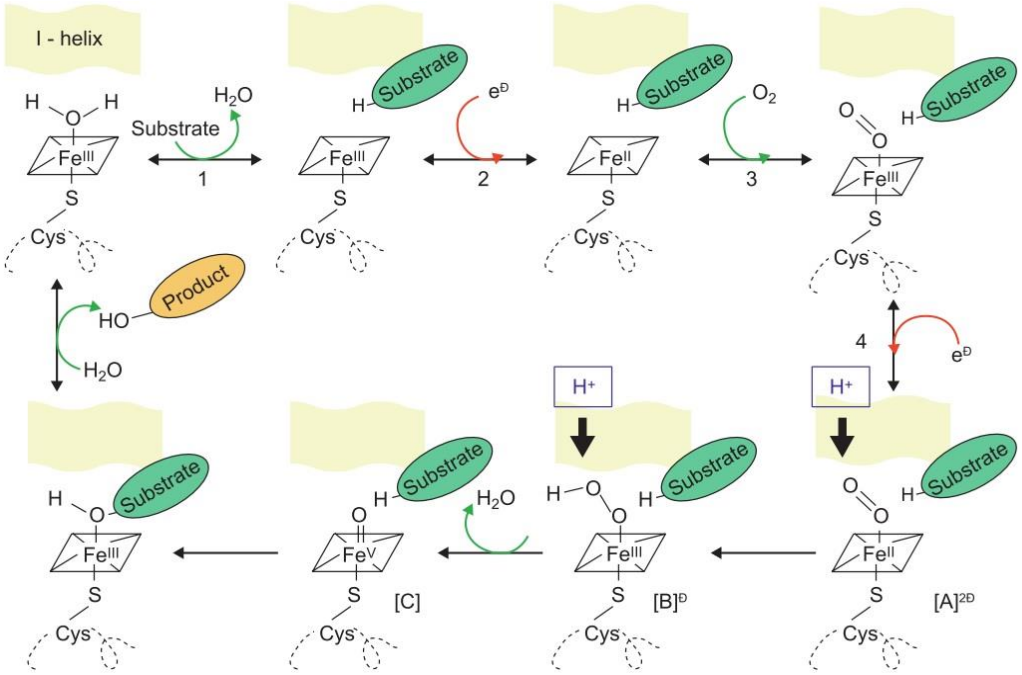
Οι πρωτεΐνες κυτοχρώματος P450 ή CYP γονίδια αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες γονιδίων με αντιπροσώπους σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς

οργανισμούς από τα βακτήρια μέχρι και τα θηλαστικά (Feyereisen, 2005; Lewis, 2001). Η αμινοξική τους αλληλουχία είναι πολύ διαφορετική και σε μερικές περιπτώσεις φτάνει και το 16% ομοιότητας, παρόλα αυτά η δομική τους αναδίπλωση παραμένει η ίδια (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Το ανθρώπινο γωνιδίωμα φέρει 57 P450 γονίδια ενώ των εντόμων περίπου εκατό. Κάθε P450 πρωτεΐνη είναι το προϊόν ενός CYP γονιδίου και η ποικιλομορφία μεταξύ των P450 είναι το αποτέλεσμα γονιδιακών διπλασιασμών, οι οποίοι συνοδεύονται από διαφοροποίηση στις αλληλουχίες. Τα τυπικά P450 πρωτεΐνικά μόρια, βάρους 45-55 kDa, είναι αιμο- ένζυμα τα οποία είναι γνωστό ότι καταλύουν πάνω από 60 χημικά διακριτές αντιδράσεις (Feyereisen, 2005). Το όνομά τους το πήραν από το χαρακτηριστικό Soret peak στα 450nm. Όταν ο αιμικός σίδηρος της πρωτεΐνης στην δισθενή του μορφή συνδεθεί με CO απορροφά φως με κορυφή απορρόφησης στα 450nm (Omura, Tsuneo; Sato, 1964a, 1964b).

Οι P450 παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση εξωγενών χημικών ενώσεων όπως εντομοκτόνα και τοξίνες φυτών. Τα P450 ένζυμα είναι κυρίως γνωστά για τον ρόλο τους ως μονοοξυγενάσες, καταλύοντας την μεταφορά ενός ατόμου μοριακού οξυγόνου στο υπόστρωμα και ανάγοντας το άλλο σε νερό. Η απλή στοιχειομετρία της αντίδρασης μονοοξυγενάσης είναι η εξής:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

Για την ενεργότητα P450 είναι απαραίτητη η παροχή αναγωγικών ισοδύναμων από το NADPH, μέσω της δράσης αναγωγάσης της P450 (CPR), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις χρειάζεται και το κυτόχρωμα b5 (cyt b5) (Feyereisen, 2005). Στην στοιχειομετρία της αλληλεπίδρασης μεταξύ P450 και CPR έχει βρεθεί ότι 6 με 8 P450s αλληλεπιδρούν με μια κεντρική CPR (Lewis, 2001). Αναλυτικά ο μηχανισμός κατάλυσης της αντίδρασης και το τι συμβαίνει στο ενεργό κέντρο της P450 φαίνεται στην εικόνα 9.



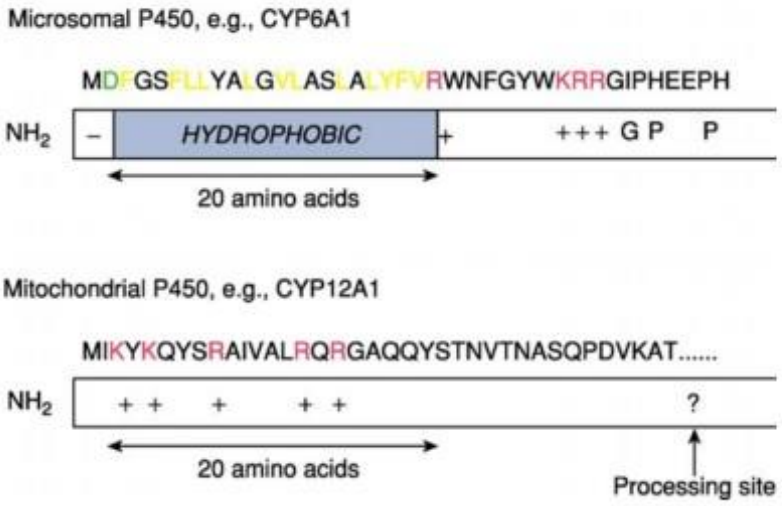
Εικόνα 9: Μηχανισμός κατάλυσης της αντίδρασης μονοοξυγενάσης από το ένζυμο P450 (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000)

Το ενεργό καταλυτικό κέντρο είναι η αίμη με την θειομάδα της συντηρημένης κυστεΐνης ως πέμπτος προσδέτης. Στην κατάσταση ηρεμίας η P450 είναι στην μορφή τρισθενούς σιδήρου και μερικώς συντονισμένη με ένα μόριο διαλύτη (νερό). Το πρώτο

βήμα για την κατάλυση είναι η πρόσδεση του υποστρώματος με την αντικατάσταση του έκτου προσδέτη δηλαδή του νερού. Το δεύτερο βήμα είναι η αναγωγή με ένα ηλεκτρόνιο που προέρχεται από το NADPH (CPR) του συμπλόκου στην κατάσταση του δισθενούς σιδήρου με αποτέλεσμα της αύξησης του αναγωγικού δυναμικού. Στη συνέχεια γίνεται η πρόσδεση του μοριακού οξυγόνου για να δώσει ένα σύμπλοκο υπεροξειδίου και μετά γίνεται η δεύτερη αναγωγή (είτε από την CPR είτε από τη Cyt b5) με ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο η οποία οδηγεί σε μια ενεργοποιημένη ομάδα οξυγόνου. Έπειτα γίνονται δυο ηλεκτρονιόφιλες οξειδώσεις ($[B]^D$,[C]) με την απελευθέρωση ενός μορίου νερού. Τέλος, γίνεται η προσθήκη του OH στο υπόστρωμα και απελευθερώνεται το προϊόν από το ενεργό κέντρο (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

1.5.1 Κυτταρικός εντοπισμός των P450.

Στους ευκαρυώτες η πλειοψηφία των ενζύμων P450 και η NADPH-P450 αναγωγάση είναι αγκυροβολημένα στην εξωτερική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω μιας υδρόφοβης αμινοτελικής αλληλουχίας αγκυροβόλησης (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Κάποια ένζυμα της οικογένειας στους ευκαρυώτες εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων με την καταλυτική επικράτεια προς την πλευρά της μήτρας. Στην περίπτωση των μιτοχονδριακών P450s το αμινοτελικό άκρο σχηματίζει μια αμφιπαθή α-έλικα (Feyereisen, 2005). Στην εικόνα 11 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του αμινοτελικού άκρου για τις δυο περιπτώσεις υποκυτταρικού εντοπισμού των P450s.



Εικόνα 10: Χαρακτηριστικά του αμινοτελικού άκρου ενζύμων P450 με εντοπισμό στο ΕΔ και στα μιτοχόνδρια (Feyereisen, 2005)

Κατά την σύνθεσή τους από το ριβόσωμα αναγνωρίζονται από το SRP (Signal Recognition Particle) το οποίο και σταματά την μετάφραση. Στην συνέχεια το σύμπλοκο mRNA, ριβοσώματος, αρτιγενούς πολυπεπτιδικής αλυσίδας και SRP μεταφέρονται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο όπου αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα του SRP. Μετά την αναγνώριση το SRP απελευθερώνεται, η μετάφραση συνεχίζεται και η πολυπεπτιδική αλυσίδα εισέρχεται στο ΕΔ μέσω του συμπλόκου-πόρου SEC61. Η συνμεταφραστική μετατόπιση σταματά μετά την σύνθεση του υδρόφοβου αμινοτελικού άκρου, το οποίο δρα ως αλληλουχία αγκυροβόλησης στη μεμβράνη και η μετάφραση συνεχίζεται αφήνοντας την υπόλοιπη πρωτεΐνη, μαζί και

την καταλυτική περιοχή, εκτεθειμένη στο κυτταρόπλασμα (E. P. a Neve & Ingelman-Sundberg, 2008).

Η αλληλουχία οδηγός του αμινοτελικού άκρου έχει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Αυτά είναι ένας υδρόφοβος πυρήνας που αποτελείτε από 16-20 υδρόφοβα αμινοξέα. Ανοδικά αυτής της αλληλουχίας υπάρχει συνήθως ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ και καθοδικά 2-4 θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Μετά τα θετικά αμινοξέα ακολουθεί μια περιοχή πλούσια σε προλίνες. Η κατανομή αυτή των φορτίων φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στον προσανατολισμό της πρωτεΐνης αφού σε πειράματα που εισήγαγαν 1-3 θετικά αμινοξέα ανοδικά της υδρόφοβης περιοχής αντί του αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος είχαν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή της καταλυτικής επικράτειας στον αυλό του ΕΔ ενώ το αμινοτελικό άκρο έμεινε στο κυτταρόπλασμα (E. P. a Neve & Ingelman-Sundberg, 2008; Sato, Sakaguchi, Mihara, & Omura, 1990; Szczesna-skorupa & Kemper, 2008).

Τα ένζυμα P450 στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχουν το σήμα KKXX στο καρβόξυτελικό τους άκρο, αναγκαίο για την ανάκτηση πολλών πρωτεϊνών από το cis-Golgi στο ΕΔ. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι το αμινοτελικό υδρόφοβο τμήμα από διαφορετικές P450s έχει τον ρόλο ενός σήματος κατακράτησης στο ΕΔ και είναι επαρκές για να περιορίσει τον εντοπισμό στην μεμβράνη του ΕΔ (Monier, Van Luc, Kreibich, Sabatini, & Adesnik, 1988; Seliskar & Rozman, 2007; E. Szczesna-Skorupa, Ahn, Chen, Doray, & Kemper, 1995). Επιπρόσθετα, εκτός από το αμινοτελικό άκρο και κάποιες άλλες περιοχές στην καταλυτική επικράτεια φαίνεται να έχουν λειτουργία κατακράτησης στο ΕΔ. Κατά πάσα πιθανότητα αυτές οι περιοχές έχουν συνεργιστική δράση μαζί με το αμινοτελικό άκρο για την κατακράτηση στο ΕΔ (Seliskar & Rozman, 2007; E. Szczesna-Skorupa et al., 1995).

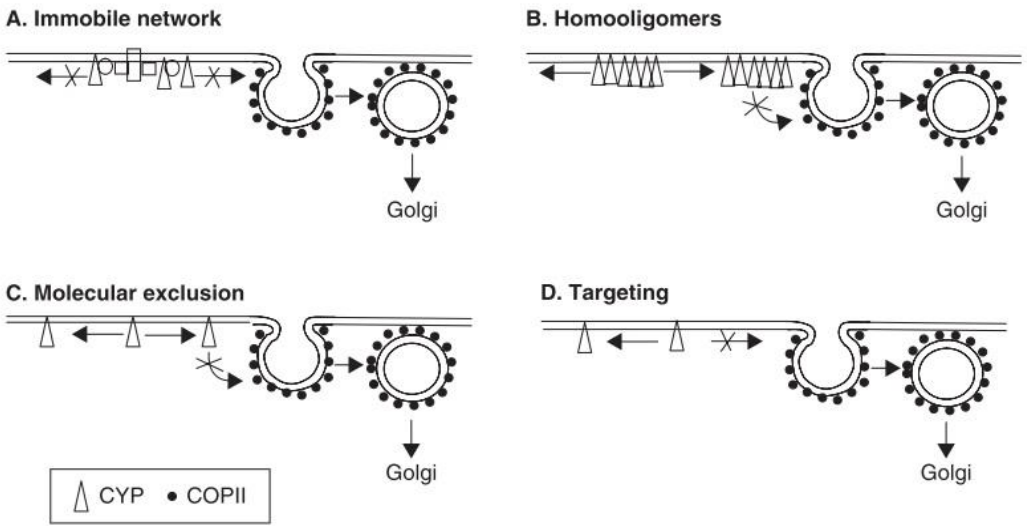
Παρόλη την ταυτοποίηση των σημαντικών περιοχών για τον εντοπισμό των P450s στο ΕΔ, ο μηχανισμός της κατακράτησης δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός. Διάφορες υποθέσεις έχουν γίνει και αρκετοί μηχανισμοί (εικόνα 11) έχουν προταθεί για την ερμηνεία του εντοπισμού των P450s στο ΕΔ (Szczesna-skorupa & Kemper, 2008).

Ένας μηχανισμός είναι ο αποκλεισμός των P450s από τα κυστίδια COPII λόγο αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες του ΕΔ σχηματίζοντας ένα σχετικά ακίνητο μεγαλομοριακό σύμπλοκο (εικόνα 11 A). Αυτό το μοντέλο καταρρίφθηκε με πειράματα FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) όπου φάνηκε ότι τόσο η CYP2C2-GFP όσο και το αμινοτελικό άκρο της CYP2C2 συνδεδεμένο με την GFP είχαν παρόμοια κινητικότητα με την πρωτεΐνη ελέγχου ενδεικτική για μια πρωτεΐνη του ΕΔ ελεύθερα κινούμενη με διάχυση (Elzbieta Szczesna-Skorupa, Chen, Rogers, Kemper, & Emper, 1998).

Ένα δεύτερο μοντέλο είναι ο αποκλεισμός των P450s από τα κυστίδια COPII λόγο ολιγομερισμού (εικόνα 11 B). Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση η ομάδα του Kemper έκαναν πειράματα FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) και BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) με την CYP2C2 και την CYP2E1 καθώς επίσης και με την CPR (Ozalp, Szczesna-skorupa, & Kemper, 2005; Elzbieta Szczesna-Skorupa, Mallah, & Kemper, 2003). Η CYP2C2 αλληλεπιδρά με τον εαυτό της και ολιγομερίζεται μέσο του αμινοτελικού άκρου της. Παρ' όλα αυτά ο ολιγομερισμός δεν είναι υπεύθυνος για την κατακράτηση στο ΕΔ αφού η χίμαιρα OEC που περιέχει το διαμεμβρανικό τμήμα του EGFR και την καταλυτική επικράτεια της CYP2C2 χωρίς το αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται στο ΕΔ χωρίς να ολιγομερίζεται με τον εαυτό της. Επιπλέον μεταλλάγματα του αμινοτελικού άκρου της CYP2C2 ή του αμινοτελικού άκρου της CYP2C1 (1-21) που δεν κατακρατούνται στο ΕΔ, διατηρούν την ικανότητα όμο-ολιγομερισμού. Από τα πειράματα FRET φάνηκε ότι η CYP2E1 δεν ομο-

ολιγομερίζεται. Τέλος όσον αναφορά την αλληλεπίδραση P450 με CPR φάνηκε ότι γίνεται μέσω της καταλυτικής επικράτειας της P450. Συνεπώς λόγω του ότι το αμινοτελικό άκρο είναι αρκετό για την κατακράτηση στο ΕΔ, η αλληλεπίδραση με την CPR δεν είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της P450 στο ΕΔ (Ozalp et al., 2005; Elzbieta Szczesna-Skorupa et al., 2003).

Τέλος ένα εναλλακτικό μοντέλο είναι η μεσολάβηση πρωτεϊνών 'υποδοχέων κατακράτησης' (retention receptor). Έτσι η αλληλεπίδραση με αυτές τις πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό των πρωτεϊνών P450 από τον χώρο που σχηματίζονται τα κυστίδια μεταφοράς και εντοπισμό αυτών σε άλλη περιοχή του ΕΔ (εικόνα 11 D) (Szczesna-skorupa & Kemper, 2008). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της CYP2C2 της οποίας ο σωστός εντοπισμός εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της με την BAP31 (B-cell Activating Protein 31). Με BiFC και με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης δείχθηκε ότι αυτές οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μέσω των διαμεμβρανικών τους επικρατειών. Σε μετασχηματισμένα κύτταρα COS-1 με την CYP2C2-GFP είτε με το αμινοτελικό άκρο της CYP2C1 (1-29) –GFP στα οποία έγινε siRNA το γονίδιο την BAP31 παρατηρήθηκε αλλαγή στον υποκυτταρικό εντοπισμό της P450. Έτσι από το ΕΔ μεταφέρθηκε σε περιοχές γύρο από τον πυρήνα, στην πυρηνική μεμβράνη και σε κάποιες περιπτώσεις στην πλασματική μεμβράνη. Αντίστοιχα όταν εκφράστηκαν αυτές οι χιμαιρικές P450 σε βλαστικά κύτταρα που δεν εκφράζουν την BAP31 ο εντοπισμός τους ήταν στην κυτταρική μεμβράνη και στον πυρηνικό φάκελο και όταν στα ίδια κύτταρα εκφράστηκε η BAP31 άλλαξε ο εντοπισμός των P450 και περιορίστηκε στο ΕΔ. Αυτά τα πειράματα καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο την αλληλεπίδρασης της CYP2C2 με την BAP31 για τον εντοπισμό της στο ΕΔ (Elzbieta Szczesna-Skorupa & Kemper, 2006).



Εικόνα 11: Πιθανοί μηχανισμοί για κατακράτηση των P450 στο ΕΔ (Szczesna-skorupa & Kemper, 2008)

Μικρές ποσότητες από κάποιες P450s μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη. Από ανάλυση ηπατικών κυττάρων βρέθηκε ότι το 10% των P450s του κυττάρου βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη με την καταλυτική επικράτεια να βλέπει τον εξωκυττάριο χώρο. Κάποιες περιπτώσεις P450 που έχουν ταυτοποιηθεί στην μεμβράνη είναι οι CYP1A1, 1A2, 2Bs, 2Cs, 2D6, 2E1 και 3A4 (E. P. a Neve & Ingelman-Sundberg, 2008; Seliskar & Rozman, 2007). Πιο συγκεκριμένα για την CYP2E1 βρέθηκε σε μετασχηματισμένα κύτταρα ήπατος ποντικού H2.35 ότι το 2%

της παραγόμενης CYP2E1 βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη με την καταλυτική επικράτεια προς τον εξωκυττάριο χώρο. Στο μετάλλαγμα $N^{++}2E1$, όπου έχει γίνει προσθήκη δυο θετικά αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο, παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό πρωτεϊνών με τύπου ΙΙ προσανατολισμό στο ΕΔ, παρόλα αυτά ο τύπου Ι προσανατολισμός επικρατούσε. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την 2,5x αύξηση της CYP2E1 στην πλασματική μεμβράνη όπου έφτασε το 4,7% της συνολικής πρωτεΐνης. Συμπερασματικά αναστροφή της τοπολογίας από τύπου Ι σε τύπου ΙΙ σε ένα μικρό κλάσμα της CYP2E1 στο ΕΔ έχει ως αποτέλεσμα την κατεύθυνση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη (E. P. A. Neve & Ingelman-Sundberg, 2000).

1.6 Η χρήση του ζαχαρομύκητα Saccharomyces cerevisiae ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης

Η ζύμη είναι ένα πολύ καλό σύστημα για έκφραση ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Επειδή η ζύμη είναι εύκολο να τροποποιηθεί γενετικά, ένα στέλεχος μπορεί να βελτιστοποιηθεί για την έκφραση μιας πρωτεΐνης. Επίσης πολλές ευκαρυωτικές πρωτεΐνες περιέχουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες μπορούν να γίνουν στη ζύμη αλλά όχι σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης. Κάποια άλλα θετικά στοιχεία για την επιλογή της ζύμης ως ετερόλογο σύστημα έκφρασης είναι η γρήγορη ανάπτυξη, το χαμηλό κόστος και οι μεγάλης έκφρασης καλλιέργειες για την αύξηση της απόδοσης. Εάν πρωτεΐνες από άλλα είδη επρόκειτο να εκφραστούν, το DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη πρέπει να κλωνοποιηθεί καθοδικά από ένα ενδογενή υποκινητή. Ένας housekeeping υποκινητής φυσιολογικά θα δώσει μια συνεχόμενη έκφραση της πρωτεΐνης. Παρ' όλα αυτά, εάν μια πρωτεΐνη είναι τοξική για την αύξηση του κυττάρου ή εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί ένας επαγόμενος υποκινητής (Abelson & Simon, 2014). Κάποια παραδείγματα P450s εντόμων που έχουν εκφραστεί σε ζύμη είναι των CYP9A12 και CYP9A14 από το Helicoverpa armigera (Yang, Yue, Chen, & Wu, 2008) και της CYP6Z8 του Aedes aegypti (Chandor-Proust et al., 2013). Και στις 3 περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ένα επαγόμενο σύστημα έκφρασης με γαλακτόζη.

1.7 Υπόβαθρο και σκοπός εργασίας.

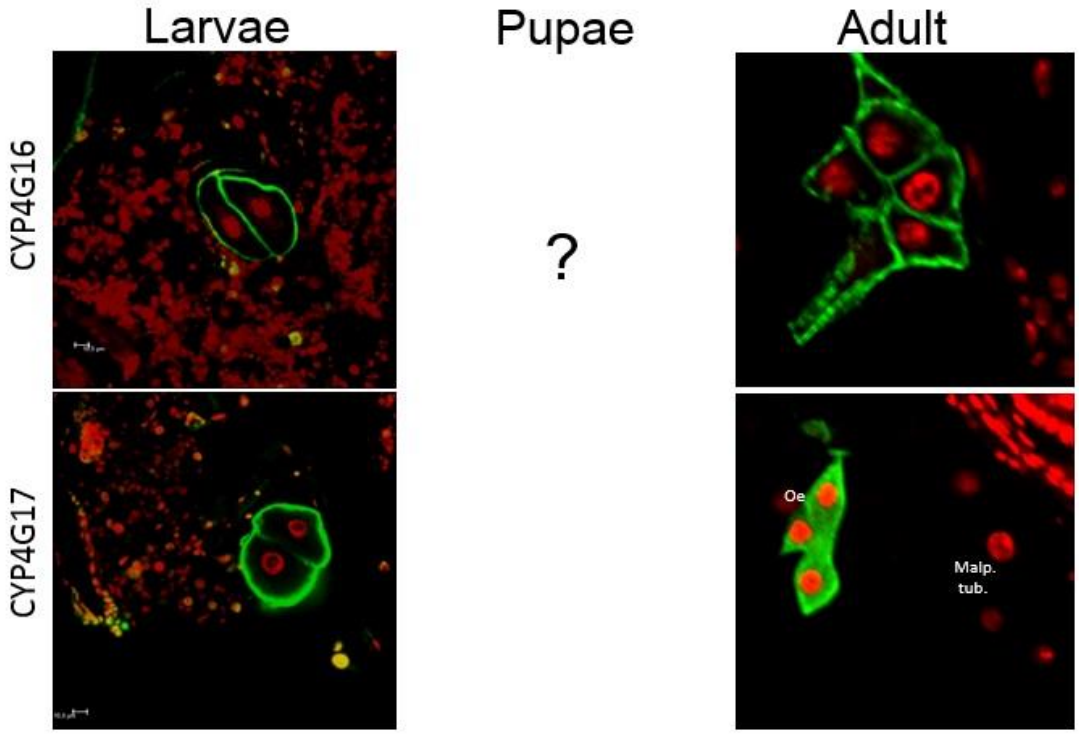
Το 2009 απομονώθηκε από ένα θερμοκήπιο με τριαντάφυλλα στην περιοχή του Μαραθώνα στην Ελλάδα ένας πληθυσμός T. urticae (Marathonas) που είχε ανθεκτικό φαινότυπο σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων. Ο συγκεκριμένος πληθυσμός διατηρήθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες παρουσία του εντομοκτόνου abamectin. Από πειράματα βιοδοκιμών που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαιώθηκε ο ανθεκτικός φαινότυπος σε μια σειρά εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων όπως τα πυρεθροειδή, οι αβαρμεκτίνες, τα METIs, οργανοτίνες κ.α. (εικόνα 12, τα πειράματα βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκαν από την Ρίγα Μ. και τον Ηλία Α.).

Chemical	RR
Abamectin	1644
Fenb Oxide	>1700
Hexyhiazox	>1500
Clofentezin	>1000
Bifenthrin	426.0
Pyridaben	320.0
Spirodiclofen	8.0
Milbemectin	34

Εικόνα 12: Αποτελέσματα βιοδοκιμών στον πληθυσμό Marathonas

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικροσυστοιχιών DNA σε συνεργασία με το εργαστήριο του Van Leewen T.. Από τα αποτελέσματα βρέθηκαν μια σειρά από ένζυμα με διαφοροποιημένη μεταγραφή μεταξύ του ανθεκτικού πληθυσμού Marathonas και ενός ευαίσθητου πληθυσμού. Τα ένζυμα αυτά εμπίπτουν στις 3 βασικές κατηγορίες ενζύμων αποτοξικοποίησης δηλαδή P450s, estereses και GSTs. Μεγαλύτερη υπερέκφραση για τις P450s βρέθηκε για τις CYP392D10, 392A11, 392D2, 392D8 και 392A16, με μεγαλύτερη έκφραση από το ευαίσθητο στέλεχος κατά 125, 80, 29.4, 29.6 και 21 φορές αντίστοιχα. Στο εργαστήριο εκφράστηκαν με επιτυχία σε E.coli οι CYP392A11 και CYP392A16 και βρέθηκε για την CYP392A11 ότι μεταβολίζει *in vitro* τα METIs ακαρεοκτόνα cyenopyrafen και fenpyroximate (Riga et al., 2015) και για την CYP392A16 ότι μεταβολίζει το abamectin (Riga et al., 2014). Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες για έκφραση των CYP392Ds σε E.coli και σε κυτταρικές σειρές εντόμων δεν είχαν κάποιο αποτέλεσμα. Σκοπός της παρούσας εργασίας όσον αναφορά αυτό το κομμάτι ήταν η έκφραση των CYP392D2, 392D8 και 392D10 σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης *Saccharomyces cerevisiae* με σκοπό τον ενζυμικό χαρακτηρισμό με την χρήση πρότυπων υποστρωμάτων και εντομοκτόνων που ενδέχεται να μεταβολίζουν αυτά τα ένζυμα *in vitro*.

Σε πειράματα μικροσυστοιχιών DNA που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι στις κοιλιές ανθεκτικών κουνουπιών υπερεκφράζονται δυο P450s της υποοικογένειας των CYP4Gs, οι CYP4G16 και CYP4G17 (Ingham et al., 2014). Για την CYP4G16 δείχθηκε ότι έχει ενεργότητα αποκαρβονηλάσης και καταλύει την τελική μετατροπή αλδεϋδών σε υδρογονάνθρακες (Balabanidou et al., 2016), οι οποίοι στη συνέχεια εναποτίθενται στην εξωτερική στιβάδα του cuticle, το epicuticle. Από πειράματα ανοσοφθορισμού φάνηκε ότι και οι δυο P450s εκφράζονται στα oenocytes, αλλά αυτό που έδειξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον ήταν ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους (εικόνα 13, (Balabanidou et al., 2016)). Η CYP4G17 σε ενήλικα κουνούπια εντοπίζεται στο ΕΔ (χαρακτηριστικός εντοπισμός για τις περισσότερες P450s) , ενώ η CYP4G16 εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, με πρροσανατολισμό προς το κυτταρόπλασμα, γεγονός που δεν έχει ξαναπαρατηρηθεί για P450s.



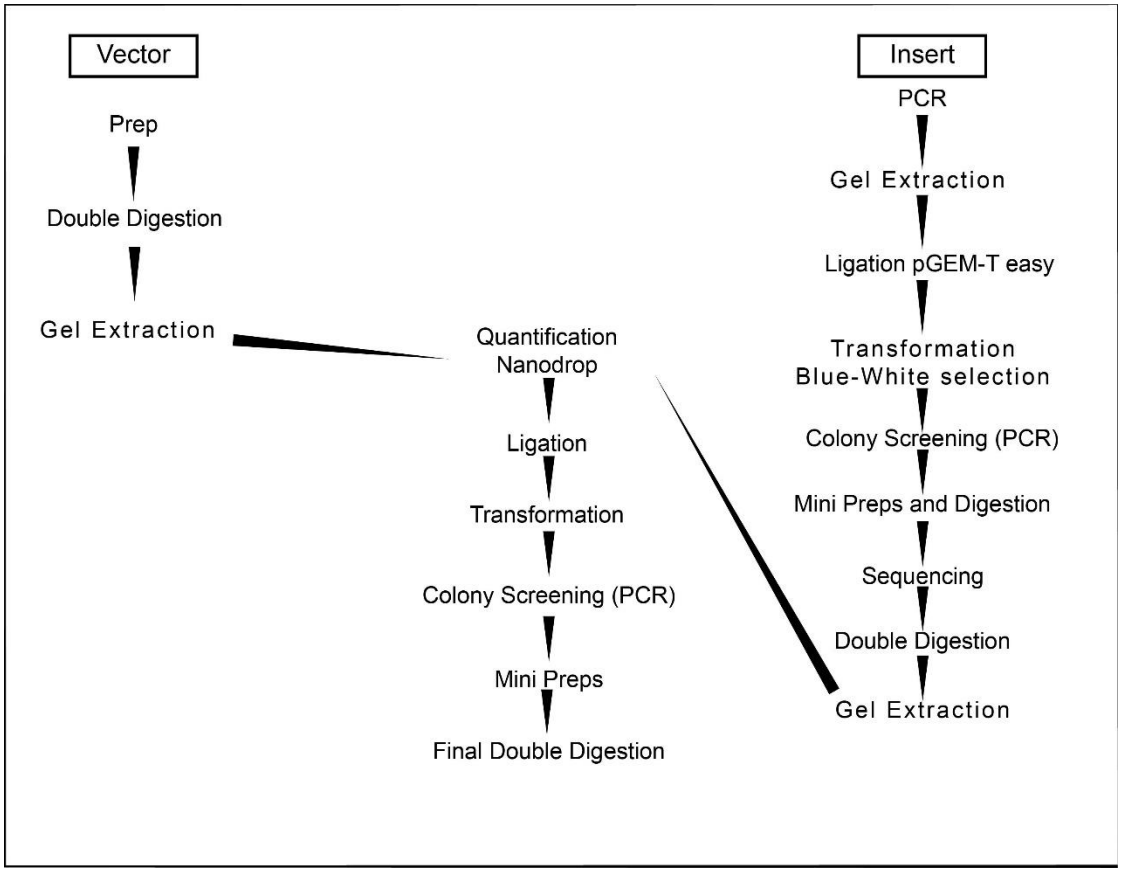
Εικόνα 13: Ανοσοεντοπισμός των CYP4G16 και CYP4G17 σε κρυοτομές ενήλικων ατόμων. Με πράσινο χρώμα έχουν βαφεί οι CYP4G16 και CYP4G17 και με κόκκινο τα νουκλεικά οξέα (Balabanidou et al., 2016). Oe: oenocytes

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκε έκφραση αυτών των δυο P450s στον οργανισμό μοντέλο *S. cerevisiae* με σκοπό να μελετηθεί ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός με πειράματα ανοσοφθορισμού και εν συνεχεία να γίνει προσπάθεια για την ταυτοποίηση του μηχανισμού που ευθύνεται για τον εντοπισμό τους στην πλασματική μεμβράνη ή το ΕΔ.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μοριακή κλωνοποίηση

Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκαν τα πλασμίδια pUTDH3myc/4G17, pUTDH3/4G17, pUTDH3myc/4G16PA, pUTDH3/4G16PA, pUTDH3myc/4G16PD1 και pUTDH3/4G16PD1. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα pHTDH3myc/AgCPR, pHTDH3myc/TuCPR, pUTDH3myc/CYP392D2, pUTDH3myc/CYP392D8 και pUTDH3myc/CYP392D10 τα οποία είχαν κατασκευαστεί στο εργαστήριο παλιότερα. Οι φορείς κλωνοποίησης pUTDH3myc και pHTDH3myc είναι κατάλληλοι για έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα ζύμης τον υποκινητή P_{TDH3} για συνεχόμενη έκφραση, myc-tag στο αμινοτελικό άκρο και μάρτυρες αυξοτροφίας για ουρακίλη και ιστιδίνη αντίστοιχα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε φαίνεται συνοπτικά στην εικόνα 14.



Εικόνα 14: Πλάνο εργασίας για την μοριακή κλωνοποίηση.

2.1.1 PCR

Για την ενίσχυση του γονιδίου στόχου και την ένθεση στα άκρα του μορίου των κατάλληλων αλληλουχιών περιορησμού πραγματοποιήθηκε PCR με κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές που φαίνονται στον πίνακα 1 και με template πλασμίδια που είχαν σχεδιαστεί για έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε E. Coli (pCWOmpA2-4G17, -4G16 PD1 και -4G16 PA). Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KAPA Taq (KK1015).

Primer name	Sequence	Restriction enzyme
1. FBUTDG17	5'- GGA TCC ATG GGC ATT GAA ACG ATC -3′	BamHI
2. FHUTDG17	5' – AAG CTT ATG GGC ATT GAA ACG ATC CC-3′	HindIII
3. REUTDG17	5' – GAA TTC TCA TGC CCT CGG CTC CAG -3′	EcoRI
4. FEUTDG16PD1	5' – GAA TTC ATG TCA GCA ACA ATT GCG -3′	EcoRI
5. FHUTDG16PD1	5' – AAG CTT ATG TCA GCA ACA ATT GCG -3′	HindIII
6. RXUTDG16PD1	5' – CTC GAG TTA ACA TAG CAT ATT TAC GTC CTG -3′	XhoI
7. FNUTDG16PA	5' – GC GG CC GC TA ATG TCA GCA ACA ATT -3′	NotI
8. FHUTDG16PA	5' – AAG CTT ATG TCA GCA ACA ATT GCG CA -3′	HindIII
9. RXUTDG16PA	5' – CTC GAG TTC ATA ATG TCT TCG ATT TGC GT -3′	XhoI

Πίνακα 1: Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Οι αντιδράσεις PCR που έγιναν ήταν οι εξείς:

Kappa Taq	0,5μl (2,5U)
10x Buffer A	5,0μl (1x)
10μM Fprimer	2,0μl (0,4μM)
10μM Rprimer	2,0μl (0,4μM)
Template	0,5μl (5ng)
10mM dNTP 's	1,0μl (0,2mM each)
ddH_2O (μέχρι τα 50 μl)	39μl

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 35 κύκλους ενίσχυσης σύμφωνα με το πρόγραμμα: **1.** T = 95ºC για 3 min, **2.** T = 95ºC για 30 sec,**3.** T = 58ºC για 30 sec,**4.** T = 72ºC για 2min,**5.** Επιστροφή στο βήμα 2 και επανάληψη των βημάτων (2-4) 34 φορές ,**6.** T = 72ºC για 2 min, **7.** Παραμονή στους 4ºC.

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

2.1.2 Gel extraction

Για την απομόνωση της επιθυμητής μπάντας είτε στην περίπτωση της PCR είτε στην πέψη του φορέα κλωνοποίησης ή του ενθέματος το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και στη συνέχεια κόπηκε η επιθυμητή μπάντα και ακολούθησε το πρωτόκολλο του gel extraction kit της QIAgen με Cat. No 28706.

2.1.3 Αντίδραση λιγάσης με το pGEM-Teasy

Για την εισαγωγή του ενθέματος στον φορέα pGEM-Teasy πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης με την T4 DNA ligase του φάγου T4 με το kit A1360 της Promega. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του insert είναι ο εξής:

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

Ο φορέας pGEM-Teasy έχει μέγεθος 3kb, τα inserts περίπου 1,7kb, το ratio insert/vector ήταν 3/1 και στην αντίδραση μπήκαν 50ng vector. Συνεπώς από τον τύπο προκύπτει ότι θα χρησιμοποιηθούν 85ng. Η αντίδραση ήταν η εξής:

Αντίδραση σύνδεσης	**Όγκος**
Insert	85ng
2X Rapid ligation buffer	5μl
pGEM-Teasy vector (50 ng)	1 μl
T4 DNA Ligase (3 weiss u/μl)	1 μl
ddH2O	$V_{τελ}$=10 μl

Αφού ετοιμαστεί η αντίδραση γίνεται επώαση για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολουθεί ο μετασχηματισμός.

2.1.4 Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli

Μετά την αντίδραση λιγάσης όλη η αντίδραση μετασχηματίζεται σε 90μl δεκτικά κύτταρα E. coli Stellar. Αρχικά γίνεται επώαση των κυττάρων μαζί με την αντίδραση λιγάσης για 30min στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ για 1min στους 42°C και επώαση στον πάγο για 5min. Έπειτα γίνεται προσθήκη 900μl LB broth και επώαση στους 37°C για 1h 250rpm. Τέλος στρώνονται σε τρυβλία Petri με agar 300μl και τα πιάτα επωάζονται για 12-16h στους 37°C. Τα τρυβλία περιέχουν 100μg/ml αμπικιλίνη, 0.5mM IPTG και 80μg/ml X-Gal.

2.1.5 PCR colony screening

Για την επιλογή θετικών αποικιών επιλέχθηκαν λευκές αποικίες από το πιάτο και κρατήθηκε αντίγραφο της κάθε αποικίας σε ένα δεύτερο τρυβλίο και τα υπόλοιπα κύτταρα στο ρυγχίο μεταφέρθηκαν σε αντιδράσεις PCR. Η αντίδραση PCR περιείχε τα εξής:

Kappa Taq	0,2μl (1U)
10x Buffer A	2,5μl (1x)
10μM Fprimer	1,0μl (0,4μM)
10μM Rprimer	1,0μl (0,4μM)
10mM dNTP 's	0,5μl (0,2mM each)
ddH_2O (μέχρι τα 25 μl)	19,8μl

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό που περιγράφηκε στην 2.1.1 με την διαφορά ότι είχε 30 κύκλους αντί για 35. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε 1%

πήκτωμα αγαρόζης και θετικές αποικίες επιλέχθηκαν για να γίνουν mini prep. Τα mini preps έγιναν με το kit της Macherey-Nagel REF 740588.250.

2.1.6 Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Ο φορέας κλωνοποίησης pUTDH3myc καθώς και τα πλασμίδια pGEM-Teasy /inserts έγιναν πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού της MINOTECH σύμφωνα με την εξής αντίδραση:

ddH_2O	Μέχρι τελικό όγκο πέψης 40μl
10x digestion buffer	4μl
BSA 1mg/ml	4μl
Plasmid	2-3μg
Restriction enzyme 1	2μl (20U)
Restriction enzyme 2	2μl (20U)

Οι πέψεις επωάστηκαν για 2-3h στους 37°C. Αναλύθηκαν σε πήκτομα αγαρόζης και έγινε gel extraction της μπάντας ενδιαφέροντος για χρήση στη συνέχεια για αντίδραση λιγάσης.

2.1.7 Αντίδραση λιγάσης με το pUTDH3myc

Τα ενθέματα και ο pUTDH3myc μετά την πέψη και το gel extraction χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση λιγάσης με την T4 DNA ligase της Promega. Οι αντιδράσεις σχεδιάστηκαν όμοια με αυτές που περιγράφηκαν στο 2.1.3 με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 100ng βέκτορα και σχεδιάστηκε για κάθε αντίδραση λιγάσης και μια αντίδραση ελέγχου όπου περιείχε τον βέκτορα αλλά όχι ένθεμα. Η επώαση των αντιδράσεων έγινε O/N στους 4°C.

Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός κυττάρων E.coli Stellar και ελέγχθηκαν με colony PCR αποικίες από το πιάτο του ligation για την ταυτοποίηση θετικών κλώνων που έχουν δεχθεί το ένθεμα. Τέλος έγινε mini preps και επιβεβαιωτικές πέψεις για κάποιους από τους θετικούς κλώνους που επιλέχθηκαν. Επίσης για κάθε πλασμίδιο που φτιάχτηκε κρατήθηκαν κατεψυγμένα μετασχηματισμένα κύτταρα στους -80°C παρουσία 40% γλυκερόλης.

2.2 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για την ανάλυση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών στα πρωτεϊνικά δείγματα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα δείγματα αρχικά φορτώθηκαν και αναλύθηκαν σε 7% πηκτώματος πολυακρυλαμίδης στα 120V. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη στα 350A για 1,5h. Η μεμβράνη μετά την ηλεκτρομεταφορά ξεπλύθηκε με TBS-T για 5min και ακολούθησε επώαση για 1h με blocking buffer (5% Milk in TBS-T). Έπειτα έγιναν 3 πλύσεις με TBS-T για 5min η κάθε μια και ακολούθησε επώαση με το πρώτο αντίσωμα O/N στους 4°C. Την δεύτερη μέρα έγιαναν 3 πλύσεις της μεμβράνης για 5min με TBS-T και επώαση για 1h με το δεύτερο αντίσωμα σε RT. Στη συνέχεια έγιναν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με TBS-T και επώαση για 3-5min με τα υγρά ECL. Τέλος έγινε η εμφάνιση σε φιλμ για διάφορους χρόνους (3sec – 30min) ανάλογα με την ένταση του σήματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Πρώτο αντίσωμα	Αραίωση πρώτου	Δεύτερο αντίσωμα	Αραίωση δεύτερου
Anti-MYC (mouse)	1/1000 σε 5%BSA	Anti-Mouse-HRP	1/5000 σε 5%Milk
Anti-4G17 (rabbit)	1/500 σε 1%Milk	Anti-Rabbit--HRP	1/10000σε 1%Milk
Anti-4G16 (rabbit)	1/500 σε 1%Milk	Anti-Rabbit--HRP	1/10000σε 1%Milk

TBS-T 1x: 150mM NaCl, 0,3% Tween-20, 20mM Tris pH7,5

2.3 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης

Το στέλεχος του S. cerevisiae που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την έκφραση των πρωτεϊνών ήταν τα AM102 (Mat a/α,P_{Gal1}-HMG2(K6R):: HOX2, ura3, trp1, his3, P_{TDH3}-HMG2(K6R)::leu2 X2, ERG9/erg9, UBC7/ubc7, SSM4/ssm4) (Ignea et al., 2012). Την πρώτη μέρα του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού γίνεται ανάπτυξη καλλιέργειας 5ml YPD κυττάρων AM102 O/N στους 30ºC στα 250rpm. Την δεύτερη μέρα ενοφθαλμίζονται 400μl O/N καλλιέργειας σε 50ml YPD (10ml για κάθε ένα μετασχηματισμό π.χ. για 5 μετασχηματισμούς 50ml καλλιέργεια) και αναπτύσσονται στους 30ºC στα 250rpm εως ότου το OD_{600} φτάσει 0,5 – 0,6. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 6000rpm για 5min RT και επανεώρηση της πελέτας σε dH_2O αποστειρωμένο. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και τα κύτταρα επανεωρούνται σε 4-5ml solution1. Γίνεται μια ακόμα φυγοκέντρηση και η πελέτα επανεωρείται σε 400μl solution1 (για κύτταρα από 50ml καλλιέργεια). Στη συνέχεια γίνεται βρασμός του Salmon Sperm DNA (SSDNA) 10mg/ml για 5min στους 90 ºC και μεταφέρετε στον πάγο. Σε κάθε transformation tube μεταφέρονται 5μl SSDNA, 1μg από το κάθε πλασμίδιο, 80μl κύτταρα που βρίσκονται στο solution1 και 350μl solution2 και ακολουθεί καλή ανάδευση. Έπειτα γίνεται επώαση για 45min στους 30ºC υπό ανακαίνιση και θερμικό σοκ για 15min στους 42 ºC. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 6000rpm για 2min RT και επανεώρηση των κυττάρων σε 150μl 1x TE. Τέλος γίνεται στρώσιμο των κυττάρων σε πιάτα με την κατάλληλη σύσταση (χωρίς κάποια θρεπτικά ανάλογα με τα πλασμίδια που εισάγονται, στην παρούσα εργασία τα πιάτα δεν είχαν ιστιδίνη και ουρακίλη) και επωάζονται για 2-3 μέρες στους 30ºC.

Solution 1	**Solution 2**	**10x TE**	**Πιάτα Glu/CM – aa για 1000ml**
2ml 10x TE	2ml 10x TE	100mM Tris-HCl pH 7,4	1,3 gr aa
2ml LiOAc 1M pH 7,8	2ml LiOAc 1M pH 7,8	10mM EDTA pH 8	6,7gr Yeast Nitrogene Base
8ml sterile ddH_2O	8ml 50% PEG 3350		20gr Glucose
			20gr Agar
			pH 5,8-6,2

10mg/ml salmon sperm DNA σε dH_2O → γίνεται sonication για 1min και φιλτράρισμα με 0,22μm φίλτρο

2.4 Παρασκευή μικροσωμάτων από κύτταρα ζύμης

Την πρώτη μέρα επωάζεται προκαλλιέργεια 6ml Glu/U,H O/N στους 30ºC 250rpm. Τα κύτταρα προέρχονται από επιλεγμένες αποικίες από πιάτο transformation ή από 25% glycerol stock που φυλάσσονται στους -80ºC. Την δεύτερη μέρα γίνεται ενοφθάλμιση καλλιέργειας 500ml Glu/U,H σε αραίωση 1/100 (5ml στα 500ml καλλιέργειας) παρουσία 1mM Aminolevulinic Acid (ALA). Η καλλιέργεια επωάζεται O/N στους 30ºC 250rpm. Την τρίτη μέρα ελέγχεται αν η καλλιέργεια έχει αναπτυχθεί αρκετά, το OD_{600} θα πρέπει να είναι 2-3 και η καλλιέργεια φυγοκεντρήται στα 6000rpm για 15min 4ºC. Τα κύτταρα επανεωρούνται σε 500ml YPD 0,5mM ALA και επωάζονται για 2h στους 30ºC 250rpm. Σε αυτό το βήμα κρατάτε δείγμα 5ml κυττάρων τα οποία φυγοκεντρούνται στα 2150g για 10min 4ºC και η πελέτα φυλάσσεται στους -80ºC με σκοπό να γίνει εξαγωγή των πρωτεϊνών(δες 2.5 Εξαγωγή πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης) και ανοσοαποτύπωση κατά western για να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών CPR και P450. Έπειτα τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 6000rpm για

15min 4ºC, επανεωρούνται σε 6ml TEK και επωάζονται για 5min σε RT. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στα 2150g για 10min 4ºC και επανεωρούνται σε 5ml TES-B (+ 1mM PMSF, +Yeast Protease Inhibitors). Μετά γίνεται προσθήκη των glass beads τα οποία δεν πρέπει να ξεπερνούν την ένδειξη 15ml σε 50ml falcon. Η διάρρηξη των κυττάρων γίνεται με ανακαίνιση για 5min στους 4ºC και vortex 2x1min με ενδιάμεση επώαση για 1min στον πάγο. Στη συνέχεια τα glass beads ξεπλένονται με 30ml TES-B και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στα 20124g για 20min 4ºC. Το υπερκείμενο που περιέχει τα μικροσώματα αραιώνεται 2 φορές με TES-B και υπερφυγοκεντρείται στα 50000rpm για 1h και 15min 4ºC. Τέλος η πελέτα που περιέχει τα μικροσώματα επαναδιαλύεται σε 600μl TEG30 (+1mM PMSF, +1x Z-Leu-Leu-Al, +10μl Yeast Protease Inhibitors).

TE : 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA
TEK : 0,1M KCl in TE
TES-B : 0,6M sorbitol in TE
TEG-30 : 30% glycerol in TE

2.5 Εξαγωγή πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης(Zhang et al., 2011)

Κύτταρα που προέρχονται από 5ml καλλιέργειας επανεωρούνται σε 1ml LiAc 2M και επωάζονται για 5min στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000g 4ºC για 1min, τα κύτταρα επανεωρούνται σε 1ml NaOH 0,4M και επωάζονται για 5min στον πάγο. Στη συνέχεια γίνεται μια ακόμα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με πριν και τα κύτταρα επανεωρούνται σε 200μl sample buffer (+5mM EDTA, 2mM PMSF και 1x protease inhibitors). Έπειτα γίνεται βρασμός των δηγμάτων για 5min στους 95ºC, φυγοκέντρηση στις 11.000g 4ºC για 1min και τέλος το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε καθαρό eppendorf. Σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αναλύονται 2,5-5μl δείγματος.

2.6 Έλεγχος των μεμβρανών για την παρουσία πρωτεΐνης P450 με τη διαφορά του φάσματος CO

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους (Omura, Tsuneo; Sato, 1964a) που έδειξαν ότι τα ανηγμένα ένζυμα P450 σχηματίζουν σύμπλοκο με το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450nm κάτι που δεν φαίνεται όταν έχεις μόνο ανηγμένο ένζυμο P450 χωρίς CO. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά η συγκέντρωση της σωστά αναδιπλωμένης P450 που υπάρχει στο δείγμα προς μελέτη (π.χ. μικροσώματα από ζύμη).

Αρχικά σε μία πλαστική κυβέτα εισάγονται 1ml από το spectrum διάλυμα (100mM Tris-HCl pH 7,4, 20% glycerol, 1mM EDTA) και πολύ μικρή ποσότητα (στη μύτη της σπάτουλας) από τον αναγωγικό παράγοντα sodium hydrosulfate που θα ανάγει το Fe^{3+} σε Fe^{2+} στο ενεργό κέντρο της P450. Στη συνέχεια στην κυβέτα προστίθενται 25-50μl μικροσώματα, αναδεύονται με ανακαίνιση και παίρνεται μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στο φάσμα 400-500nm με βήμα 2nm και γίνεται μηδενισμός (blank μέτρηση). Έπειτα διοχετεύονται φυσαλίδες CO στην κυβέτα για 45sec και πραγματοποιείται ξανά μέτρηση του φάσματος απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο.

2.7 Η δραστικότητα της πρωτεΐνης CPR από μετρήσεις της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος C στα 550nm

Στα μικροσώματα που παράχθηκαν, η εκτίμηση του περιεχομένου σε CPR έγινε από τον έλεγχο της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος C στα 550nm. Σε μια πλαστική κυβέτα τοποθετείται 1ml διαλύματος που περιέχει 50μM cytochrome C (6,6mg/10ml cytochrome C σε 0,3M potassium phosphate pH 7,7) και 10μl μικροσώματα αραιωμένα κατά 20 φορές. Στη συνέχεια μετράτε η κινητική απορρόφησης στα 550nm για περίπου 2min και μηδενίζεται. Μετά γίνεται προσθήκη 5μl διαλύματος 10mM NADPH (διαλυμένα σε νερό), ανακαινίζεται και μετράται η κινητική απορρόφησης στα 550nm για 2min. Τέλος γίνεται ο υπολογισμός της καταλυτικής ενεργότητας από την σχέση:
κατ.ενεργότητα.= Vmax x 1000 /21,4 x συγκέντρωση πρωτεΐνης

2.8 Δοκιμή πρότυπου υποστρώματος 7-ethoxyxoumarin

Τα ένζυμα P450 έχουν την ικανότητα να καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Από την πολυετή μελέτη αυτών των ενζύμων βρέθηκαν κάποια πρότυπα υποστρώματα, τα οποία υδροξυλιώνονται από αρκετά ένζυμα της υπεροικογένειας P450. Ένα από αυτά είναι και το υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin το οποίο όταν υδροξυλιώνεται παράγει ένα φθορίζον προϊόν το 7-hydroxy-coumarin το οποίο διεγείρεται στα 390nm και εκπέμπει στα 465nm. Στα πλαίσια μη χαρακτηρισμένων ενζύμων P450 γίνεται έλεγχος της ενεργότητας τους σε κάποια από αυτά τα υποστρώματα διότι αν όντος τα μεταβολίζουν in vitro είναι μια απόδειξη ότι το ένζυμο (που έχει εκφραστεί σε κάποιο ετερόλογο σύστημα έκφρασης) είναι λειτουργικό. Έτσι τυχόν αρνητικά αποτελέσματα σε in vitro δοκιμασίες με εντομοκτόνα δεν θα οφείλονται στην μη λειτουργηκότιτα του ενζύμου.
Ετοιμάζονται οι εξής αντιδράσεις:

P450 1pmole/μl	5μl	10μl	20μl
b5 50pmole/μl	1μl	2μl	4μl
NADPH 10mM	15μl	15μl	15μl
Ethoxycoumarin 20mM	5μl	5μl	5μl
0,1M sodium phosphate pH7	94μl	88μl	76μl
Total volume	120μl	120μl	120μl

Για κάθε αντίδραση ετοιμάζεται και μια με ddH_2O αντί για NADPH (negative control). Επίσης ετοιμάζονται και οι αντίστοιχες αντιδράσεις χωρίς την b5 (με και χωρίς NADPH). Οι αντιδράσεις ετοιμάζονται σε 96-well plate και επωάζονται για 30min στους 30°C στο σκοτάδι. Έπειτα ο φθορισμός του NADPH σταματάει με την προσθήκη οξειδωμένης γλουταθειόνης (GS-SG) σε τελική συγκέντρωση 2,2mM και του ενζύμου glutathione reductase (0,125 units). Μετά από 10min επώασης σε RT, η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος 70mM Tris-HCl pH8,5/Acetronitrile και ο φθορισμός μετράται με διέγερση στα 390nm κι εκπομπή στα 465nm. Τέλος βάση της πρότυπης καμπύλης που έχει γίνει με γνωστές ποσότητες 7-hydroxy-coumarin γίνεται υπολογισμός από τα fluorescent units της ποσότητας προϊόντος που έχει σχηματιστεί σε κάθε αντίδραση και αυτή διερείτε με τα pmoles p450 και με το 30min που διήρκεσε η αντίδραση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια τιμή που δείχνει πόσα pmoles 7-hydroxy-coumarin έχει σχηματιστεί ανά λεπτό ανά pmole P450.

2.9 Δοκιμή με τα πρότυπα υποστώματα Glo

Στα πλαίσια των δοκιμών με πρότυπα υποστρώματα δοκιμάστηκαν και τα υποστρώματα Glo. Αυτά τα υποστρώματα όταν υδροξυλιώνονται από κάποια P450 παράγουν φωταύγεια. Τα Glo υποστρώματα που δοκιμάστηκαν ήταν τα Luciferin – ME, -CEE, -H, -ME EGE, -H EGE, -PFBE και –PPXE. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το προτεινόμενο από την εταιρία Promega.

2.10 Μεταβολικές δοκιμές και ανάλυση με HPLC

Για να ελεγχθεί κατά πόσο οι P450s που εκφράστηκαν στη ζύμη μαζί με την TuCPR μπορούν να υδροξυλιώσουν κάποια από τα εντομοκτόνα ή ακαρεοκτόνα στα οποία είναι ανθεκτικό το στέλεχος Marathone πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταβολισμού. Σε αυτά τα πειράματα μικροσώματα που παρασκευάστηκαν από ζύμη που εκφράζει κάποια P450 και την TuCPR επωάστηκαν με εντομοκτόνα και αναγεννητικό σύστημα NADPH. Οι αντιδράσεις σχεδιάστηκαν ως εξής:

1M Tris-HCl pH7,4	14μl
Microsomes (P450 + CPR)	25pmoles P450
Ανγεννητικό σύστημα NADPH 20x	5μl
0,1mM εντομοκτόνο	20μl (τελική συγκέντρωση 20μM)
ddH_2O	Μέχρι τελικό όγκο 100μl

Το 20x αναγεννητικό σύστημα σχεδιάστηκε ως εξής:

Stock	Single reaction 5μl	20x
1M Tris-HCl pH7,4	1μl (200mM)	20μl
100mM Glucose-6-phosphate	1μl (20mM)	20μl
100mM $MgCl_2$	0,25μl (5mM)	5μl
10mM $NADP^+$	1μl (2mM)	20μl
100 U/ml Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1μl (0,1U)	20μl
ddH_2O	0,75μl	15μl

Για κάθε αντίδραση που σχεδιάζεται με αναγεννητικό σύστημα NADPH σχεδιάζεται και μια στην οποία από το αναγεννητικό σύστημα απουσιάζουν το $NADP^+$ και το ένζυμο Glucose-6-phosphate dehydrogenase (negative control). Οι αντιδράσεις επωάστηκαν στους 30^0C με ανακίνηση στις 1200 rpm για 0 και 2h. Στη συνέχεια η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ακετονιτριλίου σε αναλογία 1:1 (δηλαδή 100μl). Το δείγμα επωάστηκε για 30 επιπλέον λεπτά υπό ανακίνηση στους 30^oC. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000g για 10min και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινα φιαλίδια του HPLC.

Οι αναλύσεις στο HPLC πραγματοποιήθηκαν με κολόνα C18 και χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Από κάθε αντίδραση αναλύθηκαν τα 100μl και παράλληλα σε κάθε αντίδραση μεταβολισμού έτρεχαν και διάφορες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου για την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης. Στην περίπτωση μεταβολισμού αυτό που παρατηρείται είναι η μείωση στην ποσότητα του εντομοκτόνου καθώς και ο σχηματισμός μια άλλης κορυφής στο χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στο υδροξυλιωμένο εντομοκτόνο και εκλούεται νωρίτερα όντας πιο πολικό μόριο.

2.11 Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα ζύμης (Wei, Tsang, & Zheng, 2009; Wei & Zheng, 2009)

Την πρώτη ημέρα επωάζεται υγρή καλλιέργεια 3ml της οποίας τα κύτταρα προέρχονται είτε από glycerol stock είτε από αποικίες πιάτου transformation. Η επώαση γίνεται O/N στους 30ºC 250rpm. Την δεύτερη μέρα υγρή καλλιέργεια 11ml ενοφθαλμίζεται με 110μl (αραίωση 1/100) O/N καλλιέργειας και επωάζεται O/N στους 30ºC 250rpm. Γίνεται μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 600nm, η καλλιέργεια πρέπει να έχει OD_{600} ~1. Τα 5ml καλλιέργειας φυγοκεντρούνται στα 2000g για 5min στους 4ºC και η κυτταρική πελέτα φυλάσσεται στους -80ºC (δείγμα για western). Στα υπόλοιπα 5ml της καλλιέργειας προστίθενται 0,6ml 37% formaldehyde και επωάζονται για 90min στα 250rpm 30ºC. Στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στα 660g για 3min στους 4ºC και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 5ml κρύο Potassium Phosphate Buffer. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με πριν και επαναιώρηση των κυττάρων με 5ml κρύο Sorbitol Buffer. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1ml Sorbitol Buffer. Ακολουθεί επώαση για 5min στους 30ºC υπό ανακαίνιση και μέτρηση απορρόφησης στα 600nm με 25μl δείγματος και 975μl dH_2O. Γίνεται προσθήκη 25μl zymolyase 50mg/ml (1,25μg/ δείγμα και επώαση στους 30ºC για 2h υπό ανακαίνιση. Επαναλαμβάνεται φωτομέτρηση σε 25μl δείγματος όπως πριν, αν έχει δράσει το ένζυμο παρατηρείται μείωση στην οπτική απορρόφηση στα 600nm. Στη συνέχεια γίνονται δυο πλύσεις με 500μl κρύου Sorbitol buffer και φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 700g για 3min στους 4ºC, τελικά τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500μl Sorbitol Buffer.

Για την προετοιμασία των αντικειμενοφόρων γίνεται κάλυψη τους με poly-L-Lysine και επώαση για 10min σε RT. Ακολουθούν πέντε ξεπλύματα με ddH_2O και αφήνονται σε RT να στεγνώσουν. Σε κάθε αντικειμενοφόρο προστίθενται 150μl κυττάρων και επωάζονται για 30min σε RT. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται για 6min σε cold methanol και μετά για 30sec σε cold aceton. Αφού στεγνώσουν γίνονται πέντε πλύσεις με blocking buffer σε RT για 2min και μια έκτη για 60min. Μετά γίνεται προσθήκη των πρώτων αντισωμάτων σε κατάλληλη αραίωση (anti-4G16 1/200 και anti-AgCPR 1/500) και επωάζονται O/N στους 4ºC. Την τέταρτη μέρα γίνονται πέντε πλύσεις με blocking buffer για 2min σε RT και γίνεται προσθήκη του δεύτερου αντισώματος (anti-rabbit Alexa488 1/1000). Το δεύτερο αντίσωμα επωάζεται για 1h σε RT. Από αυτό το σημείο και στο εξής όλες οι επωάσεις γίνονται στο σκοτάδι. Έπειτα ακολουθούν πέντε πλύσεις με blocking buffer για 2min σε RT και μια πλύση με PBS1x. Οι πυρήνες βάφονται με TOPRO αραίωσης 1/1000 σε PBS1x για 10min σε RT. Ακολουθεί μια πλύση με PBS1x. Τέλος γίνεται προσθήκη μιας σταγόνας Vectashield, τοποθετείται η καλυπτρίδα και γίνεται παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

<u>Potassium phosphate buffer pH6.5 0.1M</u>
Make 0.1M KH_2PO_4 in dH_2O
Make 0.1M K_2HPO_4 in dH_2O
Add K_2HPO_4 solution to KH_2PO_4 to bring the pH at 6.5

<u>Sorbitol buffer</u> : 1.2M sorbitol in 0.1M potassium phosphate buffer pH6.5

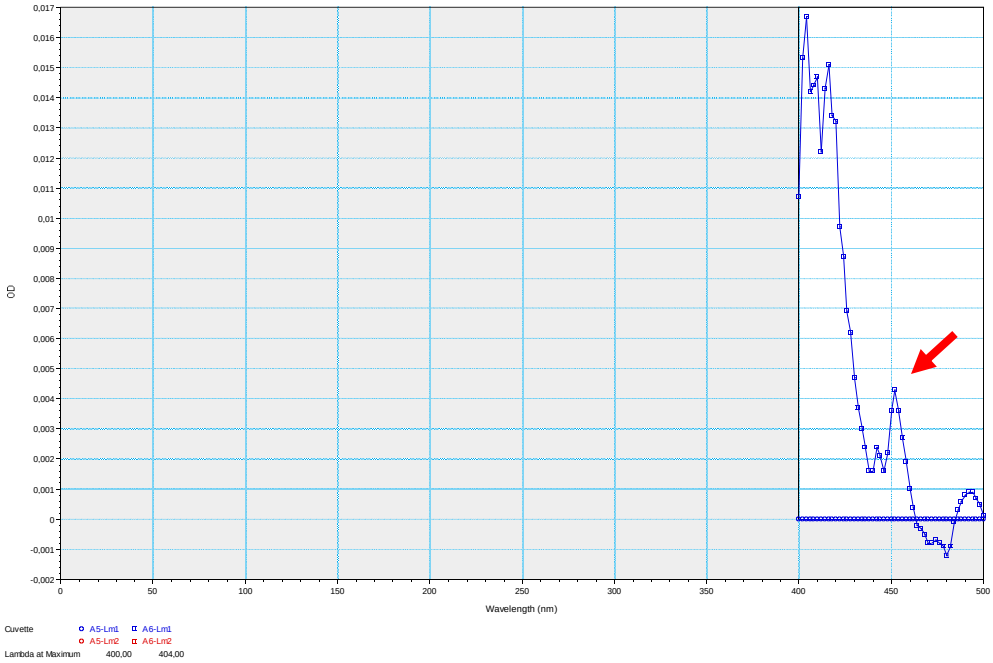
<u>Blocking buffer</u> :5% BSA in 1xPBS pH8

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έκφραση της BtCYP6CM1 στη ζύμη για έλεγχο του ετερόλογου συστήματος έκφρασης

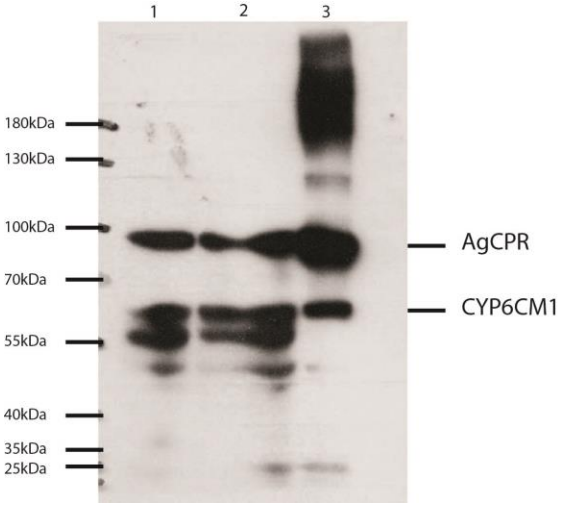
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε προσπάθεια να εκφραστούν λειτουργικά και να χαρακτηριστούν τα ένζυμα P450 του τετράνυχου, TuCYP392D2, D8 και D10, καθώς και οι CYP4G16 και CYP4G17 του Anopheles *gambiae*. Για να ελεγχθεί κατά πόσο είναι κατάλληλη η χρήση της ζύμης ως σύστημα έκφρασης ενζύμων P450 από ακάρεα και έντομα, χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου η CYP6CM1 του εντόμου Bemisia tabaci. Από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο είχε γίνει λειτουργικός χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου ενζύμου (Karunker et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, μεμβράνες που απομονώθηκαν από E. *coli* κύτταρα, οι οποίες περιείχαν το ένζυμο, βρέθηκε να μεταβολίζουν *in vitro* το εντομοκτόνο imidacloprid και επίσης να υδροξυλιώνουν το πρότυπο υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin. Συνεπώς το ένα από τα δυο assays μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να γίνει έλεγχος της λειτουργικότητας της BtCYP6CM1 η οποία όμως εκφράστηκε σε κύτταρα ζύμης.

Κύτταρα ζύμης AM102 μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια pUTDH3myc/BtCYP6CM1 και pHTDH3myc/AgCPR. Ακολούθησε έκφραση των δυο πρωτεϊνών σε καλλιέργεια 250ml Glu/U,H παρουσία 1mM ALA και απομόνωση των μικροσωμάτων. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford (συνολική συγκέντρωση πρωτεινών=19mg/ml). Η ποσότητα της P450 προσδιορίστηκε με τη διαφορά του φάσματος CO. Στην εικόνα 15 φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450nm, με βάση την οποία η συγκέντρωση της P450 προσδιορίστηκε στα 1,2μM, δηλαδή 1,2 pmoles/μl. Η επαναδιάλυση των μικροσωμάτων έγινε στα 800μl, ενώ η συνολική ποσότητα BtCYP6CM1 από 250ml καλλιέργειας ανέρχεται σε 960pmoles.



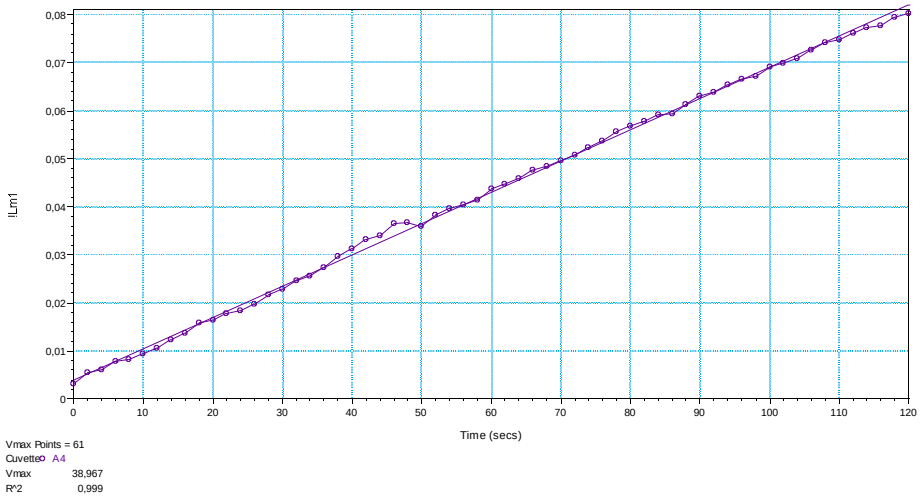
Εικόνα 15: Διαφορά του φάσματος CO για τα μικροσώματα της BtCYP6CM1. Το φάσμα CO μετρήθηκε σε 25μl μικροσωμάτων και με το βέλος φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης ενδεικτική για μια σωστά αναδιπλωμένη P450.

Για να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών BtCYP6CM1 και AgCPR, τόσο στα κύτταρα όσο και στα μικροσώματα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι του MYC-tag που φέρουν και οι δυο πρωτεΐνες στο αμινοτελικό τους άκρο. Στην εικόνα 16 φαίνεται ότι και οι δυο πρωτεΐνες έχουν εκφραστεί και υπάρχουν στα μικροσώματα (lane 3). Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη για τις δυο πρωτεΐνες είναι περίπου 60kDa για την BtCYP6CM1 και 80kDa για την AgCPR.



Εικόνα 16: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι του επιτόπου MYC για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών BtCYP6CM1 και AgCPR. 1. Total Protein Extracts από κύτταρα ζύμης μετά την έκφραση 10μl. 2. Όμοια με lane 1 αλλά 20μl. 3. Μικροσώματα BtCYP6CM1 50μg. AgCPR 80kDa και CYP392D10 60kDa.

Επιπλέον ελέγχθηκε η ενεργότητα της AgCPR με NADPH- εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος c και παρακολούθηση στα 550nm. Έτσι σε διάλυμα που περιέχει κυτόχρωμα c προστέθηκε μια μικρή ποσότητα αραιωμένων μικροσωμάτων και η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη NADPH. Τέλος από το Vmax της αντίδρασης και με τον τύπο που αναφέρθηκε στο 2.7 προσδιορίστηκε η καταλυτική ενεργότητα της AgCPR στα 1920μmoles κυτοχρώματος c/λεπτό/gr πρωτεΐνης. Στην εικόνα 17 φαίνεται η κινητική της αντίδρασης, το Vmax προσδιορίστικε στα 38,967 με R^2 =0,999.

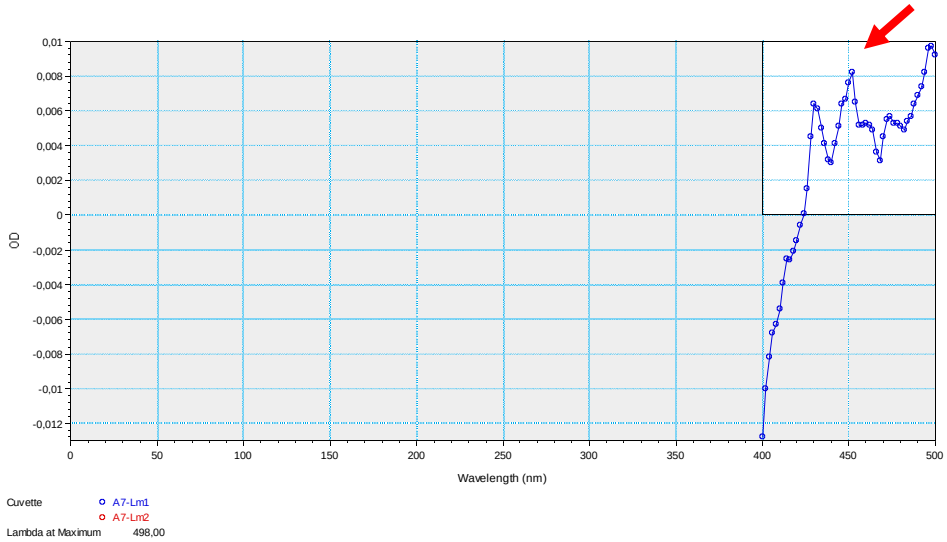


Εικόνα 17: Ενεργότητα AgCPR στα μικροσώματα BtCYP6CM1 με NADPH- εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος c στα 550nm. Vmax =38,967 και R^2 =0,999.

Τέλος για να ελεγχθεί κατά πόσον η BtCYP6CM1 που εκφράστηκε στη ζύμη είναι ενεργή πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με το πρότυπο υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με την παρουσία της πρωτεΐνης b5 σε δεκαπλάσια ποσότητα από την P450. Από αυτά τα πειράματα επιβεβαιώθηκε ότι η BtCYP6CM1 καταλύει την υδροξυλίωση του πρότυπου υποστρώματος 7-ethoxycoumarin σε 7-hydroxycoumarin με ρυθμό 0,77 pmoles 7-hydroxycoumarin/ min/pmole P450. Παρ' όλο αυτά η ενεργότητα της BtCYP6CM1 που εκφράστηκε στη ζύμη φάνηκε να είναι 2,5x μικρότερη σε σύγκριση με αυτήν από E. coli (1,92 pmoles 7-hydroxycoumarin/ min/ pmole P450). Παρά την διαφορά που παρατηρήθηκε, το γεγονός ότι τα μικροσώματα από ζύμη που εκφράζει την BtCYP6CM1 έχουν ενεργότητα είναι μια πολύ καλή ένδειξη ότι αυτό το ετερόλογο σύστημα έκφρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκφραση ενζύμων P450 από

3.2 Έκφραση της TuCYP392D2 στη ζύμη και χαρακτηρισμός της

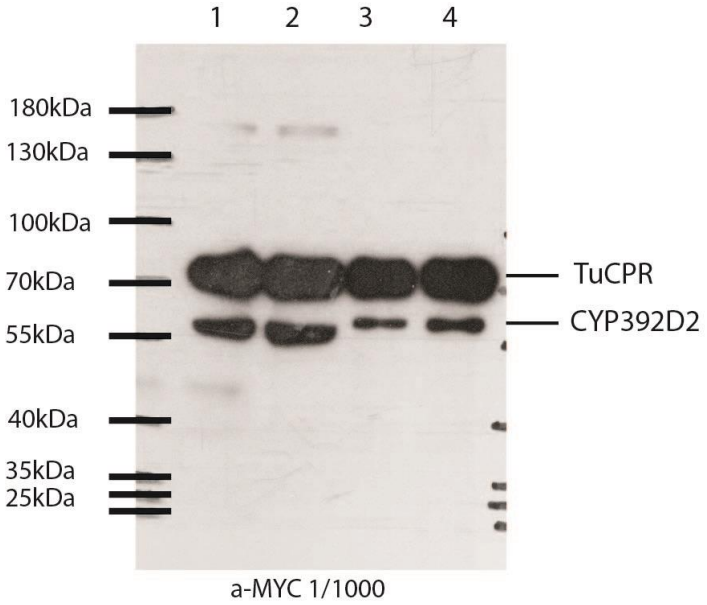
Για την έκφραση της TuCYP392D2 πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης AM102 με τα πλασμίδια pHTDH3myc/TuCPR και pUTDH3myc/CYP392D2. Καλλιέργεια 250ml Glu/U,H 1mM ALA αναπτύχθηκε O/N μέχρι το OD_{600}= 2,8 και στη συνέχεια παρασκευάστηκαν μικροσώματα από τα κύτταρα αυτά όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης στα μικροσώματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford και βρέθηκε 55mg/ml. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης P450 πραγματοποιήθηκε μέτρηση του φάσματος διαφοράς απορρόφησης αφού είχε διοχετευτεί αέριο CO. Στην εικόνα 18 φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450nm. Η συγκέντρωση της P450 προσδιορήστηκε στα 2,3μM δηλαδή 2,3pmoles/μl. Τα μικροσώματα επαναδιαλύθηκαν σε 400μl TEG30 συνεπώς από 250ml καλλιέργειας απομονώθηκαν 920pmoles CYP392D2, άρα αναλογικά έχουμε περίπου 3,5nmoles/L καλλιέργειας.



Εικόνα 18: Διαφορά του φάσματος CO για τα μικροσώματα της TuCYP392D2. Το φάσμα CO μετρήθηκε σε 25μl μικροσωμάτων και με το βέλος φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης ενδεικτική για μια σωστά αναδιπλωμένη P450. Η συγκέντρωση της P450 προσδιορίστηκε στα 2,3μM.

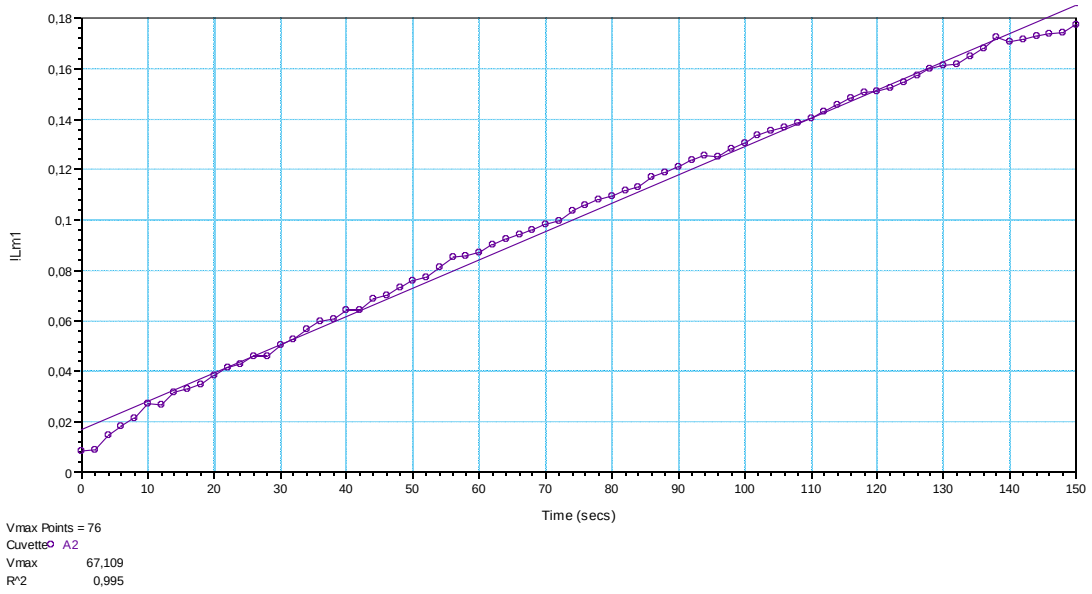
Για να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών TuCYP392D2 και TuCPR, τόσο στα κύτταρα όσο και στα μικροσώματα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι του MYC-tag που φέρουν και οι δυο πρωτεΐνες στο αμινοτελικό τους άκρο. Στην εικόνα 19 φαίνεται ότι και οι δυο πρωτεΐνες έχουν

εκφραστεί και υπάρχουν στα μικροσώματα (lane 3, 4). Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη για τις δυο πρωτεΐνες είναι περίπου 55kDa για την TuCYP392D2 και 80kDa για την TuCPR



Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι του επιτόπου MYC για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών TuCYP392D2 και TuCPR. 1. Total Protein Extracts από κύτταρα ζύμης μετά την έκφραση 2,5μl. 2. Όμοια με lane 1 αλλά 5μl. 3. Μικροσώματα TuCYP392D2 25μg. 4. Μικροσώματα TuCYP392D2 50μg. TuCPR 80kDa και CYP392D10 55kDa.

Επιπλέον έγινε έλεγχος της ενεργότητας της CPR στα μικροσώματα με την NADPH εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος c. Η καταλυτική ενεργότητα της TuCPR πσοσδιορίστηκε στα 2140μmoles κυτοχρώματος c/λεπτό/gr πρωτεΐνης. Στην εικόνα 20 φαίνεται η κινητική της αντίδρασης, το Vmax προσδιορίστηκε στα 67,11 με R^2 =0,995.



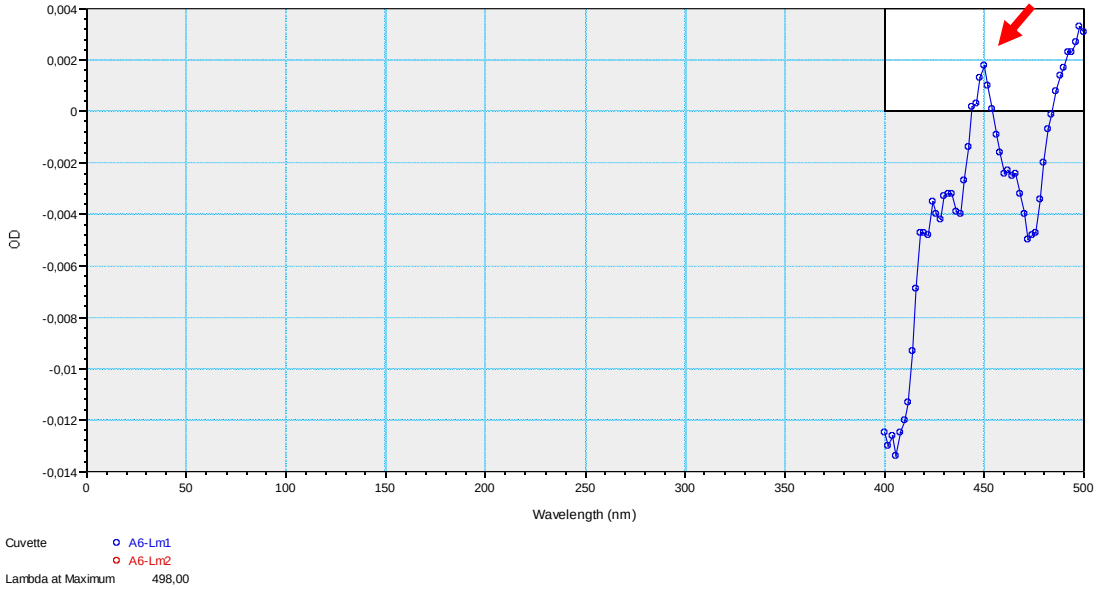
Εικόνα 20: Ενεργότητα TuCPR στα μικροσώματα TuCYP392D2 με NADPH- εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος c στα 550nm. Vmax =67,11 και R^2 =0,995.

Εφόσον στα μικροσώματα είχε ταυτοποιηθεί η έκφραση της CYP392D2 στην σωστά αναδιπλωμένη μορφή της (χαρακτηριστική κορυφή στα 450nm) και η TuCPR ήταν ενεργή δοκιμάστηκαν κατά πόσο αυτά τα μικροσώματα μπορούν να μεταβολίσουν κάποιο από τα πρότυπα υποστρώματα (7-ethoxycoumarin, Glo substrates). Η CYP392D2 βρέθηκε ότι υδοξυλιώνει το πρότυπο υπόστρωμα 7-ethoxy-coumarin αλλά όχι κάποιο από τα υποστρώματα Glo. Η ενεργότητα της βάση του ρυθμού παραγωγής του 7-hydroxycoumarin προσδιορίστηκε στα 0,21 pmoles 7-hydroxycoumarin/ min/pmole P450. Η προσθήκη 10x ποσότητας b5 σε σχέση με την P450 δεν επηρέασε την αντίδραση αλλά είχε την ίδια περίπου απόδοση.

Τέλος έγιναν πειράματα μεταβολισμού με τα μικροσώματα CYP392D2 στα εξής εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα: Pyridaben, Fenpyroximate, Tenbufenpyrad, Abamectin, Hexyhiazox, Clofentezin και Bifenthrin. Οι αντιδράσεις έγιναν με 25pmoles P450, χωρίς b5, με 20μM εντομοκτόνο για 0 και 2h. Από το συγκεκριμένο πείραμα δεν φάνηκε η CYP392D2 να μεταβολίζει κάποιο από τα εντομοκτόνα που δοκιμάστηκαν.

3.3 Έκφραση της TuCYP392D8 στη ζύμη και χαρακτηρισμός της

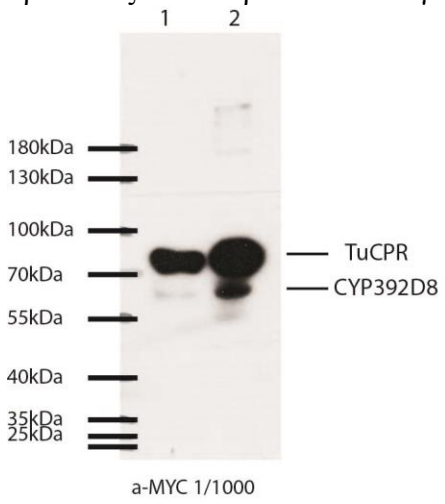
Η πρωτεΐνη TuCYP392D8 συνεκφράστηκε μαζί με την TuCPR σε κύτταρα ζύμης AM102. Καλλιέργεια 250ml Glu/U,H 1mM ALA αναπτύχθηκε O/N μέχρι το OD_{600}= 2,3 και στη συνέχεια απομονώθηκαν μικροσώματα που περιείχαν τις δυο πρωτεΐνες. Η ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης στα μικροσώματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford και βρέθηκε 67mg/ml. Η συγκέντρωση της P450 προσδιορήστηκε βάση του φάσματος απορρόφησης παρουσία CO στα 1,3μM (εικόνα 21). Τα μικροσώματα επαναδιαλύθηκαν σε 400μl TEG30 συνεπώς από 250ml καλλιέργειας απομονώθηκαν 520pmoles CYP392D8, άρα αναλογικά έχουμε περίπου 2nmoles/L καλλιέργειας.



Εικόνα 21: Διαφορά του φάσματος CO για τα μικροσώματα της TuCYP392D8. Το φάσμα CO μετρήθηκε σε 50μl μικροσωμάτων και με το βέλος φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης ενδεικτική για μια σωστά αναδιπλωμένη P450. Η συγκέντρωση της P450 προσδιορίστηκε στα 1,3μM.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι του επιτόπου MYC πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών TuCYP392D8 και

TuCPR. Στην εικόνα 22 φαίνεται ότι και οι δυο πρωτεΐνες έχουν εκφραστεί και υπάρχουν στα μικροσώματα (lane 1, 2). Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη για τις δυο πρωτεΐνες είναι περίπου 58kDa για την TuCYP392D8 και 80kDa για την TuCPR.



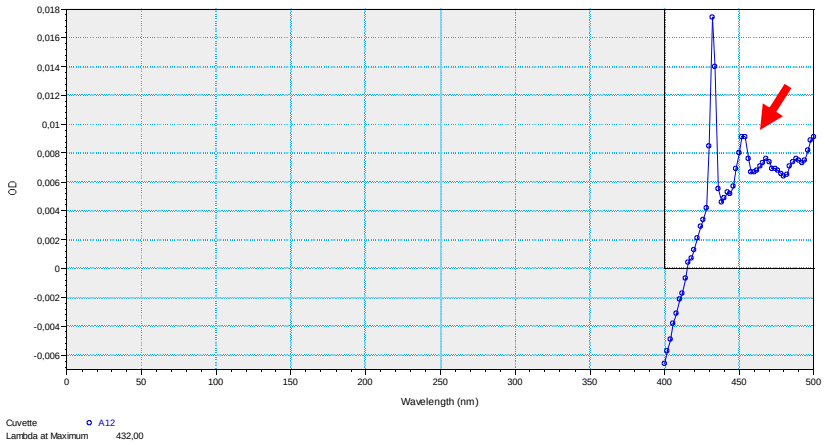
Εικόνα 22: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι του επιτόπου MYC για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών TuCYP392D8 και TuCPR. 1. Μικροσώματα TuCYP392D8 25μg. 2. Μικροσώματα TuCYP392D8 50μg. TuCPR 80kDa και CYP392D8 58kDa.

Επιπλέον έγινε έλεγχος της ενεργότητας της CPR στα μικροσώματα με την NADPH εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος c. Η καταλυτική ενεργότητα της TuCPR προσδιορίστηκε στα 1200μmoles κυτοχρώματος c/λεπτό/gr πρωτεΐνης. Το Vmax προσδιορίστηκε στα 85 με R^2 =0,99.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τα πρότυπα υποστρώματα Glo. Δοκιμάστηκαν τα υποστρώματα Luciferin –H, -ME EGE, -PPXE, -H EGE, -ME, -CEE και –PFBE με και χωρίς την παρουσία της b5 αλλά κανένα δεν αποτελεί υπόστρωμα για την CYP392D8. Τέλος σε πείραμα μεταβολισμού χωρίς την παρουσία b5 με το ακαρεοκτόνο Hexihiazox δεν παρατηρήθηκε η υδροξυλίωση του συγκεκριμένου ακαρεοκτόνου.

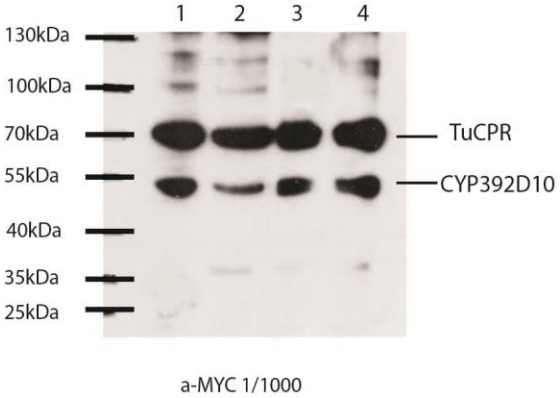
3.4 Έκφραση της TuCYP392D10 στη ζύμη και χαρακτηρισμός της

Η έκφραση της CYP392D10 έγινε σε κύτταρα ζύμης AM102 και συνεκφράστηκε με την πρωτεΐνη TuCPR. Καλλιέργεια 500ml Glu/U,H 1mM ALA επωάστηκε O/N στους 30°C και την επόμενη μέρα απομονώθηκαν μικροσώματα. Η ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης στα μικροσώματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford και βρέθηκε 50mg/ml. Η συγκέντρωση της P450 προσδιορίστηκε βάση του φάσματος απορρόφησης παρουσία CO στα 1,2μM (εικόνα 23). Τα μικροσώματα επαναδιαλύθηκαν σε 600μl TEG30 συνεπώς από 250ml καλλιέργειας απομονώθηκαν 720pmoles CYP392D10,άρα αναλογικά έχουμε περίπου 1,5nmoles/L καλλιέργειας. Επίσης παρατηρείτε και μια δεύτερη κορυφή στα 420nm ένδειξη για την παρουσία μη σωστά αναδιπλωμένης P450.



Εικόνα 23: Διαφορά του φάσματος CO για τα μικροσώματα της TuCYP392D10. Το φάσμα CO μετρήθηκε σε 25μl μικροσωμάτων και με το βέλος φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης ενδεικτική για μια σωστά αναδιπλωμένη P450. Η συγκέντρωση της P450 προσδιορίστηκε στα 1,2μM.

Επίσης η έκφραση των δυο πρωτεϊνών επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι του επιτόπου MYC που φέρουν οι δύο πρωτεΐνες στο αμινοτελικό τους άκρο. Στην εικόνα 24 φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες έχουν εκφραστεί στο πρωτεϊνικό δείγμα από κύτταρα ζύμης (lane 1, 2) και έχουν απομονωθεί στο κλάσμα των μικροσωμάτων (lane 3, 4). Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη είναι 55kDa για την CYP392D10 και 80kDa για την TuCPR.



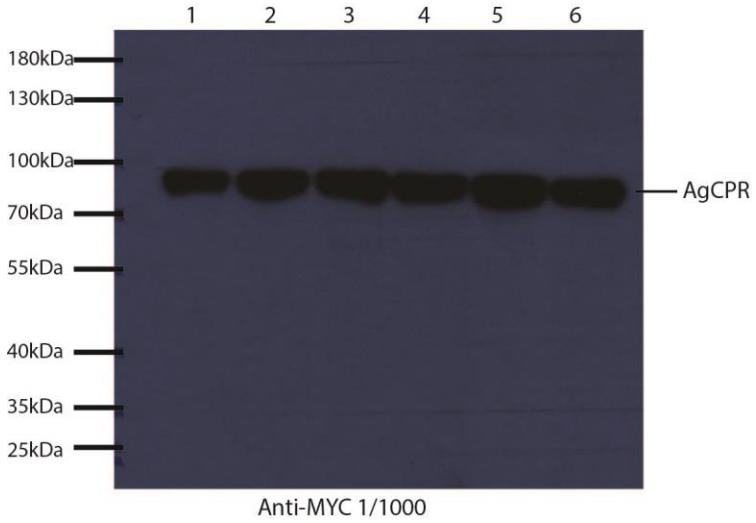
Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι του επιτόπου MYC για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών TuCYP392D10 και TuCPR. 1. Total Protein Extracts από κύτταρα ζύμης μετά την έκφραση 2,5μl. 2. Όμοια με lane 1 αλλά 5μl. 3. Μικροσώματα TuCYP392D10 25μg. 4. Μικροσώματα TuCYP392D10 50μg. TuCPR 80kDa και CYP392D10 55kDa.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της ενεργότητας CPR με την NADPH εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος c. Η καταλυτική ενεργότητα της TuCPR στα μικροσώματα προσδιορίστηκε στα 1410μmoles κυτοχρώματος c/λεπτό/gr πρωτεΐνης. Το Vmax προσδιορίστηκε στα 75,5 με R^2 =0,996.

Έπειτα δοκιμάστηκαν in vitro αντιδράσεις των μικροσωμάτων με το πρότυπο υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin με την παρουσία 10x ποσότητας b5 από την P450 και χωρίς b5. Από τα πειράματα αυτά φάνηκε ότι η CYP392D10 δεν υδροξυλιώνει το 7-ethoxycoumarin. Τέλος έγιναν πειράματα μεταβολισμού με τα ακαρεοκτόνα abamectin και fenpyroximate αλλά κανένα από τα δυο δεν αποτελεί υπόστρωμα για αυτή την P450.

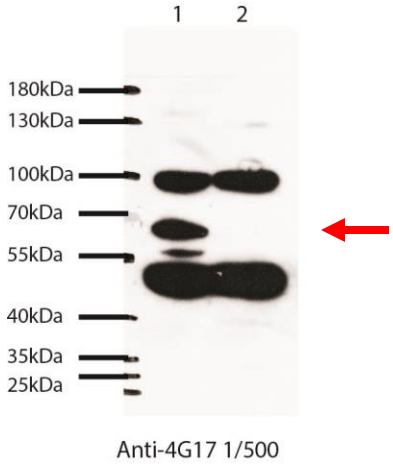
3.5 Έκφραση των AgCYP4G16 και AgCYP4G17 στη ζύμη και ανοσοεντοπισμός τους

Για να μελετηθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών CYP4G16 (και οι δυο ισομορφές PA και PD1) και CYP4G17 στη ζύμη, οι κωδικές περιοχές των γονιδίων κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pUTDH3myc με και χωρίς την αμινοτελική ετικέτα MYC (pUTDH3myc/P450 και pUTDH3/P450, αντίστοιχα). Στη συνέχεια έγινε έκφραση των πρωτεϊνών αυτών μαζί με την πρωτεΐνη AgCPR σε κύτταρα ζύμης AM102 παρουσία 1mM ALA. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι του MYC επιτόπου (εικόνα 25). Τα αναμενόμενα μοριακά βάρη είναι 80kDa για την AgCPR και 60kDa για τις P450. Φαίνεται ότι και στα έξι transformation εκφράστηκε πολύ καλά η AgCPR παρ' όλα αυτά για τις MYC-P450s (lanes 1, 3 και 5) παρατηρείτε έκφραση μόνο για τη MYC-4G16PD1 αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Οι MYC-4G17 και MYC-4G16PA δεν εκφράστηκαν καθόλου.



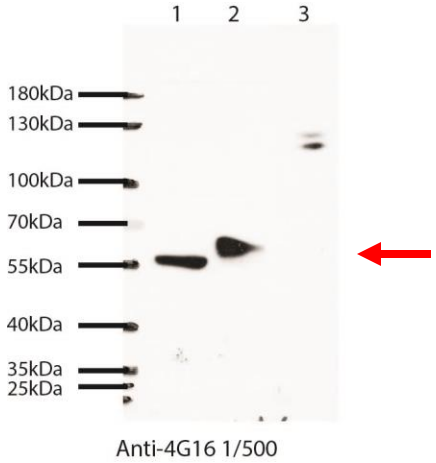
Εικόνα 25: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι του επιτόπου MYC για έλεγχο της έκφρασης των πρωτεϊνών MYC-AgCYP4G17,MYC-AgCYP4G16PD1, MYC-AgCYP4G16PA και MYC-AgCPR. 1. Total Protein Extracts (TPE) από κύτταρα ζύμης MYC-4G17 και MYC-AgCPR 5μl. 2. TPE από κύτταρα 4G17 και MYC-AgCPR 5μl. 3. TPE από κύτταρα MYC-4G16PD1 και MYC-AgCPR 5μl. 4. TPE από κύτταρα 4G16PD1 και MYC-AgCPR 5μl. 5. TPE από κύτταρα MYC-4G16PA και MYC-AgCPR 5μl. 6. TPE από κύτταρα 4G16PA και MYC-AgCPR 5μl. AgCPR 80kDa.

Με ανοσοαποτύπωση κατά Western ελέγχθηκε και η έκφραση της CYP4G17 με αντίσωμα έναντι της 4G17 (εικόνα 26). Σε κύτταρα που είχουν μετασχηματιστεί με το pUTDH3/CYP4G17 και pHTDH3/AgCPR έγινε έλεγχος της έκφρασης της CYP4G17 (lane 1) ως control δείγμα ετοιμάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα AM102 που δεν είχαν μετασχηματιστεί (lane 2). Στο lane 1 φαίνεται ξεκάθαρα η έκφραση της CYP4G17 (κόκκινο βέλος) αλλά το αντίσωμα πιάνει μη ειδικά δυο ενδογενείς πρωτεΐνες της ζύμης μια στα 50kDa και μια περίπου στα 100kDa. Συνεπώς το αντίσωμα αυτό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πειράματα ανοσοεντοπισμού της CYP4G17 στη ζύμη.



Εικόνα 26: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της πρωτεΐνης 4G17 για έλεγχο της έκφρασης της. 1. Total Protein Extracts (TPE) από κύτταρα ζύμης 4G17 και MYC-AgCPR 5μl. 2. TPE από κύτταρα AM102 που δεν έχουν μετασχηματιστεί 5μl. Το κόκκινο βέλος δείχνει το ύψος της CYP4G17. CYP4G17 58kDa.

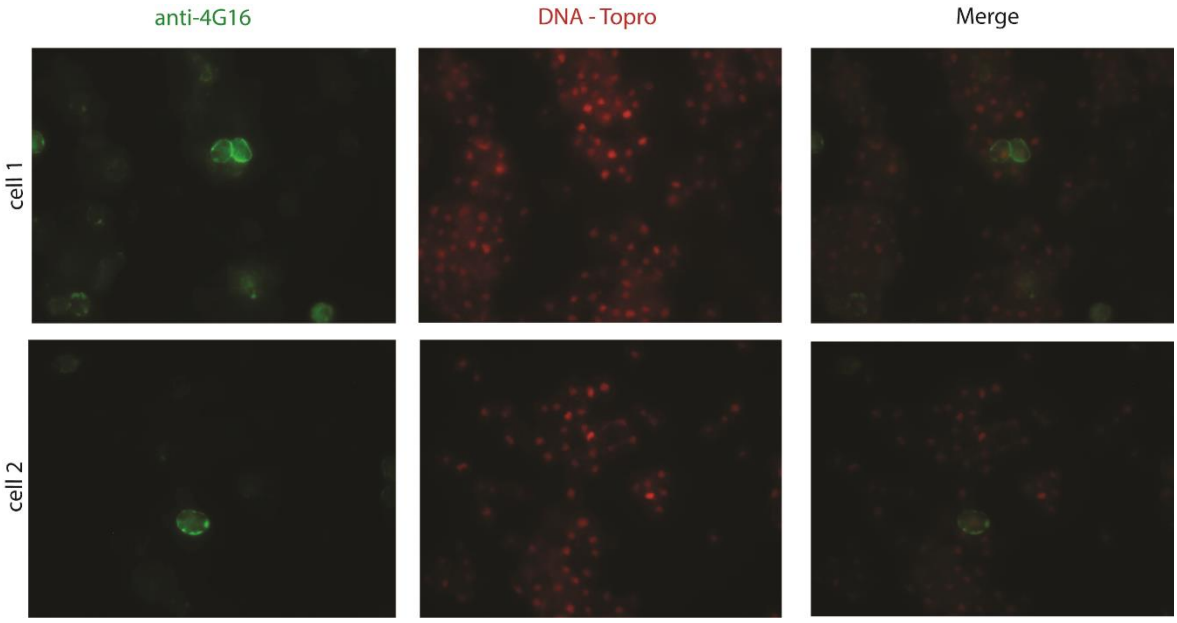
Με ανοσοαποτύπωση κατά Western ελέγχθηκε και η έκφραση της CYP4G16PD1 και CYP4G16PA με αντίσωμα έναντι της 4G16 (εικόνα 27). Σε κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί με το pUTDH3/CYP4G16PD1 και pHTDH3/AgCPR (lane 1) και pUTDH3/CYP4G16PA και pHTDH3/AgCPR (lane 2) έγινε έλεγχος της έκφρασης της CYP4G16. Ως control δείγμα ετοιμάστηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα AM102 που δεν είχαν μετασχηματιστεί (lane 3). Στο lane 1 φαίνεται ξεκάθαρα η έκφραση της CYP4G16PD1 λίγο πάνω από τα 55kDa. Η CYP4G16PA έχει επίσης εκφραστεί και τρέχει λίγο πιο ψηλά από την ισομορφή PD1 (lane 2). Το αντίσωμα δεν πιάνει μη ειδικά πρωτεΐνες της ζύμης (lane 3) συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ανοσοφθορισμού.



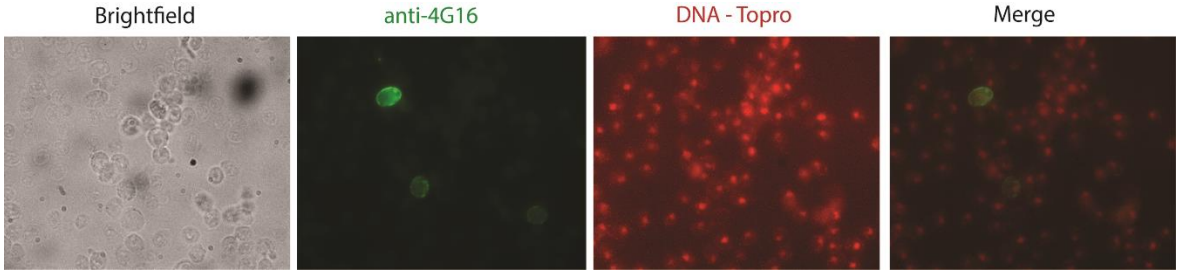
Εικόνα 27: Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της πρωτεΐνης 4G16 για έλεγχο της έκφρασης των δυο ισομορφών. 1. Total Protein Extracts (TPE) από κύτταρα ζύμης 4G16PD1 και MYC-AgCPR 5μl. 2. TPE από κύτταρα 4G16PA και MYC-AgCPR 5μl. 3. TPE από κύτταρα AM102 που δεν έχουν μετασχηματιστεί 5μl. Το κόκκινο βέλος δείχνει το ύψος των CYP4G16. CYP4G16 57kDa.

Σε κύτταρα AM102 που είχαν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια pUTDH3/CYP4G16PD1 και pHTDH3myc/AgCPR έγινε ανοσοφθορισμός με

αντίσωμα έναντι της CYP4G16. Στις εικόνες 28 και 29 φαίνεται ότι η CYP4G16PD1 εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.

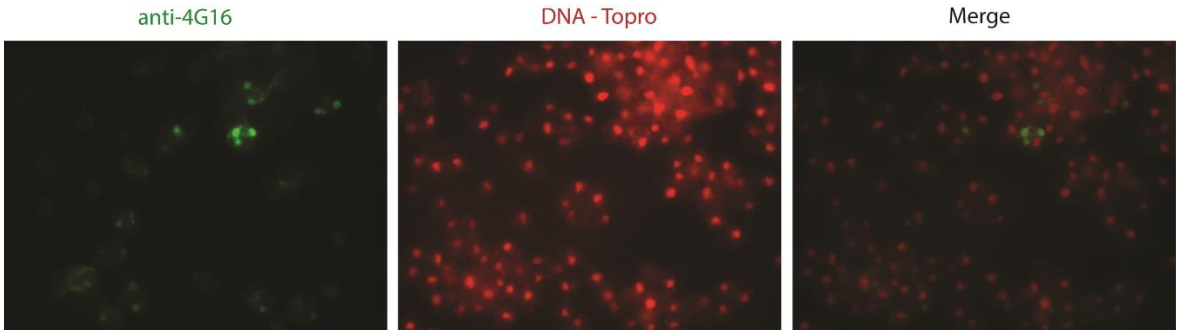


Εικόνα 28: Ανοσοαφθορισμός έναντι της πρωτεΐνης 4G16PD1 σε κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τη CYP4G16PD1 και AgCPR. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης γίνεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.

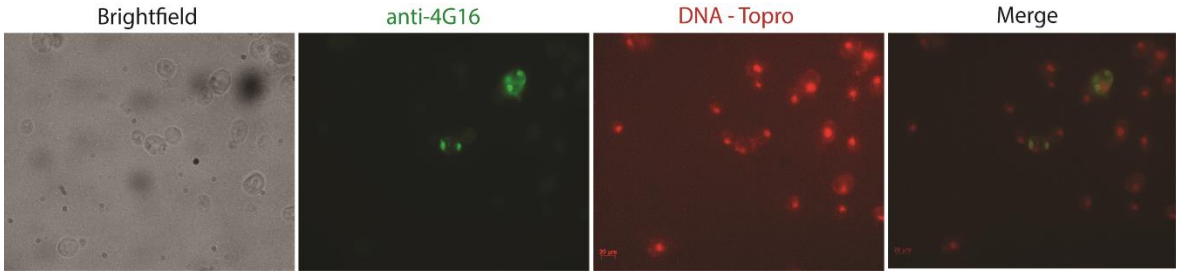


Εικόνα 29: Ανοσοαφθορισμός έναντι της πρωτεΐνης 4G16PD1 σε κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τη CYP4G16PD1 και AgCPR. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης γίνεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου.

Με το ίδιο αντίσωμα (anti-CYP4G16) πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός σε κύτταρα ζύμης που εκφράζουν την ισομορφή της CYP4G16PA (εικόνες 30 και 31). Το σήμα από αυτό το πείραμα δεν ήταν χαρακτηριστικό για μια πρωτεΐνη που εκφράζεται ούτε στην πλασματική μεμβράνη μήτε στο ΕΔ. Το σήμα προερχόταν από δυο, τρεις κυκλικές περιοχές στην περιφέρεια του κυττάρου.



Εικόνα 30: Ανοσοαφθορισμός έναντι της πρωτεΐνης 4G16PA σε κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τη CYP4G16PA και AgCPR.



Εικόνα 31: Ανοσοαφθορισμός έναντι της πρωτεΐνης 4G16PA σε κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τη CYP4G16PA και AgCPR.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια λειτουργικής έκφρασης και χαρακτηρισμού τριών ενζύμων P450 του T. urticae. Αυτές οι P450 είναι οι CYP392D2, CYP392D8 και CYP392D10, οι οποίες βρέθηκαν ότι υπερεκφράζονται σε ανθεκτικό στέλεχος T. *urticae* που απομονώθηκε από ένα θερμοκήπιο στην περιοχή του Μαραθώνα. Από βιοδοκιμές που έγιναν φάνηκε ότι αυτό το στέλεχος είναι ανθεκτικό σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων με εξαίρεση τις κετοενόλες. Στο παρελθόν έγινε προσπάθεια έκφρασης αυτών των ενζύμων στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης E. *coli* αλλά χωρίς επιτυχία. Έτσι στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκε να γίνει έκφραση αυτών των ενζύμων μαζί με τον αναγωγάση CPR, σε κύτταρα ζύμης. Για την αξιολόγηση του συστήματος έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη ελέγχου CYP6CM1 από την B. *Tabaci*, μια καλά χαρακτηρισμένη P450, με γνωστή καταλυτική ενεργότητα και υποστρώματα.

Η BtCYP6CM1 εκφράστηκε με επιτυχία στο στέλεχος ζύμης AM102 καθώς και στα απομονωμένα μικροσώματα. Πιο συγκεκριμένα, τα μικροσώματα είχαν την χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 450nm παρουσία CO, ένδειξη μιας σωστά αναδιπλωμένης P450. Ελέγχθηκε επίσης η ενεργότητα της CPR, που συνεκφράστηκε μαζί με την P450, μέσω της NADPH- εξαρτώμενης αναγωγής του κυτοχρώματος c. Αφού επιβεβαιώθηκε και η ενεργότητα της CPR έγινε *in vitro* δοκιμή με το πρότυπο υπόστρωμα 7-ethoxycoumarin. Ως πείραμα ελέγχου έγινε το αντίστοιχο πείραμα με μεμβράνες E. *coli* που είχαν εκφράσει τη BtCYP6CM1. Από τα πειράματα αυτά επιβεβαιώθηκε η ενεργότητα της BtCYP6CM1 που εκφράστηκε σε κύτταρα ζύμης με καταλυτική ενεργότητα 0,77 pmoles 7-hydroxycoumarin/ min/pmole P450, 2,5x μικρότερη από την ενεργότητα του πειράματος ελέγχου. Αυτή η μεγάλη φαινομενικά διαφορά μπορεί να οφείλεται και στην μη ακριβή ποσοτικοποίηση της P450 μέσω της χαρακτηριστικής κορυφής στα 450nm. Αυτό το πείραμα απέδειξε ότι η ζύμη που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της BtCYP6CM1 είναι ένα καλό σύστημα για την έκφραση ενζύμων P450 εντόμων.

Στις ίδιες συνθήκες που εκφράστηκε η BtCYP6CM1 εκφράστηκαν οι CYP392D2, CYP392D8 και CYP392D10 του T. urticae. Όσον αναφορά την CYP392D2 τα μικροσώματα έδωσαν το χαρακτηριστικό Soret peak και η CPR κατέλυε την NADPH- εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος C. Από την δοκιμή διάφορων πρότυπων υποστρωμάτων βρέθηκε ότι η CYP392D2 υδροξυλιώνει το 7-ethoxycoumarin με ρυθμό 0,21 pmoles 7-hydroxycoumarin/ min/pmole P450. Συνεπώς η CYP392D2 που εκφράστηκε στη ζύμη είναι ενεργή και δοκιμάστηκαν περαιτέρω μια σειρά εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων σε πειράματα in vitro μεταβολισμού. Κανένα όμως από τα εντομοκτόνα που δοκιμάστηκαν δεν αποτελεί υπόστρωμα για την CYP392D2, στις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα. Συνεπώς ενώ η CYP392D2 υπερεκφράζεται στο ανθεκτικό στέλεχος από το Μαραθώνα σε σχέση με το ευαίσθητο London στέλεχος, δεν φαίνεται να συνεισφέρει στον ανθεκτικό φαινότυπο μεταβολίζοντας κάποιο από τα παραπάνω εντομοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας αυτής.

Τα μικροσώματα από τις CYP392D8 και CYP392D10 έδωσαν τη χαρακτηριστική Soret κορυφή και παράλληλα η TuCPR ήταν ενεργή. Επομένως δοκιμάστηκαν κάποια πρότυπα υποστρώματα αλλά κανένα δεν μεταβολίστηκε και συνεπώς δεν υπήρχε κάποια ένδειξη για το αν αυτές οι δυο P450 ήταν ενεργές. Παρόλο αυτά έγιναν κάποια in vitro πειράματα μεταβολισμού. Για την CYP392D8 δοκιμάστηκε το ακαρεοκτόνο Hexihiazox και για την CYP392D10 τα ακαρεοκτόνα abamectin και fenpyroximate αλλά χωρίς να δώσουν κάποιο μεταβολίτη. Μελλοντικά

θα μπορούσε να δοκιμαστούν και άλλα πρότυπα υποστρώματα για να ελεγχθεί η ενεργότητα των ενζύμων καθώς και να γίνουν και πειράματα μεταβολισμού με άλλα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα στα οποία είναι ανθεκτικό το στέλεχος του Μαραθώνα.

Το δεύτερο τμήμα της παρούσας εργασίας αφορούσε την έκφραση και τον ανοσοεντοπισμό τριών ενζύμων P450 του An. *gambiae*, των δυο ισομορφών της CYP4G16 και της CYP4G17, σε κύτταρα ζύμης. Τα δυο αυτά ένζυμα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των υδρογονανθράκων του epicuticle. Για την CYP4G16 έχει δειχθεί ότι έχει ενεργότητα αποκαρβονηλάσης και μετατρέπει αλδεΰδες σε υδρογονάνθρακες, όμοια ενεργότητα με την περίπτωση της CYP4G1 στην D. *melanogaster*. Σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε ενήλικα άτομα η CYP4G16 εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των oenocytes ενώ η CYP4G17 στο ΕΔ των oenocytes στα ενήλικα άτομα. Ο εντοπισμός ενζύμων P450 αποκλειστικά στην πλασματική μεμβράνη είναι κάτι πρωτοφανές αφού η πλειοψηφία αυτών των ενζύμων εντοπίζεται στο ΕΔ. Υπάρχουν παραδείγματα εντοπισμού P450 θηλαστικών στην πλασματική μεμβράνη αλλά μόνο ένα μικρό κλάσμα της συνολικής πρωτεΐνης εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και το μεγαλύτερο μέρος βρίσκεται στο ΕΔ, ένα παράδειγμα είναι η CYP2E1 που μόλις το 2% της συνολικής πρωτεΐνης εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και η υπόλοιπη στο ΕΔ. Μάλιστα αυτό το 2% έχει αντίθετο προσανατολισμό με την καταλυτική επικράτεια να βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Για αυτό θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον να μελετηθεί ο μηχανισμός της στόχευσης της CYP4G16 στην πλασματική μεμβράνη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ζύμη ως οργανισμός μοντέλο για την έκφραση και μελέτη του εντοπισμού αυτών των δυο P450.

Και οι δυο ισομορφές της CYP4G16 εκφράστηκαν με επιτυχία στο στέλεχος AM102. Η ισομορφή PD1 εντοπίστηκε κυρίως στην περιφέρεια των κυττάρων ζύμης, πολύ πιθανά συνδεδεμένη στην πλασματική μεμβράνη. Ο εντοπισμός αυτός στην ζύμη συμπίπτει με τον αντίστοιχο στα oenocytes του An. *gambiae*. Η δεύτερη ισομορφή PA εντοπίστηκε σε δυο με τρεις κυκλικές περιοχές του κυττάρου, μάλλον προς την περιφέρεια χωρίς όμως αυτές να ταυτοποιηθούν. Συνεπώς για την περίπτωση της ισομορφής PD1 θα μπορούσε να δημιουργηθούν χιμαιρικές πρωτεΐνες για την ταυτοποίηση της περιοχής που είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη. Είναι γνωστό για πολλές P450 ότι το υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο αποτελεί ταυτόχρονα αλληλουχία οδηγός για το ΕΔ και σήμα συγκράτησης στο ΕΔ. Ως μελλοντικό πείραμα θα μπορούσε να σχεδιαστεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη που θα φέρει το υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο της CYP4G16PD1 (1-44aa) και μια κυτταροπλασματική διαλυτή πρωτεΐνη (π.χ. κάποια GST). Ως πρωτεΐνη ελέγχου θα έπρεπε να σχεδιαστεί αντίστοιχα μια χιμαιρική πρωτεΐνη που να φέρει το αμινοτελικό υδρόφοβο άκρο μιας P450 που εντοπίζεται στο ΕΔ και την ίδια πρωτεΐνη που θα χρησιμοποιηθεί στην προηγούμενη χίμαιρα (πχ κάποια GST). Η πρωτεΐνη ελέγχου αν ο εντοπισμός της δεν επηρεαστεί από τη GST θα πρέπει να βρίσκεται στο ΕΔ.

Η CYP4G17 εκφράστηκε με επιτυχία αλλά λόγω του ότι το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε έναντι της P450 αναγνώριζε και δυο ενδογενείς πρωτεΐνες της ζύμης δεν χρησιμοποιήθηκε για πειράματα ανοσοφθορισμού. Μια πιθανή λύση θα ήταν να εκφραστεί στη ζύμη η χίμαιρα CYP4G17-GFP έτσι ώστε να γίνει δυνατή η παρακολούθηση της CYP4G17 στα κύτταρα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abelson, J. N., & Simon, M. I. (2014). *Methods in Enzymology*.

Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., … Vontas, J. (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(33), 201608295. http://doi.org/10.1073/pnas.1608295113

Bass, C., & Field, L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Management Science*, *67*(8), 886–890. http://doi.org/10.1002/ps.2189

Becker, Norbert; Petric, Dusan; Zgomba, Marija; Boase, Clive; Madon, Minoo; Dahl, Christine; Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control* (Second Edi).

Bousema, T., Okell, L., Felger, I., & Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(12), 833–840. http://doi.org/10.1038/nrmicro3364

Bretschneider, T., Benet-Buchholz, J., Fischer, R., & Nauen, R. (2003). Spirodiclofen and spiromesifen - Novel acaricidal and insecticidal tetronic acid derivatives with a new mode of action. *Chimia*, *57*(11), 697–701. http://doi.org/10.2533/000942903777678588

Chandor-Proust, A., Bibby, J., Régent-Kloeckner, M., Roux, J., Guittard-Crilat, E., Poupardin, R., … David, J.-P. (2013). The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochemical Journal*, *455*(1), 75–85. http://doi.org/10.1042/BJ20130577

Chung, H., & Carroll, S. B. (2015). Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *BioEssays*, 822–830. http://doi.org/10.1002/bies.201500014

David, J., Ismail, H. M., Chandor-proust, A., Ingraham, M. J., David, J., Ismail, H. M., … Paine, I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance : impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth Role of cytochrome P450s in insecticide resistance : impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecti.

Demaeght, P. (2015). *A genomic approach to investigate resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*.

Demaeght, P., Dermauw, W., Tsakireli, D., Khajehali, J., Nauen, R., Tirry, L., … Van Leeuwen, T. (2013). Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetronic acids in Tetranychus urticae: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(6), 544–54. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.007

Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbić, M., Tirry, L., … Vontas, J. (2012). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of Tetranychus urticae: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(7), 455–465. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.002

Dermauw, W., Wybouw, N., Rombauts, S., Menten, B., Vontas, J., Grbic, M., … Van Leeuwen, T. (2013). A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite Tetranychus urticae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(2), E113–E122. http://doi.org/10.1073/pnas.1213214110

Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate*

Neuroscience, *7*(1), 17–30. http://doi.org/10.1007/s10158-006-0036-9
Drakeley, C., Sutherland, C., Bousema, J. T., Sauerwein, R. W., & Targett, G. A. T. (2006). The epidemiology of Plasmodium falciparum gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends in Parasitology*, *22*(9), 424–430. http://doi.org/10.1016/j.pt.2006.07.001
Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, *14*(1), 3–8. http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x
Feyereisen, R. (2005). Insect cytochrome P450. *Comprehensive Molecular Insect Science. Volume Four. Biochemistry and Molecular Biology.*, *4*, 1–77.
Ffrench-Constant, R. H. (2013). The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*, *194*(4), 807–815. http://doi.org/10.1534/genetics.112.141895
Ffrench-Constant, R. H., Daborn, P. J., & Le Goff, G. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*, *20*(3), 163–170. http://doi.org/10.1016/j.tig.2004.01.003
Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, *87*, 245–254. http://doi.org/10.1289/ehp.9087245
Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *34*(7), 653–665. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018
Hemingway, J., & Ranson, H. (2000). I Nsecticide R Esistance in I Nsect V Ectors of H Uman D Isease. *Annual Review of Entomology*, *45*, 371–391.
Ignea, C., Trikka, F. A., Kourtzelis, I., Argiriou, A., Kanellis, A. K., Kampranis, S. C., & Makris, A. M. (2012). Positive genetic interactors of HMG2 identify a new set of genetic perturbations for improving sesquiterpene production in Saccharomyces cerevisiae. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 162. http://doi.org/10.1186/1475-2859-11-162
Ingham, V. A., Jones, C. M., Pignatelli, P., Balabanidou, V., Vontas, J., Wagstaff, S. C., … Ranson, H. (2014). Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in Anopheles gambiae: known and novel candidate genes. *BMC Genomics*, *15*(1), 1018. http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1018
Karunker, I., Morou, E., Nikou, D., Nauen, R., Sertchook, R., Stevenson, B. J., … Vontas, J. (2009). Structural model and functional characterization of the Bemisia tabaci CYP6CM1vQ, a cytochrome P450 associated with high levels of imidacloprid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(10), 697–706. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.08.006
Lewis, D. (2001). *Cytochromes P450 Structure and Function*.
Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol*, *52*, 231–53. http://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104
Liu, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, *60*(1), 537–559. http://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828
Liu, N., Li, M., Gong, Y., Liu, F., & Li, T. (2015). Cytochrome P450s - Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *120*, 77–81. http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.006
Lümmen, P. (2007). Mitochondrial electron transport complexes as biochemical target sites for insecticides and acaricids. In *Insecticides Design Using Advanced Technologies* (pp. 197–215). http://doi.org/10.1007/978-3-540-46907-0_8

Makki, R., Cinnamon, E., & Gould, A. P. (2014). The development and functions of oenocytes. *Annual Review of Entomology*, *59*, 405–425. http://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162056

Monier, S., Van Luc, P., Kreibich, G., Sabatini, D. D., & Adesnik, M. (1988). Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology*, *107*(2), 457–470.

Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012). The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *107*(4), 437–449. http://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001

Muirhead-Thomson, R. C. (1954). Factors determining the true reservoir of infection of Plasmodium falciparum and Wuchereria bancrofti in a West African village. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *48*(3), 208–225. http://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90067-X

Neve, E. P. A., & Ingelman-Sundberg, M. (2000). Molecular basis for the transport of cytochrome P450 2E1 to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 17130–17135. http://doi.org/10.1074/jbc.M000957200

Neve, E. P. a, & Ingelman-Sundberg, M. (2008). Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *392*(6), 1075–1084. http://doi.org/10.1007/s00216-008-2200-z

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

Omura, Tsuneo; Sato, R. (1964b). The Carbon Monxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, *239*(7), 2370–2378. Retrieved from http://www.jbc.org/content/239/7/2370.short

Ozalp, C., Szczesna-skorupa, E., & Kemper, B. (2005). Bimolecular fluorescence complementation analysis of cytochrome p450 2c2, 2e1, and NADPH-cytochrome p450 reductase molecular interactions in living cells. *Drug Metab Dispos*, *33*(9), 1382–1390. http://doi.org/10.1124/dmd.105.005538.steps

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

Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T, Taquet N, Blomquist G, F. R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *PNAS*, *109*(37), 14858–14863. http://doi.org/10.1073/pnas.1208650109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1208650109

Riga, M., Myridakis, A., Tsakireli, D., Morou, E., Stephanou, E. G., Nauen, R., … Vontas, J. (2015). Functional characterization of the Tetranychus urticae CYP392A11, a cytochrome P450 that hydroxylates the METI acaricides cyenopyrafen and fenpyroximate. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *65*, 91–99. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.004

Riga, M., Tsakireli, D., Ilias, a, Morou, E., Myridakis, a, Stephanou, E. G., … Vontas, J. (2014). Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in Tetranychus urticae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *46*, 43–53. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.01.006

Sato, T., Sakaguchi, M., Mihara, K., & Omura, T. (1990). The amino-terminal structures that determine topological orientation of cytochrome P-450 in microsomal membrane. *Embo J.*, *9*(8), 2391–7. Retrieved from

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Scott, J. G. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *29*(9), 757–777. http://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00038-7

Seliskar, M., & Rozman, D. (2007). Mammalian cytochromes P450-Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1770*(3), 458–466. http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.016

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., … Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 5–34. http://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y

Stumpf, N., & Nauen, R. (2001). Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, *94*(6), 1577–1583. http://doi.org/10.1603/0022-0493-94.6.1577

Szczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C. D., Doray, B., & Kemper, B. (1995). The cytoplasmic and N-terminal transmembrane domains of cytochrome P450 contain independent signals for retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(41), 24327–24333. http://doi.org/10.1074/jbc.270.41.24327

Szczesna-Skorupa, E., Chen, C.-D. D., Rogers, S., Kemper, B., & Emper, B. Y. K. (1998). Mobility of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(25), 14793–14798. http://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14793

Szczesna-skorupa, E., & Kemper, B. (2008). Infl uence of protein – protein interactions on the cellular localization of cytochrome P450, 123–136.

Szczesna-Skorupa, E., & Kemper, B. (2006). BAP31 is involved in the retention of cytochrome P450 2C2 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 4142–4148. http://doi.org/10.1074/jbc.M509522200

Szczesna-Skorupa, E., Mallah, B., & Kemper, B. (2003). Fluorescence resonance energy transfer analysis of cytochromes P450 2C2 and 2E1 molecular interactions in living cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(33), 31269–31276. http://doi.org/10.1074/jbc.M301489200

Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R., & Dermauw, W. (2015). The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *121*, 12–21. http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.009

Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., & Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(8), 563–572. http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.008

Van Pottelberge, S. (2008). *Mechanisms and impact of acaricide resistance in strains of Tetranychus urticae: a genetic, biochemical and biological approach*.

Wei, Y., Tsang, C. K., & Zheng, X. F. S. (2009). Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *The EMBO Journal*, *28*(15), 2220–2230. http://doi.org/10.1038/emboj.2009.179

Wei, Y., & Zheng, X. F. S. (2009). Sch9 partially mediates TORC1 signaling to control ribosomal RNA synthesis. *Cell Cycle*, *8*(24), 4085–4090.

http://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell
Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, *1*(6), REVIEWS3003. http://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003
WHO, W. H. O. (2016). *World Malaria Report*.
Wolstenholme, a J., & Rogers, a T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, *131 Suppl*, S85–S95. http://doi.org/10.1017/S0031182005008218
Yang, Y., Yue, L., Chen, S., & Wu, Y. (2008). Functional expression of Helicoverpa armigera CYP9A12 and CYP9A14 in Saccharomyces cerevisiae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *92*(2), 101–105. http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.07.001
Zhang, T., Lei, J., Yang, H., Xu, K., Wang, R., & Zhang, Z. (2011). An improved method for whole protein extraction from yeast Saccharomyces cerevisiae. *Yeast (Chichester, England)*. http://doi.org/10.1002/yea

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα κατ' αρχή να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Ιωάννη Βόντα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία στο εργαστήριο του. Ιδιαίτερη ήταν η βοήθεια και καθοδήγηση που είχα από την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Βασιλεία Μπαλαμπανίδου και γι' αυτό την ευχαριστώ πολύ. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την τεχνικό του εργαστηρίου Δήμητρα Τσακιρέλη για την βοήθεια και την επίδειξη αρκετών από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και την συνεργασία που υπήρχε. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.