

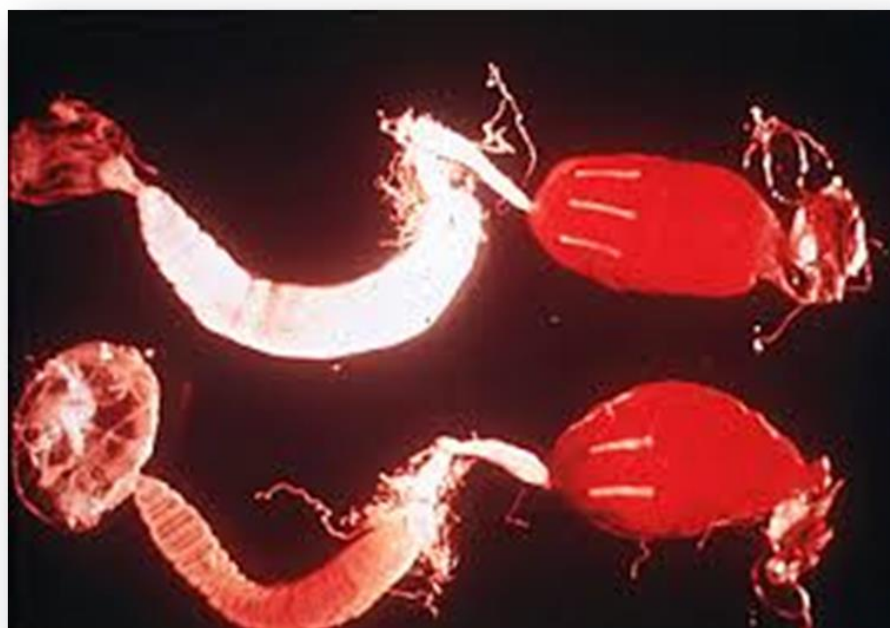


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γενετικής
ΠΜΣ: 'Βιολογία Συστημάτων'**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Συγκριτική γενωμική των μικροσποριδίων της μέλισσας.
Εφαρμογή που παρουσιάζει τα σύγχρονα δεδομένα της
παρασίτωσης από *Nosema* των μελισσών στην Ελλάδα”



ΟΥΡΑΝΙΑ Γ. ΚΑΡΑΟΥΛΑΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Ηλίας Ηλιόπουλος, Τακτικός
Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2017

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συγκριτική γενωμική των μικροσποριδίων της μέλισσας.
Εφαρμογή που παρουσιάζει τα σύγχρονα δεδομένα της
παρασίτωσης από *Nosema* των μελισσών στην Ελλάδα.

ΟΥΡΑΝΙΑ Γ. ΚΑΡΑΟΥΛΑΝΗ

Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Ηλίας Ηλιόπουλος, Τακτικός Καθηγητής
Ελένη Ντούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Κοσμίδης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα
Ιούλιος 2017

Πηγή εικόνας εξωφύλλου: <http://www.bee-pollen-health.com/nosema-and-honey-bees>

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Η Μέλισσα και η Σημασία της	8
1.1.1. Τα μικροσπορίδια	10
1.1.1.1. Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης	14
1.1.1.2. Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης	16
1.1.1.3. Απακετυλάση της Χιτίνης	17
1.2. Γενωμική σύγκριση μεταξύ των <i>Nosema apis</i> και <i>Nosema ceranae</i>	19
1.3. Σκοπός	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1. Μέθοδοι	23
2.1.1. Δειγματοληψία	23
2.1.2. Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού <i>Nosema apis</i> και <i>Nosema ceranae</i> με μικροσκόπηση	24
2.1.3. Μέθοδος απομόνωσης DNA	27
2.1.4. Ενίσχυση ειδικής αλληλουχίας DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
2.1.4.1. Βασική αρχή της μεθόδου	28
Εικόνα 11. Μέθοδος PCR	30
2.1.4.2. Αντιδραστήρια	31
2.1.4.3. Πρόγραμμα PCR	31
2.1.5. Εκκινητές	32
2.1.5.1. Σχεδιασμός των εκκινητών των τριών επόμενων αντιδράσεων PCR	33
2.1.6. Ηλεκτροφόρηση	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1. Μικροσκόπηση	37
3.2. Αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR	38
3.2.1. Πρώτος κύκλος αντιδράσεων PCR	38
3.2.2. Δεύτερος κύκλος αντιδράσεων PCR	40
3.2.3. Τρίτος κύκλος αντιδράσεων PCR	40
3.2.4. Τέταρτος κύκλος αντιδράσεων PCR	41
3.2.5. Πέμπτος κύκλος αντιδράσεων PCR	42
3.2.6. Εκκινητές των αντιδράσεων PCR	43
3.2.7. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μικροσκοπίας και των αντιδράσεων PCR	46
3.3. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών	47
3.4. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις	54
3.5. <i>In silico</i> ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ενός πιθανού φαρμάκου του μικροσπορίδιου <i>Nosema ceranae</i>	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	67

Ευχαριστίες

Το θέμα της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής επιλέχθηκε λόγω του διαρκώς αυξανόμενου προβλήματος που προκαλεί η ασθένεια των μελισσών Νοσέμωση με το οποίο ήρθα σε επαφή κατά την διάρκεια της υπηρεσίας μου στο Εργαστήριο Παρασιτολογίας Παρασιτικών Νοσημάτων και Παθολογίας Μελισσών της Διεύθυνσης του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών.

Θα ήθελα κατά αρχάς να ευχαριστήσω τη διακεκριμένη κτηνίατρο- μελισσοπαθολόγο κα Μαρία Πασαλόγλου η οποία με πολλή αγάπη με μύησε στον κόσμο της μελισσοπαθολογίας. Το πειραματικό μέρος της εργασίας μου έλαβε χώρα στο εργαστήριο Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών της Διεύθυνσης του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών το οποίο μου παραχωρήθηκε με πολύ χαρά από τον προϊστάμενο του κ. Αθανάσιο Πράττα χωρίς την συνδρομή του οποίου θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση των αναγκαίων πειραματικών δοκιμών. Δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στον έμπειρο συνάδελφο Zhang Xueyong από την Qinghai Academy of Animal and Veterinary Sciences χάριν στον οποίο έμαθα να προχωρώ βρίσκοντας και άλλα μονοπάτια από τα προτεινόμενα.

Πολύ σημαντική υπήρξε και η συνεισφορά του συναδέλφου κ. Κωνσταντίνου Ουρεϊλίδη, υπεύθυνου του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς για τη Παθολογία των Μελισσών που μου παρείχε όλες τις σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την παρουσία της νόσου στη Ελλάδα.

Ευχαριστώ την Στέλλα Χαραλαμποπούλου η οποία έκανε την αντιστοίχιση των γονιδιωμάτων *Nosema apis* και *Nosema ceranae* και τα αρχικά 3D μοντέλα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Ηλία Ηλιόπουλο οποίος πίστεψε σε εμένα καθώς και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Ντούνη στο ιδιαίτερα φιλόξενο εργαστήριο της οποίας ξεκίνησα τις μοριακές τεχνικές καθώς και τον καθηγητή κ. Νικόλαο Κοσμίδη για την συμμετοχή του στην εξεταστική μου επιτροπή.

Τέλος ευχαριστώ τον σύζυγο μου για την ενθάρρυνση του σε αυτή μου τη προσπάθεια αλλά και τους γονείς μου που τους ευγνωμονώ πάντα γιατί μου εμφύσησαν την αγάπη για τη γνώση και μου έμαθαν πως όταν υπάρχει λαχτάρα για τη κατάκτησης έστω και ένα μικρού μέρους της, δεν υπάρχουν στεγανά ή εμπόδια.

Περίληψη

Η παρούσα εργασία αφορά την μελέτη, με μεθόδους μοριακής γενετικής, γενετικής μηχανικής και βιοπληροφορικής, των μικροσποριδίων *Nosema apis* και *Nosema ceranae* τα οποία ευθύνονται για την ασθένεια νοζέμωση που προσβάλλει τις μέλισσες. Η μέλισσα θεωρείται το πιο σπουδαίο έντομο από οικονομικής άποψης παίζει δε επίσης ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του οικοσυστήματος, γεγονός που αποδεικνύει την αναγκαιότητα της προσπάθειας αντιμετώπισης της νοσέμωσης η οποία αποτελεί ολοένα και σοβαρότερο πρόβλημα στη μελισσοκομία. Η έως σήμερα φαρμακευτική προσέγγιση της νόσου μέσω του αντιβιοτικού φουματζιλλίνη δεν θεωρείται πλέον ικανοποιητική καθότι η φουματζιλλίνη χρησιμοποιείται κυρίως ενάντια στο μικροσπορίδιο *Nosema apis* το οποίο ήταν εκείνο που παρασιτούσε στην δυτική μέλισσα *Apis mellifera* στην Ευρώπη και την Αμερική. Η από δεκαετίας όμως διαρκώς και συχνότερη εύρεση του μικροσποριδίου *Nosema ceranae* της ασιατικής μέλισσας *Apis cerana* και στην *Apis mellifera* αλλάζει τα φαρμακευτικά δεδομένα αφού διαπιστώνεται ότι η φουματζιλλίνη δεν εμφανίζεται εξίσου αποτελεσματική σε αυτό το είδος μικροσποριδίου. Καθίσταται λοιπόν πλέον επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων μέσων για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου. Στην παρούσα εργασία γίνεται η παρουσίαση μιας μεθοδολογικής προσέγγισης μέσω της οποίας μπορούν να επιλεγούν δυνητικά καινούργιοι φαρμακευτικοί στόχοι ενάντια στη νοσέμωση. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν δεκατέσσερα δείγματα μελισσών από ασθενείς κυψέλες με συμπτώματα νοσέμωσης που προέρχονται από διαφορετικά μέρη της Ελλάδας. Αρχικά τα δείγματα μικροσκοπήθηκαν για να διαπιστωθεί η παρασίτωσή τους από τα μικροσποριδία και ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των σπορίων που περιείχαν. Χρησιμοποιώντας μοριακές μεθόδους (αντιδράσεις PCR) χαρακτηρίστηκαν όλα τα δείγματα για την μόλυνση μόνο από *N. ceranae*, γεγονός που επιβεβαιώνει την διαπίστωση πως η τελευταία αντικαθιστά σταδιακά την *N. apis* στην Ελλάδα. Κατόπιν έγινε η επιλογή των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν ως πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι. Μεταξύ όλων των ορθόλογων πρωτεϊνών της *N. apis* και της *N. ceranae* με τον πρότυπο για τα μικροσπορίδια οργανισμό *Encephalitozoon cuniculi* επιλέγησαν τρεις πολύ σημαντικές για την φυσιολογία των μικροσποριδίων πρωτεΐνες: η Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης, αναστολή της οποίας επιτυγχάνεται με την

φουματζιλίνη στην *N. apis*, η Απακετυλάση της Χιτίνης και η Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης. Η πρωτοταγής δομή των συγκεκριμένων τριών πρωτεϊνών εμφανίζει μικρές μόνο διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα δύο είδη μικροσποριδίων ενώ η τριτοταγής τους δομή έχει μεγάλη ομοιότητα. Ακολούθησαν τρεις αντιδράσεις PCR, μία για το αντίστοιχο γονίδιο κάθε πρωτεΐνης. Από τα αποτελέσματα των αντιδράσεων αυτών καθίσταται σαφές πως τα γονίδια που τις κωδικοποιούν δεν εκφράζονται εξ ίσου σε όλα τα δείγματα παρόλο που είχε διαπιστωθεί η μόλυνση τους από *N. ceranae*. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανώς τα εν λόγω γονίδια εκφράζονται μονό σε συγκεκριμένα στάδια της ζωής του σπορίου, παραδείγματος χάριν, τη στιγμή της βλάστησης του, γεγονός που δικαιολογεί την έως σήμερα αδυναμία αποτελεσματικής αντιμετώπισής του παρασίτου. Τέλος πραγματοποιήθηκε μία *in silico* ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ενός πιθανού φαρμάκου του μικροσποριδίου *Nosema ceranae*.

Λέξεις-Κλειδιά: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, nosemosis, μοριακές τεχνικές, μοριακοί δείκτες, βιοπληροφορικές προσεγγίσεις

Abstract

In the present thesis, the *Nosema apis* and *Nosema ceranae* microspores were studied by employing both molecular genetics and bioinformatics methods. The *Nosema* species cause nosemosis, a disease which affects adult honeybees. Honeybee is considered to play an important role in economy and the ecosystem functioning, further pointing out the need to prevent the spread of nosemosis, which presents an increasingly serious problem in beekeeping. The current pharmaceutical approach to nosemosis using the antibiotic fumagillin is no longer effective, since fumagillin is mainly used against *Nosema apis*, the parasite of Western *Apis mellifera* in Europe and America. This is further supported by the more and more frequent detection of *Nosema ceranae* microspores, which infect the Asian bee *Apis cerana* and *Apis mellifera*, over the last decade, as it has been shown that fumagillin does not appear as effective against *N. ceranae* microspores. There is, therefore, an urgent need to find new means of managing nosemosis effectively. In this work, a methodological approach for identifying potentially new pharmaceutical targets against nosemosis is presented. In particular, fourteen samples of honeybees from diseased beehives with nosemosis symptoms from different parts of Greece were tested. Initially, the samples were examined using light microscopic procedures to detect their infection by the *Nosema ceranae* microspores, followed by quantification of the microspores they contained. Using molecular methods (PCR reactions) all samples infected by *N. ceranae* were characterized, which further confirms the finding that *N. ceranae* is gradually replacing *N. apis* in Greece. The proteins tested as potential pharmaceutical targets were then selected. Among all of the *N. apis* and *N. ceranae* proteins orthologous to the *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidian model organism, three proteins which play a vital role in the microsporidian physiology were selected: Methionine Aminopeptidase 2, which is known to inhibit fumagillin in *N. apis*, Chitin Deacetylase, and Fructose Bisphosphate Aldolase. The primary structure of the three proteins in the two *Nosema* species was found to vary slightly, while their tertiary structure was highly similar. Three cycles of PCR reactions, one for the corresponding gene of each protein, followed. On the basis of the results of the PCR reactions it is becoming clear that the genes coding for these three proteins are not expressed equally in all samples, although their infection with *N. ceranae* has been established. This leads to the suggestion that these genes are

likely to be expressed exclusively at certain stages of the life cycle of *N. ceranae*, e. g. at the time of its germination, and this is probably the cause of the failed efforts to effectively treat the parasite so far. Finally, an *in silico* identification and characterization of potential drug targets for *Nosema ceranae* microspores was performed.

Keywords: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, nosemosis, molecular approaches, molecular markers, bioinformatics methods

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η Μέλισσα και η Σημασία της



Η μέλισσα είναι έντομο του γένους *Apis* (**Εικόνα 1**) και θεωρείται το πιο σημαντικό από όλα τα έντομα για την οικονομία και το οικοσύστημα λόγω της συμβολής της στην αναπαραγωγική διαδικασία των φυτών (επικονίαση) αλλά και στη πληθώρα των προϊόντων που παράγει (μέλι, γύρη βασιλικό πολτό, κεριά κ.α). Μία μέτρια αποικία μελισσών υπολογίζεται ότι έχει είκοσι έως σαράντα φορές μεγαλύτερη αξία για την επικονίαση που επιτελούν τα μελισσοσμήνη της σε σχέση με την παραγωγή της σε μέλι. Αξίζει να σημειωθεί πως η επικονίαση που συντελείται από τα έντομα αντιστοιχεί στο 9.5% της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής και οι μέλισσες επιτελούν το 80% περίπου αυτής. Σύμφωνα με το Συμβούλιο Άμυνας Φυσικών Πόρων (NRDC) των Η.Π.Α η ετήσια οικονομική αξία των μελισσών που αφορά στην επικονίαση των φυτών υπολογίζεται περίπου στα 15 δισεκατομμύρια δολάρια ενώ η αντίστοιχη παραγωγή σε μέλι κοστολογείται στα 150 εκατομμύρια δολάρια. Συνολικά οι μέλισσες είναι απαραίτητες για την παραγωγή των δύο τρίτων της ανθρώπινης διατροφής είτε άμεσα μέσα από το ρόλο τους στη γονιμοποίηση των καλλιεργειών είτε έμμεσα μέσω της αναγκαιότητας της στη παραγωγή των ζωοτροφών και συνεπώς στη διατήρηση του ζωικού κεφαλαίου. Η αναγκαιότητα της παρουσίας της μέλισσας στη ζωή του ανθρώπου τόσο γιατί η οικονομική της αξία η οποία

μεταφράζεται σε ένα σημαντικό κομμάτι της παγκόσμιας οικονομίας όσο και στη συμβολή της στη διατήρηση των οικοσυστημάτων σε όλο τον κόσμο οδήγησε την επιστημονική κοινότητα στη διαρκώς αυξανόμενη προσπάθεια προστασίας της από παράγοντες ,όπως οι ασθένειές της, που έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών της. Μια από τις πιο σημαντικές ασθένειες των μελισσών λέγεται νοσέμωση και οφείλεται στα μικροσπορίδια *Nosema apis* και *Nosema ceranae* .

- Βασίλειο: Animalia
- Συνομοταξία: Arthropoda
- Κλάση: Insecta
- Τάξη: Hymenoptera
- Υπόταξη: Apocrita
- Υπεροικογένεια: Apoidea
- Οικογένεια: Apidae
- Υποοικογένεια: Arinae
- Φύλο: Arini
- Γένος: Apis
- Υπογένος: Apis
- Είδος: *A. mellifera*
Υποείδος: *Apis mellifera carnica*
Υποείδος: *Apis mellifera caucasica*
Υποείδος: *Apis mellifera ligustica*
Υποείδος: *Apis mellifera mellifera*



Εικόνα 1. Ταξινομική κατάταξη

Η πιο γνωστή από όλες τις μέλισσες παγκοσμίως είναι η Ευρωπαϊκή ή Δυτική μέλισσα (*Apis mellifera*).

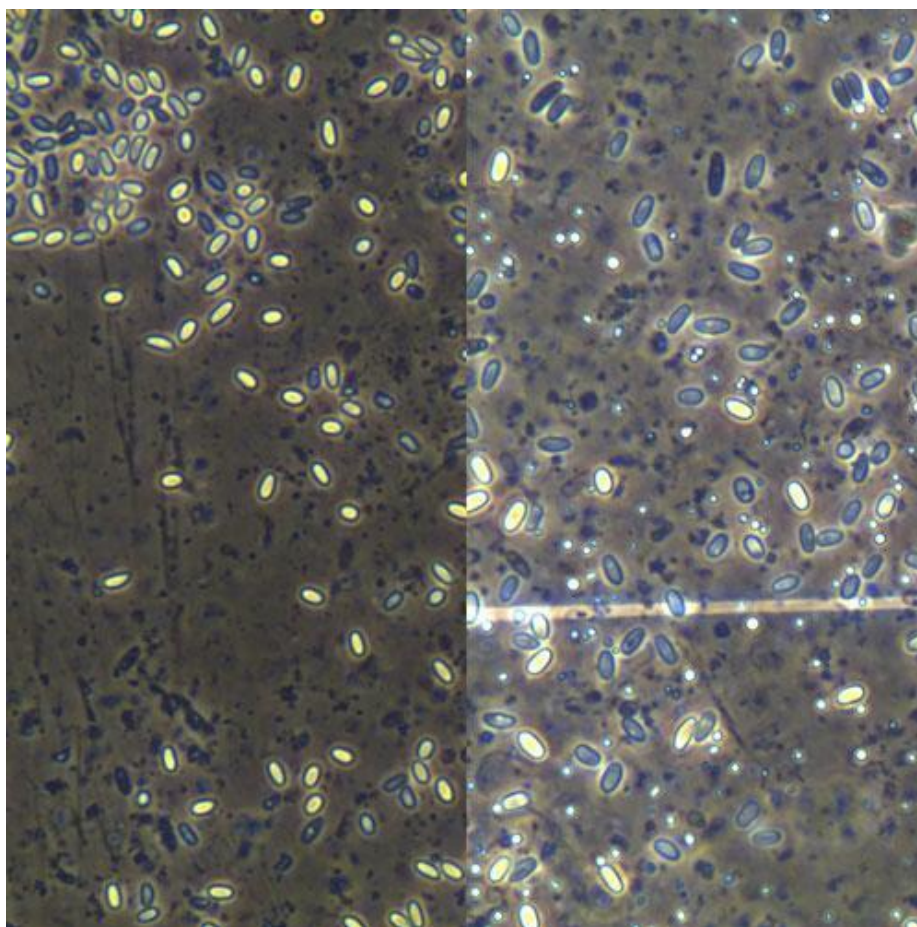
1.1.1. Τα μικροσπορίδια

Τα μικροσπορίδια είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα που μοιάζουν με μύκητες και που μπορούν να μολύνουν πολλούς διαφορετικούς μεταξύ τους οργανισμούς, τόσο σπονδυλωτούς όσο και ασπόνδυλους, ιδιαίτερα δε τα έντομα.

Έως σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερα από 1200 είδη μικροσποριδίων [1-3], τα οποία με τη σειρά τους ανήκουν σε τουλάχιστον 150 διαφορετικά γένη. Μερικά από τα είδη αυτά μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά σύνδρομα στον άνθρωπο, κυρίως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς καθώς και ευκαιριακές λοιμώξεις σε ασθενείς με σύνδρομο AIDS [4, 5].

Μέχρι πρόσφατα θεωρούσαμε πως τα μικροσπορίδια ήταν πρωτόγονα πρωτόζωα, καθώς δεν διαθέτουν τυπικά ευκαρυωτικά οργανίδια όπως π.χ. μιτοχόνδρια ή την κλασική συσκευή Golgi. Σύμφωνα όμως με πρόσφατα στοιχεία αποδείχθηκε πως τα μικροσπορίδια διαθέτουν ένα «μιτόσωμα» [6] καθώς και γόνιδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μιτοχονδριακής προέλευσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μικροσπορίδια κάποτε είχαν μιτοχόνδρια αλλά τα έχασαν κατά την εξελικτική τους πορεία. Βάσει λοιπόν των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών, και σε συνδυασμό με την παρουσία σπόριων που περιέχουν χιτίνη και τρεχαλόζη όπως ακριβώς συμβαίνει και στους μύκητες, τα μικροσπορίδια θεωρήθηκε πως θα μπορούσαν να ανήκουν στους μύκητες [7-9], με τη διαφορά όμως ότι υπέστησαν σημαντικές γενετικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της προσαρμοστικής τους εξέλιξης. Η ακριβής πάντως σχέση τους με την ομάδα των μυκήτων δεν έχει ακόμα πλήρως καθοριστεί [10].

Από τα μικροσπορίδια εκείνα με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία ανήκουν στο γένος *Nosema*.

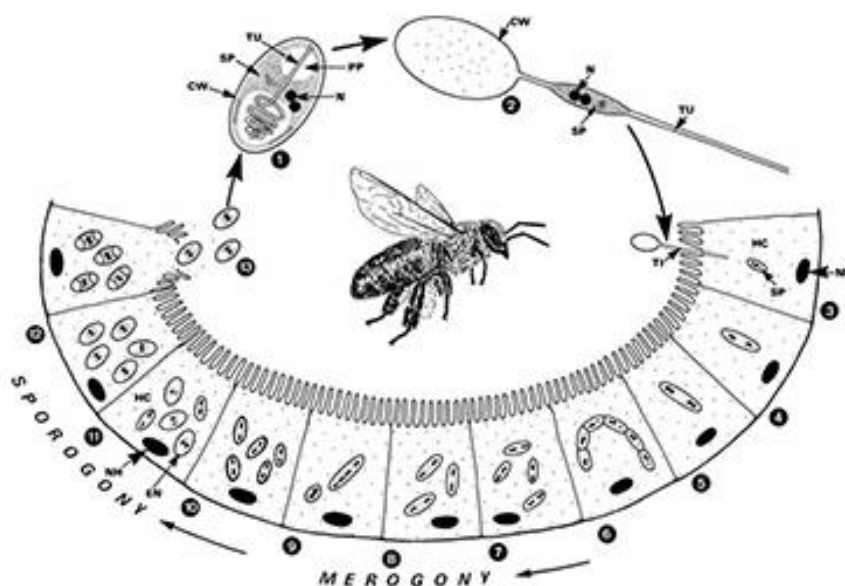


Εικόνα 2. Σπόρια της *N. ceranae* (αριστερά) και της *N. apis* (δεξιά) κάτω από την ίδια μεγένθυση (400x) χρησιμοποιώντας σύνθετο μικροσκόπιο. Το σπόριο της *N. ceranae* είναι περίπου 20% μικρότερο από εκείνο της *N. apis* και μοιάζει με αμύδαλο.

Η *N. apis* και η *N. ceranae* (Οικογένεια: Nosematidae, Γένος: Nosema) αποτελούν τα δύο πιο σημαντικά είδη μικροσποριδίων που προσβάλλουν τις μέλισσες (εργάτριες, βασίλισσες και κηφήνες) και προκαλούν την ασθένεια που ονομάζεται νοζέμωση (**Εικόνα 2**). Η *N. apis* πρωτοπεριγράφηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα και αποτέλεσε εξ αρχής σοβαρό πρόβλημα της μελισσοκομίας της *Apis mellifera* στα εύκρατα κλίματα. Η *N. ceranae* προέρχεται από την Ασία και είχε ως αρχικό ξενιστή την μέλισσα *Apis cerana*. Η εύρεση της όμως και στις ευρωπαϊκές μέλισσες [11], κατέστησε επιτακτική την ανάγκη για περαιτέρω επιδημιολογική έρευνα σχετικά με τις συνθήκες της γρήγορης και ευρείας διασποράς της παγκοσμίως.

Ο βιολογικός κύκλος των *N. apis* και *N. ceranae* είναι παρόμοιος και έχει ως εξής:

Η μέλισσα καταπίνει την μολύνουσα μορφή του μικροσποριδίου, τα σπόρια, συνήθως με την τροφή ή το νερό αλλά και κατά την διάρκεια του καθαρισμού των μολυσμένων κηρήθρων. Αξίζει να σημειωθεί πως ένα και μόνο σπόριο είναι αρκετό για να μολύνει μία ενήλικη μέλισσα. Στη συνέχεια τα σπόρια φθάνουν στο μέσο έντερο της όπου διεγείρονται από τις φυσικές και χημικές συνθήκες που επικρατούν εκεί βλασταίνουν και εξωθούν το πολικό σωληνάριο που διαθέτουν εγχέοντας το μολυσματικό σποροπλάσμα τους στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου του ξενιστή. Μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, το σποροπλάσμα υφίσταται διαίρεση με δυαδική σχάση (merogony) ή πολλαπλή σχάση (schizogony) που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σπορίων (sporogony). Ο επαναλαμβανόμενος αυτός πολλαπλασιασμός έχει ως αποτέλεσμα την πλήρωση των επιθηλιακών κυττάρων με σπόρια τα οποία τρέφονται από τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν εκεί έως την πλήρη εξάντληση όλων των αποθεμάτων. Τελικά επέρχεται την ρήξη των επιθηλιακών κυττάρων που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση νέων σπορίων στο έντερο του ξενιστή (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ο βιολογικός κύκλος της *Nosema* spp.

Μια βαριά μολυσμένη από *Nosema* spp ενήλικη μέλισσα μπορεί να περιέχει έως και 50 εκατομμύρια σπόρια του παρασίτου. Τα ώριμα σπόρια που απεκκρίνονται με τα περιττώματα μπορούν να μολύνουν τόσο άλλους ξενιστές όσο και καινούργιες αποικίες μελισσών [12].

Σε αντίθεση με την *N. apis* που σπορογονεί μόνο στα κύτταρα του μέσου εντέρου, η *N. ceranae* μολύνει ακόμα τα μαλπιγγιανά σωληνάκια, τους υποφαρυγγικούς και σιαλογόνους αδένες αλλά και τα κύτταρα του σωματικού λίπους [13] γεγονός που την καθιστά δυνητικά πιο επικίνδυνη .

Τα αποτελέσματα της παρασίτωσης των μελισσών από *N.apis* και *N. ceranae* είναι πολλά και καταστροφικά. Ο μεταβολισμός τους μειώνεται σημαντικά, αδυνατούν να πετάξουν μακριά προς αναζήτηση τροφής και η δυσεντερία που τους προκαλεί συχνά τις καθιστά επιρρεπείς σε δευτερογενείς λοιμώξεις. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δραματική μείωση της διάρκειας ζωής τους (έως και 78%). Σε περίπτωση μόλυνσης της βασίλισσας του σμήνους η αντικατάσταση της γίνεται άμεσα, μέσα σε δέκα έως τριάντα ημέρες από την μέρα της μόλυνση της. Σε ψυχρά όμως κλίματα, όπου η αντικατάσταση αυτή δεν μπορεί να λάβει χώρα για πολλούς μήνες οι μολυσμένες αποικίες των μελισσών οδηγούνται συχνά στον θάνατο.

Η ασθένεια της νοσέμωσης πέραν του ότι έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού της μολυσμένης κυψέλης έχει επίσης ενοχοποιηθεί πως συντελεί σημαντικά και στο σύνδρομο κατάρρευσης των μελισσιών [14].

Η πρώτη φαρμακευτική προσπάθεια καταπολέμησης της νοσέμωσης ξεκίνησε στις ΗΠΑ πριν από εξήντα περίπου χρόνια [15]. Το αντιβιοτικό φουματζιλίνη το οποίο στοχεύει το ένζυμο των ευκαριωτικών κυττάρων Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (MAP2) [16] αποτελεί την μόνη αξιόπιστη θεραπευτική μέθοδο κατά της *N. apis*. Τα αποτελέσματα όμως της φουματζιλίνης κατά του μικροσποριδίου *N. ceranae* παρουσιάζονται αντιφατικά καθότι αποδείχθηκε ότι απαιτούνται μεγαλύτερες από τις αντίστοιχα ενδεικνυόμενες εναντίον της *N. apis* δόσεις και ότι τα βάσει πρωτοκόλλου συνιστώμενα δασολογικά σχήματα όχι μόνο δεν κατέστειλαν την δράση του μικροσποριδίου αλλά ίσως να αποτέλεσαν μία από τις αιτίες της αντικατάστασης της *N. apis* από τη *N. ceranae* σε διάφορες περιοχές της γης [16-19].

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην Ευρώπη η χρήση της φουματζιλίνης στην μελισσοκομία έχει απαγορευθεί καθότι δεν έχει ακόμα καθοριστεί το μέγιστο όριο υπολειμμάτων της στο μέλι.

Το πρώτο μικροσπορίδιο στο οποίο ερευνήθηκε η δράση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού ήταν το *Encephalitozoon cuniculi*. Το γονιδίωμα του εν λόγω μικροσποριδίου είναι το πρώτο που αλληλουχήθηκε και μελετήθηκε εκτενώς και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως πρότυπο στη μελέτη των υπολοίπων μικροσποριδίων [20].

Από την συγκριτική μελέτη του γονιδιώματος των τριών μικροσποριδίων *N. apis*, *N. ceranae* και *Encerphalitozoon cuniculi* βρέθηκαν 1357 ορθόλογα γονίδια όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 4** όπου παρουσιάζονται ενδεικτικά τα πρώτα 39 γονίδια.

ID	Reference	Start	Stop	TRANSLATION	PFAM	BLAST	ID	Scarf/ID	Start	End	Amino Acid Sequence	Seq. Description	InterProScan	GOs
NcORF-00001	Nc000001-45607	525	1350	MVGGFAWEKVEKRTWLDSEI AN1-like Zinc finger (3.7) E. cuniculi: similarity to NPAPIS-01367		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-01367		ncsf71.180000046900.2413	3213	3213	MLNLSLNVVYKYPDENPFIhik basal transcription factor	IPRO00495; PTHR1067.F:response to stress;		
NcORF-00002	Nc000001-45607	1625	1969	MVNTVENLGIQVVKREKES zinc an1-type domain 6		E. cuniculi: hypothetical	NPAPIS-01366	ncsf71.180000046900.927	1265	1265	MVNTVENLGIQVVKREKES zinc an1-type domain 6	IPRO00008; PTHR106.F:binding		
NcORF-00006	Nc000001-45607	5477	6724	VYFTTFPMFKKAKMAYFYV		E. cuniculi: hypothetical	NPAPIS-00845	ncsf71.180000046838.5025	5339	5339	MNDPLFMEFHWLWVWVhypothetical protein NcER_1003 no IPS match	-		
NcORF-00007	Nc000001-45607	7542	11122	MNTKTEYKQKTPFHLHLDNA gyrase/topoisomerase II		E. cuniculi: DNA TOPISG	NPAPIS-00842	ncsf71.180000046830.1084	2451	2451	MNTKTEYKQKTPFHLHLDNA gyrase/topoisomerase II	IPRO01154; IPRO0115.F:transcription factor activity; F:DNA binding		
NcORF-00010	Nc000001-45607	11983	12927	MFKYKCCDFDFISVSEVAW		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00675		ncsf71.180000046814.21859	22383	22383	MVLMADHGFKLKMFVFAhypothetical protein NcER_1003 seq (SEG)	IPRO02186; G3D5A3.C:intracellular; Cnuc		
NcORF-00011	Nc000001-45607	13577	14063	MNTVFAEDKDFNFKFKA		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00675		ncsf71.180000046814.20596	21261	21261	MENIFSEKDFKHFQFNEK rna-binding protein	IPRO02186; G3D5A3.C:intracellular; Cnuc		
NcORF-00012	Nc000001-45607	14574	15299	MSTKKAQSLKAVLPTDYS		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00675		ncsf71.180000046814.15348	16121	16121	MOTDKVTLKLVFTFKK hypothetical protein NcER_1003 seq (SEG)	-		
NcORF-00013	Nc000001-45607	15796	16488	MFCANWVPLMDEDRK Transcription initiation I		E. cuniculi: TRANSCRIPTH	NPAPIS-00672	ncsf71.180000046814.14377	15033	15033	MFCANWVPLMDEDRK general transcription factor pol	IPRO03136; IPRO110.C:nucleoplasm; P:tra		
NcORF-00014	Nc000001-45607	17371	18056	MFKIKPTLSDIQPQLESLK		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00671		ncsf71.180000046814.11473	12003	12003	MNTRLLVNLVEELVSI hypothetical protein NcER_1003 no IPS match	-		
NcORF-00015	Nc000001-45607	18140	19366	MTUNENWELLVGKVFVAATPase family associate E		E. cuniculi: 265 PROTEAD	NPAPIS-00670	ncsf71.180000046814.10109	11053	11053	MAVYVVGKDKKIDAKII265 protease regulatory subunit	IPRO03593; IPRO039.F:protein binding; P:regulation of biological		
NcORF-00016	Nc000001-45607	19475	19903	MENLNLKFKYKPLNKTLNTO		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00669		ncsf71.180000046814.8897	9646	9646	MESLNLKFKYKPLNKTFEST --NA--	seq (SEG)		
NcORF-00018	Nc000001-45607	22238	23538	MQDWHFHWVWQDQVNEI Methylglyoxal-protein N		E. cuniculi: GYLCPYRPTFI	NPAPIS-00668	ncsf71.180000046814.5315	6376	6376	MQDWHFHWVWQDQVNEI glyoxylidase n-tetraoxygenase II	IPRO00503; IPRO161.F:transferase activity		
NcORF-00019	Nc000001-45607	23482	24073	MKVKVNPSTLHSDVDM Protein kinase domain II		E. cuniculi: SE87FH PRD	NPAPIS-01012	ncsf71.180000046859.19209	16393	16393	MKVKVNPSTLHSDVDM the protein kinase (mbk-dyl) seq (SEG)	-		
NcORF-00020	Nc000001-45607	24971	27421	MEMNDSNDQNDKQVSEQ Paired amphipathic helix I		E. cuniculi: hypothetical	NPAPIS-00666	ncsf71.180000046814.753	1661	1661	MEFDTFRAEDQSEAL transcriptional regulator-like	IPRO02942; IPRO065.F:binding; P:nucleobase, nucleoside, nucleot		
NcORF-00021	Nc000001-45607	28847	29341	MKMKNDQDQVYKIDQV Ribosomal protein L11		E. cuniculi: 60S RIBOSOM	NPAPIS-01010	ncsf71.180000046859.8966	9483	9483	MKMKNDQDQVYKIDQV ribosomal protein L12	IPRO00911; IPRO207.C:ribosome; F:structu		
NcORF-00023	Nc000001-45607	29623	30303	MIFPFFSDFKAGLSLVPFQ		E. cuniculi: EXPORTIN II	NPAPIS-01009	ncsf71.180000046859.8115	8807	8807	MIFPFFSDFKAGLSLVPFQ hypothetical protein NcER_1003	IPRO00712; G3D5A2.-		
NcORF-00027	Nc000001-45607	34790	35593	MAESTQVQDQDQVDM Zinc finger, C2HC4 type I		E. cuniculi: TRANSCRIPTH	NPAPIS-01002	ncsf71.180000046858.11203	11687	11687	MQDQDQVQDQDQVDM rna polymerase II transcription	IPRO01841; IPRO045.F:binding; P:biologica		
NcORF-00028	Nc000001-45607	35932	38574	MCKKVVAKKAKVSDTNSP		E. cuniculi: hypothetical	NPAPIS-01001	ncsf71.180000046858.6244	7304	7304	MKMKVVAKKAKVSDTNSP hypothetical protein NcER_1003 seq (SEG)	-		
NcORF-00029	Nc000001-45607	38692	39024	MNKPUPFMEKGVKFLKLV Transcription initiation I		E. cuniculi: TRANSCRIPTH	NPAPIS-01000	ncsf71.180000046858.5350	5661	5661	MREGKVVFFMEKGVKFLKLV transcription initiation factor I	IPRO03195; IPRO090.F:DNA binding; F:tran		
NcORF-00030	Nc000001-45607	39119	42196	MQDLNLEKPEFISVFDVH Exportin 1-like protein I2		E. cuniculi: EXPORTIN I	NPAPIS-00999	ncsf71.180000046858.2365	3855	3855	MELYANNQVDELLETI exportin 1	IPRO11989; IPRO139.F:protein transport; F:binding; F:transporter		
NcORF-00031	Nc000001-45607	42825	43095	MKPVYQVWVWVWVWV Transposase/ISomere I		E. cuniculi: TIGDSE PRD2	NPAPIS-00997	ncsf71.180000046858.9506	1619	1619	MKPVYQVWVWVWVWV rna polymerase II transcription	IPRO00552; IPRO157.F:binding; C:cell wall		
NcORF-00034	Nc000001-45607	46873	47658	MNVIVPQNLVLEHQLALV		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-01815		ncsf71.180000046858.8935	9687	9687	MNVIVPQNLVLEHQLALV similarity to ribonucleoside diphosphate	IPRO06596; G3D5A3.F:kinase activity; P:pl		
NcORF-00035	Nc000001-45607	47818	49348	MTDVFVEFEGTSMEDCLV GDP dissociation inhibitor E		E. cuniculi: RAB GDP DISI	NPAPIS-01814	ncsf71.180000046858.4881	5894	5894	MVYDFVAFEGTSMEDCLV rab protein geranylgeranyltrans	IPRO18203; G3D5A3.F:transferase activity		
NcORF-00036	Nc000001-45607	49531	50052	MKFFPISLWFDQALALAC Transmembrane adaptor E		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00709		ncsf71.180000046811.7321	7839	7839	MKFFPISLWFDQALALAC protein tex261-like	IPRO07277; seq (SEG) C:cell		
NcORF-00037	Nc000001-45607	50588	52143	MKQVLEKLEKVPYDQV Exportin complex component		E. cuniculi: hypothetical	NPAPIS-00708	ncsf71.180000046811.546	6158	6158	MKQVLEKLEKVPYDQV Exportin complex subunit acd	IPRO10136; IPRO121.C:cytoplasm		
NcORF-00039	Nc000001-45607	54665	56089	MKSQVLEKLEKVPYDQV RNA synthetases class II		E. cuniculi: PHENYLALAN	NPAPIS-00707	ncsf71.180000046812.512	2005	2005	MKSQVLEKLEKVPYDQV phenylalanyl-trna synthetase II	IPRO02319; IPRO045.F:catalytic activity; P:nucleotide binding; P:n		
NcORF-00041	Nc000001-45607	58010	61285	MKQVLEKLEKVPYDQV RNA polymerase Rpo2, di E		E. cuniculi: DNA DIRECTE	NPAPIS-01291	ncsf71.180000046887.36337	37650	37650	MKQVLEKLEKVPYDQV dna-directed rna polymerase II	IPRO07642; IPRO076.F:transferase activity; P:transcription; F:DNA		
NcORF-00043	Nc000002-58817	2733	3617	MKSHIEDVLIATTRGEAHN Glycero-phosphoryl diester		E. cuniculi: glycerophosph	NPAPIS-02168	ncsf71.180000047030.45534	46250	46250	MKSHIEDVLIATTRGEAHN glycerophosphoryl diester phos	IPRO04129; IPRO179.F:primary metabolic		
NcORF-00054	Nc000002-58817	13816	15515	MKQVLEKLEKVPYDQV Pyruvate kinase A-type and B E		E. cuniculi: 205 PROTKAL	NPAPIS-02110	ncsf71.180000047018.4046	23793	23793	MKQVLEKLEKVPYDQV pyruvate kinase associated transactin I	IPRO02590; IPRO115.C:nucleus; F:protein binding; P:nucleobase; F		
NcORF-00055	Nc000002-58817	17518	19947	MKQVLEKLEKVPYDQV Pyruvate kinase A-type and B E		E. cuniculi: hypothetical	NPAPIS-01484	ncsf71.180000046917.10208	12028	12028	MKQVLEKLEKVPYDQV hypothetical protein NcER_1003 seq (SEG)	-		
NcORF-00057	Nc000002-58817	21193	29538	MKQVLEKLEKVPYDQV ATPase family associate E		E. cuniculi: putative prot	NPAPIS-02746	ncsf71.180000047095.9131	9131	9131	MPNDQVLEKLEKVPYDQV willibrand factor type a domain	-		
NcORF-00058	Nc000002-58817	29666	30292	MKQVAVIQDQVFNKLVKLV ADP-ribosylation factor E		E. cuniculi: GTP-BINDING	NPAPIS-02745	ncsf71.180000047095.5314	5937	5937	MKQVAVIQDQVFNKLVKLV adp ribosylation factor I	IPRO03579; IPRO052.F:nucleotide binding		
NcORF-00059	Nc000002-58817	30380	32147	MFTQVAVYDQVHLLVSTI MGCAT family (3.40E-03) E		E. cuniculi: STEROL_04-C	NPAPIS-00457	ncsf71.180000046775.22	1156	1156	MFTQVAVYDQVHLLVSTI methyl-g-acyltransferase I	IPRO02399; IPRO143.C:cell; F:transferase a		
NcORF-00062	Nc000002-58817	35894	37177	MNVKVTQMKRSLHMDAVD Acyltransferase (3.40E-0) E		E. cuniculi: 1-ACYL-SN-GL	NPAPIS-00459	ncsf71.180000046775.12518	13222	13222	MNVKVTQMKRSLHMDAVD 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate	IPRO023063; IPAN108.F:transferase activity; P:biosynthetic proces		
NcORF-00066	Nc000002-58817	40019	42496	MALQDNRISLSLKVYVH Putative ATPase (DUF699) E		E. cuniculi: similarity to NPAPIS-00462		ncsf71.180000046775.22170	22170	22170	MTRSDQDQVITVSLVSI similarity to hypothetical protein	IPRO07807; PTHR108.F:transferase activity; P:biosynthetic proces		
NcORF-00067	Nc000002-58817	42928	43332	SAKRGKVPKMKYKCEVU1 zinc finger (1.20E-008) E		E. cuniculi: U1 SMALL_NU	NPAPIS-00463	ncsf71.180000046775.23374	23676	23676	MHLRGTQVTKLAKTKLLU1 small nuclear ribonucleoprotein coil (COI), seq (SEG)	IPRO02599; coil (COI) F:hydrolase activity; I		
NcORF-00068	Nc000002-58817	43325	43951	MADQVAVYDQVHLLVSTI ATP synthase subunit D I		E. cuniculi: HADQVAVI AT	NPAPIS-00464	ncsf71.180000046775.23805	24505	24505	MADQVAVYDQVHLLVSTI ATP synthase subunit D	IPRO02599; coil (COI) F:hydrolase activity; I		
NcORF-00069	Nc000002-58817	43981	45130	MALVSEIPEKDFKFKQKERE ATPase family associate E		E. cuniculi: 265 PROTEAD	NPAPIS-00525	ncsf71.180000046788.4152	9321	9321	MALVSEIPEKDFKFKQKERE 265 protease regulatory subunit	IPRO03593; IPRO039.F:protein binding; P:regulation of biological		

Εικόνα 4. Ορθόλογα γονίδια που είναι κοινά μεταξύ των μικροσποριδίων *Nosema apis*, *Nosema ceranae* και *Encerphalitozoon cuniculi*.

Η επιτακτική ανάγκη που παρουσιάζεται για την παρασκευή νέων φαρμάκων τα οποία θα δρουν αποτελεσματικά εναντίων της *Nosema spp* οδηγεί στη προσπάθεια ανεύρεσης νέων τρόπων αντιμετώπισης της νόσου. Χρησιμοποιώντας λοιπόν τα έως σήμερα δεδομένα που αφορούν στο *Encerphalitozoon cuniculi* καθώς και τη τεχνολογία της βιολογίας συστημάτων, επιλέχθηκαν τρεις σημαντικές για την φυσιολογία των μικροσποριδίων πρωτεΐνες οι οποίες θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελέσουν αποτελεσματικούς φαρμακευτικούς στόχους. Στη παρούσα εργασία γίνεται κατά αρχάς η μελέτη της Αμινοπεπτιδάσης 2 της Μεθειονίνης της οποίας μελετάται η παρουσία στα μικροσπορίδια που παρασιτούν στις μέλισσες της Ελληνικής επικράτειας. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν δύο ακόμα πρωτεΐνες , η Απακετυλάσης της Χιτίνης και η Αλδολάσης της Διφωσφορικής Φρουκτόζης. Οι λόγοι για τους οποίους οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες θεωρήθηκαν σημαντικές περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια (1.1.1.1-1.1.1.3).

1.1.1.1. Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης

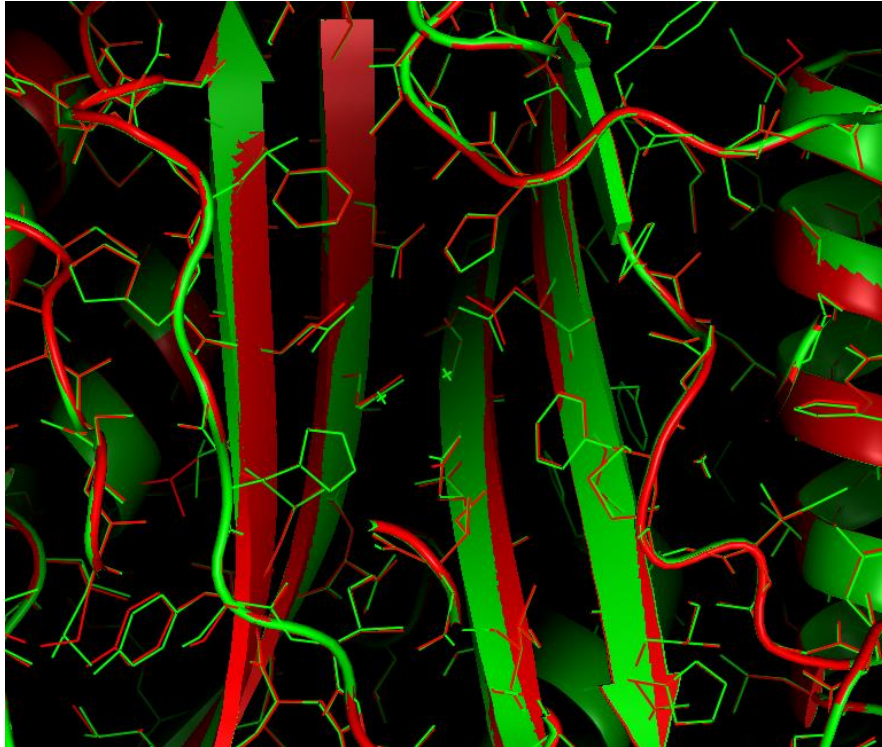
Η Αμινοπεπτιδάση της Μεθειονίνης (methionine aminopeptidase, MAP) (**Εικόνα 5**) καταλύει την απομάκρυνση του N-άκρου του καταλοίπου της μεθειονίνης κατά τη μετάφραση της πρωτεΐνης [21]. Η απομάκρυνση της μεθειονίνης σε μια πρόσφατα

συντεθειμένη πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη σωστή κυτταρική μετατόπιση της πρωτεΐνης [22].

Έχουν αναφερθεί δυο τύποι Αμινοπεπτιδάσης της Μεθειονίνης, η MAP1 και η MAP2. Από αυτές, η MAP2 εμπλέκεται στην προστασία του ευκαρυωτικού παράγοντα eIF2- α (eukaryotic initiation factor 2 alpha) από ανασταλτική φωσφορυλίωση [23]. Επίσης, παίζει ρόλο στην αγγειογένεση, δηλαδή στο σχηματισμό νέων αγγείων σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η οποία είναι απαραίτητη για την αύξηση των καρκινικών όγκων και τις μεταστάσεις.

Αυξημένη έκφραση της MAP2 έχει αναφερθεί σε κύτταρα του μεσοθελιώματος αλλά και σε διάφορα άλλα καρκινικά κύτταρα. Ενώσεις, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια της φουματζιλλίνης, αποτελούν δραστικούς αναστολείς της αγγειογένεσης και αναφέρεται ότι δεσμεύουν την MAP2 και αναστέλλουν τη δραστηριότητά της. Συγκεκριμένα, η MAP2 αναστέλλεται κατά τρόπο μη αναστρέψιμο από τη φουματζιλλίνη και τα παράγωγά της μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης ενός αμινοξικού καταλοίπου της ιστιδίνης στο ενεργό κέντρο με το άτομο άνθρακα του σπειροκυκλικού εποξειδίου στη θέση C3 στο δακτύλιο κυκλοεξανίου της φουματζιλλίνης.

Επειδή η σύνθεση κάθε πρωτεΐνης αρχίζει στο αμινοτελικό άκρο με ένα κατάλοιπο μεθειονίνης ή φορμυλομεθειονίνης, η περιοχή αυτή παρουσιάζει μια πρώιμη και σημαντική θέση επεξεργασίας των πρωτεϊνών. Ειδικές τροποποιήσεις του καταλοίπου της μεθειονίνης, απομάκρυνση της μεθειονίνης-εκκινητή, τροποποίηση της α -αμινομάδας, καθώς και διαδικασίες μετάθεσης επηρεάζουν την πλειοψηφία των πρωτεϊνών και συνδέονται ποικιλοτρόπως με τη σταθερότητα, τη λειτουργικότητα και τη διάσπασή τους [24].



Εικόνα 5. Υπέρθυση των δομών του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης από τη *N. ceranae* (κόκκινο) και τη *N. apis* (πράσινο).

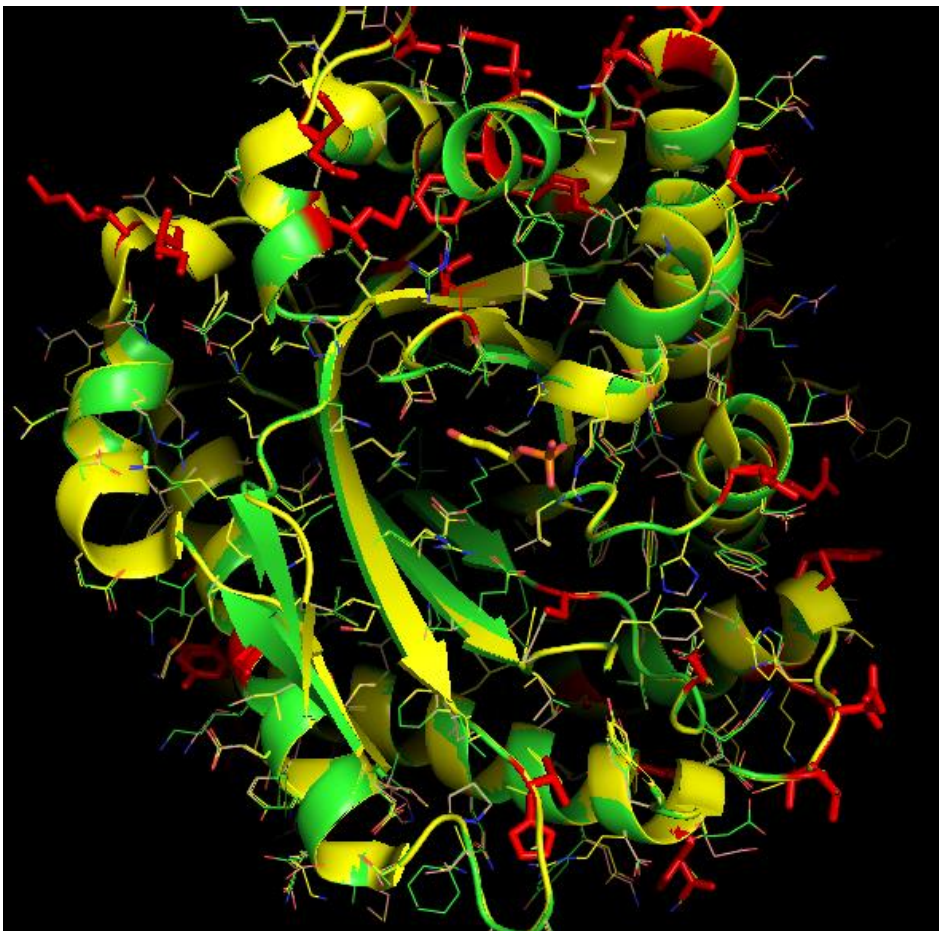
1.1.1.2. Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης

Το ένζυμο της Αλδολάσης της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (fructose biphosphate aldolase, FBPA) (**Εικόνα 6**) είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στις διαδικασίες της γλυκόλυσης, της γλυκονεογένεσης και στον κύκλο του Κάλβιν. Έχει βρεθεί δε σε πολλούς προκαρυωτικούς και ευκαριωτικούς οργανισμούς. Το Seattle Structural Genomic Center for Infectious Diseases (SSGCID), το οποίο στοχεύει σε γονιδιακή προσέγγιση για τη λύση τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών σε παθογόνους οργανισμούς, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στη βιοάμυνα για την αντιμετώπιση αναδυόμενων και επανααναδυόμενων ασθενειών έχει αναφέρει πολλές δομές του FBPA.

Οι αλδολάσες είναι ένζυμα τα οποία διασπούν τις αλδόλες και έχουν μελετηθεί από το 1971. Σήμερα στην Τράπεζα Πρωτεϊνικών Δομών (Protein Data Bank, PDB) έχουν καταχωρηθεί 70 λυμένες δομές αλδολάσης.

Η σπουδαιότητα του γλυκολυτικού ενζύμου Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης FBPA έγκειται στο ότι, αφενός κατά τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης

αναγάγει τη 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, και αφ' ετέρου δε στο ότι κατά τη διαδικασία της γλυκόλυσης χρησιμοποιείται για τη μετατροπή της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης σε φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική διυδροξυακετόνη. Καταλύει, επίσης, και την αντίστροφη αντίδραση. Ανάλυση του γονιδιώματος του ευκαρυωτικού μικροσποριδίου *Encephalitozoon cuniculi* απεκάλυψε ένα ομόλογο του FBPA. Το ενδιαφέρον του SSGCID στο ένζυμο *E. cuniculi* FBPA βασίζεται στο γεγονός ότι θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πιθανό στόχο φαρμάκων και για τον λόγο αυτόν γίνεται προσπάθεια να συγκριθεί το ενεργό κέντρο του *E. cuniculi* FBPA με εκείνο των ομολόγων ενζύμων FBPA στα θηλαστικά.



Εικόνα 6. Υπέρθηση των τριτοταγών δομών της πρωτεΐνης Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης από τη *N. ceranae* (κίτρινο) και τη *N. apis* (πράσινο).

1.1.1.3. Απακετυλάση της Χιτίνης

Το ένζυμο Απακετυλάση της Χιτίνης (**Εικόνα 7**) υδρολύει την ακεταμιδο-ομάδα στις μονάδες της N-ακετυλογλυκοζαμίνης της χιτίνης, παράγοντας μονάδες γλυκοζαμίνης

και οξικό οξύ [25]. Η Απακετυλάση της Χιτίνης ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά σε εκχύλισμα του μύκητα *Mucor rouxii* [26] και βρέθηκε ότι το ένζυμο παίρνει μέρος στη σύνθεση του τοιχώματός του μετατρέποντας την εν τω γίνεσθαι χιτίνη σε χιτοζάνη [27]. Εκτός από τους μύκητες, το ένζυμο απαντάται στα έντομα, θαλάσσια βακτήρια και μικροσπορίδια.

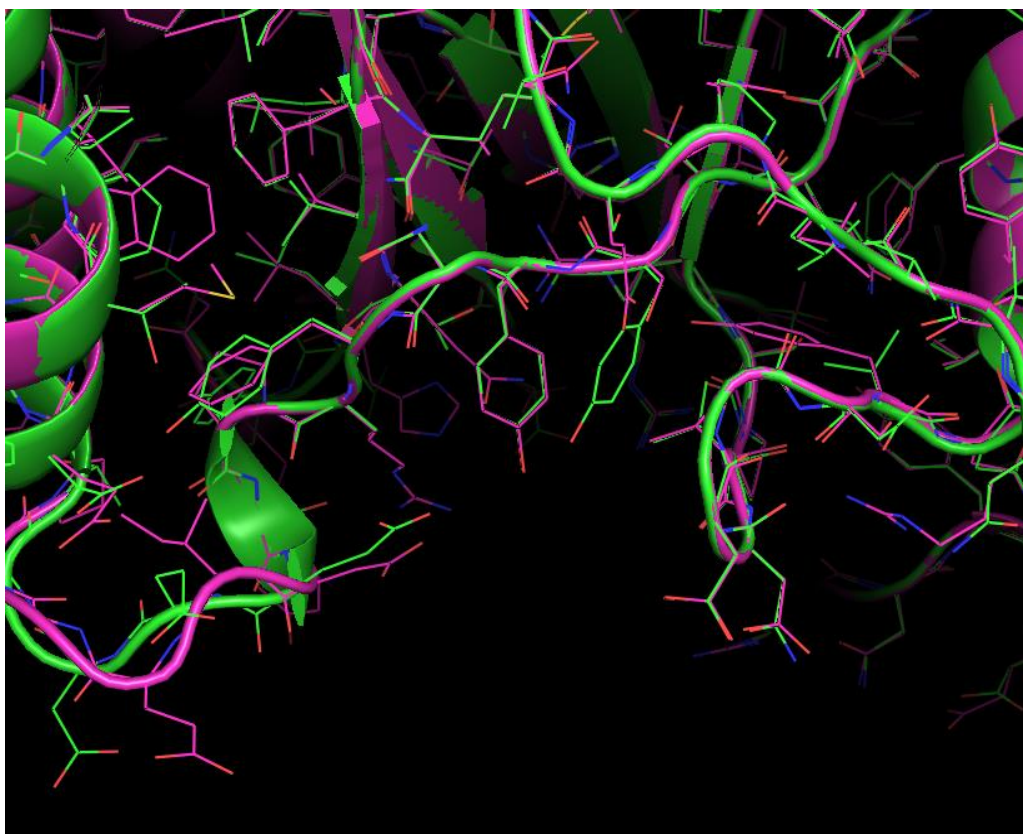
Οι ιδιότητες των διαφόρων ενζύμων Απακετυλάσης της Χιτίνης, τα οποία απομονώθηκαν από διάφορους οργανισμούς, όπως η μοριακή μάζα, το βέλτιστο pH, η θερμοκρασία, η επίδραση των μεταλλικών ιόντων και η εξειδίκευση του ενζύμου προς το υπόστρωμα έχουν υπάρξει συχνά αντικείμενο έρευνας.

Η πιο σημαντική ιδιότητα όμως της χιτίνης έγκειται στο ότι τόσο η σύνθεση όσο και η απακετυλίωση είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του τοιχώματος των σπορίων. Συγκεκριμένα, η μετατροπή της χιτίνης σε χιτοζάνη με δράση της απακετυλάσης της χιτίνης 1 (Cda1) και 2 (Cda2) επιτρέπει την κατασκευή της δεύτερης στρωματικής δομής του τοιχώματος του σπορίου, η οποία βρίσκεται μετά το εξωτερικό στρώμα της διτυροσίνης.

Παρ' όλο που η πρωτεΐνη Cda1 θεωρείται ότι απακετυλιώνει ένα ειδικό υπόστρωμα, το οποίο παράγεται κατά την σπορογονία και είναι σημαντικό για την ωρίμανση των εξωτερικών στρωμάτων του τοιχώματος του σπορίου, καθώς επίσης και ότι η Cda2 είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των στρωμάτων του τοιχώματος του σπορίου, τα οποία περιέχουν χιτοζάνη, ο ρόλος των ενζύμων της Απακετυλάσης της Χιτίνης δεν είναι πλήρως ξεκάθαρος [28].

Έχει αναφερθεί ότι η χιτοζάνη απαντάται στις γέφυρες ανάμεσα στα σπόρια, οι οποίες διατηρούν έναν φυσικό σύνδεσμο ανάμεσά τους μετά την απελευθέρωσή τους από τον ασκό [29]. Η χιτοζάνη που παράγεται με την ενζυματική απομάκρυνση των ακετυλο-ομάδων της εν τω γεννάσθαι χιτίνης αποτελεί σπουδαίο συστατικό του τοιχώματος του κυττάρου ορισμένων μυκήτων και βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας του. Κατά συνέπεια, η αναστολή της Απακετυλάσης της Χιτίνης θα μπορούσε να υποστηρίξει την υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα από φυτικές χιτινάσες, καθιστώντας έτσι εφικτό τον έλεγχο των μυκήτων των φυτών [30].

Με ανάλογους μηχανισμούς η ανασταλτική δράση εν λόγω του ενζύμου θα μπορούσε να ελέγξει και άλλους οργανισμούς όπως είναι τα μικροσπορίδια.



Εικόνα 7. Υπέρθηση των δομών του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης Απακετυλάση της Χιτίνης από τη *N. ceranae* (βιολετί) και τη *N. apis* (πράσινο).

1.2. Γενωμική σύγκριση μεταξύ των *Nosema apis* και *Nosema ceranae*

Διεξήχθη συγκριτική μελέτη των γονιδιωμάτων των τριών υπό εξέταση πρωτεϊνών μεταξύ των ειδών *N. apis* και *N. ceranae* ούτως ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη κατανόηση των ομοιοτήτων και των διαφορών που τις χαρακτηρίζουν.

Το γονιδίωμα της *Nosema ceranae* έχει μέγεθος 7.86 Mb, ενώ το γονιδίωμα της *Nosema apis* είναι ελαφρώς μεγαλύτερο, 8.5 Mb. Τα προβλεπόμενα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες στην *N. ceranae* και *N. apis*, είναι 2614 και 2771, αντίστοιχα (δηλ. 157 περισσότερα γονίδια στην *N. apis*). Ο αριθμός των γονιδίων τα οποία προβλέπονται να κωδικοποιούν tRNA (μη κωδικοποιητικό RNA) είναι παρόμοιος στην *N. ceranae* και *N. apis*, 65 και 62, αντίστοιχα. Τα κοινά ορθόλογα γονίδια στην *N. ceranae* και *N. apis* είναι 1356, τα οποία αντιστοιχούν στο 52% και 49% του συνολικού αριθμού των γονιδίων των αντίστοιχων οργανισμών. Η γονιδιακή

πυκνότητα στο γονιδίωμα της *N. ceranae* είναι 0.33 γονίδια/kb, παρόμοια με εκείνη της *N. apis* (0.326 γονίδια/kb) [31, 32].

Το γονιδίωμα της *Nosema ceranae* είναι εμπλουτισμένο σε ΑΤ, με 26% συνολική περιεκτικότητα σε GC σε ολόκληρο το γονιδίωμα, δηλαδή 7,2% υψηλότερη από αυτή της *Nosema apis* (18,78% συνολική περιεκτικότητα σε GC). Στην *N. ceranae*, οι κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε GC (27%) σε σύγκριση με τη συνολική περιεκτικότητα GC σε όλο το γονιδίωμα. Στην *N. apis*, παρομοίως, οι κωδικοποιούσες περιοχές παρουσιάζουν 25% περιεκτικότητα σε GC, υποδεικνύοντας ότι και στα δυο είδη *Nosema* η περιεκτικότητα GC δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη στο γονιδίωμα και η περιεκτικότητα GC είναι υψηλότερη στις κωδικοποιούσες περιοχές. Επίσης, η περιεκτικότητα σε GC ποικίλλει και στα κωδικόνια, όπου στα συνώνυμα κωδικόνια (δηλ. κωδικόνια που κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξύ), η πρώτη και η δεύτερη θέση έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε GC από την τρίτη θέση [31, 32].

Τόσο η *Nosema ceranae* όσο και *Nosema apis* έχουν παρόμοια προτιμώμενα ή βέλτιστα κωδικόνια, στην τρίτη θέση των οποίων απαντώνται τα νουκλεοτίδια Α ή Τ. Ωστόσο, στην *N. ceranae* χρησιμοποιούνται συχνότερα τα κωδικόνια που έχουν C ή G στην τρίτη θέση, εν αντιθέσει με την *N. apis* όπου τα νουκλεοτίδια Α ή Τ χρησιμοποιούνται συχνότερα [31, 32].

Βάσει λειτουργικού σχολιασμού, τα μεταβολικά ένζυμα που εμπλέκονται στην οδό της φωσφορικής πεντόζης (γλυκόζο-6-φωσφορικής αφυδρογονάσης, 6-φωσφογλυκονική-αφυδρογονάση, ισομεράση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης, επιμεράση της 5-φωσφορικής ριβουλόζης, τρανσκετολάση), στο μονοπάτι της τρεχαλόζης (ουριδυλοτρανσφεράση της 1-φωσφορικής γλυκόζης, τρεχαλόζη-6-φωσφορικού άλατος συνθεάση/φωσφατάση, τρεχαλάση), καθώς και τα ένζυμα εξοκινάση, ισομεράση της φωσφογλυκόζης, φωσφοφρουκτοκινάση, αλδολάση, ισομεράση της φωσφορικής τριόζης, αφυδρογονάση της 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδης, κινάση του φωσφογλυκερικού, ενολάση, πυροσταφυλική κινάση, πυροσταφυλική αφυδρογονάση, βρέθηκαν στην *N. ceranae* και την *N. apis*, υποδεικνύοντας ότι ο μεταβολισμός των υδατανθράκων ευθύνεται κυρίως για την παραγωγή ενέργειας και στα δυο είδη *Nosema* [31, 32].

Τα γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά πρωτεϊνών και την απόκριση στο στρες υπερ-εκπροσώπουνται στην *N. ceranae* σε σύγκριση με τη *N. apis*, ενώ η *N. apis* περιέχει ελαφρώς μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων που ενέχονται στην απόκριση σε

αβιοτικά ερεθίσματα. Και τα δύο είδη υπάρχει περίπου ο ίδιος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με αποκρίσεις σε ενδογενή ερεθίσματα, ενώ τα γονίδια που εμπλέκονται στην απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα και στην ομοιόσταση των κυττάρων βρέθηκαν μόνο στη *N. ceranae* και απουσίαζαν από την *N. apis*. Γονίδια σχετιζόμενα με τη συμβίωση και την αμοιβαιότητα μέσω παρασιτισμού βρέθηκαν αποκλειστικά στην *N. apis* [31, 32].

Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη δομική ακεραιότητα του κύτταρου βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στη *N. ceranae*, σε σύγκριση με τη *N. apis*. Η πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου βρέθηκε μόνο στη *N. ceranae*. Επίσης, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συστατικά της πυρηνικής και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθώς επίσης της μεμβράνης του μιτοχονδρίου και της συσκευής Golgi, βρέθηκαν περίπου σε παρόμοια επίπεδα και για τα δύο είδη *Nosema*. Εντούτοις, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συστατικά των ενδοκυτταρικών μεμβρανών που περιβάλλουν οργανίδια, συμπεριλαμβανομένου του μιτοχονδρίου και του ενδοπλασμικού δικτύου, υπερ-εκπροσωπούνται στη *N. ceranae* σε σχέση με τη *N. apis*, εν αντιθέσει με αυτά του νουκλεοπλάσματος τα οποία υπερ-εκπροσωπούνται σημαντικά στη *N. apis* από ότι στη *N. ceranae*. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες των κενοτοπίων και κυστιδίων υπάρχουν στη *N. ceranae* αλλά απουσιάζουν από τη *N. apis* [31, 32].

1.2. Σκοπός

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι αρχικά η παρουσίαση των σύγχρονων δεδομένων της παρασίτωσης της μέλισσας *Apis mellifera* στην Ελλάδα από τα μικροσπορίδια *N. apis* και *N. ceranae*. Στη συνέχεια γίνεται μία πειραματική και θεωρητική προσέγγιση των τριών σημαντικών για την φυσιολογία των μικροσποριδίων πρωτεϊνών Αμινοπετιδάση 2 της Μεθειονίνης, Απακετυλάση της Χιτίνης και Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης ως στόχων που θα μπορούσαν να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των μικροσποριδίων. Τέλος ακολουθεί μία *in silico* ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ενός πιθανού φαρμάκου του μικροσποριδίου *N. ceranae*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αρχικά συνελέγησαν 14 δείγματα μελισσών από ασθενείς κυψέλες που ήταν τοποθετημένες σε 14 διαφορετικά μέρη της Ελλάδας. Τα δείγματα μικροσκοπήθηκαν, για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι σε αυτά σπορίων *Nosema* spp. Αφού διαπιστώθηκε η ύπαρξη των σπορίων σε όλα τα δείγματα ακολούθησε και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο πρώτος κύκλος αντίδρασεων PCR ο οποίος αποσκοπούσε στην ανίχνευση της παρουσίας σπορίων που ανήκουν στο είδος *Nosema apis*. Ομοίως ακολούθησε και ο δεύτερος κύκλος αντίδρασεων PCR για την ανίχνευση των σπόρων του είδους *Nosema ceranae*.

Ακολούθησαν τρία ακόμα πειράματα PCR ώστε να διαπιστωθεί η παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τρεις σημαντικές για τα σπόρια πρωτεΐνες που μελετούνται ως πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι δηλαδή της Αμινοπεπτιδάσης 2 της Μεθειονίνης (Methionine Aminopeptidase 2), της Απακετυλάσης της Χιτίνης (Chitin Deacetylase) και της Αλδολάσης της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (Fructose Bisphosphate Aldolase, FBPA). Ο σχεδιασμός των εκκινητών των τριών τελευταίων αντιδράσεων PCR έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer-BLAST.

2.1. Μέθοδοι

2.1.1. Δειγματοληψία

Μελετήθηκαν 14 δείγματα το καθένα από τα οποία αποτελείται από περίπου 100 μέλισσες. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από 14 διαφορετικά μέρη της Ελλάδας όπως φαίνεται στην **Εικόνα 8** και στον **Πίνακα 1**. Η αρίθμηση των δειγμάτων αντιστοιχεί σε εκείνη που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μεθόδους που ακολουθούν.



Εικόνα 8. Τα 14 διαφορετικά μέρη της Ελλάδας από τα οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα.

Πίνακας 1. Τα 14 διαφορετικά μέρη της Ελλάδας από τα οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα

1. Κοζάνη
2. Άστρος Κυνουρίας
3. Κόρινθος
4. Καλάβρυτα
5. Δυτική Αττική
6. Ανατολική Αττική
7. Κύθηρα
8. Κύθνος
9. Καλαμάτα
10. Λακωνία
11. Άνδρος
12. Αθήνα
13. Ζάκυνθος
14. Πάτρα

2.1.2. Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού *Nosema apis* και *Nosema ceranae* με μικροσκόπηση

Απαιτούμενα υλικά-εξοπλισμός

1. Συλλέκτριες μέλισσες
2. Οπτικό μικροσκόπιο με δυνατότητα μεγέθυνσης τουλάχιστον 40X10
3. Αιμοκυτταρόμετρο με την καλυπτρίδα του
4. Γουδί
5. Χωνί
6. Γάζα ή άλλο υλικό που θα μπορούσε να χρησιμοποιούσε σαν φίλτρο
7. Διαβαθμισμένοι σωλήνες φυγοκέντρου των 10ml
8. Φυγόκεντρος
9. Νυστέρι-λαβίδα

10. Πιπέτα ή παστεράκι

11. Συσκευή Vortex

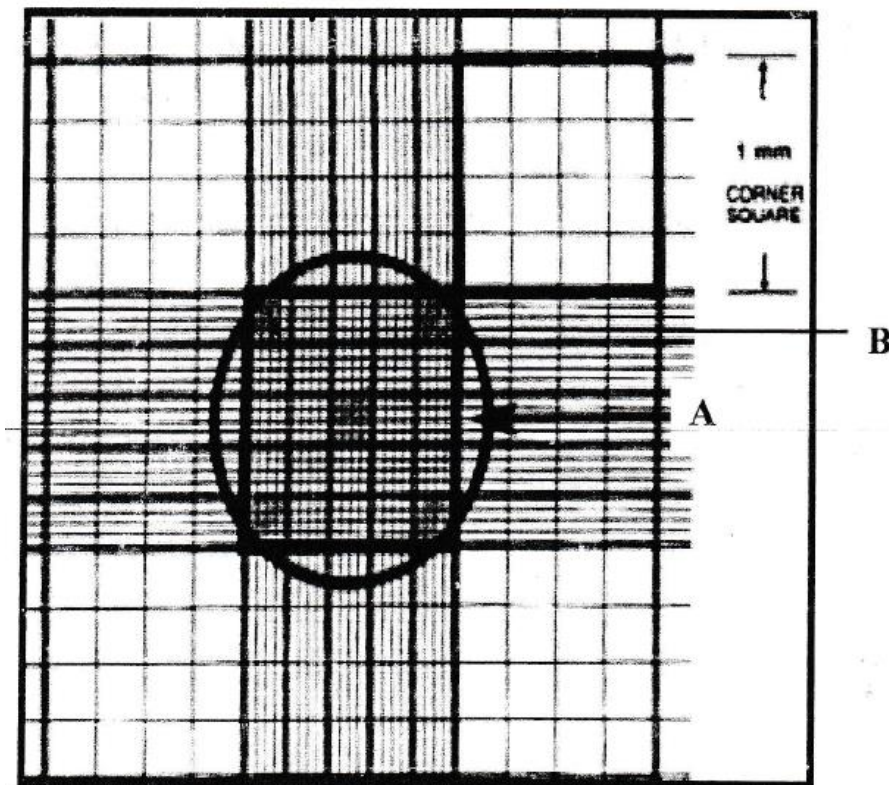
Εκτέλεση

Συλλέγουμε ένα δείγμα από 10 ηλικιωμένες μέλισσες εργάτριες αποχωρίζουμε τις κοιλιές τους και τις βάζουμε σε ένα γουδί με 5 ml νερό όπου τις λειοτριβούμε με ένα γουδοχέρι ώσπου οι ιστοί να γίνουν αρκετά λεπτοί. Το εναιώρημα φιλτράρεται με γάζα δύο στρωμάτων που έχει τοποθετηθεί σε ένα χωνί που οδηγεί σε ένα διαβαθμισμένο σωλήνα φυγοκέντρησης. Χρησιμοποιούμε άλλα 5 ml νερό για να ξεπλύνουμε το γουδοχέρι στο γουδί και κουνώντας κυκλικά το γουδί χύνουμε το υλικό μέσω φίλτρου στο σωλήνα φυγοκέντρησης. Φυγοκεντρούμε 6 λεπτά στα 800g. Πετάμε το υπερκείμενο υγρό και συμπληρώνουμε με νερό τον σωλήνα μέχρι να φτάσουμε ξανά στα 10 ml. Αφού ομογενοποιήσουμε το εναιώρημα με την συσκευή Vortex παίρνουμε άμεσα με παστεράκι ή πιπέτα ένα δείγμα (μία σταγόνα περίπου) από τον σωλήνα φυγοκέντρησης για να γεμίσουμε τον καθορισμένο όγκο του αιμοκυτταρόμετρου και τοποθετούμε την καλυπτρίδα του. Άλλη μία σταγόνα τοποθετείται και σε δεύτερο καθορισμένο όγκο στο αιμοκυτταρόμετρο. Περιμένουμε λίγα λεπτά μέχρι οι σπόροι να έχουν καθιζάνει στους θαλάμους του αιμοκυτταρόμετρου και τότε μόνο μπορεί να ξεκινήσει η καταμέτρηση.

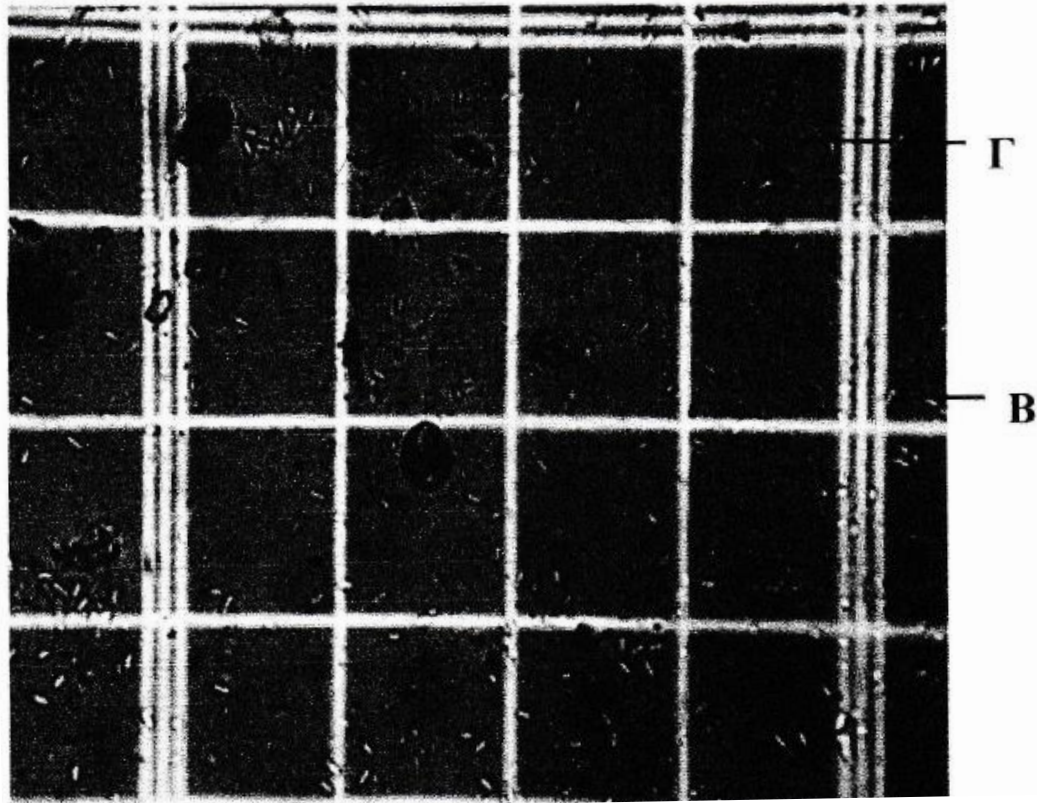
Οι σπόροι την *Nosema* εμφανίζονται διαφανείς με σκούρα ευδιάκριτα όρια ,με μήκος 5-7 μm και 3-4 μm πλάτος. Είναι καλύτερα ορατοί μετά από μεγέθυνση X 400. Καταμετράται ο αριθμός των σπόρων σε κάθε τετράγωνο. Όταν ένας σπόρος εφάπτεται στην άκρη του τετραγώνου καταμετράται μόνο όταν αυτός είναι αριστερά ή στην πάνω πλευρά και δεν καταμετρούνται οι σπόροι που βρίσκονται δεξιά και κάτω. Με τον τρόπο αυτόν αποφεύγουμε το διπλό μέτρημα κάποιων σπόρων. Σε περίπτωση που δεν βρεθούν σπόροι, το αποτέλεσμα καθορίζεται ως «μη ανιχνεύσιμο» αλλά αυτό δεν σημαίνει πως οι μέλισσες δεν είναι μολυσμένες.

Το αιμοκυτταρόμετρο έχει βοθρία (στην μία του επιφάνεια) σταθερών διαστάσεων και όγκου. Τα βοθρία αυτά αφορίζονται από οριζόντες και κάθετα χαραγμένες γραμμές. Για να καταμετρήσουμε τους σπόρους αναζητούμε το κεντρικό τετράγωνο διαστάσεων ενός τετραγωνικού χιλιοστού (**Εικόνα 9** και **Σχέδιο A**), δηλαδή το μεγάλο τετράγωνο που βρίσκεται σε κύκλο. Το μεγάλο αυτό τετράγωνο αποτελείται

από 25 μικρότερα (**Εικόνα 9** και **10 Σχέδιο Β**) μεσαίου μεγέθους και το καθένα από αυτά με τη σειρά του αποτελείται από 16 μικρότερα τετράγωνα (**Εικόνα 10Γ**), συνολικά έχουμε $25 \times 16 = 400$ μικρά τετράγωνα. Καταμέτρηση των σπόρων γίνεται σε 4 από τα 25 τετράγωνα μεσαίου μεγέθους που βρίσκονται από ένα σε κάθε γωνία του μεγάλου τετραγώνου και το 5^ο κεντρικά. Όταν η μέτρηση των σπόρων σε κάποιο τετράγωνο δεν είναι εφικτή λόγω παρουσίας υλικού (τραχιές ή άλλα υλικά) τότε καταμετράται ένα άλλο όμορο προς αυτό τετράγωνο. Την μέτρηση την επαναλαμβάνουμε άλλη μια φορά και στο δεύτερο κεντρικό τετράγωνο ενός τετραγωνικού χιλιοστού (όπου τοποθετήσαμε την δεύτερη σταγόνα) που βρίσκεται λίγο πιο κάτω από το πρώτο. Αθροίζονται τα σύνολα των σπόρων και των δύο τετραγώνων και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους, ο οποίος βρέθηκε σε σταθερό όγκο νερού. Το αποτέλεσμα ανάγεται σε 1ml νερό με την βοήθεια της μεθόδου των τριών. Άρα ο αριθμός των σπόρων που βρέθηκε μετά την αναγωγή στο ml αντιπροσωπεύει τον αρ. σπόρων/μέλισσα.



Εικόνα 9. Μεγάλο τετράγωνο (A) αιμοκυτταρόμετρου και τετράγωνο μεσαίου μεγέθους (B) με 16 μικρότερα τετράγωνα.



Εικόνα 10. Σπόροι *Nosema spp.* σε αιμοκυτταρόμετρο σε 40X10 μεγέθυνση. Τετράγωνο μεσαίου μεγέθους (B) με 16 μικρότερα τετράγωνα (Γ).

2.1.3. Μέθοδος απομόνωσης DNA

Κάθε δείγμα αποτελείται από 30 κοιλίες μελισσών από την ίδια κυψέλη οι οποίες περισυλλέχτηκαν ζωντανές και καταψύχθηκαν αμέσως ή περισυλλέχτηκαν και καταψύχθηκαν αμέσως μετά τον θάνατό τους.

Στη συνέχεια:

1. Οι 30 κοιλίες του κάθε δείγματος τοποθετούνται σε σωληνάρια των 2.0 ml.
2. Προσθέτονται 200 ml δισαπποσταγμένο νερό σε κάθε σωληνάριο.
3. Ανακίνηση με vortex.
4. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm επί 5 sec.
5. Σε κάθε δείγμα προστίθενται άλλα 300 ml δισαπποσταγμένο νερό.

6. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας ομοιογενοποιητή (Tissueuptor της QIAGEN).
7. Φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm επί 20sec.
8. Ανακίνηση με vortex.
9. Τα δείγματα ψύχονται με εμβάπτισή τους σε νιτρικό άζωτο επί 8 λεπτά και στη συνέχεια αποψύχονται με εμβάπτισή τους σε βραστό νερό επί 8 λεπτά (μέθοδος ψύξης –απόψυξης). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5 φορές.
10. Χρήση του πρωτοκόλλου για την εξαγωγή DNA από φυτικούς ιστούς από το DNeasy® Plant Mini kit protocol (QIAGEN).
11. Το DNA που ανακτάται χρησιμοποιείται άμεσα για την αντίδραση PCR.

Αντιδραστήρια

DNeasy® Plant Mini kit

2.1.4. Ενίσχυση ειδικής αλληλουχίας DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια επαναστατική επιστημονική ανακάλυψη η οποία διεύρυνε τις κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές της μοριακής βιολογίας. Επινοήθηκε το 1985 από τον Kary B Mullis, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel γι' αυτήν την ανακάλυψη το 1993. Η PCR χρησιμοποιεί την DNA πολυμεράση, μια νουκλεάση που απαντάται στη φύση, για την κατάλυση της αναγέννησης του DNA μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία απαρτίζεται από τρία βήματα (**Εικόνα 11**) που επαναλαμβάνονται ξανά και ξανά προκειμένου να ενισχυθεί εκθετικά το επιθυμητό DNA.

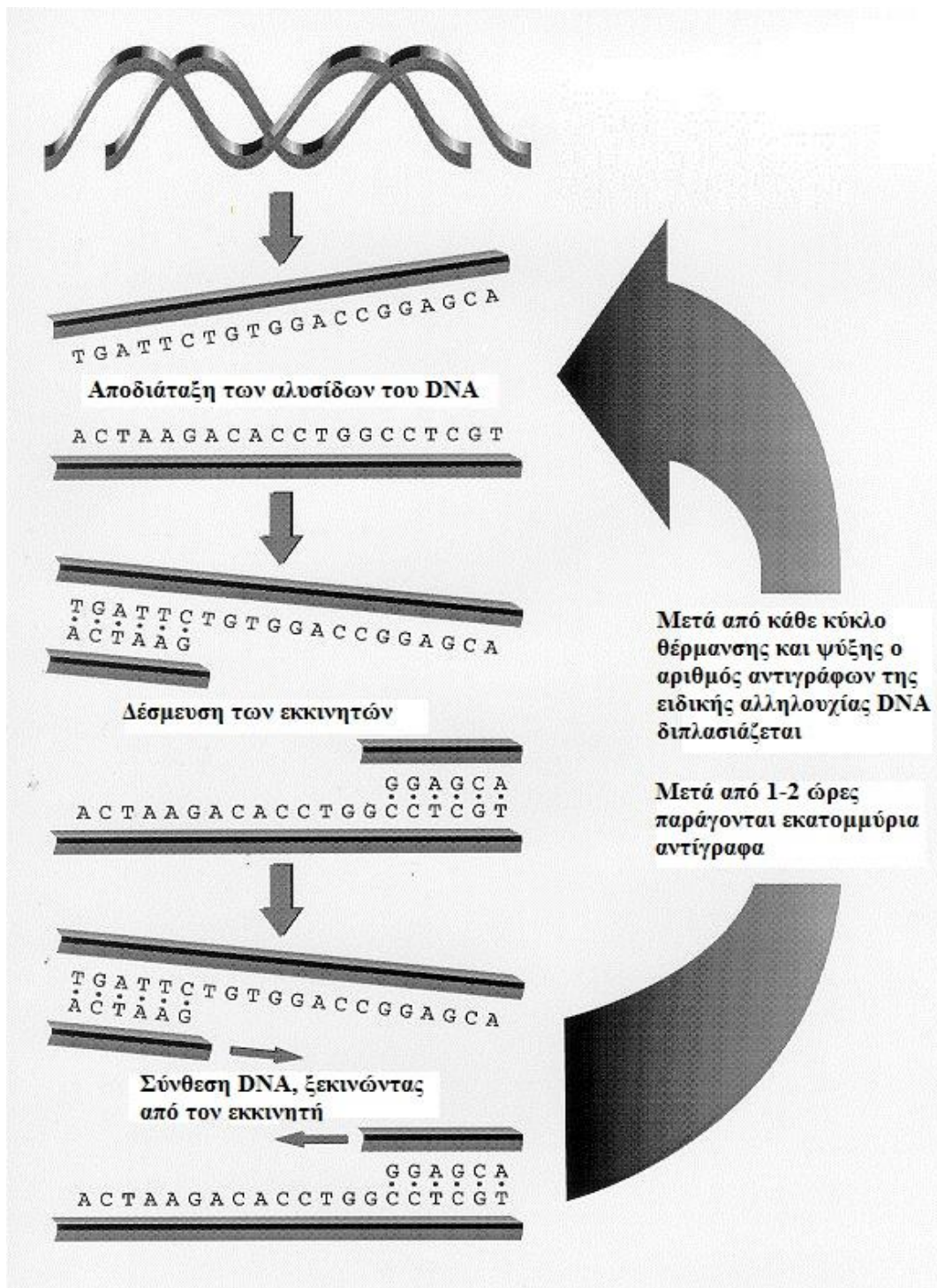
2.1.4.1. Βασική αρχή της μεθόδου

Η PCR απαιτεί την ύπαρξη ενός μητρικού μορίου – DNA ή RNA – και δυο μορίων εκκινητών προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής. Το ίδιο το DNA

είναι μια σειρά νουκλεοτιδίων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το DNA είναι δίκλωνο, αποτελούμενο από δύο νουκλεοτιδικές αλυσίδες που τυλίγονται η μία γύρω από την άλλη για το σχηματισμό της διπλής έλικας. Οι εκκινητές είναι μονόκλωνες, βραχείες νουκλεοτιδικές αλυσίδες. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, θα δεσμευθούν σε μια ειδική συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων σε ένα άλλο τμήμα μονόκλωνου DNA ή RNA.

Για την PCR, οι εκκινητές πρέπει να είναι αντίγραφα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και των δύο κλώνων του επιθυμητού DNA, το οποίο σημαίνει ότι πρέπει να γνωρίζουμε την ακριβή σειρά νουκλεοτιδίων των εκκινητών. Αυτές οι αμφίπλευρες αλληλουχίες είτε κατασκευάζονται στο εργαστήριο είτε αγοράζονται από εμπορικούς αντιπροσώπους.

Η αντίδραση PCR αποτελείται από τρία βασικά βήματα. Αρχικά, το γενετικό υλικό στόχος πρέπει να αποδιαταχθεί – δηλαδή, οι αλυσίδες της διπλής έλικας να ξετυλιχθούν και να διαχωριστούν μεταξύ τους – με αύξηση της θερμοκρασίας στους 90-96°C. Το δεύτερο βήμα είναι ο υβριδισμός, όπου οι εκκινητές δεσμεύονται στις συμπληρωματικές τους βάσεις στο μονόκλωνο DNA. Το τρίτο βήμα είναι η σύνθεση DNA με τη χρήση μιας πολυμεράσης. Ξεκινώντας από τον εκκινητή, η πολυμεράση διαβάζει μια μητρική έλικα και προσθέτει συμπληρωματικά νουκλεοτίδια με πολύ γρήγορο ρυθμό. Το αποτέλεσμα είναι δυο νέες έλικες στη θέση της πρώτης, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από μία αρχική αλυσίδα και μια νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα. Για να πάρουμε περισσότερο από το επιθυμητό DNA, επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία, ξεκινώντας με την αποδιάταξη του DNA που έχουμε ήδη συνθέσει. Κάθε φορά η ποσότητα διπλασιάζεται. Ελέγχοντας αυτόματα τον κύκλο ταχείας θέρμανσης και ψύξης, οι εκκινητές, η πολυμεράση, τα νουκλεοτίδια και τα χημικά αντιδραστήρια κάνουν τα υπόλοιπα. Κάθε κύκλος διαρκεί μόλις 1-3 λεπτά, οπότε η επανάληψη της διαδικασίας για μόλις 45 λεπτά μπορεί να παράγει εκατομμύρια αντίγραφα μιας ειδικής αλυσίδας DNA.



Εικόνα 11. Μέθοδος PCR.

2.1.4.2. Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια για την παρασκευή του μίγματος Master mix:

Nosema PCR PROTOCOL			
Δείγματα:17	<u>Master Mix(MMI)</u>	Όγκος (μl)	Τελικός όγκος(μl)
	10x buffer (-Mg)	2,50	42,50
	dNTPs (10mM)	0,50	8,50
	MgCl ₂ (50mM)	1,00	17,00
	Εκκινητής Forward (10μM)	1,00	17,00
	Εκκινητής Reverse (10μM)	1,00	17,00
	Platinum Taq(5u/μl)	0,15	2,55
	DNA	1,50	
	ddH ₂ O	17,35	294,95
	Σύνολο	25,00	399,50

2.1.4.3. Πρόγραμμα PCR

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR εφαρμόστηκε το ακόλουθο πρόγραμμα κύκλων:

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1	94	3min
2	94	30 sec
3	55	30sec
4	72	40sec
5	Επανάληψη βημάτων 2-4 για 35 κύκλους	
6	72	10min
7	4	

2.1.5. Εκκινητές

Στον πρώτο και στον δεύτερο κύκλο αντιδράσεων PCR εξετάστηκαν όλα τα δείγματα για να διαπιστωθεί ποιά είναι τα μολυσμένα από *Nosema apis* και ποιά από *Nosema ceranae*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν βασίζονται στο 16S ριβοσωμικό rRNA γονίδιο το οποίο είναι το ειδικό γονίδιο για την ταυτοποίηση των μικροσποριδίων [33].

Εκκινητές του 1^{ου} κύκλου αντιδράσεων PCR. SSU: small subunit rRNA (16S rRNA).

Όνομα		Εκκινητής	Περιοχή	Μέγεθος προϊόντος
<i>N. apis</i>	Forward	ccattgccggataagagagt	SSU-rRNA	401bp
<i>N. apis</i>	Reverse	cacgcattgctgcatcattgac		

Εκκινητές του 2^{ου} κύκλου αντιδράσεων PCR. SSU: small subunit rRNA (16S rRNA).

Όνομα		Εκκινητής	Περιοχή	Μέγεθος προϊόντος
<i>N. ceranae</i>	Forward	cggataaaaagagtccgttacc	SSU-rRNA	250bp
<i>N. ceranae</i>	Reverse	ggtcgtcacatttcattctct		

2.1.5.1. Σχεδιασμός των εκκινητών των τριών επόμενων αντιδράσεων PCR.

The image shows the Primer-BLAST web interface. The main title is "Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)". The interface is divided into several sections:

- PCR Template:** Contains a text area for the PCR template sequence (AAATTTGTAAAAAATAAATGGGTACACTCTCTTTAGTCTCAAGCATATCGATTATTTAAGCTTAATAGACGGACCATCTCAAAATGATACATTAACCTCTGGGCGAGAGAAATCTGTGATTCATCCCCCTTAAATGATATTAAGGGATCATATGTCCACACATTTGAACATACGTTATATTTAACTGAGGATGCAAGAGATTTCTAGCAAAAGGTGTGTTATTAA) and a "Range" section for Forward and Reverse primers.
- Primer Parameters:** Includes fields for "Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)", "Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)", "PCR product size" (Min: 70, Max: 1000), "# of primers to return" (10), and "Primer melting temperatures (Tm)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max Tm difference: 3).
- Exon/intron selection:** Includes "Exon junction span" (No preference), "Exon junction match" (Exon at 5' side: 7, Exon at 3' side: 4), "Intron inclusion" (checkbox), and "Intron length range" (Min: 1000, Max: 1000000).
- Primer Pair Specificity Checking Parameters:** Includes "Specificity check" (checkbox), "Search mode" (Automatic), "Database" (Refseq mRNA), "Exclusion" (checkbox), "Organism" (Nosema ceranae (taxid:40302)), "Entrez query (optional)", and "Primer specificity stringency" (Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including).

Εικόνα 12. Αρχική σελίδα του προγράμματος Primer-BLAST.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το Primer-BLAST [34] (Εικόνα 12). Το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [35] βασίζεται σε μια ευριστική μέθοδο για την αναζήτηση ομοιότητας αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών σε βιολογικές βάσεις δεδομένων (ΒΔ). Τα αποτελέσματα του BLAST περιλαμβάνουν μια λίστα με τις αλληλουχίες της ΒΔ που έχουν τον μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας με την υπό εξέταση αλληλουχία, τις αντίστοιχες τοπικές στοιχίσεις, και στατιστικά στοιχεία. Μια από τις παραλλαγές του BLAST αποτελεί το Primer BLAST. Το Primer BLAST χρησιμοποιείται για την εύρεση ζευγών εκκινητών σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται σχετίζονται με το μέγεθος του προϊόντος PCR και αναφέρονται στην Εικόνα 12. Για τις γενωμικές ακολουθίες που κωδικοποιούν τις 3 υπό μελέτη πρωτεΐνες επιλέχθηκαν εκείνα τα ζεύγη των εκκινητών τα οποία δίνουν το κατά το δυνατό μεγαλύτερο μέγεθος προϊόντος PCR.

2.1.6. Ηλεκτροφόρηση

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Είναι μια εξαιρετικά ευέλικτη προσέγγιση που παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος του μορίου DNA και κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση διαφορετικών αλληλουχιών DNA ίδιου μεγέθους. Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται επίσης για το διαχωρισμό και την απομόνωση κλασμάτων νουκλεϊκών οξέων, για την ποσοτικοποίηση ανισοροπιών, κτλ. Για την ηλεκτροφόρηση DNA, χρησιμοποιούνται τα πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης. Οι μέθοδοι αυτοί είναι εξαιρετικά ευέλικτες επειδή, αλλάζοντας τη συγκέντρωση για την αγαρόζη, και το βαθμό διασύνδεσης για την πολυακρυλαμίδα, μεταβάλλουν σημαντικά το εύρος των διαχωριζόμενων μεγεθών. Γενικά, τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι πιο χρήσιμα για το διαχωρισμό μικρότερων κλασμάτων DNA (κάτω από 300-500 ζεύγη βάσεων) και για εφαρμογές όπου απαιτείται υψηλή ανάλυση (όπως ανάλυση μικροδορυφόρων) επειδή έχουν την ικανότητα ανάλυσης διαφορών μεγέθους της τάξης του 1 ζεύγους βάσεων. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης τρέχουν πιο γρήγορα και σε υψηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με τα πηκτώματα αγαρόζης. Ωστόσο, η ακρυλαμίδα είναι νευροτοξίνη και υπάρχει κίνδυνος για την ασφάλεια. Επίσης τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι πιο δύσκολα στην παραγωγή και το χειρισμό σε σχέση με τα πηκτώματα αγαρόζης.

Ωστόσο, τα πηκτώματα αγαρόζης είναι πιο γερά και η παρασκευή τους είναι πιο εύκολη. Η κύρια δύναμη των πηκτωμάτων αγαρόζης είναι το μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού. Η συμβατική ηλεκτροφόρηση αγαρόζης μπορεί να διαχωρίσει DNA από 200 έως 50,000 bp το οποίο αρκεί για συστήματα που βασίζονται στην PCR. Οι προσαρμογές της ηλεκτροφόρησης αγαρόζης, για παράδειγμα αυτές που χρησιμοποιούν ηλεκτρικά πεδία με παλμό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό κλασμάτων DNA μέχρι 10 Mbp.

Αντιδραστήρια

1. Αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξης.
2. Διαλύουμε ένα πακέτο σκόνης TBE (Tris-borate-EDTA) σε 1 λίτρο απεσταγμένου νερού. Το κάθε πακέτο TBE περιέχει 10.78 γρ Tris (υδροξυμεθυλο) αμινομεθανίου, 5.51 γρ βορικού άλατος και 0.75 γρ EDTA.
3. Δείκτες μοριακού βάρους.
4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό.
5. Βρωμιούχο αιθίδιο.
6. Συσκευή υπεριώδους φωτός.
7. Φωτογραφική μηχανή.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

1. Προετοιμάζουμε ένα επίπεδο δοχείο ηλεκτροφόρησης, με σφραγισμένα άκρα και δυο χτενάκια με τον κατάλληλο αριθμό δειγμάτων. Γεμίζουμε τη δεξαμενή της συσκευής ηλεκτροφόρησης με 1×TBE.
2. Διαλύουμε 2 γρ αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος 1× TBE σε μια φλάσκα.
3. Αναμιγνύουμε το διάλυμα και θερμαίνουμε σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5 λεπτά μέχρι να γίνει διαυγές. Και ακολουθεί σύντομη ψύξη.
4. Προσθέτουμε 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο και αναμιγνύουμε.
5. Προσθέτουμε το μίγμα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, και αφήνουμε να κρυώσει (30 έως 60 λεπτά).

Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Απομακρύνουμε τα φράγματα και τοποθετούμε το πήκτωμα μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προσθέτουμε επαρκές ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να καλύψει το πήκτωμα.

1. Αναμιγνύουμε τα δείγματα DNA με 3μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (χρωστική).
2. Προσθέτουμε 6μl δείκτη μοριακού βάρους στο 1^ο, 10^ο και 19^ο πηγαδάκι.
3. Προσθέτουμε αργά-αργά τα δείγματα σε κάθε πηγαδάκι.
4. Εφαρμογή τάσης 120V για χρονική διάρκεια ανάλογη του είδους των δειγμάτων (μεγάλο μοριακό βάρος και μικρή διαφορά χρειάζεται περισσότερη

ώρα από δείγματα μικρότερου μοριακού βάρους και μεγάλης διαφοράς βάσεων).

5. Όταν η μετανάστευση των δεικτών ολοκληρωθεί, απομακρύνουμε το πήκτωμα, παρατηρούμε τις ζωνώσεις σε υπεριώδες φως και φωτογραφίζουμε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μικροσκόπηση

Έλαβε χώρα μικροσκόπηση για τη διαπίστωση της παρουσίας και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σπορίων *Nosema spp* στα 14 δείγματα μελισσών. Αρχικά όλα τα δείγματα μικροσκοπήθηκαν για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι σπορίων της *Nosema spp*. Αφού διαπιστώθηκε πως όλα τα δείγματα ήταν μολυσμένα από το μικροσπορίδιο ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των σπορίων τους όπως αυτός περιγράφηκε στο 2.1.2. ο οποίος μας έδωσε τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2. Ποσοτικός προσδιορισμό των σπορίων *Nosema spp*.

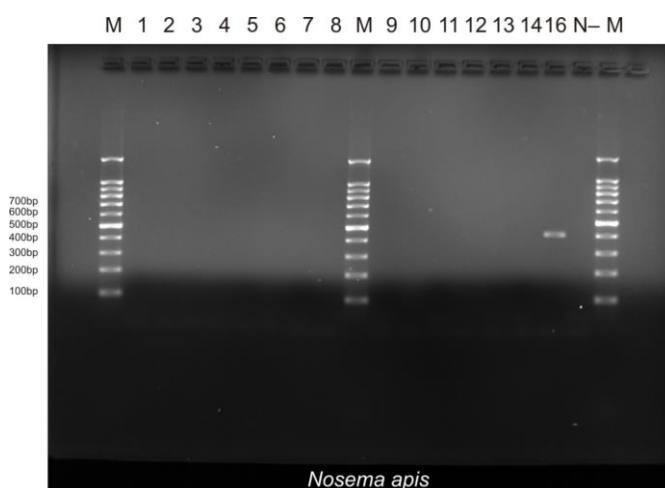
Δείγμα	Αριθμός σπορίων/μέλισσα
Δείγμα 1	10.430.888
Δείγμα 2	12.958.250
Δείγμα 3	15.434.878
Δείγμα 4	19.654.777
Δείγμα 5	14.578.001
Δείγμα 6	14.333.205
Δείγμα 7	8.123.269
Δείγμα 8	7.884.071
Δείγμα 9	11.012.351
Δείγμα 10	10.779.341
Δείγμα 11	7.002.980
Δείγμα 12	8.764.988
Δείγμα 13	13.567.323
Δείγμα 14	12.994.762

3.2. Αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR

Στις δύο πρώτες αντιδράσεις PCR που έλαβαν χώρα διαπιστώθηκε το είδος του μικροσποριδίου με το οποίο είναι μολυσμένο κάθε δείγμα. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις επιπλέον αντιδράσεις PCR που αποσκοπούσαν στην διαπίστωση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τρεις αντίστοιχα υπό μελέτη πρωτεΐνες, δηλ την Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (3.2.3), την Απακετυλάση της Χιτίνης (3.2.4) και την Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (3.2.5). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια με την σειρά που αναγράφονται στον Πίνακα 2. Ως δείγμα Νο 15 χαρακτηρίστηκε ο θετικός για την *N. ceranae* δείκτης και ως δείγμα Νο 16 χαρακτηρίστηκε ο θετικός για την *N. apis* δείκτης. Τέλος ως *N-* χαρακτηρίστηκε ο αρνητικός δείκτης.

3.2.1. Πρώτος κύκλος αντίδρασεων PCR

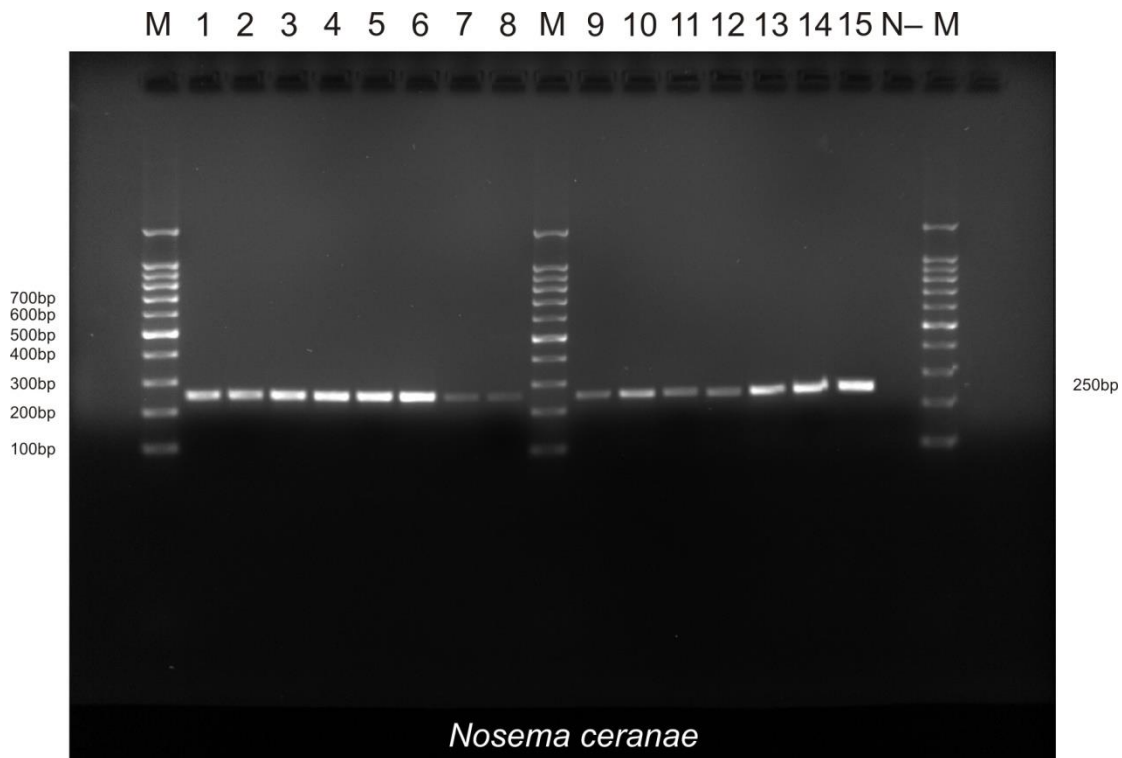
Ο πρώτος κύκλος αντίδρασεων PCR αποσκοπούσε στην ανίχνευση της παρουσίας του 16S rRNA ειδικού για την *N. apis* γονιδίου (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 401 bp) ώστε να διαπιστωθεί ποιιά είναι τα δείγματα που μολύνθηκαν από *N.apis*. Όπως είναι φανερό κανένα από τα δεκατέσσερα δείγματα δεν ήταν μολυσμένο από σπόρια της *N. apis*. Θετικό παρουσιάζεται μόνο το δείγμα Νο 16, δηλ. ο θετικός για τη *N. apis* δείκτης (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν. Στις στήλες 'M' διακρίνεται ο 100 bp DNA δείκτης. Νο16: θετικός για τη *N. apis* δείκτης, N-: αρνητικός δείκτης.

3.2.2. Δεύτερος κύκλος αντιδράσεων PCR

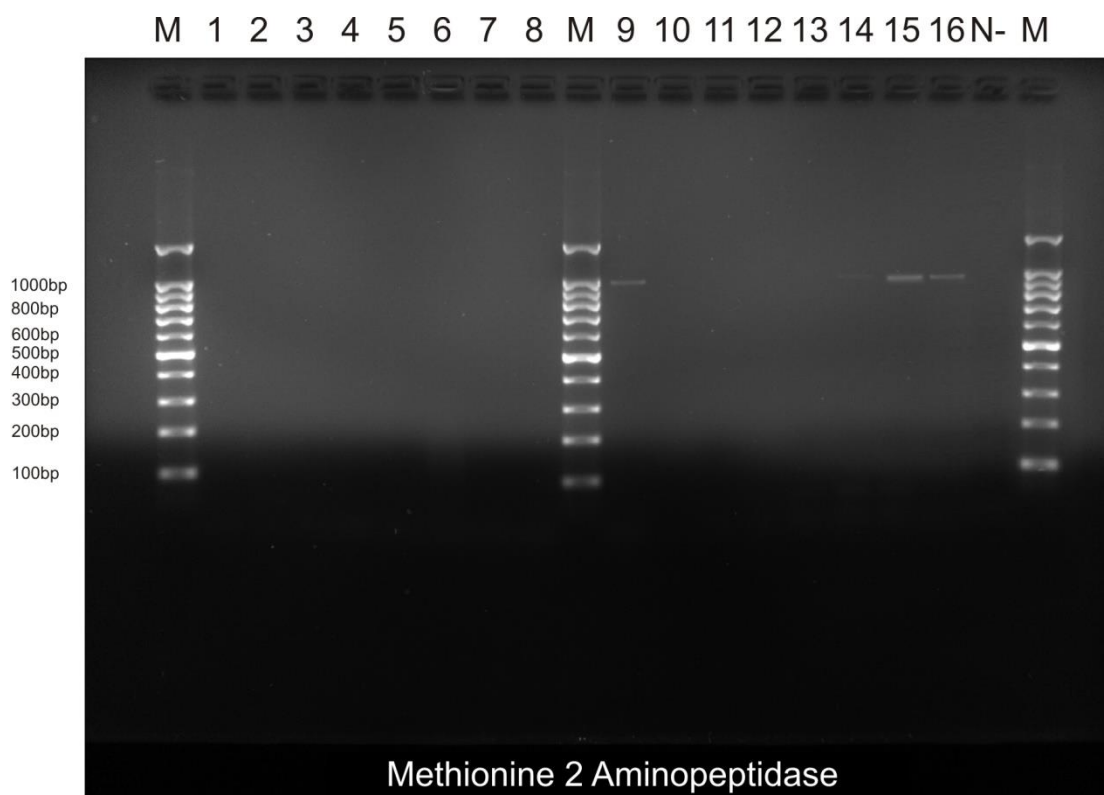
Ο δεύτερος κύκλος αντιδράσεων PCR αποσκοπούσε στην ανίχνευση της παρουσίας του 16S rRNA ειδικού για την *N. ceranae* γονιδίου (αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος PCR: 250 bp) ώστε να διαπιστωθεί ποια είναι τα δείγματα που μολύνθηκαν από *N.ceranae*. Το αποτέλεσμα αποδεικνύει πως και τα 14 δείγματα που εξετάστηκαν ήταν μολυσμένα από σπόρια της *N. ceranae*. Θετικό εμφανίζεται επίσης και το δείγμα Νο 15, δηλαδή ο θετικός για την *N. ceranae* δείκτης (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν. Στις στήλες 'M' διακρίνεται ο 100 bp DNA δείκτης. No15: θετικός για την *N.ceranae* δείκτης, N-: αρνητικός δείκτης.

3.2.3. Τρίτος κύκλος αντιδρασεων PCR

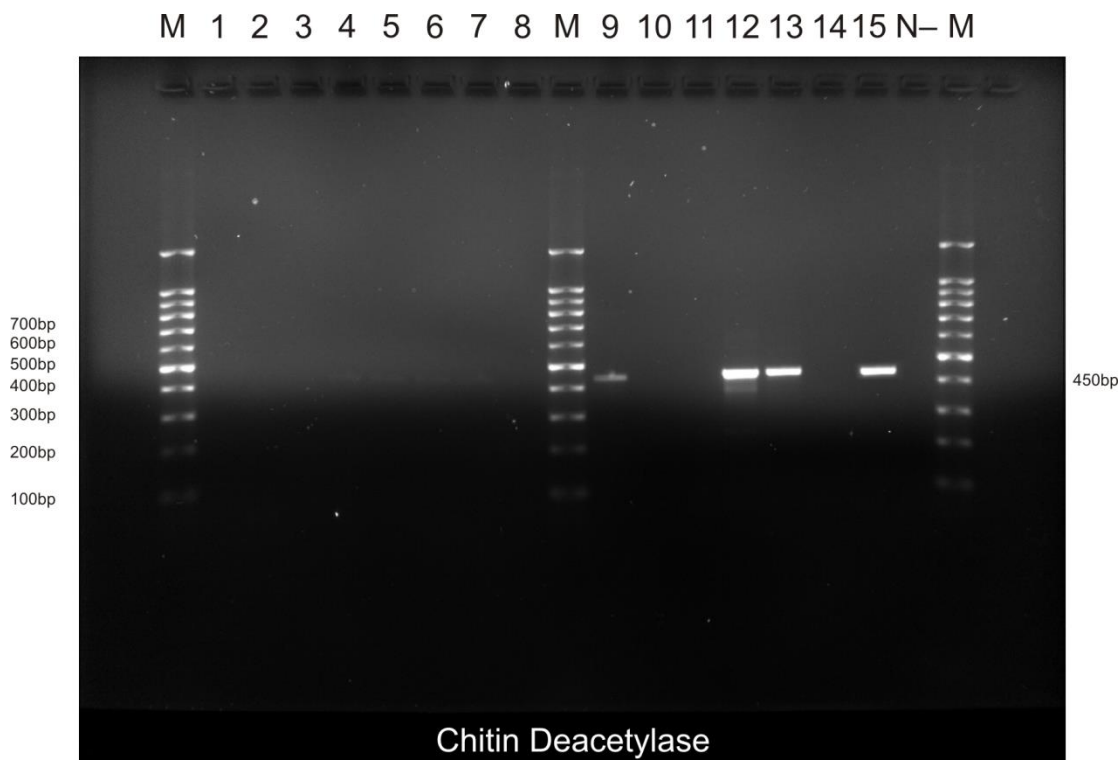
Ο τρίτος κύκλος αντιδρασεων PCR αποσκοπούσε στην ανίχνευση της παρουσίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος PCR: 999 bp). Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης δείχνει πως θετικό αποτέλεσμα έχουμε στα δείγματα Νο 9 & Νο 14 καθώς και στους θετικούς για τη *N. ceranae* (No 15) και *N. apis* (No 16) δείκτες (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν. Στις στήλες 'M' διακρίνεται ο 100 bp DNA δείκτης. No15: θετικός για την *N. ceranae* δείκτης, No16: θετικός για τη *N. apis* δείκτης, N-: αρνητικός δείκτης.

3.2.4. Τέταρτος κύκλος αντίδρασεων PCR

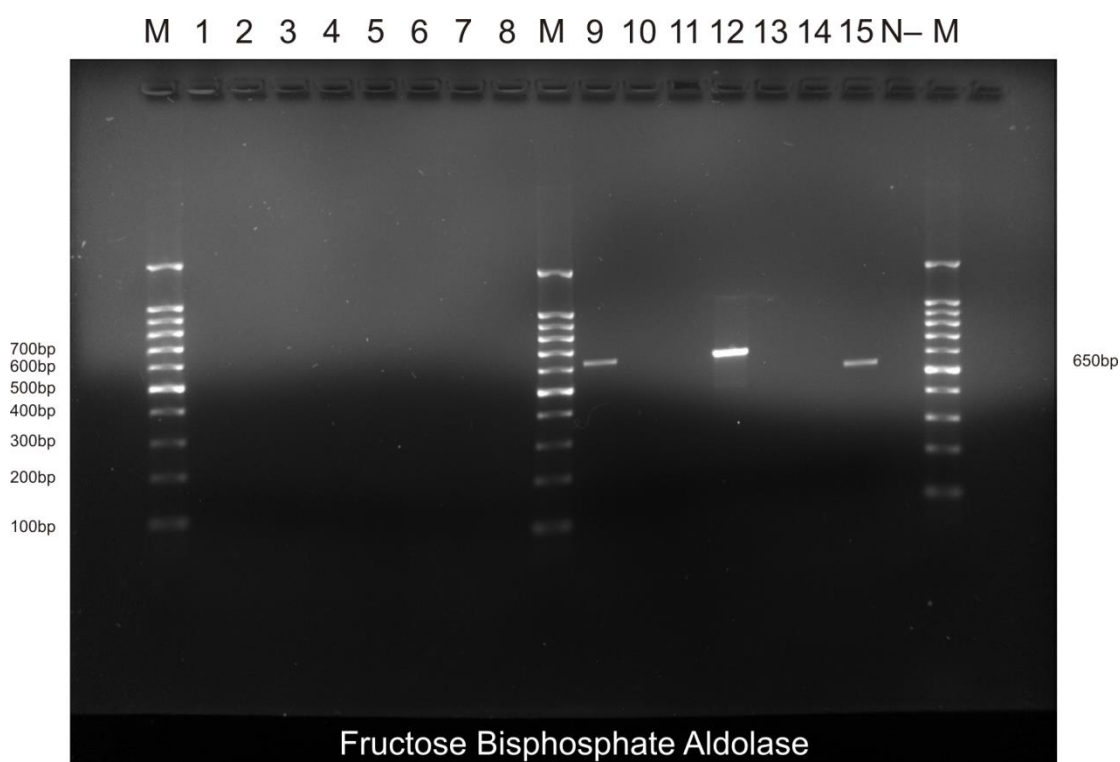
Ο τέταρτος κύκλος αντίδρασεων PCR αποσκοπούσε στην ανίχνευση της παρουσίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Απακετυλάση της Χιτίνης (αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος PCR: 445 bp). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**, τα δείγματα με νούμερα: 4, 5, 6, 7, 9, 12 & 13 βρέθηκαν θετικά όπως επίσης και ο για τη *N. ceranae* θετικός δείκτης (No 15).



Εικόνα 15. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν. Στις στήλες 'M' διακρίνεται ο 100 bp DNA δείκτης. No15: θετικός για την *N. ceranae* δείκτης. N-: αρνητικός δείκτης.

3.2.5. Πέμπτος κύκλος αντιδρασεων PCR

Ο πέμπτος κύκλος αντιδρασεων PCR αποσκοπούσε στην ανίχνευση της παρουσίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος PCR: 630bp). Θετικά εμφανίζονται τα δείγματα με τα νούμερα 9 & 12 (**Εικόνα 16**) καθώς και ο θετικός για την *N. ceranae* δείκτης (No 15).



Εικόνα 16. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν. Στις στήλες 'M' διακρίνεται ο 100 bp DNA δείκτης. No15: θετικός για την *N. ceranae* δείκτης, N-: αρνητικός δείκτης.

3.2.6. Εκκινητές των αντιδράσεων PCR

Οι εκκινητές των τριών τελευταίων κύκλων αντιδράσεων PCR σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Primer BLAST όπως προαναφέρθηκε στις μεθόδους (2.1.4.3).

Εκκινητές του 3^{ου} κύκλου αντιδράσεων PCR με σκοπό την ανίχνευση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου που κωδικοποιεί της πρωτεΐνη Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης.

```
>JPQZ01000009.1 Nosema ceranae strain PA08 1199 NODE_9, whole genome shotgun
sequence (Range: 67551 - 68810)
ACAAAAATGCATATTTTATAACCATCACAAAGCACTTTCAATGATATTAAGTAATTCATTATAAACTTCTT
GTTGTGAATCATCTGGTGTA AAAACCCATCATATTC AAAATTATGTGTCC TATTGAGATGTAAAA TACT
AATTTTATGT TTTG TATTTCAATATTTGATAAT TCTCCGGTATGTCGTATCCT TAAAAA TACTCTTATT
GCGCCTTTAAGATCAAT TATTTCA TTTTGTAAAGATTTAACTTTAGAA TTCACAATAAGGTTTCAAATT
GCGCATCTTGAAGTTTACTTTCAAGATGCTCTATTCCTTGCTTGTAAC TACCCTCTAAACTTTCAATTTT
ATTTACAAC TAGTGGCATA TTTTCTGTTTCTTAAAGTTAAAATGTGTGTTTTGAGTTGTGCAATTTCT
TCAAGTAATTTAATTTTCTTTCATCTTGTCTTTTGGTCTTTTATTGGCAGCTTCATACAGAAAATCAA
AATCTTCTTGTAAGTTTGTAAATG TATCATTAATTATTTAGATATGCATCTATATTGTCATTTCGACAT
TCTAAGGGTGGATTTTAAAAATCTTTATAGATTATATTTATGCTATTTAAAATAACTAGCTGTACATTTG
CGCATACTTCAGCTATAATTTTCAAAAAATTAATAAAAATATTATAGTTTTTTTAAAGCAGTTAAAAAAC
ATTCCGACTCAACTAATAATTAATACAAAATAAAATATAAGATTTTTAAATGCGTATTGATTAATAAAT
TGTAATAGTTTTTTAAATTTGTTACTCTACGCAATCATTACAGGTTATTTGAGTTCAAAAAATGTTCTTT
TCATCGTCATTC AACATTTGTGCTTCAAAAATTTCCAATCTTAGTCTAAAAGACTTCTAATTTTATCTTTTT
TTTCAAATATTTTCGCTCTAAGACTTTCTTCAATATAATTTATATTGTAATTAATGTTTTTATGACTGAAG
TAGCTTCTTATAACATTTTAAATTTTTTCTCAAATTAATCTTTTCACTTGTTTTACTTCTATACATTTA
GTTTCTCCTATACTTATTA AAACTTTTTTCTTTCAGAGAATTCCTTGCTTAGCAAGTTCTATTTGTGTTG
ATTTTTTATTGGATAAACATTTAATAA TTTCTTAACCGTATTGCGTTTTA TATTTAATGTGCGAT
CTGTTACTTATTCTCCTTTTTTTCTATCTTTATTATTAGATGTGTGTCAGCCGTGCATTTTAAAGCTTTT
```

Forward primer

TCTCCGGTATGTCGTATCCT (20)

Reverse primer

TAAAACGCAATACGGGTTAAGAAA (24)

Μέγεθος προϊόντος PCR: 991 bp

Εκκινητές του 4^{ου} κύκλου αντιδρασεων PCR με σκοπό τον εντοπισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Απακετυλάση της Χιτίνης.

```
>XM_002995595.1 Nosema ceranae BRL01 hypothetical protein (NCER_101403) mRNA,
complete cds
ATGCATTTATTTTTTTTACATTTTATATGTTTATAATATAGTTTTACCTAGCACTTGTACAAATGCAGGTT
TAATAGCTCTTACTTTTTGATGAAGGACCAACTGAAAATACTGATGATATATTAGATTTAGTTCAAGATAA
TAATATATTAGTAACTTTTCACCTTACAGTACATATGTTATCGTCAGGAAAACATAGAAGTGTATATAAA
AGAGCTGTTGAAGAGGGACATACTGTTGGATTAAGAACAACACCAAGTAGAAATTATGATGATATGGAAC
CCGATGTAATAAAATTCCTGATATTAGTAAACAGATTGATGCTATTAATAAAGTTACAGGAACAGATATAAA
ATTTGCAAGATCTCCTGTAATGATGGAGATGTCAATCCAGACATATATAGTATTTTTTTAGAAAATGGT
ATTATCAATCTTATTATAATTACAGTTATTCTGAGGAAGATAAGACAATTGAAGATTTCGAATTTACAC
TTTCTACAGCAAGTCCTCAAATAGATTCTTTTATTGTTACACTTTACGAAAATATTGATTGAATGAAC
TGAAGAAATAATTGATATAGGTAAGAAGAATGGGTATGAATTTGTAATAATGGATCAATGTCTAGGAGAT
TATGAACCAGATCCTGAAACCTCATTAGGTGCAAATTAATAAAAGAAAAATAATGGAGAAGTTTTAGAAA
TATTTGGATTATATACAATAGTTCTATTTTATTGTTTACTATAA
```

Forward primer

AAGAGCTGTTGAAGAGGGACA (21)

Reverse primer

TGAGGTTTCAGGATCTGGTTCA (22)

Μέγεθος προϊόντος PCR: 445 bp

Εκκινητές του 5^{ου} κύκλου αντιδρασεων PCR με σκοπό τον εντοπισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης.

```
>XM_002996602.1 Nosema ceranae BRL01 hypothetical protein (NCER_100242) mRNA,
complete cds
ATGGAAAAAGAACTGAAAAATTTATTTAAATCTTGGAGCTACCGCCAAAAAATACTTGAAAAATAATAAG
GAATTTTAGCGGTTGATGAATCTCCTAGTTCATGGAAGATAAGTTTAAAAATTTTGATATATCAAATAC
AGAGGAAAACCGTAGAAAGCTACGCGAATTGCTTTTTATGACAGAAGGATATGAAAAATTTATTGGTGGT
GCAATATTTAAATGAGGAAACATTTTCACAGAAAGCGAGTAATGGGAAATTTAGTTGACATTTTGATTG
AAAAAACGTGTGTGTAGGCATTTAAATTAGACAAAGGACTACAAAACCTTTGAAGATGAGGAGAGAATATC
TGTCGGCCTTGAAGATTTGGAGAATAGAATACAAAATAGTTTGTGGAAAAGGCAGTCTTTGCTAAATGG
CGATCATTTATTTATCGCGTCGAAAGATTTACCTACTATGGATTGCATAGATGAAAATTTGAAAAATCTCG
CAAAATACGCAAAAATTTGTCAAAGTATGGTAAGGTGCCAATAGTAGAACCCGAGTTGTATTTTAAAGG
TAATTTATCAAATAGAAGATTTCTAAAAACATACCAAACAGATTTTAAGTCATCTTATAAGGTATTTAAAT
GATGAAGATGTTTTATTTACCAGGAATTTCTAATTTAAATGGGATTTGTTACTCAAGGAACCTGAATCAAGCG
TACAAAATTCCTATGAAGGAGTAGGACTGGCCACCTTAAATGCCATGATATCTACAATTCATGTGGAGT
ACCCGGAGTTGTGTTTTTATCAGGCGGGCATACACAGGAAGATTTCTATAGGTTACCTTTCAGCAGTAAAC
AATTATAAGGTTTTAAAAACTTGGGATATAAGTTTTAGTTATGGAAGAACATTAAGTATGCACCGATAG
CAGAATGGAATGGAAGGATGAAAATATTAACAAAGCACAAAAAGCCTTCTTTAATTTAGCTAAAAGGTG
TTATATGGCAAACAAAGGTAATAA
```

Forward primer

AACCGTAGAAAGCTACGCGA (20)

Reverse primer

CACAACTCCGGGTTACTCCAC (20)

Μέγεθος προϊόντος PCR: 636 bp

3.2.7. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μικροσκοπίας και των αντιδράσεων PCR

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των πειραματικών μεθόδων που έλαβαν χώρα καταγράφονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Αριθμός δείγματος	Αριθμός σπορίων <i>Nosema</i> spp /μέλισσα με μικροσκόπηση	16S rRNA <i>N. apis</i>	16S rRna <i>N. ceranae</i>	Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης	Απακετυλάση της Χιτίνης	Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης
1	10.430.888	-	+			
2	12.958.250	-	+			
3	15.434.878	-	+			
4	19.654.777	-	+		+	
5	14.578.001	-	+		+	
6	14.333.205	-	+		+	
7	8.123.269	-	+		+	
8	7.884.071	-	+			
9	11.012.351	-	+	+	+	+
10	10.779.341	-	+		+	
11	7.002.980	-	+			
12	8.764.988	-	+			+
13	13.567.323	-	+		+	
14	16.994.762	-	+	+		
15	+ δείκτης <i>N.ceranae</i>	-	+	+	Μη διαθέσιμο	Μη διαθέσιμο
16	+ δείκτης <i>N.apis</i>	+	-	+	+	+

3.3. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες που αφορούν τις υπό εξέταση πρωτεΐνες ευθυγραμμίσθηκαν ούτως ώστε να προσδιορισθεί ο βαθμός ομοιότητας τους μεταξύ των δύο ειδών *Nosema*.

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (METAP2), Αποακετυλάση της Χιτίνης (CHITDAC) και Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (ALDO) των ειδών *N. aris* και *N. ceranae* ευθυγραμμίσθηκαν με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Clustal Omega [36]. Τα γονίδια METAP2, CHITDAC και ALDO χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 10, 11 και 1, αντίστοιχα, του *Encephalitozoon cuniculi*.

Οι αμινοξικές αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (METAP2), Αποακετυλάση της Χιτίνης (CHITDAC) και Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (ALDO) που προέρχεται από τα είδη *N. aris* και *N. ceranae* ευθυγραμμίσθηκαν με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος PROMALS3D [37].

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία METAP2 της *N. ceranae* έχει συνολικό μήκος 1074 νουκλεοτιδικές βάσεις· είναι μεγαλύτερη κατά 148 νουκλεοτίδια σε σχέση με εκείνη της *N. aris* (συνολικά 926 νουκλεοτιδικές βάσεις), όπου 674 νουκλεοτίδια είναι ταυτόσημα (**Εικόνα 17α**). Η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία METAP2 της *N. ceranae* (357 αμινοξικά κατάλοιπα) και είναι μεγαλύτερη κατά 51 αμινοξέα από εκείνη της *N. aris* (συνολικό μήκος 306 αμινοξικά κατάλοιπα). Οι δυο αλληλουχίες έχουν 219 ταυτόσημα αμινοξέα και 48 αμινοξέα με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες (**Εικόνα 17β**).

Εικόνα 17α. Ευθυγράμμιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (METAP2)* που προέρχεται από τα είδη *Nosema apis* (JQ927010.1) και *Nosema ceranae* (NW_003314244).

Nosema_ceranae_METAP2	ATGAAATTGCTACAGATAAATTCGGTAGAAGAAAAACCGATAGAGTTTTAGAGAAGTCT	60
Nosema_apis_METAP2	-----	0
Nosema_ceranae_METAP2	GACCAATACCGTAAAAATATTTTATTTAATAAAAAATAATGAAATAGTAGACAACGATCTT	120
Nosema_apis_METAP2	-----	0
Nosema_ceranae_METAP2	GATTTTGACATTTTACGAGATGCTAGAAGAGCAGCAGAGGCACATAGGCGTG-TACGTTA	179
Nosema_apis_METAP2	-----CGATTGAGCTGCGGAGGCACACAGACGTGCTCGTTA	37
	***** * ***** * * * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	TAAAGTACAAAACGCGATTAAACCTGGAATGCCGATAGTTGACATAGTAAATATTTATGA	239
Nosema_apis_METAP2	CAAAGTACAAAATTTAATTAACCTGGAATTCATATTATAGATATAGTAAATTTGATAGA	97
	***** * ***** * * * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	AGAAAATACACGAATTTTACTCAACGGTGAAGAATAATGGAATGGATTTCCCTGCTGG	299
Nosema_apis_METAP2	AGAAATCAACTAGATTTTATTTAAAAGGAGAAAAGAAATAATGGAATAGGATTTCCAGCAGG	157
	**** * * ***** * * * * ***** ***** * * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	AATGTCTATTAACGACTGTGCCGCACATTTACAGTTAACAATGGAGACAATATTTGTTT	359
Nosema_apis_METAP2	CATGTCAATAAATGAATGTGCAGCACATTTACGGTAAATAATGGAGATAATTTAGTATT	217
	***** * * * * ***** ***** * * * * ***** * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	AGGGGTGATGACATTTCTAAGATTGATTTTGGAAACCCATTCTAATGGACGTATTATGGA	419
Nosema_apis_METAP2	AAACGAAAGTGATATTTTAAAAATAGATTTTGGTACACATGTAATGGTAGAATTTATGGA	277
	* * * * * ***** * * * * ***** * * * * *****	
Nosema_ceranae_METAP2	TTCCGCATTTACTGTTGCATTTCAATCCAGAGTACGAAAATTTGCTTTTAGCTTCTAAAGA	479
Nosema_apis_METAP2	TTCTGCATTTACAGTCACATTTGATGACAAATTTGAAAATCTAGTATTAGCATCAAAAAGA	337
	*** ***** *	
Nosema_ceranae_METAP2	AGCCCAAAATGCTGGAATTAAGCTTTGGGTGTAGATGTAAGGTTGTGTGATTTGGTCG	539
Nosema_apis_METAP2	AGCTACAATGCAGGAATTAACCTCTGGTGTGACGTTAGATTATGTGAAATTTGGAAG	397
	*** ***** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	TGATATTTATGAGGTTATGAAAAGTTTGAAGTAACAATAAAAGGTAAGACATTTCCCGT	599
Nosema_apis_METAP2	AGATATTCATGAAGTCATGAAAAGTTTGAATTAACACTTAATGGAAAACTTATCCTAT	457
	***** ***** * * ***** ***** * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	TAAACCGGTTTTTGATTTACATGGACATTTCTATAGGTCAATATGTTATTATCATGTCGGTT	659
Nosema_apis_METAP2	CAAAACAGTGTGTTGATCTTCATGGTCATTCAATAGGTCAATATGTTATTATCATGCAGGACA	517
	***** * * ***** * * ***** ***** ***** ***** * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	ATCGATTCCGTGCTATGATAATCTCGATTCAACAAAAATACGAGAAGATACATTTTATGC	719
Nosema_apis_METAP2	GTCATACCATGTTATGATAATGGAGATACAAACAAAATCAAAGAAGACACTTTTATGC	577
	* * * * * * * * ***** *	
Nosema_ceranae_METAP2	AGTAGAAACCTTTGCTACTACTGGAAATGGTCATATTAAGGATAGTTCTCCGTGTACGCA	779
Nosema_apis_METAP2	TTTAGAAACATTTGCTACTACAGGAACCTGGTCGTTTTCAGATAAATCGCCTGTACACA	637
	***** ***** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_METAP2	TTACGTTTTAAATAATAAAAAGAGTGTGACTAAAGAATCTTAACTGTATAAAAATTTA	839
Nosema_apis_METAP2	TTATATGTTTAAATAAAAAAACAAGGCACGTTACATAATCCTAGTTGTAAAAGTATTTA	697
	*** *	
Nosema_ceranae_METAP2	TAATTTTGTAATAAATAAATTTGGGTACACTTCCTTTTGTAGTCCTAAGCATATCGATTATT	899
Nosema_apis_METAP2	TGAATTTGTAAAGAAAGAAATTTGGTACCTTGCCTTTTAGTCCATAACATATAGACTTTTA	757
	* * ***** *	
Nosema_ceranae_METAP2	TAACTTAATAGACGGACCATCTCAAATGTACATTAACCTTCTGGCGCAGAGAAATCTGTT	959
Nosema_apis_METAP2	TAATGTAATCGACGTACCTCTCAAATATATACATAAACTTATATCTAATATGAAACTATT	817
	*** ***** *	
Nosema_ceranae_METAP2	GATTTTCATATCCCCTTTAAATGATATTAAGGATCATATGTCGCACAATTTGAACATAC	1019
Nosema_apis_METAP2	TACTGCGTATCCACCTTTAAATGATGTTAAAGGTTTCATATGTTAGTCAATTTGAACATAC	877
	* *	
Nosema_ceranae_METAP2	GTTATATTTAACTGAAGGATGCAAAGAAGTTCTAACAAAAGGTGATGATTATTA	1074
Nosema_apis_METAP2	ATTGTATATAAGTGAAAATGGAAAAGAGATCCTAACAAAACGGTGACGA-----	926
	* *	

Εικόνα 17β. Ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης (METAP2) των ειδών *Nosema apis* (AFM97296.1) και *Nosema ceranae* (KKO75939.1), όπου *e*: β-πτυχωτή επιφάνεια και *h*: α-έλικα.

Nosema_ceranae_METAP2	MKLLQINSVEEKPIEFLEKSDQYRKNILFNKNNEIVDNDLDFDIL	45
Nosema_apis_METAP2	IEL-----	3
	hcL.....	
	hh ee hhhhhh hhhh	
Nosema_ceranae_METAP2	RDARRAAEAHRRVRYKVNQAIKPGMPIVDIVNIEENTRILLNGE	90
Nosema_apis_METAP2	---RRHTDV---LVYKVQNLKPGIHIIDIVNCIEESTRILLKGE	42
	...RRhh-h...l.YKVQnhIKPGh.lDIVNhhIEEsTRILLpGE	
	hhhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhh	
Nosema_ceranae_METAP2	RNNGIGFPAGMSINDCAAHFTVNNGDNICLGVDDILKIDFGTHSN	135
Nosema_apis_METAP2	KNNGIGFPAGMSINECAAHFTVNNGDNLVNLNESDILKIDFGTHVN	87
	+NNGIGFPAGMSIN-CAAHFTVNNGDnlhLs.sDILKIDFGTHsN	
	ee ee eeeeeeeee	
Nosema_ceranae_METAP2	GRIMDSAFTVAFNPEYENLLLASKEATNAGIKALGVDVRLCDIGR	180
Nosema_apis_METAP2	GRIMDSAFTVTFDDKFENLVLASKEATNAGIKTLGVDVRLCEIGR	132
	GRIMDSAFTVhfssc@ENLlLASKEATNAGIKhLGVDVRLC-IGR	
	eeeeeeee hhhhhhhhhhhhhhhhhhh hhhh	
Nosema_ceranae_METAP2	DIYEVMSFEVTIKGKTFPVKPVFDLHGHSIGQYVIHAGLSIPCY	225
Nosema_apis_METAP2	DIHEVMKSFEITLNGKTYPIKPVFDLHGHSIGQYVIHAGQSIPCY	177
	DI@EVMKSFEltlpGKT@PlKPVFDLHGHSIGQYVIHAGbSIPCY	
	hhhhhhh hhh eee eeeee	
Nosema_ceranae_METAP2	DNLDSTKIREDTFYAVETFATTGSGHIKSSPCTHYVLNKKSAV	270
Nosema_apis_METAP2	DNGDTNKIKEDTFYALETFATTGTGRISDKSPCTHYMFNKKKQGT	222
	DN.DosKI+EDTFYAletFATTGog+IpDpSPCTHYhhNpKKpth	
	ee eeee ee eee eeeeeee ee	
Nosema_ceranae_METAP2	LKNLNCIKIYNFVNKLGLTLPFSPKHIDYFNLDGSPQMIKLLA	315
Nosema_apis_METAP2	LHNPSCKSIYEFVKKEFGTLPFSPKHIDFYNVIDVPSQIYTKLIS	267
	L+N.sCbpIYpFVKpchGTLFPSPKHID@nLIDSPQhyhKLlt	
	ee hhhhhhhhh hhhh hhhhhhhhhhh	
Nosema_ceranae_METAP2	QRNLLISYPLNDIKGSYVAQFEHTLYLTEGCKEVLTKGDDY	357
Nosema_apis_METAP2	NMKLFTAYPPLNDVKGSYVSQFEHTLYISENGKEILTK---R	306
	p.pLhhtYPLNDlKGSYvtQFEHTLYloEstKElLTK....	
	h eee eeeeeeeeeee ee	

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες *CHITDAC* των *N. ceranae* και *N. apis* έχουν το ίδιο μήκος, δηλαδή 744 νουκλεοτιδικές βάσεις. Συνολικά, 318 νουκλεοτίδια είναι ταυτόσημα (**Εικόνα 18α**). Οι αντίστοιχες αμινοξικές αλληλουχίες έχουν, επίσης, το ίδιο μήκος, δηλαδή 247 αμινοξικά κατάλοιπα, εκ των οποίων τα 111 είναι ταυτόσημα και τα 51 έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες (**Εικόνα 18β**).

Εικόνα 18α. Ευθυγράμμιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *Αποακετυλάση της Χιτίνης (CHITDAC)* που προέρχεται από τα είδη *Nosema apis* (KE647256.1) και *Nosema ceranae* (NW_003314116).

Nosema_ceranae_CHITDAC	-----ATGCATTTATTTTTTTACATTTTATATGTTTATAATATAGTTTTACCTAGC	51
Nosema_apis_CHITDAC	TTAAAAAGCATACAGAACTAACAGAAAAATGTACGAAATATTAATATCTGTCCACCCATC	60
	*** ** *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	ACTTGTCACAAATGC-----AGGTTAAT-AGCTCTACTTTTGATGAAGG	95
Nosema_apis_CHITDAC	ACTACTTAATTTAGACTTTTTATCTATTGGGATATTATCTGGTTTAAAAATCACCCAAACA	120
	*** * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	ACCAACTGAAAATACTGATGATAT-----ATTAGATTTAGTTCAAGATAATAATATATTA	150
Nosema_apis_CHITDAC	ATCATCTAAAGTTACAAATGTGAAGCCAAATTTTTCCTATATCAATAATATCCTCTAA	180
	* ** * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	GTAACITTTTCACTTTACAGTACATATGTTATCGTCAGGAAAACATAGA-AGTGATATAA	209
Nosema_apis_CHITDAC	ATAAGCATCTTCTT---GCTCTTTTCGTCATGTAATGCACAATAAACGATTCATATTT	237
	*** * *** * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	AAGAGCTGTTGAAGAGGGACATACTGTTGGATTAAGAACAAC-ACCAAGTAGAATTATG	268
Nosema_apis_CHITDAC	AGGATTTGCT-----AATTTAACATGATTTCCATCTTCAATAGGATTT--C	284
	* ** * * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	ATGATATGGAACCCGATGTAATAAATTTCTGATATTAGTAAACAGA-----TTGATG	319
Nosema_apis_CHITDAC	CTTCTATATCATAAGGCTCAAAATTTATATGAACITTTGAACAATATTATTACCTGCAATG	344
	* *** * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	CTATTAATAAAGTTACAGGAACAGATATAAAATTTGCAAGATCTCCTGTAAAT--GATGG	377
Nosema_apis_CHITDAC	TTTCATATACTGCTTCATTATAAGATCCATCATCTACAGGTGCTCTAGCATATTTAATAT	404
	* *** * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	AG---ATGTCAATCCAGACATATATAGTA-TTTTTTTAGAAAAATGGTA--TTATTTCAAT	430
Nosema_apis_CHITDAC	CAGTATTCGTTACATCTGCTAAAGCTGTCAGTTGCTTTCAATATCATCTTTTACGTCAT	464
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	CTT---ATTATAATTACAGTTATTCTGAGGAAGATAAGACAATTGAAGATTTCGAATTT	486
Nosema_apis_CHITDAC	CAAATTCATTTTCATCATAGTTTCTTTTAGGATTAACCTAAGTCCAACA---GTATGT	520
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	ACACTTTCTACAGCAAGTCCCAAAATAGATTTTATTGTTACTTTACGAAAATATT	546
Nosema_apis_CHITDAC	CCTTCATCCGCAGCCCTTCT-----ATATATTGTTGCTAAATTTCCCTCGATATTTT	571
	* ** * * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	GATTTGAATGAACCTTGAAGAAATAATTGATATAGGTAAGAAGAATGGGTATGAATTTGTA	606
Nosema_apis_CHITDAC	TCATGAACTGTAAAATGAAAAGT-----AAGAGGT-----ACATCTT	608
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	AATATGGATCAATGTCTAGGAG--ATTATGAACCAGATCCTGAAACCTCATTAGGT--GC	662
Nosema_apis_CHITDAC	TATCTTGTGCTATATCTAGAATAGTATTTGTATATTTTGTGGACCGTCATCAAAGGTGA	668
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	AAATATATAAAAAGAAAATAATGGA-----GAAGTTTGAATAATTTGGATATAT	712
Nosema_apis_CHITDAC	TAGCTATAAGTCCGCCATTAGTACAATTTTCTGTAAATCCTGTTCTAATAATTTAACAAT	728
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
Nosema_ceranae_CHITDAC	ATACAATAGTTCTATTTTATGTTTACTATAA	744
Nosema_apis_CHITDAC	ATGAAAAAATATCAT-----	744
	** * * * * *	

Εικόνα 19α. Ευθυγράμμιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (ALDO)* που προέρχεται από τα είδη *Nosema apis* (KE647050.1) και *Nosema ceranae* (NW_003314251).

```

Nosema_ceranae_ALDO ATGGA AAAAGAAACTGAAAATTTATTAATCTTGGAGCTACCGCCAAAA-AAATACTTGA 59
Nosema_apis_ALDO -----TTATTGTTTCATTTTTTTTTGAGAATTCGCATCATAGCATCTTTTA 46
                * *   *** *   * * * * *   *** *   * * * * *

Nosema_ceranae_ALDO AAATAATA--AAGGAATTTAGCGGTTGATGAATCTCCTAGTTCTATGGAAGATAAGTT 116
Nosema_apis_ALDO   GCAATTTCAAACAATGCTTCTTGGCGCTTTAATCTATTTTCATCTAATCCTTTCCAAAT 106
                * *   *   * * * * * *   * * * *   * *   * *   * *

Nosema_ceranae_ALDO TAAAAATTTTGATATATCAAATACAGAGGAAAAC-----C-----GTAGAAAGCTACGCG 166
Nosema_apis_ALDO   TCCATTGGTGTATCTGTTAAAGTCTACCAAAACTAAAGCTTACATCCCAAGTTTTATAA 166
                * *   * * * * * * *   * * * * *   *   * *   * *

Nosema_ceranae_ALDO AATTGCTTTTTTATGACAGAAGGATATGAAAAA-----TTTATTGGTGGTGC AATATTTAA 221
Nosema_apis_ALDO   GCTTGGTTTCTATGAATTGAAGATAGATATTTCAATAGCATCGTTTTTCATTATGCCTCCA 226
                *** * * * * * * *   * * * * *   *   * * * *   * * * *

Nosema_ceranae_ALDO TGAGGAAACATTTTTCACAGAAAGCGAGTAATGGGAAATTATTAGTTG----- 268
Nosema_apis_ALDO   CTTAAAAACACTATCCCTGGAATTCACATGGTATCGTAGATAAATAGTCCGTCTAATGTA 286
                * * * * * * * * * *   * *   *   * * * * *

Nosema_ceranae_ALDO -ACATTTTGATTGAAAAAACGTTGTGTAGGCATTAATTAGACAAAGGACTACAAAAC 327
Nosema_apis_ALDO   GCAATTC CAATCTCATCAGGTGAATGTGTGATTTTGATTCATCTCCTTGAGT----- 339
                *** * *   * *   * * * * * *   * * * * *   * * *

Nosema_ceranae_ALDO TTTGAAGATGAGGAGAGAATATCTGTCTGGCCTTGAAGATTGGAGAATAGAATACAAAAT 387
Nosema_apis_ALDO   -----AACAAACTCATTTTAATAATAACACCTGGAATATATACATTATAAT 386
                *   * * * * *   * * * * * * * * * *   * * * *

Nosema_ceranae_ALDO AGTTTGTGTTGAAAAGGCAG-----TCTTTGCTAAATGGCGATCATTATTTATCGCG-- 438
Nosema_apis_ALDO   AGTTTAAGTGTTTAATTAATTTTCTAATATTCTTTTGTGTGATTTTTGCATCATGAA 446
                * * * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * * *

Nosema_ceranae_ALDO -TCGAAAGATTTACCTACTATGGATGTCATAGATGAAAATGTAA-----AATTCTC 489
Nosema_apis_ALDO   GTTCGTAATCTCCTTTAAAAATATAATTCAGGCTCAACAATTGGAACCTTCCCATATTTTT 506
                *   * *   * * * * * * * * *   * * * * * * *   * * * *

Nosema_ceranae_ALDO GCAAATACGCAAAAATTTGTCAAAGTATGGTAAGGTGCCAATAGTAGAACCCGAGTTG 549
Nosema_apis_ALDO   GGCAAACTACTAGCATATTGAGCAAGTGTGTTGCGATTTTCATCTAAGCAGTTTAAAGTTG 566
                * * * * * * *   * * * * * * * * * *   * *   * *   * *

Nosema_ceranae_ALDO TATTTTAAAGGTAATTATCAAATAGAAGATTCTAAAAACATACCAACAGATTTTAAAGT 609
Nosema_apis_ALDO   GAAATTCATGTGAAACAATAAATAATGATCTCC-----ATTTTGCGAATAAAG 614
                * * * * * * * * * *   * *   * * * *   * *   * *

Nosema_ceranae_ALDO CATCTTATAAGGTATTTAAATGATGAAGATGTTTATTTACCAGGAATCTAATTTAAATG 669
Nosema_apis_ALDO   CCTTTTCAAATTTTTTTT-----GTTGTATTCTATTTTCAAGATCTTCCAAACCAACAG 668
                * * * * * * * * * *   * *   * * * * * * *   * * * * *

Nosema_ceranae_ALDO GGATTTGTTACTCAAG-----GAAGTGAATCAAGCGTACAA 705
Nosema_apis_ALDO   AAATTTTTTCATTTCCGTCAAATTTTGTAAATCCTTTATCAAGTTTAAATCCAATTA AAA 728
                * * * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * *

Nosema_ceranae_ALDO AATTCCTATGAAGGAGTAGGACT-----GGCCACCTTAAATGCCATGA 748
Nosema_apis_ALDO   TATTCTTATCCATTATTACATCAATTAGTAATTTTTCTTTTTCATTTTTTCATTGAAAACA 788
                * * * * * * * * * *   *   * * * * * * *   * *

Nosema_ceranae_ALDO TATCTACAATTCATGTTGGAGTACCCGGAGTTGTGTTTTTATCAGGCGGCATACACAGG 808
Nosema_apis_ALDO   TTTCTTCATGTAAAATTTACTCCACTAATATATTTTCTATATTAGGTGTT---GTAAC TA 845
                * * * * * * * * * *   * *   * * * * * * * * *   *

Nosema_ceranae_ALDO AAGATTCTATAGGTTACCTTTTCCAGCAGTAAACAATTATAAGGTTTAAAAACTTGGGATA 868
Nosema_apis_ALDO   ATAATTCTCTAAATTTAA-----ATCTTGTTTTTTCATTATTTTGAATA 889
                * * * * * * * * * *   * *   * * * * * * * * *

Nosema_ceranae_ALDO TAAGTTTT-AGTTATGGAAGAACATTTAACTGATGCACCGATAGCAGAATGGAATGGAAG 927
Nosema_apis_ALDO   TCATTTTTTCAAATTTTGTGCAATTGATGATGGA-----GATTCATCTATAG 938
                * * * * * * *   * * * * * * * * * *   * * * * *

Nosema_ceranae_ALDO GATGAAAATATTAACAAAGCACAAAAGCCTTCTTTAATTTAGCTAAAAGGTGTTATATG 987
Nosema_apis_ALDO   CTAAAATACCTTTTATTCGCTAAAAGTGTGTTTGCAT-TATAACCAAGCTTTAGTAAA 997
                * * * * * * *   * * * * * * * * * *   * * * * *

```

Nosema_ceranae_ALDO GCAAACAAAGGTAAATAA-- 1005
 Nosema_apis_ALDO GTTCTTGATCTACACACAT 1017
 * * * * *

Εικόνα 19β. Ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Αποακετυλάση της Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (ALDO) των ειδών *Nosema apis* (EQB62011.1) και *Nosema ceranae* (XP_002996648.1), όπου *e*: β-πτυχωτή επιφάνεια και *h*: α-έλικα.

Nosema_ceranae_ALDO_	MEKETENLLNLGATAKKILENNKGI LAVDESPSSMEDKFKNFDIS	45
Nosema_apis_ALDO_	MCVDQETLLKLGYNKTL LADNKGILAI DESPSSIAQKFEKNDIQ	45
	M . .-p E s LL p L g h s AK p IL .s NK G IL A I DE SPSS h.p K F cp . DI p	
	hhhhhhhhhhhhhhhh eeeee hhhhhh	
Nosema_ceranae_ALDO_	NTEENRRKRLRELLFMTEGYEKFIGGAILNEETFSQKASNGKLLVD	90
Nosema_apis_ALDO_	NNEKTRFKFRELLVTPNIEKYISGVLHEEMFSMKNEKEKLLID	90
	N s E c s R . K h RELL h T .s h E K @ I t G h IL p EE h FS b K spp. KLL I D	
	hhhhhhhhhh eeeee hhhh hhh	
Nosema_ceranae_ALDO_	ILIEKNVCVGIKLKDGLQNFEEERISVGLLEDLENRIQNSLFEKA	135
Nosema_apis_ALDO_	VIMDKNILIGIKLKDGLQKFDGNEKISVGLLEDLENRIQKKFEKA	135
	ll h- KN l h l G I K L D K L Q P F-sp E + I S V G L E D L E N R I Q pp b F E K A	
	hhh eeeee eee hhhhhhhhh	
Nosema_ceranae_ALDO_	VFAKWRSLFIAASKDLPTMDCIDENCKILAKYAKICQKYGKVPIVE	180
Nosema_apis_ALDO_	LFAKWRSLFIVSHEFPTLNCLDENCKTLAQYASICQKYGKVPIVE	180
	hhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh ee	
Nosema_ceranae_ALDO_	PELYFKGNYQIEDSKKHTKQILSHLIRYLNDEDVYLPGILIKMGF	225
Nosema_apis_ALDO_	PELYFKGDYELHDAKYHTKRILGNLIKHLNYYNVYIPGVIKMSF	225
	PE LY F K G s Y p l c D t K b H T K p IL t <p>LI+@LN.bsVYlPGlIKMtF</p>	
	hhh hhhhhhhhhhhhhhhhhhh ee	
Nosema_ceranae_ALDO_	VTQGTSSVQNSYEGVGLATLNAMISTIPCGVPGVFLSGGHTQE	270
Nosema_apis_ALDO_	VTQGDESKSTHSPDEIGIATLDGLLSTIPCGIPGIVFLSGGHEN	270
	VT Q G s E Spspp S .-.l G l ATL st h l ST I PC G l P G l V F L S G G H spp	
	hhhhhhhhhhhhhh eee hh	
Nosema_ceranae_ALDO_	DSIGYLSAVNNYKVLKTWDISFSYGRTLTDAPIAEWNGKDENINK	315
Nosema_apis_ALDO_	DAIEYLSSIHRNQAYKTWDVSFSFGRTLTDTPMEIWKGLDENRLK	315
	D t I . Y L S t l pp.p hh K T W D l S F S@ G R T L T D h P h .b W p G b D E N . K	
	hhhhhhhhhh eeeee hhhhhh hhhhhh	
Nosema_ceranae_ALDO_	AQKAFNLAKRRCYMANKGK---- 334	
Nosema_apis_ALDO_	AQEALFEIAKRCDANSQKMKQ 338	
	AQ c A h F p l A K R C Y. A N p . K	
	hhhhhhhhhh hhh hh	

Παρόλες τις διαφορές στις αμινοξικές τους αλληλουχίες, η δευτεροταγής δομή των παραπάνω πρωτεϊνών είναι όμοια και στα δύο είδη *Nosema* (**Εικόνα 17β, 18β & 19β**).

Οι αριθμοί καταχώρησης των αντίστοιχων νουκλεοτιδικών (**Εικόνα 17α, 18α & 19α**) και αμινοξικών αλληλουχιών (**Εικόνα 17β, 18β & 19β**) στην GenBank (NCBI) [38] αναγράφονται μέσα σε παρενθέσεις.

3.4. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις

Οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης, Απακετυλάση της Χιτίνης και Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης διερευνήθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων γνωστών και προβλεπόμενων αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών STRING [39] (**Εικόνα 17γ, 18γ & 19γ**).

Η πρωτεΐνη MAP2 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις παρακάτω πρωτεΐνες (**Εικόνα 17γ**) :

ECU04_0350: Τοποϊσομεράση τύπου II, η οποία ελεγχει τις τοπολογικές καταστάσεις του DNA με παροδική θραύση και επακόλουθη επανασύνδεση των κλώνων του DNA. Η τοποϊσομεράση τύπου II προκαλεί διπλή θραύση του DNA (1144 αμινοξέα).

RPL3-1: πρωτεΐνη L3 της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (383 αμινοξέα).

ECU03_1220: πρωτεΐνη L3 της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (383 αμινοξέα).

ECU08_0830: πρωτεΐνη L4 της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (335αμινοξέα).

RPL7: πρωτεΐνη L7 της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (239 αμινοξέα).

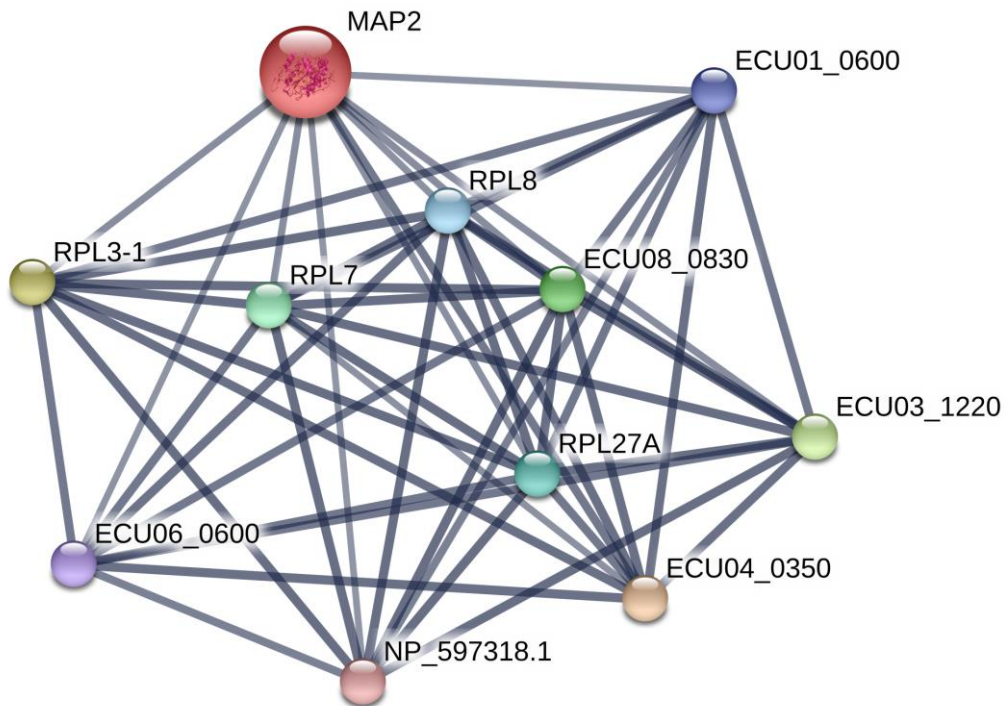
RPL27A: πρωτεΐνη L27A της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (147 αμινοξέα).

RPL8: πρωτεΐνη L8 της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (239 αμινοξέα).

ECU01_0600: DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση I (305 αμινοξέα).

ECU06_0600: DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II, Τρίτη αλυσίδα (240 αμινοξέα).

NP_597318.1: πρωτεΐνη L23A της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S (88 αμινοξέα).



Εικόνα 17γ. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Αμινοπεπτιδάσης 2 της Μεθειονίνης (MAP2).

Η πρωτεΐνη ECU11_510 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις παρακάτω πρωτεΐνες **(Εικόνα 18γ)**:

CHS1: Συνθάση τύπου I της χιτίνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη βιογένεση του κυτταρικού τοιχώματος (816 αμινοξέα).

ECU03_0390: ABC μεταφορέας (590 αμινοξέα).

ECU07_0560: ABC μεταφορέας (584 αμινοξέα).

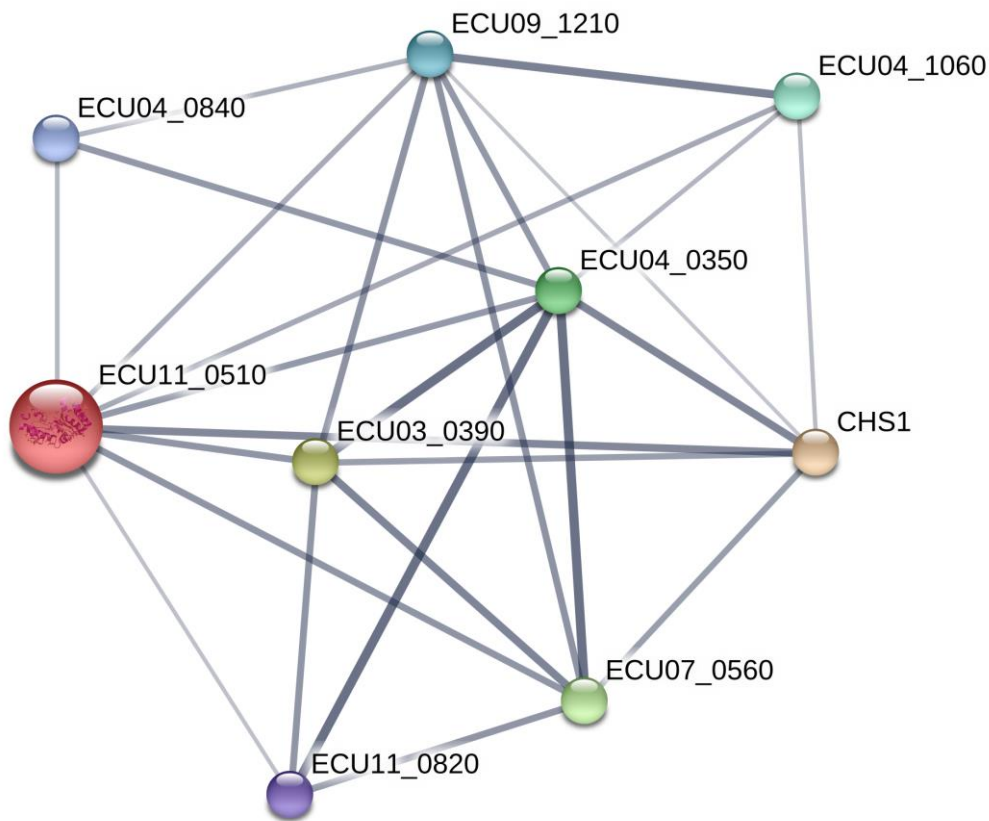
ECU04_0350: Τοποϊσομεράση τύπου II (1144 αμινοξέα).

ECU09_1210: Πρωτεΐνη βιοσύνθεσης της GPI-άγκυρας (408 αμινοξέα).

ECU04_0840: Ομοιότητα με την Συνθετάση της ασπαραγίνης (474 αμινοξέα).

ECU11_0820: Ομόλογο της πρωτεΐνης επιδιόρθωσης του DNA, RAD51 (334 αμινοξέα).

ECU04_1060: δολιχοφωσφορική μανοσυλτρανσφεράση (230 αμινοξέα).



Εικόνα 18γ. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Απακετυλάσης της Χιτίνης (ECU11_0510).

Η πρωτεΐνη ECU01_0240 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις παρακάτω πρωτεΐνες
(**Εικόνα 19γ**):

ECU07_0800: Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (327 αμινοξέα).

ECU11_0230: Ισομεράση της φωσφορικής τριόζης (242 αμινοξέα).

ECU03_0680: Φωσφοφρουκτοκινάση 6 (φωσφοφρουκτοζη-1-κινάση ισοένζυμο A) (921 αμινοξέα).

PYK1: Πυροσταφυλική κινάση (519 αμινοξέα).

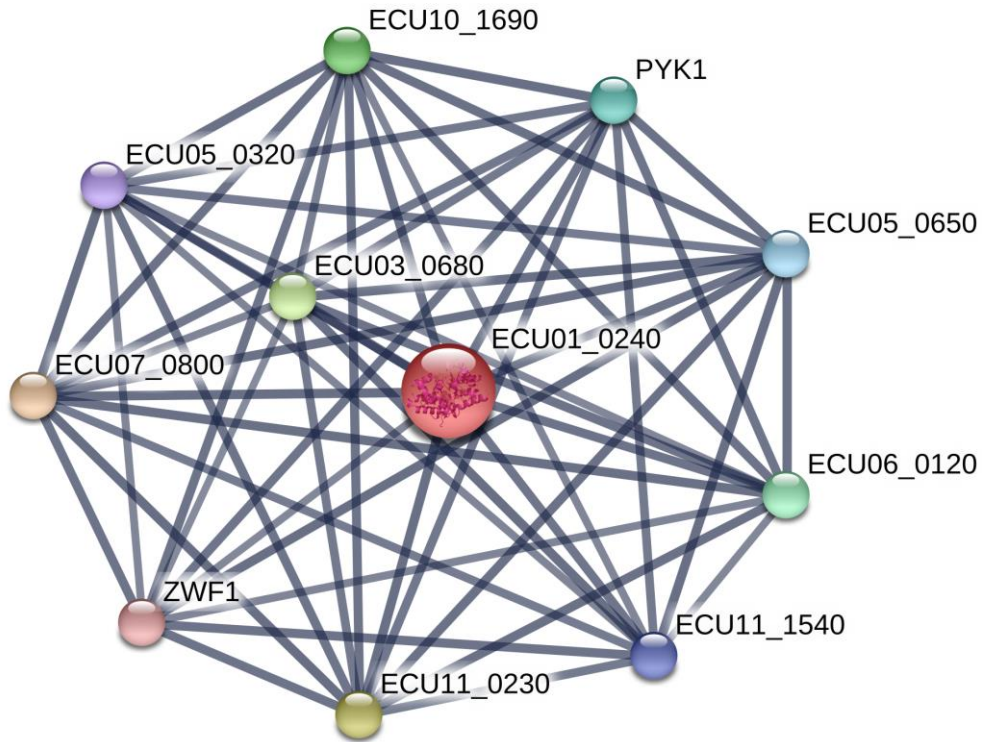
ECU06_0120: Τρανσκετολάση, η οποία καταλύει τη μεταφορά μιας ομάδας κετόλης δύο ατόμων άνθρακα από έναν δότη κετόζης σε έναν δέκτη αλδόζης, μέσω ενός ομοιοπολικού ενδιάμεσου με τον συμπαραγοντα πυροφωσφορικό θειαμίνη (628 αμινοξέα).

ECU10_1690: Ενδολάση (412 αμινοξέα).

ECU05_0650: Ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (508 αμινοξέα).

ECU11_1540: Εξοκινάση (475 αμινοξέα).

ZWF1: Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία καταλύει το ρυθμορυθμιστικό στάδιο της οξειδωτικής οδού πεντόζης-φωσφορικού οξέος.
ECU05_0320: Κινάση φωσφογλυκερικού οξέος (388 αμινοξέα).

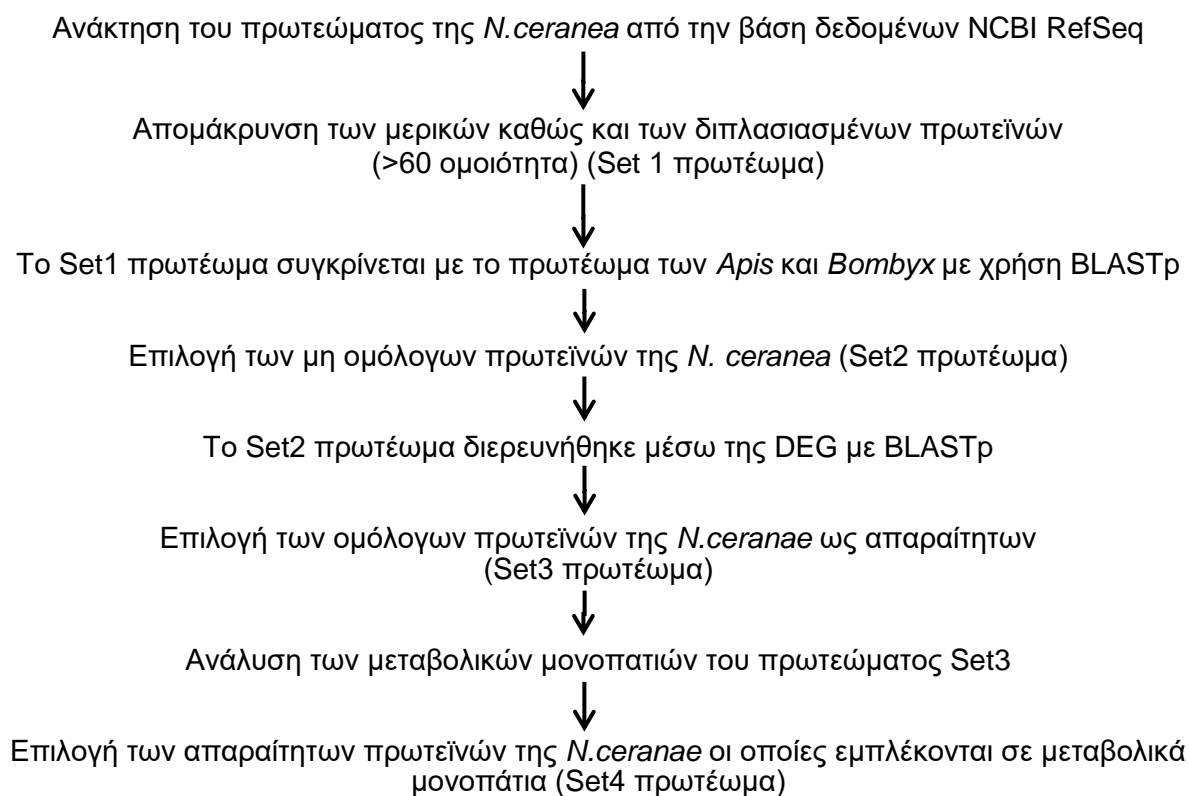


Εικόνα 19γ. Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της Αλδολάσης της Διφωσφορικής Φρουκτόζης (ECU01_0240).

3.5. *In silico* ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ενός πιθανού φαρμάκου του μικροσποριδίου *Nosema ceranae*

Το πλήρες πρωτέωμα του μικροσποριδίου *Nosema ceranae* υποβλήθηκε σε αφαιρετική ανάλυση πρωτεώματος με στόχο τον εντοπισμό πιθανών πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως στόχοι φαρμάκων, αποφεύγοντας ταυτόχρονα πιθανές τοξικές παρενέργειες στον ξενιστή. Το διάγραμμα ροής εργασίας περιγράφεται στην **Εικόνα 20**.

Εικόνα 20. Διάγραμμα ροής εργασίας για τον προσδιορισμό των πιθανών πρωτεϊνικών στόχων της *Nosema ceranae*.



Το πλήρες πρωτέωμα της *Nosema ceranae* ανακτήθηκε από την βάση δεδομένων RefSeq του NCBI [40], το οποίο αποτελεί ένα σύνολο 2060 πρωτεϊνών. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αυτές υποβλήθηκαν σε CD-HIT [41] ανάλυση. Το CD-HIT χρησιμοποιεί ως είσοδο (input) ένα αρχείο που περιέχει αλληλουχίες σε μορφή FASTA και δημιουργεί ένα σύνολο από όλες τις μη-περιττές (non-redundant) αλληλουχίες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε θέτοντας ως τιμή κατωφλίου το 0.6, προκειμένου να αποκλειστούν οι διπλασιασμένες αλληλουχίες που ανευρίσκονται [42] καθώς και εκείνες με αμινοξική ταυτότητα (identity) μεγαλύτερη του 60%. Με αυτόν τον τρόπο, 65 πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν. Οι μερικές (partial) πρωτεΐνες (συνολικά 59) αφαιρέθηκαν επίσης. Οι 1896 συνολικά προκύπτουσες πρωτεΐνες (Set1 πρωτέωμα) συγκρίθηκαν με τις πρωτεΐνες των οργανισμών-ξενιστών *Apis* και *Bombyx* με χρήση BLASTP [35]. Οι *Nosema ceranae* πρωτεϊνικές αλληλουχίες αποκλείστηκαν θέτοντας ως κατώφλι προσδοκώμενης τιμής (*E-value*) το 10 με την παραδοχή ότι έχουν ένα ορισμένο βαθμό ομοιότητας με τις πρωτεΐνες του ξενιστή τους. Με αυτόν τον τρόπο, λάβαμε τις πρωτεΐνες της *N. ceranae* που δεν είναι ομόλογες προς τον ξενιστή (*Apis* και *Bombyx*), καθότι οποιοσδήποτε βαθμός ομοιότητας αλληλουχίας θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες κυτταροτοξικές διασταυρούμενες αντίδρασεις με τον ξενιστή σε περίπτωση που επιλεγούν ως στόχοι φαρμάκων. Το σύνολο δεδομένων (Set2 πρωτέωμα), το οποίο περιλαμβάνει 740 πρωτεΐνες, δεν έχει καμία ομολογία με το πρωτέωμα του ξενιστή και περιέχει πρωτεΐνες παρούσες αποκλειστικά και μόνο στην *N. ceranae*.

Το επόμενο βήμα ήταν να προσδιορίσουμε τα γονίδια που κωδικοποιούν εκείνες τις πρωτεΐνες της *N. ceranae* που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του μικροσποριδίου. Για το σκοπό αυτό, το Set2 πρωτέωμα διερευνήθηκε μέσω της DEG (βάση δεδομένων των απαραίτητων γονιδίων) [43]. Η DEG περιέχει εκείνα τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του κυττάρου και βρίσκονται στο γονιδίωμα των οργανισμών πρότυπων. Το Set2 πρωτέωμα συγκρίθηκε με το πρωτέωμα των οργανισμών αναφοράς *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* και *Aspergillus fumigatus* στη DEG χρησιμοποιώντας BLASTP, θέτοντας ως κατώφλι της *E-value* το 10^{-5} και bit score το 100. Ως εκ τούτου, το Set 3 πρωτέωμα της *N. ceranae* που ελήφθη περιλαμβάνει 51 απαραίτητες πρωτεΐνες που βρίσκονται αποκλειστικά σε εκείνη.

Η ανεύρεση μεταβολικών μονοπατιών για την ανάλυση απαραίτητων πρωτεϊνών της *N. ceranae* πραγματοποιήθηκε μέσω KAAS [44]. Το KAAS παρέχει λειτουργικό

σχολιασμό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες διεξάγωντας αναζητήσεις ομολογίας αλληλουχιών, με χρήση BLAST, στη βάση δεδομένων KEGG GENES. Σε κάθε πρωτεϊνική αλληλουχία εισόδου ανατίθεται κωδικός πρόσβασης KO (KEGG Orthology). Συλλογικά, 17 πρωτεΐνες (Set4 πρωτέωμα) του προτεώματος Set3 βρέθηκαν να εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια της *N. ceranae* (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Οι απαραίτητες για την *Nosema ceranae* πρωτεΐνες. Πρώτη στήλη: NCBI RefSeq κωδικός καταχώρησης για την αντίστοιχη πρωτεΐνη *N.ceranae*. Δεύτερη στήλη: KO κωδικός καταχώρησης. Τρίτη στήλη: σύμβολο του γονιδίου που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη της πρώτης στήλης. Τέταρτη στήλη: περιγραφή του γονιδίου της τρίτης στήλης. Οι πρωτεΐνες STX1B_2_3 και TOM40 υποδεικνύονται με κόκκινο.

RefSeq κωδικός καταχώρησης	KO κωδικός καταχώρησης	Σύμβολο γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
XP_002996292.1	K02148	ATPeV1C	V-type H ⁺ -transporting ATPase subunit C
XP_002995813.1	K02155	ATPeV0C	V-type H ⁺ -transporting ATPase 16kDa proteolipid subunit
XP_002995059.1	K02328	POLD2	DNA polymerase delta subunit 2
XP_002995918.1	K02727	PSMA3	20S proteasome subunit alpha 7
XP_002996012.1	K02918	RP-L35e	large subunit ribosomal protein L35e
XP_002996021.1	K03033	PSMD3	26S proteasome regulatory subunit N3
XP_002995705.1	K03039	PSMD13	26S proteasome regulatory subunit N9
XP_002996265.1	K03132	TAF7	transcription initiation factor TFIID subunit 7
XP_002996766.1	K08486	STX1B_2_3	syntaxin 1B/2/3
XP_002996007.1	K10739	RFA2	replication factor A2
XP_002996556.1	K11108	RCL1	RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein
XP_002995954.1	K11215	STE12	transcription factor STE12
XP_002996082.1	K11518	TOM40	mitochondrial import receptor subunit TOM40
XP_002996094.1	K12160	SUMO	small ubiquitin-related modifier
XP_002995896.1	K14408	CSTF3	cleavage stimulation factor subunit 3
XP_002996008.1	K14554	UTP21	U3 small nucleolar RNA-associated protein 21
XP_002995438.1	K14568	EMG1	rRNA small subunit pseudouridine methyltransferase Nep1

Κάθε μία από τις πρωτεΐνες αυτές ελέγχθηκε για ομόλογες πρωτεΐνες με υψηλό βαθμό ομοιότητας στην *N. apis* και στην *N. bombycis* με χρήση του BLASTP, θέτοντας ως κατώφλι της E-value το 10^{-75} . Στη συνέχεια, οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες ομόλογες των *N. apis* και *N. bombycis* ανακτήθηκαν και ευθυγραμμίστηκαν με εκείνες της *N. ceranae* χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ευθυγράμμισης αλληλουχιών PROMALS3D [37]. Οι ευθυγραμμίσεις επιθεωρήθηκαν οπτικά και επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες των πρωτεΐνων με καθολική και επαρκή ευθυγράμμιση και στα τρία γένη *Nosema* για περαιτέρω έρευνα.

Ομόλογες αλληλουχίες των πρωτεϊνών αυτών αναζητήθηκαν στο πρωτέωμα των ξενιστών *Apis* και *Bombyx* χρησιμοποιώντας BLASTP (κατώφλι E-value = 10, όπως και πριν). Από αυτές, οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν είχαν ομόλογες στους οργανισμούς ξενιστές θεωρήθηκαν ως στόχοι υποψήφιου φαρμάκου. Με τον τρόπο αυτό, δύο σύνολα ομολόγων πρωτεϊνών, των *N. ceranae*, *N. apis* και *N. bombycis*, που πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής επιλέχθηκαν, και συγκεκριμένα οι XP_002996766.1 και XP_002996082.1, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια STX1B_2_3 (συνταξίνη 1B /2/3) και TOM40 (κανάλι εισαγωγής πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη), αντίστοιχα (**Πίνακας 5**). Έν συνεχεία, τα δύο σύνολα ομολόγων πρωτεϊνών ευθυγραμμίστηκαν με χρήση του PROMALS3D [37] (**Εικόνες 21 & 22**).

Πίνακας 5. Οι πρωτεΐνες της *N. ceranae* STX1B_2_3 και TOM40 καθώς και οι ομόλογες τους στην *N. apis* και *N. bombycis*.

GeneBank κωδικός καταχώρησης			Σύμβολο γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
<i>Nosema ceranae</i>	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema bombycis</i>		
XP_002996766.1	EQB61435.1	EOB15057.1	STX1B_2_3	syntaxin 1B/2/3
XP_002996082.1	EQB61321.1	AET97826.1	TOM40	mitochondrial import receptor subunit TOM40

Εικόνα 21. Ευθυγράμμιση των ομολόγων πρωτεϊνών STX1B_2_3 στη *N. ceranae*, *N. apis* και *N. bombycis*, όπου *e*: β-πτυχωτή επιφάνεια και *h*: α-έλικα.

Nosema_ceranae_STX1B_2_3	-MDDFLTKSKKFFSDVNQLKSYSASFHLSGQKNSGILDK	39
Nosema_apis_STX1B_2_3	-MREFLDSSKKFFADIDTLRNYTRKFNYLSSQKNNGILDS	39
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	MMREFLVSSKKFFEDVKTLDSYTKSFEHLNSRLNNSILNE	40
	.Mc-FLspSKKFF.DlppLcsYo.pFp@LsSpbNstILsp	
	hh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	KTEKMLNNQMEAINNKFRKLSNELKDRLQEATSEISDSQS	79
Nosema_apis_STX1B_2_3	KTEKSVNNQIEVINERFKLSNELKDQLNEFNEILDQTQES	79
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	KDEKSIHNQIEVVNKRFKLSLSLNEKINVSTDQIEQOMEN	80
	KsEK.lpNQhEhlnp+F+pLS.pLp-plp..spbLpp.ps	
	hh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	-NENFMYKTKKIHVHSQTKALTSAINERYDAQYQYKKEEE	118
Nosema_apis_STX1B_2_3	EMKKFDYQTMQIHVHAQTKALANSVNQYRDAQYKQKHQEE	119
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	KNDNFYKTLKIHLHAQTKALTAAVNKYRDAQFKHKAEEE	120
	..cpF.YpTbpIHlhtQTKALhstlnpYRDAQ@p.K.pEE	
	hh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	EKFKLQFFIARPDANEDEISECINEDRGESILASAFALGS	158
Nosema_apis_STX1B_2_3	TKFKLQFVIAPKPDADENEINEFISDDKNDAKLGAAFALGS	159
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	EKFKLQYIIAKPGADEDEINESISGDQSDAKLASAFALGS	160
	pKFKLQ@hIA+PsAsEsEIsE.Is.Dps-tbLttAFALGS	
	hhhhhhhhhh hhhhhhhhhh hhhhhhhhhhhh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	NSAKGILDEAKNRKTNIQKIATMIQELIEMLKILNDAIYQ	198
Nosema_apis_STX1B_2_3	KSAKSILNEAEKRKTNIRKIAMMIQDLIEMMRILDEAIHK	199
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	NSAQGILEEAEKRKTNIKKIGEMIQELIEMMRILNEAISK	200
	pSAptILpEAcpRKTNIpKI.t.MIQ-LIEMh+ILs-AI.p	
	hh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	QHDVVDNIEQDITTAHENTAAANIDLEAALDYQIRASRLK	238
Nosema_apis_STX1B_2_3	QSAVVDKISENTETAYENTAAANVDLEQALDYQIRASRIK	239
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	QTDVVDKIAENLITAEENTAAANVDLTQALDYQIRATRIK	240
	QpsVVDpI.psh.TA.ENTAAANLDLp.ALDYQIRAoRlK	
	hh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	KILIGIVVTIVVIIIVFVVIKIAFFSDYSPYGK--HQYNV	276
Nosema_apis_STX1B_2_3	RIIIGILAVLVIAGLGLFLILKFGFLNGGSSNDTSRILHTF	279
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	RIIGTCVVVVVIIAILYVILKLNIFGT-KRNE-----	271
	+I1.shlhhIVlh.1.@lllKshhss.p.....	
	hh	
Nosema_ceranae_STX1B_2_3	IF-	278
Nosema_apis_STX1B_2_3	LFK	282
Nosema_bombycis_STX1B_2_3	---	
	...	

Εικόνα 22. Ευθυγράμμιση των ομολόγων πρωτεϊνών TOM40 στη *N. ceranae*, *N. apis* και *N. bombycis*, όπου *e*: β-πτυχωτή επιφάνεια και *h*: α-έλικα.

Nosema_ceranae_TOM40	---MKSFYKIKSYLFSKSAINTSFDTFNLENSITSLNLY	37
Nosema_apis_TOM40	---MKSSLKNIWKLFKEEITFSYDSCNNEISKITDLYPF	37
Nosema_bombycis_TOM40	MSWISNGLKNL---FSKKIETSFDKYNLETSMILETDNY	36
	...hps.hKp1...Fpp.IphS@DphN.E.s.Ihph.s@	
	hhhhh	hhhhhhhhh
Nosema_ceranae_TOM40	TGVKTEISKTVSPHFQISHVSSMGADFDIKQTYATFCFNN	77
Nosema_apis_TOM40	SGVSTEISKTLTPNIQIRHISIINSNETSKQLIGNLSFYN	77
Nosema_bombycis_TOM40	SGLKAEVSLDNTQLSFISYNADKFIIRNAFCTFCTTN	76
	oGlpheLSKTlospHQlp@lS.hstsb..+phhtshth.N	
	eeeeeeee	eeeeeeee
		ee
Nosema_ceranae_TOM40	LLLQTSIDQDKIFRIRGTHMFKNLLTKFHTVIGRSKDIFT	117
Nosema_apis_TOM40	MLWQINADQDKNLQIRGTHIYKNILSKFNYSQITNREKYI	117
Nosema_bombycis_TOM40	SLFQFSLDQKNMQFQGTHLYKKLVTKFNTVYSEDKNVFS	116
	.LhQhshDQsK.hphpGTHh@Kp1loKFphsb.ps+p.@.	
	eeeeeeee	eeeeeeee
		eeeeeeeeee
		ee
Nosema_ceranae_TOM40	QIEVDIKNKYNNMCIKMIQPAIKGASCIYVGNMQQLGVI	157
Nosema_apis_TOM40	HFEFDIKNKYNNLCFKLFRLSKELSSVGILNFMQKIGNL	157
Nosema_bombycis_TOM40	QINIELNNKLNCLKMIKPAIKGASFIYIFNYMQQLGNA	156
	pphp-lpNKhNNhChKhhp.h.K.hS.l.l.N@MqlGsh	
	eeeeeeee	eeeeeeee
		eeeeeeeeee
		e
Nosema_ceranae_TOM40	SLGGEI IKADEYIGLSFVGRYEGIGSISTISLQQFNTLSI	197
Nosema_apis_TOM40	SIGTEVIKVENGIGLSFSSRFEILNSIFTVSLHQFNLSA	197
Nosema_bombycis_TOM40	SIGTEIISSEYCSLSFAGRYKKGNSIGSIGLQHLNTFSF	196
	SIGsEliPs-p.htLSFstR@c..sSI.oltLpphNhhsh	
	eeeeeeee	eeeeeeeeee
		eeeeeeee
		eee
Nosema_ceranae_TOM40	DYYKTLSSICDVGIKISTDREKSVNYGLGVKLSKKEGII	237
Nosema_apis_TOM40	DLYYKLNEMIDFGLKFSTSKDSEVCYGLGIRVYSNRGEVI	237
Nosema_bombycis_TOM40	DFYRKLNEIFEIGITSTISRDKTYSYGLGCKITTDKAEAK	236
	DhY.pLsphh-hGlp.ohs+-pphsYGLGh+lhop+tehb	
	eeeeee	eeeeeeeeee
		eeeeeeeeee
Nosema_ceranae_TOM40	GCVDNNHILSIYNDKLSEGLTLNLSCRFGKVKVFDYGYGF	277
Nosema_apis_TOM40	GSLNSSRQLCLSFNKDLGEGIYINASCRLKNNFIYGYGF	277
Nosema_bombycis_TOM40	INF'DNNKKIRFSLIDKLSNFVNMNCEIGKGEFIYGYGL	276
	.shsss+bl.h.h.DKLtEsh.lNhsCch.K..F.YGYGh	
	eeee	eeeeeeeeee
		eeeeeeeeee
		eeeeee
Nosema_ceranae_TOM40	IYEF	281
Nosema_apis_TOM40	TYEF	281
Nosema_bombycis_TOM40	NYYF	280
	.YbF	
	eee	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρασίτωση της δυτικής μέλισσας *Apis mellifera* από το μικροσπορίδιο *Nosema* spp αποτελεί μία από τις σοβαρές απειλές της σύγχρονης μελισσοκομίας. Δεδομένης της σημασίας της μέλισσας στην οικονομία καθίσταται επιτακτική πια η ανάγκη της εύρεσης καινούργιων τρόπων και μέσων φαρμακευτικής αντιμετώπισης της νοσέμωσης, της ασθένειας η οποία προκαλείται από την προαναφερθείσα παρασίτωση. Στη παρούσα εργασία επιχειρείται μία προσέγγιση της διαδικασίας ανεύρεσης πιθανών καινούργιων φαρμακευτικών στόχων χρησιμοποιώντας τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα του καλά μελετημένου μικροσποριδίου *Encephalitozoon cuniculi*, καθώς και της τεχνολογίας της βιολογίας συστημάτων.

Αρχικά εξετάστηκαν δεκατέσσερα μολυσμένα με *Nosema* spp δείγματα τα οποία περισυλλέγησαν από διαφορετικά μέρη της Ελλάδας και με μοριακές τεχνικές ανιχνεύτηκε το είδος του μικροσποριδίου από το οποίο μολύνθηκαν. Το μικροσπορίδιο *N. ceranae*, που όπως αναφέρθηκε εμφανίζεται να εξαπλώνεται ολοένα και περισσότερο εις βάρος του μικροσποριδίου *N. apis* [17-20], το οποίο μέχρι προ δεκαετίας κυριαρχούσε στη δυτική μέλισσα, φαίνεται πως είναι εκείνο που κυρίως ανευρίσκεται πια και στην μέλισσα της Ελληνικής επικράτειας. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως από όλα τα δείγματα των μελισσών που εξετάστηκαν σε κανένα δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία της *N.apis*, ενώ σε όλα τα δείγματα ανιχνεύτηκε η ασιατική *N. ceranae* υποστηρίζοντας περαιτέρω το γεγονός πως *N. ceranae* έχει σε πολύ μεγάλο βαθμό αντικαταστήσει την *N. apis*. Στη συνέχεια επιλέχτηκαν τρεις ομόλογες και για τα τρία είδη μικροσποριδίων (*Encephalitozoon cuniculi*, *N. apis* και *N. ceranae*) σημαντικές για τη βιολογική διεργασία του μικροσποριδίου πρωτεΐνες, η πρωτεάση Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης, η Απακετυλάση της Χιτίνης, η οποία καταλύει την απακετυλίωση της χιτίνης, ενός δομικού βιοπολυμερούς που βρίσκεται στα τοιχώματα των μικροσπορίων [45] και η Αλδολαση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης, η οποία εμπλέκεται στη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης. Για όλες τις επιλεγείσες πρωτεΐνες υπάρχει τρισδιάστατη δομή από το συγγενικό *E. cuniculi*. Με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων έγινε η επιλογή των ζευγών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε τρεις αντιδράσεις PCR με σκοπό την ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις επιλεγμένες πρωτεΐνες. Η Αμινοπεπτιδάση 2 της Μεθειονίνης αποτελεί την

πρωτεΐνη στόχο του έως σήμερα ευρέως χρησιμοποιούμενου εναντίον της νοσέμωσης αντιβιοτικού της φουματζιλλίνης [20]. Όπως όμως έχει ήδη αναφερθεί, τα αποτελέσματα της φουματζιλλίνης κρίνονται ικανοποιητικά μόνο εναντίον της *N. apis*, ενώ δεν ισχύει ο ίδιος και για την *N. ceranae* [17-20]. Το γεγονός αυτό καθίσταται εμφανές στην τρίτη κατά σειρά αντίδραση PCR όπου ανιχνεύεται το γονίδιο που κωδικοποιεί την εν λόγω πρωτεΐνη. Χαρακτηριστικά θετικός εμφανίζεται ο *N.apis* δείκτης (No 16) ενώ μόνο δύο μολυσμένα με *N. ceranae* δείγματα (No9&No14) καθώς και ο δείκτης της *N. ceranae* (No15) παρουσιάζονται αντίστοιχα θετικά. Αξίζει να σημειωθεί πως κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των σπορίων τους, τα δείγματα με αριθμό 9 και 14 δεν ήταν εκείνα που περιείχαν τον μεγαλύτερο αριθμό σπορίων γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο βαθμός της μόλυνσης και η αποτελεσματική θεραπεία δεν είναι άμεσα συνδεδεμένα μεταξύ τους. Πιθανώς η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη στόχο της φουματζιλλίνης να εμφανίζεται μόνο σε κάποια συγκεκριμένη στιγμή της ζωής της *N. ceranae*, όπως για παράδειγμα τη στιγμή της βλάστησής του μικροσποριδίου, και ως εκ τούτου να μην υπάρχει καλή ανταπόκριση στο εν λόγω αντιβιοτικό, ενώ φαίνεται να εκφράζεται σταθερά στη *N. apis*. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η δεύτερη αντίδραση PCR που αποσκοπούσε στην ανίχνευση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας που κωδικοποιεί την απαραίτητη για το τοίχωμα του μικροσποριδίου πρωτεΐνη Απακετυλάση της Χιτίνης. Βάσει αποτελεσμάτων, τα δείγματα με αριθμό 4, 5, 6, 7, 9, 12 και 13, καθώς και ο θετικός για τη *N. ceranae* δείκτης (No15) εμφανίστηκαν θετικά, γεγονός αρκετά ενθαρρυντικό όσον αφορά την επιλογή της Απακετυλάσης της Χιτίνης ως πιθανού φαρμακευτικού στόχου. Η τελευταία αντίδραση PCR αφορούσε όπως έχει ήδη αναφερθεί την ανεύρεση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας που κωδικοποιεί την απαραίτητη για τον μεταβολισμό πρωτεΐνη Αλδολάση της Διφωσφορικής Φρουκτόζης. Θετικά εμφανίζονται τα δείγματα No9 και No12, καθώς και ο θετικός για την *N. ceranae* δείκτης. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα και των τριών αντιδράσεων είναι εμφανές πως το δείγμα No9 παρουσιάζεται θετικό και στις τρεις αντιδράσεις PCR, το οποίο και κατά την ποσοτική καταμέτρηση των σπορίων του εμφανίζει μεγάλο ποσοστό μόλυνσης.

Στο πλαίσιο της παρούσης εργασίας διεξήχθη επίσης η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός ενός πιθανού στόχου για εφαρμογή φαρμακευτικών ουσιών επί του μικροσποριδίου *Nosema ceranae* με την χρήση μιας υπολογιστικής μεθοδολογικής προσέγγισης. Από τις συνολικές 2060 πρωτεΐνες του μικροσποριδίου *Nosema*

ceranae, επιλέχθηκαν 740 πρωτεΐνες οι οποίες δεν είχαν ομόλογες πρωτεΐνες στους οργανισμούς ξενιστές *Apis* και *Bombyx*. Εν συνεχεία, επιλέχθηκε ένα σύνολο 17 πρωτεϊνών τα αντίστοιχα γονίδια των οποίων είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα, τη φυσιολογία και τον μεταβολισμό του μικροσποριδίου. Συνολικά, βρέθηκαν 2 πρωτεΐνες οι οποίες προβλέπεται να έχουν ομόλογες πρωτεΐνες και στα τρία γένη *Nosema*, δηλαδή *N. ceranae*, *N. apis* και *N. bombycis*: 1) STX1B_2_3 (συνταξίνη 1B /2/3) και 2) TOM40 (κανάλι εισαγωγής πρωτεϊνών στη μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν πιθανούς στόχους φαρμάκων, αποφεύγοντας ταυτόχρονα πιθανές τοξικές παρενέργειες στον ξενιστή.

Η σύνθετη προσέγγιση που εφαρμόστηκε με την χρήση μοριακών τεχνικών και βιοπληροφορικών προσεγγίσεων, με στόχο την κοινή μελέτη φαρμακολογικών στόχων και αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, δοκιμάστηκε αρχικά σε τρεις σημαντικούς στόχους, ώστε να θεμελιωθεί και ρυθμιστεί η διαδικασία ανάλυσης, καθώς και να οριστούν οι βάσεις πληροφόρησης για τα συγκεκριμένα παθογόνα *Nosema* της μέλισσας. Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και υποδεικνύονται νέοι στόχοι για μελλοντική εργασία. Η επιπλέον ενσωμάτωση του λογικού σχεδιασμού φαρμακευτικών ουσιών στην διαδικασία μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό εξειδικευμένων αναστολέων ζωτικών διεργασιών του μικροσποριδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Didier ES: **Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals.** *Acta tropica* 2005, **94**(1):61-76.
2. Keeling PJ, Fast NM: **Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites.** *Annual review of microbiology* 2002, **56**:93-116.
3. Wittner M, Weiss LM: **The microsporidia and microsporidiosis**, vol. 553. Washington, DC: ASM Press; 1999.
4. Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R: **Occurrence of a new microsporidan: Enterocytozoon bieneusi n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS.** *The Journal of protozoology* 1985, **32**(2):250-254.
5. Snowden KF: **Zoonotic microsporidia from animals and arthropods with a discussion of human infection.** In: *Opportunistic infections: toxoplasma, sarcocystis, and microsporida* Edited by Lindsay DS, Weiss LM. Boston, MA: World Class Parasites; 2004: 123–134.
6. Williams BA, Hirt RP, Lucocq JM, Embley TM: **A mitochondrial remnant in the microsporidian Trachipleistophora hominis.** *Nature* 2002, **418**(6900):865-869.
7. Capella-Gutierrez S, Marcet-Houben M, Gabaldon T: **Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi.** *BMC biology* 2012, **10**:47.
8. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J *et al*: **Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny.** *Nature* 2006, **443**(7113):818-822.
9. Thomarat F, Vivares CP, Gouy M: **Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of Encephalitozoon cuniculi supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes.** *Journal of molecular evolution* 2004, **59**(6):780-791.
10. Gill EE, Fast NM: **Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes.** *Gene* 2006, **375**:103-109.
11. Higes M, Martin R, Meana A: **Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe.** *Journal of invertebrate pathology* 2006, **92**(2):93-95.
12. Smith ML: **The honey bee parasite Nosema ceranae: transmissible via food exchange?** *PloS one* 2012, **7**(8):e43319.
13. Chen YP, Huang ZY: **Nosema ceranae, a newly identified pathogen of Apis mellifera in the USA and Asia.** *Apidologie* 2010, **41**:364–374.
14. Higes M, Martin-Hernandez R, Garrido-Bailon E, Gonzalez-Porto AV, Garcia-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL: **Honeybee colony collapse due to Nosema ceranae in professional apiaries.** *Environmental microbiology reports* 2009, **1**(2):110-113.
15. Bailey L: **Effect of fumagillin upon Nosema apis (Zander).** *Nature* 1953, **171**(4344):212-213.
16. Sin N, Meng L, Wang MQ, Wen JJ, Bornmann WG, Crews CM: **The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(12):6099-6103.
17. Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski AM, Pettis JS: **Asymmetrical coexistence of Nosema ceranae and Nosema apis in honey bees.** *Journal of invertebrate pathology* 2009, **101**(3):204-209.
18. Huang WF, Bocquet M, Lee KC, Sung IH, Jiang JH, Chen YW, Wang CH: **The comparison of rDNA spacer regions of Nosema ceranae isolates from different hosts and locations.** *Journal of invertebrate pathology* 2008, **97**(1):9-13.
19. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P *et al*: **Widespread dispersal of the microsporidian Nosema**

- ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*.** *Journal of invertebrate pathology* 2007, **96**(1):1-10.
20. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P *et al*: **Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*.** *Nature* 2001, **414**(6862):450-453.
 21. Bradshaw RA, Brickey WW, Walker KW: **N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families.** *Trends in biochemical sciences* 1998, **23**(7):263-267.
 22. Arfin SM, Kendall RL, Hall L, Weaver LH, Stewart AE, Matthews BW, Bradshaw RA: **Eukaryotic methionyl aminopeptidases: two classes of cobalt-dependent enzymes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(17):7714-7718.
 23. Wu S, Gupta S, Chatterjee N, Hileman RE, Kinzy TG, Denslow ND, Merrick WC, Chakrabarti D, Osterman JC, Gupta NK: **Cloning and characterization of complementary DNA encoding the eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa protein (p67).** *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**(15):10796-10801.
 24. Krishna RG, Wold F: **Post-translational modification of proteins.** *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 1993, **67**:265-298.
 25. Coutinho PM, Henrissat B: **Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach.** In: *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*. Edited by Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson B. Cambridge, UK; 1999: 3–12.
 26. Araki Y, Ito E: **A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin.** *European journal of biochemistry* 1975, **55**(1):71-78.
 27. Davis LL, Bartnicki-Garcia S: **Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*.** *Biochemistry* 1984, **23**:1065–1073.
 28. Martinou A, Koutsioulis D, Bouriotis V: **Expression, purification, and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Protein expression and purification* 2002, **24**(1):111-116.
 29. Coluccio A, Neiman AM: **Interspore bridges: a new feature of the *Saccharomyces cerevisiae* spore wall.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 10):3189-3196.
 30. Tokuyasu K, Ohnishi-Kameyama M, Hayashi K: **Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1996, **60**(10):1598-1603.
 31. Chen Y, Pettis JS, Zhao Y, Liu X, Tallon LJ, Sadzewicz LD, Li R, Zheng H, Huang S, Zhang X *et al*: **Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions.** *BMC genomics* 2013, **14**:451.
 32. Cornman RS, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, Desany B, Egholm M, Hutchison S, Pettis JS, Lipkin WI *et al*: **Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees.** *PLoS pathogens* 2009, **5**(6):e1000466.
 33. Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS: ***Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States.** *Journal of invertebrate pathology* 2008, **97**(2):186-188.
 34. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL: **Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.** *BMC bioinformatics* 2012, **13**:134.
 35. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *Journal of molecular biology* 1990, **215**(3):403-410.
 36. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J *et al*: **Fast, scalable generation of high-quality protein**

- multiple sequence alignments using Clustal Omega.** *Molecular systems biology* 2011, **7**:539.
37. Pei J, Tang M, Grishin NV: **PROMALS3D web server for accurate multiple protein sequence and structure alignments.** *Nucleic acids research* 2008, **36**(Web Server issue):W30-34.
 38. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW: **GenBank.** *Nucleic acids research* 2017, **45**(D1):D37-D42.
 39. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P *et al*: **The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible.** *Nucleic acids research* 2017, **45**(D1):D362-D368.
 40. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B, Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D *et al*: **Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation.** *Nucleic acids research* 2016, **44**(D1):D733-745.
 41. Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, Li W: **CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences.** *Bioinformatics* 2010, **26**(5):680-682.
 42. Pan G, Xu J, Li T, Xia Q, Liu SL, Zhang G, Li S, Li C, Liu H, Yang L *et al*: **Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation.** *BMC genomics* 2013, **14**:186.
 43. Luo H, Lin Y, Gao F, Zhang CT, Zhang R: **DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements.** *Nucleic acids research* 2014, **42**(Database issue):D574-580.
 44. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M: **KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server.** *Nucleic acids research* 2007, **35**(Web Server issue):W182-185.
 45. Zhao Y, Park RD, Muzzarelli RA: **Chitin deacetylases: properties and applications.** *Marine drugs* 2010, **8**(1):24-46.