Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

Πτυχιακή εργασία

Θέμα: Ενθετική μεταλλαξιγένεση στη *Drosophila melanogaster* για τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης του εντομοκτόνου diflubenzuron

Υπεύθυνος καθηγητής: Βόντας Ιωάννης

Supervisor: Παυλίδη Νένα

Προπτυχιακός φοιτητής: Κατσούλης – Δημητρίου Κωνσταντίνος

Περίληψη:

Τα εντομοκτόνα είναι πολύ σημαντικά για την καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σ' αυτά αποτελεί μεγάλο πρόβλημα. Η διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης και των μοριακών στόχων των εντομοκτόνων θα μπορούσε να βοηθήσει την βελτίωση των σκευασμάτων αυτών. Η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης του diflubenzuron, με τη χρήση ενθετικής μεταλλαξιγένεσης, που βασίζεται σε ένα σύστημα του μεταθετού στοιχείου *Minos* για χρήση στη *Drosophila melanogaster*. Κατά τη διάρκεια του ελέγχου το εντομοκτόνο diflubenzuron χρησιμοποιήθηκε ως μέσο επιλογής σε συγκέντρωση 3ppm. Ωστόσο, παρόλο που καλύφθηκε ένα ποσοστό ~4.6% του γονιδιώματος, κανένα απ' τα γονίδια που χτυπήθηκαν δεν εμπλέκονταν στην ανθεκτικότητα και το πείραμα θα μπορούσε να επαναληφθεί.

Λέξεις κλειδιά: Ενθετική μεταλλαξιγένεση, *Minos,* ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, *Drosophila melanogaster,* diflubenzuron.

Εισαγωγή:

1.1<u>Εντομοκτόνα παρεμποδιστές του σχηματισμού της χιτίνης:</u>

Αν η επιδερμίδα του εντόμου, που παρέχει την εξωσκελετική δομή, παρεμποδιστεί κατά τη διαδικασία του σχηματισμού, το αποτέλεσμα είναι θανατηφόρο για το έντομο. Η επιδερμίδα πρέπει να είναι αδιάβροχη για προστασία, απαλή και εύκαμπτη για να επιτρέπει την κίνηση, εκτατή μεταξύ των μεταμερών για να επιτρέπει την αύξηση κατά τη διαδικασία της θρέψης και ανάπτυξης, και, επίσης, συμπαγής για να παρέχει σταθερά σημεία πρόσδεσης των μυών, των σαγονιών και των νυχιών, (Dhadialla *et al*, 2005). Η επιδερμίδα προέρχεται από μία μοναδική στιβάδα επιδερμικών κυττάρων και αποτελείται από διαφορετικά στρώματα, από τα οποία η προδερμίδα περιέχει χιτίνη, ένα βασικό συστατικό της, (30-60%). Η χιτίνη είναι ένα β(1-4)

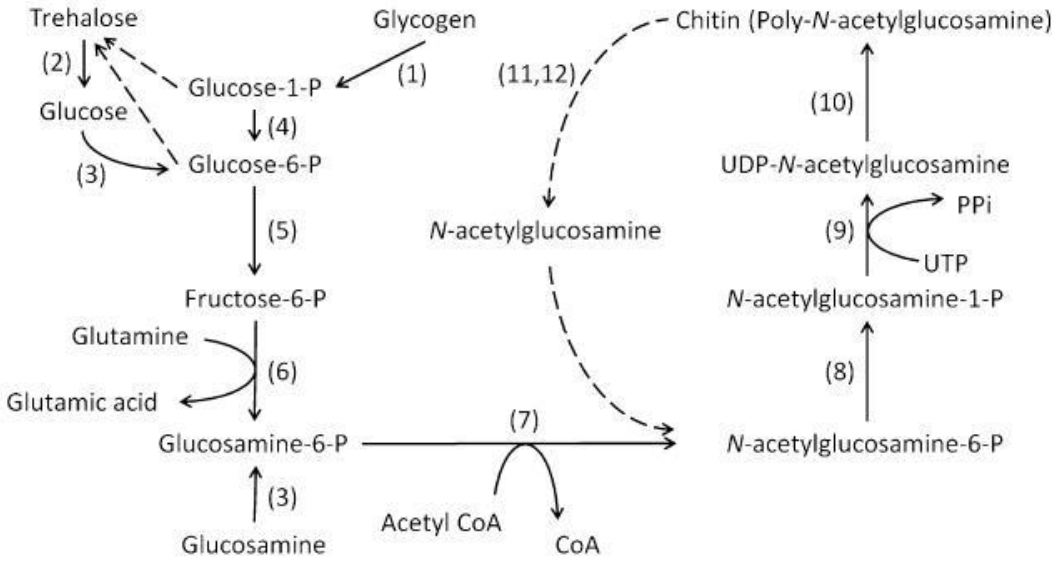
συνδεδεμένο αμινοπολυσακχαριδικό ομοπολυμερές της Ν ακετυλογλυκοζαμίνης, και είναι ένα από τα πιο άφθονα υλικά που υπάρχουν στη γη. Αυτός ο πολυσακχαρίτης συνδέεται σε πλέγμα με πρωτεΐνες, μέσω διφαινολικών δεσμών, για να σχηματίσει μια προστατευτική μήτρα, η οποία αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα μικροϊνιδίων χιτίνης. (Dhadialla *et al*, 2005).

Πολλές πλευρές της σύνθεσης και της αποδόμησης της χιτίνης έχουν ερευνηθεί τα τελευταία χρόνια αυξάνοντας την κατανόησή μας για τους μηχανισμούς του κυττάρου που την ελέγχουν. Η βιοσύνθεση της χιτίνης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που αποτελείται από μια σειρά ενζυματικών βημάτων, η οποία ξεκινά με ένα μόριο γλυκόζης (Hans Merzendorfer, 2011). Το μόριο μετατρέπεται σε GlcNAc, που συνδέεται με UTP για να μεταφερθεί μέσα στο κύτταρο σε συνδυασμό με φωσφορική δολιχόλη, και πολυμερίζεται σε χιτίνη, η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με πρωτεϊνες για να σχηματίσει μικροϊνίδια στην επιδερμίδα. Ο πολυμερισμός για το σχηματισμό της χιτίνης καταλύεται από το ένζυμο συνθάση της χιτίνης, το οποίο εμφανίζεται στα αρθρόποδα σε μεμβρανική μορφή. (Merzendorfer, 2011).

Το μονοπάτι βιοσύνθεσης της χιτίνης, (Σχήμα 1), είναι το ακόλουθο: Το γλυκογόνο μετατρέπεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, (1), σε γλυκόζη 1-P η οποία υπόκειται σε γλυκόλυση ή χρησιμοποιείται για τη σύνθεση τρεχαλόζης. Αυτή με τη σειρά της μπορεί να υδρολυθεί σε γλυκόζη από την τρεχαλάση, (2). Η μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη 6-P περιλαμβάνει την εξοκινάση, (3), τη φωσφογλυκομουτάση, (4), και την ισομεράση της γλυκόζης 6-P, (5). Από το σημείο της 6 φωσφορικής φρουκτόζης το μονοπάτι βιοσύνθεσης χιτίνης διακλαδίζεται, με το πρώτο ένζυμο να είναι η αμιδοτρανσφεράση της γλουταμινικής φρουκτόζης 6-P, (6). Η αντίδραση που καταλύεται από αυτό το ένζυμο μετατρέπει τη φρουκτόζη 6-P σε 6 φωσφορική γλυκοζαμίνη, μεταφέροντας την αμμωνία από το συν-υπόστρωμα l- γλουταμίνη και ισομερίζοντας την 6-φωσφορική γλυκοσιμίνη που προκύπτει. Μετά, μια ακετυλική ομάδα από το συνένζυμο Α προστίθεται από την ακετυλοτρανσφεράση της γλυκοζαμίνης 6-P, (7), για να αποκτήθεί Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη 6-P, της οποίας το φωσφορικό μεταφέρεται από τον άνθρακα 6 στον άνθρακα 1,

το ένζυμο που κάνει αυτή την κατάλυση είναι η μουτάση της φωσφοακετυλογλυκοζαμίνης, (8). Το μόριο που προκύπτει, (GlcNAc-P), ουριδιλιώνεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-GlcNAc, (9). Έτσι, δημιουργείται UDP-GlcNAc η οποία χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τη συνθάση της χιτίνης, (10), μια μεμβρανική, (στα έντομα), γλυκοζυλοτρανσφεράση που μεταφέρει το μόριο σακχάρου της UDP-GlcNAc στην αυξανόμενη αλυσίδα χιτίνης. Η χιτίνη αποδομείται από χιτινάσες, (11) και Ν-ακετυλογλυκοζαμινιδάσες, (12), δίνοντας GlcNAc που μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για σύνθεση χιτίνης. (Merzendorfer, 2011)

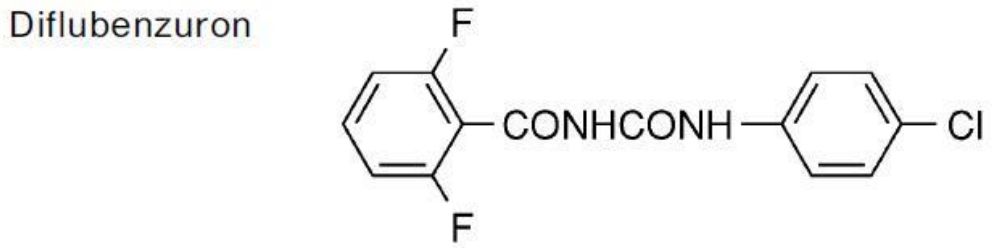
Για μεγάλο διάστημα, το μονοπάτι βιοσύνθεσης της χιτίνης έχει αποδειχθεί σημαντικό για την ανάπτυξη παραγόντων ελέγχου εντόμων, οι οποίοι καταστέλλουν επιλεκτικά οποιοδήποτε από τα βήματα του μονοπατιού στα έντομα αυτά. Δύο είδη τέτοιων παραγόντων χρησιμοποιούνται εμπορικά ως σήμερα: Οι βενζοφαινολικές ουρίες και τα buprofezin, cyromazine, (Dhadialla *et al*, 2005).



Σχήμα 1: Το μονοπάτι βιοσύνθεσης χιτίνης: (1) φωσφορυλάση του γλυκογόνου, (2) τρεχαλάση, (3) εξοκινάση, (4) φωσφογλυκομουτάση, (5) ισομεράση της γλυκόζης 6-P, (6) αμιδοτρανσφεράση της γλουταμινικής φρουκτόζης 6-P, (7) ακετυλοτρανσφεράση της γλυκοζαμίνης 6-P, (8) μουτάση της φωσφοακετυλογλυκοζαμίνης, (9) πυροφωσφορυλάση της UDP-GlcNAc, (10) συνθάση της χιτίνης, (11) χιτινάσες, (12) Ν-ακετυλογλυκοζαμινιδάσες.

1.2Diflubenzuron:

Το diflubenzuron, (Σχήμα 2), ανήκει στις βενζοφαινολικές ουρίες και αποτελεί τον πρώτο αναστολέα βιοσύνθεσης της χιτίνης που χρησιμοποιήθηκε εμπορικά. Είναι μη συστημικός ρυθμιστής της ανάπτυξης με δράση εξ' επαφής και στοματική. Δρα κατά την έκδυση το εντόμου, αλλά και κατά την εκκόλαψη των αυγών. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι, όπως όλες οι βενζοφαινολικές ουρίες, το Diflubenzuron δεν είναι αποτελεσματικό στους μύκητες, που σημαίνει ότι δρα σε κάποιο σημείο που υπάρχει μόνο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της χιτίνης των αρθροπόδων, (Abo-Elghar *et al*, 2004).



Σχήμα 2: Μοριακή δομή του Diflubenzuron

Το diflubenzuron χρησιμοποιείται στη δασοκομία, τα διακοσμητικά φυτά και την παραγωγή φρούτων για την καταπολέμηση μεγάλης ποικιλίας εντόμων που τρέφονται με φύλλα. Επίσης, χρησιμοποιείται για να ελέγξει βασικά παράσιτα στο βαμβάκι, τη σόγια, το κίτρο, το τσάι, τα λαχανικά και τα μανιτάρια. Επιπλέον δρα στις προνύμφες της μύγας, των κουνουπιών, και τις ακρίδας. Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί σαν αποπαρασιτικό στα πρόβατα για την καταπολέμηση της ψείρας, των ψύλλων και των προνυμφών της κρεατόμυγας, (Dhadialla *et al*, 2005).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όσον αφορά το μηχανισμό δράσης του diflubenzuron, γνωρίζουμε ότι αυξάνει τη μεταφορά Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου σε πρόσφατα εκδυμένες αμερικανικές κατσαρίδες, (Nakagawa *et al*l, 1994), που δείχνει ότι πιθανώς ο στόχος του εντομοκτόνου είναι μια αντλία ABC, (ATP binding cassette), ίσως ένας υποδοχέας ευαίσθητος στις συλφονυλουρίες, (Abo-Elghar *et al*, 2004). Κατά τα άλλα ο μηχανισμός δράσης του δεν έχει εντελώς εξακριβωθεί.

2. Ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα:

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα εντομοκτόνα είναι από τα βασικά μέσα που χρησιμοποιούνται στη γεωργική βιομηχανία, για την αντιμετώπισή εντόμων που προκαλούν ζημιά στις σοδειές καθώς και για την αντιμετώπιση εντόμων που μεταφέρουν ασθένειες, όπως για παράδειγμα το κουνούπι, που μεταφέρει την ελονοσία. (Casida, 2010)

Ωστόσο ένα απ' τα μεγαλύτερα προβλήματα που επηρεάζει τη χρήση εντομοκτόνων, είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς των εντόμων στο πεδίο. Η ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα έχει αναφερθεί στα περισσότερα σημαντικά έντομα, και έχει αναπτυχθεί σε κάθε χημική τάξη εντομοκτόνων, συμπεριλαμβανομένου μικροβιακά φάρμακα και αυτά που στοχεύουν ρυθμιστές της ανάπτυξης. Επίσης η ανθεκτικότητα αναμένεται να επηρεάσει σοβαρά την επανεμφάνιση ασθενειών που μεταφέρονται με φορείς κι εκεί που δεν θα συνεισφέρει στην εξάπλωσή τους θα δυσκολέψει το έλεγχο των ασθενειών, (Nicholson, 2006).

Οι λανθάνοντες μηχανισμοί και αιτίες της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι αρκετοί. Ο κύριος λόγος είναι ότι, λόγω της ευρείας χρήσης και του στενού πεδίου στόχευσης των αγροχημικών, τα αρθρόποδα έχουν βρεθεί κάτω από υψηλά επίπεδα εξελικτικής πίεσης. Με αυτόν τον τρόπο κάθε γενιά γίνεται πιο ανθεκτική απ' την επόμενη μέσω μηχανισμών φυσικής επιλογής, (Brogdon and McAllister, 1998).

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα μπορεί να χαρακτηριστεί από υψηλά επίπεδα αποτοξικοποίησης που προκύπτουν από ανεβασμένα επίπεδα εστεράσης, Τρανσφεράσης της γλουταθιόνης S, μονοοξυγενάσης, κυτοχρώματος p450, από μειωμένη ευαισθησία του στόχου, του εντομοκτόνου, λόγω κάποιας αλλαγής, από μειωμένη διαθεσιμότητα του εντομοκτόνου, λόγω δυσκολίας εισόδου του στο έντομο καθώς και από συμπεριφορική απόκριση του εντόμου, το οποίο ίσως αποφεύγει το εντομοκτόνο. (Brogdon and McAllister, 1998). Επίσης το γεγονός ότι τα περισσότερα εντομοκτόνα στοχεύουν σε ένα από πέντε μόνο στόχους του νευρικού συστήματος έχει ενισχύσει την

ανάπτυξη πολλαπλής ανθεκτικότητας σε διάφορες οικογένειες εντομοκτόνων, (Raymond – Delpech *et al,* 2005).

Καταλαβαίνουμε λοιπόν πόσο σημαντική είναι η ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων και η μελέτη των μοριακών μηχανισμών δράσης τους.

3.1. Η *Drosophila melanogaster* ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη εντομοκτόνων:

Η *Drosophila melanogaster* χρησιμοποιείται ως οργανισμός γενετικό μοντέλο εδώ και πολύ καιρό, για μελέτες πάνω στην ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη συμπεριφορά. Σ' αυτή την ευρεία και μακρόχρονη χρήση της συμβάλλουν τα πολλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει ως οργανισμός μοντέλο: Ένα από αυτά είναι ότι δεν κοστίζει πολύ η εκτροφή της, καθώς η δίαιτά της βασίζεται σε ένα μείγμα ζυμομύκητα, καλαμποκάλευρου κι άγαρ. Εκτός αυτού δεν χρειάζεται κάποια εξειδικευμένη μέθοδο για την παρατήρηση των γονιδίων δεικτών κατά τις διασταυρώσεις και, στα περισσότερα αναπτυξιακά στάδια ο χειρισμός της είναι εύκολος. Επίσης ο κύκλος ζωής της είναι σχετικά μικρός, με πολλούς απογόνους και λίγα παθογόνα που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν προβλήματα στην αξιοπιστία της πειραματικής διαδικασίας. Γενετικά πλεονεκτήματά της αποτελούν το ότι έχει μικρό αριθμό χρωμοσωμάτων, (μόνο 4) στα οποία τα γονίδια είναι αρκετά συμπυκνωμένα, καθώς και μια πλειάδα γενετικών εργαλείων που έχουν αναπτυχθεί για αυτή κατά τα πολλά χρόνια εργαστηριακής χρήσης της, (*Drosophila* methods and protocols, Humana press).

Άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα, που εμφανίζει η δροσόφιλα όσον αφορά το εργαστηριακό επίπεδο και γονιδιακές μελέτες, είναι ότι υπάρχουν λεπτομερείς χάρτες των πολυτενικών χρωμοσωμάτων, (Pardue, 1986), όπως και μεγάλος αριθμός διαθέσιμων μεταλλαγμάτων και γενετικών εργαλείων, που έχουν αναπτυχθεί με τον καιρό, (Bloomington, 2010), μαζί με πολλά πρωτόκολλα για γενετική και μοριακή ανάλυση, (Sullivan *et al*, 2000). Τέλος, πολύ σημαντικό είναι και το ότι έχει χαρτογραφηθεί ολόκληρο το γονιδίωμα του συγκεκριμένου οργανισμού, (Adams *et al*, 2000; Tweedie *et al*, 2009),

ενώ έχουν δημιουργηθεί και αρκετά μεταγραφικά εργαλεία, (White *et al*., 1999).

Εκτός από τις χρήσεις της για αναπτυξιακές, εξελικτικές και συμπεριφορικές μελέτες, η *Drosophila melanogaster* έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα. (Wilson, 2001) Αυτό συμβαίνει γιατί τα έντομα στόχοι των εντομοκτόνων αυτών, που βρίσκονται στο πεδίο, εμφανίζουν δυσκολίες στη μελέτη τους. Όπως δυσκολία στη μεταφορά πληθυσμών στο εργαστήριο και την κατάλληλη εκτροφή τους, καθώς και το γενετικό έλεγχό τους, αφού τα γονιδιώματά τους παραμένουν τις περισσότερες φορές άγνωστα και δεν υπάρχει η πληθώρα γενετικών και μοριακών εργαλείων που είναι διαθέσιμη στη δροσόφιλα. Έτσι, με τη χρήση της *Drosophila melanogaster* για τη μελέτη των στόχων και των μηχανισμών δράσης των εντομοκτόνων, μπορούμε να τους διασαφηνίσουμε πολύ πιο εύκολα και να εφαρμόσουμε τη γνώση που αποκτήσαμε αργότερα στα επιβλαβή έντομα του πεδίου, (Perry *et al*, 2011).

3.2. Μελέτη εντομοκτόνων στη *Drosophila melanogaster:*

Η δροσόφιλα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη εντομοκτόνων και έχουν εξακριβωθεί σ' αυτή πολλοί μηχανισμοί που περιλλαμβάνουν ένα σημείο στόχο, όπως τον υποδοχέα GABA, το κανάλι χλωρίου – νατρίου και τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Μία από τις πρώτες εφαρμογές, ήταν μια μετάλλαξη ενός αμινοξέος στον υποδοχέα GABA που χάριζε ανθεκτικότητα στη διλεδρίνη. Αυτή η ανακάλυψη υπήρξε πολύ σημαντική γιατί ήταν από τις πρώτες φορές που ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας δεν ανακαλύπτονταν στο πεδίο, αλλά στο εργαστήριο και στη συνέχεια έγινε συσχέτιση με την ανθεκτικότητα στο πεδίο, καθώς ανακαλύφθηκε αργότερα σε επιβλαβή έντομα του πεδίου, που εμφάνιζαν ανθεκτικτότητα στη διλεδρίνη, (ffrench-Constant *et al*, 1994).

Επίσης έχει γίνει υπερέκφραση στη δροσόφιλα γονιδίων άλλων ειδών, που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν ανθεκτικές δροσόφιλες στα εντομοκτόνα αυτά. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώνεται η συσχέτιση μεταξύ γονιδίου και ανθεκτικότητας. Ένα παράδειγμα είναι η εκτοπική έκφραση του

CYP6BQ9 από το *T. castaneum* στη *D. melanogaster* που της χάρισε ανθεκτικότητα στη δελταμεθρίνη, (Zhu *et al*, 2010).

4.1 Η μεταλλαξιγένεση στα έντομα:

Αν και οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις που ανακαλύφθηκαν αρχικά εμφανίστηκαν τυχαία, τεχνικές για την πρόκληση μεταλλάξεων σε γονίδια και την πρόκληση δυσλειτουργιών σ' αυτά έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ακόμα. Τα αρχικά μεταλλάγματα μελετούνταν κυρίως για να αναγνωριστεί το γονίδιο που ήταν υπεύθυνο για το μεταλλαγμένο φαινότυπο. Αυτή η στρατηγική ονομάζεται εμπρόσθια γενετική προσέγγιση, (Johnston, 2002). Η αναγνώριση των ορθολόγων των χαρακτηρισμένων γονιδίων σε άλλα είδη, και πιο πρόσφατα ο πλούτος των γενετικών πληροφοριών που παρέχεται από προγράμματα γονιδιωμάτων απαιτούσε την ανάπτυξη αντίστροφων γενετικών τεχνικών, οι οποίες καθιστούν δυνατή την κληρονομική πρόκληση δυσλειτουργίας ενός συγκεκριμένου γονιδίου με σκοπό την ανίχνευση της in vivo λειτουργίας του. Έτσι, η διαθεσιμότητα της αλληλουχίας DNA ενός γονιδίου και η ακριβής θέση του στο γονιδίωμα αποτελούσε ένα σημείο έναρξης. Αυτή η αντίστροφη γενετική προσέγγιση μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Ο ένας εστιάζει στην δημιουργία μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια ενδιαφέροντος με μέσο τροποποιημένους εμπρόσθιους γενετικούς ελέγχους. Η χημική μεταλλαξιγένεση, χρησιμοποιώντας παράγοντες που βλάπτουν το DNA, όπως το EMS, (ethyl methanesulphonate) η ENU, (ethylnitrosourea), και η ακτινοβόληση, καθώς και η μεταλλαξιγένεση με τη χρήση μεταθετών στοιχείων αποτελούν τα εργαλεία αυτών των μελετών, (Reumer *et al*, 2007).

4.2 Ο ρόλος της μεταλλαξιγένεσης σε μελέτες εντομοκτόνων στη Δροσόφιλα:

Η δροσόφιλα αποτελεί ένα από τους πιο σημαντικούς οργανισμούς μοντέλα για γενετικούς ελέγχους και μπορεί να υποστεί τόσο χημική, (Με τη χρήση μεταλλαξογόνων ουσιών), όσο και ενθετική μεταλλαξιγένεση, (Εισαγωγή ενός τμήματος DNA στο γονιδίωμα). Η

χρήση αυτού το εντόμου για τη μελέτη μηχανισμών ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι το ότι, επειδή η δροσόφιλα μπορεί να αναπτυχθεί πολύ εύκολα στο εργαστήριο, σε αντίθεση με τα επιβλαβή έντομα του πεδίου για τα οποία πρέπει να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκτροφής, μπορούμε να αναλύσουμε ή να ανακαλύψουμε μηχανισμούς ανθεκτικότητας πριν αυτοί εμφανιστούν στο πεδίο. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να ελεγχθούν άμεσα και εύκολα οι μηχανισμοί δράσης νέων εντομοκτόνων, έτσι ώστε να εξακριβωθούν τυχόν περιορισμοί ή προληπτικά μέτρα που θα έπρεπε να ληφθούν υπ' όψιν πριν την κυκλοφορία τους στην αγορά. Επιπλέον, επειδή η δροσόφιλα χρησιμοποιείται ευρέως εργαστηριακά είναι πολύ πιο εύκολο να ελέγξουμε το γενετικό υπόβαθρο και να συσχετίσουμε την ανθεκτικότητα με μια συγκεκριμένη μεταλλαγή, (Perry *et al*, 2011).

4.3 Εφαρμογές της ενθετικής μεταλλαξιγένεσης:

Η ενθετική μεταλλαξιγένεση μπορεί να εφαρμοστεί σε διαγονιδιακά ζώα που έχουν την τρανσποζάση και το μεταθετό στοιχείο. Όταν η ενθετική μεταλλαξιγένεση είναι ενεργή στη γαμετική σειρά οδηγεί σε κληρονομούμενες μεταλλάξεις και αυτή η προσέγγιση είχε εφαρμοστεί ευρέως σε γενετικές μελέτες κατώτερων οργανισμών και, πιο πρόσφατα, στα ποντίκια. Η σωματική ενθετική μεταλλαξιγένεση μπορεί να προκαλέσει καρκίνο κι έτσι χρησιμοποιείται για ανακάλυψη μονοπατιών γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο, όπου τα τρανσποζόνια προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους ρετροϊούς, (Drabek *et al,* 2002).

4.4 Η ενθετική μεταλλαξιγένεση στη μελέτη εντομοκτόνων:

Μια πολύ χρήσιμη εφαρμογή της ενθετική μεταλλαξιγένεσης είναι η χρήση της στη μελέτη εντομοκτόκτων, και πιο συγκεκριμένα στην ανακάλυψη και μελέτη σε μοριακό επίπεδο των μηχανισμών δράσης τους και των μοριακών τους στόχων. Σε αυτή την περίπτωση έχει το εμφανές πλεονέκτημα έναντι της παραδοσιακή χημικής μεταλλαξιγένεσης, στο ότι το γονίδιο που στοχεύεται μπορεί να

αναγνωριστεί και να απομονωθεί εύκολα, αφού μεταφέρει το μεταθετό στοιχείο ως ταμπέλα. Αυτό γίνεται στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται τρανσποζόνια, (Handler *et al*, 2006).

Ένα παράδειγμα αποτελεί ή παγίδευση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα σε ένα παρασιτοκτόνο, όπως το diflubenzuron, η οποία γίνεται με την πρόκληση τυχαίων ενθέσεων σε περιοχή που περιλαμβάνει όλο το γονιδίωμα και επιλογή σε υψηλές συγκεντρώσεις του παραπάνω εντομοκτόνου. Κάτι τέτοιο, εκτός απ' την παγίδευση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα μπορεί να ρίξει φως και στο μηχανισμό δράσης του εντομοκτόνου.

4.5 Μεταθετά στοιχεία:

Στη φύση τα μεταθετά στοιχεία είναι γενετικά στοιχεία, που απαρτίζονται από το γονίδιο για ένα ένζυμο τρανσποζάσης μαζί με τις συγγενείς αλληλουχίες αναγνώρισής του. Σε ένα κύτταρο ξενιστή, η έκφραση της πρωτεΐνης της τρανσποζάσης οδηγεί στην απότμηση του στοιχείου από το σημείο που βρίσκεται στο γονιδίωμα και επανένθεση σε μια νέα περιοχή, (Vassiliou *et al*, 2010). Τα μεταθετά στοιχεία χωρίζονται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό ένθεσης. Αυτά που προκαλούν πολλαπλές ενθέσεις, (Copy & Paste) ή τάξης I και αυτά που προκαλούν μία ένθεση κάθε φορά, (Cut & Paste) ή τάξης II. Τα πρώτα ονομάζονται και ρετροτρανσποζόνια, επειδή μεταγράφουν τον εαυτό τους σε RNA το οποίο πολλαπλασιάζεται και κάνει αντίστροφη μεταγραφή πάλι σε DNA, (Η αντίστροφή μεταγραφάση συχνά κωδικοποιείται από το ίδιο το τρανσποζόνιο). Στη δεύτερη περίπτωση, τα μεταθετά στοιχεία απλώς μεταφέρονται από τη μια περιοχή του γονιδιώματος στην επόμενη και οδηγούμαστε σε ενθετική μεταλλαξιγένεση σε ένα μόνο σημείο, που μπορεί να οδηγήσει σε θνησιμότητα ή ασθένειες ανάλογη με τα ειδικά αποτελέσματα του ενθεμένου μεταθετού στοιχείου στα τοπικά γονίδια.

Στην πειραματική βιολογία, τα δύο συστατικά του τρανσποζονίου μπορούν να διαχωριστούν. Αυτό δημιουργεί ένα μη αυτόνομο μεταθετό στοιχείο, του οποίου η κινητικότητα ελέγχεται από την τρανσποζάση, που εκφράζεται in trans. Οποιοδήποτε τύπου γενετικό φορτίο μπορεί

να εισαχθεί μέσα στο μεταθετό στοιχείο για να βοηθήσει τον πειραματικό σκοπό, (Vassiliou *et al*, 2010).

4.6 Το μεταθετό στοιχείο *Minos* και η κατασκευή που βασίζεται σ' αυτό:

Ο πρώτος μετασχηματισμός γαμετικής σειράς ενός μη Δροσοφιλικού εντόμου με τη χρήση ενός συστήματος φορέα βασισμένου σε τρανσποζόνιο επιτεύχθηκε με το στοιχείο *Minos.* Το *Minos* απομονώθηκε αρχικά σαν μια τυχαία ανακάλυψη στην *Drosophila hydei* κατά την αλληλούχιση της μη κωδικής περιοχής ενός ριβοσωμικού γονιδίου. Μετά απομονώθηκαν επιπλέον μεταθετά στοιχεία *Minos,* από την *Drosophila hydei,* έχοντας μικρές διαφορές ενός ή δύο νουκλεοτιδίων, ωστόσο τα νέα στοιχεία είχαν μια αλλαγή φάσης που αποκατέστησε το κανονικό πλαίσιο ανάγνωσης, επιτρέποντας την μετάφραση μιας λειτουργικής τρανσποζάσης, (Handler *et al*, 2006)

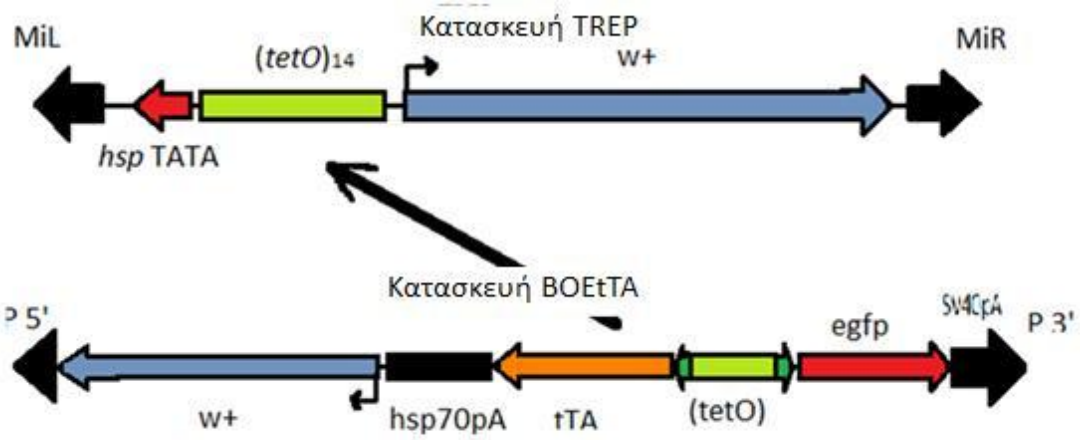
Το *Minos* είναι ένα κινητό στοιχείο που ανήκει στην ευρέως κατανεμημένη υπεροικογένεια *Tc1/mariner.* (de Almeida *et al*, 2005). Τα τρανσποζόνια που ανήκουν στην οικογένεια *Tc1/mariner* είναι ενεργά σε φυλογενετικά μακρινά είδη, επειδή χρειάζονται μόνο την τρανσποζάση για τη μετάθεσή τους, (Drabek *et al*, 2002)

Το *Minos* είναι περίπου 1800 βάσεις σε μήκος και περιέχει το γονίδιο της τρανσποζάσης κωδικοποιημένο από δύο εξώνια που διαχωρίζονται από ένα ιντρόνιο μήκους 60 ζευγών βάσεων. Επίσης δημιουργεί σταθερές ενθέσεις στα κύτταρα της γαμετικής σειράς εντόμων και ασκιδίων, άρα και κληρονομήσιμες μεταλλάξεις, (Loukeris *et al*, 1995a). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ενεργό σε κύτταρα εντόμων και θηλαστικών που βρίσκονται σε καλλιέργειες, καθώς και στα σωματικά και γαμετικά κύτταρα των ποντικών, (Pavlopoulos *et al*, 2007; Klinakis *et al*, 2000a).

Το Minos, όπως τα περισσότερα μεταθετά στοιχεία της υπεροικογένειας *Tc1/mariner*, είναι ενεργό σε μεγάλη ποικιλία οργανισμών ξενιστών, όπως σε διάφορα καρκινοειδή, ασκίδια, ακάρεα, έντομα, ακόμα και σε κύτταρα θηλαστικών, όπως το ποντίκι. Επίσης, το γεγονός ότι δεν είναι επιλεκτικό ως προς τις θέσεις που εντίθεται το καθιστά πολύ σημαντικό εργαλείο για ενθετική μεταλλαξιγένεση,

καθώς μπορεί να προσφέρει σταθερά μεταλλάγματα με υψηλή αποτελεσματικότητα. Έτσι το *Minos,* χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πολύ διαφορετικών γενετικών μοντέλων σε διαγονιδιακές μελέτες, (de Almeida *et al*, 2005).

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήσαμε μια κατασκευή που βασίζεται στο μεταθετό στοιχείο *Minos* και ονομάζεται TREP (tetracycline regulatable enhancer promoter). Η κατασκευή TREP αποτελείται από ένα minimal υποκινητή hsp70 που ελέγχεται μέσω του συστήματος tetO. Πιο συγκεκριμένα η πρωτεΐνη tTA, (ενεργοποιητής της μεταγραφής) προσδένεται στον τόπο tetO, και προκαλεί την ενεργοποίηση το υποκινητή, η οποία οδηγεί σε ενίσχυση του αμέσως επόμενου γονιδίου προς το 3΄άκρο μετά την περιοχή της ένθεσης. Αυτό προκαλεί εκτοπική υπερέκφραση του γονιδίου που βρίσκεται αμέσως μετά την ένθεση της κατασκευής TREP. Ως γονίδιο δείκτης για την ύπαρξη του TREP στις μύγες, με στόχο να διευκολυνθεί η επιλογή στης διασταυρώσεις, χρησιμοποιείται το γονίδιο mini-white (w+), το οποίο δίνει φαινότυπο κόκκινων ματιών σε ένα γενετικό υπόβαθρο που δίνει λευκά μάτια, (Σχήμα 3). Η πηγή tTA παρέχεται από μια βοηθητική BOEtTA κατασκευή.



Σχήμα 3: Η κατασκευή TREP (tetracycline regulatable enhancer promoter) και η κατασκευή BOEtTA: Η κατασκευή TREP περιέχει ένα ελάχιστο υποκινητή hsp70 που ελέγχεται από στοιχεία tetO και περιέχει, ως γονίδιο δείκτη, το mini – white gene (W+) το οποίο δίνει φαινότυπο κόκκινο ματιών σε γενετικό υπόβαθρό λευκών. Η κατασκευή BOEtTA περιέχει το γονίδιο tTA, καθώς και το egfp ως γονίδιο δείκτη για την επιτυχία του μετασχηματισμού. Παρουσία του BOEtTA, το tTA προσδένεται στα tetO στοιχεία της κατασκευής TREP, προκαλώντας την ενεργοποίηση του ελάχιστου υποκινητή hsp70 και

οδηγώντας στην ενίσχυση του αμέσως επόμενου γονιδίου, κατά τη φορά 5΄προς 3΄μετά τον hsp70.

5. Σκοπός της μελέτης:

Σκοπός της μελέτης είναι η χρήση ενθετικής μεταλλαξιγένεσης σε όλο το γονιδίωμα στη δροσόφιλα, ακολουθούμενη από επιλογή σε θανατηφόρες δόσεις του diflubenzuron, με σκοπό την ανακάλυψη του μηχανισμού δράσης του diflubenzuron και την χαρτογράφηση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος θα δημιουργήσουμε αρκετές μεταλλαγμένες μύγες με διαφορετική μεταλλαγή στην κάθε μία, χρησιμοποιώντας το σύστημα τρανσποζονίου βασισμένο στο *Minos*. Κάθε μία από αυτές θα ελέγχεται για ανθεκτικότητα στο diflubenzuron. Εκείνες που θα επιτύχουν στον έλεγχο, εμφανίζοντας δηλαδή ανθεκτικότητα, θα περάσουν ένα ακόμα στάδιο ανάλυσης όπου θα ελέγξουμε τη μεταλλαγή τους και θα προσπαθήσουμε να συσχετίσουμε τα γονίδια που επηρεάστηκαν με την ανθεκτικότητα ή/και το μηχανισμό δράσης του diflubenzuron.

Για το πείραμά μας, επιλέξαμε ενθετική μεταλλαξιγένεση, βασισμένη στο *Minos,* σε αντίθεση με χημική μεταλλαξιγένεση, επειδή η κατασκευή που βασίζεται στο *Minos* συνδέεται με το επηρεασμένο γονίδιο σαν ταμπέλα, προκαλώντας την ενίσχυσή του, οπότε είναι εύκολη η απομόνωση του γονιδίου με τη χρήση PCR και η συσχέτισή του με το φαινότυπο της ανθεκτικότητας αντίστοιχα. Επίσης, το *Minos* χρησιμοποιήθηκε επειδή σε αντίθεση με άλλα μεταθετά στοιχεία, όπως το στοιχείο P, εντίθεται εντελώς τυχαία, χωρίς να επηρεάζεται από αλληλουχίες του γονιδιώματος, οπότε καλύπτεται όλο το γονιδίωμα πιο εύκολα. Για τον έλεγχό μας, χρησιμοποιήσαμε ένα σύστημα τρανσποζονίου που πήραμε από το εργαστήριο Σαβάκη.

Υλικά και μέθοδοι:

1. **Σειρές της *Drosophila melanogaster* και τα χαρακτηριστικά τους:**

Οι σειρές δροσόφιλας που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη διατηρήθηκαν σε βασικό θρεπτικό μέσο που αποτελείται από καλαμποκάλευρο, άγαρ και ζυμομύκητα, σε θερμοκρασία 25 βαθμών κελσίου και σε φωτοπερίοδο 12 ωρών φωτός και 12 ωρών σκοταδιού:

TREP 2.30: Η σειρά TREP, (Kiupakis and Savakis, unpublished), είναι η σειρά που περιέχει την κατασκευή που βασίζεται στο *Minos.* Αυτή η κατασκευή βρίσκεται στο τέταρτο χρωμόσωμα σε ομοζυγωτία και περιέχει το γονίδιο mini-white (w+) ως φαινοτυπικό δείκτη για την ύπαρξη του TREP. Το γονίδιο αυτό δίνει φαινότυπο κόκκινων ματιών σε γενετικό υπόβαθρο λευκών.

iso31[SM6, MiT 2.4]/Sco: Η συγκεκριμένη σειρά δροσόφιλας περιέχει μια βοηθητική κατασκευή στην αναστροφή του δεύτερου χρωμοσώματος εξισσοροπητή. Σε αυτή την κατασκευή υπάρχει το γονίδιο της τρανσποζάσης του μεταθετού στοιχείου *Minos* η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάθεση της κατασκευής TREP. Ως γονίδιο φαινοτυπικό δείκτη για τη διευκόλυνση της επιλογής κατά τις διασταυρώσεις έχει το CyO το οποίο εμφανίζει φαινότυπο κυρτών φτερών στις μύγες. (Metaxakis *et al*, 2005)

BOEtTA 6.24: Η σειρά αυτή, (Koukidou *et al*, 2006), μεταφέρει μια βοηθητική κατασκευή βασισμένη στο στοιχείο P, που εντοπίζεται στο φυλετικό χρωμόσωμα X. Η κατασκευή BOEtTA 6.24 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ελάχιστου υποκινητή hsp70 του TREP καθώς παρέχει τον τρανς ενεργοποιητή της τετρακυκλίνης, tTA που χρειάζεται για την ενεργοποίηση του υποκινητή αυτού. Ως γονίδιο δείκτη περιέχει το egfp,(enhanced green fluorescent protein), το οποίο δίνει πράσινο φθορισμό στα μάτια της μύγας κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Επιπλέον περιέχεται το γονίδιο mini – white, (w+), που όμως είναι μη λειτουργικό σ’ αυτή τη σειρά.

Η κατασκευή BOEtTA εντοπίζεται μόνο στο X φυλετικό χρωμόσωμα των αρσενικών. Αυτό επιτυγχάνεται επειδή τα θηλυκά φέρουν δύο χρωμοσώματα X συνδεδεμένα μεταξύ τους και ένα Y, (XXY). Έτσι κατά τη διασταύρωση οι μόνοι απόγονοι που προκύπτουν είναι τα αρσενικά

XY που μεταφέρουν την κατασκευή BOEtTA στο X χρωμόσωμά τους και τα θηλυκά XXY που δεν τη μεταφέρουν. Τα θηλυκά φέρουν ενεργό το γονίδιο mini – white, (w+), οπότε εμφανίζουν φαινότυπο κόκκινων ματιών για να είναι πιο εύκολος ο διαχωρισμός.

Το BOEtTA είναι η κατασκευή η οποία φέρει το γονίδιο που παράγει την tTA, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οπότε είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του ελάχιστου υποκινητή του TREP. Για να μηδενιστεί η πιθανότητα η ενεργοποίηση αυτή να συμβεί ενώ δεν έχει προηγηθεί μετάθεση του TREP, έχει δειχθεί ότι όταν ο υποκινητής ενεργοποιείται στην αρχική ένθεση το αποτέλεσμα είναι θανατηφόρο για τη μύγα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω υπερέκφρασης ενός γονιδίου που έχει θνησιγόνα αποτελέσματα, (Kalajdzic and Savakis, unpublished data)

Iso31: Η σειρά iso31, (Ryder *et al*, 2004) είναι ένα ισογενικό ως προς τα χρωμοσώματα X, 2 και 3 στέλεχος που χρησιμοποιείται ως ευαίσθητο στο εντομοκτόνων για των επανέλεγχο των επιζώντων του δεύτερου βήματος της ενθετικής μεταλλαξιγένεσης.

2. <u>Διαδικασία της Ενθετικής μεταλλαξιγένεσης</u>

Η διαδικασία της ενθετικής μεταλλαξιγένεσης ήρθε σε πέρας με τη χρήση ενός κλασικού συστήματος “jumpstarter””, (Cooley *et al*, 1988). Περιλαμβάνει δύο βήματα, το πρώτο από τα οποία είναι η δημιουργία μεταλλάξεων λόγων νέας μετάθεσης του TREP, (Οι μύγες που τις φέρουν ονομάζονται Jumpstarters), ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει τη δημιουργία μυγών που περιέχουν και την κατασκευή BOEtTA, οπότε έχουν ενεργοποιημένο τον ελάχιστο υποκινητή, οι οποίες δοκιμάζονται σε υψηλή συγκέντρωση του εντομοκτόνου diflubenzuron, με σκοπό να γίνει επιλογή. Οι μύγες που θα επιβιώσουν από το δεύτερο βήμα θα είναι ανθεκτικές στο εντομοκτόνο και θα ελεγθούν περαιτέρω ως προς την ένθεση την οποία φέρουν, για να διαπιστωθεί αν συσχετίζεται το ενισχυμένο γονίδιο με την ανθεκτικότητα.

<u>Βήμα πρώτο: Δημιουργία νέων ενθέσεων:</u> Για την δημιουργία των θηλυκών jumpstarters προβήκαμε σε διασταύρωση μεγάλων αριθμών μυγών της σειράς TREP με μύγες της σειράς iso31[SM6, MiT 2.4]/Sco. Σε

κάθε διασταύρωση η αναλογία αρσενικών – θηλυκών ήταν 5 αρσενικά και 10 θηλυκά, όπου τα θηλυκά θα μπορούσαν να ανήκουν σε οποιαδήποτε από τις δύο σειρές και τα αρσενικά το ίδιο. Αυτό που μας ενδιαφέρει είναι οι απόγονοι που θα έχουν κληρονομήσει την κατασκευή TREP και την τρανσποζάση του *Minos,* η οποία περιέχεται στη σειρά iso31[SM6, MiT 2.4]/Sco, ώστε να είναι δυνατή η μετακίνηση του TREP και η ένθεσή του σε νέο σημείο του γονιδιώματος. Τα θηλυκά αυτής της διασταύρωσης αφέθηκαν να γεννήσουν αυγά σε φιαλίδια με θρεπτικό μέσο καλαμποκάλευρου, άγαρ και ζυμομύκητα και οι απόγονοι υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ όσο βρίσκονταν στο στάδιο της προνύμφης, (Larvae), έως ότου εμφανιστούν οι πρώτες νύμφες, (Pupae). Αυτό γίνεται γιατί η τρανσποζάση του *Minos* είναι θερμικά επαγόμενη. Επίσης, έχει δειχθεί ότι στο στάδιο της προνύμφης η θνησιμότητα από το θερμικό σοκ είναι μικρότερη, και γίνονται ενθέσεις στα γαμετικά κύτταρα, οι οποίες είναι κληρονομήσιμες. Οι προνύμφες υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ κάθε μέρα για μία ώρα περίπου στους 37 βαθμούς κελσίου.

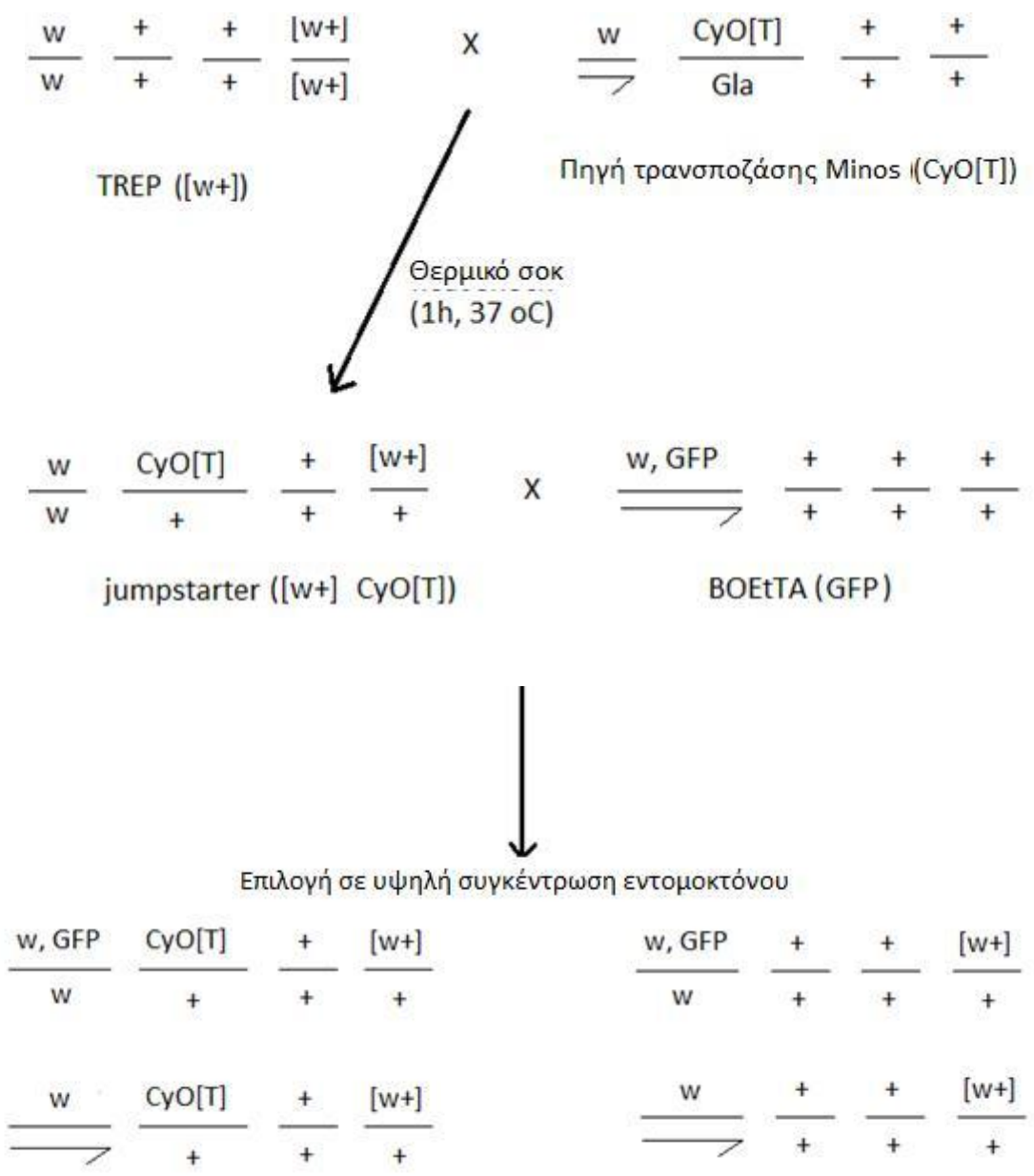
Το γονίδιο δείκτης του TREP είναι το mini-white που δίνει κόκκινα μάτια σε λευκό υπόβαθρο και το γονίδιο φαινοτυπικός δείκτης που συνδέεται με την τρανσποζάση του *Minos* είναι το CyO που δίνει κυρτά φτερά. Οπότε όταν οι απόγονοι της πρώτης διασταύρωσης εκδυθούν συλλέγουμε θηλυκές παρθένες που φέρουν κόκκινα μάτια και κυρτά φτερά, (jumpstarters), για να χρησιμοποιήσουμε στο επόμενο βήμα της διαδικασίας. Κάθε μια από αυτές θα έχει τουλάχιστον μια καινούρια ένθεση του TREP στα γαμετικά της κύτταρα.

<u>Βήμα δεύτερο: Ενεργοποίηση του ελάχιστου υποκινητή και επιλογή σε θανατηφόρα συγκέντρωση του diflubenzuron:</u> Κατά τη δεύτερη διασταύρωση σκοπός μας ήταν να δημιουργήσουμε μύγες που θα έχουν μια νέα ένθεση του TREP, στην οποία ο ελάχιστος υποκινητής θα είναι ενεργοποιημένος, ώστε να τις χρησιμοποιήσουμε για επιλογή σε υψηλή συγκέντρωση εντομοκτόνου. Για να το πετύχουμε αυτό διασταυρώσαμε μεγάλους αριθμούς θηλυκών jumpstarters με αρσενικά BOEtTA. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα θηλυκά BOEtTA δεν

περιέχουν την κατασκευή που δίνει τον ενεργοποιητή tTA του ελάχιστου υποκινητή του TREP, οπότε σ' αυτή την περίπτωση μόνο η συγκεκριμένη διασταύρωση είναι εφικτή. Σε κάθε διασταύρωση, (20 θηλυκά jumpstarters x 10 αρσενικά BOEtTA), πραγματοποιήθηκε επιλογή σε εντομοκτόνο diflubenzuron. Τα ενήλικα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με θρεπτικό μέσο δροσόφιλας στο οποίο είχαν ενσωματωθεί οι καθορισμένη θανατηφόρα δόση του εντομοκτόνου, που θα επέτρεπε μόνο στους ανθεκτικούς απογόνους να επιβιώσουν. Έχει δειχθεί ότι για να έχουμε τουλάχιστον μια νέα ένθεση του TREP, στα αυγά που γεννιούνται από ένα θηλυκό jumpstarter, πρέπει να το αφήσουμε να γεννήσει περίπου 100, (Kalajdzic and Savakis, αδημοσίευτα δεδομένα). Γι' αυτό το λόγο τα ενήλικα της διασταύρωσης μεταφέρονταν σε νέα φιαλίδια κάθε 24 ώρες έως ότου συμπληρωθεί οι αριθμός των 2000 αυγών, άρα 100 για κάθε θηλυκό.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ενεργοποίηση του ελάχιστου υποκινητή όταν δεν έχει προηγηθεί μετάθεση είναι θανατηφόρα, γι' αυτό το λόγο όσοι απόγονοι με κόκκινα μάτια, (Φαινοτυπικός δείκτης του TREP), επιβιώσουν θα έχουν νέα μετάθεση. Οπότε συλλέγουμε όλους αυτούς τους απογόνους, που ονομάζονται επιζώντες, (survivors), για περαιτέρω έλεγχο. Πρέπει ωστόσο να τονιστεί ότι οι αρσενικοί επιζώντες δεν έχουν την κατασκευή BOEtTA, επειδή βρίσκεται στο φυλετικό χρωμόσωμα X του πατέρα, άρα η ανθεκτικότητά τους θα υπάρχει λόγω ένθεσης ή διαγραφής από τη μετάθεση του TREP. Είναι τα θηλυκά που έχουν και την κατασκευή TREP και τον ενεργοποιητή tTA, ώστε να έχουμε ενίσχυση του αμέσως επόμενου, κατά τη φορά 3΄, γονιδίου από τον ελάχιστου υποκινητή hsp70. Οπότε η ανθεκτικότητα στα θηλυκά θα βασίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου αυτού.

Ένα παράδειγμα για τη διαδικασία διασταυρώσεων της ενθετικής μεταλλαξιγένεσης σε όλο το γονιδίωμα δίνεται παρακάτω. (Σχήμα 4)



Σχήμα 4: Σχήμα διασταυρώσεων για την ενθετική μεταλλαξιγένεση: Αναπαράσταση μιας νέας ένθεσης στο 4° χρωμόσωμα. Νέες ενθέσεις αποκτούνται με τη διασταύρωση TREP ([w+]) με Iso31 [SM6, MiT 2.4]/Sco (πηγή τρανσποζάσης Minos). Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 37 βαθμούς κελσίου στο στάδιο της προνύμφης έως ότου εμφανιστούν νύμφες. Οι θηλυκοί απόγονοι με κόκκινα μάτια. ([w+}) και κυρτά φτερά (CyO[T]) (jumpstarters συλλέγονται και διασταυρώνονται με αρσενικά BOEtTA. Στη συνέχεια οι απόγονοι επιλέγονται σε υψηλή συγκέντρωση diflubenzuron. Οι επιζώντες, (survivors), με κόκκινα μάτια και άρα την κατασκευή TREP συλλέγονται για περαιτέρω έλεγχο. [w+]: κατασκευή TREP, Cyo[T]: πηγή τρανσποζάσης του *Minos*, GFP: κατασκευή BOEtTA.

3. Προσδιορισμός της θανατηφόρας συγκέντρωσης, (LC) του diflubenzuron:

Με σκοπό τον προσδιορισμό της θανατηφόρας συγκέντρωσης, που θα χρησιμοποιούσαμε αργότερα στο πείραμα, πραγματοποιήσαμε βιοδοκιμές, όπου οι μύγες αφέθηκαν να γεννήσουν σε φιαλίδια με κλιμακούμενες συγκεντρώσεις εντομοκτόνων ενσωματωμένες στο θρεπτικό μέσο δροσόφιλας. Πρέπει να τονιστεί ότι είναι πολύ σημαντικό η δόση του εντομοκτόνου να είναι αρκετά τοξική ώστε να αφήνει μόνο τους ανθεκτικούς απόγονους να επιβιώσουν. Έτσι, θέλοντας να λάβουμε υπ' όψιν παράγοντες όπως το γενετικό υπόβαθρο και τον αριθμό των προνυμφών στα φιαλίδια, χρησιμοποιήσαμε μύγες από τη δεύτερη διασταύρωση, (20 Θηλυκά jumpstarters x 10 αρσενικά BOEtTA), τις οποίες αφήσαμε να γεννήσουν αυγά σε φιαλίδια με diflubenzuron για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Η θνησιμότητα στο diflubenzuron υπολογίστηκε με βάση πόσοι από τους απογόνους κατάφεραν να φτάσουν στο στάδιο του ενήλικου. Για κάθε συγκέντρωση έγιναν τρεις επαναλήψεις και συνολικά το πείραμα έγινε σε δύο επαναλήψεις των 24 ωρών. Η κλίμακα των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εξής:

- 0.25ppm – 0.5ppm – 1ppm – 2ppm – 4ppm – 8ppm

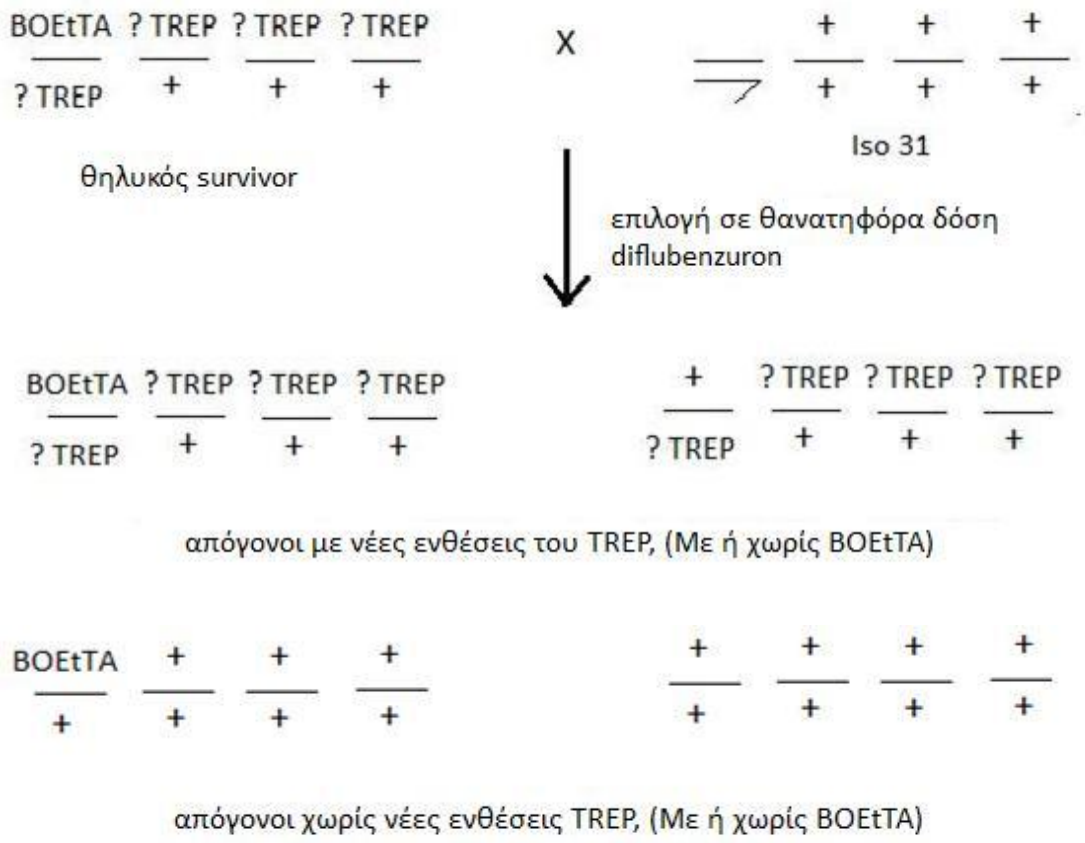
4. Επανέλεγχος των επιζώντων, (survivors) για ανθεκτικότητα στο Diflubenzuron:

Οι απόγονοι της δεύτερης διασταύρωσης που επιζούν τη θανατηφόρα δόση του εντομοκτόνου και έχουν κόκκινα μάτια, άρα το στοιχείο TREP που έχει κάνει νέα μετάθεση, συλλέγονται και περνούν από καινούριο έλεγχο ως προς την ανθεκτικότητά τους. Αυτό γίνεται γιατί δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η ένθεση του TREP είναι που πραγματικά χαρίζει την ανθεκτικότητα στο diflubenzuron, οπότε περαιτέρω έλεγχος είναι απαραίτητος.

Για να πραγματοποιηθεί αυτός ο έλεγχος κάνουμε άλλη μία διασταύρωση των επιζώντων, που συλλέχθηκαν στο τελευταίο βήμα της ενθετικής μεταλλαξιγένεσης. Αυτή η διασταύρωση γίνεται με ενήλικα της σειράς iso31 σε αναλογία 3 προς 1. Δηλαδή κάθε θηλυκός survivor

διασταυρώνεται με 3 αρσενικά iso 31 και αντίστροφα. Τα ενήλικα τοποθετούνται σε φιαλίδια με τη θανατηφόρα δόση του εντομοκτόνου ενσωματωμένη στο θρεπτικό υλικό τους για να γεννήσουν αυγά και ελέγχονται οι φαινότυποι των απογόνων που φτάνουν στο στάδιο του ενήλικου. Αν οι απόγονοι εμφανίζουν φαινότυπο μόνο κόκκινων ματιών τότε η ανθεκτικότητα είναι πιθανό να προκαλείται από τη νέα ένθεση του TREP, ενώ αν συνυπάρχει ο φαινότυπος των κόκκινων ματιών με αυτό τον λευκών, τότε η ανθεκτικότητα δεν σχετίζεται με την ένθεση του TREP.

Ένα παράδειγμα της διαδικασίας διασταυρώσεων για τους θηλυκούς επιζώντες φαίνεται παρακάτω, (Σχήμα 5)



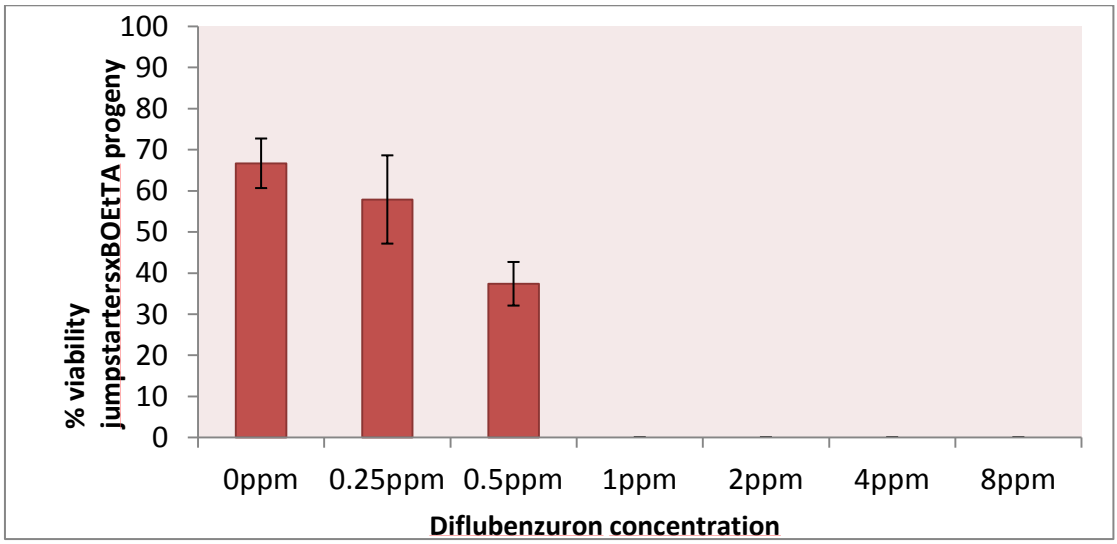
Σχήμα 5: Διασταυρώσεις ελέγχου θηλυκών survivors για ανθεκτικότητα στο diflubenzuron: Η διασταύρωση θηλυκών survivors με iso31 γίνεται σε αναλογία 3:1. Το θηλυκά γεννούν αυγά σε θρεπτικό μέσο με θανατηφόρα συγκέντρωση diflubenzuron και οι απόγονοι ελέγχονται φαινοτυπικά. Μόνο κόκκινα μάτια, (Δείκτης του TREP), υποδεικνύει συσχέτιση ανθεκτικότητας και ένθεσης. Συνύπαρξη κόκκινων με λευκά μάτια, υποδεικνύει μη συσχέτιση ανθεκτικότητας και ένθεσης του TREP.

Αποτελέσματα:

1. Προσδιορισμός της θανατηφόρας συγκέντρωσης, (LC) του diflubenzuron:

Η θανατηφόρα συγκέντρωση του diflubenzuton προσδιορίστηκε με μια σειρά βιοδοκιμών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν απόγονοι της δεύτερης διασταύρωσης, (jumpstarters x BOEtTA), για να ληφθεί υπ' όψιν το γενετικό υπόβαθρο. Επίσης τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν για 24 ώρες σε φιαλίδια με θρεπτικό μέσο που είχε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις diflubenzuron ενσωματωμένες, για να ληφθούν υπ' όψιν οι συνθήκες του κανονικού πειράματος, όπως ο αριθμός των αυγών σε κάθε φιαλίδιο. Κάθε συγκέντρωση έγινε σε τρεις επαναλήψεις και όλο το πείραμα των 24 ωρών επαναλήφθηκε 2 φορές. Τα αποτελέσματα είναι συγκεντρωτικά.

Ελέγχθηκαν 200 απόγονοι, (24h) των θηλυκών jumpstarters με αρσενικά BOEtTA ανά συγκέντρωση, σε αυτούς είχαμε. 66. 7%, (±6.02) επιβίωση στα φιαλίδια control, 57.9%, (±10.7) επιβίωση στα 0.25ppm, 37.4%, (±5.3) επιβίωση στα 0.5ppm, 0%, (±0), επιβίωση στα 1ppm, 0%, (±0), επιβίωση στα 2ppm, 0%, (±0), επιβίωση στα 4ppm, και 0%, (±0) επιβίωση στα 8ppm.



Σχήμα 7: Βιωσιμότητα (%) των απογόνων της διασταύρωσης θηλυκών jumpstarters με αρσενικά BOEtTA σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις diflubenzuron: 20 θηλυκά με 10 αρσενικά μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια και αφέθηκαν για 24 ώρες με σκοπό να γεννήσουν

~200 αυγά. Τα ενήλικα αφαιρέθηκαν και μετρήθηκε ο αριθμός των ενηλίκων που κατάφεραν να εκδυθούν.

Με βάση τα αποτελέσματα, η θανατηφόρα δόση του diflubenzuron υπολογίστηκε στα 3ppm για ένα πείραμα όπου η δεύτερη διασταύρωση θα μεταφέρεται κάθε 24 ώρες.

2. Ενθετική μεταλλαξιγένεση σε όλο το γονιδίωμα:

Στόχος μας κατά την ενθετική μεταλλαξιγένεση ήταν να καλύψουμε το 3-5% του γονιδιώματος της *D. melanogaster.* Έχει εξακριβωθεί ότι το γονιδίωμα της δροσόφιλας περιέχει περίπου 13.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, (Adams *et al*, 2000). Γι' αυτό το λόγο κατά τη μελέτη μας δημιουργήσαμε περίπου 3000 θηλυκά jumpstarters τα οποία διασταυρώσαμε και οι απόγονοι πέρασαν από επιλογή σε 3ppm diflubenzuron. Κάθε ένα από τα θηλυκά αφέθηκε να γεννήσει 100 περίπου αυγά σε φιαλίδια με θρεπτικό μέσο που είχε ενσωματωμένη τη θανατηφόρα δόση του εντομοκτόνου, άρα ελέγχθηκαν για ανθεκτικότητα 300.000 αυγά. Έτσι, αναμένονταν, στις πέντε φορές που καλύφθηκε το γονιδίωμα, να επηρεαστούν 600 γονίδια, (3000 νέες ενθέσεις του TREP/5), τουλάχιστον μία φορά το καθένα. Άρα καλύψαμε ένα ποσοστό περίπου 4,6% του γονιδιώματος, οπότε πετύχαμε το στόχο μας. Ωστόσο, κανένας από τους απογόνους δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο, ώστε να επιβιώσει τη θανατηφόρα δόση.

Συζήτηση:

Τα εντομοκτόνα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην σύγχρονη γεωργία, με την αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων, αλλά και στην υγεία με τη αντιμετώπιση εντόμων που είναι φορείς ασθενειών. Έτσι η ανάπτυξη ανθεκτικότηταw από τους επιβλαβείς πληθυσμούς στο πεδίο αποτελεί μεγάλο πρόβλημα. Ένας από τους τρόπους για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος είναι η διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης των εντομοκτόνων σε μοριακό επίπεδο, έτσι ώστε να είναι πιο αποτελεσματική η χρήση τους, καθώς και η κατασκευή

νέων εντομοκτόνων. Ωστόσο τα μοριακά μονοπάτια και οι στόχοι πολλών εντομοκτόνων, όπως το diflubenzuron, που χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες, παραμένουν άγνωστα. Η απόκτηση αυτών των γνώσεων θα μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για τη βελτιστοποίηση και την καλύτερη χρήση τέτοιων σκευασμάτων.

Στην παρούσα μελέτη κινηθήκαμε προς αυτή την κατεύθυνση, δηλαδή τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του diflubenzuron με τη χρήση ενθετικής μεταλλαξιγένεσης που θα καλύπτει ολόκληρο το γονιδίωμα, σε συνδυασμό με έντονη επιλογή σε θανατηφόρες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου αυτού. Ένα μέρος του ελέγχου περιλάμβανε τον προσδιορισμό της θανατηφόρας δόσης diflubenzuron και ένα άλλο την κάλυψη ενός ποσοστού 3-5% του γοδινιώματος της *Drosophila melanogaster,* με τη δημιουργία νέων ενθέσεων της κατασκευής TREP. Έτσι θα μπορούσαμε να ανακαλύψουμε και να χαρακτηρίσουμε κάποιο γονίδιο που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα στο diflubenzuron, αφού η κατασκευή TREP συσχετίζεται μ' αυτό σαν ταμπέλα, καθιστώντας εύκολη την απομόνωσή του.

Όπως αναφέρθηκε πρώτο βήμα ήταν ο προσδιορισμός της θανατηφόρας συγκέντρωσης του diflubenzuron, η οποία θα χρησιμοποιούταν για την επιλογή. Θέλοντας να λάβουμε υπ' όψιν τις συνθήκες της επιλογής, όπως το γενετικό υπόβαθρο των μυγών και τον αριθμό των προνυμφών σε κάθε φιαλίδιο, χρησιμοποιήσαμε τους απογόνους της διασταύρωσης των θηλυκών jumpstarters με BOEtTA, σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις diflubenzuron. Τα θηλυκά αφέθηκαν να γεννήσουν αυγά, (~200) για 24 ώρες και η δόση προσδιορίστηκε με βάση τον αριθμό των απογόνων που κατόρθωσαν να εκδυθούν και να φτάσουν στο στάδιο του ενήλικου. Η θανατηφόρα δόση diflubenzuron προσδιορίστηκε στα 3ppm.

Ακολούθησε η διαδικασία της ενθετική μεταλλαξιγένεσης κατά την οποία διασταυρώθηκαν 3000 περίπου θηλυκές jumpstarters, που έφεραν τουλάχιστον 3000 νέες ενθέσεις του TREP στα γαμετικά τους κύτταρα. Στη συνέχεια διασταυρώθηκαν με αρσενικά BOEtTA και αφέθηκαν να γεννήσουν αυγά σε φιαλίδια με θρεπτικό μέσο, το οποίο περιείχε ενσωματωμένο diflubenzuron σε συγκέντρωση 3ppm diflubenzuron. Αν λάβουμε υπ' όψιν ότι το γονιδίωμα της δροσόφιλας

περιλαμβάνει περίπου 13.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και καλύφθηκε πέντε φορές από τον έλεγχο, περιμέναμε 600 τουλάχιστον γονίδια να επηρεαστούν τουλάχιστον μια φορά από τις νέες ενθέσεις του TREP. Έτσι ο στόχος να καλύψουμε το 3-5% του γονιδιώματος πραγματοποιήθηκε, αφού καλύψαμε ένα ποσοστό ~4.6%.

Αν και ένα ποσοστό 4.6% του γονιδιώματος καλύφθηκε κατά τη διαδικασία της ενθετικής μεταλλαξιγένεσης, δεν υπήρξε κανένας επιζώντας, (survivor), από τη θανατηφόρα δόση του diflubenzuron. Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο μικρό ποσοστό του γονιδιώματος που καλύφθηκε. Ωστόσο το σύστημα *Minos* αποτελεί εργαλείο μεγάλης αποτελεσματικότητας για τη διαλεύκανση μηχανισμών δράσης εντομοκτόνων μέσω ενθετικής μεταλλαξιγένεσης και προτείνεται επανάληψη του πειράματος και για άλλα σκευάσματα.

Βιβλιογραφία:

Zhu, F. *et al.* (2010) A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. Proc. *Natl. Acad. Sci.* 107: 8557-8562

Wilson, T.G. (2001) Resistance of Drosophila to toxins. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 545-571

White, K.P. *et al*. (1999) Microarray analysis of Drosophila development during metamorphosis. *Sci.* 286, 2179-2184.

Tweedie, S. *et al*. (2009) FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res*. 37(Database issue): D555-559.

Tabashnik ,B.E. *et al*. (2009) Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. *J. of Econ. Entomol.* 102, 2011-2025

Sullivan, W. *et al.* (2000) Drosophila protocols. NY, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Reumer *et al*, (2007), How functional genomics and genetics complements insect endocrinology,

Raymond-Delpech, *et al,* (2005), Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci. 5, 119–133.*

Perry ,T. *et al.* (2011) The biology of insecticidal activity and resistance. Ins*. Biochem. Biol.* 41, 411-422

Pavlopoulos, A. *et al.* (2007) The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertabrates and invertabrates. *Gen. Biol. 8: S2*

Pardue, M.L., (1986) In situ hybridisation to DNA of chromosomes and nuclei. Drosophila: A practical approach. D. B. Roberts, Oxford: IRL press

Nicholson, (2006), Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon 49 (2007) 413–422*

Nakagawa *et al,* (1994), Diflubenzuron Stimulates Phosphorylation of a 39 kDa Integumental Protein from Newly Molted American Cockroach (*Periplaneta americana*).

Nakagawa *et al,* (1994), Diflubenzuron Affects Gamma-thioGTP Stimulated Ca 2+ Transport in vitro in Intracellular Vesicles from the Integument of the Newly Molted American Cockroach, *Periplaneta americana L.*

Merzendorfer (2011) The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences, University of Osnabrück, Faculty of Biology and Chemistry, Department of Animal Physiology.

Loukeris, T.G. *et al.* (1995) Introduction of the transposable element *Minos* into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Gen.* 92, 9485-9489

Handler, *et al*, (2006), Transposable Elements for Insect Transformation, *El. 459*

George Vassiliou *et al,* (2010), The Use of DNA Transposons for Cancer Gene Discovery in Mice, El.

ffrench-Constant, R.H. *et al*. (1993) A point mutation in an Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance. *Nat.* 363, 449-451

ffrench-Constant, R.H. *et al*. (1991) Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Aci.* 88, 7209-7213

ffrench-Constant, R.H. (1994) The molecular and population genetics of cyclodiene insectide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 335-345

Feyereisen, INRA, Centre de Recherches de Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, France (2005), *Elsevier, 1-58*

Drabek, *et al* (2002), Tansposition of the Drosophila hydei Minos transposon in the mouse germ line. *El. 108-109.*

Dhadialla, *et al,* (2005) Insect Growth- and Development-Disrupting Insecticides, *Elsevier, 55-100*

de Almeida, *et al*, (2005), Multiple events of horizontal transfer of the Minos transposable element between Drosophila species *El. 583*.

Casida, *Handbook of Pesticide toxicology 3rd edition 2010, 103-113*

Casida and Quistad (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of non-acetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol. 17, 983–998.*

Casida and Quistad (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol. 43, 1–16*.

Casida and Quistad (2001). Insect toxicology in the beginning: William Muriece Hoskins. *Pest Manag. Sci. 57, 875–876*

Brogdon *et al*, (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Dis. 4, 605–613.*

Adams, M.D. *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Sci.* 287, 2185-2195.

Abo-Elghar, *et al* (2004), Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica.*