ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Μελέτη των Μονοπατιών των Μικρών Μορίων RNA στο Μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*): μία *in vitro* και *in vivo* Προσέγγιση

Διδακτορική Διατριβή

ΑΝΝΑ Ν. ΚΟΛΛΙΟΠΟΥΛΟΥ, *BSc*, *MSc*

Γεωπόνος Βιοτεχνολόγος

ΑΘΗΝΑ
Ιούλιος 2016

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
Section of Cell Biology & Biophysics

Molecular Dissection of Small RNA Pathways in the Silkworm (*Bombyx mori*): an *in vitro* and *in vivo* Approach

Doctorate (*PhD*) Thesis

ANNA N. KOLLIOPOULOU, *BSc*, *MSc*

Agricultural Biotechnologist

ATHENS
July 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη	Καθηγήτρια και Διευθύντρια Τομέα, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Luc Swevers	Ερευνητής Α', Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων & Βιοτεχνολογίας, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη	Καθηγήτρια και Διευθύντρια Τομέα, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Σπύρος Ευθυμιόπουλος	Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Διαμάντης Σίδερης	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Ιωάννης Βόντας	Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, *και* Ερευνητής Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Σκαρλάτος Ντέντος	Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Ζωολογίας και Θαλάσσιας Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
Luc Swevers	Ερευνητής Α', Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων & Βιοτεχνολογίας, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος»

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2

Στους γονείς μου,

Νίκο και Ευαγγελία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Α' και Διευθυντή του Εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Δρ. Luc Swevers, και του Επίκουρου Καθηγητή, του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δρ. Δημητρίου Ι. Στραβοπόδη. Ακόμη, στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή μου συμμετείχε η Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Δρ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη. Στο πλαίσιο υλοποίησης της εργασίας αυτής μου χορηγήθηκε τετραετής υποτροφία από το ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Καταρχάς, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον άμεσο επιβλέποντά μου Δρ. Luc Swevers, ο οποίος τα πέντε τελευταία χρόνια υπήρξε ο άνθρωπος που μου παρείχε σε κάθε ευκαιρία, και με πολλή γενναιοδωρία, άπλετη επιστημονική υποστήριξη, ενώ συγχρόνως συνέβαλλε καθοριστικά, με τις αστείρευτες γνώσεις του, στην επιτυχή καθοδήγηση και παραγωγική ολοκλήρωση της έρευνάς μου. Επιπλέον, η ηρεμία και η διακριτικότητα που τον διακρίνουν λειτούργησαν καταλυτικά για τη διατήρηση ευχάριστου κλίματος καθ' όλο το διάστημα που εργάστηκα πλάι του. Είναι άλλωστε βέβαιο ότι, χωρίς την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, ήδη από τις πρώτες ημέρες που ξεκίνησα να δουλεύω στο Εργαστήριο, δεν θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω αυτή τη Διδακτορική Διατριβή.

Ευχαριστώ εξίσου θερμά τον Καθηγητή μου, Δρ. Δημήτριο Ι. Στραβοπόδη, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε σε θέματα επιστημονικά αλλά και διαδικαστικά σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Σε κάθε βήμα του Διδακτορικού μου ήταν εκεί για να με στηρίξει και να με καθοδηγήσει στην πορεία της έρευνάς μου, αλλά και να με αφυπνίσει έναντι πιθανών κινδύνων όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Επιπλέον, χαρακτηριστικό ήταν το γεγονός ότι δεν δίσταζε να ξεφύγει από το «τυπικό» του ρόλου του και να επικοινωνήσει μαζί μου σε ανθρώπινο επίπεδο. Η προθυμία, η εμπιστοσύνη και το ειλικρινές ενδιαφέρον για την πρόοδό μου θα μείνουν ανεξίτηλα χαραγμένα στη μνήμη μου.

Ως τρίτο μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, ευχαριστώ βαθύτατα την Καθηγήτρια, Δρ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, η οποία συνέδραμε στην επίβλεψη της

μελέτης μου καθ’ όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής μου, ενώ ήταν πάντα παρούσα σε οποιαδήποτε δυσκολία ανέκυπτε. Κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας εκτίμησα την επιστημονική της καλλιέργεια, την προσήνεια και τη σεμνότητά της ως ανθρώπου. Άλλωστε, οι εύστοχες παρατηρήσεις της αναφορικά με την πορεία της έρευνάς μου επαναπροσδιόρισαν θετικά και επηρέασαν ουσιαστικά τη μετέπειτα εξέλιξή της.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της Διδακτορικής Διατριβής μου, καθώς και για την πολύτιμη και ουσιαστική στήριξή τους. Ειδικότερα, ευχαριστώ, από το Τμήμα Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον Καθηγητή του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Δρ. Σπύρο Ευθυμιόπουλο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Δρ. Διαμάντη Σίδερη, και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Ζωολογίας και Θαλάσσιας Βιολογίας, Δρ. Σκαρλάτο Ντέντο. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας, του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και Ερευνητή του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στην Κρήτη, Δρ. Ιωάννη Βόντα.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα έναν ακόμη άνθρωπο που επιτέλεσε πολύ σημαντικό ρόλο στην εκπόνηση της Διδακτορικής Διατριβής μου, και κυρίως κατά τα πρώτα βήματά μου στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, τον Ομότιμο Καθηγητή/Ερευνητή Α’ Δρ. Κώστα Ιατρού. Ως μέλος της Τριμελούς Εσωτερικής Επιτροπής, εντός του Ιδρύματος του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», υπήρξε πολύτιμος αρωγός στην έρευνά μου, καθώς μου παρείχε επιστημονικές συμβουλές και παρακολουθούσε με ενδιαφέρον την πορεία της εργασίας μου καθ’ όλη τη διάρκειά της, αλλά κυρίως λειτούργησε ως πρότυπο δημιουργικής σκέψης θέτοντας συνεχώς νέα ερωτήματα και προοπτικές στο ερευνητικό μου πεδίο.

Σημαντικότατη, και άξια πολλών ειλικρινών ευχαριστιών, ήταν η συνδρομή της Ερευνήτριας Β΄, Δρ. Βασιλικής Λαμπροπούλου στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, καθώς ως μέλος της Τριμελούς Εσωτερικής Επιτροπής στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» ήταν πάντοτε παρούσα με συμβουλές σε επιστημονικές συζητήσεις και εποικοδομητικά σχόλια ως προς τη βελτίωση των ερευνητικών μου κειμένων, ενώ ακόμη συνέβαλλε στη διαμόρφωση ευχάριστου κλίματος στο Εργαστήριο.

Βέβαια, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Φυτοπροστασίας, του Πανεπιστημίου της Γάνδης (Βέλγιο), Dr. Guy Smagghe, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στα πλαίσια μιας διεθνούς ερευνητικής ομάδας και να επισκεφθώ το εργαστήριό του αποκομίζοντας πολύτιμες εμπειρίες. Ακόμη, ευχαριστώ τον Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου της Γάνδης (Βέλγιο), Dr. Filip Van Nieuwerburgh για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχε στο επιστημονικό πεδίο της Βιοπληροφορικής, για την αποκωδικοποίηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την τεχνολογία αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS), αλλά και για τη γενικότερη συνεργασία μας.

Σημαντικότατη επίσης ήταν η συμβολή του Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Πόρων, της Σχολής Γεωπονίας, του Πανεπιστημίου Kyushu (Fukuoka, Ιαπωνία), Dr. Takahiro Kusakabe, καθώς με αφορμή την ευγενική του παραχώρηση έφτασε στα χέρια μου το απαραίτητο για τα πειράματά μου πλασμίδιο pENTR11-BmR2D2. Ακόμη, μεγάλο μέρος των πειραμάτων κατέστη εφικτό έπειτα από την ευγενική παραχώρηση του διαλύματος των πολυέδρων του ιού BmCPV από τον Καθηγητή του Ινστιτούτου Τεχνολογίας του Κυότο (Ιαπωνία), Dr. Hajime Mori.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ιδιαιτέρως το ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για την υποτροφία που μου χορήγησε προκειμένου να φέρω εις πέρας το μακρόχρονο έργο της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής, καθώς χωρίς αυτήν τίποτα από όσα περιλαμβάνονται σε αυτό το σύγγραμμα δεν θα είχε πραγματοποιηθεί. Ακόμη, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλο το Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς συνέδραμε τόσο με την παροχή εργαστηριακού εξοπλισμού, όσο και με γόνιμες συζητήσεις σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο, στην επιτυχία της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Α’, Δρ. Ηρώ Γεωργούση, την Ερευνήτρια Α’, Δρ. Έφη Τσιλιμπάρη, τον Ερευνητή Β’, Δρ. Γεράσιμο Βουτσινά, την Ερευνήτρια Β’, Δρ. Αγγελική Χρόνη, τον Ερευνητή Β’, Δρ. Γιάννη Αλμυράντη, και την Ερευνήτρια Β’, Δρ. Αναστασία Προμπονά. Επιπλέον, για την ανεκτίμητη συνδρομή τους στη χρήση του συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser ευχαριστώ τον Δρ. Θεοδόση Θεοδοσίου και την Ερευνήτρια Γ’, Δρ. Μαρίνα Σαγνού.

Από τη δική μου σκοπιά, βέβαια, το Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας θα ήταν διαφορετικό αν δεν υπήρχε η τεχνικός κ. Δήμητρα Στεφάνου με

τη «μητρική» της παρουσία όλα αυτά τα χρόνια, η οποία με στήριξε τόσο σε πρακτικά θέματα που αφορούσαν τα πειράματά μου, όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Δημήτρη Κοπανέλη που με τις τακτικές εμφανίσεις του στο Εργαστήριο μας προσέφερε, εκτός από τα άνθη του Υμηττού, τη στοργή της καρδιάς του σαν «πατέρας» μας.

Χαίρομαι ιδιαίτερα που γνώρισα όλα αυτά τα καλά παιδιά με τα οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ στη διάρκεια των χρόνων που εκπονούσα τη Διδακτορική Διατριβή μου. Ξεκινώντας από παλαιότερα, ευχαριστώ τη Χριστιάνα Μαγκριώτη, τον Κωστή Κούση, τη Γεωργία Κυθραιώτη, την Alexandra Amaral-Psarris, τον Jisheng Liu και τον Niels Wynant, με τους οποίους μοιράστηκα εκτός από το ίδιο γραφείο και πολλές χαρούμενες στιγμές. Και συνεχίζοντας στα πιο πρόσφατα χρόνια, χαίρομαι ειλικρινά καθώς ευρισκόμενη στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» απέκτησα συνταξιδιώτες και φίλους από το Εργαστήριό μας, όπως τον Άρη Ζωγραφίδη, τον Κωνσταντίνο Ιωαννίδη, την Παναγιώτα Τσίτουρα και τη Νάντια Σδράλια, αλλά και από «αδελφά» Εργαστήρια, όπως τον Κώστα Αποστόλου-Καραμπέλη, την Άντα Μπιράτση, την Αρχοντία Καμινάρη και τη Μαρία Παπακωνσταντίνου.

Τέλος, ευχαριστώ κυρίως την οικογένειά μου, τους δικούς μου ανθρώπους και τους φίλους μου εκτός «Δημοκρίτου», για τη διακριτική τους παρουσία, την υπομονή και την πολυεπίπεδη συμπαράσταση στα διάφορα, και πολλές φορές επώδυνα, στάδια που μεσολάβησαν έως ότου ολοκληρώσω τη Διδακτορική μου Διατριβή. Βέβαια, ευχαριστώ πρωτίστως το Θεό που μου επέτρεψε να φτάσω ως εδώ.

Άννα Ν. Κολλιοπούλου

Αθήνα, 04/07/2016

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

20E: 20-hydroxyecdysone, 20-υδρόξυ-εκδυσόνη

AcMNPV: *Autographa californica* Multicapsid (Multiple) Nucleopolyhedrovirus, πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *A. californica*

$AcNH_4$: ammonium acetate, οξικό αμμώνιο

AMP: antimicrobial peptide, αντιμικροβιακό πεπτίδιο

ANOVA: analysis of variance, ανάλυση διακύμανσης

APS: ammonium persulfate, υπερθειϊκό αμμώνιο

Arbovirus: Arthropod-borne Virus, αρβοϊός

asRNA: antisense RNA, μη κωδικοποιό RNA

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

BeeMLV: Bee Macula-like Virus, ιός τύπου Macula της μέλισσας

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, βασικό εργαλείο αναζήτησης με τοπική στοίχιση

BmBDV: *Bombyx mori* Bidensovirus

BmCPV: *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus, κυτταροπλασματικός πολυεδρικός ιός του *B. mori*

BmMLV: *Bombyx mori* Macula-like Virus, ιός τύπου Macula του *B. mori*

BmNPV: *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *B. mori*

bp: base pair, ζεύγος βάσεων

BS/BK: Bluescript, βακτηριακός φορέας

BSA: bovine serum albumine, αλβουμίνη ορού βοός

BV: budded virus, εκβλαστημένο ιϊκό σωμάτιο

cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA

CFAV: Cell Fusing Agent Virus

CHIKV: Chikungunya Virus, ιός Chikungunya

CIAP: calf intestine alkaline phosphatase, αλκαλική φωσφατάση από έντερο μόσχου

CP: coat protein, πρωτεΐνη καψιδίου

CrPV: Cricket Paralysis Virus, ιός παράλυσης του γρύλλου

CSP: capsid shell protein, πρωτεΐνη περιβλήματος καψιδίου

CuTLV: *Culex* Tymoviridae-like Virus, ιός τύπου Tymoviridae του κουνουπιού *Culex*

DAPI: 4',6-diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride, δι-υδροχλωρική-4',6-διαμιδίνο-2-φαινυλ-ινδόλη

DCV: *Drosophila* C Virus, ιός C της *Drosophila*

ddH_2O: double distilled H_2O, διπλά απεσταγμένο H_2O

DENV: Dengue Virus, δάγκειος ιός

DIPs: defective interfering particles, ατελή παρεμβαλλόμενα σωμάτια

DMSO: dimethylsulfoxide, διμεθυλ-σουλφοξείδιο

DNA: deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DNase I: deoxyribonuclease I, δεοξυριβονουκλεάση (DNάση) I

dNTPs: deoxynucleoside triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια

DS: deep sequencing, «βαθιά» αλληλούχιση (βλ. και NGS)

dsRBP: dsRNA-binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης σε dsRNA

dsRNA: double-stranded RNA, δίκλωνο RNA

DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη

DXV: *Drosophila* X Virus, ιός X της *Drosophila*

EBV: Epstein-Barr virus, ιός Epstein-Barr

EcR: ecdysone receptor, υποδοχέας εκδυσόνης

EcRE: ecdysone response element, στοιχείο απόκρισης στην εκδυσόνη

EDTA: ethylene-diamino-tetracetic acid, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

EtBr: ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο

EXPASY: expert protein analysis system, έμπειρο σύστημα πρωτεϊνικής ανάλυσης

EYFP: enhanced yellow fluorescent protein, ενισχυμένη κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

FBS: fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός

FHV: Flock House Virus, ιός Flock House

FITC: fluorescein isothiocyanate, ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη

GFkV: Grapevine fleck Virus, ιός κηλίδωσης της αμπέλου

GFP: green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

GO: gene ontology, γονιδιακή οντολογία

HaSNPV: *Helicoverpa armigera* Single Nucleopolyhedrovirus, απλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *H. armigera*

Hi5: High Five κύτταρα από αυγά του λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4)

hr3: homologous region 3 of BmNPV, ομόλογη περιοχή 3 του BmNPV που δρα ως ενισχυτής

HoVRV: *Homalodisca vitripennis* reovirus, ρεοϊός του *H. vitripennis*

HP: hairpin, φουρκέτα

HRP: horseradish peroxidase, υπεροξειδάση χρένου (ραπανακιού)

HSP: heat shock protein, πρωτεΐνη θερμικού σοκ

HvAV: *Heliothis virescens* Ascovirus, ασκοϊός του *H. virescens*

HzNV-1: *Heliothis zea* Nudivirus-1, ιός Nudivirus-1 του *H. zea*

IAPV: Israeli Acute Paralysis Virus, ιός οξείας παράλυσης του Ισραήλ

ie1: immediate early gene 1, άμεσο πρώιμο γονίδιο του BmNPV

IIV-6: invertebrate iridescent virus 6, ιριδίζων ιός 6 των ασπονδύλων

Imd: immune deficiency, πρωτεΐνη ανοσοανεπάρκειας

IRES: internal ribosome entry site, εσωτερική θέση πρόσβασης ριβοσώματος

JAK: Janus kinase, κινάση Janus

kb: kilobase, χιλιάδα βάσεων

kbp: kilobase pair, χιλιάδα ζευγών βάσεων

kDa: kilodalton, κιλοντάλτον (μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους πρωτεϊνών)

KRV: Kamiti River Virus, ιός Kamiti River

LPP: large protrusion protein, μεγάλη προεξέχουσα πρωτεΐνη

MA: microarray analysis, ανάλυση μικροσυστοιχιών

MbNPV: *Mamestra brassicae* Nuclear Polyhedrosis Virus, πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *M. brassicae*

MBP: maltose binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης της μαλτόζης

MCS: multiple cloning site, θέση πολλαπλής κλωνοποίησης

miRNA: microRNA

mRNA: messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 3-[4,5-διμεθυλ-θειαζολ-2-υλ]-2,5-διφαινυλο-τετραζολ-βρωμίδιο

MUT: mutant, μεταλλαγμένο

NCBI: National Center for Biotechnology Information, Εθνικό Κέντρο για Πληροφορίες Βιοτεχνολογίας

NGS: next generation sequencing, αλληλούχιση νέας γενιάς

NSP: non-structural protein, μη-δομική πρωτεΐνη

nt: nucleotide, νουκλεοτίδιο

ODV: occlusion-derived virion, έγκλειστο ιϊκό σωμάτιο

ONNV: O'nyong-nyong Virus, ιός O'nyong-nyong

ORF: open reading frame, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

PAC: puromycin acetyltransferase, ακετυλοτρανσφεράση της πουρομυκίνης

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση επί πηκτής πολυακρυλαμιδίου

PAMP: pathogen-associated molecular patterns, παθογονο-συνδεόμενο μοριακό πρότυπο

PBS: phosphate buffer saline, φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα

PCR: polymerase chain reaction, αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης

PD: proportional distance, αναλογική απόσταση

PfNPV: *Panolis flammea* Nuclear Polyhedrosis Virus, πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *P. flammea*

pfu: plaque forming unit, μονάδα σχηματισμού πλάκας

piRNA: P-element-Induced Wimpy Testis, PIWI-interacting RNA

pre-miRNA: precursor miRNA, πρόδρομο miRNA

PRR: pattern recognition receptor, υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων

qRT-PCR: quantitative Real-Time PCR, ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

RdRp: RNA-dependent RNA polymerase, RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση

RISC: RNA-induced silencing complex, RNA-επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης

RNA: ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ

RNAi: RNA interference, RNA παρεμβολή

RNase: ribonuclease, ριβονουκλεάση

rNTPs: ribonucleoside triphosphate, τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια

RPKM: reads per kilobase per million mapped reads, αναγνώσεις ανά χιλιάδα βάσεων ανά εκατομμύριο χαρτογραφημένων αναγνώσεων

rpm: rounds per minute, στροφές ανά λεπτό

RT: reverse transcription, αντίστροφη μεταγραφή

RVFV: Rift Valley fever Virus, ιός του πυρετού της κοιλάδας Rift

SDS: sodium dodecyl sulphate, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο

SE: standard error, τυπικό σφάλμα

Sf21: κυτταρική σειρά από το λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda*

SFV: Semliki Forest Virus, ιός του δάσους Semliki

SG: stress granule, κοκκίο στρες

SH: subtractive hybridization, αφαιρετικός (διαφορικός) υβριδισμός

SID: systemic RNA interference deficient, ανεπάρκεια συστημικής RNA παρεμβολής

SINV: Sindbis virus, ιός Sindbis

siRNA: short interfering RNA, μικρό παρεμβαλλόμενο RNA

SR: scavenger receptor, υποδοχέας «καθαρισμού»

sRNA: sense RNA, κωδικοποιό RNA

T4 PNK: T4 polynucleotide kinase, T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση

TAE: tris/acetate/EDTA, tris/οξικό οξύ/EDTA (βλ. και EDTA)

TBEV: Tick-Borne Encephalitis Virus, ιός της εγκεφαλίτιδας από κρότωνες

$TCID_{50}$: tissue culture infectious dose, μέση λοιμογόνος δόση ιού για την κυτταροκαλλιέργεια

TEMED: N, N, N’, N’-tetramethylene-diamine, N, N, N’, N’-τετραμεθυλενο-διαμίνη

T_m: melting temperature, θερμοκρασία αποδιάταξης

TP: turret protein, πρωτεΐνη turret

Tris: tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, τρις-(υδροξυ-μέθυλο)-αμινο-μεθάνιο

UTR: untranslated region, μη μεταφραζόμενη περιοχή

UV: ultra-violet, υπεριώδης

VP: viral protein, ιϊκή πρωτεΐνη

VSR: viral suppressor of RNAi, ιϊκός καταστολέας του RNAi

vsRNA: virus-derived small RNA, μικρό RNA ιϊκής προέλευσης

VSV: Vesicular Stomatitis Virus, ιός της φυσαλιδώδους στοματίτιδας

WGA: wheat germ agglutinin, συγκολλητίνη φύτρου σιταριού

WNV: West Nile Virus, ιός του Δυτικού Νείλου

WT: wild type, φυσικού τύπου

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1
1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ RNAi 3
1.1.1 Γενικά 3
1.1.2 Τα μονοπάτια των μικρών μορίων RNA 4
1.1.2.1 Το μονοπάτι miRNA 5
1.1.2.2 Το μονοπάτι siRNA 8
1.1.2.3 Το μονοπάτι piRNA 11
1.1.3 Η φυσική ανοσία και η σχέση της με το RNAi στα πλαίσια της αντιϊκής προστασίας 14
1.2 Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RNAi ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ 17
1.2.1 Οι μέθοδοι πρόσληψης και διάδοσης του dsRNA στα έντομα 17
1.2.2 Οι μηχανισμοί πρόσληψης του dsRNA 20
1.2.2.1 Το διαμεμβρανικό κανάλι της οικογένειας SID 20
1.2.2.2 Η ενδοκύτωση 21
1.2.3 Η πρωτεΐνη-μεταφορέας των μορίων dsRNA, SID-1 22
1.2.4 Η μεταφορά του σήματος του RNAi 26
1.2.5 Οι μέθοδοι χορήγησης του dsRNA 27
1.2.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi στα έντομα 31
1.2.7 Πειράματα RNAi στο Λεπιδόπτερο έντομο *B. mori* 35
1.3 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNAi ΥΠΟ ΤΟ ΠΡΙΣΜΑ ΤΗΣ ΙΪΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ 39
1.3.1 Οι τύποι της ιϊκής μόλυνσης 39
1.3.2 Εμμένουσα μόλυνση και έντομα 40
1.3.2.1 Τα οφέλη μίας εμμένουσας μόλυνσης 41
1.3.2.2 Μηχανισμοί που σχετίζονται με την εγκαθίδρυση μίας εμμένουσας μόλυνσης 42
1.3.3 Η συνεισφορά των μικρών RNAs στις αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή 44
1.3.3.1 Τα miRNAs 44
1.3.3.2 Τα siRNAs 48
1.3.3.3 Τα piRNAs 52
1.3.4 Ιοί που θα μελετηθούν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή 53
1.3.4.1 Οι ιοί του γένους *Maculavirus* και ο ιός BmMLV (*Bombyx mori* Macula-like virus) 53
1.3.4.2 Οι ιοί του γένους *Cypovirus* και ο ιός BmCPV (*Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus) 55
1.3.4.3 Οι ιοί της οικογένειας *Dicistroviridae* και ο ιός CrPV (Cricket Paralysis Virus) 57
1.3.4.4 Οι μπακουλοϊοί και ο ιός AcMNPV (*Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus) 59
1.4 Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RNAi ΩΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΤΕΧΝΟΓΝΩΣΙΑ 61
1.4.1 Εφαρμογές της τεχνολογίας του RNAi 61
1.4.2 Οφέλη και κίνδυνοι που προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi 63
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ 69
2.1 ΥΛΙΚΑ 71
2.1.1 Βιολογικό υλικό 71
2.1.1.1 Ο μεταξοσκώληκας *B. mori* 71
2.1.1.1.1 Κύκλος ζωής 71

2.1.1.1.2 Εκτροφή 73
2.1.1.2 Κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων 74
2.1.1.3 Βακτηριακά στελέχη 74
2.1.1.4 Πλασμίδια 74
2.1.1.5 Bacmid 75
2.1.2 Κοινά θρεπτικά μέσα και διαλύματα 75
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ 79
2.2.1 Γενικές Μέθοδοι 79
2.2.1.1 Σύνθεση δίκλωνου RNA 79
2.2.1.2 Απομόνωση DNA 80
2.2.1.3 Απομόνωση ολικού RNA 81
2.2.1.4 Αντίστροφη μεταγραφή RNA 82
2.2.1.5 Αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης 83
2.2.1.6 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου 84
2.2.1.7 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης 86
2.2.1.8 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης μέσω ηλεκτροέκλουσης 87
2.2.1.9 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI) 88
2.2.1.10 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων 89
2.2.2 Κλωνοποιήσεις 90
2.2.2.1 Γενική διαδικασία κλωνοποίησης 90
2.2.2.1.1 Προετοιμασία φορέα - Αποφωσφορυλίωση 90
2.2.2.1.2 Προετοιμασία ενθέματος 91
2.2.2.1.3 Αντίδραση σύνδεσης - Δημιουργία τυφλών άκρων 92
2.2.2.1.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ 92
2.2.2.1.5 Επιλογή αποικιών και υγρή καλλιέργεια 93
2.2.2.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα 93
2.2.2.1.7 Πολλαπλασιασμός του κλώνου και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία ή μεγάλη κλίμακα 95
2.2.2.1.8 Αλληλούχιση πλασμιδιακού DNA 98
2.2.2.2 Κλωνοποιήσεις τμημάτων γονιδίων των RNAi μονοπατιών στον πλασμιδιακό φορέα pLitmus 99
2.2.2.3 Κλωνοποιήσεις ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης στον πλασμιδιακό φορέα pEA 101
2.2.2.3.1 Ο φορέας pEA-BmAgo2-Myc.His 101
2.2.2.3.2 Ο φορέας pEA-BmAgo3-Myc.His 102
2.2.2.3.3 Ο φορέας pEA-Flag-BmAub 103
2.2.2.3.4 Ο φορέας pEA-Myc-BmDcr2 104
2.2.2.3.5 Οι φορείς pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-Flag-BmR2D2 105
2.2.2.3.6 Οι φορείς pEA-Flag-BmDcr2, pEA-BmTranslin2-Myc.His και pEA-TcR2D2-Myc.His 106
2.2.2.4 Κλωνοποιήσεις για την παραγωγή RNA φουρκετών 106
2.2.2.4.1 Κλωνοποίηση της RNA φουρκέτας HP-Ago3 106
2.2.2.4.2 Κλωνοποίηση της RNA φουρκέτας HP-Aub 107
2.2.2.4.3 Κλωνοποίηση της RNA φουρκέτας HP-Luc 108
2.2.2.5 Κλωνοποιήσεις των φουρκετών S1.2-WT και S1.2-MUT στους πλασμιδιακούς φορείς pEA-EYFP και pLitmus-38i 109
2.2.2.5.1 Κλωνοποίηση στον pEA-EYFP 110

2.2.2.5.2 Κλωνοποίηση στον pLitmus-38i 111
2.2.2.6 Κλωνοποιήσεις για την κατασκευή του ιού AcMNPV-EYFP 111
2.2.3 Πειράματα *in vitro* 112
2.2.3.1 Μετρήσεις βιωσιμότητας με τη χρωστική Trypan Blue 112
2.2.3.2 Ανάλυση κυτταροτοξικότητας μέσω δοκιμασίας MTT 113
2.2.3.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων 114
2.2.3.4 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών 119
2.2.3.5 Συλλογή και λύση κυττάρων 120
2.2.3.6 Λειτουργικά πειράματα βιοφωταύγειας 120
2.2.3.7 Στατιστική ανάλυση των πειραμάτων βιοφωταύγειας 121
2.2.3.8 Αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση Western 122
2.2.3.9 Ανοσοφθορισμός 124
2.2.3.10 Μολύνσεις κυττάρων με τον ιό CrPV 126
2.2.3.11 Υπολογισμός ιϊκού τίτλου και μέσης λοιμογόνου δόσης ($TCID_{50}$) 126
2.2.3.12 Ψύξη κυττάρων 127
2.2.4 Πειράματα *in vivo* 128
2.2.4.1 Ενέσεις ζώων με dsRNA 128
2.2.4.2 Μολύνσεις ζώων με τον ιό BmCPV 128
2.2.4.3 Συλλογή δείγματος ζωικού ιστού 129
2.2.4.4 Αλληλούχιση νέας γενιάς για την ανάλυση του μεταγραφώματος και των μικρών RNAs σε προνύμφες μολυσμένες με τον ιό BmCPV 130
2.2.4.5 Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας 133

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 135
3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ RNAi ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ 135
3.1.1 Λειτουργική ανάλυση της απόκρισης του RNAi μηχανισμού σε κύτταρα Bm5 137
3.1.1.1 Διερεύνηση των βασικών RNAi παραγόντων που συμμετέχουν στη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω dsRNA στα κύτταρα Bm5 138
3.1.1.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσης της γονιδιακής αποσιώπησης των RNAi παραγόντων που επάγεται μέσω μορίων dsRNA σε κύτταρα Bm5 145
3.1.1.3 Διερεύνηση του ρόλου των μονόκλωνων RNAs στην ενδοκυτταρική απόκριση του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5 148
3.1.1.4 Η επίδραση της υπερέκφρασης πρωτεϊνών-κλειδιών του siRNA μονοπατιού στη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω dsRNA σε κύτταρα Bm5 150
3.1.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός βασικών παραγόντων του RNAi σε κύτταρα Bm5 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού 152
3.1.2.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός των κύριων πρωτεϊνών του siRNA μονοπατιού 152
3.1.2.2 Υποκυτταρικός συνεντοπισμός των κύριων πρωτεϊνών του siRNA μονοπατιού 158
3.1.2.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης BmTranslin2 163
3.1.2.4 Υποκυτταρικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών BmR2D2 και TcR2D2 164
3.1.2.5 Παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν την αξιοπιστία της τεχνικής του ανοσοφθορισμού ως προς τον πρωτεϊνικό υποκυτταρικό εντοπισμό 166
3.1.3 Ανάλυση του ρόλου των γονιδίων του piRNA μονοπατιού *BmAgo3* και *BmAub* σε κύτταρα Bm5 168
3.1.3.1 Μελέτη της υπερέκφρασης των *BmAgo3* και *BmAub* σε σχέση με τον RNAi μηχανισμό 168

3.1.3.2 Μελέτη της αποσιώπησης των γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* μέσω έκφρασης RNA φουρκετών 172
3.1.3.2.1 Έλεγχος λειτουργικότητας των RNA φουρκετών 172
3.1.3.2.2 Σταθερός μετασχηματισμός κυττάρων Bm5 με τους φορείς έκφρασης των RNA φουρκετών 177
3.1.3.2.3 Οι επιπτώσεις της μειορρύθμισης του *BmAgo3* σε σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα Bm5 184
3.1.3.2.3.1 Ο ιός Macula-like Virus (BmMLV) 184
3.1.3.2.3.2 Γονίδια που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό 185
3.1.3.2.3.3 Αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού 188
3.1.4 Μελέτη της δυνατότητας πρόκλησης συστημικού RNAi στον *B. mori* 190
3.1.4.1 Η έκφραση των βασικών siRNA γονιδίων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και όργανα των στελεχών του *B. mori* P50 και Daizo 190
3.1.4.2 Πειράματα πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω ενέσεων dsRNA *in vivo* 194
3.1.4.2.1 Απόπειρα αποσιώπησης του γονιδίου *BmEcR* 194
3.1.4.2.2 Απόπειρα αποσιώπησης του γονιδίου *BmFTZ-F1* 197

3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΜΙΑΣ ΙΪΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ 201
3.2.1 Μελέτη της επίδρασης του RNAi μηχανισμού στην ιϊκή ανάπτυξη σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων 203
3.2.1.1 Διερεύνηση του ρόλου του miRNA μονοπατιού στην αυτορρύθμιση του γονιδίου VP1 του ιού BmCPV 203
3.2.1.1.1 Έκφραση των pre-microRNAs που στοχεύουν τη VP1 μέσω του φορέα pEA-EYFP 203
3.2.1.1.2 *In vitro* σύνθεση των pre-microRNAs που στοχεύουν στην πρωτεΐνη VP1 207
3.2.1.2 Μελέτη της επίδρασης των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα στην ανάπτυξη του ανασυνδυασμένου ιού AcMPNV-EYFP 209
3.2.1.3 Δοκιμή μόλυνσης με τον ιό Cricket Paralysis Virus (CrPV) 216
3.2.2 Ανάλυση της μεταγραφικής απόκρισης και των μικρών μορίων RNA στο μεσέντερο του *B. mori* έπειτα από εμμένουσα και παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV 219
3.2.2.1 Φαινοτυπική παρατήρηση προνυμφών μεταξοσκώληκα Daizo μολυσμένων με τον ιό BmCPV 220
3.2.2.2 Ανίχνευση παθογόνου και εμμένουσας μόλυνσης 221
3.2.2.3 Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας 224
3.2.2.4 Ανάλυση μεταγραφώματος 227
3.2.2.4.1 Γενικές παρατηρήσεις 227
3.2.2.4.2 Γονίδια που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση και η πιθανή σχέση τους με την αντιϊκή απόκριση έναντι του BmCPV 231
3.2.2.4.3 Γονίδια που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό 240
3.2.2.4.4 Γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση 249
3.2.2.5 Ανίχνευση και ανάλυση των μικρών RNAs του ιού BmCPV (vsRNAs) 252

3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ dsRNA ΑΠΟ ΤΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΜΕΣΟ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ 255
3.3.1 Μελέτη ετερόλογης έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CeSID-1-Flag του *C. elegans* σε κύτταρα Bm5 257
3.3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης CeSID-1 του *C. elegans* σε κύτταρα Bm5 258
3.3.3 Διερεύνηση της δυνατότητας πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω 260

εμβαπτισμού κυττάρων μεταξοσκώληκα σε μέσο που περιέχει dsRNA
3.3.3.1 Εμβαπτισμός κυττάρων L6Q-Luc σε μέσο που περιέχει dsLuc 260
3.3.3.2 Εμβαπτισμός κυττάρων Bm5 σε μέσο που περιέχει dsVH-ATPase 261
3.3.3.3 Εμβαπτισμός κυττάρων L6Q σε μέσο που περιέχει dsgfp 263
3.3.3.4 Έλεγχος των πρωτεϊνών BmR2D2 και BmTranslin2 ως προς την πιθανή συμμετοχή τους στην ενίσχυση της γονιδιακής αποσιώπησης έπειτα από εμβαπτισμό κυττάρων σε μέσο που περιέχει dsRNA 264

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ 269
4.1 Ο ρόλος των κύριων RNAi παραγόντων στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού 271
4.2 Ο ρόλος μίας ιϊκής μόλυνσης στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού 286
4.3 Η επίδραση της πρόσληψης του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού 294
4.4 Σύνοψη αναφορικά με τα γονίδια του RNAi μηχανισμού 297
4.5 Σύγκριση των παραγόντων που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού σε σχέση με τη *Drosophila* 300
4.6 Η συμβολή της Διδακτορικής Διατριβής στην επιστήμη 302
4.7 Μελλοντικές εφαρμογές που προκύπτουν από τα αποτελέσματα της Διδακτορικής Διατριβής 304

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 307

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 311

ABSTRACT 317

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 323
Προγράμματα PCR 325
Εκκινητές 326
Πλασμιδιακοί χάρτες 330

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 335

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ RNAi

1.1.1 Γενικά

Ο μηχανισμός της παρεμπόδισης της γονιδιακής λειτουργίας μέσω RNA ή αλλιώς RNA παρεμβολή (RNA interference, RNAi) πρόκειται για μία διαδικασία μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, η οποία παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (Berezikov, 2011; Burand and Hunter, 2012; Carthew and Sontheimer, 2009).

Η ανακάλυψη, πριν από 18 χρόνια, ότι η εξωγενής χορήγηση μορίων dsRNA έχει την ιδιότητα να αποσιωπεί την έκφραση συμπληρωματικών mRNAs στον *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998) ήταν πρωτοποριακή για την έρευνα σχετικά με τους ζωικούς οργανισμούς, αν και αντίστοιχες τεχνικές μετα-μεταγραφικής γονιδιακής αποσιώπησης είχαν ήδη περιγραφεί για τα φυτά και τους μύκητες (Matzke et al., 1989; Romano and Macino, 1992). Πλέον τα τελευταία χρόνια, για την καλύτερη κατανόηση του RNAi μηχανισμού, και κατ' επέκταση την πιθανή χρησιμοποίησή του σε πειράματα μελέτης της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεθόδων αντίστροφης Γενετικής (reverse Genetics), πλήθος μελετών έχουν διεξαχθεί σε οργανισμούς όπως νηματώδεις, μύκητες, φυτά, έντομα αλλά και στον άνθρωπο (Belles, 2010; Dang et al., 2011; Lindbo, 2012; Maule et al., 2011; Seyhan, 2011).

Ο μηχανισμός του RNAi φυσιολογικά εμπλέκεται σε διαδικασίες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, των επιγενετικών τροποποιήσεων και της άμυνας έναντι παθογόνων, ενώ παράλληλα έχει εξελιχθεί σε ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την έρευνα μέσω αντίστροφης Γενετικής. Ειδικότερα, το RNAi έχει φανεί χρήσιμο στη γονιδιωματική για τον προσδιορισμό της λειτουργίας αλλά και την αποσιώπηση ενός γονιδίου σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Παράλληλα, στην Ιατρική βρίσκει εφαρμογές στον έλεγχο του καρκίνου και των ιϊκών μολύνσεων, ενώ αποδεικνύεται ως ένα εργαλείο με ισχυρή προοπτική για τη Γεωπονική Βιοτεχνολογία (Gordon and Waterhouse, 2007; Price and Gatehouse, 2008).

Προκειμένου για τα έντομα, η τεχνική του RNAi προσβλέπει στη βελτίωση της αγροτικής παραγωγής. Έτσι, η στόχευση και αποσιώπηση μέσω RNAi γονιδίων, τα οποία κρίνονται απαραίτητα για την επιβίωση ορισμένων επιβλαβών εντόμων, θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη για την προστασία καλλιεργειών έναντι αυτών (Burand and Hunter,

2012; Swevers and Smagghe, 2012). Επιπλέον, στρατηγικές χρήσης του RNAi έχουν ήδη εφαρμοστεί για την καταπολέμηση ιϊκών ασθενειών σε έντομα που είναι χρήσιμα για τον άνθρωπο, όπως ο μεταξοσκώληκας και η μέλισσα (Aronstein et al., 2011).

1.1.2 Τα μονοπάτια των μικρών μορίων RNA

Στα έντομα, η μέθοδος του RNAi έχει μελετηθεί εκτενώς κατά τα τελευταία χρόνια, με τη *Drosophila* να αποτελεί το βασικό πρότυπο σύστημα για τη μελέτη αυτού του μηχανισμού (Carthew and Sontheimer, 2009). Τα μονοπάτια του μηχανισμού της γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες: α) το **mi**RNA (**mi**croRNA), β) το **si**RNA (**s**hort **i**nterfering RNA) και γ) το **pi**RNA (**P**-element-**I**nduced **Wi**mpy testis, **PIWI**-interacting RNA). Τα μικρά αυτά μόρια RNA έχουν την ιδιότητα να ενεργούν με υψηλή εξειδίκευση, ούτως ώστε να αναγνωρίζουν τα γονίδια-στόχους τους που διαθέτουν συμπληρωματικές αλληλουχίες προς αυτά και τελικά να προκαλούν την αποσιώπησή τους (Obbard et al., 2009).

Στη *Drosophila*, αν και τα τρία αυτά μονοπάτια παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες, ωστόσο διαφοροποιούνται σε σχέση με τους λειτουργικούς τους ρόλους, αλλά και τη βιοσύνθεσή τους. Έτσι, τα miRNAs παράγονται από ενδογενή γονίδια και έχουν κυρίως λειτουργικούς ρόλους στην ανάπτυξη και τη ρύθμιση κυτταρικών διαδικασιών (Ding and Voinnet, 2007), ενώ τα siRNAs εμπλέκονται στην άμυνα έναντι παρασιτικών νουκλεϊκών οξέων που μπορούν να προέρχονται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές (Soares et al., 2014). Αναφορικά με το μονοπάτι piRNA, έχει αναφερθεί ότι παίζει προστατευτικό ρόλο στα κύτταρα της βλαστικής σειράς έναντι μεταθετών γενετικών στοιχείων (Vagin et al., 2006), ενώ η ανίχνευση piRNAs ιϊκής προέλευσης σε αρκετές μελέτες εμπλέκει και αυτό το μονοπάτι στην αντιϊκή προστασία (Gammon and Mello, 2015).

Όσον αφορά στα μόρια-κλειδιά που απαιτούνται για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα μονοπάτια, τα miRNA και siRNA πυροδοτούνται από ποικίλου μήκους πρόδρομα μόρια δίκλωνου RNA (dsRNA) (Vodovar and Saleh, 2012) που είτε εκφράζονται, είτε εισέρχονται στο κύτταρο με κάποιον τρόπο, και τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα για τις εξειδικευμένες dsRNA ριβονουκλεάσες τύπου III (Dicer), καθώς δρουν ως ερέθισμα για την ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών (Jinek and Doudna,

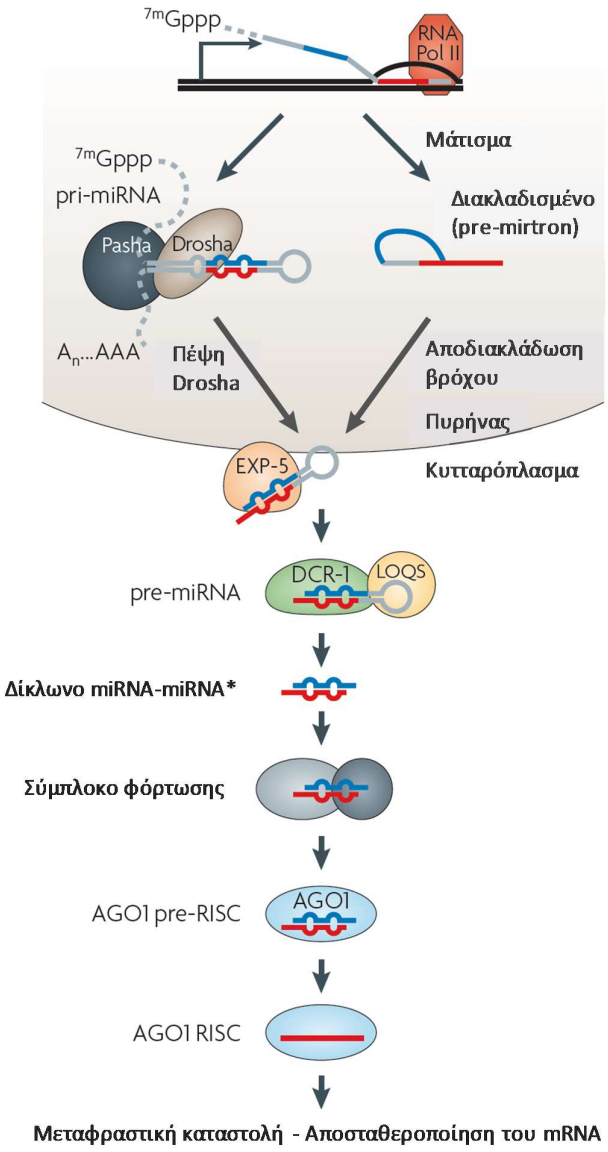
2009; Siomi and Siomi, 2009). Αντίθετα, στην περίπτωση του μονοπατιού piRNA, μονόκλωνα μετάγραφα λειτουργούν ως πρόδρομα μόρια που υφίστανται επεξεργασία, ώστε να προκύψουν τα πρωτογενή piRNAs μέσω ενός όχι πλήρως αποσαφηνισμένου μηχανισμού, ο οποίος δεν περιλαμβάνει κάποια πρωτεΐνη Dicer (Malone and Hannon, 2009).

Προκειμένου για τις πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute, αυτές που εμπλέκονται στα μονοπάτια miRNA και siRNA (Argonaute1 και Argonaute2, αντίστοιχα) ανήκουν στον κλάδο AGO, σε αντίθεση με εκείνες του μονοπατιού piRNA (Piwi, Aubergine, Argonaute3) που διαφέρουν σημαντικά καθώς ανήκουν στον κλάδο PIWI (Carthew and Sontheimer, 2009; Joshua-Tor and Hannon, 2011).

Από την άλλη πλευρά όμως, εκτός από το πρότυπο βιολογικό σύστημα της *Drosophila*, η σχετική έρευνα πάνω στο μηχανισμό του RNAi στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* είναι ελλιπής όσον αφορά στα δύο πρώτα μονοπάτια, ενώ έχει αναπτυχθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια ως προς το μονοπάτι piRNA. Τα στοιχεία που παρουσιάζονται στη συνέχεια αναφορικά με τον τρόπο λειτουργίας των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA προέρχονται κυρίως από μελέτες που αφορούν στη *Drosophila*, και σε μικρότερο βαθμό σε άλλα έντομα (όπως το μεταξοσκώληκα και τα κουνούπια) και στον άνθρωπο.

1.1.2.1 Το μονοπάτι miRNA

Τα microRNAs κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ξενιστή, και μπορούν να προέρχονται από ποικίλες πηγές, όπως μη-κωδικοποιά μετάγραφα, ιντρόνια (εσώνια) αλλά ακόμα και κάποιες κωδικοποιούσες περιοχές (Asgari, 2013). Η μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs γίνεται στον πυρήνα, κυρίως μέσω της RNA πολυμεράσης II (**Εικόνα 1**), αν και δεν αποκλείεται σε ορισμένες περιπτώσεις να δραστηριοποιούνται και άλλες RNA πολυμεράσες (Cai et al., 2004; Kim, 2005; Lee et al., 2004). Τα πρωτογενή miRNA μετάγραφα (pri-miRNAs, primary miRNAs) μοιάζουν με τα mRNAs, καθώς παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό 5’ κάλυμμα m^7G (7’-μεθυλιωμένη γουανίνη), ενώ είναι πολυαδενυλιωμένα στο 3΄ άκρο τους (Bracht et al., 2004; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Επιπλέον, τα pri-miRNAs διαθέτουν μία μεγάλη θηλιά (≥ 10 nt) στο άκρο τους, η οποία προεκτείνεται σε ένα κορμό (stem) μήκους ~30 bp, που πρέπει να είναι μεγαλύ-



Εικόνα 1 Το μονοπάτι miRNA στη *Drosophila*. Η μεταγραφή των γονιδίων miRNA προκαλεί την ενεργοποίηση του miRNA μονοπατιού. Τα πρωτογενή μετάγραφα miRNA (pri-miRNAs) υφίστανται επεξεργασία από το σύμπλοκο Drosha/Pasha στον πυρήνα, ή εναλλακτικά, τα πρωτογενή mirtrons (pre-mirtrons) αποδιακλαδίζονται, ώστε να δημιουργηθούν τα pre-miRNAs. Τα pre-miRNAs στη συνέχεια εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, όπου το σύμπλοκο Dcr1/Loqs οδηγεί στη δημιουργία του δίκλωνου μορίου miRNA-miRNA*. Όταν συνδεθεί με το σύμπλοκο Ago1/RISC, η αλυσίδα miRNA* απομακρύνεται, ενώ η αλυσίδα miRNA προκαλεί τη μεταφραστική καταστολή του ομόλογου mRNA (Προσαρμογή από Ghildiyal and Zamore, 2009).

τερος κατά μία ελικοειδή στροφή σε σχέση με το δίκλωνο miRNA που θα προκύψει (~22 nt) (Zeng et al., 2005). Τα μόρια που διαθέτουν αυτά τα χαρακτηριστικά αναγνωρίζονται

από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάζεται «μικροεπεξεργαστής» (microprocessor). Το σύμπλοκο απαρτίζεται από μία ριβονουκλεάση τύπου III (RNase III), τη Drosha, και την πρωτεΐνη πρόσδεσης dsRNA (dsRNA-binding protein, dsRBP) Pasha (Partner of Drosha) (Denli et al., 2004; Lee et al., 2003).

Ακολούθως, το σύμπλοκο Drosha/Pasha υδρολύει με τέτοιον τρόπο ώστε να δημιουργηθούν πρόδρομα μόρια miRNA (pre-miRNAs, precursor miRNAs) μήκους ~70 nt, τα οποία διαθέτουν 5'-φωσφορικά και 3'-υδροξυλικά άκρα σε συνδυασμό με 3' μονόκλωνα προεξέχοντα άκρα μήκους 2-3 nt (Du and Zamore, 2005; Lee et al., 2002; Lee et al., 2003).

Εκτός του παραπάνω μονοπατιού, έχει ταυτοποιηθεί και η ύπαρξη ενός εναλλακτικού μονοπατιού δημιουργίας pre-miRNAs, των mirtrons. Τα mirtrons προκύπτουν από τη διαδικασία ματίσματος των pri-miRNA μεταγράφων και επεξεργασίας τους με το αποδιακλαδωτικό ένζυμο βρόχου (lariat debranching enzyme) που λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, μέσω της οποίας απελευθερώνονται ιντρόνια που ομοιάζουν δομικά με pre-miRNAs (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Έτσι, σε αυτή την περίπτωση, τα mirtrons εξάγονται στο κυτταρόπλασμα έχοντας παρακάμψει τη φάση επεξεργασίας τους από τη Drosha (Chawla and Sokol, 2011).

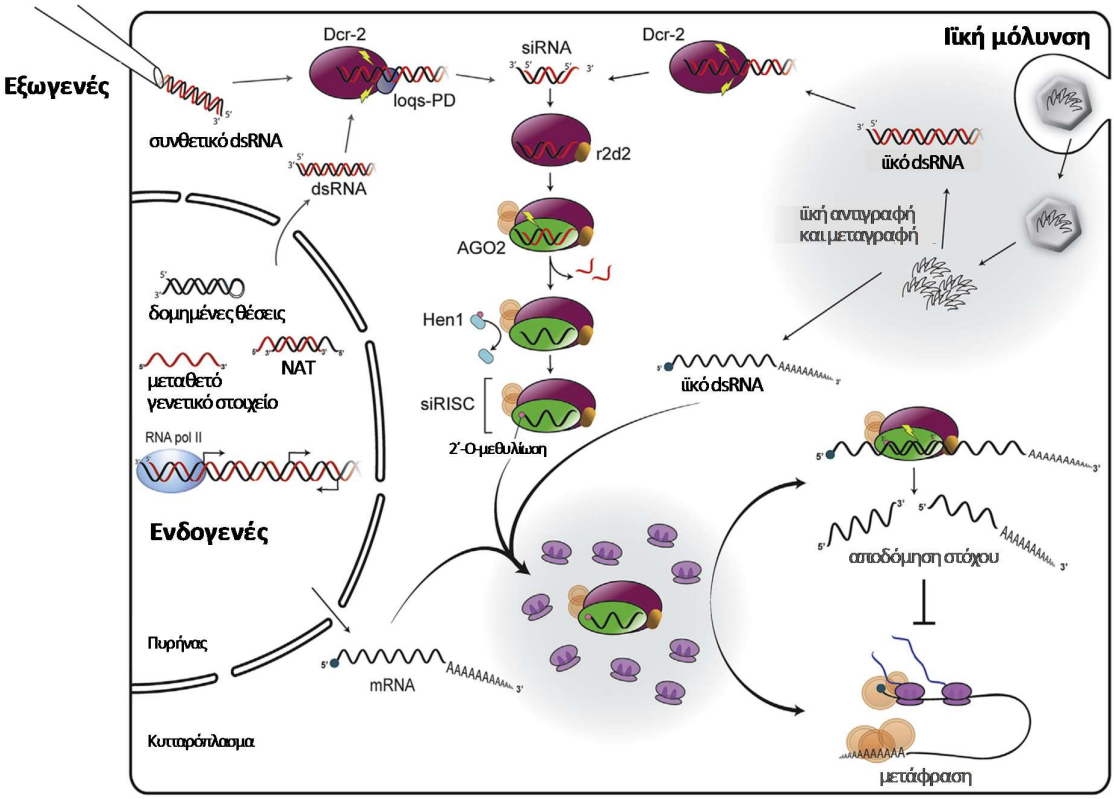
Ακολουθεί η πρόσδεση των pre-miRNAs (ή των mirtrons) στην Exportin-5 με τη βοήθεια του συμπαράγοντα RanGTP και η έξοδός τους στο κυτταρόπλασμα (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Εκεί, μία άλλη RNase III, η Dicer1 (Dcr1), σε σύμπλοκο με κάποια ισομορφή της dsRBP πρωτεΐνης Loquacious (Loqs-PA ή Loqs-PB), αποκόπτει τη θηλειά των pre-miRNAs και δημιουργεί ώριμα δίκλωνα μόρια RNA μήκους ~21-24 nt (miRNA/miRNA*) που δεν παρουσιάζουν απόλυτη συμπληρωματικότητα μεταξύ τους, ενώ εμφανίζουν προεξοχές 2 nt στα 3' άκρα και των δύο αλυσίδων (Forstemann et al., 2005; Hutvagner et al., 2001; Jiang et al., 2005; Saito et al., 2005). Στη συνέχεια, οι δύο αλυσίδες του μορίου miRNA/miRNA* φορτώνονται στο σύμπλοκο miRISC (miRNA-induced silencing complex) που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη Argonaute1 (Ago1) (Kawamata et al., 2009). Η αλυσίδα οδηγός miRNA (guide strand) που εμφανίζει μεγαλύτερη θερμοδυναμική αστάθεια στο 5' άκρο της συγκρατείται ως ώριμο πλέον miRNA από το miRISC, ενώ η δεύτερη αλυσίδα miRNA* (passenger strand) αποδομείται (Du and Zamore, 2005; Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Το σύμπλοκο miRISC χρησιμοποιεί το ώριμο μονόκλωνο miRNA για να εντοπίσει τα mRNAs που διαθέτουν

συμπληρωματική αλληλουχία προς αυτό, ούτως ώστε να προκαλέσει καταστολή της μετάφρασής τους ή αποαδενυλίωση που οδηγεί στην αποδόμησή τους (Jinek and Doudna, 2009; Obbard et al., 2009). Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις το miRNA ενδέχεται να δράσει ανάστροφα, ενεργοποιώντας τη μετάφραση ορισμένων mRNA-στόχων (Chawla and Sokol, 2011).

1.1.2.2 Το μονοπάτι siRNA

Όπως προαναφέρθηκε, η προέλευση του dsRNA για την παραγωγή των siRNAs μπορεί να ποικίλλει (**Εικόνα 2**). Έτσι, ενδογενείς πηγές dsRNA μπορούν να αποτελούν δομημένες θέσεις, φυσικά ζεύγη κωδικοποιών/μη κωδικοποιών μεταγράφων (natural sense-antisense transcript pairs, NAT) ή αμφίδρομα μετάγραφα μεταθετών γενετικών στοιχείων (Czech et al., 2008; Okamura et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, το εξωγενές dsRNA δεν παράγεται μέσω πυρηνικής σύνθεσης, αλλά εισέρχεται στο κύτταρο είτε μέσω ιϊκής μόλυνσης (ιϊκό γονιδίωμα ή μεγάλου μήκους ενδιάμεσα προϊόντων ιϊκής αντιγραφής), είτε τεχνητά ως διαγονίδιο ή προϊόν από *in vitro* μεταγραφή (Soares et al., 2014). Ανάλογα με την προέλευση του υποστρώματος dsRNA, τα μόρια siRNA που θα παραχθούν στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε endo-siRNAs (endogenous siRNAs), exo-siRNAs (exogenous siRNAs) και vsiRNAs (viral siRNAs) (Marques et al., 2013).

Προκειμένου για dsRNAs που παράγονται ενδογενώς ή χορηγούνται εξωγενώς, αυτά παραλαμβάνονται από το σύμπλοκο που δημιουργεί η πρωτεΐνη Dicer2 (Dcr2), μία RNase III, με την πρωτεΐνη Loquacious-PD (Loqs-PD), μία dsRBP (Hartig et al., 2009; Zhou et al., 2009). Στη *Drosophila*, η Loqs-PD αποτελεί τη μοναδική από τις τέσσερεις ισομορφές της πρωτεΐνης Loqs που είναι απαραίτητη για την επεξεργασία των siRNAs (Forstemann et al., 2005; Fukunaga et al., 2012; Hartig et al., 2009). Η ύπαρξη της Loqs-PD είναι κρίσιμη για τη σωστή λειτουργία της Dcr2, καθώς αλληλεπιδρώντας με την περιοχή ελικάσης της Dcr2 τη σταθεροποιεί σε κατάλληλη διαμόρφωση, η οποία επιτρέπει τη διάσπαση dsRNA υποστρωμάτων με τέτοια χαρακτηριστικά (π.χ. δομημένα άκρα) που υπό άλλες συνθήκες η Dcr2 δεν θα μπορούσε να τα επεξεργαστεί μόνη της (Sinha et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση υποστρώματος dsRNA ιϊκής προέλευσης, η μεν παρουσία της Dcr2 φαίνεται να είναι απαραίτητη, όμως η πρωτεΐνη Loqs-PD φαίνεται ότι δε χρειάζεται για την επεξεργασία τους σε vsiRNAs (Marques et al.,



Εικόνα 2 Οι παραλλαγές του μονοπατιού siRNA στη *Drosophila*, όπως διαμορφώνονται ανάλογα με την προέλευση του υποστρώματος dsRNA. Πηγές του dsRNA μπορούν να αποτελέσουν ενδογενή μετάγραφα, εξωγενή συνθετικά μόρια ή προϊόντα ιϊκής αντιγραφής. Τα μόρια dsRNA προκαλούν την έναρξη του siRNA μονοπατιού, καθώς αναγνωρίζονται και κατακερματίζονται από τη Dcr2 με τη συνεργασία της Loqs-PD (endo-, exo-siRNAs) ή και χωρίς αυτή (vsiRNAs). Τα siRNAs δεσμεύονται από το σύμπλοκο Dcr2/R2D2 και φορτώνονται στην Ago2. Η οδηγός αλυσίδα υφίσταται μεθυλίωση από τη HEN1, ενώ η δεύτερη αλυσίδα απομακρύνεται μέσω του συμπλόκου C3PO. Το ώριμο Ago2/holo-RISC με τη βοήθεια των ριβοσωμάτων αναζητά πλήρως συμπληρωματικά κυτταρικά ή ιϊκά mRNAs, ώστε να προκαλέσει τη διάσπασή τους, εμποδίζοντας έτσι τη μετάφρασή τους (Προσαρμογή από Soares et al., 2014).

2013). Ο μη-καθοριστικός ρόλος για την Loqs-PD σε αυτό το στάδιο πιθανώς σημαίνει ότι η Dcr2 επιτελεί το έργο αυτό είτε μόνη της, είτε σε συνεργασία με μία άλλη dsRBP (Marques et al., 2013).

Στη συνέχεια, το dsRNA κόβεται σε μικρά νουκλεοτιδικά μόρια μήκους ~21 nt, είτε από το σύμπλοκο Dcr2/Loqs-PD (endo-siRNAs, exo-siRNAs), είτε από την πρωτεΐνη Dcr2 με κάποιο άγνωστο μέχρι στιγμής τρόπο (vsiRNAs) (Marques et al., 2010; Marques et al., 2013; Miyoshi et al., 2010a). Βέβαια, σε αντίθεση με τη *Drosophila*, στα Λεπιδόπτερα τα

μόρια που προκύπτουν από τη δράση της Dicer αντιστοιχούν κυρίως στο μέγεθος των 20 nt (Jayachandran et al., 2012; Mehrabadi et al., 2015; Wu et al., 2013; Zografidis et al., 2015). Αφού απελευθερωθούν τα υδρολυμένα πλέον siRNAs (Marques et al., 2010), η Dcr2 δημιουργεί σύμπλοκο με μία άλλη πρωτεΐνη dsRBP, την R2D2 (Liu et al., 2003; Liu et al., 2006). Ο ρόλος της R2D2 είναι καθοριστικός ως προς την αναγνώριση και ταξινόμηση των endo- και exo-siRNAs, ούτως ώστε στη συνέχεια να καθοδηγηθούν σωστά προς την ενδονουκλεάση Argonaute2 (Ago2) (Okamura et al., 2011; Tomari et al., 2007).

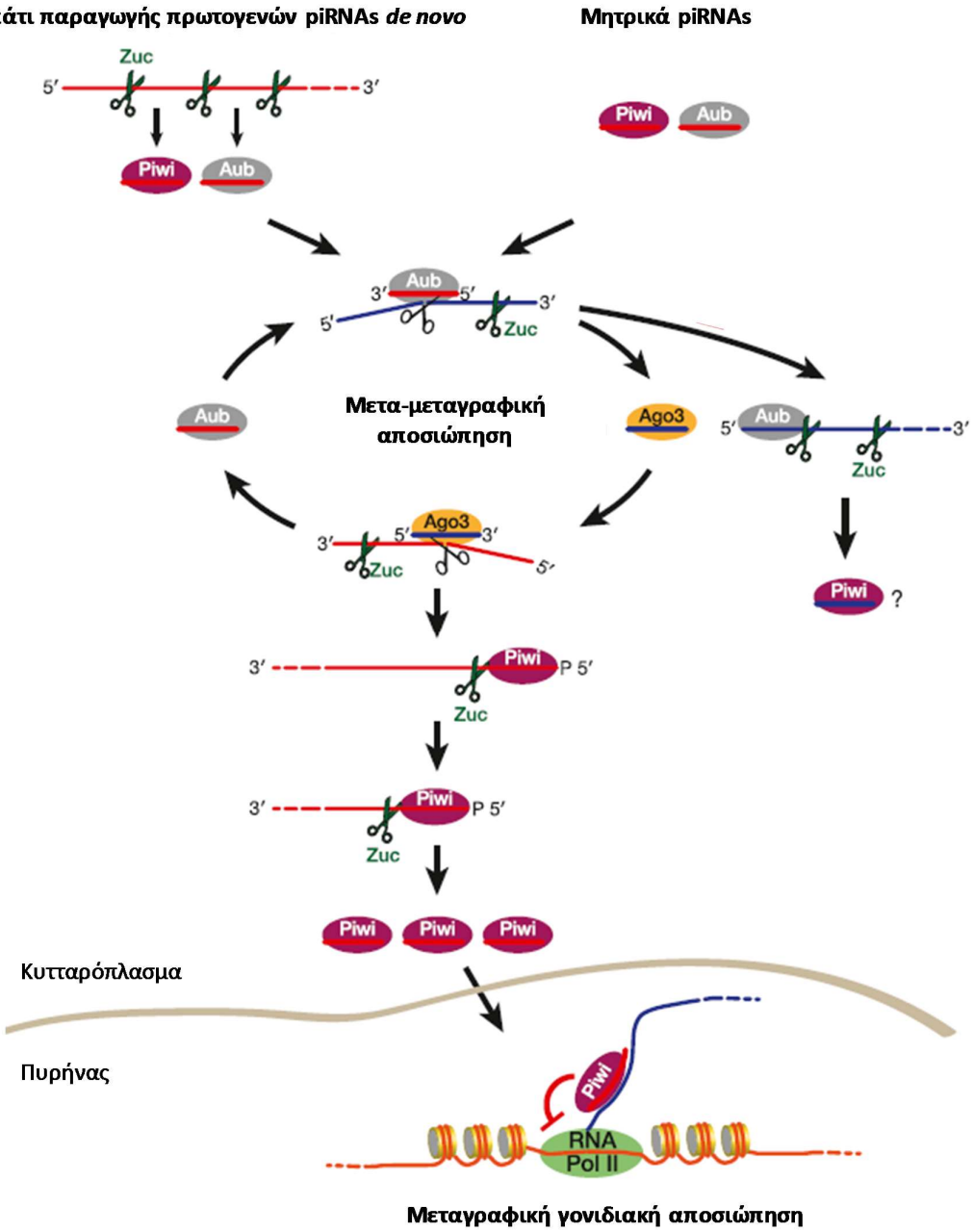
Αφού τα δίκλωνα siRNAs προσδεθούν στο πρόδρομο σύμπλοκο Ago2/pre-RISC (precursor RNA-induced silencing complex) και εκτυλιχθούν, η Ago2 ως καταλυτικός πυρήνας του συμπλόκου συγκρατεί την αλυσίδα οδηγό ενώ ταυτόχρονα αποκόπτει και απομακρύνει τη δεύτερη αλυσίδα (Kim et al., 2007; Liu et al., 2004; Matranga et al., 2005; Song et al., 2004). Για τη σταθεροποίηση του ώριμου πλέον πρωτεϊνικού συμπλόκου Ago2/holo-RISC, η οδηγός αλυσίδα υφίσταται 2’-O-μεθυλίωση από τη μεθυλοτρανσφεράση HEN1 (Horwich et al., 2007), ενώ στην αποδόμηση της δεύτερης αλυσίδας συμμετέχει το σύμπλοκο C3PO (component 3 promoter of RISC) που αποτελείται από τις πρωτεΐνες Translin και TRAX (Liu et al., 2009; Ye et al., 2011). Κύρια λειτουργία του συμπλόκου Ago2/holo-RISC αποτελεί η αναζήτηση του συνόλου των μεταγράφων και ο εντοπισμός πιθανών RNA στόχων (Peters and Meister, 2007; Siomi and Siomi, 2009). Έτσι, μέσω της περιοχής PIWI που διαθέτει η πρωτεΐνη Ago2, καταλύεται η διάσπαση των mRNAs (ή των ιϊκών RNAs) που διαθέτουν συμπληρωματική αλληλουχία προς την οδηγό αλυσίδα (Tomari and Zamore, 2005). Ειδικότερα, μέσω μίας διαδικασίας που εξαρτάται από την παρουσία Mg^{2+}, τα siRNAs προκαλούν τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων του mRNA στόχου που είναι συμπληρωματικά προς τις βάσεις 10 και 11 του siRNA μετρώντας από το 5’ άκρο του (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b), και με αυτό τον τρόπο δημιουργούν 3’-υδροξυλικά και 5’-φωσφορικά άκρα (Martinez and Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004). Μετά τη διάσπασή του, ο RNA-στόχος απελευθερώνεται από το siRNA, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στο σύμπλοκο RISC να επαναχρησιμοποιηθεί για τη διάσπαση νέων στόχων (Carthew and Sontheimer, 2009).

1.1.2.3 Το μονοπάτι piRNA

Το τρίτο καλά χαρακτηρισμένο μονοπάτι των μικρών RNAs είναι αυτό των piRNAs, τα οποία είναι γνωστά για το ρόλο τους στην προστασία του ζωικού γονιδιώματος στα κύτταρα της βλαστικής σειράς έναντι παρασιτικών νουκλεϊκών οξέων, όπως είναι τα μεταθετά γενετικά στοιχεία (τρανσποζόνια) (Czech and Hannon, 2016; Ishizu et al., 2012). Επιπλέον, στον *B. mori*, εκτός από το ρόλο τους στον έλεγχο της έκφρασης των τρανσποζονίων (Kawaoka et al., 2011b), τα piRNAs είναι κρίσιμα σε αναπτυξιακές διαδικασίες όπως είναι ο καθορισμός του φύλου (Kawaoka et al., 2011a; Kiuchi et al., 2014), ενώ στα κουνούπια συμμετέχουν στην αντιϊκή απόκριση (Miesen et al., 2015; Morazzani et al., 2012; Vodovar et al., 2012).

Τα piRNAs έχουν μέγεθος 23-30 nt και προκύπτουν από τη μεταγραφή συμπλεγμάτων piRNA (piRNA clusters) ή υπολειμμάτων τρανσποζονίων, λειτουργώντας ως ένα είδος γενετικής μνήμης που προστατεύει τον οργανισμό από τρανσποζόνια στα οποία έχει εκτεθεί στο παρελθόν (Aravin et al., 2007; Brennecke et al., 2007). Ωστόσο, ορισμένα piRNAs ενδέχεται να έχουν και μητρική προέλευση, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να μεταφέρονται και να είναι λειτουργικά στην επόμενη γενιά (Brennecke et al., 2008). Η διαδικασία βιογένεσης των piRNAs είναι σύνθετη και διαχωρίζεται σε τρεις επιμέρους φάσεις που δημιουργούν διαφορετικά είδη piRNAs, τα πρωτογενή, τα δευτερογενή και τα τριτογενή (Siomi and Siomi, 2015).

Για την έναρξη της βιοσύνθεσης των piRNAs (**Εικόνα 3**), τα πρόδρομα piRNA μετάγραφα (μη-κωδικοποιά - antisense mRNAs) μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου ανάλογα με το είδος του κυττάρου διαφοροποιείται η θέση όπου θα γίνει η επεξεργασία τους (Czech and Hannon, 2016). Προκειμένου για βλαστικά κύτταρα, τα piRNAs βιοσυντίθενται σε περιπυρηνικές πολυπρωτεϊνικές δομές που ονομάζονται nuage (δηλ. σύννεφο), ενώ στα θυλακικά (σωματικά) κύτταρα αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται στα σωμάτια Yb (Yb bodies) (Brennecke et al., 2007; Szakmary et al., 2009; Theron et al., 2014). Τα πρόδρομα piRNA μετάγραφα υφίστανται επεξεργασία από την ενδονουκλεάση Zucchini (Zuc), ώστε να παραχθούν τα πρωτογενή piRNAs που εμφανίζουν το χαρακτηριστικό της ουριδίνης στο 5’ άκρο τους (1U) (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007; Ipsaro et al., 2012; Nishimasu et al., 2012), και προσδένονται στις πρωτεΐνες Piwi ή Aubergine (Aub) (Li et al., 2009a; Malone et al., 2009; Saito et al., 2009).



Εικόνα 3 Το μοντέλο βιογένεσης των piRNAs στα γαμετικά κύτταρα της *Drosophila*. Πρωτογενή μόρια piRNA (pri-piRNAs) που είτε παράγονται *de novo* στον πυρήνα, είτε έχουν μητρική προέλευση, μπορούν να πυροδοτήσουν την έναρξη του κύκλου Ping-Pong. Τα pri-piRNAs (κυρίως μη-κωδικοποιά, κόκκινα) υδρολύονται από την Zuc (με την υπογραφή 1U) και οδηγούνται προς τις πρωτεΐνες Aub/PIWI. Τα piRNAs (1U) καθοδηγούν την Aub ώστε να διασπάσει συμπληρωματικά κωδικοποιά μετάγραφα (μπλε), δημιουργώντας το 5’ άκρο των δευτερογενών piRNAs που θα φορτωθούν στην Ago3 (10A). Ακολούθως, η Zuc κόβει ~27 nt μετά το πρόδρομο piRNA που είναι δεσμευμένο στην Ago3, δημιουργώντας έτσι το 3’ άκρο του δευτερογενούς piRNA και το 5’ άκρο του τριτογενούς piRNA (1U). Παράλληλα, τα κωδικοποιά δευτερογενή piRNAs καθοδηγούν την Ago3 προς συμπληρωματικά πρόδρομα μετάγραφα που προκύπτουν από συμπλέγματα piRNA (piRNA clusters). Έτσι, μέσω ενός

επαναλαμβανόμενου και επανατροφοδοτούμενου κύκλου από κωδικοποιά και μη-κωδικοποιά mRNAs, παράγονται άφθονα piRNAs με τη βοήθεια των πρωτεϊνών Ago3 και Aub. Τέλος, τα νέα piRNAs μέσω της πρωτεΐνης Piwi επανεισάγονται στον πυρήνα, όπου πιθανολογείται ότι προκαλούν μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (Προσαρμογή από Wang et al., 2014).

Σε αυτό το σημείο, ξεκινά ο κύκλος Ping-Pong, από τον οποίο θα προκύψουν τα δευτερογενή piRNAs, καθώς τα piRNAs που είναι δεσμευμένα στην Aub (μη-κωδικοποιά) προκαλούν την αποκοπή των μεταγράφων των συμπληρωματικών τους τρανσποζονίων. Εναλλακτικά, πηγή των πρωτογενών piRNAs που θα πυροδοτήσουν τη λειτουργία του κύκλου Ping-Pong μπορεί να αποτελέσουν piRNAs μητρικής προέλευσης (Brennecke et al., 2008). Τα δευτερογενή piRNAs (κωδικοποιά, sense) που παράγονται προσδένονται στην πρωτεΐνη Argonaute3 (Ago3) και εμφανίζουν ως χαρακτηριστικά τη συμπληρωματικότητα με τα Aub-piRNAs στο 5’ άκρο τους και την αδενοσίνη στο 10^{ο} νουκλεοτίδιό τους (10A) (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007). Αυτά, με τη σειρά τους, εντοπίζουν και αποκόπτουν τα συμπληρωματικά τους πρόδρομα mRNAs των piRNAs, δημιουργώντας νέα δευτερογενή Aub-piRNAs (responder piRNAs) και πολλαπλασιάζοντας έτσι τη δεξαμενή των piRNAs κατά έναν τρόπο αντίστοιχο της πολυμεράσης RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) που δρα στο νηματώδη *C. elegans* (Brennecke et al., 2007). Η ασφαλής παράδοση και παραλαβή του piRNA που έχει υποστεί την πέψη από τη μία πρωτεΐνη PIWI στην άλλη διαμεσολαβείται από το σύμπλοκο Amplifier, του οποίου πυρήνα αποτελεί η ελικάση Vasa (Xiol et al., 2014).

Στη συνέχεια, μέσω μίας διαδικασίας που εξαρτάται από την Zuc, τεμαχίζονται σταδιακά τα πρόδρομα μόρια που προκύπτουν από τη δράση της Ago3, ώστε ακριβώς μετά το 3’ άκρο των responder piRNAs να ακολουθεί το 5’ άκρο των τριτογενών (trailer, φασικά-phased) piRNAs με το χαρακτηριστικό 1U και μέγεθος ~27 nt, τα οποία θα προσδεθούν στην Piwi επιτρέποντας έτσι την εξάπλωσή τους σε υποκυτταρικά σημεία που βρίσκονται μακριά από το σημείο κοπής τους (Han et al., 2015; Mohn et al., 2015). Συνεπώς, ο κύκλος Ping-Pong συνεισφέρει στην αφθονία των παραγόμενων piRNAs, ενώ το μονοπάτι των τριτογενών φασικών piRNAs συμβάλλει στην αύξηση της ποικιλομορφίας τους με στόχο την προσαρμογή του οργανισμού σε πιθανές μεταβολές στις αλληλουχίες των τρανσποζονίων (Han et al., 2015).

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των piRNAs είναι η 2’-O-μεθυλίωση που φέρουν στα 3’ άκρα τους, λόγω χημικής τροποποίησης από τη μεθυλοτρανσφεράση HEN1 (Horwich et al., 2007; Saito et al., 2007). Ο ρόλος της HEN1 ανταγωνίζεται τη δράση της 3’-5’ εξωριβονουκλεάσης Nibbler, γεγονός που σε συνδυασμό με την ηλικία του οργανισμού επηρεάζει την επίτευξη και διατήρηση του σωστού μήκους στα 3’ άκρα των 2’-O-μεθυλιωμένων piRNAs (Feltzin et al., 2015; Wang et al., 2015a).

Κατ΄αναλογία με τη *Drosophila*, στα κύτταρα BmN4 του μεταξοσκώληκα εκφράζονται δύο από τις βασικές πρωτεΐνες της υποοικογένειας PIWI, η Siwi (Aubergine) και η Argonaute3 (BmAgo3), οι οποίες εμπλέκονται στην καταστολή των τρανσποζονίων (Kawaoka et al., 2008a; Tatsuke et al., 2010). Έχει παρατηρηθεί ότι στα κύτταρα αυτά εμφανίζεται ενεργό τόσο το πρωτογενές όσο και το δευτερογενές μονοπάτι της βιογένεσης των piRNAs, καθώς η Siwi συνήθως δεσμεύει μη-κωδικοποιά piRNAs που φέρουν ισχυρή προτίμηση για 1U στο 5’ άκρο τους, ενώ η BmAgo3 δεσμεύεται συχνότερα σε κωδικοποιά piRNAs που είναι εμπλουτισμένα σε 10A (Kawaoka et al., 2009). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η πρωτεΐνη συνοδός HSP90 (πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90), η οποία είναι απαραίτητη για την ορθή λειτουργία του μονοπατιού piRNA στη *Drosophila* (Specchia et al., 2010), βρέθηκε ότι κατέχει κρίσιμο ρόλο στη φόρτωση των pre-piRNAs στη Siwi, καθώς και στην απομάκρυνση των παραπροϊόντων της πέψης που επιτελείται από την Ago3 (Izumi et al., 2013; Xiol et al., 2012). Τέλος, έχει ταυτοποιηθεί η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών PIWI με άλλες πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν περιοχές TUDOR (BmPAPI, BmTdrd12) μέσω μοτίβων συμμετρικής διμεθυλαργινίνης (Honda et al., 2013; Pandey et al., 2013).

1.1.3 Η φυσική ανοσία και η σχέση της με το RNAi στα πλαίσια της αντιϊκής προστασίας

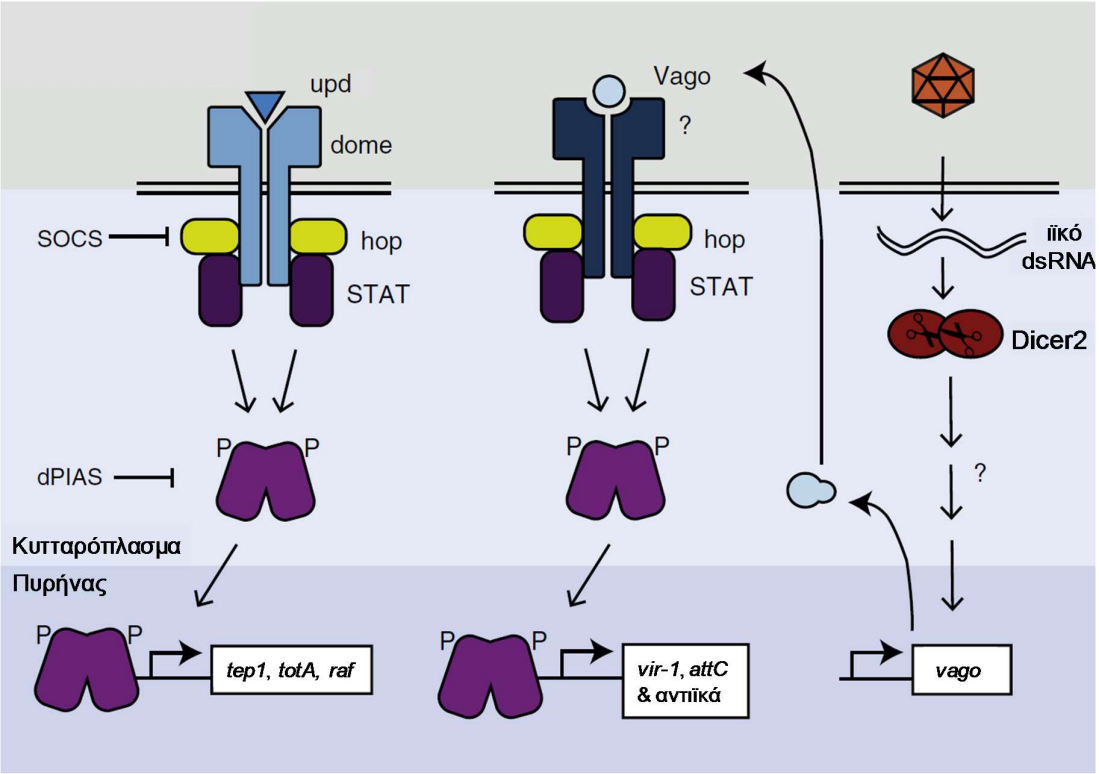
Τα έντομα κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς άμυνας έναντι των παθογόνων οργανισμών που ενδέχεται να προσβάλουν τον οργανισμό. Κατά την έναρξη της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης του εντόμου, ειδικοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs) αναγνωρίζουν συντηρημένα στοιχεία των διαφόρων παθογόνων που ονομάζονται παθογονο-συνδεόμενα μοριακά πρότυπα (pathogen-associated molecular patterns,

PAMPs) (Kingsolver et al., 2013). Οι μηχανισμοί άμυνας κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες που είναι η αντιμικροβιακή ανοσολογική απόκριση και η αντιϊκή απόκριση (Vodovar and Saleh, 2012).

Στην περίπτωση της άμυνας έναντι των μικροβίων, τα έντομα έχουν αναπτύξει φυσικά μέσα που εμποδίζουν τα παθογόνα να εισέλθουν στο σώμα του ζώου, όπως είναι η επιδερμίδα, και τα επιθήλια της εντερικής και της αναπνευστικής οδού. Στο έντερο δε, επιστρατεύονται χημικά εμπόδια, όπως είναι η έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων, η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και το χαμηλό pH, που δυσκολεύουν την επιβίωση των μικροβίων σε ένα τόσο εχθρικό περιβάλλον (Tzou et al., 2002). Όταν τα μικρόβια υπερπηδήσουν αυτά τα πρώτα εμπόδια, ακολουθούν πρωτεολυτικοί «καταρράκτες», που οδηγούν σε πήξη του αίματος και μελανοποίηση. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται η κυτταρική απόκριση, που συνεπάγεται τη φαγοκυττάρωση των μικροβίων από τα μακροφάγα αιμοκύτταρα, και τελικά επάγεται η χυμική απόκριση, η οποία συνίσταται στη σύνθεση και έκκριση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) κυρίως από το λιπαρό σώμα (Buchon et al., 2014; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Tzou et al., 2002). Για την παραγωγή των AMPs υπεύθυνα είναι δύο σηματοδοτικά μονοπάτια NF-κB με παράλληλη δράση: α) το Toll, το οποίο ενεργοποιείται κυρίως από Gram-θετικά βακτήρια και μύκητες, και β) το IMD, που ενεργοποιείται κυρίως από Gram-αρνητικά βακτήρια (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Από την άλλη πλευρά, ως γνωστόν, τα έντομα δε διαθέτουν μηχανισμούς κλασσικής επίκτητης ανοσίας όπως τα θηλαστικά, και γι΄ αυτό η αντιϊκή τους προστασία εξαρτάται αποκλειστικά από τη φυσική ή ενδογενή ανοσία (innate immunity). Ο ρόλος της φυσικής ανοσίας στα έντομα είναι καθοριστικός για την έκβαση της μόλυνσης ενός εντόμου από έναν αρβοϊό (Arbovirus, Arthropod-borne Virus), και όπως φαίνεται, για το λόγο αυτό, οι μολύνσεις αυτού του είδους σε μεγάλο βαθμό δεν καταλήγουν να γίνουν παθογόνες για το έντομο (Kingsolver et al., 2013; Xu and Cherry, 2014).

Ο κυριότερος μηχανισμός αντιϊκής απόκρισης είναι η παραγωγή μικρών μορίων RNA (siRNAs) που στοχεύουν το ιϊκό γονιδίωμα και εντάσσεται στον RNAi μηχανισμό που περιγράφηκε νωρίτερα (§1.1.2.2). Ενδιαφέρον, ωστόσο, είναι ότι στη *Drosophila* ένα πολυπεπτίδιο με χαρακτηριστικά κυτοκίνης, το Vago, επάγεται κατά έναν τρόπο ανεξάρτητο του RNAi μέσω της πρωτεΐνης Dcr2, η οποία μπορεί να αναγνωρίζει μία ιϊκή



Εικόνα 4 Το μονοπάτι Jak/STAT στη *Drosophila*. Το έναυσμα για το κλασσικό μονοπάτι είναι η δέσμευση ενός προσδέτη upd στον υποδοχέα dome, που επάγει το διμερισμό του. Εναλλακτικά, μία ιϊκή μόλυνση μέσω του ιϊκού dsRNA αναγνωρίζεται από τη Dcr2, η οποία κατά έναν μη-RNAi-εξαρτώμενο τρόπο επάγει την έκφραση του γονιδίου *vago*, του οποίου το εκκρινόμενο προϊόν πιθανώς αναγνωρίζεται ως προσδέτης από έναν άγνωστο υποδοχέα που επίσης διμερίζεται. Ακολουθεί δια-φωσφορυλίωση (trans-phosphorylation) των κινασών hop, και στρατολόγηση/δια-φωσφορυλίωση των STAT, με αποτέλεσμα τη μεταφορά τους στον πυρήνα και τη ρύθμιση της μεταγραφής αντιμικροβιακών ή αντιϊκών γονιδίων. Οι SOCS και dPIAS παρεμποδίζουν τη δράση των hop και STAT, αντίστοιχα (Προσαρμογή από Kingsolver et al., 2013).

μόλυνση μέσω της περιοχής ελικάσης DExD/H-box που διαθέτει και να επάγει αντιϊκό σηματοδοτικό «καταρράκτη» (**Εικόνα 4**) (Deddouche et al., 2008). Άλλωστε, το ορθόλογο του Vago στα κουνούπια *Culex*, εκτός του ότι περιορίζει τη μόλυνση από τον ιό WNV (West Nile Virus), έχει αποδειχθεί πως ενεργοποιεί το μονοπάτι Jak/STAT (Paradkar et al., 2012). Παράλληλα, επίσης ανεξάρτητα από τον RNAi μηχανισμό, στη *Drosophila* η πρωτεΐνη Dcr2 μέσω της περιοχής PAZ έχει την ικανότητα να προσδένεται στην 3’ UTR του mRNA του γονιδίου *Toll* και να ρυθμίζει μετα-μεταγραφικά την έκφρασή του, ενώ ακόμη είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση του μονοπατιού Toll έναντι των ιών FHV (Flock House Virus) και VSV (Vesicular Stomatitis Virus) (Wang et al., 2015b).

Ένας ισχυρός, λοιπόν, μηχανισμός αντιϊκής προστασίας είναι αυτός που ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού Jak/STAT, το οποίο ανταποκρίνεται στη σηματοδότηση των κυτοκινών, ώστε να μεταφερθεί η πληροφορία σε γειτονικά κύτταρα σχετικά με κάποια υπάρχουσα ιϊκή μόλυνση (Dostert et al., 2005). Στη *Drosophila*, το μονοπάτι Jak/STAT απαρτίζεται από τις κυτοκίνες της οικογένειας Unpaired (upd), το διαμεμβρανικό υποδοχέα Domeless (dome), την κινάση Janus Hopscotch (hop), καθώς και το μεταγραφικό ενεργοποιητή STAT92E (Arbouzova and Zeidler, 2006). Ο ρόλος του μονοπατιού Jak/STAT στην αντιϊκή προστασία έχει αποδειχθεί σε έντομα όπως η *Drosophila*, ο *B. mori*, το κουνούπι *Aedes*, ενώ υπάρχουν ενδείξεις και για τη μέλισσα (Chen et al., 2014a; Kemp et al., 2013; Liu et al., 2015a; Souza-Neto et al., 2009).

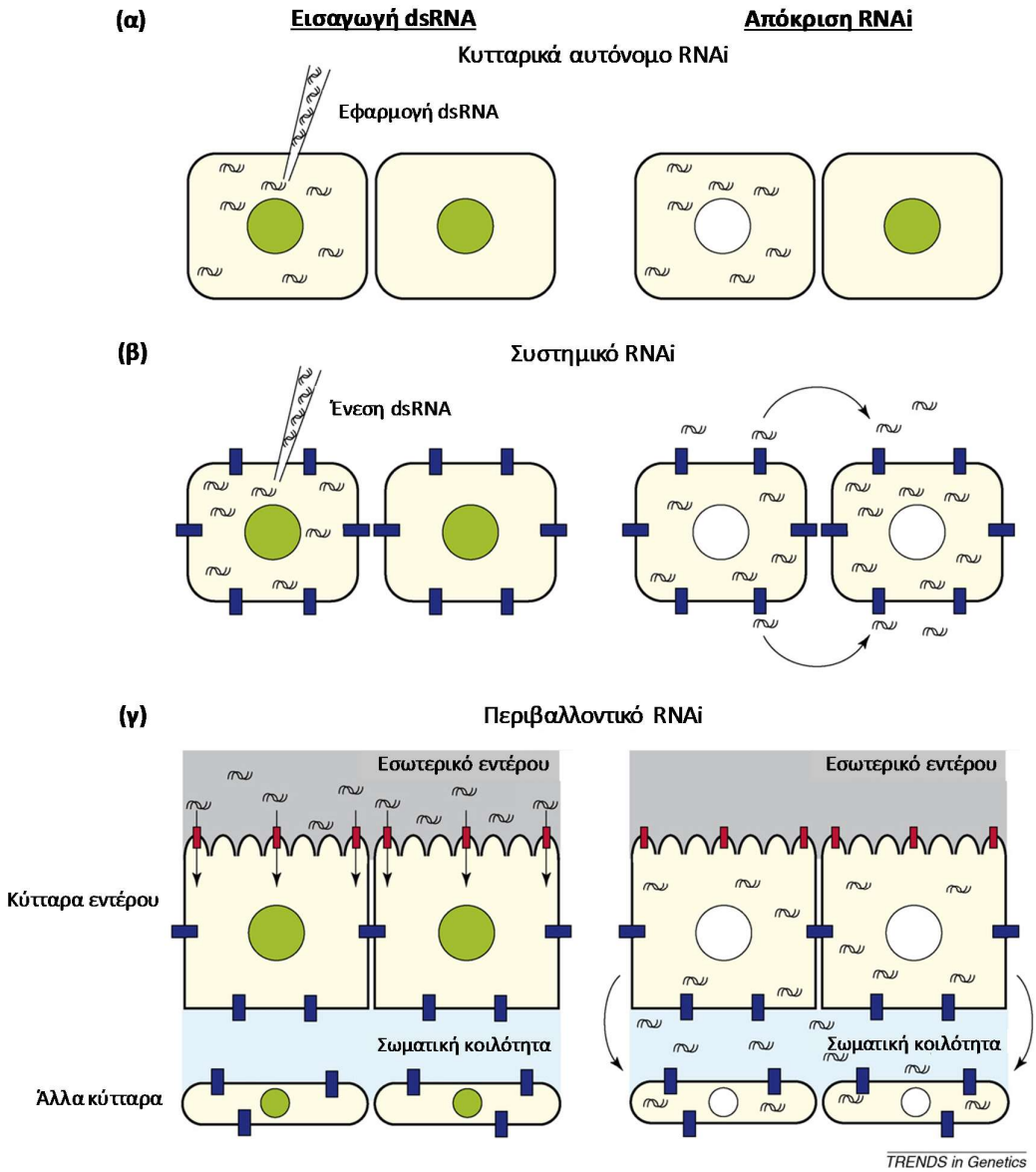
Παράλληλα, επιπρόσθετο αντιϊκό ρόλο φαίνεται ότι επιτελούν και τα σηματοδοτικά μονοπάτια NF-κB. Ειδικότερα, προκειμένου για το Toll, έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην αντιμετώπιση ιϊκών μολύνσεων στη *Drosophila*, το κουνούπι *Aedes* και τη μέλισσα (Chen et al., 2014a; Ramirez and Dimopoulos, 2010; Xi et al., 2008). Επίσης, ο υποδοχέας Toll-7 της *Drosophila* έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιεί την αυτοφαγία έναντι του ιού VSV (Nakamoto et al., 2012). Ομοίως, το μονοπάτι IMD περιορίζει ιϊκές μολύνσεις στη *Drosophila* και το κουνούπι (Avadhanula et al., 2009; Costa et al., 2009; Huang et al., 2013), και επάγεται κατόπιν ιϊκής μόλυνσης στη μέλισσα (Nazzi et al., 2012).

Εκτός από τα παραπάνω μονοπάτια, η πληθώρα στοιχείων που έχει προκύψει τα τελευταία χρόνια μέσω των σύγχρονων τεχνικών αλληλούχισης μεταγραφωμάτων (transcriptomes) δείχνει ότι πιθανώς υπάρχουν και άλλα μονοπάτια που επάγουν έντονη μεταγραφική απόκριση μετά από μία ιϊκή μόλυνση, τα οποία περιλαμβάνουν PRRs που δε διαθέτουν θέσεις δέσμευσης τύπου κB ή STAT (Xu and Cherry, 2014).

1.2 Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RNAi ΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

1.2.1 Οι μέθοδοι πρόσληψης και διάδοσης του dsRNA στα έντομα

Ανάλογα με τον τρόπο μετάδοσης ενός dsRNA ερεθίσματος, το οποίο θα οδηγήσει στην επαγωγή του μηχανισμού του RNAi σε έναν ευκαρυωτικό οργανισμό, μπορεί να γί-



Εικόνα 5 Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικά αυτόνομου, συστημικού και περιβαλλοντικού RNAi. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κύτταρα όπου εκφράζεται κανονικά το γονίδιο-στόχος, ενώ με άσπρο τα κύτταρα όπου το γονίδιο-στόχος έχει αποσιωπηθεί. Αριστερά φαίνεται η κατάσταση των κυττάρων όταν εισάγεται το dsRNA, ενώ δεξιά η κατάσταση μετά την απόκριση του RNAi μηχανισμού. (α) Στο κυτταρικό αυτόνομο RNAi, αποσιώπηση παρατηρείται μόνο στο κύτταρο που δέχτηκε την εφαρμογή του dsRNA. (β) Στο συστημικό RNAi, αποσιώπηση παρατηρείται τόσο στο κύτταρο που δέχτηκε την εφαρμογή του dsRNA, όσο και σε γειτονικά κύτταρα. Η μεταφορά του σήματος του RNAi γίνεται μέσω καναλιών μεταφοράς του dsRNA (μπλε). (γ) Στο περιβαλλοντικό RNAi, αποσιώπηση παρατηρείται τόσο στα κύτταρα του εντέρου, όσο και σε κύτταρα άλλων ιστών. Το dsRNA εισέρχεται μέσω του περιβάλλοντος στο εσωτερικό του εντέρου, απ' όπου εισάγεται στα κύτταρα του εντέρου μέσω ειδικών μεταφορέων (κόκκινοι) και προκαλεί αποσιώπηση. Ακολούθως, το dsRNA εξάγεται στη σωματική κοιλότητα, και μέσω συστημικού RNAi μεταφέρεται και προκαλεί αποσιώπηση σε απομακρυσμένα κύτταρα (Προσαρμογή από Whangbo and Hunter, 2008).

νει η διάκριση στο κυτταρικά αυτόνομο και το μη-κυτταρικά αυτόνομο RNAi (Huvenne and Smagghe, 2010; Whangbo and Hunter, 2008). Έτσι, το κυτταρικά αυτόνομο RNAi (**Εικόνα 5α**) αναφέρεται σε περιπτώσεις όπου η διαδικασία της κυτταρικής αποσιώπησης περιορίζεται σε μεμονωμένα κύτταρα όπου έχει εισαχθεί ή εκφραστεί το dsRNA. Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση του μη-κυτταρικά αυτόνομου RNAi η αποσιώπηση αφορά κύτταρα ή ιστούς που δε βρίσκονται στο σημείο όπου χορηγήθηκε ή παράχθηκε το dsRNA (Huvenne and Smagghe, 2010; Whangbo and Hunter, 2008).

Προκειμένου για το μη-κυτταρικά αυτόνομο RNAi, αυτό διαχωρίζεται επιμέρους σε δύο κατηγορίες που αφορούν δύο διαφορετικού τύπου γεγονότα RNAi, όπως είναι το συστημικό και το περιβαλλοντικό RNAi (**Εικόνες 5β και 5γ**). Αναφερόμενοι στο συστημικό RNAi, περιγράφουμε γεγονότα γονιδιακής αποσιώπησης που αφορούν στη μετάδοση του dsRNA ερεθίσματος από κύτταρο σε κύτταρο ή από έναν ιστό σε κάποιον άλλο, κάτι που προφανώς συμβαίνει αποκλειστικά σε πολυκύτταρους οργανισμούς (Huvenne and Smagghe, 2010; Whangbo and Hunter, 2008). Στην περίπτωση του περιβαλλοντικού RNAi, αυτό περιγράφει κάθε διαδικασία που περιλαμβάνει την πρόσληψη μορίων dsRNA μέσω του περιβάλλοντος από ένα κύτταρο, γεγονός που του επιτρέπει να αναφέρεται τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες, όσο και σε μονοκύτταρους αλλά και πολυκύτταρους οργανισμούς.

Στα πλαίσια του περιβαλλοντικού RNAi, και προκειμένου για έναν πολυκύτταρο οργανισμό, τα μόρια dsRNA προσλαμβάνονται από μία αρχική ομάδα κυττάρων μέσω του περιβάλλοντος και στη συνέχεια ακολουθεί η συστημική εξάπλωση της γονιδιακής αποσιώπησης μέσω μίας δευτερεύουσας ομάδας κυττάρων και ιστών (Whangbo and Hunter, 2008). Για παράδειγμα, στην περίπτωση του νηματώδη *C. elegans*, μετά την πρόσληψη των μορίων dsRNA από το περιβάλλον, ακολουθεί η μεταφορά τους στο εσωτερικό του εντέρου και η εισαγωγή τους μέσω ειδικών πρωτεϊνών στα κύτταρα του εντέρου. Έπειτα, τα μόρια dsRNA (υπό τη μορφή αυτή, ή ως σήματα αποσιώπησης που παράγονται μέσω της RdRp πολυμεράσης) εξέρχονται από τα κύτταρα του εντέρου στη σωματική κοιλότητα, και μεταδίδονται (πιθανά διαμέσου του αίματος) σε άλλα κύτταρα ή ιστούς μέσω του μηχανισμού του συστημικού RNAi, έτσι ώστε να προκαλέσουν απομακρυσμένη γονιδιακή αποσιώπηση (Whangbo and Hunter, 2008). Έτσι λοιπόν, το περιβαλλοντικό RNAi αποτελεί έναν μοναδικό μηχανισμό μέσω του οποίου το

εξωτερικό περιβάλλον ενός οργανισμού μπορεί να επηρεάσει με άμεσο τρόπο τη γονιδιακή έκφραση στο εσωτερικό του (McEwan et al., 2012).

1.2.2 Οι μηχανισμοί πρόσληψης του dsRNA

1.2.2.1 Το διαμεμβρανικό κανάλι της οικογένειας SID

Για την πρόσληψη του dsRNA από το περιβάλλον ή το εξωκυττάριο μέσο στα ζώα υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες και τον εκάστοτε οργανισμό. Ο πλέον καλά χαρακτηρισμένος μηχανισμός πρόσληψης του dsRNA στα ζώα είναι αυτός του διαμεμβρανικού καναλιού που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες της οικογένειας SID (systemic RNA interference deficient) που ανακαλύφθηκαν στον *C. elegans*, και στις οποίες ανήκουν οι SID-1, SID-2, SID-3 και SID-5. Από αυτές, η SID-1 είναι ευρέως μελετημένη στα έντομα, ενώ για τις υπόλοιπες τρεις διαθέτουμε στοιχεία που αφορούν μόνο στον *C. elegans*.

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη SID-1 λειτουργεί κυτταρικά αυτόνομα στα πλαίσια του συστημικού RNAi και συμμετέχει στη μεταφορά μορίων dsRNA στο εσωτερικό των κυττάρων (Feinberg and Hunter, 2003; Winston et al., 2002). Το γεγονός ότι η μεταφορά του dsRNA μέσω της SID-1 γίνεται από τον εξωκυττάριο χώρο προς το εσωτερικό του κυττάρου, και όχι αντίστροφα, αποδίδεται στον επιπρόσθετο ρόλο του συμπλόκου RISC στην παρεμπόδιση εξόδου των εισηγμένων μορίων dsRNA από το κύτταρο, χωρίς αυτά απαραίτητα να υφίστανται επεξεργασία σε siRNA (Shih and Hunter, 2011). Στο *C. elegans*, η SID-1 εκφράζεται ευρέως σε μη-νευρωνικά κύτταρα, με ιδιαίτερη προτίμηση σε εκείνα που είναι εκτεθειμένα στο περιβάλλον, και το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι τα νευρωνικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στο συστημικό RNAi (Tavernarakis et al., 2000; Winston et al., 2002).

Η πρωτεΐνη SID-2 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στα κύτταρα του αυλού του εντέρου του *C. elegans* και συμμετέχει στην είσοδο μορίων dsRNA μέσα στα κύτταρα, αλλά όχι και στη μεταφορά τους από κύτταρο σε κύτταρο (McEwan et al., 2012; Winston et al., 2007). Άλλωστε, για τη σωστή λειτουργία της SID-2 έχει βρεθεί πως είναι απαραίτητη η ύπαρξη όξινου pH στον εξωκυττάριο χώρο, όπως συμβαίνει στο έντερο (lumen), και συνεπώς πιστεύεται ότι ο ρόλος της είναι να μεταφέρει μόρια dsRNA που έχουν εισαχθεί μέσω της τροφής στο ζώο στα κύτταρα του εντέρου, διευκολύνοντας έτσι την

πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω περιβαλλοντικού RNAi (McEwan et al., 2012). Στα ζώα δεν έχουν βρεθεί ομόλογα του γονιδίου *sid-2*, πιθανώς λόγω της ταχύτατης εξέλιξης του γονιδίου (Aronstein et al., 2011).

Προκειμένου για τη SID-3, έχει βρεθεί ότι πρόκειται για μία συντηρημένη κινάση της τυροσίνης που σχετίζεται με την εισαγωγή μορίων dsRNA στα κύτταρα, αλλά όχι με την έξοδό τους από αυτά (Jose et al., 2012). Με τον τρόπο αυτό, εμπλέκεται κυτταρικά αυτόνομα στην εύρυθμη λειτουργία του συστημικού RNAi στο *C. elegans* (Rocheleau, 2012).

Αναφορικά με τη SID-5, αυτή είναι μία πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την αποτελεσματικότητα του συστημικού RNAi, καθώς συμμετέχει πιθανώς στη μεταφορά μορίων dsRNA που έχουν εισαχθεί μέσω της τροφής ή έχουν εκφραστεί στα κύτταρα του *C. elegans*. Εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικές εστίες, συνδέεται με τα ενδοσώματα, και σχετίζεται με τη μετάδοση του RNAi σήματος μεταξύ των κυττάρων του φάρυγγα και του μυϊκού ιστού του επιδερμικού τοιχώματος (Hinas et al., 2012; Rocheleau, 2012).

Βέβαια, από το καλά χαρακτηρισμένο πρότυπο βιολογικό σύστημα της *Drosophila* απουσιάζουν ορθόλογα του γονιδίου *sid* (Winston et al., 2002), ενώ ενέσεις ζώων *Drosophila* στο προνυμφικό στάδιο δεν ήταν ικανές να προκαλέσουν γονιδιακή αποσιώπηση σε κανέναν ιστό πλην των αιμοκυττάρων (Miller et al., 2008). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί επιτυχή πειράματα συστημικού RNAi στη *Drosophila* μέσω ενέσεων dsRNA σε ενήλικα άτομα (Dzitoyeva et al., 2001; Goto et al., 2003; Petruk et al., 2006).

1.2.2.2 Η ενδοκύτωση

Η ενδοκύτωση αναδείχθηκε ως ένας εναλλακτικός μηχανισμός πρόσληψης του dsRNA, λοιπόν, η οποία για πρώτη φορά περιγράφηκε στη *Drosophila*, όπου σε πειράματα που αφορούσαν στα κύτταρα S2 βρέθηκε ότι ήταν δυνατόν έπειτα από εμβαπτισμό τους σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ειδικό dsRNA να προκληθεί αποσιώπηση του υπό μελέτη γονιδίου-στόχου (Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006). Η διαδικασία πρόσληψης του dsRNA μέσω ενδοκύτωσης φαίνεται ότι συνδέεται με δύο υποδοχείς «καθαρισμού» (scavenger receptors, SRs), τον SR-CI και τον Eater, καθώς η αποσιώπησή τους οδηγεί σε μειωμένη είσοδο του dsRNA στα κύτταρα S2 (Ulvila et al.,

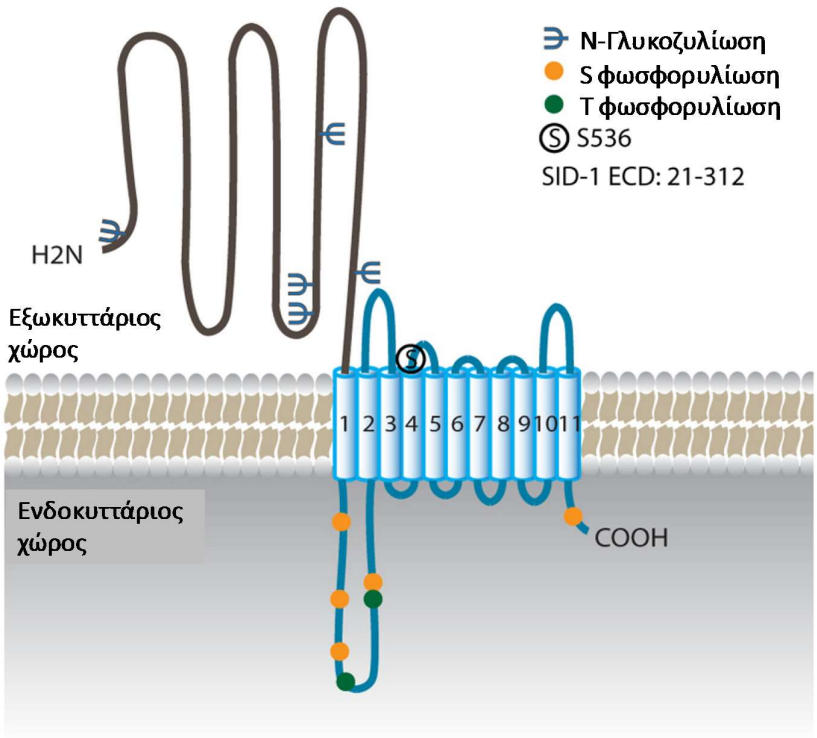
2006). Οι SRs δραστηριοποιούνται σε πλήθος κυτταρικών διαδικασιών, όπως είναι η ενδοκύτωση επιλεγμένων πολυ-ανιονικών προσδετών, η προσκόλληση, η μεταφορά λιπιδίων, η αντιγονοπαρουσίαση και η απαλλαγή από παθογόνα (Peiser et al., 2002; Yu et al., 2015).

Η λειτουργία των SRs στην πρόσληψη dsRNA στο εναλλακτικό αυτό μονοπάτι έχει άμεση σχέση με τη ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Δύο βασικά γονίδια που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία του RNAi είναι αυτά της βαριάς αλυσίδας της κλαθρίνης (*clathrin heavy chain*, *Chc*) και της κενοτοπικής H^+-ATPάσης (*vacuolar H^+-ATPase*), όπως άλλωστε έχει δειχθεί στα έντομα *Bactrocera dorsalis* (Li et al., 2015c), *Drosophila melanogaster* (Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006), *Schistocerca gregaria* (Wynant et al., 2014) και *Tribolium castaneum* (Xiao et al., 2015).

Η εμπλοκή του μηχανισμού της ενδοκύτωσης στην πρόσληψη του dsRNA φαίνεται ότι είναι μία εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία, καθώς η αποσιώπηση γονιδίων που σχετίζονται με την ενδοκυτταρική μεταφορά κυστιδίων, αλλά και με την τροποποίηση λιπιδίων, προκαλεί σημαντική καταστολή της επίδρασης του συστημικού RNAi στο νηματώδη *C. elegans* (Saleh et al., 2006). Επιπλέον, αντίστοιχα φαινόμενα παρεμπόδισης του συστημικού RNAi παρατηρήθηκαν στα ακάρεα *Metaseiulus occidentalis* (Wu and Hoy, 2014) και *Haemaphysalis longicornis* (Aung et al., 2011), έπειτα από αποσιώπηση των γονιδίων *Chc* και *HlSRB*, αντίστοιχα. Τέλος, δείχθηκε ότι και σε κύτταρα θηλαστικών, στα οποία δεν παρατηρείται ανάλογη εσωτερίκευση dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, ετερόλογη έκφραση του υποδοχέα SR-CI είναι σε θέση να διευκολύνει την είσοδο μορίων dsRNA σε αυτά (Ulvila et al., 2006).

1.2.3 Η πρωτεΐνη-μεταφορέας των μορίων dsRNA, SID-1

Η SID-1 διαθέτει ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο (extracellular domain, ECD) μεγάλου μήκους (~300 αμινοξέα) και 11 προβλεπόμενες διαμεμβρανικές έλικες, ενώ επιπλέον υπάρχει μία θηλιά ~100 αμινοξέων μεταξύ των διαμεμβρανικών ελίκων 1 και 2 (**Εικόνα 6**) (Feinberg and Hunter, 2003; Li et al., 2015b; Winston et al., 2002). Μέσω της περιοχής ECD, η SID-1 είναι ικανή να δεσμεύει εκλεκτικά μεγάλου μήκους μόρια dsRNA και να συντελεί στη μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου (Li et al., 2015b). Η πρωτεΐνη SID-1 είναι εκλεκτική ως προς τη μεταφορά, αποκλειστικά, μορίων



Εικόνα 6 Η προβλεπόμενη δομική οργάνωση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης SID-1. Η SID-1 διαθέτει ένα μεγάλο εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο, ένα διαμεμβρανικό κομμάτι που διατρέχει πολλές φορές την κυτταροπλασματική μεμβράνη, μία μεγάλη κυτταροπλασματική θηλιά και ένα μικρού μεγέθους κυτταροπλασματικό καρβοξυτελικό άκρο. Στο σχήμα φαίνονται, επίσης, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της SID-1, που αφορούν στην N-γλυκοζυλίωση του αμινοτελικού άκρου, τις πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης των κυτταροπλασματικών τμημάτων της και τη σερίνη 536 που αποτελεί κατάλοιπο-κλειδί του διαμεμβρανικού τμήματος (Προσαρμογή από Li et al., 2015b).

dsRNA, έστω και εάν αυτά διαθέτουν μερικώς μονόκλωνες δομές (όπως είναι τα πρόδρομα miRNAs ή οι φουρκέτες RNA) (Shih and Hunter, 2011).

Η SID-1 έχει χαρακτηριστεί ως κανάλι μεταφοράς μορίων RNA (Kobayashi et al., 2012), καθώς έχει βρεθεί ότι διευκολύνει την παθητική πρόσληψη των μορίων dsRNA από τα κύτταρα (Feinberg and Hunter, 2003). Άλλωστε, η προσθήκη dsRNA σε κύτταρα *Drosophila* S2 που εκφράζουν τη CeSID-1 είναι ικανή να προκαλέσει αλλαγές στην αγωγιμότητα της μεμβράνης, αποδεικνύοντας ότι η SID-1 λειτουργεί ως πρωτεΐνη-κανάλι που επηρεάζεται από την παρουσία μορίων dsRNA (Shih and Hunter, 2011). Η έκφραση της CeSID-1 σε κύτταρα S2 της *Drosophila* κατέστησε πιο αποτελεσματική την πρόσληψη του dsRNA σε σχέση με ομάδα κυττάρων που εξέφραζαν μία μεταλλαγμένη

μορφή της ίδιας πρωτεΐνης (Feinberg and Hunter, 2003). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν, επίσης, όταν η CeSID-1 υπερεκφράστηκε τόσο σε ανθρώπινα κύτταρα, όσο και σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (Duxbury et al., 2005; Tsang et al., 2007).

Σε κυτταροκαλλιέργειες μεταξοσκώληκα (κύτταρα BmN4) έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση της CeSID-1 είναι ικανή να προκαλεί γονιδιακή αποσιώπηση έπειτα από εμβαπτισμό των κυττάρων σε μέσο που περιέχει ειδικό dsRNA ως προς κάποιο γονίδιο-στόχο (Cheng et al., 2014; Kobayashi et al., 2012; Mon et al., 2012; Mon et al., 2013; Mon et al., 2014; Nagata et al., 2013). Παράλληλα, κυτταροκαλλιέργειες Λεπιδοπτέρων (Bme21, Sf9) τροποποιήθηκαν ούτως ώστε να υπερεκφράζουν τη CeSID-1 με σκοπό τη βελτίωση της παραγωγής πρωτεϊνών μέσω του συστήματος έκφρασης των μπακουλοϊών (Xu et al., 2013c; Xu et al., 2013d).

Η *in silico* ανάλυση για την ύπαρξη ορθόλογων του γονιδίου *sid-1* του *C. elegans* έδειξε ότι αυτά εντοπίζονται σε αρκετά είδη εντόμων (**Πίνακας 1**) (Huvenne and Smagghe, 2010). Ωστόσο, τα εν λόγω ορθόλογα του *sid-1* παρουσιάζουν μεγαλύτερες ομοιότητες με το γονίδιο *cup-1 (Cholesterol Uptake Protein-1)* του *C. elegans*, το οποίο παλαιότερα έφερε την ονομασία *tag-I30*, που όμως σχετίζεται με την πρόσληψη της χοληστερόλης και όχι με το μηχανισμό του συστημικού RNAi (Tomoyasu et al., 2008; Valdes et al., 2012). Έτσι, για παράδειγμα, η ομολογία σε δύο από τα ορθόλογα της SID-1 στο μεταξοσκώληκα αντιστοιχεί στο 15.5% και 27.7% των πρωτεϊνών SID-1 και CUP-1 του *C. elegans* (Valdes et al., 2012)

Παρά την ύπαρξη 3 ορθολόγων του *sid-1* στον *B. mori*, για την επιτυχία των πειραμάτων συστημικού RNAi σε αυτό το λεπιδόπτερο έντομο χρειάζεται να πληρούνται αρκετές άλλες προϋποθέσεις που θα αναλυθούν στη συνέχεια (βλ. §1.2.6) (Terenius et al., 2011). Αντίθετα, το κολεόπτερο *T. castaneum* ανήκει στα έντομα που ανταποκρίνονται ιδιαίτερα αποτελεσματικά σε πειράματα συστημικού RNAi, αν και τα 3 ορθόλογα του *sid-1* που διαθέτει δε φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία (Bucher et al., 2002; Tomoyasu and Denell, 2004; Tomoyasu et al., 2008). Παράλληλα, μελέτες δείχνουν ότι η πρόκληση συστημικού RNAi είναι δυνατή στο κουνούπι, παρά το γεγονός ότι δεν εντοπίζονται ορθόλογα του *sid-1* σε αρκετά είδη κουνουπιού (Boisson et al., 2006; Tomoyasu et al., 2008; Volz et al., 2006; Zhu et al., 2003), ενώ αντίθετα η ύπαρξη της SID-1 φαίνεται να είναι καίριας σημασίας για αντίστοιχα πειράματα στο εί-

Πίνακας 1 Σύνοψη των ορθολόγων του γονιδίου *sid-1* σε διάφορες τάξεις και διαφορετικά είδη εντόμων. Προκειμένου για γονίδια που δεν αναφέρονται σε συγκεκριμένη δημοσίευση, παρατίθεται ως αναφορά το Accession Number τους (Προσαρμογή από Huvenne and Smagghe, 2010).

Είδος	Αριθμός Ορθολόγων Γονιδίων	Αναφορά
Coleoptera		
Leptinotarsa decemlineata	2	KP273192.1, KP273193.1
Tribolium castaneum	3	(Tomoyasu et al., 2008)
Diptera		
Aedes aegypti	0	(Tomoyasu et al., 2008)
Anopheles gambiae	0	(Tomoyasu et al., 2008)
Culex quinquefasciatus	0	NCBI BlastN
Drosophila melanogaster	0	(Winston et al., 2002)
Hemiptera		
Acrythosiphon pisum	1	XM 001951872.1
Aphis glycines	1	(Bansal and Michel, 2013)
Aphis gossypii	1	(Xu and Han, 2008)
Bemicia tabaci	1	(Upadhyay et al., 2013)
Nilaparvata lugens	1	(Xu et al., 2013a)
Rhodnius prolixus	0	NCBI BlastN
Rhopalosiphum padi	1	EF533712
Sitobion avenae	1	(Xu and Han, 2008)
Hymenoptera		
Apis mellifera	1	(Aronstein et al., 2006)
Nasonia vitripennis	1	(Tomoyasu et al., 2008)
Lepidoptera		
Bombyx mori	3	(Tomoyasu et al., 2008)
Helicoverpa armigera	1	KC292008.1
Plutella xylostella	1	(Wang et al., 2014)
Spodoptera exigua	1	(Tian et al., 2009)
Spodoptera litura	1	KF717089.1
Orthoptera		
Locusta migratoria	1	(Luo et al., 2012)
Schistocerca americana	1	(Dong and Friedrich, 2005)
Schistocerca gregaria	1	(Wynant et al., 2014)
Phtiraptera		
Pediculus humanus corporis	1	XM_002427838b

δος *Apis mellifera* (Aronstein et al., 2006). Τέλος, τα κύτταρα S2 της *Drosophila* διαθέτουν την ικανότητα πρόσληψης μορίων dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, παρόλο που αυτό το έντομο δεν περιλαμβάνει ορθόλογα του *sid-1* στο γονιδίωμά του (Feinberg and Hunter, 2003; Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006).

Τα ανωτέρω δεδομένα συγκλίνουν στην άποψη ότι η ύπαρξη της πρωτεΐνης SID-1 δε φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για το συστημικό RNAi και την πρόσληψη των μορίων dsRNA από πολλά έντομα (Huvenne and Smagghe, 2010). Παράλληλα, ενισχύεται η θεωρία της πιθανής ύπαρξης σε αυτά ενός εναλλακτικού μηχανισμού πρόσληψης dsRNA, και κατ' επέκταση, πρόκλησης συστημικού RNAi (Huvenne and Smagghe, 2010; Tomoyasu et al., 2008). Για τους παραπάνω λόγους, θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της ετερόλογης έκφρασης της CeSID-1 σε κύτταρα μεταξοσκώληκα σε σχέση με το μηχανισμό του RNAi, καθώς και η αναζήτηση εναλλακτικών πρωτεϊνών που επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες στα έντομα.

1.2.4 Η μεταφορά του σήματος του RNAi

Σε κάποιους οργανισμούς ενεργοποιείται ένας ακόμα μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την «ενίσχυση» (amplification) του RNAi σήματος, και ο οποίος αποτελείται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των RNA-εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RdRps). Έτσι, μία RdRp μπορεί να δρα σε φυτά (*Arabidopsis thaliana*), μύκητες (*Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*) και νηματώδεις (*C. elegans*), όπου ενισχύει το αρχικό σήμα (εξωγενές dsRNA) της γονιδιακής αποσιώπησης (Zhang and Ruvkun, 2012). Συγκεκριμένα, στον *C. elegans* η παραγωγή των πρωτογενών siRNAs είναι η προϋπόθεση για τη δημιουργία των δευτερογενών siRNAs, που πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης των πρώτων με το mRNA του γονιδίου-στόχου, με τη βοήθεια μίας πολυμεράσης RdRp (Aoki et al., 2007; Pak and Fire, 2007; Sijen et al., 2001; Sijen et al., 2007).

Προκειμένου για τα αρθρόποδα, αν και ομόλογα της RdRp έχουν βρεθεί στα ακάρεα *Rhipicephalus microplus* και *Ixodes scapularis* (Kurscheid et al., 2009), το γονίδιο αυτό απουσιάζει από τα έντομα (Gordon and Waterhouse, 2007; Obbard et al., 2009). Παλαιότερα, θεωρείτο ότι το RNAi στα έντομα αφορούσε μία αποκλειστικά κυτταρικά αυτόνομη διαδικασία, χωρίς τη δυνατότητα ύπαρξης συστημικής εξάπλωσης του σήματος του RNAi (Roignant et al., 2003). Βέβαια, σε εκχυλίσματα από έμβρυα *Drosophila* έχει αναφερθεί η παραγωγή siRNAs ανεξαρτήτως της λειτουργικότητας του RNAi μηχανισμού, η οποία αποδίδεται στην ύπαρξη δραστικότητας που προσομοιάζει αυτή μίας κανονικής RdRp πολυμεράσης (Lipardi et al., 2001). Ωστόσο, προς το παρόν

δεν έχει αποδειχθεί η ύπαρξη της δράσης κάποιας RdRp που να ενισχύει το σήμα των μικρών RNAs στα έντομα (Lipardi and Paterson, 2009, 2011; Ruckert et al., 2014).

1.2.5 Οι μέθοδοι χορήγησης του dsRNA

Οι μέθοδοι χορήγησης του dsRNA στα έντομα μπορούν να ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό και με αυτό τον τρόπο να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης (Yang et al., 2011). Οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι συνοψίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- **Χορήγηση με μικροένεση:** Υπήρξε από τις πρώτες τεχνικές που εφαρμόστηκαν με επιτυχία στο νηματώδη *C. elegans* (Fire et al., 1998). Αποτελεί συνήθη μέθοδο χορήγησης dsRNA στα έντομα, αν και η αποτελεσματικότητά της ως προς την επίτευξη γονιδιακής αποσιώπησης ποικίλλει (Terenius et al., 2011; Yang et al., 2011). Τα πλεονεκτήματα που διαθέτει είναι σαφή σε σχέση με άλλες τεχνικές, καθώς με χρήση μικροενέσεων το dsRNA μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας στον επιθυμητό ιστό ή την αιμολέμφο, ούτως ώστε να αποφεύγονται πιθανά φυσιολογικά εμπόδια, ενώ η μέθοδος είναι απόλυτα ακριβής ως προς την ποσότητα του dsRNA που θα φτάσει στον ιστό-στόχο (Yu et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, όμως, τα αποτελέσματα δεν είναι μόνιμα (Kennerdell and Carthew, 2000), υπάρχουν περιορισμοί που αφορούν το κόστος και τη περιπλοκότητα της *in vitro* σύνθεσης του dsRNA που θα χορηγηθεί, ενώ η διαδικασία της ένεσης από μόνη της ενέχει τον κίνδυνο να προκαλέσει τραυματισμό και επαγωγή την ανοσολογικής απόκρισης στο ζώο (Yang et al., 2011). Το αποτέλεσμα είναι να απαιτούνται λεπτοί χειρισμοί και η διαδικασία να καθίσταται χρονοβόρα (Yu et al., 2013). Στην περίπτωση των προνυμφών, οι ενέσεις πραγματοποιούνται συνήθως στη ράχη του ζώου ή μεταξύ των κοιλιακών μεταμεριδίων, ενώ στα ενήλικα άτομα προτιμάται ο ιστός που βρίσκεται κάτω από τα φτερά του ζώου (Yu et al., 2013).
- **Χορήγηση μέσω της τροφής:** Πολλοί είναι οι τρόποι που έχουν αναπτυχθεί για την επίτευξη εισαγωγής του επιθυμητού dsRNA διαμέσου της τροφής μέσα σε ένα έντομο. Ο πιο άμεσος τρόπος είναι η ανάμιξη της τροφής με dsRNA που έχει συντεθεί *in vitro*. Εναλλακτικά, το dsRNA μπορεί να αναμιχθεί με κάποιο διάλυμα, το οποίο στη συνέχεια θα τοποθετηθεί με μορφή σταγονιδίων πλησίον των στοματικών εξαρτημάτων του εντόμου (Turner et al., 2006), ή θα χορηγηθεί μέσω τριχοειδών σωληναρίων

απευθείας στο υποστόμιό του (Rechav et al., 1999; Soares et al., 2005). Ακόμη, όπως έγινε για πρώτη φορά με επιτυχία στον *C. elegans* (Timmons and Fire, 1998), έτσι και στην τροφή ενός εντόμου, μπορούν να προστεθούν βακτήρια *Escherichia coli* τα οποία θα εκφράζουν κάποιο dsRNA (Tian et al., 2009). Επίσης, δεν είναι σπάνια πλέον η γενετική τροποποίηση φυτών ώστε να εκφράζουν κάποια φουρκέτα dsRNA που θα στοχεύει σε ένα επιλεγμένο γονίδιο του εντόμου από το οποίο προσβάλλεται, ώστε τα επιβλαβή έντομα να πεθαίνουν και τα φυτά αυτά να καθίστανται (μέσω σταθερής παραγωγής ειδικού dsRNA) ανθεκτικά σε συγκεκριμένους εχθρούς τους (Yang et al., 2011; Zhang et al., 2015). Τέλος, ο εγκλεισμός μορίων dsRNA σε νανοσωματίδια, από υλικά όπως χιτοζάνη, carbon quantum dot (CQD) ή πυρίτιο, είναι μία υπό εξέλιξη μέθοδος, η οποία προσφέρει το πλεονέκτημα της σταθεροποίησης των μορίων dsRNA ούτως ώστε να φτάσουν άθικτα στο σημείο-στόχο τους (Das et al., 2015; Gong et al., 2013).

Η χορήγηση dsRNA μέσω της τροφής πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις η πρακτική της εφαρμογή επιτρέπει τον ταυτόχρονο χειρισμό μεγάλου αριθμού εντόμων, ενώ είναι εύκολη (Tian et al., 2009) και ανταποδοτική ως προς το κόστος της (Katoch and Thakur, 2013; Yu et al., 2013). Ακόμη, είναι ελάχιστα παρεμβατική ως προς το ίδιο το ζώο και το γεγονός αυτό διευκολύνει το χειρισμό εντόμων μικρού μεγέθους χωρίς τον κίνδυνο τραυματισμού τους (Yang et al., 2011; Yu et al., 2013). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν είναι εξίσου αποτελεσματική ανάμεσα στα είδη που έχει εφαρμοστεί λόγω διαφορετικής ευαισθησίας, και η ποικιλομορφία αυτή ενδεχομένως να σχετίζεται με το περιβάλλον του εντέρου που θα υποδεχθεί το dsRNA μετά την είσοδό του μέσω της τροφής (Yu et al., 2013). Ακόμη, στην περίπτωση χορήγησης γυμνού dsRNA, οι ποσότητες που θα πρέπει να συντεθούν *in vitro* είναι μεγαλύτερες σε σχέση με τη μικροένεση, διότι πρέπει να συνυπολογίζονται πιθανές απώλειες κατά τη διαδικασία εισόδου ή λόγω αποδόμησης ενός ποσοστού μέσα στο ίδιο το έντερο.

- **Χορήγηση μέσω εμβαπτισμού/διαμόλυνσης:** Η ανακάλυψη της αποτελεσματικότητας του εμβαπτισμού σε μέσο που περιέχει dsRNA ως προς τη γονιδιακή αποσιώπηση έγινε έπειτα από τοποθέτηση νηματωδών σκωλήκων *C. elegans* για μία ημέρα σε μίγμα dsRNA και λιποσώματος, η οποία προκάλεσε τον επιθυμητό θανατηφόρο φαινότυπο στο μεγαλύτερο ποσοστό των εμβρύων της επόμενης γενιάς

(Tabara et al., 1998). Ωστόσο, η χορήγηση dsRNA με τη μέθοδο του εμβαπτισμού μπορεί να αναφέρεται τόσο σε έναν ολόκληρο οργανισμό, όσο και σε μία κυτταροκαλλιέργεια.

Προκειμένου για τα έντομα, μιλώντας για εμβαπτισμό σε dsRNA, συνήθως αναφερόμαστε σε κυτταροκαλλιέργειες, όπου για παράδειγμα εμβαπτισμός πραγματοποιήθηκε με επιτυχία αρχικά σε κύτταρα S2 της *Drosophila* σε μέσο που περιείχε γυμνό dsRNA (Clemens et al., 2000), ενώ ακολούθησαν δοκιμές και σε μίγμα διαμόλυνσης που περιείχε dsRNA (Caplen et al., 2000; Hammond et al., 2000). Ωστόσο, ειδική ως προς το γονίδιο-στόχο αποσιώπηση πραγματοποιήθηκε έπειτα από εμβαπτισμό εμβρύων *Drosophila*, από τα οποία είχε αφαιρεθεί το χόριο, μέσα σε διάλυμα που περιείχε dsRNA (Eaton et al., 2002), καθώς και μετά από *in vivo* ψεκασμό dsRNA στην επιδερμίδα του είδους *Ostrinia furnalalis* κατά το στάδιο της προνύμφης (Wang et al., 2011).

Ο εμβαπτισμός κυττάρων σε dsRNA πλεονεκτεί έναντι της τεχνικής της διαμόλυνσης, καθώς είναι απλός από τεχνικής άποψης και προσφέρει υψηλότερα ποσοστά εισόδου του dsRNA μέσα στα κύτταρα (Clemens et al., 2000). Επιπλέον, σε σχέση με τη δημιουργία «knock-out» (γονιδιακά αδρανοποιημένων) κυτταρικών σειρών, είναι εξαιρετικά πιο γρήγορη τεχνική αφού η αποσιώπηση επιτυγχάνεται μέσα σε λίγες ημέρες (Clemens et al., 2000). Η τεχνική του εμβαπτισμού προσφέρει τη δυνατότητα διεξαγωγής διαλογής υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) μέσω RNAi, με στόχο την ανακάλυψη της λειτουργίας νέων γονιδίων και την πρόβλεψη της απόκρισης ενός γονιδιακού δικτύου στα πλαίσια της Συστημικής Βιολογίας (Perrimon and Mathey-Prevot, 2007). Όπως προκύπτει, δε, φαίνεται ότι είναι περισσότερο εφαρμόσιμη σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας, καθώς με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται φυσικά εμπόδια (π.χ. επιδερμίδα) που ενδέχεται να ανακόψουν την είσοδο του dsRNA στο σώμα του εντόμου (Yu et al., 2013).

- **Δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων:** Επιτυγχάνεται μέσω πραγματοποίησης μικροένεσης πλασμιδίου που εκφράζει μία κατάλληλα σχεδιασμένη φουρκέτα RNA σε έμβρυα, προνύμφες ή νύμφες εντόμων. Σαν τεχνική εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στον *C. elegans* (Tavernarakis et al., 2000), ενώ σύντομα ακολούθησε η εφαρμογή της και στα έντομα (Kennerdell and Carthew, 2000).

Αν και η εφαρμογή μικροένεσης σαν μέθοδος έχει ήδη αναφερθεί, εδώ διαφοροποιείται λόγω του γεγονότος ότι στην προκειμένη περίπτωση προκαλείται

γονεϊκό RNAi (parental RNAi), δηλαδή το αποτέλεσμα της γονιδιακής αποσιώπησης είναι κληρονομήσιμο, άρα και σταθερό στις επόμενες γενιές (Yang et al., 2011). Επιπλέον, η χρήση του συστήματος GAL4/UAS στο φορέα που θα εισαχθεί αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς με αυτόν τον τρόπο η έκφραση της φουρκέτας RNA καθίσταται επαγόμενη, και άρα η αποσιώπηση του επιθυμητού γονιδίου είναι εύκολο να προσαρμοστεί ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του εντόμου και τις ανάγκες του πειράματος (Kennerdell and Carthew, 2000; Tavernarakis et al., 2000). Η κατασκευή εντόμων που θα εκφράζουν σταθερά μία φουρκέτα RNA μπορεί να χρησιμεύσει σε επίπεδο πληθυσμών, είτε μειώνοντάς τους μέσω δημιουργίας στείρων ατόμων, είτε αντικαθιστώντας τους από στελέχη που δεν εκφράζουν κάποιο γονίδιο της επιλογής μας (Scolari et al., 2011).

- **Μόλυνση με διαγονιδιακούς ιούς που εκφράζουν dsRNA:** Η κατασκευή ανασυνδυασμένων ιών, οι οποίοι παράγουν μετάγραφα που στοχεύουν στο επιθυμητό γονίδιο ενός εντόμου-ξενιστή, και η μετέπειτα χρήση τους για μόλυνση του εντόμου, είναι μία όχι ιδιαίτερα συνηθισμένη διαδικασία στο πεδίο της έρευνας που αφορά στις εφαρμογές του RNAi στα έντομα (Yang et al., 2011). Ωστόσο, έχει εφαρμοστεί με επιτυχία εδώ και αρκετά χρόνια στα έντομα, αναφέροντας εδώ ενδεικτικά τα είδη *Heliothis virescens* (Hajos et al., 1999), *B. mori* (Uhlirova et al., 2003) και *Ae. aegypti* (Attardo et al., 2003). Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, αξιοποιείται η ικανότητα των ιών να εξαπλώνονται ταχύτατα μέσω της μόλυνσης σε έναν πληθυσμό, με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται διαλογή των ατόμων ή των κυττάρων που έχουν δεχθεί το σήμα του RNAi (Yang et al., 2011).
- **Ηλεκτροδιάτρηση:** Η ηλεκτροδιάτρηση αποτελεί κοινή μέθοδο μετασχηματισμού κυττάρων, με χρήση της οποίας είθισται να εισάγεται το επιθυμητό πλασμίδιο στο κύτταρο μέσω πρόκλησης ηλεκτρικής εκκένωσης που καθιστά την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή από το DNA. Με την τεχνολογία του RNAi, η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης έχει εξελιχθεί περαιτέρω, καθώς μπορεί να αφορά τον *in vivo* μετασχηματισμό εμβρύων, προνυμφών ή ενήλικων ατόμων, είτε με κάποιο πλασμίδιο που εκφράζει μία φουρκέτα RNA, είτε με ένα κατάλληλα σχεδιασμένο dsRNA ή siRNA.

Η εισαγωγή dsRNA σε ζωικά κύτταρα μέσω ηλεκτροδιάτρησης, με επακόλουθη πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης, έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε αυγά και νύμφες του ακάρεως *I. scapularis* (Karim et al., 2010), αλλά και στα έντομα *B. mori*, *Papilio*

xuthus και *T. castaneum* (Ando and Fujiwara, 2013). Η ηλεκτροδιάτρηση dsRNA είναι αποτελεσματική και πρακτικά εύκολη, ενώ δεν είναι επικίνδυνη, καθώς δεν προκαλεί τραυματισμούς στα άτομα που την υφίστανται (Karim et al., 2010).

1.2.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi στα έντομα

Αρκετά χρόνια μετά την ανακάλυψη του μηχανισμού της RNA παρεμβολής (Fire et al., 1998) και των πρώτων *in vivo* πειραμάτων σε έντομα (Kennerdell and Carthew, 1998), από τη βιβλιογραφία έχει προκύψει πληθώρα πειραμάτων όπου έχει εφαρμοστεί αυτή η τεχνική στα έντομα. Ωστόσο, όπως έχει αποδειχθεί, η ευαισθησία της απόκρισης στην επαγωγή RNAi *in vivo* ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών τάξεων και ειδών εντόμων (Belles, 2010), με τα Λεπιδόπτερα και τα Ημίπτερα να αποτελούν τις πιο αμφιλεγόμενες κατηγορίες εντόμων ως προς τη δεκτικότητά τους στα πειράματα του RNAi (Swevers et al., 2013b; Terenius et al., 2011). Από την άλλη πλευρά, βλέπουμε ότι έντομα όπως τα *T. castaneum* (Κολεόπτερα), *Blatella germanica* (Δικτυόπτερα), *Locusta migratoria* (Ορθόπτερα), *S. gregaria* (Ορθόπτερα), *Anopheles gambiae* (Δίπτερα), *D. melanogaster* (Δίπτερα, μόνο σε ενήλικα) και *Apis mellifera* (Υμενόπτερα) ανταποκρίνονται με επιτυχία σε ενέσεις dsRNA το οποίο στοχεύει ειδικά σε κάποιο γονίδιο του εντόμου (Biessmann et al., 2010; Ciudad et al., 2007; Elias-Neto et al., 2010; Goto et al., 2003; Luo et al., 2013; Tan and Palli, 2008; Terenius et al., 2011; Wynant et al., 2012).

Το αποτέλεσμα της απόκρισης του εντόμου στα πειράματα RNAi μπορεί να εξαρτάται από πλήθος παραγόντων. Ένας από αυτούς είναι τα επίπεδα έκφρασης βασικών γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό, σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρότυπα που προέρχονται από χρόνια έρευνας (Jinek and Doudna, 2009). Βέβαια, τα απαραίτητα γονίδια για την επιτυχία του RNAi ενδέχεται να ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών ειδών εντόμων (Swevers et al., 2013b; Terenius et al., 2011). Έτσι, ενώ στη *Drosophila* το γονίδιο *r2d2* αποτελεί κλειδί για το μονοπάτι siRNA (Liu et al., 2003), στον *B. mori* το ομόλογό του *BmR2D2* δεν εκφράζεται φυσιολογικά (Swevers et al., 2011) και πιθανώς αυτό να σχετίζεται με τη μειωμένη αποτελεσματικότητα των πειραμάτων που περιλαμβάνουν ενέσεις dsRNA *in vivo* στο μεταξοσκώληκα (Swevers and Smagghe, 2012). Αντίστοιχα δεδομένα προκύπτουν στο *S. gregaria*, καθώς η μειωμένη έκφραση των γονιδίων *dcr2* και *ago2* στον ιστό του αναπαραγωγικού

συστήματός του οδηγεί σε μειωμένη απόδοση στα πειράματα RNAi (Wynant et al., 2012). Αντίστοιχα, στην κυτταροσειρά C3/C6 του κουνουπιού *Ae. albopictus*, όπου δεν εκφράζεται φυσιολογικά η Dcr2, η παραγωγή ιϊκών siRNAs είναι σαφώς μειωμένη (Scott et al., 2010).

Κρίσιμες παραμέτρους συνιστούν, ακόμη, η ικανότητα πρόσληψης του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, αλλά και η επιτυχής ενσωμάτωσή του στο μονοπάτι του RNAi μηχανισμού (Swevers and Smagghe, 2012). Αν και έχει αποδειχθεί η ικανότητα ορισμένων κυτταροσειρών που προέρχονται από Λεπιδόπτερα έντομα να προσλαμβάνουν dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, όπως φαίνεται αυτό δεν αρκεί για να προκαλέσει αποσιώπηση ενός γονιδίου (Hannan et al., 2009; Swevers and Smagghe, 2012; Terenius et al., 2011). Συνεπώς, για να είναι αποτελεσματικό το RNAi, η εσωτερίκευση του dsRNA από το κύτταρο θα πρέπει να συνοδεύεται και από την αποτελεσματική επαφή του με τους ενδοκυτταρικούς παράγοντες του RNAi μηχανισμού (Swevers and Smagghe, 2012).

Βέβαια, η επιτυχής εσωτερίκευση του dsRNA, και κατά συνέπεια η απόδοση της αποσιώπησης, είναι αλληλένδετη με το μήκος του σε ζεύγη βάσεων (Katoch et al., 2013). Ουσιαστικά, το RNAi επηρεάζεται από το μήκος του dsRNA όταν αυτό βρίσκεται έξω από τα κύτταρα (Miller et al., 2012). Παρόλο που το συστημικό RNAi δεν ενδείκνυται σαν μέθοδος σε προνύμφες της *Drosophila* (Miller et al., 2008), εντούτοις στα αιμοκύτταρα S2 έχει δειχθεί ότι απαιτείται ένα ελάχιστο μήκος dsRNA ούτως ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή γονιδιακή αποσιώπηση (Saleh et al., 2006). Παρόμοια είναι τα συμπεράσματα που προκύπτουν από *in vivo* δοκιμές στα Κολεόπτερα *Diabrotica virgifera virgifera* (Bolognesi et al., 2012) και *T. castaneum* (Miller et al., 2012), καθώς και το Λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera* (Mao et al., 2007). Ωστόσο, υπάρχουν και εξαιρέσεις όπου το RNAi στέφθηκε με επιτυχία χρησιμοποιώντας siRNAs σε έντομα που ανήκαν στην τάξη των Ομόπτερων (Mutti et al., 2006) και Ισόπτερων (Zhou et al., 2006). Η αποτελεσματικότητα των μεγάλου μήκους dsRNAs ενδέχεται να δικαιολογείται λόγω του ότι μία μεγαλύτερη αλληλουχία θα δημιουργήσει πιο άφθονα είδη siRNAs, με αποτέλεσμα ίσως να αυξάνεται η πιθανότητα πρόκλησης αποσιώπησης (Miller et al., 2012).

Ένας άλλος παράγοντας που εμπλέκεται στην επιτυχία του RNAi στα έντομα είναι η σταθερότητα των dsRNAs και των μικρών RNAs ως μορίων μέσα στον οργανισμό των

εντόμων, η οποία εξαρτάται τόσο από την παρουσία αποικοδομητικών ενζύμων που προκαλούν ενζυμική υδρόλυση, όσο και από το pH που επικρατεί στο περιβάλλον του εντέρου και ευθύνεται για τη χημική υδρόλυση των dsRNA υποστρωμάτων (Katoch et al., 2013; Price and Gatehouse, 2008; Swevers and Smagghe, 2012; Swevers et al., 2013b). Μία RNA νουκλεάση ναι μεν μπορεί να λειτουργήσει υποβοηθητικά συμβάλλοντας στην περαιτέρω αποικοδόμηση του mRNA-στόχου, αλλά μπορεί επίσης να δράσει παρεμποδιστικά ως προς την αποσιωπητική διαδικασία μέσω πέψης του RNAi σήματος (Swevers et al., 2013b). Τα επίπεδα των νουκλεασών μπορούν να κυμαίνονται ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του εντόμου και τη διατροφή του, καθώς φαίνεται ότι στη φάση της έκδυσης και έπειτα από στέρηση τροφής (starvation) η αποικοδομητική δράση έναντι του dsRNA στο έντερο είναι μειωμένη (Rodriguez-Cabrera et al., 2010). Σε πειράματα που αφορούσαν στη σταθερότητα του dsRNA στην αιμολέμφο των εντόμων, αυτό βρέθηκε να είναι πολύ πιο σταθερό στη *B. germanica*, που επιδεικνύει υψηλή αποτελεσματικότητα στα πειράματα RNAi, σε σχέση με τη *Manduca sexta*, όπου δεν είναι εύκολη η αποσιώπηση μέσω συστημικού RNAi (Garbutt et al., 2013). Βέβαια, σε *in vitro* πειράματα όπου μελετήθηκε η σταθερότητα του dsRNA στον *B. mori*, η επώαση του dsRNA μέσα σε πεπτικά υγρά οδήγησε σε ταχύτατη αποικοδόμηση, ενώ η διαδικασία αυτή εξελίχθηκε πολύ πιο αργά όταν το dsRNA επωάστηκε μέσα στην αιμολέμφο (Furusawa et al., 1993; Liu et al., 2013b). Έτσι, όταν από τα πεπτικά υγρά του *B. mori* απομονώθηκε μία μη-ειδική DNA/RNA νουκλεάση (dsRNάση) (Arimatsu et al., 2007), βρέθηκε ότι έπειτα από εκτοπική υπερέκφρασή της δρα παρεμποδιστικά ως προς τον ενδοκυτταρικό RNAi μηχανισμό στα κύτταρα Bm5 και Hi5, ενώ συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη Dcr2 (Liu et al., 2012). Τέλος, το σάλιο και η αιμολέμφος του *Lygus lineolaris* και του *Acyrthosiphon pisum*, αντίστοιχα, αποδείχθηκαν εξαιρετικά αποτελεσματικά στην ικανότητά τους να αποικοδομούν ταχύτατα μόρια dsRNA (Allen and Walker, 2012; Christiaens et al., 2014).

Αναφορικά με τα επίπεδα οξύτητας που επικρατούν στο έντερο των εντόμων, είναι γνωστό ότι ποικίλλουν ανάλογα με την τάξη στην οποία ανήκουν (Price and Gatehouse, 2008). Έτσι, το pH στο μεσέντερο κυμαίνεται από όξινο στα Ημίπτερα και τα Υμενόπτερα, έως ισχυρά αλκαλικό στα Λεπιδόπτερα, ενώ στα Κολεόπτερα και τα Δίπτερα ποικίλλει ανάλογα με την οικογένεια (Terra et al., 1996). Το αλκαλικό περιβάλλον του μεσεντέρου εντόμων όπως τα Λεπιδόπτερα δυσχεραίνει τη διατήρηση

της ακεραιότητας του dsRNA (Katoch et al., 2013; Swevers et al., 2013b). Επιπλέον, μέσα στο ίδιο έντομο το pH μπορεί να ποικίλλει τόσο κατά μήκος του εντέρου, όσο και ανάλογα με την απόσταση από το επιθήλιο του μεσεντέρου (Price and Gatehouse, 2008).

Ο μηχανισμός της φυσικής ανοσίας, και ο τρόπος που αυτός ενεργοποιείται, αξιολογείται ως μία ακόμα σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την αποδοτικότητα του RNAi στα έντομα. Η φυσική ανοσία ενεργοποιείται μέσω ερεθίσματος που προκύπτει από μόρια με μορφή δίκλωνου RNA, τόσο σαν απόκριση σε μία ιϊκή μόλυνση (όπου το ιϊκό γονιδίωμα ή ορισμένα ενδιάμεσά του είναι της μορφής dsRNA), όσο και μη-ειδικά σε μόρια dsRNA ανεξαρτήτως του στόχου τους. Το dsRNA λειτουργεί ως PAMP που μπορεί να πυροδοτήσει τους μηχανισμούς αντιϊκής άμυνας στα έντομα (Ding, 2010; Flenniken and Andino, 2013; Kingsolver et al., 2013; Pitaluga et al., 2008) και σε άλλα αρθρόποδα (Robalino et al., 2007; Weisheit et al., 2015). Για παράδειγμα, το μονοπάτι Jak/STAT ενεργοποιείται μετά από μόλυνση με RNA ή DNA ιούς στη *Drosophila* και τον *B. mori* (Kemp et al., 2013; Liu et al., 2015a), ενώ επίσης το γονίδιο του αντιμικροβιακού πεπτιδίου *Hemolin* ενεργοποιείται κατόπιν ένεσης με το μη-ειδικό dsgfp σε νύμφες του *Antheraea pernyi* (Hirai et al., 2004). Ενδιαφέρον αποτελεί το εύρημα ότι η πρωτεΐνη Dcr2 στη *Drosophila* και το κουνούπι *Culex quinquefasciatus*, κατά έναν μη-RNAi-εξαρτώμενο τρόπο, επάγει την έκφραση του γονιδίου *vago* που κωδικοποιεί για έναν εναλλακτικό προσδέτη του μονοπατιού Jak/STAT προκαλώντας έτσι την ενεργοποίησή του στα πλαίσια της αντιϊκής προστασίας (Deddouche et al., 2008; Kingsolver et al., 2013; Paradkar et al., 2012). Ακόμη, πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ο ρόλος της μεθυλ-τρανσφεράσης Dnmt2 στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της φυσικής ανοσίας έναντι (+)-RNA ιών στη *Drosophila* (Durdevic et al., 2013). Σε κύτταρα μεταξοσκώληκα Bm5, η υπερέκφραση του γονιδίου *BmToll9-1* οδήγησε σε επαγωγή των γονιδίων *Rel* (μονοπάτι Toll), *Stat* (μονοπάτι Jak/STAT) και *BmDcr2* (μονοπάτι siRNA) κατόπιν έκθεσής τους σε μέσο που περιείχε dsRNA, γεγονός που υποδεικνύει πιθανό ρόλο του *BmToll9-1* στην ευαισθητοποίηση έναντι μορίων dsRNA που προκύπτουν από ιϊκές μολύνσεις (Liu et al., 2014). Παράλληλα, ένεση με μη-ειδικό dsRNA προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Ago2* και *Dcr2* σε προνύμφες *M. sexta*, *B. mori* και *B. germanica* (Garbutt and Reynolds, 2012; Liu et al., 2013b; Lozano et al.,

2012), αλλά δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες μεταβολές όταν νύμφες του *A. pisum* ενέθηκαν με το ειδικό dsEcR (Christiaens et al., 2014).

Η ενδεχόμενη συνύπαρξη με κάποιον ιό υπό εμμένουσα μόλυνση μπορεί επίσης να επηρεάσει την απόκριση του RNAi μηχανισμού σε ένα έντομο, καθώς οι ιοί έχουν αναπτύξει τρόπους ούτως ώστε να αντιπαρέρχονται την οργανωμένη άμυνα των ξενιστών τους (βλ. §1.3.2.2). Έτσι, χρησιμοποιούν στρατηγικές όπως είναι η έκφραση καταστολέων του RNAi (Viral Suppressors of RNAi, VSRs), οι οποίοι στοχεύουν στην παρεμπόδιση της λειτουργίας του siRNA και όχι του miRNA μονοπατιού (Berry et al., 2009; Li et al., 2002; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006). Ακόμη, παράγουν άφθονα ιϊκά αλλά και μικρά RNAs ούτως ώστε να προκαλέσουν κορεσμό του RNAi μηχανισμού και να τον αποπροσανατολίσουν προς μη-επιβλαβείς ιϊκές δομές (Swevers et al., 2013b; Vijayendran et al., 2013). Ταυτόχρονα, οι ιοί σε επίπεδο miRNA μπορούν να τροποποιήσουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων του ξενιστή και του ιού προς όφελός τους (Fullaondo and Lee, 2012), και τελικά να επάγουν μία γενικευμένη αντιϊκή στάση στα προσβεβλημένα έντομα που θα επιδράσει αρνητικά στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού (Swevers et al., 2013b).

Άλλοι παράγοντες που ενδέχεται να ευθύνονται για την παρατηρούμενη ποικιλομορφία ως προς την απόκριση μπορεί να σχετίζονται με το κομμάτι του πειραματικού σχεδιασμού, όπως είναι η μέθοδος χορήγησης (βλ. §1.2.5) και η συγκέντρωση του dsRNA, το είδος και το αναπτυξιακό στάδιο του εντόμου, ο ιστός και το γονίδιο που στοχεύεται, αλλά και η ύπαρξη μη-ειδικών στόχων ή/και πολυμορφισμών στην αλληλουχία του στόχου που μπορεί να οδηγήσουν σε ανθεκτικότητα ως προς ένα συγκεκριμένο dsRNA (Belles, 2010; Katoch et al., 2013; Terenius et al., 2011).

1.2.7 Πειράματα RNAi στο Λεπιδόπτερο έντομο *B. mori*

Τα τελευταία χρόνια, τα Λεπιδόπτερα έχουν χαρακτηριστεί ως έντομα που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς την απόκρισή τους σε πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης, καθώς τα πειράματα συστημικού RNAi δεν απέφεραν πάντα το επιθυμητό αποτέλεσμα (Swevers et al., 2013b; Terenius et al., 2011). Αν και έχουν ανακύψει στοιχεία σχετικά με τους παράγοντες της παρατηρούμενης μειωμένης

αποτελεσματικότητας, ωστόσο αυτοί δεν έχουν προσδιοριστεί προς το παρόν με ακρίβεια. Συνεπώς, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο τον *B. mori*, η εφαρμογή του RNAi στα Λεπιδόπτερα χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω, ούτως ώστε να προσδιοριστούν σαφέστερα οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi, καθώς και οι συνθήκες που είναι απαραίτητες για την επιτυχία του, σε αυτή την τάξη εντόμων (**Πίνακας 2**).

Η έκβαση της γονιδιακής αποσιώπησης στα Λεπιδόπτερα έχει αποδειχθεί πως επηρεάζεται από τη μέθοδο με την οποία χορηγείται το σήμα του RNAi (Terenius et al., 2011). Έτσι, σε *in vitro* πειράματα όπου έχουν χρησιμοποιηθεί κυτταροκαλλιέργειες Λεπιδοπτέρων, παρατηρείται πολύ υψηλή απόκριση στο RNAi έπειτα από διαμόλυνση με ειδικά μόρια dsRNA (Kayukawa et al., 2016; Li et al., 2016c; Swevers et al., 2011) ή shRNA (Kim et al., 2012; Tanaka et al., 2009). Αντίθετα, στα *in vivo* πειράματα RNAi, η αποδοτικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης δεν είναι εξασφαλισμένη, με κάποιες από τις τεχνικές να προτιμώνται έναντι άλλων (Terenius et al., 2011).

Πρόσφατα δείχθηκε ότι ενώ η πλειοψηφία των βασικών γονιδίων των μονοπατιών miRNA και siRNA εκφράζονται σε αφθονία στους ιστούς του μεταξοσκώληκα *B. mori*, το γονίδιο *BmR2D2* που κωδικοποιεί για ένα ένζυμο-κλειδί του siRNA μονοπατιού εκφράζεται από ελάχιστα (*in vivo*) έως καθόλου (*in vitro*) (Swevers et al., 2011). Ωστόσο, το γεγονός ότι σε πειράματα διαμόλυνσης η *in vitro* επαγωγή RNAi αποδεικνύεται ως απολύτως εφικτή (Swevers et al., 2011) υποδεικνύει πιθανά την ύπαρξη κάποιου εναλλακτικού μηχανισμού που δεν απαιτεί την ύπαρξη του γονιδίου *BmR2D2* του siRNA μονοπατιού που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη πρόσδεσης dsRNA.

Από τις πρώτες αναφορές επιτυχούς *in vivo* RNAi εφαρμογής στο μεταξοσκώληκα ήταν η δημιουργία ενός διαγονιδιακού ιού (SINV, Sindbis Virus) που εξέφραζε ένα μη-κωδικοποιό RNA έναντι του γονιδίου *BR-C* το οποίο εμπλέκεται στη μεταμόρφωση του εντόμου (Uhlirova et al., 2003). Πλέον, από τις πιο δημοφιλείς πρακτικές στο μεταξοσκώληκα είναι η πραγματοποίηση ενέσεων dsRNA ή siRNA που έχει συντεθεί *in vitro*, αλλά και η δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων που εκφράζουν φουρκέτες RNA μέσω του συστήματος μεταφοράς piggyBac. Ενέσεις δίκλωνου RNA (συχνότητα 82.9%),

Πίνακας 2 Επιτυχή *in vivo* RNAi πειράματα στο μεταξοσκώληκα *B. mori*. Τα αποτελέσματα αφορούν δημοσιευμένες μελέτες.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ
Ανάπτυξη
ανάπτυξη ωοθηκών (Xue et al., 2014), έκταση φτερών (Huang et al., 2007), εμβρυϊκή ανάπτυξη & δημιουργία αυγών (Yang et al., 2014a; Yang et al., 2014b), εμβρυϊκή δημιουργία μεταμεριδίων (Liu, 2013; Nakao, 2012, 2015), επιδερμίδα (Zhuo et al., 2014), θωρακικά μεταμερίδια (Chen et al., 2013b), μεταμεριδιακά εξαρτήματα (Liu, 2012; Masumoto et al., 2009; Tomita and Kikuchi, 2009; Xiang et al., 2011), οζώδεις προεξοχές (Edayoshi et al., 2015), σωματικά μεταμερίδια και επιμήκυνση του άξονα (Liu et al., 2008)
Ανθεκτικότητα σε παθογόνα
BmCPV (Pan et al., 2015), BmNPV (Isobe et al., 2004; Jiang et al., 2013; Kanginakudru et al., 2007; Subbaiah et al., 2013; Zhang et al., 2014a), Gram$^-$ βακτήρια (Ma et al., 2015), *Trichoderma* (Li et al., 2015d)
Ανοσολογικοί μηχανισμοί
αντιμικροβιακά πεπτίδια και φυσική ανοσία (Mrinal and Nagaraju, 2008; Tian et al., 2010b; Yang et al., 2015), *E. coli* (Gandhe et al., 2007), *Serratia marcescens* και *Staphylococcus aureus* (Hu et al., 2015)
Βιοτεχνολογικές εφαρμογές
δομή γλυκοζυλίωσης N-γλυκανών (Nomura et al., 2015), υποδοχέας ινσουλίνης (Zhang et al., 2014d)
Έκδυση - Μεταμόρφωση
απελευθέρωση ορμόνης διάπαυσης (Sato et al., 2014), απόπτωση (Tian et al., 2012), αυτοφαγία (Tian et al., 2013), έκδυση-μεταμόρφωση (Cheng et al., 2008; Dai et al., 2007; Dai et al., 2008; Deng et al., 2012; Gui et al., 2006; Guo et al., 2012; Hossain et al., 2008; Lee et al., 2009a; Li et al., 2015a; Liu et al., 2015b; Uhlirova et al., 2003; Wang et al., 2013b; Wang et al., 2013c), λιπόλυση (Hossain et al., 2013)
Εμβρυογένεση
ανάπτυξη θανατηφόρου εμβρυϊκής μεταλλαγής (Chen et al., 2013a), βιτελλινική μεμβράνη (Xu et al., 2011)
Θερμοπροστασία
θερμοευαίσθητη επιληψία (Nie et al., 2015)
Μεταβολισμός
αποτοξινωτικοί μηχανισμοί έναντι ξενοβιοτικών (Zhao et al., 2014), μεταβολικές λειτουργίες λιπαρού σώματος (Orville Singh et al., 2014)
Μηχανισμός του RNAi
ενίσχυση RNAi μηχανισμού (Li et al., 2015e)
Νευρικό σύστημα
καθοδήγηση νευράξονα (Li et al., 2016a, b; Yu et al., 2014)
Προσδιορισμός φύλου
μηχανισμός χρωμοσωμικού προσδιορισμού φύλου (Suzuki et al., 2012; Suzuki et al., 2014)
Πρωτεϊνική μεταφορά
σύμπλεγμα πρωτεϊνών-προσαρμογέων (Niu et al., 2013)
Φερομόνες
βιοσύνθεση φερομονών φύλου (Du et al., 2012b; Du et al., 2012a; Du et al., 2015; Hull et al., 2009; Hull et al., 2010; Ohnishi et al., 2006; Ohnishi et al., 2009; Zhang et al., 2014b; Zhang et al., 2014c)
Χρωματισμός
αυγά (Osanai-Futahashi et al., 2012), έμβρυο (Yamaguchi et al., 2011), έμβρυο και προνύμφη (Ando and Fujiwara, 2013; Quan et al., 2002), προνύμφη (Liu et al., 2010a; Yoda et al., 2014), επιδερμίδα (Wang et al., 2013a), κουκούλι (Tabunoki et al., 2004)

ανεξαρτήτως μήκους, έχει αναφερθεί ότι πραγματοποιούνται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, με πιο συχνά εκείνα του εμβρύου (π.χ. Nakao, 2015; Suzuki et al., 2014) και της προνύμφης από την έναρξη του 5^{ου} σταδίου (π.χ. Yang et al., 2015) έως και τη φάση του κλαδώματος (wandering stage) (π.χ. Cheng et al., 2008). Ακόμη επιτυχή αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί σε μεμονωμένες αναφορές έπειτα από ένεση και ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας siRNAs (Edayoshi et al., 2015), καθώς και κατόπιν πραγματοποίησης ενέσεων με μίγμα dsRNA και λιποσώματος (Pan et al., 2015). Αντίστοιχα, οι ενέσεις με το σύστημα piggyBac (συχνότητα 16%) λαμβάνουν χώρα κυρίως σε έμβρυα (π.χ. Nomura et al., 2015), ενώ ακόμη έχουν αναφερθεί σε συνδυασμό με ηλεκτροδιάτρηση σε προνύμφες (Ando and Fujiwara, 2013; Yoda et al., 2014) και σε ενήλικα θηλυκά άτομα (Zhang et al., 2014a). Τέλος, αξίζει να τονιστεί ότι δεν υπάρχουν αναφορές που να αφορούν στην επίτευξη γονιδιακής αποσιώπησης με χορήγηση dsRNA μέσω της τροφής στο μεταξοσκώληκα.

Ανάμεσα στις δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν σε πειράματα RNAi στα Λεπιδόπτερα, ξεχωρίζουν ορισμένες κατηγορίες φυσιολογικών λειτουργιών που όταν στοχεύονται η επιτυχία της αποσιώπησης εμφανίζει μεγάλα ποσοστά (**Πίνακας 2**). Από αυτές, την πρώτη θέση κατέχουν τα γονίδια που ρυθμίζουν την έκδυση και τη μεταμόρφωση (22%), αν και αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μοναδικής μέχρι σήμερα μελέτης ανασκόπησης που αφορά στα Λεπιδόπτερα (Terenius et al., 2011). Ωστόσο, η φαινομενική αντίθεση δικαιολογείται από το γεγονός ότι στη μελέτη αυτή αναλύονται και δεδομένα από μη-δημοσιευμένα αποτελέσματα ανεπιτυχών πειραμάτων RNAi, ενώ επίσης μέσα στα τελευταία 5 έτη η έρευνα στο πεδίο αυτό έχει εξελιχθεί κατά πολύ. Εξίσου σημαντική είναι η κατηγορία γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη σε διάφορα στάδια ζωής του εντόμου (20%), ενώ ακόμη συχνές είναι και οι μελέτες που στοχεύουν σε λειτουργίες όπως η βιοσύνθεση φερομονών φύλου (12%) και ο χρωματισμός (11%). Τέλος, αξιοσημείωτη και με πρακτικές εφαρμογές είναι η ύπαρξη αρκετών μελετών με αντικείμενο την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε παθογόνα, όπως οι μπακουλοϊοί, μέσω στόχευσης σημαντικών γονιδίων τους (11%).

1.3 Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNAi ΥΠΟ ΤΟ ΠΡΙΣΜΑ ΤΗΣ ΙΪΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

1.3.1 Οι τύποι της ιϊκής μόλυνσης

Ένας ιός μπορεί να οριστεί ως ένα ενδοκυτταρικό παράσιτο που περιλαμβάνει τα δικά του νουκλεϊκά οξέα, είναι ικανό να αυτοαντιγράφεται και δεν είναι κύτταρο (Roossinck, 2011). Βέβαια, ανεξαρτήτως μολυσματικού παράγοντα και ξενιστή, οι μολύνσεις μπορούν να διακριθούν σε δύο βασικές κατηγορίες, την οξεία και την εμμένουσα μόλυνση (Goic and Saleh, 2012).

Χαρακτηριστικά μίας οξείας ιϊκής μόλυνσης είναι ο υψηλός ρυθμός αντιγραφής σε συνδυασμό με το μεγάλο αριθμό απογόνων. Η διάρκεια της αντιγραφής είναι μικρή, καθώς διακόπτεται είτε από το θάνατο του ξενιστή είτε από τη συνεπαγόμενη ανοσολογική αντίδρασή του (Goic and Saleh, 2012; Swevers et al., 2013b). Επιπλέον, συχνά παρατηρούνται συμπτώματα ασθένειας, υψηλοί ρυθμοί μεταλλαγών (στους RNA ιούς), οριζόντια μεταφορά και αντιγραφή σε περισσότερους από έναν ξενιστές (Sorrell et al., 2009; Villarreal et al., 2000). Αντίθετα, οι ιοί που προκαλούν εμμένουσες μολύνσεις δεν επιφέρουν εμφανή σημάδια ασθένειας, ενώ χαρακτηρίζονται από γενετική σταθερότητα και φυλογενετική συμβατότητα του γονιδιώματός τους σε σχέση με εκείνο του ξενιστή. Ακόμη, η μεταφορά τους γίνεται κάθετα (από τους γονείς στους απογόνους) ή μέσω σεξουαλικής επαφής, καθώς επίσης επιδεικνύουν υψηλή εξειδίκευση ως προς το είδος του ξενιστή (Villarreal et al., 2000).

Αυτοί οι δύο τύποι μολύνσεων φαίνεται ότι συνδέονται μεταξύ τους, καθώς ιϊκοί παράγοντες που προκαλούν μία εμμένουσα μόλυνση σε έναν συγκεκριμένο ξενιστή θα μπορούσαν είτε να προέρχονται από μία οξεία μόλυνση από την οποία δεν απαλλάχτηκε ποτέ πλήρως ο ξενιστής, είτε να είναι η αφετηρία για την έναρξη μίας οξείας μόλυνσης σε ένα νέο ξενιστή (Goic and Saleh, 2012; Villarreal et al., 2000). Ενδιαφέρον προκαλεί η περίπτωση των προνυμφών του είδους *Mamestra brassicae* που βρίσκονταν υπό εμμένουσα μόλυνση με έναν ιό που προσομοίαζε με τον MbNPV (*Mamestra brassicae* Nuclear Polyhedrosis Virus) και εν συνεχεία μολύνθηκαν με τους ετερόλογους ιούς PfNPV (*Panolis flammea* NPV) και AcNPV (*Autographa californica* NPV), όπου ο προϋπάρχων ιός ενεργοποιήθηκε και μετέτρεψε τη μόλυνση σε οξεία (Hughes et al., 1993).

Η έκβαση μίας ιϊκής μόλυνσης στα έντομα, τουλάχιστον σε πειραματικό επίπεδο, εξαρτάται από τη μολυσματική οδό (με ένεση ή από το στόμα), καθώς και από την ηλικία του εντόμου (Roossinck, 2011). Έτσι για παράδειγμα, όταν άτομα του είδους *D. melanogaster* μολύνθηκαν στην προ-αναπαραγωγική ηλικία με τον (+)-ssRNA ιό DCV, η επιβίωσή τους μειώθηκε δραματικά, ενώ στην περίπτωση των ενηλίκων ατόμων η μόλυνση ενίσχυσε την αναπαραγωγική τους ικανότητα (Thomas-Orillard, 1996).

1.3.2 Εμμένουσα μόλυνση και έντομα

Μία εμμένουσα μόλυνση μπορεί να είναι λανθάνουσα, δηλαδή να χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ιϊκού γονιδιώματος και πιθανώς ιϊκών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτό, όμως ταυτόχρονα να απουσιάζουν τα ιϊκά σωμάτια. Αντίθετα, όταν η εμμένουσα μόλυνση είναι χρόνια παρατηρείται σταθερή παραγωγή ιϊκών σωματίων σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στην περίπτωση της αμοιβαίας μόλυνσης (αμφοτεροβίωση), ο ιός είναι επωφελής για τον ξενιστή, ο οποίος μπορεί να τον ενσωματώσει στο γονιδίωμά του (endogenization) (Fablet, 2014; Goic and Saleh, 2012; Sorrell et al., 2009; Swevers et al., 2013b). Έτσι, ενώ μία εμμένουσα μόλυνση θεωρείται ότι αφορά σωματικά κύτταρα και ουσιαστικά πρόκειται για εκ νέου μόλυνση κάθε διαδοχικής γενιάς ως συνέπεια της σταθερής ενσωμάτωσης του ιϊκού γονιδιώματος, η ενσωμάτωση ενός ενδογενούς ρετροϊού (endogenous retrovirus, ERV) προκύπτει από τη μόλυνση γαμετικών κυττάρων από κάποιον ήπιας επιθετικότητας ρετροϊό που στη συνέχεια παρέμεινε στο γονιδίωμα και έτσι προσαρτήθηκε σε αυτό με επιτυχία (Fablet, 2014).

Η μελέτη του φαινομένου της εμμένουσας μόλυνσης είναι σημαντική για τα έντομα, ενώ φαίνεται ότι το είδος του εντόμου που μολύνεται παίζει σημαντικό ρόλο στην έκβαση της μόλυνσης. Συχνά, στα έντομα οι ιοί δημιουργούν εμμένουσες μολύνσεις, καθώς στις καταστάσεις αυτές ο ιός δεν εξολοθρεύεται αλλά περιορίζεται σε τέτοιο σημείο ούτως ώστε να εμποδίζεται η δημιουργία οξείας και ενδεχομένως θανατηφόρου μόλυνσης (Gammon and Mello, 2015). Ειδικότερα, όσον αφορά στους αρβοϊούς που μεταφέρονται μέσω των εντόμων στα σπονδυλόζωα, αυτοί συχνά δημιουργούν εμμένουσες μολύνσεις που φαινομενικά είναι μη-επιβλαβείς για το έντομο-ξενιστή, όμως μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή νόσο στον τελικό ξενιστή (Flegel, 2007). Έτσι, στην περίπτωση των κουνουπιών, οι ιοί συνήθως προκαλούν μη-παθογόνες αλλά

εμμένουσες μολύνσεις (Blair, 2011; Blair and Olson, 2015). Η στρατηγική αυτή είναι περισσότερο ωφέλιμη για τον ιό, καθώς, αν και δεν διακινδυνεύεται η επιβίωση του εντόμου-φορέα, διευκολύνεται η μετάδοση του παθογόνου ιού στον τελικό ξενιστή του (Swevers et al., 2013b). Παράλληλα, ένα αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρείται, επίσης, με ιούς που προσβάλλουν τα φυτά, οι οποίοι μεταφέρονται μέσω εντόμων, όπου πολλαπλασιάζονται χωρίς εμφανή σημάδια ασθένειας και παράγουν μολυσματικά ιϊκά σωμάτια με στόχο κάποιο φυτό (Flegel, 2007; Hogenhout et al., 2003).

Αντίθετα, προκειμένου για τις μέλισσες και τις σφήκες, τα δεδομένα είναι διαφορετικά καθώς μία μόλυνση μπορεί υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις να μετατραπεί από εμμένουσα σε οξεία με σαφείς οικονομικές απώλειες. Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη μετάβαση από τη μία κατάσταση μόλυνσης στην άλλη σχετίζονται με συνθήκες πρόκλησης αβιοτικού ή βιοτικού στρες, όπως για παράδειγμα μεταβολές στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, χορήγηση εντομοκτόνων, έλλειψη τροφής, καθώς και συνύπαρξη με άλλα παθογόνα όπως το άκαρι *Varroa destructor* ή το μύκητα *Nosema apis* (Chen and Siede, 2007; Di Prisco et al., 2013; Doublet et al., 2015; Prisco et al., 2011).

1.3.2.1 Τα οφέλη μίας εμμένουσας μόλυνσης

Αναφορικά με την εμμένουσα μόλυνση, αυτή δύναται να θεωρηθεί ως η πιο επιτυχής μορφή αλληλεπίδρασης ενός ξενιστή με το αντίστοιχο παθογόνο του, καθώς τα οφέλη από τη συμβίωση αυτή ποικίλλουν για τα δύο μέλη της σχέσης.

Έτσι, από την πλευρά του ιού, αυτός επωφελείται από το γεγονός ότι διασφαλίζεται η παραγωγή και μετάδοση του ιϊκού γενετικού υλικού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η κατάσταση αυτή θα μπορούσε να επιτρέψει τη συνύπαρξη πολλαπλών ιϊκών μολύνσεων (με τον ίδιο ή διαφορετικούς ιούς), ούτως ώστε να αποτελέσει πηγή ενισχυμένης γενετικής ποικιλομορφίας. Ακόμη, εξαιτίας του γεγονότος ότι τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα δεν επηρεάζεται αρνητικά η υγεία του ξενιστή από την παρουσία της μόλυνσης, ένας ξενιστής που μετακινείται μπορεί να λειτουργήσει έτσι ώστε να διασπείρει τον ιό στο περιβάλλον του ή σε νέα περιβάλλοντα (Goic and Saleh, 2012).

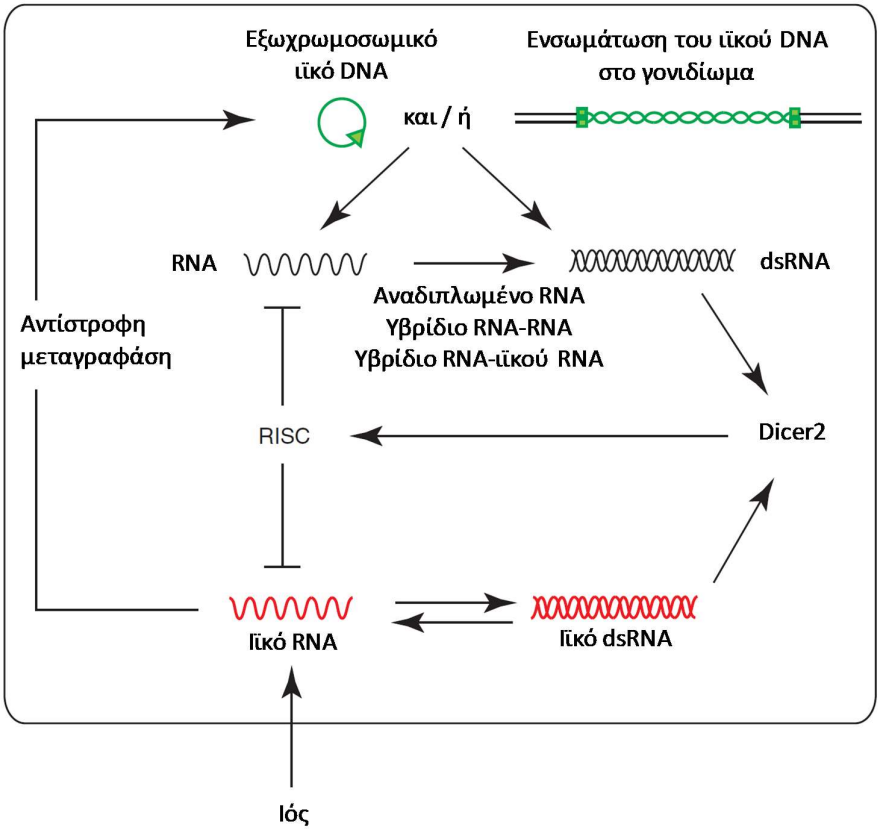
Παράλληλα, ο ίδιος ο ξενιστής μπορεί να επωφεληθεί από τη συνύπαρξη με τη μορφή εμμένουσας μόλυνσης με κάποιον ιό, καθώς αυτή ενδέχεται να του προσδώσει ανθεκτικότητα έναντι συγγενών ιών λόγω του φαινομένου της «ιϊκής συγκατοίκησης» (viral accommodation) (Flegel, 2007). Ακόμη, πληθυσμοί υπό εμμένουσα μόλυνση, λόγω διασποράς του ιού, ενδέχεται να αντικαταστήσουν ευπαθείς πληθυσμούς σε μία νέα περιοχή (Villarreal, 2009). Άλλωστε, οργανισμοί υπό εμμένουσα ιϊκή μόλυνση σε μορφή αμοιβαίας μόλυνσης εμφανίζουν αυξημένη αντιϊκή απόκριση, ενώ ένας τέτοιος ιός μπορεί να παρέχει στον ξενιστή του νέα γονίδια, να προκαλέσει ωφέλιμες επιγενετικές αλλαγές στο γονιδίωμά του και να βοηθήσει στη προσαρμογή του σε πιθανές περιβαλλοντικές αλλαγές (Noreen et al., 2007; Roossinck, 2011).

1.3.2.2 Μηχανισμοί που σχετίζονται με την εγκαθίδρυση μίας εμμένουσας μόλυνσης

Το ισοζύγιο στη σχέση ξενιστή-ιού που έχει ως αποτέλεσμα μία εμμένουσα μόλυνση επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των κατάλληλων μηχανισμών και από τις δύο πλευρές. Για την αντιμετώπιση μίας ιϊκής μόλυνσης, τα διάφορα είδη ξενιστών έχουν αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές, όπως για παράδειγμα το σύστημα CRISPR σε βακτήρια και αρχαία, το σύστημα πλασμιδιακού αποκλεισμού σε βακτήρια, το RNAi σε φυτά, αρθρόποδα και νηματώδεις, καθώς και την επίκτητη ανοσία στα σπονδυλωτά (Goic and Saleh, 2012). Από την πλευρά τους, δε, οι ιοί που προσβάλλουν έντομα και φυτά εκφράζουν πρωτεΐνες-καταστολείς (VSRs) ούτως ώστε να αντιπαρέλθουν την αντιϊκή απόκριση μέσω RNAi.

Ακόμη, υπάρχουν αναφορές που αποδεικνύουν την ενσωμάτωση μη-ρετροϊκών ιϊκών αλληλουχιών στο γονιδίωμα κάποιου άλλου οργανισμού (**Εικόνα 7**). Για παράδειγμα, πρόσφατα ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη ομόλογων περιοχών μεταξύ γονιδιωμάτων σπονδυλωτών και ιών που προσβάλλουν έντομα, η οποία αποδίδεται στη φυσική επιλογή που οδήγησε στη μακρόχρονη εξέλιξη των σπονδυλωτών, αλλά και στη βελτίωση των ιών των εντόμων (Fan and Li, 2011). Ειδικότερα, δε, για τα έντομα, έχει προταθεί ότι η ενσωμάτωση αλληλουχιών αυτού του είδους στο DNA ενός εντόμου-ξενιστή οδηγεί στην μεταγραφή του σε RNA και στην ενίσχυση της αντιϊκής προστασίας μέσω της παραγωγής μικρών RNAs (siRNAs ή piRNAs) (Goic and Saleh, 2012). Για τα

κουνούπια του γένους *Aedes*, έχει δειχθεί ότι στο γονιδίωμά τους περιλαμβάνονται αλληλουχίες που προέρχονται από τους ιούς CFAV (Cell Fusing Agent Virus) και KRV (Kamiti River Virus) της οικογένειας *Flaviviridae* (Crochu et al., 2004). Επίσης, όσον αφορά στις μέλισσες του είδους *A. mellifera*, έχει βρεθεί ότι στο γονιδίωμα ενός μεγάλου ποσοστού ατόμων (~30%) περιλαμβάνεται ένα κομμάτι του γονιδιώματος του (+)-RNA ιού IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus), γεγονός που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στον ιό αυτό (Maori et al., 2007). Ακόμη, σε κύτταρα της *Drosophila* ανακαλύφθηκε η παρουσία έξι RNA ιών υπό λανθάνουσα μορφή, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν με τη μορφή των vpiRNAs (Wu et al., 2010).



Εικόνα 7 Προτεινόμενο μοντέλο για την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση μίας εμμένουσας μόλυνσης στα έντομα. Από τη στιγμή που ένα κύτταρο μολύνεται από έναν ιό, ακολουθεί η διάδοση του ιϊκού γενετικού υλικού (υπό τη μορφή γονιδιώματος ή ενδιάμεσων μορφών dsRNA, κόκκινο), το οποίο είτε αναγνωρίζεται από τη Dcr2 και οδηγείται στο RISC, είτε μεταγράφεται αντίστροφα. Πλέον, με τη μορφή DNA (ενσωματωμένου στο γονιδίωμα του ξενιστή ή ως εξωχρωμοσωμικό κυκλικό DNA, πράσινο), παράγονται RNA μετάγραφα (μαύρα) που σχηματίζουν δομές dsRNA, οι οποίες καθοδηγούνται και πάλι μέσω της Dcr2 στο RISC. Το αποτέλεσμα είναι να περιοριστεί η τρέχουσα μόλυνση και να επιτευχθεί ισορροπία που θα οδηγήσει σε κατάσταση εμμένουσας μόλυνσης (Προσαρμογή από Goic et al., 2013).

Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο μηχανισμός του RNAi μπορεί να έχει καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση μίας εμμένουσας μόλυνσης και στη δημιουργία μίας διαφορετικού τύπου ανοσολογικής μνήμης χρησιμοποιώντας νουκλεϊκά οξέα (**Εικόνα 7**) (Gammon and Mello, 2015). Έτσι, αυτός ο μηχανισμός ανοσοποίησης μέσω dsRNA θα μπορούσε να είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση, και με αυτόν τον τρόπο να παρέχει μία μορφή ανοσολογικής μνήμης που να βασίζεται σε νουκλεϊκά οξέα, η οποία να μεταφέρεται από κύτταρο σε κύτταρο και να προσδίδει ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα είδη ιών (Bartholomay et al., 2012; Gammon and Mello, 2015; Saleh et al., 2009). Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι σε έντομα και κύτταρα του γένους *Drosophila* μολυσμένα με τον ιό FHV, ενδογενείς αντίστροφες μεταγραφάσες ενεργοποιούνται ούτως ώστε να δημιουργήσουν cDNA του ιϊκού γονιδιώματος, τα οποία μπορούν να ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή, να μεταγράφονται, και να παράγουν dsRNAs και vsiRNAs (μέσω του RNAi μηχανισμού) για τον έλεγχο των επιπέδων του ιού (Goic et al., 2013). Η αποσιώπηση, δε, των *dcr2* και *ago2* σε κύτταρα *Drosophila* υπό εμμένουσα μόλυνση με τον FHV οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων αντιγραφής του ιού (Flynt et al., 2009). Επιπλέον, εκτός από τα vsiRNAs, αποδεικνύεται η παραγωγή και vpiRNAs κατά τη μόλυνση κυττάρων κουνουπιού με τον ιό RVFV (Rift Valley Fever Virus), ενώ αυτή εμφανίζεται αυξημένη σε μεταγενέστερα στάδια, όπου μία οξεία μόλυνση τείνει να μετατραπεί σε εμμένουσα (Leger et al., 2013).

Βέβαια, φαίνεται ότι και άλλοι παράγοντες εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, καθώς υπάρχουν RNA ιοί για τους οποίους η εγκαθίδρυση εμμένουσας μόλυνσης δεν ελέγχεται από το μηχανισμό του RNAi, όπως στην περίπτωση μόλυνσης ατόμων *D. melanogaster* από τον ιό Nora (Habayeb et al., 2009). Επίσης, δεν παρατηρούνται αντίστοιχα φαινόμενα παραγωγής μικρών μορίων RNA σε όλες τις περιπτώσεις μόλυνσης κάποιου εντόμου από έναν ιό που εν δυνάμει μπορούν να δράσουν προστατευτικά σε περίπτωση επαναμόλυνσης με τον ίδιο ιό (Longdon et al., 2013).

1.3.3 Η συνεισφορά των μικρών RNAs στις αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή

1.3.3.1 Τα miRNAs

Παλαιότερα υπήρχε σκεπτικισμός ως προς την πιθανότητα τα miRNAs ενός ξενιστή να έχουν αντιϊκό ρόλο, αφού έχουν βρεθεί miRNAs που είναι συντηρημένα ανάμεσα σε

πολλά είδη σπονδυλωτών, από τα πουλιά έως και τον άνθρωπο. Έτσι, θα ήταν δύσκολο για ένα miRNA να έχει εξελιχθεί με τρόπο ώστε να στοχεύει σε ένα συγκεκριμένο ιό, καθώς το εύρος των ξενιστών που αντιστοιχούν σε έναν ιό είναι γενικά πιο περιορισμένο. Αντίθετα, οι ιοί συνήθως έχουν πολύ πιο σύντομο κύκλο ζωής σε σχέση με τους ξενιστές, ενώ οι πολυμεράσες τους υπόκεινται σε αυξημένο αριθμό λαθών, ώστε ο ρυθμός της ιϊκής εξέλιξης να είναι αυξημένος (Fullaondo and Lee, 2012; Umbach and Cullen, 2009).

Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν πολλαπλές λειτουργίες των miRNAs στις αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή (**Εικόνα 8**). Ως εκ τούτου, μία ιϊκή μόλυνση φαίνεται ότι προκαλεί μεγάλες αλλαγές στα επίπεδα των miRNAs που εκφράζονται από τον ξενιστή, όπως συμβαίνει για παράδειγμα έπειτα από μόλυνση με το μπακουλοϊό AcMNPV (*Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus) σε κύτταρα Sf9 (Mehrabadi et al., 2013) ή με τον HaSNPV (*Helicoverpa armigera* Single Nucleopolyhedrovirus) σε προνύμφες *Helicoverpa armigera* (Jayachandran et al., 2013), καθώς και κατόπιν μόλυνσης με τον κυτταροπλασματικό πολυεδρικό ιό BmCPV (*Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus) σε προνύμφες *B. mori* (Wu et al., 2013).

Ακόμη, τα miRNAs του ξενιστή μπορούν ενδεχομένως να στοχεύουν σε κάποιο ιϊκό γονίδιο, και με αυτόν τον τρόπο να το απενεργοποιούν προς όφελος του ξενιστή (Vijayendran et al., 2013). Μία τέτοια περίπτωση είναι αυτή του miR-8 του μεταξοσκώληκα *B. mori*, για το οποίο έχει βρεθεί ότι διαθέτει αλληλουχίες αναγνώρισης και πρόσδεσης σε αρκετά γονίδια του ιού BmNPV (*Bombyx mori* Nucleopolyhedrosis Virus), μεταξύ των οποίων είναι και το *ie-1*, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο το ιϊκό φορτίο (Singh et al., 2012). Αντίστοιχα, σε κυτταροκαλλιέργειες του είδους *Helicoverpa zea*, το miR-24 μπορεί να μειώνει τα επίπεδα πολλαπλασιασμού ενός ασκοϊού στοχεύοντας σε μία DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (Hussain et al., 2010).

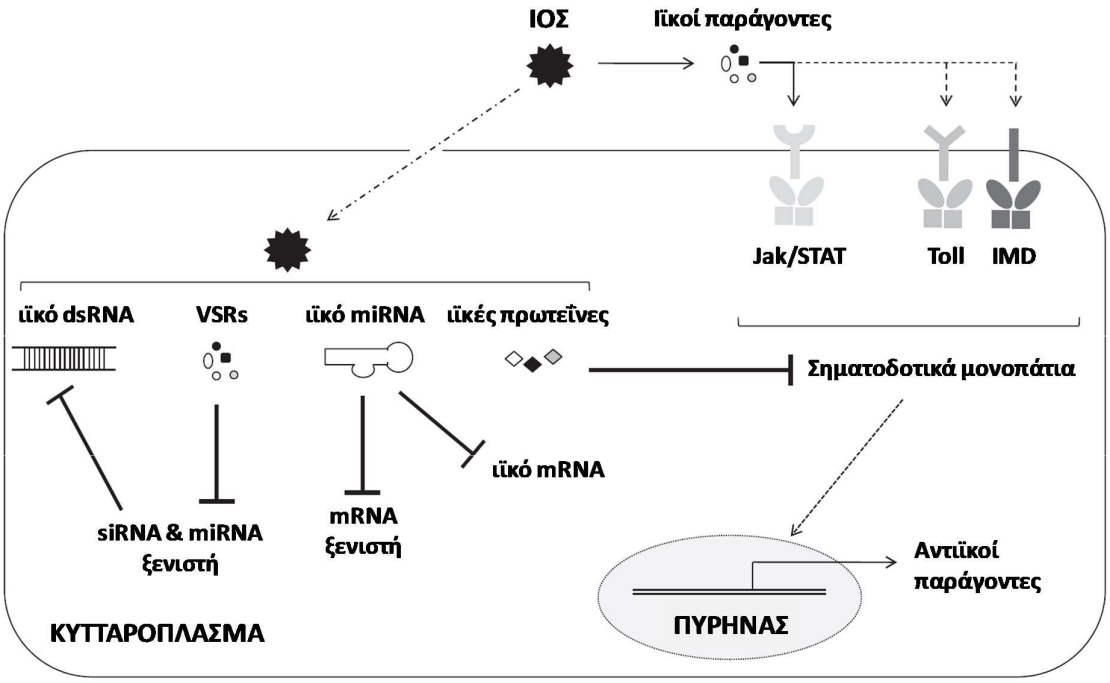
Από την πλευρά του ιού, τα miRNAs έχουν εξίσου ρυθμιστικό ρόλο στην επιτυχή εξέλιξη της μόλυνσης, μέσω παρεμβολής τους στις φυσιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον ξενιστή (Vijayendran et al., 2013). Ένα miRNA που ανήκει σε αυτήν την κατηγορία είναι το miR-1 του ιού BmNPV, καθώς αυτό στοχεύει στον συμπαράγοντα Ran του γονιδίου *exportin-5* του μεταξοσκώληκα, ο οποίος εμπλέκεται στη μεταφορά των pre-miRNAs από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Με τον τρόπο αυτό, η έκφραση του miR-1 μπλοκάρει την παραγωγή miRNAs του μεταξοσκώληκα

έναντι του BmNPV, και άρα χρησιμοποιεί την ίδια την άμυνα του ξενιστή για να την ανακόψει (Singh et al., 2012). Ένα άλλο παράδειγμα είναι αυτό του KUN-miR-1 που κωδικοποιείται από τον ιό του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV) και για το οποίο έχει βρεθεί πως προκαλεί αυξορρύθμιση στα επίπεδα μεταγραφής ενός μεταγραφικού παράγοντα, του GATA4, στο κουνούπι *Aedes albopictus*, ούτως ώστε να αυξάνονται τα επίπεδα της ιϊκής αντιγραφής στα μολυσμένα κύτταρα (Asgari, 2014; Hussain et al., 2012).

Επιπλέον, ο ιός μπορεί να αξιοποιήσει το μηχανισμό των microRNAs προς όφελός του τροποποιώντας την έκφραση μεταγράφων που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τον ιό (Vijayendran et al., 2013). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι αυτό του miR-1 που κωδικοποιείται από τον ασκοϊό του είδους *Heliothis virescens* HvAV (*Heliothis virescens* Ascovirus) και στοχεύει στο γονίδιο της DNA πολυμεράσης I του HaAV στα κύτταρα Sf9 (Hussain et al., 2008). Ενδιαφέρον προκαλεί επίσης η περίπτωση των miRNAs που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *pag1* του ιού *Heliothis zea* Nudivirus-1 (HzNV-1), ούτως ώστε να διατηρούνται χαμηλά τα επίπεδα του πρώιμου ιϊκού γονιδίου-στόχου του, *hhi1*, σε κυτταροκαλλιέργειες Sf21 υπό λανθάνουσα μόλυνση (Wu et al., 2011b). Οι μπακουλοϊοί, επίσης, είναι γνωστό ότι εκφράζουν miRNAs, ώστε να μειώσουν τα επίπεδά τους και, έτσι, να διαφύγουν της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Τέτοια είναι η περίπτωση στόχευσης του μεταγράφου της πρωτεΐνης πρόσδεσης του DNA P6.9 από το bmnpv-miR-3 (Singh et al., 2014), αλλά και του ODV-E25 από το AcMNPV-miR-1 (Zhu et al., 2013c).

Μία ακόμη στρατηγική του ιού για την καταπολέμηση της άμυνας του εντόμου-ξενιστή είναι η παραγωγή ιϊκών πρωτεϊνών που μπορούν να καταστρέφουν τα miRNAs του ξενιστή. Σε αυτό το πλαίσιο, ο ιός Poxvirus κωδικοποιεί μεταξύ άλλων μία πολυ-A-πολυμεράση, η οποία στην περίπτωση μόλυνσης των κυττάρων DL1 της *D. melanogaster* πολυαδενυλιώνει τα miRNAs του ξενιστή και τα οδηγεί προς αποδόμηση από τον ίδιο το μηχανισμό του ξενιστή. Αντίθετα, τα siRNAs που έχουν υποστεί 2'-O-μεθυλίωση προστατεύονται από αυτή τη διαδικασία (Backes et al., 2012).

Σύμφωνα με τα παραπάνω παραδείγματα των miRNAs που αφορούν αποκλειστικά DNA ιούς, φαίνεται να είναι ευρέως αποδεκτή η χρησιμότητά τους σε καίριες λειτουργίες, τόσο του ξενιστή, όσο και του ιού. Ωστόσο, η πλειοψηφία της δεύτερης μεγάλης κατηγορίας ιών που είναι οι RNA ιοί αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα, με ε-



Εικόνα 8 Οι αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή. Κατά τη διάρκεια μίας ιϊκής μόλυνσης ενεργοποιούνται πλήθος στρατηγικών τόσο από τον ιό, όσο και από τον ξενιστή, προς όφελος της κάθε πλευράς. Ένας ιός μπορεί να παράγει VSRs, οι οποίοι μπλοκάρουν τον RNAi μηχανισμό του ξενιστή. Ακόμη, μέσω της παραγωγής ιϊκών miRNAs μπορεί να μπλοκάρει τη μετάφραση ιϊκών mRNAs για την εγκαθίδρυση εμμένουσας μόλυνσης ή των mRNAs του ξενιστή ώστε να ευνοήσει τον πολλαπλασιασμό του. Επίσης, μέσω παραγωγής ιϊκών πρωτεϊνών μπορεί να εμποδίσει τη λειτουργία των σηματοδοτικών μονοπατιών της φυσικής ανοσίας και άρα την έκκριση αντιϊκών παραγόντων. Από την πλευρά του ο ξενιστής αναγνωρίζει ιϊκούς παράγοντες που οδηγούν σε ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας, ενώ μέσω των μονοπατιών siRNA και miRNA παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των ιϊκών μορφών dsRNA (Προσαρμογή από Fullaondo and Lee, 2012).

ξαιρέσεις τους ιούς των οικογενειών *Retroviridae* και *Orthomyxoviridae* (Cullen, 2011; de Faria et al., 2013). Σαν αποτέλεσμα, μέχρι πρόσφατα, ήταν λίγες οι πληροφορίες που υπήρχαν αναφορικά με τους RNA ιούς ως προς τη δυνατότητά τους να κωδικοποιούν και να εκφράζουν miRNAs. Άλλωστε, οι κυτταροπλασματικοί RNA ιοί δεν αναμένεται να κωδικοποιούν miRNAs, καθώς ναι μεν αυτοί πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο η επεξεργασία των πρόδρομων miRNAs (pri-miRNAs) κανονικά γίνεται από το σύμπλοκο Drosha/Pasha που εδράζεται στον πυρήνα του ξενιστή (Cullen, 2011; Swevers et al., 2013b; Vodovar and Saleh, 2012).

Πρόσφατα δείχθηκε πως οι κυτταροπλασματικοί RNA ιοί μπορούν να εκφράζουν με αποτελεσματικότητα miRNAs, ούτως ώστε τα ρυθμιστικά αυτά μόρια να τροποποιούν

τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφώματος (Rouha et al., 2010). Για παράδειγμα, όταν η αλληλουχία του miR-BART2 του ιού Epstein-Barr (EBV) εισήχθη στο γονιδίωμα του RNA ιού της εγκεφαλίτιδας από κρότωνες TBEV (Tick-Borne Encephalitis Virus) της οικογένειας *Flaviviridae*, το miRNA που παρήχθη ήταν λειτουργικό και δεν επηρέασε τα επίπεδα του ιού TBEV (Rouha et al., 2010). Ωστόσο, αμφισβητήθηκε η ύπαρξη μηχανισμού βιογένεσης miRNAs στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας του μικρού αριθμού αντιγράφων του miR-BART2 που ανιχνεύθηκαν, και έτσι έγινε η υπόθεση πως το γονιδίωμα του TBEV είτε μεταφέρεται στον πυρήνα σε μικρό ποσοστό, είτε αποκτά πρόσβαση στη Drosha κατά τη φάση της μίτωσης όπου διαλύεται η πυρηνική μεμβράνη (Cullen, 2011). Στο παράδειγμα αυτό έρχονται να προστεθούν δύο ακόμα μελέτες, όπου κυτταροπλασματικοί ιοί με RNA γονιδίωμα θετικής (SINV) ή αρνητικής πολικότητας (Vesicular Stomatitis Virus, VSV) τροποποιήθηκαν ούτως ώστε να εκφράζουν επιτυχώς το ώριμο μόριο miR-124 (Langlois et al., 2012; Shapiro et al., 2010). Έτσι, η παράλληλη ανακάλυψη ότι η μόλυνση από ανασυνδυασμένους ιούς SINV οδηγεί σε ανακατανομή και μεταφορά στο κυτταρόπλασμα της πρωτεΐνης-κλειδιού του πυρηνικού συμπλόκου επεξεργασίας των πρόδρομων miRNAs, Drosha, αποτέλεσε την πρώτη ουσιαστική απόδειξη στο ερώτημα της ύπαρξης μηχανισμού επεξεργασίας των c-pri-miRNAs (Shapiro et al., 2012). Άλλωστε, σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές, κυτταροπλασματικοί RNA ιοί μπορούν να παράγουν ιϊκά μικρά RNAs (vsRNAs, viral small RNAs) και με αυτό τον τρόπο να αυτορρυθμίζουν τα επίπεδά τους (Weng et al., 2014; Zografidis et al., 2015).

1.3.3.2 Τα siRNAs

Η κατηγορία των siRNAs αποτελεί την καλύτερα μελετημένη ομάδα μικρών RNAs, καθώς είναι και η πιο άμεσα εμπλεκόμενη στην αλληλεπίδραση του ιού με τον ξενιστή του. Η τεχνολογία της αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) αποκάλυψε σημαντικές λεπτομέρειες σχετικά με την ταυτότητα αλλά και την προέλευση των μικρών RNAs που προκύπτουν μετά από μία μόλυνση.

Μία δομή που έχει τη μορφή dsRNA και λειτουργεί ως υπόστρωμα του ενζύμου Dcr2 μπορεί να υπάρξει μέσα σε ένα κύτταρο με πολλούς τρόπους (Bronkhorst and van Rij, 2014; Gammon and Mello, 2015; Sabin et al., 2013). Έτσι, η απλούστερη πηγή dsRNA

είναι το γονιδίωμα ενός dsRNA ιού, όπως έχει βρεθεί στην περίπτωση του εντόμου *Homalodisca vitripennis* μετά από μόλυνση με το ρεοϊό HoVRV (*Homalodisca vitripennis* Reovirus) (Nandety et al., 2013) ή του *B. mori* έπειτα από μόλυνση με τον ιό BmCPV (Zografidis et al., 2015). Μία δεύτερη περίπτωση είναι αυτή των dsRNA δομών που δημιουργούνται μέσω των ενδιάμεσων μορίων που προκύπτουν κατά την αντιγραφή ενός ssRNA ιού, όπως συμβαίνει με τον ιό SINV όταν μολύνει έντομα του γένους *Drosophila* (Marques et al., 2013). Επίσης, δομημένα στοιχεία μονόκλωνου RNA, όπως για παράδειγμα γονιδιώματα ή μετάγραφα, αποτελούν πιθανή πηγή ιϊκών siRNAs (Brackney et al., 2010), ή αλληλοεπικαλυπτόμενα ιϊκά μετάγραφα που σχηματίζουν υβρίδια ώστε να δημιουργούν dsRNA (Jayachandran et al., 2012). Σύμφωνα με τα παραπάνω, θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι, ανεξάρτητα από την προέλευσή του dsRNA, δημιουργούνται διαμορφώσεις μορίων αυτής της μορφής ως απόκριση του ξενιστή για την ενεργοποίηση του μηχανισμού του RNAi προς όφελός του (de Faria et al., 2013).

Πολλά είναι τα έντομα που αποτελούν πρότυπους οργανισμούς για τη μελέτη του siRNA μονοπατιού σε σχέση με μία ιϊκή μόλυνση. Μεταξύ αυτών ανήκει και η *Drosophila*, για την οποία έχει αποδειχθεί ποικιλοτρόπως ότι ο RNAi μηχανισμός συνιστά ισχυρή αντιϊκή στρατηγική. Έτσι, υπάρχουν γενετικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι σειρές κυττάρων ή έντομα που φέρουν μεταλλαγές σε γονίδια του RNAi μηχανισμού είναι πολύ ευπαθείς σε μολύνσεις από ιούς, ενώ το ιϊκό φορτίο που φέρουν είναι αυξημένο (Kemp and Imler, 2009). Ειδικότερα, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila* παρουσία μεταλλαγών στα γονίδια *ago2*, *dcr2* και *r2d2*, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία σε μολύνσεις από ιούς όπως οι DCV (*Drosophila* C Virus), CrPV (Cricket Paralysis Virus), FHV, SINV, VSV και IIV-6 (Invertebrate Iridescent Virus 6) (Galiana-Arnoux et al., 2006; Kemp et al., 2013; Mueller et al., 2010; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006). Παράλληλα, το εύρημα ότι τα τρία αυτά γονίδια ανήκουν στο 3% του γονιδιώματος της *Drosophila* που αντιπροσωπεύει τα πιο ταχέως εξελισσόμενα γονίδια, σε αντίθεση με άλλα γονίδια-κλειδιά του miRNA μονοπατιού, ενισχύει τη σημαντικότητα του ρόλου τους στην αντιϊκή άμυνα του εντόμου-ξενιστή (Obbard et al., 2006).

Ο εντοπισμός ιϊκών siRNAs (vsiRNAs) έπειτα από μία μόλυνση ενισχύει την άποψη ότι το μονοπάτι siRNA αποτελεί ισχυρό αντιϊκό μηχανισμό για τα έντομα (**Εικόνα 8**) (Kemp

and Imler, 2009). Για παράδειγμα, έπειτα από μόλυνση με τους αντίστοιχους ιούς έχουν ανιχνευθεί άφθονα vsiRNAs των ιών VSV και FHV στη *Drosophila*, των RVFV, SFV (Semliki Forest Virus) και ONNV (O'nyong-nyong Virus) στο κουνούπι (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus, A. gambiae*), και του HaSNPV σε προνύμφες *H. armigera* (Aliyari et al., 2008; Jayachandran et al., 2012; Myles et al., 2008; Sabin et al., 2013). Βέβαια, το προφίλ των vsiRNAs που ανιχνεύονται εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι το είδος ιού που προκαλεί τη μόλυνση, το είδος του ξενιστή, καθώς και από την παρουσία ή όχι κάποιου καταστολέα του RNAi μηχανισμού (Vijayendran et al., 2013).

Σε πολλούς ιούς που προσβάλλουν τα έντομα έχουν ανιχνευτεί ιϊκές πρωτεΐνες που δρουν ως καταστολείς του RNAi μηχανισμού (VSRs) και, λόγω της παρεμπόδισης κυρίως του μονοπατιού siRNA (αλλά ενίοτε και του miRNA), ευνοείται ο πολλαπλασιασμός του ιού (Marques and Carthew, 2007). Προκειμένου για τη *Drosophila*, η πιο γνωστή περίπτωση VSR είναι αυτή της πρωτεΐνης B2 του ιού FHV, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται τόσο σε μεγάλου μήκους μόρια dsRNA και σε siRNA, όσο και στη Dcr2, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη βιογένεση των siRNAs, αλλά και την ενσωμάτωσή τους στο σύμπλοκο Ago2/RISC (Li et al., 2002; Qi et al., 2012). Μία άλλη πρωτεΐνη γνωστή για τη δράση της ως VSR είναι η 1A που κωδικοποιείται από τον ιό DCV, και η οποία δεσμεύει μόρια dsRNA μεγάλου μήκους ή και siRNA εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση της Dcr2 (Nayak et al., 2010; van Rij et al., 2006). Προκειμένου για την πρωτεΐνη 1A του CrPV, η παρεμποδιστική της δράση ως προς τον RNAi μηχανισμό διαφοροποιείται, καθώς αυτή αναστέλλει την ενδονουκλεολυτική δράση της Ago2 (Nayak et al., 2010; van Mierlo et al., 2012; Wang et al., 2006).

Εκτός των VSRs, μία άλλη στρατηγική που πιστεύεται ότι εφαρμόζεται από τους ιούς ώστε να παραπλανήσουν την άμυνα του ξενιστή είναι η υπερπαραγωγή vsiRNAs με σκοπό αυτά να λειτουργήσουν ως «δόλωμα» (ή αλλιώς «σφουγγάρι») για τον RNAi μηχανισμό (Blair and Olson, 2015; Charley and Wilusz, 2014; Swevers et al., 2013b; Vijayendran et al., 2013). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, ένας ιός μπορεί να αποπροσανατολίσει τον RNAi μηχανισμό του ξενιστή παράγοντας vsiRNAs τα οποία προκύπτουν από ιϊκά RNAs που υπάρχουν σε αφθονία, ώστε να διαφυλάξει την ακεραιότητα των λιγότερο άφθονων και κρίσιμων για τον πολλαπλασιασμό του ϊκών RNA (Gammon and Mello, 2015). Έτσι, παρατηρείται η παραγωγή vsiRNAs από τις περιοχές του ιϊκού γονιδιώματος που ονομάζονται «hot spots», οι οποίες

χαρακτηριστικά αποτελούν στόχο προς καταστολή από τον RNAi μηχανισμό σε υψηλά ποσοστά σε αντίθεση με τις «cold spot» περιοχές που στοχεύονται σπανιότερα (Vijayendran et al., 2013). Στην περίπτωση μόλυνσης του *H. vitripennis* με τον ιό HoVRV, αυτό το φαινόμενο παρατηρείται έκδηλα, ενώ είναι έντονο κυρίως στις 5’ και 3’ UTR περιοχές τεσσάρων από τα δώδεκα τμήματα του ιϊκού γονιδιώματος, γεγονός το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί λόγω της χαρακτηριστικής δομής που μοιάζει με «χέρι τηγανιού» (panhandle) και χαρακτηρίζει τα άκρα των mRNA της οικογένειας των ιών *Reoviridae* (Nandety et al., 2013). Αντίστοιχη θεωρείται και η περίπτωση μόλυνσης δύο κυτταροσειρών κουνουπιού με τον ιό SFV, όπου πιθανολογείται ότι οι «hot spot» περιοχές που ανιχνεύονται μέσω αλληλούχισης νέας γενιάς είναι πιο εύκολα προσβάσιμες από τη Dcr2 και με αυτό τον τρόπο ο ιός εξοικονομεί χρόνο ούτως ώστε να προλάβει να πολλαπλασιαστεί ενόσω ο RNAi μηχανισμός είναι απασχολημένος με την παραγωγή των vsiRNA δολωμάτων (Siu et al., 2011). Ωστόσο, στην περίπτωση μόλυνσης του *B. mori* από τον ιό BmCPV δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην αποσιωπητική ικανότητα μεταξύ siRNAs που προέκυψαν από αλληλουχίες χαρακτηρισμένες ως «hot spots» ή «cold spots» (Zografidis et al., 2015). Στα πλαίσια του ίδιου μηχανισμού, πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι οι περιοχές των αποκαλούμενων ατελών παρεμβαλλόμενων σωματίων (defective interfering particles, DIPs) του ιού VSV, καθώς και το τμήμα της ενδογονιδιακής φουρκέτας S του ιού RVFV, αποτελούν κυρίαρχο στόχο για την παραγωγή vsiRNAs (Sabin et al., 2013). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ιοί που εφαρμόζουν τέτοιες τακτικές ως προς τον ξενιστή τους είναι πιθανώς εκείνοι που δε διαθέτουν VSRs, αν και δεν αποκλείεται ο μηχανισμός αυτός να δρα συνεργιστικά με κάποιον VSR (Vijayendran et al., 2013).

Η συσσώρευση μεταλλαγών στο γονιδίωμα ενός ιού θεωρείται ως ένας ακόμη τρόπος που μεταχειρίζονται οι ιοί ώστε να αντιπαρέλθουν την άμυνα που προσφέρει ο RNAi μηχανισμός στον ξενιστή τον οποίον προσβάλλουν (Vodovar and Saleh, 2012). Άλλωστε, το γεγονός ότι οι RdRps των RNA ιών στερούνται της ικανότητας να διορθώνουν λάθη που συμβαίνουν κατά τον πολυμερισμό έχει ως αποτέλεσμα το φαινόμενο της συσσώρευσης μεταλλαγών να είναι πολύ συχνό (Vodovar and Saleh, 2012). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη μόλυνσης του κουνουπιού *Culex pipiens quinquefasciatus* από τον ιό WNV, όπου ενόσω εξελισσόταν η μόλυνση παρατηρήθηκε αύξηση της ιϊκής ποικιλομορφίας, ενώ αυτή καταγράφηκε ως

εντονότερη στις περιοχές που αποτελούσαν πιο συχνά στόχο του RNAi (hot spots) (Brackney et al., 2009). Συνεπώς, ενδεχομένως ο μηχανισμός του RNAi του ξενιστή να προάγει την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ιών μέσω μηχανισμών επιλεκτικής πίεσης (Vijayendran et al., 2013; Vodovar and Saleh, 2012).

1.3.3.3 Τα piRNAs

Η ισχυρή παρουσία του piRNA μονοπατιού στις γονάδες έχει επιβεβαιωθεί ότι σχετίζεται με τον έλεγχο των μεταθετών γενετικών στοιχείων και τη διαφύλαξη της ακεραιότητας του γονιδιώματος στη γαμετική σειρά (Vodovar et al., 2012; Weick and Miska, 2014). Ωστόσο, ήδη εδώ και αρκετά χρόνια έχει προστεθεί ένας επιπλέον ρόλος των piRNAs στα κουνούπια που αφορά στην αντιϊκή προστασία. Για παράδειγμα, σε κύτταρα του κουνουπιού *Ae. aegypti*, τα επίπεδα αντιγραφής του ιού SFV έπειτα από αποσιώπηση της πρωτεΐνης Piwi4 ήταν αυξημένα (Schnettler et al., 2013a), ενώ οι πρωτεΐνες Piwi5 και Ago3 αποδείχθηκαν απαραίτητες για την παραγωγή piRNAs του ιού SINV (Miesen et al., 2015). Επιπλέον, η ανάλυση του γονιδιώματος του *Ae. aegypti* έδειξε ότι οκτώ από τα τριάντα πιο άφθονα piRNA γονίδια που ανιχνεύονται είναι ιϊκής προέλευσης (Arensburger et al., 2011). Τέλος, αναφορικά με την πρωτεΐνη Ago3 στο κουνούπι *A. gambiae*, έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για τη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω μορίων dsRNA, ενώ η ίδια πρωτεΐνη σχετίζεται και με την άμυνα έναντι του ιού ONNV (Hoa et al., 2003; Keene et al., 2004).

Ο αντιϊκός ρόλος του piRNA μονοπατιού στα κύτταρα της γαμετικής σειράς, ενδεχομένως, να συνίσταται στην παρεμπόδιση της κάθετης μεταφοράς ιών που μολύνουν τα αρθρόποδα στις επόμενες γενιές διαμέσου των γονάδων ή στον περιορισμό της ιϊκής αντιγραφής στα αναπτυσσόμενα έμβρυα (Schnettler et al., 2013a; Vodovar et al., 2012). Παράλληλα, στα σωματικά κύτταρα το piRNA φαίνεται να θεωρείται ως ενδογενές συστατικό της αντιϊκής απόκρισης των εντόμων με τρόπο που να επηρεάζεται ο ιϊκός πολλαπλασιασμός (Vodovar et al., 2012).

Συχνά σε μελέτες ανιχνεύονται piRNAs ιϊκής προέλευσης, όπως για παράδειγμα συμβαίνει σε κουνούπια *Ae. aegypti* μολυσμένα με τον ιό DENV (Dengue virus) (Hess et al., 2011). Επίσης, σε αρκετές περιπτώσεις έχει προσδιοριστεί ότι τα piRNAs που εντοπίζονται αντιστοιχούν τόσο σε πρωτογενή όσο και σε δευτερογενή ιϊκά piRNAs.

Έτσι, piRNAs με τις υπογραφές 1U και 10A ανιχνεύονται σε κύτταρα κουνουπιού *Ae. albopictus* και *Ae. aegypti* έπειτα από μόλυνση με (+) ή (-)-ssRNA ιούς, όπως είναι ο SINV και ο LACV (La Crosse Virus), αντίστοιχα (Vodovar et al., 2012), ή με τον RVFV του οποίου το γονιδίωμα είναι τριμερές (-)/αμφιπολικό RNA (Leger et al., 2013). Παράλληλα, πρωτογενή (1U) και δευτερογενή (10A) piRNAs έχουν ανιχνευθεί και σε σωματικούς ιστούς *Ae. albopictus* μολυσμένους με τον ιό CHIKV (Chikungunya Virus) (Morazzani et al., 2012).

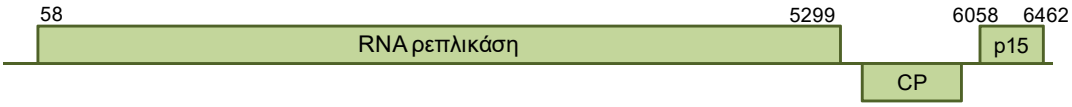
Εκτός από τα κουνούπια, στη *Drosophila* ή σε άλλα έντομα δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν υπάρχει και σε τι συνίσταται ο ρόλος του piRNA μονοπατιού σε σχέση με την αντιϊκή προστασία. Έτσι, έχει δειχθεί ότι μύγες *D. melanogaster* που έφεραν μεταλλαγές ως προς τα γονίδια *piwi* και *aub* παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία στη μόλυνση από τους ιούς DXV (*Drosophila* X virus) και WNV (Chotkowski et al., 2008; Zambon et al., 2006). Ακόμη, τα κύτταρα OSS (ovary somatic sheet) της *Drosophila* παράγουν piRNAs που προέρχονται από ενδογενείς ιούς, τα οποία φέρουν τη χαρακτηριστική υπογραφή ουριδίνης στο 1° νουκλεοτίδιο (1U), δηλαδή είναι αποκλειστικά πρωτογενή (Wu et al., 2010).

Η αλληλεπίδραση των μονοπατιών piRNA και exo-siRNA σε μία ιϊκή μόλυνση είναι σημαντική, και φαίνεται ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό τόσο από το είδος ιού και ξενιστή, όσο και από τη λειτουργικότητα των γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi (Blair and Olson, 2015). Έτσι, υπάρχουν ενδείξεις ότι το piRNA δρα συμπληρωματικά ως προς το exo-siRNA ή αντισταθμιστικά σε περίπτωση που το exo-siRNA εμφανίζεται ελαττωματικό, ενώ ενδέχεται να παίζει και ρυθμιστικό ρόλο σε μία εμμένουσα ιϊκή μόλυνση (Blair and Olson, 2015).

1.3.4 Ιοί που θα μελετηθούν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή

1.3.4.1 Οι ιοί του γένους *Maculavirus* και ο ιός BmMLV (*Bombyx mori* Macula-like Virus)

Η οικογένεια *Tymoviridae* περιλαμβάνει ιούς που μολύνουν φυτά και αποτελείται από τα γένη *Tymovirus*, *Marafivirus* και *Maculavirus.* Το γονιδίωμά τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας με μέγεθος από 6.0 έως 7.5 kb, το οποίο διαθέτει



Εικόνα 9 Η δομή του RNA γονιδιώματος του ιού BmMLV. Το γονιδίωμα του BmMLV απαρτίζεται από 3 ORFs: μία RdRp (RNA ρεπλικάση), μία πρωτεΐνη καψιδίου (CP) και ένα πολυπεπτίδιο αγνώστου λειτουργίας (p15) (Προσαρμογή από Katsuma et al., 2005).

κάλυμμα στο 5' άκρο του. Συνήθως, τα γένη *Tymovirus* και *Maculavirus* μολύνουν δικοτυλήδονα φυτά, ενώ το *Marafivirus* προσβάλλει φυτά που ανήκουν στην οικογένεια *Poaceae* (Martelli et al., 2002). Ωστόσο, διάφορα έντομα διευκολύνουν τη μετάδοση των ιών αυτών λειτουργώντας ως φορείς. Πιο συγκεκριμένα, ιοί των γενών *Tymovirus* και *Marafivirus* μεταδίδονται με τη βοήθεια Κολεόπτερων και Ημίπτερων αντίστοιχα, ενώ για το γένος *Maculavirus* δεν υπάρχουν επιβεβαιωμένα έντομα-φορείς (Martelli et al., 2002; Wang et al., 2012).

Οι ιοί της οικογένειας *Tymoviridae* δυνητικά μπορούν να πολλαπλασιάζονται τόσο σε φυτά όσο και σε έντομα (Katsuma et al., 2005). Συγκεκριμένα, μόνο στο γένος *Maculavirus* έχουν ήδη ταυτοποιηθεί τρεις ιοί που μολύνουν και πιθανότατα πολλαπλασιάζονται μέσα σε έντομα-ξενιστές. Σε αυτούς ανήκει ο ιός BmMLV του μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori* Macula-like Virus), ο ιός CuTLV του κουνουπιού *Culex* spp. (*Culex* Tymoviridae-like Virus), και ο ιός BeeMLV της μέλισσας *A. mellifera* και του παρασίτου της *V. destructor* (Bee Macula-like Virus) (de Miranda et al., 2015; Katsuma et al., 2005; Wang et al., 2012).

Το γένος *Maculavirus* διαθέτει 4 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), από τα οποία το ORF1 κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντιγραφή, καθώς διαθέτει μοτίβα μεθυλ-τρανσφεράσης, ελικάσης και RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp), και μία περιοχή πρωτεάσης papain-like. Το ORF2 κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του καψιδίου (coat protein, CP), ενώ τα ORFs 3 και 4 κωδικοποιούν για δύο μικρότερες πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη. Επίσης, οι ιοί του γένους *Macula* φέρουν πολυαδενυλίωση στο 3' άκρο του γονιδιώματός τους. Ο ιός που χαρακτηρίζει το γένος είναι ο GFkV (*Grapevine Fleck Virus*), ο οποίος μολύνει είδη του γένους *Vitis* sp. (Martelli et al., 2002).

Προκειμένου για τον BmMLV (**Εικόνα 9**), το γονιδίωμά του έχει μέγεθος 6,513 bp και περιλαμβάνει 3 ORFs. Οι τρεις πιθανές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τον BmMLV

είναι μία RdRp (ρεπλικάση), μία πρωτεΐνη καψιδίου (CP) και ένα πολυπεπτίδιο άγνωστης λειτουργίας (p15 ή gp3) (Iwanaga et al., 2012). Αν και ο BmMLV δεν είναι ενσωματωμένος στο γονιδίωμα του *B. mori*, ωστόσο παρατηρούνται σφαιρικά ιϊκά σωμάτια στα μολυσμένα κύτταρα και η μόλυνση μπορεί να μεταφέρεται κάθετα από γενιά σε γενιά (Iwanaga et al., 2012; Katsuma et al., 2005).

1.3.4.2 Οι ιοί του γένους *Cypovirus* και ο ιός BmCPV (*Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus)

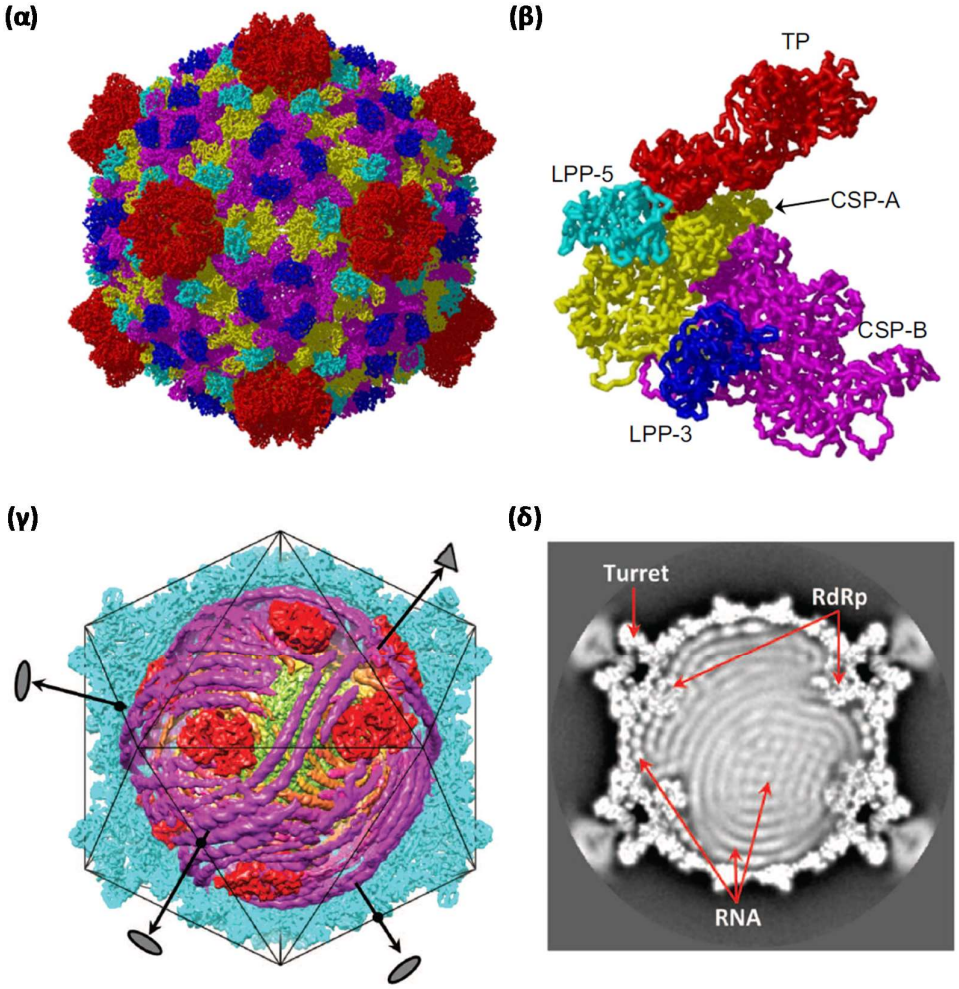
Ο BmCPV ανήκει στο γένος *Cypovirus* της οικογένειας *Reoviridae* (Mertens et al., 2004) και μαζί με τους υπόλοιπους CPVs αποτελούν τη δεύτερη βασική ομάδα παθογόνων ιών των εντόμων (Van Regenmortel et al., 2000a; van Regenmortel et al., 2000b). Η οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από ιούς που διαθέτουν γονιδίωμα αποτελούμενο από διακριτά γραμμικά τμήματα μορίων dsRNA (10-12) (Mori and Metcalf, 2010; Rubinstein et al., 1976). Χαρακτηριστικές μολυσματικές δομές αυτής της κατηγορίας ιών είναι τα πολύεδρα, τα οποία είναι κρυσταλλικά έγκλειστα σωμάτια (occlusion bodies) που περιέχουν χιλιάδες ιϊκών σωματίων (Mori and Metcalf, 2010).

Οι ιοί του γένους *Cypovirus* συντίθενται μέσα σε συγκεντρικές εικοσαεδρικές συμμετρικές στρώσεις πρωτεϊνών, οι οποίες οργανώνονται σε έναν έως τρεις φλοιούς που περιέχουν τα τμήματα του dsRNA (Mori and Metcalf, 2010). Η κάθε εικοσαεδρική υπομονάδα του ιού αποτελείται από δύο μόρια VP1 (CSP-A και CSP-B, capsid shell protein), δύο μόρια VP7 (LPP-3 και LPP-5, large protrusion protein) και ένα μόριο VP3 (TP, turret protein). Εξήντα τέτοιες εικοσαεδρικές υπομονάδες σε συνδυασμό με στοιχεία που δε διαθέτουν παρόμοια συμμετρία (όπως μόρια dsRNA και ινώδη μόρια «A spike») διαμορφώνουν το ιϊκό σωμάτιο (**Εικόνα 10**) (Yu et al., 2008; Yu et al., 2011).

Ο ιός του μεταξοσκώληκα BmCPV διαθέτει 10 τμήματα dsRNA στο γονιδίωμά του, με μεγέθη που κυμαίνονται από 4,190 βάσεις (S1) έως 944 βάσεις (S10) (Hagiwara et al., 2002), το καθένα από τα οποία κωδικοποιεί για μία διαφορετική πρωτεΐνη. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι έξι δομικές πρωτεΐνες του ιϊκού σωματίου (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 και VP7), τρεις μη-δομικές πρωτεΐνες (NSP5, NSP8, NSP9) και η πολυεδρίνη (Hagiwara et al., 2002). Η VP2 προκύπτει από το S2 και αντιστοιχεί σε μία RdRp, η οποία μεταγράφει (-) μόρια γονιδιωματικού RNA για να συνθέσει (+) μόρια RNA (ιϊκά mRNAs), που στη

συνέχεια ωριμάζουν στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζονται. Έπειτα, για τη συναρμολόγηση του ώριμου ιϊκού σωματίου, τα (+) RNAs εισάγονται στο καψίδιο και χρησιμοποιούνται ως μήτρα από την RdRp για τη σύνθεση της (-) αλυσίδας RNA, ώστε να δημιουργηθεί το γονιδιωματικό ιϊκό dsRNA (**Εικόνα 10**) (Liu and Cheng, 2015; Mertens, 2004; Mori and Metcalf, 2010; Yang et al., 2014c).

Τα πολύεδρα, μέσα στα οποία περιέχονται τα ιϊκά σωμάτια, είναι πολύ ανθεκτικές δομές που είναι κατασκευασμένες από την πρωτεΐνη πολυεδρίνη του ιού. Η πολυεδρίνη κωδικοποιείται από το μικρότερο τμήμα dsRNA του γονιδιώματος (S10) (Ikeda et al.,



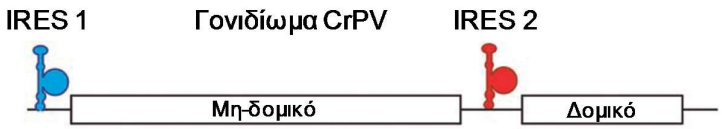
Εικόνα 10 Το ιϊκό σωμάτιο του ιού BmCPV. (α) Ατομικό μοντέλο του ιϊκού σωματίου (καψιδίου) του BmCPV. (β) Μη-συμμετρική υπομονάδα, η οποία επαναλαμβάνεται 60 φορές ώστε να παραχθεί ολόκληρο το ιϊκό σωμάτιο. (γ) Εικοσαεδρική δομή του ιϊκού σωματίου, μέσα στο οποίο περιλαμβάνονται το γονιδιωματικό dsRNA (μωβ χρώμα) και οι πρωτεΐνες RdRp (κόκκινο χρώμα). (δ) Τομή του ιϊκού σωματίου, όπου διακρίνονται μόρια RNA και πρωτεϊνών (RdRp και Turret) (Πηγές: Liu and Cheng, 2015; Yu et al., 2011).

1998). Η ανθεκτικότητα των πολυέδρων διευκολύνει την επιβίωση του ιού σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η σταθερότητα και η βιωσιμότητα των ιϊκών σωματίων για μακρά χρονικά διαστήματα (Mori and Metcalf, 2010). Επιπλέον, η ιδιότητα των πολυέδρων να παραμένουν αδιάλυτα σε τιμές pH μικρότερες του 10.5, εγγυάται την απελευθέρωση του ιού μόνο στο κατάλληλο περιβάλλον όπου επικρατούν συνθήκες κατάλληλης οξύτητας, δηλαδή στο αλκαλικό περιβάλλον του μεσεντέρου των προνυμφών. Έτσι, μόνο έπειτα από κατάποση μολυσμένης τροφής, ο ιός απελευθερώνεται στο εσωτερικό του μεσεντέρου και μολύνει τα επιθηλιακά κύτταρα που αποτελούν τον κύριο στόχο του. Επικουρικά βέβαια δρουν και οι αλκαλικές πρωτεϊνάσες του μεσεντέρου, οι οποίες αποδομούν περαιτέρω την πολυεδρίνη (Coulibaly et al., 2007).

Αφού προσβάλει τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου, ο ιός προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη των ζώων, δηλαδή στην περίοδο που διαρκεί έως τη μεταμόρφωση (Wu et al., 2011a). Χαρακτηριστικό σύμπτωμα των προνυμφών μεταξοσκώληκα που νοσούν από τον BmCPV είναι οι λευκές ρυτίδες που εμφανίζονται στο τελευταίο τμήμα του μεσεντέρου, ενώ τα θηλυκά που έχουν νοσήσει παράγουν λιγότερα αυγά σε σχέση με τα υγιή ζώα (Wu et al., 2011a). Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, μοναδικό στόχο του BmCPV αποτελούν τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου του μεταξοσκώληκα (Wu et al., 2011a). Έτσι, προνύμφες που μολύνονται στο 2^{ο} στάδιο έκδυσης αποκτούν τη νόσο στο 3^{ο} ή το 4^{ο} στάδιο, ενώ εάν αυτές μολυνθούν στο 5^{ο} στάδιο μπορούν να σχηματίσουν κουκούλια και να γίνουν νύμφες με επιτυχία (Wu et al., 2011a).

1.3.4.3 Οι ιοί της οικογένειας *Dicistroviridae* και ο ιός CrPV (Cricket Paralysis Virus)

Η οικογένεια *Dicistroviridae* αποτελείται από RNA ιούς και πήρε το όνομά της από το γεγονός ότι περιέχει 2 ORFs ή αλλιώς 2 κιστρόνια (cistrons) (Bonning and Miller, 2010). Τα μέλη της οικογένειας *Dicistroviridae* μπορούν να μολύνουν ωφέλιμα αρθρόποδα, όπως είναι οι μέλισσες και οι γαρίδες, αλλά και επιβλαβή παράσιτα γεωπονικού ή ιατρικού ενδιαφέροντος, όπως το *Trypanosoma cruzi* (Bonning and Miller, 2010; Kerr et al., 2015). Τα γένη που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι το *Cripavirus* και το *Aparavirus* (Bonning and Miller, 2010). Ο ιός CrPV (Cricket Paralysis Virus) ανήκει στο



Εικόνα 11 Η δομή του RNA γονιδιώματος του ιού CrPV. Το γονιδίωμα του CrPV απαρτίζεται από 2 ORFs, τα ORF1 και ORF2 που κωδικοποιούν για μη-δομικές και δομικές πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Επιπλέον, περιλαμβάνει και δύο ρυθμιστικές περιοχές της μετάφρασης, IRES 1 και IRES 2 (Προσαρμογή από Nayak et al., 2010).

πρώτο γένος, και, αν και αρχικά απομονώθηκε από το γρύλλο (cricket), διαθέτει μία ευρεία ποικιλία ξενιστών καθώς μολύνει έντομα διαφόρων τάξεων (Δίπτερα, Ημίπτερα, Υμενόπτερα, Λεπιδόπτερα και Ορθόπτερα), ενώ πολλαπλασιάζεται επιπλέον και σε κυτταροκαλλιέργειες εντόμων όπως της *Drosophila* (Bonning and Miller, 2010; Wilson et al., 2000).

Το γονιδίωμα του CrPV είναι ένα μόριο (+)-RNA που αποτελείται από δύο διακριτά ORFs (**Εικόνα 11**). Τα ORF1 και ORF2 κωδικοποιούν για μη-δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή και δομικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου, αντίστοιχα (Nayak et al., 2010). Είναι γνωστό ότι όλοι οι ιοί της ίδιας κατηγορίας (picorna-like ιοί) παράγουν τις δομικές πρωτεΐνες σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις μη-δομικές, και άρα παρόλο που κωδικοποιούνται από το ίδιο mRNA, είναι πιθανό σε μεταφραστικό επίπεδο να ρυθμίζονται ανεξάρτητα (Moore et al., 1981; Wilson et al., 2000). Πράγματι, κάθε μία από τις πολυπρωτεΐνες του CrPV υφίσταται διαφορικό έλεγχο έκφρασης μέσω ξεχωριστής εσωτερικής θέσης πρόσβασης του ριβοσώματος (IRES, internal ribosome entry site) που προηγείται του εκάστοτε ORF και δρα ρυθμιστικά ως προς την έναρξη της μετάφρασης (Wilson et al., 2000).

Ο RNAi μηχανισμός ενός εντόμου-ξενιστή που μολύνεται από τον ιό CrPV έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τα ιϊκά επίπεδα, όπως περιγράφηκε νωρίτερα (§1.3.3.2). Από την πλευρά του, ο ιός CrPV φαίνεται ότι έχει εξελιχθεί έτσι ώστε να μπορεί να αντιμετωπίζει τον RNAi μηχανισμό του ξενιστή του, καθώς εκφράζει την πρωτεΐνη 1A που κωδικοποιείται από το ORF1 και διαθέτει παρεμποδιστική δράση έναντι της Ago2, τόσο στα πλαίσια του κλασικού μονοπατιού siRNA (§1.3.3.2), όσο στην αποσιώπηση μέσω miRNAs στη *Drosophila* (Besnard-Guerin et al., 2015).

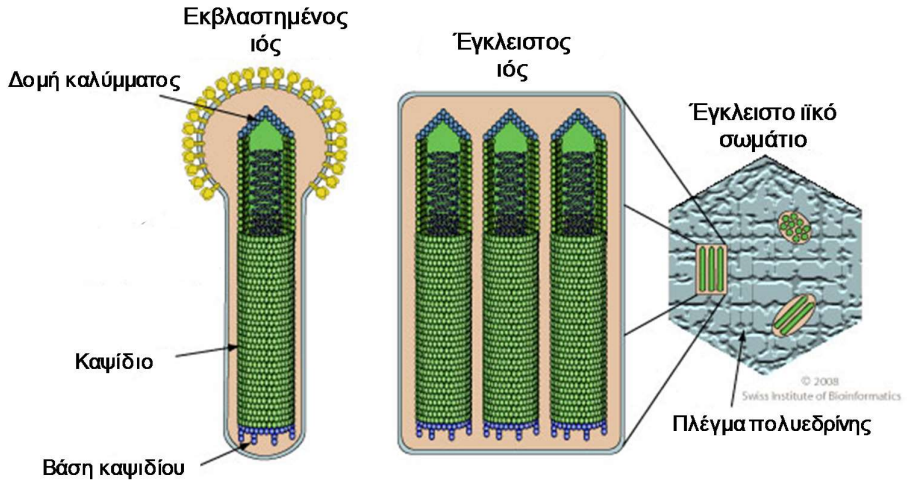
Εκτός από το RNAi, φαίνεται ότι στη *Drosophila* ενεργοποιείται και το μονοπάτι Jak/STAT της φυσικής ανοσίας (Kingsolver et al., 2013). Συγκεκριμένα, μύγες που

έφεραν μεταλλαγή για το γονίδιο *hop* αποδείχθηκαν πιο ευπαθείς σε μόλυνση από τον CrPV και επέδειξαν αυξημένους ιϊκούς τίτλους. Παράλληλα, παρατηρήθηκε αυξορρύθμιση των γονιδίων *upd2* και *upd3*, που κωδικοποιούν για κυτοκίνες-ενεργοποιητές του μονοπατιού Jak/STAT, και του *vir-1*, του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται από το ίδιο μονοπάτι (Kemp et al., 2013).

1.3.4.4 Οι μπακουλοϊοί και ο ιός AcMNPV (*Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus)

Οι μπακουλοϊοί είναι μία ευρεία κατηγορία ιών που χαρακτηρίζονται από γονιδίωμα DNA κυκλικής μορφής και μεγέθους 80 έως 180 kb, το οποίο είναι πακεταρισμένο μέσα σε ραβδόμορφα ιϊκά σωμάτια διαστάσεων 200x30 μM (Rohrmann, 2013). Οι ιοί αυτοί πολλαπλασιάζονται μόνο εντός των εντόμων και περικλείονται μέσα σε έναν μεμβρανώδη φάκελο, ενώ διαθέτουν δύο μολυσματικές μορφές (Fay and Pante, 2015). Συγκεκριμένα, οι μπακουλοϊοί μπορούν έχουν μορφή είτε έγκλειστου ιϊκού σωμάτιου (occlusion-derived virion, ODV), είτε εκβλαστημένου ιϊκού σωμάτιου (budded virus, BV) (**Εικόνα 12**). Στην περίπτωση των ODVs, τα ιϊκά σωμάτια περιβάλλονται από μία πρωτεϊνική μήτρα (πολυεδρίνη) σε ιδιαίτερα ανθεκτικές δομές που ονομάζονται πολύεδρα (Rohrmann, 2013), ενώ τα BVs αποτελούνται από το καψίδιο που περιέχει το ιϊκό γονιδίωμα και ταυτόχρονα περιβάλλονται από έναν μεμβρανικό φάκελο που προκύπτει από εκβλάστηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Fay and Pante, 2015; Shi et al., 2015). Τα ODVs ευθύνονται για τη μετάδοση του ιού από προνύμφη σε προνύμφη, ενώ στα BVs οφείλεται η μετάδοση από κύτταρο σε κύτταρο μέσα σε ένα έντομο ή σε μία κυτταροκαλλιέργεια (Fay and Pante, 2015). Ανάλογα με τον αριθμό των υπαρχόντων νουκλεοκαψιδίων μέσα στο φάκελο του ODV, οι μπακουλοϊοί διακρίνονται σε μονούς (απλούς) (Single Nucleopolyhedroviruses, SNPVs) ή σε πολλαπλούς πυρηνικούς πολυεδρικούς ιούς (Multiple Nucleopolyhedroviruses, MNPVs) (Shi et al., 2015).

Ο ιός *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο μπακουλοϊό και διαθέτει γονιδίωμα μεγέθους 134 kb, το οποίο κωδικοποιεί για τουλάχιστον 156 ORFs (Ayres et al., 1994). Η μόλυνση με τον AcMNPV στα κύτταρα Λεπιδοπτέρων είναι γνωστό ότι ευθύνεται για τη διαφορική έκ-



Εικόνα 12 Οι μολυσματικές μορφές ενός μπακουλοϊού. Οι μπακουλοϊοί υπάρχουν στη φύση ως καψίδια είτε μέσα σε έγκλειστα ιϊκά σωμάτια (ODVs), είτε ως εκβλαστημένα ιϊκά σωμάτια (BV). Τα έγκλειστα ιϊκά σωμάτια περιβάλλονται από την πρωτεϊνική μήτρα της πολυεδρίνης και εμπεριέχονται στα πολύεδρα. Τα BVs περιβάλλονται από έναν μεμβρανικό φάκελο που προκύπτει από εκβλάστηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Προσαρμογή από viralzone.expasy.org).

φραση σε επίπεδο μεταγραφώματος (Chen et al., 2014b; Nobiron et al., 2003; Salem et al., 2011), αλλά και πρωτεώματος του ξενιστή (Carinhas et al., 2011; Popham et al., 2010).

Επιπλέον, και σε επίπεδο miRNA, έχει βρεθεί ότι η μόλυνση προκαλεί μεταβολές στην έκφραση των miRNAs του ξενιστή, ιδιαίτερα μετά την παρέλευση 72 ωρών από την έναρξη της μόλυνσης (Mehrabadi et al., 2013). Παράλληλα, πολλά ιϊκά vsiRNAs παράγονται μέσω του RNAi μηχανισμού του κυττάρου με στόχο την αντιϊκή προστασία του ξενιστή και πιθανώς την αυτορρύθμιση των επιπέδων του ιού AcMNPV (Mehrabadi et al., 2015). Εκτός από τον ξενιστή, όμως, η μόλυνση προκαλεί μεταβολές συν τω χρόνω και στα επίπεδα των ιϊκών μεταγράφων προς όφελος του ιού (Chen et al., 2013c). Οι μεταβολές αυτές πιθανώς σχετίζονται με την έκφραση ιϊκών miRNAs, τα οποία έχουν την ικανότητα να αυτορρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων ιϊκών ή, κατά περίπτωση, και κυτταρικών γονιδίων (Singh et al., 2010; Zhu et al., 2013c).

Στα Λεπιδόπτερα έντομα, κατόπιν μόλυνσης με έναν μπακουλοϊό ο ξενιστής ενεργοποιεί μηχανισμούς φυσικής ανοσίας που συνίστανται στην ολοκληρωτική διακοπή των διεργασιών που σχετίζονται με την πρωτεϊνοσύνθεση και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης. Προκειμένου να αναστείλουν την

επαγωγή απόπτωσης, οι μπακουλοϊοί κωδικοποιούν παράγοντες, όπως οι πρωτεΐνες p35 και iaps, οι οποίοι παρεμποδίζουν την ενδοκυτταρική αντιϊκή απόκριση του ξενιστή και δρουν ως αναστολείς της απόπτωσης (Ikeda et al., 2013). Ωστόσο, πρόσφατα ταυτοποιήθηκε για την p35 του AcMNPV ένας δεύτερος και ανεξάρτητος της απόπτωσης ρόλος, καθώς ανακαλύφθηκε ότι αυτή μπορεί να δρα ως VSR, δηλαδή παρεμποδιστικά ως προς το μηχανισμό του RNAi σε κύτταρα εντόμων και θηλαστικών. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η παρεμποδιστική λειτουργία της p35 ως VSR δε σχετίζεται με τη Dcr2, ενώ πιο πιθανό είναι να εκτρέπει τα siRNAs από το μονοπάτι τους, ή να επεμβαίνει σε επίπεδο Ago2/RISC (Mehrabadi et al., 2015).

1.4 Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RNAi ΩΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΤΕΧΝΟΓΝΩΣΙΑ

1.4.1 Εφαρμογές της τεχνολογίας του RNAi

Η κατανόηση των μηχανισμών της γονιδιακής αποσιώπησης σε βάθος δίνει τη δυνατότητα στη σύγχρονη έρευνα να αξιοποιήσει αυτή τη γνώση, ούτως ώστε αυτή να βρει εφαρμογή σε ουσιαστικά προβλήματα της αγροτικής παραγωγής, όπως είναι η καταπολέμηση εντόμων που είναι επιβλαβή για τη γεωργία και την κτηνοτροφία, αλλά και η στόχευση εχθρών ή ασθενειών που απειλούν ωφέλιμα έντομα. Επιπλέον, η γνώση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση εντόμων που αποτελούν φορείς επικίνδυνων ασθενειών και παρασίτων για τα ζώα αλλά και τον ίδιο τον άνθρωπο (Aronstein et al., 2011; Scott et al., 2013).

Για την αξιοποίηση της τεχνολογίας του RNAi σε επιβλαβή έντομα στο πεδίο θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι που είναι εύκολο να εφαρμοστούν σε μεγάλη κλίμακα. Προκειμένου για φυτοφάγα έντομα, η χορήγηση μέσω της τροφής μπορεί να υλοποιηθεί είτε κατασκευάζοντας διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν dsRNA, είτε μέσω ψεκασμού dsRNA στα φυτά φυσικού τύπου.

Η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με υψηλή εμπορική αξία που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε κάποιο σημαντικό επιβλαβές έντομο έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πειραματικό επίπεδο εδώ και αρκετά χρόνια, όπως για παράδειγμα στο καλαμπόκι, το βαμβάκι και τον καπνό (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007; Mao et al., 2011). Η τεχνολογία του *in planta* RNAi στη συνέχεια αποδείχθηκε αποτελεσματική έναντι αρκετών ειδών εντόμων που ανήκουν στα Κολεόπτερα, τα Ημίπτερα και τα

Λεπιδόπτερα (Kim et al., 2015). Ειδικά στα Λεπιδόπτερα, έχει ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς στα είδη *H. armigera* (Mao et al., 2007; Mao et al., 2011; Mao et al., 2013; Tao et al., 2012; Xiong et al., 2013; Zhu et al., 2012), *S. exigua* (Zhu et al., 2012) και *M. sexta* (Kumar et al., 2014).

Όσον αφορά στην πρακτική του ψεκασμού, το dsRNA που χρησιμοποιείται μπορεί είτε να έχει συντεθεί χημικά (*in vitro*), είτε να έχει παραχθεί από μετασχηματισμένα βακτήρια (Palli, 2014). Σε εμπορικό επίπεδο, ήδη βρίσκονται στις φάσεις δοκιμών I και II προϊόντα dsRNA που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες μέσω ψεκασμού, με στόχο να διοχετευθούν στην αγορά. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία, στόχος ενός από αυτά τα προϊόντα είναι το Κολεόπτερο *L. decemlineata*, (www.monsanto.com /products/pages/biodirect.aspx, www.syngenta.com/global/corporate/en/news-center/ news-releases/Pages/1205 14.aspx).

Βέβαια, η τεχνολογία του RNAi βρίσκει εφαρμογή και έναντι αστικών μη-φυτοφάγων εντόμων, όπως είναι για παράδειγμα οι τερμίτες και τα κουνούπια. Έτσι, στην περίπτωση των τερμιτών, το dsRNA μπορεί να χορηγηθεί μέσω τροφής «δολώματος» (Zhou et al., 2008), ενώ τοποθετώντας στο νερό νανοσωματίδια χιτοζάνης που περιέχουν dsRNA η στόχευση είναι εφικτή για τις υδρόβιες προνύμφες των κουνουπιών (Zhang et al., 2010).

Αναφορικά με τη χρήση του RNAi με σκοπό τη βελτίωση της υγείας ωφέλιμων εντόμων, υπάρχει πληθώρα εφαρμογών. Όπως έχει ήδη συζητηθεί, η δημιουργία διαγονιδιακών μεταξοσκωλήκων έχει καταφέρει να προσδώσει στον *B. mori* ανθεκτικότητα μέσω RNAi σε ιούς όπως ο BmNPV και ο BmCPV (**Πίνακας 2**). Ακόμη, μελέτες έχουν δείξει ότι το RNAi μπορεί να καταστήσει ανθεκτικές τις μέλισσες στο μύκητα *Nosema ceranae* (Paldi et al., 2010), το άκαρι *V. destructor* (Campbell et al., 2010; Garbian et al., 2012), αλλά και σε ιϊκές μολύνσεις (Hunter et al., 2010; Liu et al., 2010b; Maori et al., 2009). Άλλωστε, έχει ήδη υπάρξει σχεδιασμός για την παραγωγή προϊόντων που θα στοχεύουν στη *Varroa* και σε ιούς των μελισσών (www.monsanto.com/products/pages/biodirect.aspx).

Μία ακόμη πρακτική εφαρμογή αφορά στα χημικά εντομοκτόνα, όπου η χρήση του RNAi αποδεικνύεται ωφέλιμη για τον προσδιορισμό των γονιδίων που αποτελούν στόχο γνωστών εντομοκτόνων και τη διακρίβωση των μηχανισμών αποτοξίνωσης που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε κάποιο εντομοκτόνο (Kim et al., 2015). Επιπλέον, έχει

προταθεί η συνδυαστική χορήγηση εντομοκτόνου και στόχευση μέσω RNAi του ίδιου του γονιδίου-στόχου του εντομοκτόνου, η οποία όμως ως πρακτική μπορεί να επηρεάσει τόσο θετικά, όσο και αρνητικά την αποτελεσματικότητα του εντομοκτόνου. Έτσι, προκειμένου για ένα εντομοκτόνο που στοχεύει σε κάποιο αποτοξινωτικό ένζυμο (π.χ. ακετυλοχολινεστεράση, AChE), το RNAi θα μειώσει κατά ένα ποσοστό την παραγωγή της AChE, ενώ τα λίγα μόρια που τελικά θα παραχθούν θα προσδέσουν το ειδικό εντομοκτόνο που θα τα καταστήσει ανενεργά, προκαλώντας αυξημένα ποσοστά θανάτων στα έντομα-στόχους (Lu et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση εντομοκτόνων που στοχεύουν σε υποδοχείς ή πρωτεϊνικά κανάλια ιόντων, η εφαρμογή RNAi έναντι του ίδιου γονιδίου-στόχου θα μειώσει την πυκνότητα των υποδοχέων (π.χ. υποδοχείς ρυανοδίνης, RyR) και συνεπώς τα τοξικά αποτελέσματα του εντομοκτόνου θα μειωθούν (Wan et al., 2014; Yang et al., 2014d).

1.4.2 Οφέλη και κίνδυνοι που προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi

Η εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi στην πράξη φαίνεται ότι διαθέτει ποικίλα πλεονεκτήματα, αλλά ταυτόχρονα ενδέχεται να κρύβει και αρκετούς κινδύνους. Αναφορικά με τα οφέλη του RNAi, αυτά συνοψίζονται στα εξής:

- Το RNAi έχει δυνατότητα εξειδικευμένης δράσης ως προς το στόχο του, ενώ το dsRNA είναι μία μορφή μορίου που βρίσκεται ήδη μέσα στον οργανισμό επιτελώντας φυσιολογικές λειτουργίες, αφού ο RNAi μηχανισμός αποτελεί συντηρημένη λειτουργία ανάμεσα στα διάφορα Βασίλεια (Burand and Hunter, 2012; Gu and Knipple, 2013).
- Σε σχέση με τα κοινά εντομοκτόνα, τα dsRNAs θεωρούνται φιλικά ως προς το περιβάλλον, καθώς βιοαποικοδομούνται ταχύτατα στο έδαφος (Dubelman et al., 2014). Ωστόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με το ρυθμό βιοαποικοδόμησής τους στα φύλλα, και αυτό σημαίνει ότι χρειάζονται περισσότερες μελέτες που να συνηγορούν στην αποδόμηση του dsRNA στο περιβάλλον σε σύντομο χρονικό διάστημα (Roberts et al., 2015).
- Η συνδυαστική εφαρμογή χημικού εντομοκτόνου και dsRNA μπορεί να συμβάλει στη μείωση της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου εντομοκτόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση του οικονομικού και περιβαλλοντικού κόστους (Zhang et al., 2013).

- Η τεχνολογία του *in planta* RNAi μπορεί να αποτελέσει λύση για την αντιμετώπιση των μυζητικών εντόμων, στα οποία δεν αποδίδει η κατασκευή διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν την τοξίνη *Bt* (*Bacillus thurigiensis*) (Zhang et al., 2013).

Αντίστοιχα, όσον αφορά στους κινδύνους που μπορούν να προκύψουν από την εφαρμογή του RNAi στα έντομα, αυτοί είναι οι εξής:

- Ενδέχεται να προκληθεί μη-ειδική αποσιώπηση (off-target effect) σε γονίδια που εμφανίζουν μεγάλη ομολογία στο έντομο-στόχο ή σε άλλα έντομα (non-target effect), αλλά και σε ομόλογα του γονιδίου-στόχου σε άλλους οργανισμούς (Aronstein et al., 2011; Nandety et al., 2015; Palli, 2014; Roberts et al., 2015; Scott et al., 2013). Άλλωστε, έχει παρατηρηθεί πρόκληση μη-ειδικής γονιδιακής αποσιώπησης όταν υπάρχει ομολογία μεταξύ των νουκλεοτιδίων του siRNA στις θέσεις 2-7 και της 3΄ μη-μεταφραζόμενης περιοχής (3΄ UTR) κάποιου άλλου γονιδίου που δεν αποτελεί στόχο του siRNA (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2006; Lin et al., 2005). Έτσι, αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει την εύρυθμη λειτουργία οργανισμών μη-στόχων, όπως για παράδειγμα παρατηρείται σε παράσιτα, θηρευτές ή επικονιαστές (Palli, 2014).
- Όπως έχει συμβεί με πλήθος χημικών εντομοκτόνων, υπάρχει ο κίνδυνος να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα των εντόμων απέναντι στη χορήγηση dsRNA σε βάθος χρόνου, για παράδειγμα μέσω δημιουργίας μεταλλαγών τόσο σε γονίδια-κλειδιά του RNAi μηχανισμού, όσο και στο ίδιο το γονίδιο-στόχο (Palli, 2014; Scott et al., 2013).
- Υπάρχει η πιθανότητα η εφαρμογή του RNAi να διεγείρει το μηχανισμό της φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης και να προκαλέσει κορεσμό στον ενζυμικό μηχανισμό που συγκροτεί το RNAi (Aronstein et al., 2011; Palli, 2014).
- Δεν είναι αμελητέος ο κίνδυνος μεταφοράς του dsRNA σε ανώτερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας μέσω φυτοφάγων εντόμων που μπορεί να λειτουργήσουν ως φορείς (Roberts et al., 2015).

Συνεπώς, όλα τα προαναφερθέντα οφέλη, τα οποία αναδεικνύουν τη χρησιμότητα του RNAi, σε συνδυασμό με τους κινδύνους που ενδέχεται να διαταράξουν την ισορροπία του οικοσυστήματος όπου ανήκει το έντομο-στόχος, πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν στο σχεδιασμό της εφαρμοσμένης έρευνας που αξιοποιεί νέες τεχνολογίες όπως είναι η γονιδιακή αποσιώπηση μέσω RNAi.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η αναγνώριση του μεταξοσκώληκα ως εντόμου με μεγάλη εμπορική και ερευνητική αξία, η μειωμένη αποδοτικότητα των *in vivo* πειραμάτων συστημικού RNAi που τον αφορούν (Terenius et al., 2011), αλλά και η έλλειψη ουσιαστικών στοιχείων από τη βιβλιογραφία σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας του RNAi μηχανισμού του, δημιούργησαν την ανάγκη ενδελεχούς ανάλυσης της Βιολογίας του *Bombyx mori* με έμφαση στα μονοπάτια των μικρών RNAs που συνιστούν το μηχανισμό του RNAi.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή, λοιπόν, εστιάζει στη μελέτη των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα *B. mori*, εξετάζοντάς τα σε σχέση με διάφορους παράγοντες που δύνανται να επηρεάσουν την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού *in vivo* και *in vitro*. Έτσι, η μελέτη αυτή ασχολείται με παράγοντες όπως είναι η έκφραση των γονιδίων-κλειδιών του RNAi μηχανισμού, η ύπαρξη ιϊκών μολύνσεων, η ενδογενής φυσική ανοσία και η ικανότητα πρόσληψης του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αναμένεται να προκύψουν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων στην αποδοτικότητα του μηχανισμού του RNAi στο μεταξοσκώληκα.

Η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί να αποσαφηνίσει βασικά σημεία του τρόπου λειτουργίας του RNAi μηχανισμού στο μεταξοσκώληκα, έτσι ώστε στη συνέχεια να διευκολυνθεί η ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης *in vivo* στο συγκεκριμένο πρότυπο βιολογικό σύστημα, αλλά και σε άλλα πιθανώς επιβλαβή για τις καλλιέργειες είδη Λεπιδοπτέρων. Ακόμη, μελετώντας την αλληλεπίδραση του μεταξοσκώληκα με ορισμένους RNA και DNA ιούς, στόχος είναι να προκύψουν στοιχεία για τη συμμετοχή του RNAi μηχανισμού στην άμυνα του *B. mori* έναντι σοβαρών ιϊκών μολύνσεων, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα επιβλαβείς σε μονάδες εκτροφής μεταξοσκωλήκων. Τέλος, από ερευνητικής σκοπιάς, τα ευρήματα που θα προκύψουν από αυτή τη Διδακτορική Διατριβή θα προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το βαθμό συντήρησης του μηχανισμού του RNAi σε σχέση με άλλα έντομα, όπως είναι η *Drosophila*, και με άλλους οργανισμούς εν γένει.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Βιολογικό υλικό

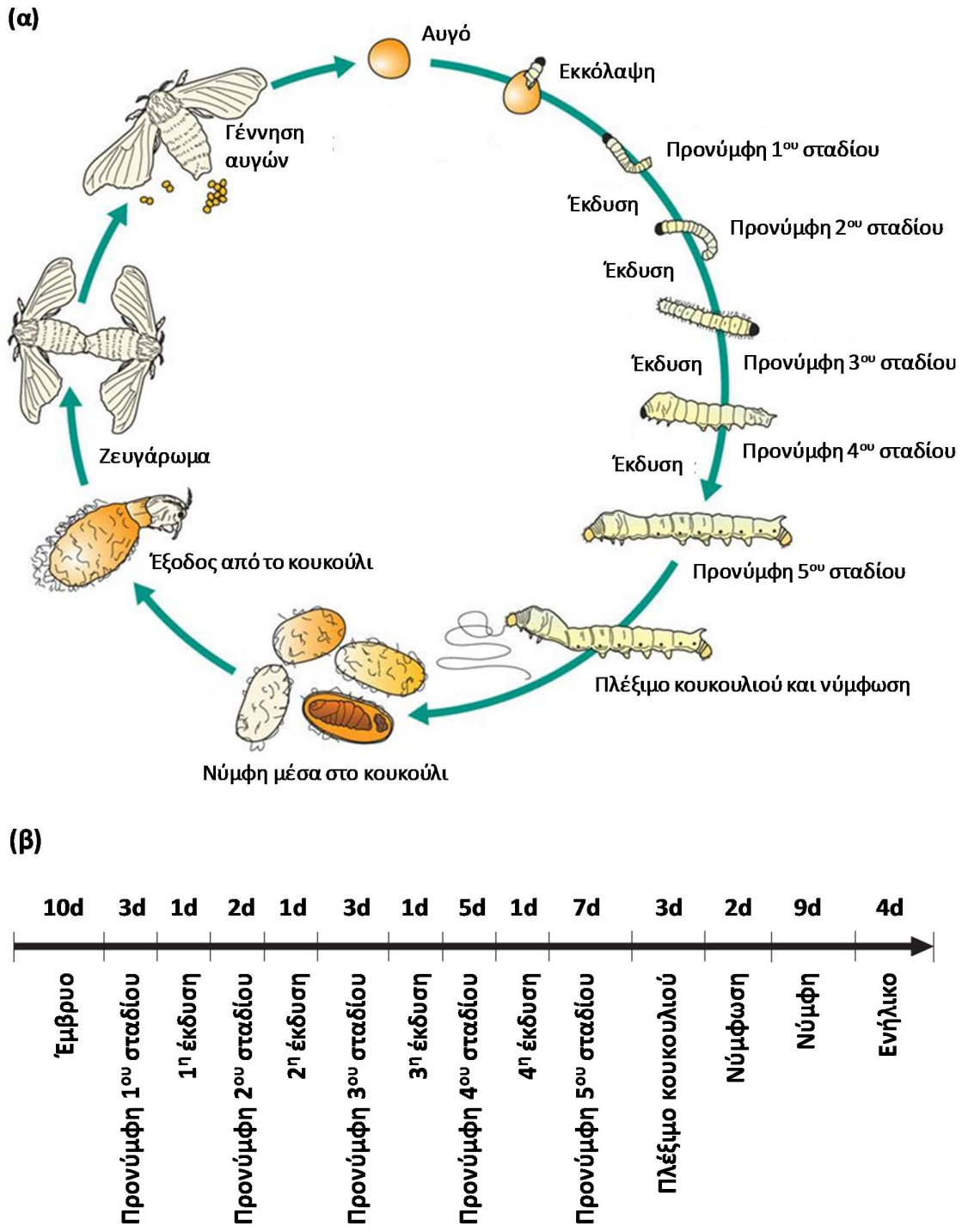
2.1.1.1 Ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori*

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των *in vivo* πειραμάτων προήλθε από τα στελέχη Daizo (Ιαπωνικής προέλευσης) και P50 (Κινεζικής προέλευσης) του μεταξοσκώληκα *B. mori.* Η εκτροφή των ζώων έγινε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας που ανήκει στο ΙΒΕ (Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

2.1.1.1.1 Κύκλος ζωής

Ο μεταξοσκώληκας *B. mori* ανήκει στην τάξη των Λεπιδοπτέρων και είναι ένα ολομετάβολο έντομο. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του διέρχεται από διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, από το αυγό έως το τέλειο έντομο (**Εικόνα 13α**). Από τη στιγμή που θα εκκολαφθεί το αυγό, ο μεταξοσκώληκας εξέρχεται σε μορφή προνύμφης και ακολουθούν 5 διαδοχικά προνυμφικά στάδια, τα οποία προσδιορίζονται από 4 ενδιάμεσες εκδύσεις (αποδερματώσεις). Η συνολική διάρκεια των προνυμφικών σταδίων εκτροφής είναι από 23 έως 30 ημέρες (**Εικόνα 13β**), και επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι το είδος της τροφής, οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, σχετική υγρασία, φως και αερισμός), οι τεχνικές εκτροφής και το συγκεκριμένο στέλεχος του μεταξοσκώληκα (Χαριζάνης, 2006).

Κατά τη διάρκεια της κάθε έκδυσης, η προνύμφη εισέρχεται στη φάση του ύπνου, όπου παραμένει ακίνητη και δεν τρέφεται έως ότου ολοκληρωθεί η αποδερμάτωση (~1 ημέρα). Μετά το πέρας και του 5^{ου} προνυμφικού σταδίου, η προνύμφη γίνεται ανήσυχη, διακόπτει την τροφή της και το σώμα της συρρικνώνεται λαμβάνοντας διάφανη όψη. Τότε, αρχίζει η φάση της περιπλάνησης (wandering) και ακολουθεί το πλέξιμο του κουκουλιού (spinning), το οποίο διαρκεί 2-3 ημέρες. Ακολούθως, η προνύμφη μεταμορφώνεται σε νύμφη (2 ημέρες), και σε περίπου 9 ημέρες το τέλειο έντομο διατρυπά το κουκούλι και εξέρχεται από αυτό. Για τις επόμενες 3-4 ημέρες, μπορεί να γίνει η γονιμοποίηση του θηλυκού από το αρσενικό, την οποία ακολουθεί η



Εικόνα 13 Ο κύκλος ζωής του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. (α) Όντας ένα ολομετάβολο έντομο, ο *B. mori* κατά τη διάρκεια της ζωής του διέρχεται από διαδοχικά στάδια ανάπτυξης, όπως αυτό του αυγού, της προνύμφης (1ου έως 5ου σταδίου), της νύμφης και του τέλειου εντόμου (slideplayer.com/slide/2811303/). (β) Απεικόνιση της διάρκειας του κάθε αναπτυξιακού σταδίου του *B. mori* σε ημέρες (d, days) [Προσαρμογή από (Liu et al., 2007)].

γέννηση των αυγών. Τη στιγμή της γέννησής τους, τα γονιμοποιημένα αυγά διαθέτουν κίτρινο χρωματισμό, ενώ μετά από μερικές ώρες αποκτούν γκρίζο χρώμα.

Ανάλογα με τον αριθμό των γενεών που προκύπτουν ανά έτος, το στέλεχος του μεταξοσκώληκα χαρακτηρίζεται ως μονόγονο (univoltine), δίγονο (bivoltine) ή πολύγονο (polyvoltine) (Χαριζάνης, 2006).

2.1.1.1.2 Εκτροφή

Η εκτροφή του μεταξοσκώληκα λαμβάνει χώρα σε κατάλληλο θάλαμο επώασης, όπου η θερμοκρασία διατηρείται στους 25 °C και η φωτοπερίοδος είναι 12h φως/12h σκοτάδι. Οι μεταξοσκώληκες αναπτύσσονται μαζικά μέσα σε κατάλληλα πλαστικά δοχεία, τα οποία επιτρέπουν τον αερισμό τους, ενώ απαιτείται τακτικός καθαρισμός τους (κάθε 1-2 ημέρες), ώστε να απομακρύνονται τα περιττώματα και η τροφή που έχει τυχόν ξεραθεί.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι μεταξοσκώληκες τρέφονται με φύλλα μουριάς, τα οποία είναι διαθέσιμα από τις αρχές της άνοιξης έως το τέλος του καλοκαιριού. Για τη διατροφή κατά το 1^{ο} έως και το 3^{ο} προνυμφικό στάδιο, τα φύλλα πρέπει να είναι πολύ τρυφερά, ενώ για τα δύο τελευταία στάδια μπορούν να είναι πιο ώριμα. Για την εκτροφή στο εργαστήριο, αφότου τα φύλλα κοπούν από το δένδρο, πλένονται καλά με νερό βρύσης και στεγνώνονται σε απορροφητικό χαρτί. Ωστόσο, σε περιόδους του έτους όπου οι μουριές δεν έχουν φύλλα, για την εκτροφή των ζώων χρησιμοποιείται τεχνητή τροφή (Yakuroto Co., Tokyo, Japan ή Dr. Bo-Xiong Zhong, Πανεπιστήμιο Zhejiang, Hangzhou, China), η οποία έχει ως βάση αποξηραμένα φύλλα μουριάς σε σκόνη, ενώ ταυτόχρονα περιέχει παράγοντες που προκαλούν στερεοποίηση της τροφής και συντηρητικά ώστε να διατηρείται για μακρό χρονικό διάστημα.

Για την παρασκευή της τεχνητής τροφής, 100 g σκόνης αναμιγνύονται με 250 mL νερού (95 °C), και θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων για 15’. Στη συνέχεια, έπειτα από καλή ανάδευση και αφότου κρυώσει, η τροφή μπορεί να χορηγηθεί στους μεταξοσκώληκες κομμένη σε λεπτές φέτες ή να αποθηκευθεί στους 4 °C.

2.1.1.2 Κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων εντόμων

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των *in vitro* πειραμάτων αντιστοιχεί στις εξής κυτταρικές σειρές:

α) Bm5, που προέρχεται από κύτταρα ωοθήκης του μεταξοσκώληκα *B. mori* (Grace, 1967),

β) BTI-Tn-5B1-4 ή αλλιώς High Five™ (Hi5), που προέρχεται από αυγά του Λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* (Granados et al., 1986; Granados et al., 1994), και

γ) IPLB-SF21 (Sf21), που προέρχεται από μη-ώριμες ωοθήκες νυμφών του Λεπιδόπτερου *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977).

Τα κύτταρα Bm5, Hi5 και Sf21 διατηρούνται σε ειδικό θάλαμο επώασης στους 28 °C μέσα σε φλάσκες των 25 cm^2, οι οποίες περιέχουν θρεπτικό υλικό IPL-41 (Gibco, USA) με προσθήκη 10% εμβρυϊκού ορού μόσχου (FBS, Fetal Bovine Serum, Biosera ή HyClone, USA). Το IPL-41 αποτελεί μίγμα ανοργάνων αλάτων, αμινοξέων, βιταμινών, σακχάρων και άλλων θρεπτικών συστατικών (Schneider, 1964). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται μία φορά την εβδομάδα, ενώ για την αποφυγή μολύνσεων μετά από διαμόλυνση των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό προστίθεται γενταμυκίνη (50 μg/mL).

2.1.1.3 Βακτηριακά στελέχη

Για τις ανάγκες των κλωνοποιήσεων που περιγράφονται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*:

α) DH5a™ (Invitrogen, USA), προκειμένου για την παραγωγή πλασμιδιακού DNA, και

β) DH10Bac™ (Invitrogen, USA), προκειμένου για την παραγωγή bacmid DNA.

2.1.1.4 Πλασμίδια

Για τις ανάγκες των πειραμάτων που περιγράφονται ακολούθως, στις κλωνοποιήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πλασμιδιακοί φορείς:

α) pLitmus (28i ή 38i, New England Biolabs, USA), ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση και τη μετέπειτα *in vitro* μεταγραφή των κλωνοποιημένων αλληλουχιών, με σκοπό την κατασκευή ειδικού dsRNA (Evans et al., 1995),

β) pEA, ο οποίος είναι κατάλληλος για την ενισχυμένη έκφραση γονιδίων σε κυτταρικές σειρές εντόμων (Lu and Iatrou, 1997),

γ) pGEM-T-Easy (Promega, USA), ο οποίος είναι ένα ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο που στη θέση ένθεσης περιλαμβάνει από μία θυμίνη και στα δύο 3' άκρα του. Με αυτό τον τρόπο, αποφεύγεται η επανακυκλοποίηση του φορέα, ενώ καθίσταται κατάλληλος για την εύκολη κλωνοποίηση προϊόντων PCR που έχουν παραχθεί από θερμοσταθερές πολυμεράσες που δε δημιουργούν τυφλά άκρα, και

δ) pBluescript SK^+ (Stratagene, USA), ο οποίος επιλέγεται για ορισμένα ενδιάμεσα στάδια υποκλωνοποίησης.

2.1.1.5 Bacmid

Στα πειράματα που αφορούν στις αλληλεπιδράσεις των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα με τον ανασυνδυασμένο φθορίζοντα μπακουλοϊό AcMNPV-EYFP χρησιμοποιήθηκε το AcMNPV Bacmid μέσω του συστήματος έκφρασης μπακουλοϊών Bac-to-Bac® (Invitrogen, USA).

2.1.2 Κοινά θρεπτικά μέσα και διαλύματα

Αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Cracking buffer): 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS και 4 M ουρία

Διαλύματα αλκαλικής λύσης βακτηρίων (Mini-prep, Midi-prep, Maxi-prep):

- **Διάλυμα I:** 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) και 10 mM EDTA
- **Διάλυμα I (G.E.T.):** 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) και 10 mM EDTA
- **Διάλυμα II:** 1% SDS και 0.2 N NaOH
- **Διάλυμα III:** 3 M KAc (pH 4.8) και 11.5% CH_3COOH

Διάλυμα απομάκρυνσης αντισωμάτων (Stripping buffer): 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS και 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7)

Διάλυμα βακτηριακής λύσης (Μέθοδος λυσοζύμης): 8% σακχαρόζη, 100 mM Tris (pH 8.0) και 10 mM EDTA

Διάλυμα πρωτεΐνης γάλακτος 10% (Blocking buffer): 10% γάλα σε σκόνη (NFM, non-fat milk) σε 1x PBS-Tween 20

Διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI, phenol/chloroform/ isoamyl alcohol): φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:25:1

Διάλυμα Hunsley's (Hunsley's Medium): 250 mM σακχαρόζη, 10 mM KH_2PO_4, 4 mM NaCl, 26 mM KCl, 18 mM $MgCl_2$ και 3 mM $CaCl_2$ (pH 6.6). Για 100 mL διαλύματος αναμιγνύονται 2.5 mL 40x Salts Stock, 2 mL 50x Buffer Stock και 8.56 g σακχαρόζης, ενώ το pH ρυθμίζεται στο 6.6 με 10 N KOH.

Θρεπτικό υλικό IPL-41 + 10% FBS: Σε 800 mL ddH_2O προστίθενται 25.63 g σκόνης IPL-41 (Genaxxon Bioscience, Germany), 0.35 g $NAHCO_3$, 20 mL φωσφορικής τρυπτόζης, 1 mL 0.24 mM $ZnSO_4.7H_2O$ και 1 mL 16 mM $AlK(SO_4)_2.12H_2O$, και το pH προσαρμόζεται στο 5.9 με 10 N KOH. Ακολούθως, προστίθεται ddH_2O έως τελικού όγκου 900 mL και 100 mL αδρανοποιημένου FBS. Το pH προσαρμόζεται στο 6.3 με 1 N KOH και η ωσμομοριακότητα στα 360-380 mOsM, ενώ κατόπιν φιλτραρίσματος (0.22 μm, Millipore, USA) το μέσο αποθηκεύεται στους 4 °C υπό συνθήκες σκότους.

Θρεπτικό υλικό LB (Luria-Bertani): Σε 1 lt ddH_2O προστίθενται 10 g τρυπτόνης, 5 g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) και 5 g NaCl (pH 7.0).

Θρεπτικό υλικό TB (Terrific Broth): Σε 225 mL ddH_2O προστίθενται 3 g τρυπτόνης, 6 g εκχυλίσματος ζύμης και 1 mL γλυκερόλης. Αφού αποστειρωθεί, προστίθενται 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PB (Phosphate buffer).

Πηκτή διαχωρισμού (Separating gel) 10%: 3.3 mL 30% ακρυλαμίδης/δις-ακρυλαμίδης, 4.1 mL ddH_2O, 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 μL 10% SDS, 50 μL 10% APS και 10 μL TEMED

Πηκτή συμπύκνωσης (Stacking gel): 670 μL 30% ακρυλαμίδης/δις-ακρυλαμίδης, 2.2 mL ddH_2O, 1 mL 0.5 M Tric-HCl (pH 6.8), 40 μL 10% SDS, 40 μL 10% APS και 4 μL TEMED

Ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης 1x: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) και 0.1 mM EDTA

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης DNάσης I (με $MgCl_2$) 10x: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM $MgCl_2$ και 1 mM $CaCl_2$

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής (RT Buffer) 5x: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$ και 10 mM DTT

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Laemmli running buffer) 10x: 250 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 1% SDS (pH 8.3)

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής (Transcription buffer) 5x: 400 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 60 mM $MgCl_2$, 10 mM σπερμιδίνη και 200 mM DTT

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) 1x: 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS και 20% μεθανόλη

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PB (Phosphate buffer): 0.17 M KH_2PO_4 και 0.72 M K_2HPO_4

Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης 10x: 400 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT και 5 mM ATP (pH 7.8 στους 25°C)

Ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης *Dream Taq* 10x: Περιέχει KCl και $(NH_4)_2SO_4$, καθώς και 20 mM $MgCl_2$

Ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης *Hytest* 10x: 670 mM Tris-HCl (pH 8.8), 166 mM $(NH_4)_2SO_4$ και 0.1 % Tween 20

Ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης *Pfu* (με $MgSO_4$) 10x: 200 mM Tris-HCl (pH 8.8 στους 25°C), 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM KCl, 1 mg/mL BSA, 1% Triton X-100 και 20 mM $MgSO_4$

Ρυθμιστικό διάλυμα *Platinum Taq* High Fidelity 10x: 600 mM Tris-SO_4 (pH 8.9) και 180 mM $(NH_4)_2SO_4$

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE Buffer): 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) και 1 mM EDTA

Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA πολυμεράσης 5x: 335 mM Tris-HCl (pH 8.8 στους 25°C), 33 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT και 84 mM $(NH_4)_2SO_4$

Buffer Stock 50x: 312 mM KH_2PO_4 και 143 mM $K_2HPO_4.3H_2O$ (χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος Hunsley's)

LB/άγαρ: 1.5% άγαρ σε θρεπτικό υλικό LB. Αφού αποστειρωθεί, εφόσον χρειάζεται, προστίθεται σε αυτό το κατάλληλο αντιβιοτικό (συνήθως αμπικιλλίνη 100 μg/mL), και διαμοιράζεται σε τρυβλία Petri, όπου και στερεοποιείται.

PBS 1x: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 και 18 mM KH_2PO_4 (pH 7.4)

PBS-T (PBS-Tween 20): 0.1% Tween 20 σε 1x PBS

Salts Stock 40x: 158 mM NaCl, 1 M KCl, 0.7 M $MgCl_2.6H_2O$ και 158 mM $CaCl_2$ (χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος Hunsley's)

Sample buffer 1x: 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% γλυκερόλη, 0.002% μπλε της βρωμοφαινόλης

Sample buffer 1x (με β-μερκαπτοαιθανόλη): 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% γλυκερόλη, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.002% μπλε της βρωμοφαινόλης

TAE 10x: 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0) και 40 mM CH_3COOH

Urea lysis buffer: 7 M ουρία, 2% SDS, 135 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5) και 1 mM EDTA

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Γενικές Μέθοδοι

2.2.1.1 Σύνθεση δίκλωνου RNA

Για την πραγματοποίηση των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων που περιλαμβάνουν τη χορήγηση μορίων dsRNA, ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο *in vitro* σύνθεσης dsRNA:

- Μετά την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου στο φορέα pLitmus (§2.2.2.2), ακολουθεί πέψη του φορέα με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα σε 2 ξεχωριστές αντιδράσεις. Έτσι, το ένα ένζυμο θα υδρολύσει ακριβώς μετά το ένθεμα, και το άλλο ακριβώς πριν από αυτό. Υδρολύονται 30-35 μg του φορέα με 20 U του εκάστοτε ενζύμου για 3h περίπου σε αντίδραση τελικού όγκου 100 μL, και ελέγχεται σε πηκτή αγαρόζης (§2.2.1.7) εάν έχει κοπεί ολόκληρη η ποσότητα του φορέα. Εδώ, για τους φορείς 38i-Ago1, 38i-Aub, 38i-Dcr1, 38i-Dcr2, 38i-Loqs, 38i-Translin, 38i-Trax-B και 28i-R2D2, πραγματοποιήθηκε αντίδραση υδρόλυσης με *Bam*HI ή *Hind*III, ενώ για το φορέα 38i-Ago2 έγινε πέψη με *Bam*HI ή *Mfe*I. Επίσης, για τους φορείς 28i-Ago3 και 28i-MalE (που χρησιμοποιήθηκε ως dsRNA ελέγχου) έγινε πέψη με *Bgl*II ή *Stu*I.
- Ακολουθεί καθαρισμός των γραμμικών φορέων με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI) και κατακρήμνιση σε διάλυμα αιθανόλης 100% και οξικού αμμωνίου (NH_4Ac, 0.25 M τελική συγκέντρωση) στους -20 °C για 16h.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται, και το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα αιθανόλης 70%, ενώ στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 10’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20-30 μL ddH_2O.
- Τα DNAs ελέγχονται σε πηκτή αγαρόζης, χρησιμοποιώντας 1 μL του δείγματος και μία 1:10 αραίωσή του, ώστε να εκτιμηθεί με ακρίβεια η ποσότητα του DNA στο αρχικό δείγμα, συγκρίνοντας με δείγμα νουκλεϊκών οξέων γνωστού μεγέθους και ποσότητας (DNA ladder).
- Ακολούθως, για τη σύνθεση του μονόκλωνου κωδικοποιού (sRNA) και μη-κωδικοποιού RNA (asRNA) που αντιστοιχεί στο κλωνοποιημένο DNA ένθεμα, πραγματοποιούνται 2 ξεχωριστές αντιδράσεις. Έτσι, σε σωλήνα τύπου eppendorf αναμιγνύονται: γραμμική μήτρα DNA pLitmus (5 μg), ρυθμιστικό διάλυμα

μεταγραφής, τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια (rNTPs, 3 mM, Thermo Fischer Scientific, USA), T7 RNA πολυμεράση (160 U, Thermo Fischer Scientific, USA), αναστολέας RNAσών Ribolock (80 U, Thermo Fischer Scientific, USA) και αποστειρωμένο ddH_2O (μέχρι τελικού όγκου 100 μL). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37 °C για περίπου 6h (η διάρκεια μπορεί να κυμαίνεται από 3-16h). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα καλό είναι να ανακινείται ελαφρώς ο σωλήνας, ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευση των συστατικών στον πάτο. Ένδειξη επιτυχούς σύνθεσης του RNA είναι, ότι μετά το πέρας λίγων ωρών, το μίγμα αποκτά θολότητα.

- Ακολούθως, τα ssRNAs ελέγχονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης στα 100 V για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 15’.
- Αφού επιβεβαιωθεί η ικανοποιητική σύνθεση των ssRNAs, πραγματοποιείται πέψη του γραμμικού DNA με προσθήκη DNάσης I (2 U/μg DNA, Thermo Fischer Scientific, USA) στους 37 °C για 30’. Η DNάση I (ελεύθερη RNασών) είναι ένα ένζυμο που έχει την ιδιότητα να διασπά μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA.
- Τα ssRNAs καθαρίζονται με διάλυμα PCI και κατακρημνίζονται σε διάλυμα αιθανόλης 100% και NH_4Ac 0.25 M στους -20 °C για 16h.
- Το ίζημα των ssRNAs επαναδιαλύεται σε διάλυμα 150 mM NaCl (παρουσία ή απουσία 1 mM EDTA).
- Οι 2 συμπληρωματικές αλυσίδες ssRNA αναμιγνύονται σε ισόποσες συγκεντρώσεις (1-3 mg/mL).
- Ακολουθεί ο υβριδισμός τους στους 95 °C για 2’ και στη συνέχεια το διάλυμα του dsRNA αφήνεται να φτάσει αργά σε θερμοκρασία δωματίου (25-40 °C).
- Η τελική συγκέντρωση του dsRNA υπολογίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιώντας γνωστή ποσότητα (1 μg) του λ DNA ladder (*Hind*II/*Hind*III).
- Το dsRNA χρησιμοποιείται άμεσα ή αποθηκεύεται στους -20 °C.

2.2.1.2 Απομόνωση DNA

- Σε δείγματα από κύτταρα Bm5 που συλλέγονται προστίθενται 700 μL Urea lysis buffer και ακολουθεί ήπια ανάμιξη με προσοχή ώστε να μην προκληθεί φθορά στο DNA.

- Προστίθενται 500 μL από το διάλυμα PCI, ακολουθεί έντονη μηχανική ανάδευση για 30” και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 5’.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα για μία φορά.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf και σε αυτήν προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και NaCl 0.2 M. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15’.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm στους 4 °C για 15’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα αιθανόλης 75%.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 5’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH_2O.

2.2.1.3 Απομόνωση ολικού RNA

- Στα δείγματα (κύτταρα Bm5, διάφοροι προνυμφικοί και νυμφικοί ιστοί μεταξοσκώληκα) που συλλέγονται προστίθεται 1 mL TRI Reagent (MRC, USA ή Sigma-Aldrich GmbH, Germany) ανά 5-10 x 10^6 ζωικά κύτταρα ή ανά 50-100 mg ιστού μέσα σε σωλήνα τύπου eppendorf. Τα κύτταρα αναδεύονται ισχυρά, ενώ οι ιστοί ομογενοποιούνται με χρήση ειδικού έμβολου.
- Σε περίπτωση δειγμάτων με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή εξωκυτταρικά υλικά, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm στους 4 °C για 10’.
- Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα προσεκτικά ώστε να μη διαταραχθεί η ενδιάμεση λιπώδης και πολυ-σακχαρική φάση. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5’.
- Ακολουθεί προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου και έντονη ανακίνηση για 15”, και τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-15’.
- Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm στους 4 °C για 15’.
- Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και σε αυτήν προστίθενται 500 μL ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10’.
- Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm στους 4 °C για 10’.

- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 1 mL διαλύματος αιθανόλης 75%.
- Μετά από έντονη μηχανική ανάδευση, γίνεται φυγοκέντρηση στις 7,500 rpm στους 4 °C για 5’.
- Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5-10’ και επαναδιαλύεται σε ddH_2O.
- Ακολούθως, εκτιμάται η συγκέντρωση του RNA στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, USA, §2.2.1.10) και/ή μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% (§2.2.1.7).
- Τέλος, ανάλογα με την ποσότητα του RNA που θα χρησιμοποιηθεί στην επακόλουθη αντίστροφη μεταγραφή (§2.2.1.4), σε νέο σωλήνα προστίθεται το RNA υπόστρωμα/μήτρα, κατάλληλη ποσότητα DNάσης I (1 U/μg RNA, Thermo Fischer Scientific, USA), ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης DNάσης I που περιέχει $MgCl_2$ (Thermo Fischer Scientific, USA) και αποστειρωμένο ddH_2O μέχρι τελικού όγκου 10 μL σε θερμοκρασία 37 °C για 15’, ούτως ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα DNA που ενδεχομένως υπήρχαν στο δείγμα.

2.2.1.4 Αντίστροφη μεταγραφή RNA

Με σκοπό την ανίχνευση των επιπέδων της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου, 1 μg ολικού RNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα/μήτρα για τη σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA (complementary ή copy DNA) μέσω αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT) με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), η οποία δρα ως RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση.

Σε περιπτώσεις όπου στόχος είναι η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων του μεταξοσκώληκα ή του ιού BmMLV, η αντίστροφη μεταγραφή γίνεται είτε με τη χρήση εκκινητών oligo-[dT] που υβριδοποιούνται με τις poly-$[A]^+$ ουρές των mRNA μορίων του δείγματος, είτε με τυχαία εξαμερή (random hexamers, Thermo Fischer Scientific, USA) που υβριδοποιούνται σε πολλαπλές θέσεις και μη-ειδικά με το RNA. Αντίθετα, ειδικά για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούνται από το ιϊκό γονιδίωμα BmCPV, το RNA αρχικά αναμιγνύεται με DMSO (AppliChem GmbH, Germany) σε αναλογία 1:1 και θερμαίνεται στους 50 °C για 45’ ή στους 75 °C για 10’, ούτως ώστε να αποδιαταχθεί το

dsRNA γονιδίωμα του ιού, και εν συνεχεία γίνεται η RT. Προκειμένου να ανιχνευθεί η πολυεδρίνη του BmCPV, ο εκκινητής BmCPV-Ph-ORF-F (**Πίνακας Π2**) που χρησιμοποιείται στην RT είναι ειδικός ως προς την αλληλουχία του τμήματος S10 του γονιδιώματος.

Το μίγμα της κάθε αντίδρασης αποτελείται από: ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής (Thermo Fischer Scientific, USA), dNTPs (1 mM, Thermo Fischer Scientific, USA), αλβουμίνη ορού βοός (BSA, 100 μg/mL, Takara, Japan), DTT (10 mM), αντίστροφη μεταγραφάση RevertAid (60 U, Thermo Fischer Scientific, USA), αναστολέα RNασών Ribolock (8 U, Thermo Fischer Scientific, USA), τον κατάλληλο εκκινητή και αποστειρωμένο ddH_2O. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται ανήκουν σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες: α) oligo-[dT] (0.2 μg), β) τυχαία εξαμερή (0.1 μg), ή γ) ειδικός εκκινητής για την πολυεδρίνη (0.3 μg).

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή, τα δείγματα τοποθετούνται στους 42 °C για 1h. Ωστόσο, ειδικά στην περίπτωση σύνθεσης cDNA για το οποίο χρησιμοποιούνται ως εκκινητές τυχαία εξαμερή, του βήματος αυτού προηγείται επώαση στους 25 °C για 10’. Το cDNA που θα προκύψει χρησιμοποιείται στη συνέχεια ως υπόστρωμα/μήτρα προς ενίσχυση για την ανίχνευση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της αντίδρασης PCR (RT-PCR, βλ. §2.2.1.5). Οι συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων RT-PCR για την ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων περιγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα Π1** του Παραρτήματος.

2.2.1.5 Αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η τεχνική της αλυσ(ι)δωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction) αποτελεί μία εξειδικευμένη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA, η οποία συνίσταται σε 3 βασικά επαναλαμβανόμενα στάδια: την αποδιάταξη (denaturation) του υποστρώματος/μήτρας των νουκλεϊκών οξέων μέσω θέρμανσης, την υβριδοποίηση/επαναδιάταξη (annealing) των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με τις ακολουθίες-στόχους μονής αλυσίδας του υποστρώματος/μήτρας DNA, και την επιμήκυνση (extension) των υβριδοποιημένων εκκινητών μέσω μίας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Αυτός ο κύκλος αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται για 25 έως 40 φορές, και οδηγεί σε εκθετική αύξηση της ποσότητας

των δίκλωνων μορίων DNA του αρχικού δείγματος. Εκκινητές ονομάζονται μονόκλωνες αλληλουχίες DNA που συνήθως έχουν μήκος από 18 έως 24 νουκλεοτίδια (nt) και είναι συμπληρωματικές ως προς συγκεκριμένα σημεία του μόριου DNA που θα αποτελέσει το υπόστρωμα/μήτρα της PCR. Έτσι, η υβριδοποίηση ενός ζεύγους εκκινητών με το συμπληρωματικό του DNA ενισχύει την αλληλουχία που αντιστοιχεί στην περιοχή του υποστρώματος/μήτρας η οποία οριοθετείται από τους δύο εκκινητές, με αποτέλεσμα την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων του επιθυμητού δίκλωνου DNA.

Γενικά, για την πραγματοποίηση της PCR στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται το υπόστρωμα/μήτρα του DNA (1 ng έως 1 μg), ένα ζεύγος εκκινητών που είναι συμπληρωματικοί ως προς το 3’ άκρο της κάθε αλυσίδας του υποστρώματος/μήτρας του DNA (0.1-1 μM), μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs, 0.5 mM), 1x ρυθμιστικό διάλυμα, δισθενή κατιόντα (Mg^{2+} ή Mn^{2+}, 2 mM), *Taq* ή *Pfu* DNA πολυμεράση (1.5 U) και αποστειρωμένο ddH_2O (μέχρι τελικού όγκου 50 μL).

Οι γενικές συνθήκες του θερμοκρασιακού προγράμματος μίας αντίδρασης PCR είναι: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 1-3’ (1 κύκλος), αποδιάταξη στους 94 °C για 30”, υβριδοποίηση στους 45-65 °C για 30-60”, επιμήκυνση στους 72 °C για 1’/kb (25-40 κύκλοι), τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5-15’ (1 κύκλος) και, προαιρετικά, διατήρηση στους 4 °C. Οι συνθήκες πραγματοποίησης των αντιδράσεων PCR για την ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων περιγράφονται αναλυτικά στον **Πίνακα Π1** του Παραρτήματος.

Μετά την PCR, ακολουθεί εξέταση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (§2.2.1.7) και έπειτα, καθαρισμός τους με διάλυμα φαινόλης PCI (§2.2.1.9).

2.2.1.6 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης των μελετούμενων γονιδίων, χρησιμοποιείται η μέθοδος qRT-PCR (quantitative real time PCR). Το σύστημα που χρησιμοποιείται είναι το Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, USA) με χρήση του προγράμματος MxPro™ QPCR Software (Agilent Technologies, USA), το οποίο επιτρέπει την παρακολούθηση της συσσώρευσης ενός προϊόντος PCR σε πραγματικό χρόνο κατά την εξέλιξη της αντίδρασης PCR, χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green που περιέχεται σε ειδικό ενζυμικό μίγμα.

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται η μέθοδος του $\Delta\Delta C_t$, σύμφωνα με την οποία συγκρίνονται οι κύκλοι (C_t) όπου εμφανίζεται το κατώφλι (threshold) της αντίδρασης PCR σε κάθε ένα από τα δείγματα σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή που προκύπτει για το γονίδιο αναφοράς (Livak and Schmittgen, 2001). Ειδικότερα, τα σχετικά επίπεδα των μεταγράφων του γονιδίου (X) που μας ενδιαφέρει υπολογίζονται ως ένα ποσοστό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς (B), και συγκεκριμένα, ως $2^{-\Delta Ct}$, όπου το ΔC_t ισούται με C_t^X-C_t^B. Τέλος, για την επιβεβαίωση της ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών, καθώς και της απουσίας ύπαρξης παραπροϊόντων από τη δημιουργία διμερών εκκινητών, γίνεται ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης μέσω παρακολούθησης της θερμοκρασίας τήξης των προϊόντων (T_m, melting temperature).

Εδώ, για την κάθε αντίδραση αναμιγνύονται: υπόστρωμα/μήτρα cDNA (12.5 ng), εκκινητές ειδικοί για το προς μελέτη γονίδιο (0.55 μM), KAPA SYBR® FAST qPCR MasterMix (8 μL, Kapa Biosystems, USA), χρωστική Rox (0.04 μL, από το φιαλίδιο υψηλής συγκέντρωσης) και αποστειρωμένο ddH_2O. Το KAPA SYBR® FAST qPCR MasterMix περιέχει την DNA πολυμεράση KAPA SYBR FAST, το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, dNTPs, τη χρωστική SYBR Green I και $MgCl_2$ σε τελική συγκέντρωση 2.5 mM.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που εφαρμόζεται στα πειράματα είναι 95 °C για 3’, και στη συνέχεια 40 κύκλοι στους 95 °C για 5”, 59 °C ή 60 °C για 30” και 72 °C για 5”. Για την κανονικοποίηση μικρών διαφορών μεταξύ των ποσοτήτων των υποστρωμάτων/μητρών του cDNA χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας το γονίδιο αναφοράς του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eukaryotic translation initiation factor 4A (*BmTIF*, DQ443290.1) (Wang et al., 2008) ή το γονίδιο της κυτταροπλασματικής ακτίνης A3 (AB701689.1) (Gao et al., 2012).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων έχουν σχεδιαστεί με το πρόγραμμα Primer Express 2.0 (Applied Biosystems/Life Technologies, USA, **Πίνακας Π6**)[1].

---

[1]Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις που παρουσιάζονται στην §3.1.4.1 σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να περιλαμβάνουν τμήματα 2 διαδοχικών εξωνίων, και συνεπώς στα RNAs που αποτέλεσαν το υπόστρωμα/μήτρα για τη σύνθεση των αντίστοιχων cDNAs δεν πραγματοποιήθηκε χειρισμός με DNάση I.

2.2.1.7 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Η ακεραιότητα και ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων με βάση το μέγεθός τους προσδιορίζεται μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που συντίθεται από εναλλασσόμενα υπολείμματα D- και L-γαλακτόζης, τα οποία ενώνονται με α (1-3) και β (1-4) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Για την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μονής και διπλής αλυσίδας (RNA και DNA) στην πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μία χρωστική που υπό ακτινοβολία UV φθορίζει. Το EtBr έχει την ιδιότητα να διεισδύει μέσα στην έλικα των νουκλεϊκών οξέων, ούτως ώστε να τοποθετείται κάθετα προς τον ελικοειδή άξονα και να δημιουργεί δεσμούς Van der Waals με τα ζεύγη βάσεων που βρίσκονται πάνω και κάτω από αυτό.

Κατά την ηλεκτροφόρηση, εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση στην πηκτή, η οποία προκαλεί τη μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων μορίων των νουκλεϊκών οξέων προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο της συσκευής. Λόγω της παρουσίας του EtBr, η παρατήρηση σε λάμπα UV (υπεριώδους φωτός) επιτρέπει την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, ενώ για την εξαγωγή συμπερασμάτων τα δείγματα συγκρίνονται πάντα με δείγμα DNA αναφοράς (DNA ladder). Εδώ, συνήθως χρησιμοποιείται ο DNA ladder λ *Hinc*II/*Hind*III. Ο ρυθμός μετακίνησης των νουκλεϊκών οξέων μέσω της πηκτής αγαρόζης επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι το μοριακό βάρος των νουκλεϊκών οξέων και η συγκέντρωση της αγαρόζης.

Για την παρασκευή μίας πηκτής αγαρόζης x% w/v, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Σε γυάλινη φλάσκα προστίθενται x g αγαρόζης και 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TAE.
- Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων, έως ότου η αγαρόζη ομογενοποιηθεί πλήρως (5-10’).
- Η φλάσκα διαρκώς ανακινούμενη τοποθετείται κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να κρυώσει ελαφρώς και στη συνέχεια σε αυτήν προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/mL, η οποία αναμιγνύεται καλά με το διάλυμα.
- Στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η «χτένα»-οδηγός ώστε να διαμορφωθούν οι θέσεις φόρτωσης μέσα στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

- Το ζεστό διάλυμα αγαρόζης/EtBr αδειάζεται μέσα στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει για ~30’ σε θερμοκρασία δωματίου. Η πηκτή πρέπει να έχει πάχος 3-5 mm, και τυχόν φουσκάλες αέρα πρέπει να αφαιρούνται.
- Αφού στερεοποιηθεί, η πηκτή τοποθετείται μέσα στη συσκευή, έτσι ώστε οι θέσεις φόρτωσης να βρίσκονται κοντά στον αρνητικό πόλο, και η «χτένα» αφαιρείται, ενώ ακολούθως προστίθεται όσο διάλυμα 1x TAE χρειάζεται ώστε να καλυφθεί η πηκτή περίπου κατά 1 mm.
- Τα δείγματα των νουκλεϊκών οξέων αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης που περιέχει χρωστική (όπως μπλε της βρωμοφαινόλης) σε τελική συγκέντρωση 1x και εγχύονται στις θέσεις φόρτωσης με τη χρήση πιπέτας, ενώ σε μία από τις θέσεις φόρτωσης εγχύεται ο DNA ladder.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση (συνήθως 100 V) και τα δείγματα αφήνονται να μετακινηθούν μέσα στην πηκτή έως ότου η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης έχει διατρέξει μία ικανή απόσταση μέσα στην πηκτή. Σε μία πηκτή 1% w/v, η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μετακινείται με ταχύτητα ισοδύναμη με αυτή ενός μορίου DNA 500 bp.
- Στη συνέχεια, η συσκευή αποσυνδέεται από το ρεύμα και η πηκτή μεταφέρεται στη UV λάμπα για την παρατήρηση και φωτογράφηση των δειγμάτων.

Στην περίπτωση ανάλυσης δειγμάτων RNA, προκειμένου να αποφευχθεί η αποδιάταξή τους, το διάλυμα της αγαρόζης αποστειρώνεται πριν χρησιμοποιηθεί και η συσκευές καθαρίζονται πολύ καλά με οινόπνευμα. Επίσης, τα δείγματα RNA αφήνονται να «τρέξουν» αυστηρά για 15’ κατά προτίμηση σε τάση 80 V.

2.2.1.8 Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πηκτή αγαρόζης μέσω ηλεκτροέκλουσης

- Προκειμένου να απομονωθεί η επιθυμητή ζώνη DNA από μία πηκτή αγαρόζης, η πηκτή τοποθετείται υπό το φως μίας φορητής λάμπας UV και η ζώνη αφαιρείται από αυτήν με χρήση μίας καθαρής λεπίδας.
- Μεμβράνη διαπίδυσης κατάλληλου μεγέθους τοποθετείται μέσα σε τρυβλίο Petri που περιέχει ddH_2O, και ακολούθως σφραγίζεται από τη μία πλευρά με ειδικό πλαστικό κλιπ.

- Στη συνέχεια, το κομμάτι της αγαρόζης που αφαιρέθηκε από την πηκτή εισάγεται μέσα στο σωλήνα διαπίδυσης και, ανάλογα με την ποσότητα του DNA, προστίθενται σε αυτό 500-1,000 μL ddH_2O.
- Η μεμβράνη σφραγίζεται και από την άλλη πλευρά με ειδικό πλαστικό κλιπ με τέτοιο τρόπο ώστε να μην παγιδευτεί αέρας κατά το δυνατόν μέσα σε αυτήν.
- Η σφραγισμένη μεμβράνη τοποθετείται μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με το κομμάτι αγαρόζης προς τη μεριά του αρνητικού πόλου, ούτως ώστε λόγω της διαφοράς δυναμικού το DNA να εξέλθει της πηκτής και να διαχυθεί στο ddH_2O.
- Εφαρμόζεται τάση 90 V για 30’, και ακολούθως η μεμβράνη ελέγχεται υπό το φως λάμπας UV για να διαπιστωθεί ότι το DNA έχει μεταφερθεί από την πηκτή στο ddH_2O.
- Ακολούθως, αντιστρέφοντας τη θέση των καλωδίων στο τροφοδοτικό της συσκευής ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται τάση με αντίθετη κατεύθυνση για 10”, ούτως ώστε τυχόν υπολείμματα DNA που έχουν προσκολληθεί στο εσωτερικό της μεμβράνης να αποκολληθούν.
- Το DNA μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου eppendorf και ακολουθεί καθαρισμός του με διάλυμα PCI (§2.2.1.9).

Εναλλακτικά, μετά την αφαίρεση της ζώνης που περιέχει το DNA από την πηκτή, ο καθαρισμός της πραγματοποιείται μέσω στήλης καθαρισμού με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας χρησιμοποιώντας ειδικό εμπορικό κιτ απομόνωσης DNA (GeneJET gel extraction kit, Thermo Fischer Scientific, USA).

2.2.1.9 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI)

- Στο δείγμα DNA ή RNA που πρόκειται να καθαριστεί προστίθεται ddH_2O σε σωλήνα τύπου eppendorf μέχρι τα 400 μL.
- Προστίθενται ακόμη 400 μL διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI). Ακολουθεί καλή μηχανική ανάδευση για 30” και φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 60”.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα για μία φορά.

- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και σε αυτήν προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30” και φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 60”.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και σε αυτήν προστίθεται 1/10 του όγκου NH_4Ac (250 mM) και 2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100%. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30” και φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 60”.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C για 16h.
- Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm στους 4 °C για 15’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα πλένεται με 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 10’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5’.
- Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH_2O.

2.2.1.10 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Η συγκέντρωση και καθαρότητα του RNA και του DNA προσδιορίζονται φωτομετρικά, με χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop (NanoDrop™ ND-1000, Thermo Fischer Scientific, USA). Το φασματοφωτόμετρο NanoDrop συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω του οποίου προβάλλονται από το αντίστοιχο πρόγραμμα τα δεδομένα της μέτρησης που πραγματοποιείται από το φασματοφωτόμετρο. Με το NanoDrop είναι δυνατό να μετρηθούν δείγματα που βρίσκονται σε 50 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων που μπορούν να μετρηθούν από ένα κλασσικό φωτόμετρο.

Για τη μέτρηση τοποθετείται με τη βοήθεια πιπέτας 1-1.5 μL από το δείγμα των νουκλεϊκών οξέων στην ειδική υποδοχή στη βάση του οργάνου, και πραγματοποιείται η μέτρηση από το όργανο. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων, το λογισμικό του φασματοφωτόμετρου βασίζεται στην εξίσωση του νόμου των Beer-Lambert, σύμφωνα με την οποία: $c = (A * e) / b$, όπου c: η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα (ng/μL), A: η απορρόφηση του δείγματος (AU), e: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (ο οποίος εξαρτάται από το μήκος κύματος, ng-cm/μL), b: είναι το μήκος της διαδρομής (cm). Η τιμή του συντελεστή μοριακής

απορροφητικότητας ποικίλλει ανάλογα με το είδος του προς ανάλυση νουκλεϊκού οξέος. Συγκεκριμένα, οι τιμές του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας που είναι ευρέως αποδεκτές για τα νουκλεϊκά οξέα είναι 50 ng-cm/μL για το δίκλωνο DNA, 33 ng-cm/μL για το μονόκλωνο DNA και 40 ng-cm/μL για το μονόκλωνο RNA.

Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων, το λογισμικό με το οποίο συνοδεύεται το φασματοφωτόμετρο NanoDrop™ υπολογίζει την απορρόφηση του προς ανάλυση δείγματος σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (230, 260 και 280 nm), των οποίων οι λόγοι θα πρέπει να εμπίπτουν εντός ορισμένων ορίων. Ειδικότερα, θα πρέπει ο λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} να κυμαίνεται περίπου στο 1.8 για το DNA και στο 2.0 για το RNA. Ομοίως, ο λόγος A_{260}/A_{230} θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.8 και 2.2 για το DNA και το RNA, αντίστοιχα, και να είναι μεγαλύτερος του αντίστοιχου λόγου A_{260}/A_{280}.

2.2.2 Κλωνοποιήσεις

2.2.2.1 Γενική διαδικασία κλωνοποίησης

Κλωνοποίηση ονομάζεται η διαδικασία ενσωμάτωσης ενός επιθυμητού τμήματος DNA, του ενθέματος (insert), σε ένα άλλο μεγαλύτερο τμήμα DNA που αντιστοιχεί στο φορέα (vector), με σκοπό την παραγωγή του συγκεκριμένου μορίου DNA σε μεγάλες ποσότητες μέσω μετασχηματισμού βακτηρίων. Για την επίτευξη του ενθέματος απαιτείται είτε η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA μέσω αλυσ(ιδ)ωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, §2.2.1.5), είτε η απομόνωσή του από έναν ήδη υπάρχοντα φορέα μέσω πέψης του με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες (υποκλωνοποίηση). Η χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών για την πέψη τόσο του ενθέματος, όσο και του φορέα, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συμβατών μεταξύ τους άκρων και έτσι την επιτυχή σύνδεσή τους για τη δημιουργία του επιθυμητού πλασμιδίου. Τα επακόλουθα στάδια της γενικής διαδικασίας κλωνοποίησης περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

2.2.2.1.1 Προετοιμασία φορέα - Αποφωσφορυλίωση

Ο κυκλικός φορέας στον οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί το προϊόν της PCR ή το προϊόν της πέψης άλλου φορέα υφίσταται υδρόλυση με την κατάλληλη περιοριστική

ενδονουκλεάση μέσα σε υδατόλουτρο στις συνθήκες που περιγράφονται από τον κατασκευαστή του κάθε ενζύμου (NEB, USA; Takara, Japan; Minotech, Greece), ούτως ώστε να προκύψει η γραμμική μορφή του φορέα. Ακολουθεί έλεγχος μικρής ποσότητας δείγματος σε πηκτή αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί η πλήρης πέψη του φορέα, και στη συνέχεια ο γραμμικός φορέας υφίσταται καθαρισμό με διάλυμα PCI.

Προκειμένου να αποφευχθεί η επανακυκλοποίηση του φορέα και να βελτιστοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η απόδοση της κλωνοποίησης, ακολουθεί αντίδραση αποφωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιείται υδρόλυση των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στα 5’ άκρα του γραμμικού μορίου DNA. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται ο γραμμικός φορέας, το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση εντέρου μόσχου CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Thermo Fischer Scientific, USA), το ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης και αποστειρωμένο ddH_2O. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37 °C για 30’, ενώ ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85 °C για 15’, και τελικά ο γραμμικός φορέας καθαρίζεται ξανά σε διάλυμα PCI.

2.2.2.1.2 Προετοιμασία ενθέματος

Μετά την ενίσχυση μέσω PCR (§2.2.1.5) της επιθυμητής αλληλουχίας DNA που θα αποτελέσει το ένθεμα, και προκειμένου για κλωνοποίηση σε γραμμικό φορέα που έχει ήδη αποφωσφορυλιωθεί, απαιτείται η φωσφορυλίωση του προϊόντος της PCR, ούτως ώστε να είναι δυνατή στη συνέχεια η σύνδεση των άκρων τους. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί φωσφορυλίωση των εκκινητών της PCR πριν την ενίσχυση του ενθέματος.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται το ένζυμο T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση (PNK, polynucleotide kinase, Thermo Fischer Scientific, USA), το οποίο έχει την ιδιότητα να καταλύει τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από μόρια ATP στο 5’ άκρο μονόκλωνων ή δίκλωνων μορίων νουκλεϊκών οξέων. Για τις ανάγκες της αντίδρασης, αναμιγνύονται σε σωλήνα τύπου eppendorf: το προϊόν της PCR για το ένθεμα ή ο επιθυμητός εκκινητής (20 μg), ρυθμιστικό διάλυμα A 1x, ATP (1 mM), T4 PNK (30 U) και αποστειρωμένο ddH_2O μέχρι τελικού όγκου 100 μL. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37 °C για 1h, ενώ στη συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται στους 75 °C για 10’. Τελικά,

το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με διάλυμα PCI σύμφωνα με το σύνηθες πρωτόκολλο (§2.2.1.9), ενώ ειδικά για την περίπτωση φωσφορυλίωσης εκκινητών η κατακρήμνιση γίνεται χρησιμοποιώντας NaOAc 300 mM ως άλας.

2.2.2.1.3 Αντίδραση σύνδεσης - Δημιουργία τυφλών άκρων

Για να ενωθεί ο πλασμιδιακός φορέας με το αντίστοιχο ένθεμα πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσής τους (ligation) με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Η λιγάση, παρουσία ATP, έχει την ικανότητα να καταλύει τη δημιουργία ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ 5’-φωσφορικών και 3’-υδροξυλικών DNA άκρων, και μπορεί να συνδέει τμήματα DNA που διαθέτουν είτε συμπληρωματικά (sticky, cohesive), είτε τυφλά άκρα (blunt). Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται σε κατά το δυνατόν ισομοριακές ποσότητες τα DNAs του φορέα και του ενθέματος, και επιπλέον ATP (1 mM), T4 DNA ligase (5 U, Thermo Fischer Scientific, USA), ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης και ddH_2O (συνήθως μέχρι τελικού όγκου 10 μL). Η διάρκεια της αντίδρασης κυμαίνεται από τουλάχιστον 1 έως 16h. Προκειμένου για μόρια DNA με συμπληρωματικά άκρα, η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16 °C, ενώ για μόρια DNA με τυφλά άκρα γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην περίπτωση που για τις ανάγκες της κλωνοποίησης απαιτείται η μετατροπή των συμπληρωματικών άκρων σε τυφλά, πριν από την αντίδραση σύνδεσης απαιτείται να προηγηθεί επεξεργασία του DNA με το ένζυμο T4 DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA), το οποίο έχει την ικανότητα να συμπληρώνει τα 5’ προεξέχοντα άκρα και/ή να αποκόπτει τα 3’ προεξέχοντα άκρα. Έτσι, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται το DNA στο οποίο είναι επιθυμητή η τροποποίηση, ώστε να έχει τυφλά άκρα, dNTPs (0.1 mM), T4 DNA πολυμεράση (1 U/μg DNA, Thermo Fischer Scientific, USA), ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και αποστειρωμένο ddH_2O. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37 °C για 15’.

2.2.2.1.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Για το μετασχηματισμό των «δεκτικών» βακτηρίων (competent cells) του στελέχους DH5a™ που ανήκει στο είδος *Escherichia coli* με το επιθυμητό πλασμίδιο, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA που κατασκευάστηκε (1-200 ng) προστίθεται σε 100 μL βακτηρίων DH5a^{TM} μέσα σε σωλήνα τύπου eppendorf (1.5 mL), και μαζί αφήνονται να επωαστούν για 30’ στον πάγο.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ των βακτηρίων στους 42 °C για 2-3’.
- Τα βακτήρια επανατοποθετούνται στον πάγο για 1-2’.
- Στα βακτήρια προστίθεται 1 mL θρεπτικού υλικού LB και αφήνονται να επωαστούν για 1h στους 37 °C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 3000 rpm για 5’, αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού LB (100 μL).
- Τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία Petri που περιέχουν LB/άγαρ παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (εδώ, αμπικιλλίνη 100 μg/mL) στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα το επιθυμητό πλασμίδιο. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης και τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37 °C για 16h.

2.2.2.1.5 Επιλογή αποικιών και υγρή καλλιέργεια

- Σε σωλήνες χωρητικότητας 12-15 mL προστίθενται 3 mL θρεπτικού υλικού LB σε συνδυασμό με το κατάλληλο αντιβιοτικό (εδώ, αμπικιλλίνη 100 μg/mL).
- Με χρήση αποστειρωμένου ρύγχους, επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες από τα τρυβλία, οι οποίες προστίθενται στους σωλήνες με το θρεπτικό υλικό.
- Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση στις 220 rpm για 16h.

2.2.2.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

Οι υγρές καλλιέργειες συλλέγονται και το ήμισυ του όγκου τους φυγοκεντρείται σε σωλήνες τύπου eppendorf στις 13,000 rpm για 2’. Ακολούθως, πραγματοποιείται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep), χρησιμοποιώντας μία από τις παρακάτω μεθόδους:

Μέθοδος αλκαλικής λύσης

- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μL παγωμένου Διαλύματος I στο οποίο έχει προστεθεί RNάση A (100 μg/mL, AppliChem GmbH, Germany) με μηχανική ανάδευση.
- Προστίθενται 250 μL Διαλύματος II, ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα και το μίγμα αφήνεται στον πάγκο για 3-5’ ή μέχρι να γίνει διαυγές.
- Προστίθενται 350 μL Διαλύματος III και ακολουθεί καλή ανάμιξη με μηχανική ανάδευση.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15’.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf και σε αυτόν προστίθενται 700 μL ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 5’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5’.
- Τελικά, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε 50 μL ddH_2O.

Μέθοδος λυσοζύμης

- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και στο βακτηριακό ίζημα προστίθενται 400 μL διαλύματος λύσης και 50 μg/mL λυσοζύμης (AppliChem GmbH, Germany).
- Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10’.
- Στα δείγματα προστίθενται 200 μL 1% SDS σε διάλυμα TE.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στους 37 °C για 10’.
- Προστίθενται 200 μL οξικού καλίου (1.25 M), ακολουθεί καλή ανάδευση με επαναλαμβανόμενη αναστροφή των σωλήνων και τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 30’.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15’.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf και σε αυτό προστίθενται 800 μL ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα.

- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 10’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 5’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5’.
- Τελικά, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε 50 μL ddH_2O.

Ανεξαρτήτως της μεθόδου απομόνωσης που θα επιλεχθεί, το πλασμιδιακό DNA στη συνέχεια υφίσταται έλεγχο ακεραιότητας και αξιοπιστίας μέσω πέψης με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ώστε να διαπιστωθεί ότι αποτελεί όντως τον επιθυμητό κλώνο.

2.2.2.1.7 Πολλαπλασιασμός του κλώνου και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία ή μεγάλη κλίμακα

Μετά την ταυτοποίηση του επιθυμητού κλώνου, ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός αυτού εμβολιάζοντας θρεπτικό υλικό LB ή TB παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (εδώ αμπικιλλίνη 100 μg/mL) με το υπόλοιπο ήμισυ της αρχικής υγρής καλλιέργειας. Ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων, ο επιθυμητός κλώνος παράγεται σε μεσαίας (Midi-prep) ή μεγάλης κλίμακας ποσότητες (Maxi-prep).

Midi-prep

- Η υγρή καλλιέργεια του κλώνου προστίθεται σε 20 mL LB μέσα σε σωλήνα τύπου falcon χωρητικότητας 50 mL, και τοποθετείται σε κλίβανο επώασης στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 220 rpm για 16h.
- Η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 7,500 rpm για 8’.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 400 μL Διαλύματος I (G.E.T.).
- Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου eppendorf χωρητικότητας 2 mL και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5’.
- Στο μίγμα προστίθενται 800 μL φρέσκου Διαλύματος II και ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή (5-10 φορές). Το δείγμα αφήνεται στους 4 °C για 10’.

- Προστίθενται 650 mL Διαλύματος III, ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα και σύντομη μηχανική ανάδευση (3”). Το δείγμα αφήνεται στους 4 °C για 10’.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 20’.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο τύπου σωλήνα eppendorf (2 mL) και σε αυτό προστίθενται 15 μL RNάσης A (10 mg/mL, AppliChem GmbH, Germany). Το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 20’.
- Ακολούθως, το δείγμα διαμοιράζεται ισομερώς σε 2 σωλήνες τύπου eppendorf (2 mL).
- Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 700 μL διαλύματος PCI και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5’.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται 700 μL διαλύματος PCI και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5’.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται 700 μL χλωροφορμίου και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5’.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται 800 μL αιθανόλης 100% και ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή.
- Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C για 5-10’ και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 20’.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται, στο κάθε ίζημα προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5’.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και τα ιζήματα αφήνονται να στεγνώσουν.
- Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 80 μL ddH_2O.
- Στα δείγματα προστίθενται 20 μL NaCl 4 M και 100 μL 13% PEG-8000, και ακολούθως διατηρούνται στους 4 °C για 2-16h.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 15-20’.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και στα ιζήματα (που δεν είναι ορατά) προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 5’.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και στα ιζήματα (που πλέον είναι ορατά) προστίθενται ξανά 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 5’.

- Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 80-100 μL ddH_2O συνολικά και το περιεχόμενο των δύο σωλήνων ενοποιείται σε έναν.

Maxi-prep

- Η υγρή καλλιέργεια του επιθυμητού κλώνου προστίθεται σε 250 mL αποστειρωμένου TB, και τοποθετείται σε κλίβανο επώασης στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 220 rpm για 16h.
- Ακολουθεί συλλογή της υγρής καλλιέργειας και φυγοκέντρηση σε σωλήνες τύπου falcon των 50 mL στις 7,800 rpm για 10’.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθενται 5 mL παγωμένου Διαλύματος I (G.E.T.) που περιέχει 50 mg λυσοζύμης (AppliChem GmbH, Germany), μέσα στο οποίο επαναδιαλύεται το βακτηριακό ίζημα με μηχανική ανάδευση. Το μίγμα αφήνεται στους 4 °C για 30’.
- Προστίθενται 10 mL Διαλύματος II, ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα και το μίγμα αφήνεται στους 4 °C για 10’.
- Προστίθενται 7.5 mL Διαλύματος III, ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα και το μίγμα αφήνεται στους 4 °C για 10-60’.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 7,800 rpm στους 4 °C για 15’.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon (50 mL) και σε αυτόν προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα και ψύξη στους -20 °C για 10-30’, ή για 16h.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 5,500 rpm για 15’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 5 mL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 7,800 rpm για 5’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα των νουκλεϊκών οξέων επαναδιαλύεται σε 3.2 mL ddH_2O.
- Στο δείγμα προστίθενται 3.4 g χλωριούχου καισίου (CsCl), γίνεται έντονη μηχανική ανάδευση, και ακολούθως προστίθεται 240 μL βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/mL (EtBr, 0.75 mg/mL).
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 7,800 rpm για 15’.

- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ειδική κάψουλα, η οποία σφραγίζεται με θέρμανση και φυγοκεντρείται σε υπερφυγόκεντρο στις 100,000 rpm για 5h. (Επειδή απαιτείται ζυγός αριθμός δειγμάτων για την υπερφυγοκέντρηση, οι κάψουλες προηγουμένως ζυγίζονται ώστε να έχουν το ίδιο βάρος.)
- Από τις δύο έντονες ζώνες του DNA που έχουν δημιουργηθεί μετά την υπερφυγοκέντρηση, επιλέγεται η δεύτερη (κατώτερη), η οποία αντιστοιχεί στο υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA. Η λήψη του DNA γίνεται με σύριγγα, και στη συνέχεια αυτό αραιώνεται σε 1 mL ddH_2O μέσα σε σωλήνα τύπου falcon (15 mL).
- Ακολουθεί προσθήκη 3 mL ενυδατωμένης (κορεσμένης) βουτανόλης για την απομάκρυνση του EtBr, καλή ανακίνηση και απόρριψη της ανώτερης φάσης.
- Το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται 5 φορές ακόμα.
- Προστίθεται αιθανόλη 100% μέχρι τα 12 mL, καλή ανακίνηση και ψύξη στους -20 °C για 16h ή στους -80 °C για 30-45’, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 8,500 rpm για 25’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί πλύση με διάλυμα αιθανόλης 70%, ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 7,500 rpm για 20’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στους 37 °C για 10’.
- Τελικά, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε ~500-1,000 μL ddH_2O.

Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε ελέγχεται μέσω πέψης με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ώστε να επιβεβαιωθεί η ταυτότητά του. Εναλλακτικά, η παραγωγή του επιθυμητού πλασμιδιακού DNA σε μεγάλες ποσότητες πραγματοποιείται με χρήση εμπορικού κιτ (Fast ion plasmid maxi kit, Yeastern Biotech, Taiwan).

2.2.2.1.8 Αλληλούχιση πλασμιδιακού DNA

Στην περίπτωση κυρίως των κλωνοποιήσεων που αφορούν ολόκληρα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs), και με σκοπό την πιστοποίηση της ταυτότητας της αλληλουχίας του κλωνοποιημένου ενθέματος, αλλά και την ανίχνευση τυχόν σημειακών λαθών που θα αλλοιώσουν την αμινοξική αλληλουχία του

κλωνοποιημένου γονιδίου, πραγματοποιείται DNA αλληλούχιση (sequencing) του πλασμιδίου που απομονώθηκε. Η αλληλούχιση μπορεί να αφορά ολόκληρο το ένθεμα, ή μόνο τα σημεία ένωσης του ενθέματος με το φορέα, και πραγματοποιείται σε εργαστήρια ιδιωτικής εταιρείας (Biogenomica, CEMIA ή MALVA).

Η αλληλούχιση που εφαρμόζεται εδώ βασίζεται στη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας (chain terminator) (Sanger et al., 1977), και αποτελεί μία αυτοματοποιημένη διαδικασία που ονομάζεται Dye-terminator. Για την τεχνική απαιτείται ένα υπόστρωμα/μήτρα DNA (πλασμίδιο), ένας ειδικός εκκινητής, μία DNA πολυμεράση, φυσικού τύπου νουκλεοτίδια (dNTPs) και τροποποιημένα δι-δεοξυ-νουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα τροποποιημένα ddNTPs στερούνται της ομάδας 3'-OH που απαιτείται για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο διαδοχικών νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα να τερματίζουν την επιμήκυνση του DNA. Παράλληλα, κάθε ένα από τα 4 ddNTPs φέρει χρώση με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, η οποία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι, πραγματοποιώντας την αντίδραση για ένα δείγμα DNA παράγεται ένα χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην ηλεκτρονική μορφή της αλληλουχίας. Η ανάλυση των αλληλουχιών πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος BioEdit (USA).

2.2.2.2 Κλωνοποιήσεις τμημάτων γονιδίων των RNAi μονοπατιών στον πλασμιδιακό φορέα pLitmus

Ο pLitmus είναι ένας μικρός πλασμιδιακός φορέας της *E. coli*, ο οποίος παράγει υψηλό αριθμό αντιγράφων. Ο φορέας αυτός είναι κατάλληλα σχεδιασμένος έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αποτελεσματική μεταγραφή του σε μόρια dsRNA, καθώς περιλαμβάνει έναν T7 υποκινητή σε κάθε DNA αλυσίδα του, ο οποίος αναγνωρίζεται από την T7 πολυμεράση για να μπορεί να οδηγεί σε *in vitro* μεταγραφή της γονιδιακής αλληλουχίας που έπεται αυτού. Μετά τον T7 υποκινητή, ακολουθεί μία περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS, multiple cloning site), η οποία είναι εντός πλαισίου ανάγνωσης με το γονίδιο *lacZα*, γεγονός που επιτρέπει τη χρωματική σάρωση των κλώνων ως προς το γονιδιακό ένθεμα με χρήση της α-συμπληρωματικότητας (Evans et al., 1995).

Τμήματα των γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό του *B. mori* πολλαπλασιάστηκαν με PCR χρησιμοποιώντας την *Taq* DNA πολυμεράση (HyTest, Finland) και κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pLitmus (28i ή 38i) (Evans et al., 1995). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση περικλείουν τουλάχιστον ένα εσώνιο και παρατίθενται στον **Πίνακα Π3**. Για τις κλωνοποιήσεις στον pLitmus χρησιμοποιήθηκαν τμήματα των γονιδίων-στόχων και όχι ολόκληρο το ORF, καθώς για την καλύτερη λειτουργικότητα των δίκλωνων RNA (dsRNA) αυτά θα πρέπει να έχουν μήκος από 300 έως 600 βάσεις.

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην αντίδραση της PCR ήταν: 94 °C για 3’, 35 κύκλοι των 94 °C για 45”, 60 °C για 45” και 72 °C για 30”, και 72 °C για 10’. Ειδικά για την αντίδραση PCR του γονιδίου *BmR2D2* εφαρμόστηκε το παραπάνω πρόγραμμα με τη διαφορά ότι η υβριδοποίηση των εκκινητών έγινε στους 55 °C και πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι.

Για τις κλωνοποιήσεις των γονιδίων στο φορέα 38i, μετά την ενίσχυση των γονιδιακών αλληλουχιών από την PCR, πραγματοποιήθηκε φωσφορυλίωση, δημιουργία τυφλών άκρων, καθαρισμός με διάλυμα PCI και εν συνεχεία εισαγωγή στη θέση *Eco*RV του φορέα. Για τις κλωνοποιήσεις στο φορέα 28i, οι γονιδιακές αλληλουχίες αρχικά κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega, USA), ο οποίος φέρει βάσεις T στα 3’ άκρα του για τη διευκόλυνση της ένθεσης τμημάτων PCR που παράγονται από θερμοσταθερές πολυμεράσες, όπως η *Taq*. Έπειτα, ακολούθησε *Eco*RI εκτομή των αλληλουχιών από το φορέα pGEM-T Easy, και εν συνεχεία, αυτές υποκλωνοποιήθηκαν στην αντίστοιχη θέση του pLitmus 28i.

Σύμφωνα με τις παραπάνω διαδικασίες, δημιουργήθηκαν οι φορείς 38i-Ago1, 38i-Ago2, 28i-Ago3, 38i-Aub, 38i-Dcr1, 38i-Dcr2, 38i-Loqs, 28i-MalE, 28i-R2D2, 38i-Translin και 38i-Trax-B. Στη συνέχεια, οι κλώνοι που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση μορίων dsRNA με τη βοήθεια της T7 πολυμεράσης (§2.2.1.1), έτσι ώστε αυτά ακολούθως να εφαρμοστούν σε λειτουργικά πειράματα βιοφωταύγειας.

2.2.2.3 Κλωνοποιήσεις ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης στον πλασμιδιακό φορέα pEA

Ο pEA είναι ένας πλασμιδιακός φορέας ο οποίος χρησιμοποιείται σε συστήματα Λεπιδοπτέρων για την ενισχυμένη έκφραση του εκάστοτε ενθέματος, καθώς ενισχύει κατά 100 φορές τη συστατική έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου (Lu et al., 1997). Ο φορέας αυτός περιλαμβάνει την περιοχή hr3 (αλληλουχία ενίσχυσης της ομόλογης περιοχής 3 του μπακουλοϊού BmNPV, Lu et al., 1997), τον υποκινητή της κυτταροπλασματικής ακτίνης A3 του *B. mori*, μία θέση MCS, καθώς και τη μη-μεταφραζόμενη 3' περιοχή του γονιδίου της ακτίνης του *B. mori* που διαθέτει σήματα πολυαδενυλίωσης (Douris et al., 2006).

Το ORF του επιθυμητού γονιδίου κλωνοποιείται μεταξύ της θέσης του ενισχυτή της ακτίνης A3 και της poly-$[A]^+$ περιοχής της ακτίνης. Στο 5΄ ή το 3΄ άκρο του γονιδίου μπορεί να προστεθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντιστοιχεί σε κάποιον επίτοπο (Myc, His ή Flag) έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση της έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με χρήση του κατάλληλου αντισώματος (Douris et al., 2006).

Προκειμένου η κλωνοποίηση να γίνει εντός πλαισίου ανάγνωσης με τον εκάστοτε αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό επίτοπο, οι εκκινητές ευθείας κατεύθυνσης (F, forward) που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση εξυπηρετείται να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να περιέχουν μία θέση κλωνοποίησης *Bgl*II. Το ίδιο ισχύει και για τους εκκινητές αντίστροφης κατεύθυνσης (R, reverse) μόνο για την περίπτωση ενός καρβοξυτελικά σημασμένου φορέα pEA. Επιπλέον, οι εν λόγω F εκκινητές περιέχουν την αλληλουχία Kozak (Kozak, 1987) και το κωδικόνιο έναρξης ATG (**Πίνακας Π4**).

2.2.2.3.1 Ο φορέας pEA-BmAgo2-Myc.His

Το ORF του γονιδίου *BmAgo2* (AB206986.2, μήκους 3,117 bp) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEA-Myc.His (Douris et al., 2006). Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές BmAgo2-*Bgl*II-F και BmAgo2-*Bgl*II-R (**Πίνακας Π4**), ενώ το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε χρησιμοποιώντας ένα ενζυμικό μίγμα *Taq* (HyTest, Finland) και *Pfu* DNA πολυμεράσης (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 94 °C για 2', 10 κύκλοι των 94 °C για 45", 40 °C για 60" και 72 °C για 4.5', ομοίως 25 κύκλοι των 94 °C για

45”, 60 °C για 60” και 68 °C για 5’, και 68 °C για 10’. Τέλος, το προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση PCR αλληλουχήθηκε για να επιβεβαιωθεί ότι αντιστοιχεί στο ORF του γονιδίου *BmAgo2*.

Ο φορέας pEA-BmAgo2-Myc.His χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων Bm5 σε συνδυασμό με το βοηθητικό φορέα pBmIE1. Έτσι, επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western ότι η πρωτεΐνη BmAgo2-Myc.His εκφράζεται επιτυχώς με μέγεθος 1,067 αμινοξικά κατάλοιπα και μοριακό βάρος 120 kDa, συμπεριλαμβανομένου του επιτόπου Myc.His.

2.2.2.3.2 Ο φορέας pEA-BmAgo3-Myc.His

Το ORF του γονιδίου *BmAgo3* (NM_001104597.2, μήκους 2,781 bp) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEA-Myc.His (Douris et al., 2006). Λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους του γονιδίου, η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Έτσι, αρχικά δημιουργήθηκαν οι δύο ενδιάμεσοι φορείς pGEM-T-Easy-Ago3 5’-ORF (1-1909) και pGEM-T-Easy-Ago3 3’-ORF (1485-2781). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών, αντίστοιχα: BmAgo3-ORF-F/BmAgo3-1909R και BmAgo3-1485F/BmAgo3-ORF-R (**Πίνακας Π3 και Π4**).

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιώντας ένα ενζυμικό μίγμα *Taq* (HyTest, Finland) και *Pfu* DNA πολυμεράσης (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 94 °C για 2’, 10 κύκλοι των 94 °C για 30”, 48 °C για 30” και 72 °C για 4’, ομοίως 30 κύκλοι των 94 °C για 30”, 51 °C για 30” και 72 °C για 4’, και 72 °C για 10’. Αντίστοιχα, στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε η *Platinum Taq HF* (High Fidelity) DNA πολυμεράση (Invitrogen, USA) στο ακόλουθο πρόγραμμα: 94 °C για 2’, 10 κύκλοι των 94 °C για 45”, 48 °C για 45” και 72 °C για 1.5’, ομοίως 30 κύκλοι των 94 °C για 45”, 50 °C για 45” και 72 °C για 1.5’, και 72 °C για 10’.

Στη συνέχεια, έγινε πέψη του pGEM-T-Easy-Ago3 5’-ORF (1-1909) με *Nco*I/*Sac*II, ούτως ώστε να απαλειφθεί η 1η θέση περιορισμού *Not*I που προηγείτο του ενθέματος, και έτσι δημιουργήθηκε ο φορέας pGEM-T-Easy-Ago3 5’-ORF (1-1909) [Δ*Not*I1]. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πέψη και των δύο κλώνων Ago3 (5’-[Δ*Not*I1] και 3’-ORF) με τα ένζυμα *Eco*RV/*Not*I, καθώς το γονίδιο *BmAgo3* διαθέτει μοναδική θέση αναγνώρισης για το ένζυμο *Eco*RV στο νουκλεοτίδιο 1668, ενώ ο φορέας pGEM-T-Easy

διαθέτει θέση αναγνώρισης από το ένζυμο *Not*I η οποία έπεται της αλληλουχίας του ενθέματος. Διαδοχικά, με τη βοήθεια λιγάσης (Thermo Fischer Scientific, USA), έγινε ένωση των δύο τμημάτων pGEM-T-Easy-Ago3 5'-ORF (1-1668) [Δ*Not*I1] και Ago3 (1668-2781), τα οποία έφεραν συμπληρωματικά κολλώδη άκρα *Eco*RV/*Not*I.

Στη συνέχεια, ο νέος φορέας pGEM-T-Easy-Ago3 ORF [Δ*Not*I1] χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα/μήτρα για την αντίδραση PCR σε συνδυασμό με τους εκκινητές BmAgo3-*Bgl*II-F και BmAgo3-*Bgl*II-R. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας το ένζυμο *Platinum Taq HF* DNA πολυμεράση (Invitrogen, USA) ήταν: 94 °C για 2', 40 κύκλοι των 94 °C για 30", 50 °C για 30" και 72 °C για 5.5', και 72 °C για 15'.

Το προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση PCR κλωνοποιήθηκε στον pEA-Myc.His, ενώ τα σημεία ένωσης του ενθέματος με το φορέα pEA-Myc.His αλληλουχήθηκαν ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η κλωνοποίηση έγινε εντός πλαισίου ανάγνωσης με τον καρβοξυτελικό επίτοπο Myc.His. Τελικά, ο φορέας pEA-BmAgo3-Myc.His χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων Bm5 σε συνδυασμό με το βοηθητικό φορέα pBmIE1. Έτσι, επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, ότι η πρωτεΐνη BmAgo3-Myc.His εκφράζεται επιτυχώς με μέγεθος 955 αμινοξικών καταλοίπων και μοριακό βάρος 108 kDa, συμπεριλαμβανομένου του επιτόπου Myc.His.

2.2.2.3.3 Ο φορέας pEA-Flag-BmAub

Το ORF του γονιδίου *BmAub* (NM_001104596.2, μήκους 2,700 bp) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEA-Flag (Douris et al., 2006), χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο φορέα υποκλωνοποίησης τον pGEM-T-Easy.

Ειδικότερα, αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές BmAub-ORF-F και BmAub-ORF-R (**Πίνακας Π4**), οι οποίοι περιέχουν αντίστοιχα τα κωδικόνια έναρξης και λήξης του γονιδίου *BmAub*. Ακολούθως, το προϊόν της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκε στο φορέα pGEM-T-Easy. Ο φορέας αυτός χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως υπόστρωμα/μήτρα για μία νέα PCR, σε συνδυασμό με έναν εκκινητή ευθείας κατεύθυνσης (BmAub-*Bgl*II-F, **Πίνακας Π4**) κατάλληλα σχεδιασμένο για κλωνοποίηση στο φορέα pEA-Flag, και με τον εκκινητή BmAub-ORF-R που περιγράφηκε ήδη. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στις αντιδράσεις PCR

χρησιμοποιώντας την *Platinum Taq HF* DNA πολυμεράση (Invitrogen, USA) ήταν: 94 °C για 3’, 10 κύκλοι των 94 °C για 45”, 48 °C για 45” και 72 °C για 2.5’, ομοίως 30 κύκλοι των 95 °C για 45”, 50 °C για 45” και 72 °C για 2.5’, και 72 °C για 12’.

Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο φορέα pEA-Flag και, μετά την κλωνοποίηση, τα σημεία ένωσης του γονιδίου *BmAub* με το φορέα pEA-Flag αλληλουχήθηκαν ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η κλωνοποίηση έγινε εντός πλαισίου ανάγνωσης με τον αμινοτελικό επίτοπο Flag. Τελικά, έπειτα από διαμόλυνση κυττάρων Bm5 σε συνδυασμό με τον pBmIE1, επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western ότι η πρωτεΐνη Flag-Aub που αποτελείται από 911 αμινοξικά κατάλοιπα, και με μοριακό βάρος 104 kDa, εκφράζεται κανονικά, συμπεριλαμβανομένου του επιτόπου Flag.

2.2.2.3.4 Ο φορέας pEA-Myc-BmDcr2

Το ORF του γονιδίου *BmDcr2* (AB566386.1, μήκους 5,034 bp) υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEA-N-Myc (Douris et al., 2006) από τον αρχικό φορέα pEA-Flag-BmDcr2 (Liu et al., 2012). Ειδικότερα, αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές BmDcr2-*Bgl*II-F και BmDcr2-*Bgl*II-R (**Πίνακας Π4**). Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας την *Pfu* DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 95 °C για 3’, 10 κύκλοι των 95 °C για 45”, 55 °C για 45” και 72 °C για 5’, ομοίως 30 κύκλοι των 95 °C για 45”, 60 °C για 45” και 72 °C για 5’, και 72 °C για 15’.

Μετά από πέψη με το ένζυμο *Bgl*II και φωσφορυλίωση, το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε ακολούθως στο αποφωσφορυλιωμένο γραμμικό πλασμίδιο pEA-N-Myc που είχε υποστεί πέψη με *Bam*HI. Μετά την κλωνοποίηση, τα σημεία ένωσης του ενθέματος με το φορέα pEA-Myc-BmDcr2 αλληλουχήθηκαν, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η κλωνοποίηση έγινε εντός ORF.

Τελικά, ο φορέας pEA-Myc-BmDcr2 χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων Bm5 σε συνδυασμό με το βοηθητικό φορέα pBmIE1, και έτσι, επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western ότι η πρωτεΐνη Myc-BmDcr2 εκφράζεται επιτυχώς με μέγεθος 1,687 αμινοξικών καταλοίπων, και μοριακό βάρος 192 kDa, συμπεριλαμβανομένου του επιτόπου Myc.

2.2.2.3.5 Οι φορείς pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-Flag-BmR2D2

Το ORF του γονιδίου *BmR2D2* (NM_001195078.1, μήκους 1,023 bp), υποκλωνοποιήθηκε στους πλασμιδιακούς φορείς pEA-Myc.His και pEA-Flag (Douris et al., 2006), έπειτα από την ευγενική παραχώρηση του πατρικού φορέα pENTR11-BmR2D2 από τον Dr. T. Kusakabe (Πανεπιστήμιο Kyushu, Fukuoka, Japan).

Για την υποκλωνοποίηση του *BmR2D2* στο φορέα pEA-Myc.His, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές BmR2D2-*Bgl*II-F και BmR2D2-*Bgl*II-R (**Πίνακας Π4**), ενώ για την υποκλωνοποίηση στο φορέα pEA-Flag χρειάστηκαν ορισμένα επιπλέον ενδιάμεσα στάδια. Ειδικότερα, αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές BmR2D2-*Bgl*II-F και BmR2D2-R2 (**Πίνακας Π4**), όπου ο δεύτερος εκκινητής συμπίπτει με το τέλος της περιοχής ORF του γονιδίου καθώς περιέχει το κωδικόνιο λήξης. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας την *Pfu* DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 95 °C για 3’, 10 κύκλοι των 95 °C για 30”, 50 °C για 30” και 72 °C για 2’, ομοίως 25 κύκλοι των 95 °C για 30”, 56 °C για 30” και 72 °C για 2’, και 72 °C για 10’.

Το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε, ακολούθως, στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega, USA), και, στη συνέχεια, έγινε πέψη του ενθέματος με *Bgl*II/*Not*I, από την οποία προέκυψε το τμήμα 1-839 του γονιδίου *BmR2D2*. Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης με το φορέα pEA-Flag στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού, ώστε να κατασκευαστεί ο φορέας pEA-Flag-BmR2D2 (1-839). Στη συνέχεια, έγινε πέψη του φορέα pENTR11-BmR2D2 με *Xho*I/*Xba*I για την απελευθέρωση του 3’ άκρου του *BmR2D2* και ακολούθως κλωνοποίηση στο φορέα pBluescript SK$^+$ (pBSK$^+$) στις αντίστοιχες θέσεις. Τέλος, έπειτα από πέψη των κλώνων pEA-Flag-BmR2D2 (1-839) και pBSK$^+$-BmR2D2 (789-1023) με το ένζυμο *Not*I, κλωνοποιήθηκε ολόκληρο το γονίδιο *BmR2D2* σημασμένο με τον επίτοπο Flag στο φορέα pEA. Μετά την κλωνοποίηση, οι κλώνοι pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-Flag-BmR2D2 αλληλουχήθηκαν, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι αντιστοιχούν στη σωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Τελικά, οι φορείς pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-Flag-BmR2D2 χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση κυττάρων Bm5 σε συνδυασμό με το βοηθητικό φορέα pBmIE1. Έτσι, επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western ότι οι πρωτεΐνες BmR2D2-Myc.His και Flag-BmR2D2 εκφράζονται επιτυχώς με μεγέθη 369 και 352 αμινοξικών καταλοίπων,

και μοριακά βάρη 41 και 39 kDa, συμπεριλαμβανομένων των επιτόπων Myc.His και Flag, αντίστοιχα.

2.2.2.3.6 Οι φορείς pEA-Flag-BmDcr2, pEA-BmTranslin2-Myc.His και pEA-TcR2D2-Myc.His

Για τα πειράματα μελέτης της έκφρασης των πρωτεϊνών BmDcr2 και BmTranslin2 χρησιμοποιήθηκαν οι ανασυνδυασμένοι φορείς υπερέκφρασης που έχουν ήδη περιγραφεί σε παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου (Liu et al., 2012; Swevers et al., 2011).

2.2.2.4 Κλωνοποιήσεις για την παραγωγή RNA φουρκετών

Με βάση την αλληλουχία του ORF του γονιδίου-στόχου, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pEA κατάλληλα σχεδιασμένες αλληλουχίες, ούτως ώστε μέσω της μεταγραφής τους να οδηγήσουν στην παραγωγή μονόκλωνων RNA μορίων που η δευτεροταγής τους διαμόρφωση θα έχει τη μορφή stem-loop, δηλαδή ενός δίκλωνου μορίου RNA με μία RNA φουρκέτα (hairpin, hp) στο ένα του άκρο. Το κάθε ένα από αυτά τα μόρια είχε ως προορισμό την απενεργοποίηση του γονιδίου-στόχου του μέσω του μονοπατιού siRNA (Okamura et al., 2008).

Για την κατασκευή του κάθε πλασμιδίου που θα παρήγαγε το επιθυμητό μόριο RNA συμπεριλαμβανομένης της φουρκέτας, κατασκευάστηκαν αρχικά δύο επιμέρους φορείς για κάθε γονίδιο-στόχο. Έτσι, ο πρώτος φορέας περιείχε την αλληλουχία-στόχο συν μία επιπλέον αλληλουχία η οποία χρησίμευε στη δημιουργία της θηλειάς (loop) της φουρκέτας, ενώ ο δεύτερος την ίδια αλληλουχία-στόχο σε αντίθετο προσανατολισμό. Στη συνέχεια, το ένθεμα του δεύτερου φορέα υποκλωνοποιήθηκε στον πρώτο, ούτως ώστε μετά τη μεταγραφή του σε RNA να υβριδοποιούνται τα συμπληρωματικά τμήματα και να σχηματίζουν την επιθυμητή φουρκέτα.

2.2.2.4.1 Κλωνοποίηση της RNA φουρκέτας HP-Ago3

Προκειμένου για το γονίδιο-στόχο *BmAgo3*, δημιουργήθηκαν οι δύο ενδιάμεσοι φορείς: α) ο pGEM-T-Easy-HP-Ago3-480, ο οποίος αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 1934-

2313 του ORF συν τα 2314-2414 που χρησιμεύουν για τη δημιουργία της θηλειάς, και β) ο pGEM-T-Easy-HP-Ago3-379, ο οποίος αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 2313-1935 του ORF.

Ειδικότερα, για τη δημιουργία του φορέα pGEM-T-Easy-HP-Ago3-480, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους φωσφορυλιωμένους εκκινητές HP-Ago3-F-*Sma*I και HP-Ago3-R-*Bam*HI (**Πίνακας Π4**), οι οποίοι περιέχουν θέσεις κλωνοποίησης *Sma*I και *Bam*HI, αντίστοιχα. Παράλληλα, για τη δημιουργία του φορέα pGEM-T-Easy-HP-Ago3-379 στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι φωσφορυλιωμένοι εκκινητές HP-Ago3-F-*Bam*HI και HP-Ago3-R-*Not*I (**Πίνακας Π4**), οι οποίοι περιέχουν θέσεις κλωνοποίησης *Bam*HI και *Not*I, αντίστοιχα. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας την *Dream Taq* DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 94 °C για 3’, 10 κύκλοι των 94 °C για 30”, 50 °C για 30” και 72 °C για 30”, ομοίως 25 κύκλοι των 94 °C για 30”, 60 °C για 30” και 72 °C για 30”, και 72 °C για 7’.

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR, αυτά κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pGEM-T-Easy (Promega, USA), ενώ ακολούθησε πέψη του pGEM-T-Easy-HP-Ago3-480 με *Sma*I και *Bam*HI. Παράλληλα, με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pEA και στη συνέχεια αποφωσφορυλίωσή του. Έχοντας πλέον συμπληρωματικά άκρα (*Sma*I/*Bam*HI), το φωσφορυλιωμένο ένθεμα HP-Ago3-480 κλωνοποιήθηκε στον αποφωσφορυλιωμένο φορέα pEA. Έπειτα, ο νέος φορέας pEA-HP-Ago3-480, καθώς και ο pGEM-T-Easy-HP-Ago3-379, υδρολύθηκε με τα ένζυμα *Bam*HI και *Not*I. Μετά την πέψη, ο pEA-HP-Ago3-480 αποφωσφορυλιώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του φωσφορυλιωμένου ενθέματος HP-Ago3-379 με τα συμπληρωματικά άκρα, ούτως ώστε τελικά να κατασκευαστεί ο φορέας pEA-HP-Ago3.

2.2.2.4.2 Κλωνοποίηση της RNA φουρκέτας HP-Aub

Προκειμένου για το γονίδιο-στόχο *BmAub*, δημιουργήθηκαν οι δύο ενδιάμεσοι φορείς: α) ο pBS/SK$^+$-HP-Aub-514, ο οποίος αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 962-1360 του ORF συν τα 1361-1475 που χρησιμεύουν για τη δημιουργία της φουρκέτας, και β) ο pBS/SK$^+$-HP-Aub-399, ο οποίος αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 1360-962 του ORF.

Ειδικότερα, για τη δημιουργία του φορέα pBS/SK$^+$-HP-Aub-514 πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους φωσφορυλιωμένους εκκινητές HP-Aub-F-*Sma*I και HP-Aub-R-*Bam*HI (**Πίνακας Π4**), οι οποίοι περιέχουν θέσεις κλωνοποίησης *Sma*I και *Bam*HI, αντίστοιχα. Παράλληλα, για τη δημιουργία του φορέα pBS/SK$^+$-HP-Aub-399 στην αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι φωσφορυλιωμένοι εκκινητές HP-Aub-F-*Bam*HI και HP-Aub-R-*Not*I (**Πίνακας Π4**), οι οποίοι περιέχουν θέσεις κλωνοποίησης *Bam*HI και *Not*I, αντίστοιχα. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας την *Dream Taq* DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 94 °C για 3’, 10 κύκλοι των 94 °C για 30”, 48 °C για 30” και 72 °C για 30”, ομοίως 25 κύκλοι των 94 °C για 30”, 55 ή 58 °C για 30” και 72 °C για 30”, και 72 °C για 7’.

Μετά τον καθαρισμό των φωσφορυλιωμένων προϊόντων της PCR, τη δημιουργία τυφλών άκρων και τον εκ νέου καθαρισμό τους με διάλυμα PCI, πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίησή τους στη θέση *Eco*RV του αποφωσφορυλιωμένου φορέα pBS/SK+ με χρήση του ενζύμου T4 DNA Ligase (Thermo Fischer Scientific, USA). Ακολούθησε πέψη του pBS/SK$^+$-HP-Aub-514 με *Sma*I και *Bam*HI, και κλωνοποίηση στον αποφωσφορυλιωμένο φορέα pEA που διαθέτει συμπληρωματικά προς το ένθεμα άκρα (*Sma*I/*Bam*HI). Εν συνεχεία, ο νέος φορέας pEA-HP-Aub-514, καθώς και ο pBS/SK$^+$-HP-Aub-399, αποκόπηκε με τα ένζυμα *Bam*HI και *Not*I. Μετά την πέψη, ο pEA-HP-Aub-514 αποφωσφορυλιώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του φωσφορυλιωμένου ενθέματος HP-Aub-399 που έφερε συμπληρωματικά άκρα, έτσι ώστε τελικά να κατασκευαστεί ο φορέας pEA-HP-Aub.

2.2.2.4.3 Κλωνοποίηση της RNA φουρκέτας HP-Luc

Για τη δημιουργία ενός φορέα που θα υπερεκφράζει μία RNA φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του ήδη διαθέσιμου φορέα του εργαστηρίου μας SHV-HS-dsLuc-BGH στη θέση *Apa*I, και του άδειου φορέα pEA στη θέση *Not*I, με τα αντίστοιχα ένζυμα. Εν συνεχεία, δημιουργήθηκαν τυφλά άκρα και στους δύο ευθύγραμμους φορείς, ενώ ακολούθησε πέψη τους με *Bam*HI, από την οποία απελευθερώθηκε το τμήμα dsLuc-BGH που διέθετε ένα κολλώδες *Bam*HI άκρο και ένα τυφλό άκρο, καθώς και ο φορέας pEA που έφερε όμοια άκρα. Τελικά, αξιοποιώντας τα συμπληρωματικά άκρα, το ένθεμα που κωδικοποιεί για την RNA

φουρκέτα έναντι της λουσιφεράσης κλωνοποιήθηκε στο φορέα pEA, δημιουργώντας τον ανασυνδυασμένο φορέα pEA-HP-Luc.

2.2.2.5 Κλωνοποιήσεις των φουρκετών S1.2-WT και S1.2-MUT στους πλασμιδιακούς φορείς pEA-EYFP και pLitmus-38i

Χρησιμοποιώντας το εργαλείο Βιοπληροφορικής HHMMiR (Kadri et al., 2009) που έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση πιθανών αλληλουχιών microRNAs, αναζητήθηκαν και εντοπίστηκαν πέντε εν δυνάμει πρόδρομα μόρια microRNA (precursor miRNAs, pre-miRNAs) ή φουρκέτες (hairpins) που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του BmCPV (Filip Van Nieuwerburgh, Πανεπιστήμιο Γάνδης, Βέλγιο). Οι επιλεγμένες αλληλουχίες ελέγχθηκαν στη συνέχεια ως προς την προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή τους μέσω του εργαλείου RNAfold (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi).

Με σκοπό να διερευνήσουμε εάν κάποιο από τα προβλεπόμενα pre-miRNAs είναι πράγματι λειτουργικό στο να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου από το οποίο προέρχεται, επιλέχθηκε να ελεγχθεί το microRNA S1.2-WT (wild-type, φυσικού τύπου) μήκους 70 βάσεων σε *in vitro* πειράματα. Η αλληλουχία του S1.2 που επιλέχθηκε αντιστοιχεί στις θέσεις 2023-2092 του segment 1 (S1, GU323605.1), το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1 του ιού BmCPV. Παράλληλα, με τη βοήθεια του προγράμματος RNAfold, σχεδιάστηκε *in silico* και έπειτα κλωνοποιήθηκε ένα δεύτερο pre-miRNA ιδίου μήκους (S1.2-MUT, mutant, μεταλλαγμένο) που προέκυψε από τη βασική αλληλουχία του S1.2-WT, η οποία όμως έφερε πολλαπλές μεταλλαγές, ούτως ώστε η δευτεροταγής δομή του να μην πληροί τις προϋποθέσεις για να αναγνωριστεί από το miRNA μονοπάτι και να οδηγήσει στην αποσιώπηση της VP1.

Για τη δημιουργία του DNA της φουρκέτας φυσικού τύπου S1.2-WT πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φορέα pEA-VP1-Myc.His και τους εκκινητές miR-S1.2-WT-F [*Not*I] και miR-S1.2-WT-R [*Not*I] (**Πίνακας Π5**), οι οποίοι φέρουν θέση αναγνώρισης από το ένζυμο *Not*I. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας την *Platinum Taq HF* DNA πολυμεράση (Invitrogen, USA) ήταν: 94 °C για 3’, 10 κύκλοι των 94 °C για 30”, 52 °C για 30” και 72 °C για 30”, ομοίως 25 κύκλοι των 94 °C για 30”, 60 °C για 30” και 72 °C για 30”, και 72 °C για 7’.

Αντίστοιχα, για τη δημιουργία του DNA της φουρκέτας που έφερε πολλαπλές μεταλλαγές (S1.2-MUT, οι μεταλλαγές σημειώνονται με υπογραμμισμένα γράμματα) και έχει την αλληλουχία 5'-GUUGUAAAUGAGCGAGCGGUGCAGGAUGAUAUGCAGAAGCC CUGAGCGAGAGUACUAAACAAUGGUUAA-3', σχεδιάστηκαν οι εκκινητές miR-S1.2-MUT-F και miR-S1.2-MUT-R (**Πίνακας Π5**), οι οποίοι φωσφορυλιώθηκαν, αφέθηκαν να υβριδοποιηθούν και στο μίγμα προστέθηκε το ένζυμο Klenow (Thermo Fischer Scientific, USA) ούτως ώστε να συμπληρωθούν τα άκρα του επιθυμητού μορίου. Στη συνέχεια, το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στη θέση *Eco*RV του φορέα pBluescript. Επειδή τα DNA των φουρκετών έφεραν κοινά άκρα, ακολούθησε PCR με υπόστρωμα/μήτρα το φορέα pBS-S1.2-MUT και τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR του S1.2-WT, ούτως ώστε να προστεθούν άκρα *Not*I και στους δύο τύπους DNA των φουρκετών.

2.2.2.5.1 Κλωνοποίηση στον pEA-EYFP

Τα προϊόντα της PCR S1.2-WT και S1.2-MUT αποκόπηκαν με το ένζυμο *Not*I. Επιπροσθέτως, ο υπάρχων φορέας pEA-EYFP, στον οποίον είναι κλωνοποιημένο το γονίδιο *eyfp* (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) στις θέσεις *Bam*HI και *Not*I, υδρολύθηκε επίσης με *Not*I. Ακολούθως, δεδομένης της ύπαρξης συμπληρωματικών άκρων, τα 2 DNA κλωνοποιήθηκαν ξεχωριστά στο φορέα pEA-EYFP ακριβώς μετά το κωδικόνιο λήξης του *eyfp*. Συνεπώς, η μεταγραφή του *eyfp* συνεπάγεται τη μεταγραφή της φουρκέτας που ακολουθεί, άρα η έκφραση των S1.2-WT και -MUT μπορεί να ποσοτικοποιείται μέσω του παραγόμενου βιοφθορισμού λόγω έκφρασης της πρωτεΐνης EYFP.

Τα δύο pre-miRNAs κλωνοποιήθηκαν και με τους δύο προσανατολισμούς (sense, antisense) στο φορέα έκφρασης pEA-EYFP έπειτα από το ένθεμα *eyfp*, έτσι ώστε να επιτευχθεί από ένας αρνητικός μάρτυρας για κάθε pre-miRNA. Η ταυτότητα των κλώνων επιβεβαιώθηκε μετά από πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, ενώ η έκφρασή τους ταυτοποιήθηκε μετά από διαμόλυνση κυττάρων Bm5 και ανίχνευση του εκλυόμενου βιοφθορισμού σε λάμπα UV (υπεριώδους φωτός).

2.2.2.5.2 Κλωνοποίηση στον pLitmus-38i

Όπως ήδη περιγράφηκε (§2.2.2.2), ο φορέας pLitmus-38i περιλαμβάνει και στις δύο αλυσίδες τον υποκινητή της T7 πολυμεράσης, γεγονός που επιτρέπει την *in vitro* μεταγραφή του κλωνοποιημένου ενθέματος. Για την κλωνοποίηση των S1.2-WT και S1.2-MUT στον pLitmus-38i, έγινε πέψη των pEA-EYFP-S1.2-WT και pEA-EYFP-S1.2-MUT με το ένζυμο *Not*I, ακολούθησε απομόνωση των S1.2-WT και S1.2-MUT, και δημιουργία τυφλών άκρων. Στη συνέχεια, τα DNA των φουρκετών κλωνοποιήθηκαν στη θέση *Eco*RV του αποφωσφορυλιωμένου φορέα pLitmus-38i και οι φορείς που προέκυψαν αλληλουχήθηκαν για να προσδιοριστεί ο προσανατολισμός του κλωνοποιημένου ενθέματος. Τελικά, ακολούθησε πέψη των φορέων που προέκυψαν με *Bam*HI και *Hind*III, ώστε οι ευθύγραμμοι φορείς να χρησιμεύσουν ως υπόστρωμα/μήτρα για την *in vitro* σύνθεση των RNA φουρκετών με προσανατολισμό sense ή antisense.

2.2.2.6 Κλωνοποιήσεις για την κατασκευή του ιού AcMNPV-EYFP

Με σκοπό να τροποποιηθεί το γονιδίωμα του ιού AcMNPV, ούτως ώστε ο ιός να είναι εύκολα ανιχνεύσιμος, έγινε ενσωμάτωση του γονιδίου *eyfp* στο γονιδίωμα του ιού AcMNPV με χρήση του συστήματος Bac-to-Bac® (Invitrogen, USA) και κατασκευάστηκε ο ιός AcMNPV-EYFP που παράγει βιοφθορισμό.

Η κατασκευή του ιού AcMNPV-EYFP πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά, έγινε πέψη του φορέα pEA-EYFP-S1.2-WT-sense με τα περιοριστικά ένζυμα *Not*I and *Sma*I, ούτως ώστε να απομονωθεί το τμήμα που περιείχε το γονίδιο *eyfp*. Παράλληλα, έγινε πέψη του φορέα pFastBac1 στη θέση πολλαπλής κλωνοποίησης που βρίσκεται μετά από τον ισχυρό υποκινητή του γονιδίου της πολυεδρίνης του ιού AcMNPV (P_{PH}) με τα περιοριστικά ένζυμα *Stu*I και *Not*I. Στη συνέχεια, το τμήμα *eyfp* (*Not*I/*Sma*I) κλωνοποιήθηκε στο φορέα pFastBac1 που έφερε συμβατά άκρα (*Stu*I/*Not*I), και ο ανασυνδυασμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων DH5a™, όπου ο κατάλληλος κλώνος επιλέχθηκε παρουσία αμπικιλλίνης (100 μg/mL).

Στο δεύτερο στάδιο, βακτήρια της κατηγορίας DH10Bac™ (που περιλαμβάνουν το AcMNPV bacmid σε συνδυασμό με το βοηθητικό πλασμίδιο pMON7124) μετασχηματίστηκαν με τον pFastBac1-EYFP. Με τη βοήθεια της τρανσποζάσης που εκφράζεται από το pMON7124, του στοιχείου mini-Tn7 του pFastBac1 και της

αλληλουχίας-στόχου mini-*att*Tn7 του bacmid, έγινε μετάθεση του P_{PH}-*eyfp* στο bacmid, ούτως ώστε να δημιουργηθεί το AcMNPV-EYFP bacmid. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων DH10Bac™ που περιείχαν τον κατάλληλο κλώνο έγινε με τη μέθοδο της επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών παρουσία καναμυκίνης (50 μg/mL), τετρακυκλίνης (10 μg/mL) και γενταμυκίνης (7 μg/mL).

Για τον έλεγχο της επιτυχούς κλωνοποίησης του *eyfp* στον AcMNPV, αρχικά το bacmid που κατασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα/μήτρα σε PCR για το γονίδιο *eyfp* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές YFP-130F και M13R (**Πίνακας Π2**), όπου επιτεύχθηκε η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στην αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας την *Dream Taq* DNA πολυμεράση (Thermo Fischer Scientific, USA) ήταν: 94 °C για 3’, 10 κύκλοι των 94 °C για 30”, 55 °C για 30” και 72 °C για 40”, και 72 °C για 7’. Ακολούθως, το bacmid χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση κυττάρων Sf21 και έπειτα από 3-4 ημέρες τα κύτταρα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη βιοφθορισμού. Η παρουσία του ανασυνδυασμένου ιού επιβεβαιώθηκε μέσω παρατήρησης στο μικροσκόπιο σε λάμπα UV (υπεριώδους φωτός), αλλά και μέσω μέτρησης του εκλυόμενου βιοφθορισμού στο φθορισμόμετρο Tecan (Switzerland).

2.2.3 Πειράματα *in vitro*

2.2.3.1 Μετρήσεις βιωσιμότητας με τη χρωστική Trypan Blue

Η χρωστική Trypan Blue έχει την ιδιότητα να διαπερνά τις μεμβράνες μόνο των νεκρών κυττάρων, με αποτέλεσμα αυτά τα κύτταρα να αποκτούν μπλε χρωματισμό. Με αυτό τον τρόπο, γίνεται οπτικός διαχωρισμός των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα, τα οποία μπορούν να καταμετρηθούν σε αιματοκυττόμετρο Neubauer στο οπτικό μικροσκόπιο. Για την καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων μίας καλλιέργειας ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Σε σωλήνα τύπου eppendorf αναμιγνύονται 30 μL από την κυτταροκαλλιέργεια με 120 μL από διάλυμα της χρωστικής Trypan Blue (0.1% σε 1x PBS, Gibco, USA).
- Μέρος του αραιωμένου κυτταρικού διαλύματος φορτώνεται στο αιματοκυττόμετρο Neubauer.
- Ακολουθεί παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (Euromex Microscopes Holland, The Netherlands), καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε πέντε από τα οριοθετημένα

τετράγωνα εμβαδού 1 mm^2 και άθροισή τους (κάθε τετράγωνο αντιστοιχεί σε όγκο καλλιέργειας 0.1 μL).

- Υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων ανά mL κυτταροκαλλιέργειας πολλαπλασιάζοντας το άθροισμα των καταμετρημένων κυττάρων επί 10^4.
- Για την επίτευξη αντικειμενικότερου υπολογισμού της συγκέντρωσης κυττάρων ανά mL κυτταροκαλλιέργειας, η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά, ενώ τελικά υπολογίζεται ο μέσος όρος των δύο τιμών.

2.2.3.2 Ανάλυση κυτταροτοξικότητας μέσω δοκιμασίας MTT

Η δοκιμασία του MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) είναι μία χρωματομετρική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας κάποιου παράγοντα προς έλεγχο. Βάση της μεθόδου είναι η ικανότητα των κυτταρικών μιτοχονδριακών αφυδρογονασών να ανάγουν τη διαλυτή στο νερό χρωστική MTT στην αδιάλυτη μορφή της φορμαζάνη (formazan), μέσω αποκοπής του τετραζολικού δακτυλίου. Όταν η χρωστική MTT διαλυθεί μέσα σε διάλυμα αλάτων προσδίδει σε αυτό κίτρινο χρωματισμό, ενώ κατόπιν της αναγωγής της μετατρέπεται στην αδιάλυτη φορμαζάνη που έχει μωβ χρωματισμό. Διαλύτες όπως η ισοπροπανόλη έχουν την ιδιότητα να διαλυτοποιούν τη φορμαζάνη. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή έχει ως εξής:

- Η χρωστική MTT (Sigma-Aldrich GmbH, Germany) διαλύεται σε 1x PBS σε τελική συγκέντρωση 5 mg/mL και, αφού το διάλυμα διηθηθεί μέσω φίλτρου 0.22 $μm^2$ (Corning), φυλάσσεται στους 4 °C υπό συνθήκες σκότους.
- Μέρος του διαλύματος αραιώνεται σε ddH_2O σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL.
- Κύτταρα από την προς μελέτη κυτταροκαλλιέργεια αποκολλώνται από τον πάτο της φλάσκας ή του μικροβοθρίου με καλό πιπετάρισμα. Ακολουθεί ανάμιξη 100 μL από την κυτταροκαλλιέργεια με το αραιωμένο διάλυμα MTT (100 μL), και το μίγμα αφήνεται να επωαστεί στους 27 °C για 3h.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 7’ σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο που περιέχει το μη τροποποιημένο MTT απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 220 μL ισοπροπανόλης.

- Ακολουθεί ανάδευση με συνεχή περιστροφή για 30’, ούτως ώστε οι κρύσταλλοι φορμαζάνης να εξέλθουν του κυτταρικού ιζήματος και να διαλυτοποιηθούν στην ισοπροπανόλη.
- Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 7’ σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και να μειωθεί το μη-ειδικό σήμα που ενδέχεται να επηρεάσει τη μέτρηση της απορρόφησης.
- Από το υπερκείμενο, 200 μL μεταφέρονται σε διαφανή πλάκα 96 μικρο-βοθρίων.
- Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 560 nm (με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm) από το φασματοφωτόμετρο Infinite M200 (Tecan, Switzerland).

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ακολουθείται η ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας μία σειρά από γνωστούς αριθμούς κυττάρων.

2.2.3.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Η διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων συνίσταται στην εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού (DNA, RNA) σε αυτά. Για τη διαδικασία αυτή, στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή χρησιμοποιείται ο παράγοντας Escort™ IV (Sigma-Aldrich GmbH, Germany), ο οποίος αποτελεί μίγμα ενός πολυκατιονικού και ενός ουδέτερου λιπιδίου. Αυτό το μίγμα έχει την ιδιότητα να σχηματίζει ένα σταθερό θετικά φορτισμένο λιποσωμικό σύμπλοκο όταν αναμιχθεί με το αρνητικά φορτισμένο DNA (ή RNA), απουσία ορού. Στη συνέχεια, εφόσον προστεθεί στο κυτταρικό θρεπτικό μέσο, το σύμπλοκο συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη, λόγω δομικής ομοιότητας με τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα, με αποτέλεσμα την είσοδο των νουκλεϊκών οξέων στο κυτταρόπλασμα. Ειδικότερα, η διαδικασία διαμόλυνσης έχει ως εξής:

- Σε μικροπλάκα καλλιέργειας των 6 βοθρίων (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Austria), επιστρώνονται 1 x 10^6 κύτταρα Λεπιδοπτέρων ανά βοθρίο σε τελικό όγκο 2 mL θρεπτικού υλικού IPL-41 (Gibco, USA) με προσθήκη 10% ορού FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, USA). Οι μικροπλάκες αφήνονται σε ηρεμία για τουλάχιστον 30’ στους 28 °C.

- Σε σωλήνα τύπου eppendorf αναμιγνύονται 15 μL Escort IV™ με 250 μL απλού IPL-41 (basal IPL-41, Gibco, USA) για το κάθε μικροβοθρίο, και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30’.
- Προετοιμάζεται από ένας σωλήνας τύπου eppendorf για κάθε μικροβοθρίο, όπου προστίθενται 1.5-2.5 μg νουκλεϊκών οξέων σε 250 μL απλού IPL-41, και αφήνονται στους 4 °C.
- Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τα κύτταρα και προσθήκη 1 mL απλού IPL-41 στο τοίχωμα του μικροβοθρίου με προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά, ώστε να ξεπλυθούν τα κύτταρα από υπολείμματα ορού και πρωτεϊνών.
- Στη συνέχεια, προστίθενται 250 μL από το μίγμα του Escort IV™ σε κάθε σωλήνα που περιέχει το μίγμα των νουκλεϊκών οξέων (250 μL), ενώ ακολουθεί καλή μηχανική ανάδευση και επώαση στους 4 °C για 15-45’.
- Έπειτα, το υπερκείμενο των κυττάρων απορρίπτεται και αντίστοιχα προστίθενται 500 μL μίγματος διαμόλυνσης ανά μικροβοθρίο.
- Η μικροπλάκα ανακινείται ελαφρώς και καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη, ούτως ώστε να αποφευγχθεί η εξάτμιση του θρεπτικού μέσου, και τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν στους 28 °C για 5-16h.
- Το μίγμα διαμόλυνσης αντικαθίσταται από 2 mL θρεπτικού υλικού ILP-41 που περιέχει ορό FBS 10% ανά μικροβοθρίο. Επιπλέον, προς αποφυγή κυτταρικών μολύνσεων λόγω της διαδικασίας της διαμόλυνσης, στο θρεπτικό υλικό προστίθεται το αντιβιοτικό γενταμυκίνη (Gibco, USA) σε τελική συγκέντρωση 50 μg/mL. Τελικά, τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για όσο χρόνο απαιτείται στους 28 °C.

Ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε πειράματος, οι αριθμοί των κυττάρων που διαμολύνονται και ο τύπος της μικροπλάκας ποικίλλουν, και συνεπώς οι τιμές του πρωτοκόλλου μεταβάλλονται αναλόγως. Οι ποσότητες νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε περίπτωση περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια. Στις περιπτώσεις όπου δεν προσδιορίζεται η χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά, εννοείται ότι γίνεται αναφορά σε κύτταρα Bm5.

Διαμόλυνση για λειτουργικά πειράματα βιοφωταύγειας

Σε αυτή την κατηγορία πειραμάτων, τα κύτταρα διαμολύνονται με φορείς αναφοράς που εκφράζουν τη λουσιφεράση [pEcRE.bA.luc (Soin et al., 2008)] και την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη [pbA/EcRE.gfp (Swevers et al., 2004)], υπό τον έλεγχο ενός στοιχείου απόκρισης στην εκδυσόνη (Ecdysone Responsive Element, EcRE). Η περιοχή EcRE περιλαμβάνει 7 στοιχεία πρόσδεσης της 20-υδρόξυ-εκδυσόνης (20HE) (Swevers et al., 2004), έτσι ώστε όταν προστεθεί 20HE, ή ανάλογό της, να επάγεται η έκφραση του γονιδίου που έπεται αυτής. Επιπλέον στο μίγμα διαμόλυνσης προστίθεται dsRNA, ειδικό ή μη. Ακόμη, όλα τα δείγματα, πλην του μάρτυρα, διαμολύνονται με dsRNA ειδικό για το γονίδιο της λουσιφεράσης [dsLuc (Swevers et al., 2011)]. Η επαγωγή των φορέων που φέρουν το EcRE γίνεται 48h μετά την έναρξη της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τον αγωνιστή της εκδυσόνης RH-5992 (500 nM) (Swevers and Iatrou, 1999), και τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για μία ημέρα ακόμα.

Στην περίπτωση των πειραμάτων που περιελάμβαναν παρεμπόδιση των γονιδίων του RNAi μηχανισμού μέσω dsRNA (§3.1.1.1), πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με τους φορείς pEcRE.bA.luc (3.3 μg/mL) και pbA/EcRE.gfp (0.17 μg/mL), και με dsRNA (1.3 μg/mL). Επιπλέον, σε όλα τα δείγματα εκτός του dsMalE- προστέθηκε dsLuc (0.33 μg/mL). Αντίστοιχα, για τη μελέτη πιθανής παρεμπόδισης της έκφρασης της λουσιφεράσης μέσω κωδικοποιών ή μη-κωδικοποιών μορίων ssRNA (§3.1.1.3), οι συγκεντρώσεις των νουκλεϊκών οξέων μεταβλήθηκαν ως εξής: pEcRE.bA.luc (1.7 μg/mL), pbA/EcRE.gfp (0.17 μg/mL), καθώς και ssRNA ή dsRNA που στόχευαν στο γονίδιο της λουσιφεράσης ή το malE (3.3 μg/mL). Στην περίπτωση του dsLuc η συγκέντρωση ήταν 0.17 μg/mL.

Για τα πειράματα υπερέκφρασης γονιδίων των μονοπατιών siRNA και piRNA (§3.1.1.4, §3.1.3.1), έγινε διαμόλυνση με τους φορείς pEcRE.bA.luc (0.9 μg/mL), pbA/EcRE.gfp (0.2 μg/mL) και pEA οικογένειας (pEA-BmAgo2-Myc.His, pEA-BmAgo3-Myc.His, pEA-Flag-BmAub pEA-Myc-BmDcr2, pEA-BmR2D2-Myc.His ή pEA.pac, 0.9 μg/mL). Επιπλέον, το dsLuc προστέθηκε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (3.125 έως 50 ng/mL - γονίδια siRNA μονοπατιού, 1.556 έως 25 ng/mL - γονίδια piRNA μονοπατιού), ενώ η ολική συγκέντρωση του dsRNA διατηρήθηκε σταθερή στα 50 ή τα 25 ng/mL,

αντίστοιχα (συμπληρώνοντας την υπολειπόμενη ποσότητα dsRNA με το μη-ειδικό dsMalE)[2].

Προκειμένου να ελεγχθεί ο φορέας pEA-HP-Luc (§3.1.3.2.1), έγινε διαμόλυνση με τους φορείς pEcRE.bA.luc (0.9 μg/mL), pbA/EcRE.gfp (0.2 μg/mL), pEA-HP-Luc (0.9 ή 0.45 μg/mL) και το κατάλληλο dsRNA (dsLuc ή dsMalE, 6.25 ng/mL). Ακόμη, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του RNAi στις σταθερές κυτταρικές σειρές Bm5-HP-Ago3 (§3.1.3.2.2), τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το διπλό φορέα αναφοράς pEcRE.bA.Luc/EcRE.bA.gfp (1.1 μg/mL) και με το κατάλληλο dsRNA (dsLuc ή dsMalE, 0.05 μg/mL).

Διαμόλυνση για πειράματα μελέτης πρωτεϊνικής έκφρασης

Για τη μελέτη της έκφρασης ορισμένων RNAi παραγόντων μέσω ανοσοαποτύπωσης Western ή ανοσοφθορισμού (§3.1.1.2, 3.1.2.1-3.1.2.4), χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαμόλυνση 2 μg/mL του φορέα εκάστοτε έκφρασης pEA (pEA-BmAgo2-Myc.His, pEA-Myc-BmDcr2, pEA-Flag-BmDcr2, pEA-BmR2D2-Myc.His, pEA-Flag-BmR2D2, pEA-BmTranslin2-Myc.His ή pEA-Flag-TcR2D2) σε συνδυασμό με 0.55 μg/mL του βοηθητικού πλασμιδίου pBmIE1 (Lu et al., 1997), ενώ ειδικά στην περίπτωση ανίχνευσης της πρωτεΐνης CeSID-1-Flag (§3.3.1.1-3.3.1.2) στη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένες συγκεντρώσεις του φορέα pEA-CeSID-1-Flag (2.2 μg/mL) και του pBmIE1 (1.1 μg/mL). Για τη μελέτη της δοσοεξαρτώμενης από το dsRNA πρωτεϊνικής έκφρασης (§3.1.1.2), τα κύτταρα διαμολύνθηκαν επιπλέον με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ειδικού dsRNA (0.55 έως 1.65 μg/mL) με την ολική συγκέντρωση του dsRNA να διατηρείται στα 1.65 μg/mL (συμπληρώνοντας την υπολειπόμενη ποσότητα dsRNA με το μη-ειδικό dsMalE), ενώ για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των dsRNAs (§3.1.1.2) αυτά διαμολύνθηκαν με 1.3 μg/mL ειδικού dsRNA.

Προκειμένου για τη μελέτη της αποσιώπησης της πρωτεΐνης VP1 του ιού BmCPV, μέσω ανοσοαποτύπωσης Western (§3.2.1.1.1), κύτταρα Bm5 και Hi5 διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-VP1-Myc.His (1.7 μg/mL), το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (0.55 μg/mL) και το φορέα pEA-EYFP που εκφράζει την αντίστοιχη RNA φουρκέτα (1.7 μg/mL).

[2]Η διαφορά στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του dsLuc μεταξύ των δύο τύπων πειραμάτων οφείλεται στη χρονική απόσταση μεταξύ της υλοποίησης των διαμολύνσεων, που είχε ως αποτέλεσμα τη χρήση διαφορετικού ως προς την αποτελεσματικότητα «στοκ» dsLuc.

Ομοίως, στη συνέχεια (§3.2.1.1.2) κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-VP1-Myc.His, ο οποίος εκφράζει την πρωτεΐνη VP1 του ιού BmCPV σημασμένη με τον επίτοπο Myc.His (μη-δημοσιευμένα δεδομένα, 0.9 μg/mL), το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (0.55 μg/mL) και το RNA της αντίστοιχης φουρκέτας (200 nM), ενώ για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEA-FHV-CP1-Myc (0.9 μg/mL) (Zografidis et al., 2015).

Για τον έλεγχο της λειτουργικότητας των RNA φουρκετών που στοχεύουν στα δύο piRNA γονίδια μέσω ανοσοαποτύπωσης Western (§3.1.3.2.1), κύτταρα Bm5 και Hi5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου (pEA-BmAgo3-Myc.His ή pEA-Flag-BmAub, 2 μg/mL), με το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (0.55 μg/mL) και με το φορέα έκφρασης της εκάστοτε φουρκέτας (pEA-HP-Ago3, pEA-HP-Aub ή pEA-HP-Luc) ή το αντίστοιχο dsRNA (2.2 μg/mL).

Σε όλα τα πειράματα μελέτης πρωτεϊνικής έκφρασης η επώαση των κυττάρων διήρκεσε 48-72h.

Διαμόλυνση για λοιπά πειράματα

Με στόχο τον έλεγχο μέσω PCR των RNA φουρκετών ως προς τη λειτουργικότητά τους στη στόχευση των δύο piRNA γονιδίων (§3.1.3.2.1), κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με έναν από τους φορείς που εκφράζουν μία RNA φουρκέτα (pEA-HP-Ago3, pEA-HP-Aub ή pEA-HP-Luc) ή με το αντίστοιχο dsRNA (2 μg/mL), σε συνδυασμό με το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (0.55 μg/mL). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν για 24-72h.

Τέλος, για τη μελέτη της ανάπτυξης του ιού AcMNPV-EYFP μέσω μέτρησης του βιοφθορισμού (§3.2.1.2), κύτταρα Sf21 διαμολύνθηκαν με το bacmid του ιού (2.8 μg/mL) και με το φορέα έκφρασης του εκάστοτε παράγοντα (pEA-BmAgo2-Myc.His, pEA-BmAgo3-Myc.His, pEA-Flag-BmAub, pEA-Myc-BmDcr2, pEA-BmR2D2-Myc.His, pEA-BmTranslin2-Myc.His ή pEA.pac) ή της κατάλληλης RNA φουρκέτας (pEA-HP-Ago3, pEA-HP-Aub ή pEA-HP-Luc) σε συγκέντρωση 0.83 μg/mL. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 8-10 ημέρες.

2.2.3.4 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών

Για τη διευκόλυνση της περαιτέρω μελέτης του ρόλου συγκεκριμένων γονιδίων του RNAi μηχανισμού, επιλέχθηκε η μέθοδος του σταθερού κυτταρικού μετασχηματισμού παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, κύτταρα Bm5 διαμολύνονται με τα επιθυμητά πλασμίδια που υπερεκφράζουν ή καταστέλλουν την έκφραση των προς μελέτη γονιδίων, σε συνδυασμό πάντα με κάποιον φορέα που εκφράζει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας προς κάποιο αντιβιοτικό της επιλογής μας. Παράλληλα, τα κύτταρα μπορούν να διαμολυνθούν, επιπροσθέτως, με κάποιο φορέα αναφοράς, που εκφράζει για παράδειγμα το γονίδιο της λουσιφεράσης και της gfp, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας, τα κύτταρα αρχικά καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό IPL-41 που περιέχει ορό FBS (10%) χωρίς το αντιβιοτικό επιλογής. Λίγες ημέρες μετά την αρχική διαμόλυνση, στην καλλιέργεια προστίθεται το αντιβιοτικό επιλογής (πουρομυκίνη), συνήθως σε τελική συγκέντρωση 15 μg/mL και τα κύτταρα παρακολουθούνται για μερικές εβδομάδες (3-6), έως ότου επιλεγεί ένας ανθεκτικός μικτός πληθυσμός.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, για την κατασκευή των κυττάρων που θα χρησιμοποιούνταν σε πειράματα μελέτης του ρόλου των piRNA γονιδίων στην αντιϊκή προστασία και στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού (§3.1.3.2.2), κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με: α) έναν από τους φορείς pEA-HP-Ago3, pEA-HP-Aub ή pEA-HP-Luc (3.2-3.6 μg/mL), β) το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (0.3-0.8 μg/mL), και γ) το φορέα έκφρασης pEA.pac (0.3-0.8 μg/mL).

Για την κατασκευή κυττάρων που θα χρησιμοποιούνταν σε πειράματα εμβαπτισμού σε εξωκυττάριο μέσο που περιέχει dsRNA (§3.3.1.3.4), κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με: α) έναν από τους φορείς των γονιδίων προς έλεγχο pEA-R2D2-Myc.His, pEA-Translin2-Myc.His ή pEA-CeSID-1-Flag (4 μg/mL), β) το φορέα ενίσχυσης της έκφρασης pBmIE1 (1 μg/mL), γ) τους φορείς αναφοράς pERE.bA.Luc (0.5 μg/mL) και pbA/EcRE.gfp (0.1 μg/mL), και δ) το φορέα έκφρασης του γονιδίου *pac* που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη pEA.pac (0.8-1 μg/mL). Τέλος, για την κατασκευή μίας τέταρτης κυτταρικής σειράς ως αρνητικού μάρτυρα, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEA.pac σε μεγαλύτερη συγκέντρωση.

2.2.3.5 Συλλογή και λύση κυττάρων

Για τις ανάγκες των λειτουργικών πειραμάτων βιοφωταύγειας, αλλά και για τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης, τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί λύονται σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Δύο έως τρεις ημέρες μετά από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνα τύπου eppendorf με φυγοκέντρηση στις 5,000 rpm για 5’.
- Εν συνεχεία, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μL διαλύματος 1x PBS.
- Ακολουθεί ένας κύκλος ψύξης (στους -70 °C για 30’) και γρήγορης απόψυξης (σε θερμοκρασία δωματίου), και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 10’.
- Ειδικά για τα πειράματα μελέτης της πρωτεϊνικής έκφρασης, συνήθως ακολουθεί διαχωρισμός του υπερκειμένου (διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα) από το ίζημα (αδιάλυτο πρωτεϊνικό κλάσμα) και προσθήκη 100 μL αποδιατακτικού ρυθμιστικού διαλύματος (cracking buffer) σε κάθε δείγμα. Στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά κλάσματα επωάζονται στους 95 °C για 5’ και 15’ αντίστοιχα.

Ειδικά για την πρωτεΐνη CeSID-1, πραγματοποιείται λύση με χρήση υπερήχων (sonication). Ειδικότερα, μετά τον κύκλο ψύξης-απόψυξης και την επακόλουθη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο κυτταρικό ίζημα προστίθενται 50 μL αποδιατακτικού ρυθμιστικού διαλύματος sample buffer 1x. Ακολουθεί λύση με χρήση υπερήχων (0.5 κύκλοι, πλάτος πίεσης: 30) και στη συνέχεια προσθήκη β-μερκαπτο-αιθανόλης (5%, χωρίς βρασμό).

2.2.3.6 Λειτουργικά πειράματα βιοφωταύγειας

Η κατηγορία των λειτουργικών πειραμάτων βιοφωταύγειας στη παρούσα Διδακτορική Διατριβή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παραγόντων που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του μηχανισμού του RNAi, μέσω μελέτης της μεταγραφικής ρύθμισης του φορέα αναφοράς της λουσιφεράσης. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (firefly) να καταλύει την αντίδραση οξυγόνωσης της λουσιφερίνης του σκαθαριού, που έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε οξυ-λουσιφερίνη, την παραγωγή AMP, PP_i και CO_2, καθώς και την έκλυση φωτός. Στο σύστημά μας, η λουσιφερίνη (Steady Glo® Substrate, Promega, USA) αναμιγνύεται με κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όπου περιέχεται η πρωτεΐνη λουσιφεράση, καθώς

εκφράζεται μέσω του φορέα αναφοράς κατόπιν διαμόλυνσης (§2.2.3.3). Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται έχει ως εξής:

- Μετά τη λύση των κυττάρων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες λουσιφεράση και GFP, το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε κατάλληλη λευκή πλάκα χωρητικότητας 96 θέσεων (Greiner Bio-One GmbH, Austria), όπου γίνεται μέτρηση του βιοφθορισμού μέσω της συσκευής Infinite M200 (Tecan, Switzerland) με διέγερση της GFP στα 488 nm και ανίχνευση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 521 nm.
- Εν συνεχεία, σε κάθε θέση προστίθενται και αναμιγνύονται 10 μL αντιδραστηρίου Steady-Glo® Substrate (Promega, USA).
- Ακολουθεί μέτρηση της βιοφωταύγειας που παράγεται από τη λουσιφεράση στη συσκευή Infinite M200 (Tecan, Switzerland).
- Για την εξαγωγή και σύγκριση των αποτελεσμάτων, αρχικά αφαιρείται από όλα τα δείγματα ο «θόρυβος» που αντιστοιχεί σε δείγμα μη-διαμολυσμένων κυττάρων. Ακολούθως, υπολογίζεται ο λόγος της παραγόμενης βιοφωταύγειας προς τον αντίστοιχο βιοφθορισμό. Επιπλέον, για τη σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών επαναλήψεων, συνήθως η κανονικοποιημένη βιοφωταύγεια εκφράζεται επί τοις εκατό (%), θεωρώντας ως 100% τη σχετική βιοφωταύγεια που παράγεται από κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με το φορέα της λουσιφεράσης, το φορέα της GFP και το dsMalE.

2.2.3.7 Στατιστική ανάλυση των πειραμάτων βιοφωταύγειας

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GraphPad Prism 4 (USA). Αναλυτικότερα:

- Στα πειράματα παρεμπόδισης του RNAi μηχανισμού μέσω dsRNA ή ssRNA μορίων (§3.1.1.1, §3.1.1.3), πραγματοποιήθηκε ανάλυση One Way ANOVA (analysis of variance) σε συνδυασμό με το post-hoc test Tukey's Multiple Comparison Test.
- Στη μελέτη της υπερέκφρασης των siRNA και piRNA γονιδίων (§3.1.1.4, §3.1.3.1) έγινε ανάλυση Two Way ANOVA, σε συνδυασμό με το post-hoc test Bonferroni's Multiple Comparison Test.

- Για τη μελέτη των επιπτώσεων της μειορρύθμισης του *BmAgo3* σε γονίδια που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό (§3.1.3.2.3.2), στα σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα Bm5 πραγματοποιήθηκαν Two-Tailed Unpaired t-Tests.
- Στα πειράματα όπου μελετήθηκε η επίδραση των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα στην ανάπτυξη του ιού AcMNPV-EYFP (§3.2.1.2) έγινε ανάλυση Two Way ANOVA, χρησιμοποιώντας το post-hoc test Bonferroni's Multiple Comparison Test.
- Στα πειράματα εμβαπτισμού των σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων L6Q-Luc σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsLuc (§3.3.1.3.1) πραγματοποιήθηκε One Way ANOVA, χρησιμοποιώντας το post-hoc test Tukey's Multiple Comparison Test.

2.2.3.8 Αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση Western

Για την ανάλυση της έκφρασης των μελετούμενων πρωτεϊνών, ακολουθείται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) μέσω εφαρμογής τάσης σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και την πηκτή συμπύκνωσης (stacking gel). Η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης στην πηκτή διαχωρισμού ποικίλλει, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να μεταβάλλεται το μέγεθος των πόρων της πηκτής ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πηκτή πραγματοποιείται παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulphate), το οποίο έχει την ιδιότητα να προσδένεται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, με αποτέλεσμα την αποδιάταξή τους σε «ευθύγραμμα» μόρια και την απόκτηση συνολικού αρνητικού φορτίου. Συνεπώς, κατόπιν εφαρμογής τάσης, το αρνητικό φορτίο επιτρέπει τη μετακίνηση των πρωτεϊνών προς τον θετικό πόλο της πηκτής, ενώ ο διαχωρισμός τους γίνεται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Αφότου διαχωριστούν, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτή σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω εφαρμογής ηλεκτρικής τάσης. Τέλος, κατόπιν επώασης της μεμβράνης με τα κατάλληλα αντισώματα, καθίσταται δυνατή η ανίχνευση των

πρωτεϊνών με χρήση χημειοφωταύγειας. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά ως εξής:

- Δείγματα κυτταρικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα οποία έχει προστεθεί 1x sample buffer (που περιέχει SDS) θερμαίνονται στους 95 °C για 5-15’.
- Τα δείγματα εισάγονται στις ειδικές θέσεις φόρτωσης της πηκτής διαχωρισμού μέσα σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, ενώ σε μία θέση ακόμα φορτώνεται ο δείκτης πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (PiNK prestained protein ladder, Nippon Genetics Europe GmbH, Germany).
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση (120 V, 350 mA) για ~1.5h, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (running buffer 1x).
- Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare, USA) εντός ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer 1x) στα 100 V.
- Προκειμένου να καλυφθούν οι μη-ειδικές θέσεις της μεμβράνης, ακολουθεί επώαση με διάλυμα πρωτεΐνης γάλακτος 10% (blocking buffer) για 45’ υπό συνεχή ανακίνηση.
- Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο ανιχνεύει τον επίτοπο της μελετούμενης πρωτεΐνης, για 16h στους 4 °C, υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολουθούν 3 σύντομες πλύσεις των 5’ σε 1x PBS-T.
- Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με την HRP (horseradish peroxidase), για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 5’ και 2 πλύσεις των 20’ σε 1x PBS-T.
- Στη μεβράνη προστίθεται το μίγμα του αντιδραστηρίου ECL (GE Healthcare, USA) για 1’, καθώς η HRP υπεροξειδάση υπό την επίδραση του ECL παράγει χημειοφωταύγεια. Η χημειοφωταύγεια ανιχνεύεται και μετριέται από το σύστημα απεικόνισης LAS-4000 (Fujifilm, Japan).
- Η απαιτούμενη επεξεργασία των φωτογραφιών που λαμβάνονται πραγματοποιείται με τα προγράμματα Aida και Adobe Photoshop CS6, ενώ εάν απαιτείται ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης χρησιμοποιείται το λογισμικό πυκνομέτρησης ImageJ (Abramoff et al., 2004).

Στην παρούσα μελέτη, ανάλογα με τον επίτοπο της μελετούμενης πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται διαδοχικά τα αντισώματα mouse anti-Myc (Cell Signaling, USA) και anti-mouse HRP (Chemicon, USA), ή rabbit anti-Flag (Sigma-Aldrich GmbH, Germany) και anti-rabbit HRP (Jackson, USA). Ακόμη, το πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιείται συνήθως σε αραίωση 1:1000, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα σε αραίωση 1:2000.

Στην περίπτωση της επώασης με διαφορετικό αντίσωμα για την ανίχνευση μίας διαφορετικής πρωτεΐνης (re-probing), όπως για παράδειγμα της α-τουμπουλίνης, ακολουθείται η διαδικασία της αφαίρεσης των προσδεδεμένων αντισωμάτων από την υπάρχουσα μεμβράνη (stripping). Ειδικότερα, η μεμβράνη επωάζεται μέσα σε stripping buffer στους 50 °C για 30’ υπό συνεχή ανακίνηση, ακολουθούν 2 πλύσεις των 10’ σε 1x PBS-T και επώαση σε blocking buffer για 1h, και στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η επώαση με τα αντισώματα που ήδη περιγράφηκε. Εδώ, για την ανίχνευση της α-τουμπουλίνης, χρησιμοποιήθηκε το μοναδικό συζευγμένο με την HRP αντίσωμα rat anti-alpha tubulin HRP-conjugated (AbD Serotec, USA) σε αραίωση 1:800.

2.2.3.9 Ανοσοφθορισμός

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μελετούμενων πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται η τεχνική του ανοσοφθορισμού, μέσω της οποίας η πρωτεΐνη σημασμένη με τον κατάλληλο επίτοπο αναγνωρίζεται από ένα ειδικό για τον επίτοπο αντίσωμα. Στη συνέχεια, το αντίσωμα αναγνωρίζεται από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένα φθορίζον μόριο, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο που δημιουργείται να είναι ορατό με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Ειδικότερα, η διαδικασία του ανοσοφθορισμού έχει ως εξής:

- Ειδικές αντικειμενοφόροι πλάκες (Esco®, Thermo Fischer Scientific, USA) επωάζονται επιφανειακά με περίσσεια 0.01% διαλύματος πολυ-λυσίνης (poly-L-lysine hydrochloride, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) στους 37 °C για 1h και στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν για 10’.
- Κύτταρα Bm5 που εκφράζουν μέσω παροδικής διαμόλυνσης, τις επιθυμητές πρωτεΐνες, 2-3 ημέρες μετά τη διαμόλυνση, ξεπλένονται με απλό μέσο IPL-41 και ακολούθως επωάζονται επί 2h σε θερμοκρασία δωματίου επάνω στις επικαλυμμένες με πολυ-λυσίνη αντικειμενοφόρους πλάκες, ώστε να προσκολληθούν.

- Προαιρετικά, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με διάλυμα 1x PBS και χρώση των κυτταρικών μεμβρανών με 5 μg/mL WGA (wheat germ agglutinin, Texas Red-X conjugate, Molecular Probes, USA) σε θερμοκρασία 28 °C για 10’.
- Στη συνέχεια γίνεται εκ νέου πλύση με 1x PBS και στερέωση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3.7% σε 1x PBS για 10’ σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι πλάκες ξεπλένονται 3 φορές με 1x PBS (όπως και μετά από κάθε ένα από τα επόμενα βήματα).
- Έπειτα, οι κυτταρικές μεμβράνες καθίστανται διαπερατές μετά από επώαση των κυττάρων για 5’ σε διάλυμα 0.1% Triton X-100 (Takara, Japan) σε 1x PBS.
- Ακολουθεί επώαση για 1h σε διάλυμα αλβουμίνης (BSA, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) 3% σε 1x PBS, για την αποφυγή της μη-ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος στο επόμενο στάδιο.
- Εν συνεχεία, τα κύτταρα επωάζονται για 16h στους 4 °C με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε 1x PBS και 1% BSA.
- Ακολούθως, τα κύτταρα ξεπλένονται και επωάζονται με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε 1x PBS και 1% BSA για 1h σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνθήκες σκότους.
- Ακολουθεί πυρηνική χρώση σε θερμοκρασία δωματίου για 5’ με διάλυμα DAPI (4’,6 diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL σε 1x PBS.
- Στις πλάκες τοποθετείται διάλυμα Mowiol (polyvinyl alcohol, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) και τα δείγματα σφραγίζονται με καλυπτρίδες (Knittel-Glass GmbH, Germany).
- Η παρατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται είτε με μικροσκοπία φθορισμού σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert, Zeiss, Germany), είτε με συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία με Laser (BIORAD MRC 1024 Confocal System, USA), το οποίο συνδυάζεται με το λογισμικό Laser Sharp Version 3.2 BioRad software και δίνει τη δυνατότητα λήψης σειριακών τομών.
- Οι ληφθείσες φωτογραφίες υφίστανται επεξεργασία με το λογισμικό ImageJ (Abramoff et al., 2004).

Στην παρούσα μελέτη, ανάλογα με τον επίτοπο της μελετούμενης πρωτεΐνης, χρησιμοποιούνται διαδοχικά τα αντισώματα mouse anti-Myc (1:200, Cell Signaling, USA) και anti-mouse FITC (1:200, Sigma-Aldrich GmbH, Germany), ή rabbit anti-Flag (1:200, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) και goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (1:1000, Molecular Probes, USA).

2.2.3.10 Μολύνσεις κυττάρων με τον ιό CrPV

Κύτταρα Bm5 μολύνθηκαν με τον ιό CrPV, σε αναλογία 10^6 ιϊκών σωματίων ανά 10^6 κύτταρα. Η μόλυνση έλαβε χώρα σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 μικροβοθρίων, όπου επιστρώθηκαν 250,000 κύτταρα ανά μικροβοθρίο, και είτε ήταν συνεχής, είτε είχε διάρκεια 3h με επακόλουθη αντικατάσταση του κυτταρικού μέσου από φρέσκο (μη-μολυσμένο) μέσο IPL-41 (Gibco, USA) που περιείχε 10% FBS (Biosera, HyClone, USA) και γενταμυκίνη 50 μg/mL. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα κάθε μικροβοθρίου διαχωρίστηκαν σε τέσσερα ισάριθμα κλάσματα και μεταφέρθηκαν σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 μικροβοθρίων. Ακολούθησε μέτρηση ζωντανών και νεκρών κυττάρων ανά 24h επί 4 ημέρες με χρήση της χρωστικής Trypan Blue (βλ. §2.2.3.1).

2.2.3.11 Υπολογισμός ιϊκού τίτλου και μέσης λοιμογόνου δόσης ($TCID_{50}$)

Ο προσδιορισμός του ιϊκού τίτλου του AcMNPV-EYFP έγινε με τη μέθοδο Reed-Müench (Reed and Muench, 1938). Για το σκοπό αυτό, κύτταρα Sf21 επιστρώθηκαν σε πλάκες των 96 μικροβοθρίων (10^4 κύτταρα ανά μικροβοθρίο) με 90 μL θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 μL από διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} to 10^{-6}) του μολυσμένου με τον ιό υπερκειμένου που είχε συλλεχθεί προς τιτλοδότηση, ενώ σε κάθε αραίωση αντιστοιχούσαν 10 μικροβοθρία. Ακολούθησε επώαση έως και για 10 ημέρες, και η έκταση της ιϊκής μόλυνσης προσδιορίστηκε έπειτα από συστηματική παρακολούθηση και καταγραφή των μικροβοθρίων που περιείχαν μολυσμένα (φθορίζοντα) κύτταρα.

Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, γίνονται οι εξής παραδοχές: α) όλα τα κύτταρα που βρέθηκαν μολυσμένα σε μία συγκεκριμένη αραίωση, θα είχαν επίσης μολυνθεί σε όλες τις μικρότερες αραιώσεις, και β) όλα τα κύτταρα που βρέθηκαν υγιή σε μία

συγκεκριμένη αραίωση θα είχαν επίσης παραμείνει υγιή και σε όλες τις μεγαλύτερες αραιώσεις.

Για τον υπολογισμό της μέσης λοιμογόνου δόσης του ιού για την κυτταροκαλλιέργεια (tissue culture infectious dose, $TCID_{50}$), αρχικά προσδιορίστηκαν οι δύο αραιώσεις μεταξύ των οποίων έχει μολυνθεί το 50% των κυττάρων. Έτσι, ως «A» ορίζεται το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων στην μεγαλύτερη αραίωση που δίνει μολυσμένα κύτταρα >50%, ενώ ως «B» το ποσοστό μολυσμένων κυττάρων στην αμέσως επόμενη αραίωση (μολυσμένα κύτταρα <50%). Στη συνέχεια υπολογίστηκε η αναλογική απόσταση (proportional distance, PD) μεταξύ της απόκρισης της πρώτης αραίωσης και της υποθετικής απόκρισης για το 50%: PD = (A-50)/(A-B). Ακολούθως, υπολογίστηκε η $TCID_{50}$: $logTCID_{50}$ = -(ο βαθμός αραίωσης που αντιστοιχεί στο «A») - PD, και $TCID_{50} = 10^{logTCID50}$. Έπειτα υπολογίστηκε ο ιϊκός τίτλος (virus titer): = $1/TCID_{50}$. Τέλος, έγινε μετατροπή σε μονάδες σχηματισμού πλάκας (plaque forming units, pfu) ανά mL: pfu/ mL = 0.69 x $TCID_{50}$.

2.2.3.12 Ψύξη κυττάρων

Για τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση και διατήρηση των κυτταρικών σειρών σε υγρό άζωτο, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Κυτταροκαλλιέργεια υψηλής πυκνότητας (5 mL) που έχει αναπτυχθεί σε φλάσκα των 25 cm^2 συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon (15 mL) και φυγοκεντρείται στις 2,500 rpm για 5’.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 mL μίγματος 90% FBS (Biosera, HyClone, USA) και 10% DMSO (Hybri-Max™, Sigma-Aldrich GmbH, Germany). Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει πολύ σύντομα, καθώς το DMSO είναι κυτταροτοξικό.
- Το κυτταρικό διάλυμα χωρίζεται σε 2 φιαλίδια (cryovials) και αποθηκεύεται στους -70 °C σε ειδικό κουτί (cryobox).
- Την επόμενη ημέρα τα φιαλίδια μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

2.2.4 Πειράματα *in vivo*

2.2.4.1 Ενέσεις ζώων με dsRNA

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω ενέσεων dsRNA, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις σε ζώα που βρίσκονταν στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο (5°), λίγο πριν την εκκένωση του εντέρου και την έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού (wandering stage), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Cheng et al., 2008). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται ως εξής:

- Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων με dsRNA, οι προνύμφες αρχικά αναισθητοποιούνται μέσα σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει νερό βρύσης για 5'. Επειδή η διάρκεια της αναισθητοποίησης είναι σύντομη, και με σκοπό την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ένεσης, πριν τα ζώα συνέλθουν, συνιστάται ο χειρισμός αυτός να πραγματοποιείται σε μέγιστο αριθμό 2-3 ζώων, ταυτόχρονα.
- Ακολούθως, τα ζώα μεταφέρονται σε καθαρή επιφάνεια και το σημείο του σώματος όπου θα πραγματοποιηθεί η ένεση απολυμαίνεται με τοπική εφαρμογή διαλύματος αιθανόλης 70%.
- Πιπέτα Hamilton χωρητικότητας 50 μL ξεπλένεται διαδοχικά 3 φορές με διάλυμα αιθανόλης 70% και 3 φορές με ddH_2O. Με την πιπέτα λαμβάνεται η ποσότητα του dsRNA που αντιστοιχεί σε ένα ζώο και ενίεται στην προνύμφη, είτε στη βάση του $2^{ου}$ πλεοπόδιου (Tian et al., 2010b; Tian et al., 2010a), είτε πλευρικά του σώματος στο σημείο της ένωσης δύο κεντρικών μεταμεριδίων.
- Μεταξύ των ενέσεων που αφορούν διαφορετικά άτομα πραγματοποιούνται πλύσεις της πιπέτας με διάλυμα αιθανόλης 70% και ddH_2O.
- Ακολούθως στα ζώα χορηγείται τροφή και αφήνονται να αναπτυχθούν υπό φυσιολογικές συνθήκες.

2.2.4.2 Μολύνσεις ζώων με τον ιό BmCPV

Για την επίτευξη παθογόνου μόλυνσης σε προνύμφες μεταξοσκώληκα, η τεχνητή τροφή διαχωρίστηκε σε μικρά κομμάτια ίσων διαστάσεων (λίγων εκατοστών), τα οποία διαποτίστηκαν με διάλυμα που περιείχε σε υψηλή συγκέντρωση πολύεδρα του ιού BmCPV (3.25×10^7 πολύεδρα/mL). Το διάλυμα του ιού BmCPV που χρησιμοποιήθηκε αποτέλεσε ευγενική παραχώρηση του Dr. Mori (Kyoto Institute of Technology, Kyoto,

Japan). Ακολούθως, η μολυσμένη τροφή χορηγήθηκε άπαξ σε προνύμφες 1-2 ημέρες μετά την έκδυση του 2^{ου} (n=30) ή του 4^{ου} σταδίου (n=30). Στη συνέχεια, τα ζώα διατηρήθηκαν υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης για 10-20 ημέρες, έως ότου έγινε η συλλογή του δείγματος μεσεντέρου και επιδερμικού ιστού.

Η επιτυχία πρόκλησης παθογόνου ιϊκής μόλυνσης αξιολογήθηκε μακροσκοπικά ως θετική σε περίπτωση επιμήκυνσης του χρόνου ανάπτυξης του ζώου, ενώ επιβεβαιώθηκε και μικροσκοπικά μέσω ανίχνευσης πολυέδρων έπειτα από παρατήρηση των ιστών σε οπτικό μικροσκόπιο (Axiovert, Zeiss). Ακόμη, σε μοριακό επίπεδο η μόλυνση ταυτοποιήθηκε μέσω RT-PCR (§2.2.1.4) για το γονίδιο της πολυεδρίνης του ιού BmCPV.

2.2.4.3 Συλλογή δείγματος ζωικού ιστού

Για τις ανάγκες των πειραμάτων που απαιτούν τη συλλογή ζωικού ιστού, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Αρχικά, για την αναισθητοποίηση των ζώων, όταν βρίσκονται στο στάδιο της προνύμφης, αυτά τοποθετούνται είτε σε δοχείο με νερό για 10’, είτε σε δοχείο που περιέχει χαρτί εμποτισμένο με χλωροφόρμιο για λίγα δευτερόλεπτα. Προκειμένου ειδικά για το στάδιο της νύμφης, τα ζώα τοποθετούνται μέσα στον πάγο για 5-10’.
- Στη συνέχεια, το αναισθητοποιημένο ζώο σταθεροποιείται με ανατομικές καρφίτσες σε ειδική κέρινη βάση, ούτως ώστε να διευκολύνεται η δειγματοληψία, και διαβρέχεται με διάλυμα Hunsley’s (Paul et al., 1972; Swevers and Iatrou, 1992).
- Με χρήση στερεοσκοπίου (Nikon SMZ800, The Netherlands) και συσκευή φωτισμού, το σώμα του ζώου ανατέμνεται με ειδικό ψαλίδι, και ο επιθυμητός ιστός (επιδερμίδα, μεσέντερο, λιπαρό σώμα ή όρχεις) αφαιρείται με ανατομική λαβίδα. Ειδικά για την επιδερμίδα, το δείγμα λαμβάνεται από το ίδιο πάντα σημείο της ράχης του ζώου, ενώ όσον αφορά στο μεσέντερο πριν αποθηκευθεί ξεπλένεται προσεκτικά το περιεχόμενό του που αναμένεται να περιέχει ένζυμα αποδόμησης του mRNA.
- Στη συνέχεια, ο ιστός ξεπλένεται μέσα σε διάλυμα Hunsley’s και τοποθετείται σε σωλήνα τύπου eppendorf. Τα δείγματα μπορούν ακολούθως να χρησιμοποιηθούν άμεσα για απομόνωση ολικού RNA ή για μικροσκοπική παρατήρηση, ενώ εναλλακτικά μπορούν να αποθηκευθούν στους -70 °C για μελλοντική ανάλυση.

2.2.4.4 Αλληλούχιση νέας γενιάς για την ανάλυση του μεταγραφώματος και των μικρών RNAs σε προνύμφες μολυσμένες με τον ιό BmCPV

Αν και οι βασικές αρχές της αλληλούχισης είναι όμοιες με την κλασική μέθοδο Sanger που ήδη περιγράφηκε (§2.2.2.1.8), η τεχνική της αλληλούχισης νέας γενιάς (next generation sequencing, NGS) επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων αλληλουχιών σε μεγάλη κλίμακα. Για την ανάλυση του μεταγραφώματος ή των μικρών RNAs μέσω NGS με το σύστημα της Illumina® (USA), αρχικά απομονώνεται ολικό RNA, το οποίο χρησιμοποιείται για την κατασκευή της αντίστοιχης βιβλιοθήκης. Ακολουθεί η ενίσχυση των αλληλουχιών κατά συστάδες, καθώς αυτές δεσμεύονται σε ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς αλληλουχίες-προσαρμοστές (adapters) με χρήση της τεχνικής bridge amplification. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αλληλούχιση χρησιμοποιώντας φθορίζοντα dNTPs με το σύστημα Illumina SBS (sequencing by synthesis) και η ανάλυση των δεδομένων με το κατάλληλο λογισμικό.

Προκειμένου για την κατασκευή βιβλιοθηκών mRNAs που περιλαμβάνουν poly-$[A]^+$ ουρές, το ολικό RNA καθαρίζεται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων που φέρουν αλληλουχίες poly-[T], ενώ στη συνέχεια τεμαχίζεται σε μικρότερα τμήματα χρησιμοποιώντας δισθενή κατιόντα υπό υψηλή θερμοκρασία. Ακολουθεί η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA χρησιμοποιώντας τυχαίους εκκινητές με τη βοήθεια αντίστροφης μεταγραφάσης, και η σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας του cDNA χρησιμοποιώντας τα ένζυμα DNA πολυμεράση I και RNase H. Τα 3’ τυφλά άκρα του δίκλωνου cDNA αδενυλιώνονται και ακολουθεί σύνδεσή τους με αλληλουχίες-προσαρμοστές που αντίστοιχα φέρουν θυμίνη (T) στα 3’ άκρα τους. Αφού καθαριστούν, τα cDNAs πολλαπλασιάζονται με PCR και δημιουργούν την τελική βιβλιοθήκη των cDNA. Αντίστοιχα, προκειμένου για τις βιβλιοθήκες των μικρών RNAs, αυτά συνδέονται με 3’- και 5’-RNA αλληλουχίες-προσαρμοστές, ενισχύονται μέσω RT-PCR και τελικά καθαρίζονται μέσω απομόνωσής τους από πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, για την ανάλυση μέσω NGS χρησιμοποιήθηκαν 4 δείγματα RNA, τα οποία προήλθαν από ιστό μεσεντέρου προνυμφών ($2^{ου}$ και $4^{ου}$ σταδίου) που βρίσκονταν υπό παθογόνο (2inf και 4inf) ή εμμένουσα μόλυνση (2c και 4c) με τον ιό BmCPV, και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Το ολικό RNA που απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε με χρήση του φθορισμομέτρου Qubit (Life technologies, USA).

- Για κάθε δείγμα κατασκευάστηκε μία βιβλιοθήκη αλληλούχισης mRNA χρησιμοποιώντας 100 ng ολικού RNA με τη βοήθεια του TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, USA). Αντίστοιχα, 500 ng ολικού RNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή βιβλιοθήκης μικρών RNA χρησιμοποιώντας το TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina, USA).
- Από την αλληλούχιση καθεμιάς από τις τέσσερις mRNA βιβλιοθήκες, καθώς και τις τέσσερις βιβλιοθήκες των μικρών RNA σε ισομοριακές ποσότητες μέσω του Illumina HiSeq 2000 flowcell, παρήχθησαν 1 x 50 bp αναγνώσεις.
- Μετά την αλληλούχιση, τα δεδομένα αποκωδικοποιήθηκαν με τη βοήθεια ειδικών γραμμωτών κωδίκων (barcodes) νουκλεοτιδίων για το κάθε δείγμα, ενώ κατά μέσο όρο παρήχθησαν 30 x 10^6 mRNA.
- Η ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των mRNAs και των μικρών RNAs πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού CLC bio (Qiagen, USA).
- Οι αλληλουχίες-προσαρμοστές του συστήματος της Illumina αποκόπηκαν (trimming) από τα άκρα όλων των αναγνώσεων.

Βιβλιοθήκες mRNAs

- Οι αναγνώσεις των mRNAs που προέκυψαν αντιστοιχήθηκαν στο ήδη καταχωρημένο γονιδίωμα του *B. mori* (http://sgp.dna.affrc.go.jp/pubdata/genomicsequences.htmL, KAIKObase). Για τα δείγματα mRNA 2inf, 2c, 4inf και 4c, το ποσοστό των αντιστοιχημένων στο γονιδίωμα αναγνώσεων ήταν, αντίστοιχα, 24%, 37%, 29% και 36%. Τα χαμηλότερα ποσοστά αναγνώσεων που αντιστοιχήθηκαν στα δείγματα υπό παθογόνο μόλυνση πιθανώς αντικατοπτρίζουν την επικράτηση μεταγράφων που ενδεχομένως αντιστοιχούσαν στο ιϊκό γονιδίωμα, γεγονός που καταδεικνύει τη σοβαρότητα της μόλυνσης σε αυτά τα δείγματα.
- Ο αριθμός των αναγνώσεων των mRNAs που αντιστοιχούν σε ένα μετάγραφο διαιρέθηκε δια του μήκους του μεταγράφου και κανονικοποιήθηκε (ανά δείγμα) ως προς τον αριθμό των αντιστοιχημένων αναγνώσεων. Με τον τρόπο αυτό, υπολογίστηκε η τιμή έκφρασης RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) για κάθε γονίδιο και κατέστη εφικτή η σύγκριση της διαφορικής έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων.

- Λόγω της ύπαρξης μοναδικού δείγματος για κάθε χειρισμό (και άρα της έλλειψης βιολογικών επαναλήψεων), δεν πραγματοποιήθηκαν t-tests για την ταυτοποίηση στατιστικά σημαντικών διαφορών στη γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, αντί αυτού, τα δεδομένα του RNA-seq φιλτραρίστηκαν σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: α) το σύνολο των αναγνώσεων των γονιδίων που προέκυψε από τις τέσσερις βιβλιοθήκες έπρεπε να είναι μεγαλύτερο του 10, και β) τα επιλεγμένα μετάγραφα έπρεπε να παρουσιάζουν κατ' ελάχιστο 2 φορές μεταβολή της τιμής RPKM ($|\log_2 Ratio| \geq 1$, όπου η τιμή «Ratio» ισοδυναμεί με 2inf/2c ή 4inf/4c) μεταξύ των δειγμάτων που προέκυψαν από παθογόνο και από εμμένουσα μόλυνση, και στα δύο ζεύγη βιβλιοθηκών. Η μεταβολή της RPKM θα έπρεπε να παρατηρείται προς την ίδια κατεύθυνση και στα δύο ζεύγη βιβλιοθηκών, δηλαδή ως αύξηση ή ως μείωση της έκφρασης (Chevignon et al., 2015; Gu et al., 2013). Συνεπώς, η εφαρμογή αυτών των κριτηρίων εξασφάλισε: α) την αξιολόγηση κάθε γονιδίου (ακόμα και με χαμηλά επίπεδα έκφρασης) που παρουσίασε σημαντική διαφορική έκφραση, και β) τη συμπερίληψη γονιδίων με σημαντικές αλλαγές στην έκφραση ανεξαρτήτως του αναπτυξιακού σταδίου των μολυσμένων προνυμφών.

Βιβλιοθήκες μικρών RNAs

- Μετά την αφαίρεση των αλληλουχιών-προσαρμοστών από τα άκρα όλων των αναγνώσεων, περισσότερο από το 95% του αρχικού αριθμού των αναγνώσεων χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των διαφορετικών αλληλουχιών των μικρών RNAs. Αλληλουχίες με λιγότερες από 5 αναγνώσεις, οι οποίες αντιστοιχούσαν περίπου στο 15% των αλληλουχιών που ανιχνεύθηκαν, απορρίφθηκαν.
- Οι εναπομείνασες αλληλουχίες καταμετρήθηκαν και αντιστοιχήθηκαν στο γονιδίωμα του *Bombyx* με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων για τα miRNAs miRBase 19. Τα υπόλοιπα μικρά RNAs, για τα οποία δεν εντοπίστηκε αντιστοίχιση με κάποια αλληλουχία στη miRBase 19, αντιστοιχήθηκαν ως προς το γονιδίωμα του BmCPV ώστε να εντοπιστούν μικρά RNAs ιϊκής προέλευσης. Τα γραφήματα που απεικονίζουν την κατανομή των μικρών RNAs ως προς το μήκος δημιουργήθηκαν στη γλώσσα προγραμματισμού R (Core Team, 2012), χρησιμοποιώντας το πακέτο λογισμικού viRome (http://www.ark-genomics.org/bioinformatics/virome).

Τελικά, όλες οι αλληλουχίες που περιλαμβάνονταν στις βιβλιοθήκες των mRNA και των μικρών RNA για τα τέσσερα δείγματα υποβλήθηκαν στο European Nucleotide Archive (Accession Number PRJEB7502).

2.2.4.5 Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας

Όλες οι αλληλουχίες των μεταγράφων που βρέθηκαν να παρουσιάζουν διαφορική έκφραση μεταξύ των δειγμάτων μεσεντέρου προνυμφών υπό εμμένουσα ή παθογόνο μόλυνση αναλύθηκαν ως προς τη γονιδιακή οντολογία τους (gene ontology, GO) [www.geneontology.org (Carbon et al., 2009; Gene Ontology, 2010)]. Οι αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν με βάση τις καταχωρημένες πληροφορίες για την αλληλουχία του γονιδίου που υπάρχουν στην KAIKObase (sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/) και, στη συνέχεια, τα γονίδια που προέκυψαν από την αναζήτηση ομολογίας εισήχθησαν στη βάση δεδομένων DAVID [david.abcc.ncifcrf.gov (Huang da et al., 2009)].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ RNAi ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

3.1.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Bm5

Για τη διερεύνηση των βασικών παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της RNAi απόκρισης στον *Bombyx mori*, ήταν απαραίτητη η επιλογή ενός κατάλληλου συστήματος μελέτης. Η κυτταρική σειρά Bm5, η οποία προέρχεται από κύτταρα ωοθήκης του *B. mori* (Grace, 1967), παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα στη χρήση της για τα πειράματα αυτού του είδους. Έτσι, στα κύτταρα Bm5 η μέθοδος της διαμόλυνσης και του μετασχηματισμού εμφανίζεται αποτελεσματική (Swevers et al., 2004). Επιπλέον, τα κύτταρα Bm5 παρουσιάζουν ισχυρή απόκριση του RNAi μηχανισμού έπειτα από διαμόλυνση με dsRNA, ενώ ακόμη σε αυτά παρατηρείται έκφραση της πλειοψηφίας των κύριων γονιδίων που συμμετέχουν στα μονοπάτια miRNA και siRNA (Swevers et al., 2011). Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, επιβεβαιώθηκε και η έκφραση των βασικών γονιδίων του piRNA μονοπατιού (*BmAgo3* και *BmAub*), τόσο στα κύτταρα Bm5, όσο και σε προνυμφικούς/νυμφικούς ιστούς μεταξοσκώληκα *in vivo* (**Εικόνα 14**).

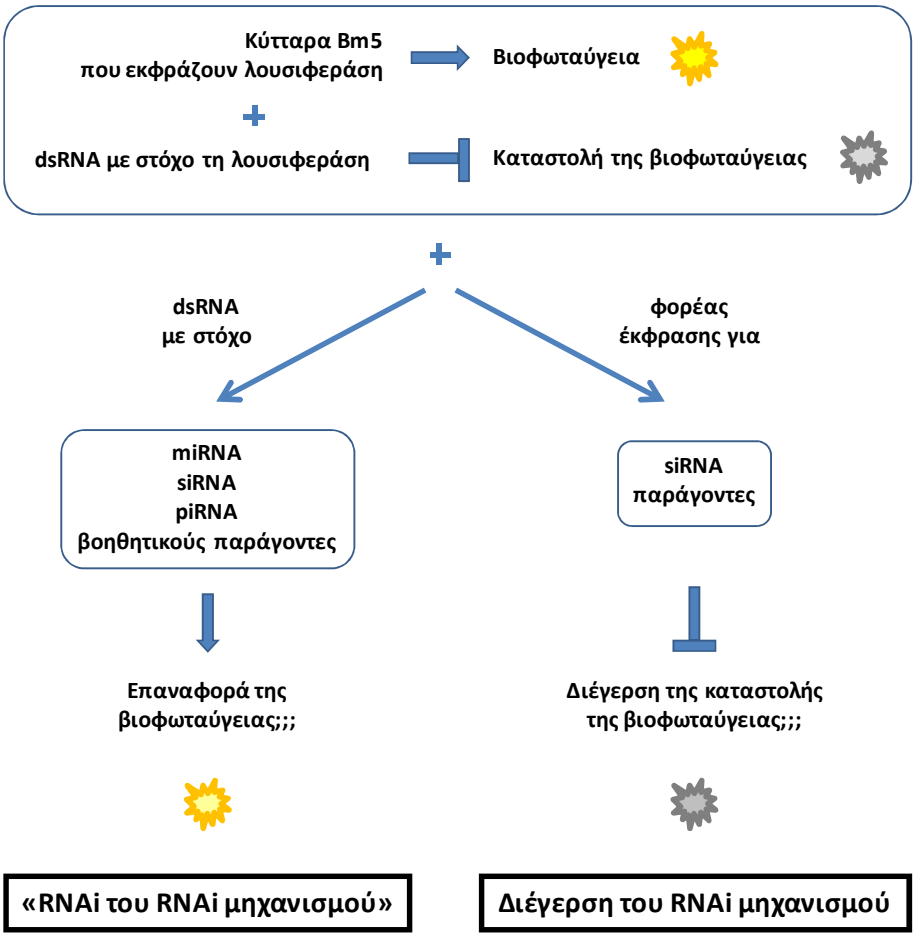
Εικόνα 14 Ενίσχυση των αλληλουχιών mRNA που αντιστοιχούν σε παράγοντες του piRNA μονοπατιού, όπως προέκυψαν από διαφορετικούς ιστούς προνυμφών και νυμφών του στελέχους Daizo, καθώς και από την κυτταρική σειρά μεταξοσκώληκα Bm5. Τα προϊόντα της PCR για τα γονίδια *BmAgo3* και *BmAub* προέκυψαν έπειτα από 35 κύκλους. Ορισμένα από αυτά αλληλουχήθηκαν και βρέθηκαν να αντιστοιχούν στο cDNA (που καλύπτει περισσότερα του ενός εξώνια) του γονιδίου που αναφέρεται. Συντομογραφίες: EP (epidermis) = επιδερμίδα, FB (fat body) = λιπαρό σώμα, G (midgut) = μεσέντερο, M (muscle) = μυϊκό σύστημα, MT (Malpighian tubules) = Μαλπιγγιανά σωληνάρια, CNS (central nervous system) = κεντρικό νευρικό σύστημα, SG (silk gland) = μεταξογόνος αδένας, T (testis) = όρχις, OV (ovary) = ωοθήκη, H (haemocytes) = αιμοκύτταρα και WD (wing disc) = δίσκος πτερύγων. Η στήλη «-» αντιστοιχεί στην αντίδραση PCR απουσία δείγματος.

3.1.1.1 Διερεύνηση των βασικών RNAi παραγόντων που συμμετέχουν στη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω dsRNA στα κύτταρα Bm5

Με σκοπό να προσδιοριστεί η ταυτότητα των βασικών παραγόντων που συνιστούν τον RNAi μηχανισμό στο μεταξοσκώληκα *B. mori*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των γονιδίων που προέρχονταν και από τα τρία γνωστά μονοπάτια των μικρών RNA, σύμφωνα με τα δεδομένα που είναι γνωστά σχετικά με τη *Drosophila*. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στην προσέγγιση του «RNAi του RNAi μηχανισμού» (Dorner et al., 2006; Hoa et al., 2003; Saleh et al., 2006). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, τα κύτταρα διαμολύνονται με dsRNAs τα οποία είναι κατάλληλα σχεδιασμένα ούτως ώστε να στοχεύουν ειδικά σε κάθε ένα από τα RNAi γονίδια προς διερεύνηση, παράλληλα με την αποσιώπηση του διαμολυσμένου φορέα αναφοράς που εκφράζει το γονίδιο της λουσιφεράσης (Luciferase, *Luc*), η οποία επιτελείται από το συνδιαμολυσμένο ειδικό dsRNA (dsLuc) (**Εικόνα 15**). Με τη στρατηγική αυτή στόχος ήταν να προκληθεί παρεμπόδιση της γονιδιακής λειτουργίας μέσω δίκλωνων RNAs, τα οποία έχουν σχεδιαστεί ειδικά ώστε να στοχεύουν σε αυτά ακριβώς τα γονίδια που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στο μηχανισμό του RNAi.

Στους στόχους περιλαμβάνονταν τα βασικά γονίδια των μονοπατιών miRNA, siRNA και piRNA, δηλαδή αυτά που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Dicer και Argonaute, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες πρόσδεσης του dsRNA, και για άλλους βοηθητικούς παράγοντες (**Πίνακας 3**). Με αυτό τον τρόπο, έγινε η υπόθεση ότι λόγω της μειορρύθμισης ενός γονιδίου-κλειδιού του RNAi μηχανισμού του *B. mori*, θα μπορούσε να προκληθεί, παράλληλα, παρεμπόδιση της αποσιώπησης του γονιδίου *Luc*, ούτως ώστε η προκαλούμενη επίδραση να ήταν δυνατόν να εκτιμηθεί μέσω αλλαγών στην παραγόμενη βιοφωταύγεια.

Για τη μέτρηση πιθανών μεταβολών στο κύτταρο, έπειτα από τη χορήγηση dsRNAs έναντι των προαναφερθέντων στόχων, χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιοφωταύγειας ο επαγόμενος φορέας αναφοράς της λουσιφεράσης (pEcRE.bA.luc) (Soin et al., 2008), ο οποίος περιλαμβάνει ένα στοιχείο απόκρισης στην εκδυσόνη (EcRE), το βασικό υποκινητή της ακτίνης, την περιοχή ORF του γονιδίου *Luc* και μία αλληλουχία λήξης. Παράλληλα, για την κανονικοποίηση των μετρήσεων της βιοφωταύγειας, τα κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα με έναν επαγόμενο φορέα



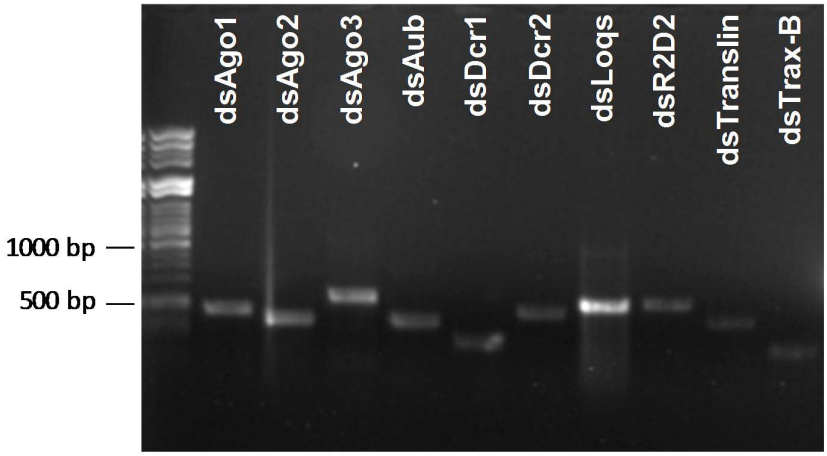
Εικόνα 15 Σχηματική αναπαράσταση της παρεμπόδισης («RNAi του RNAi μηχανισμού») και της διέγερσης του RNAi μηχανισμού. Η παραγωγή βιοφωταύγειας από τα κύτταρα Bm5 που έχουν διαμολυνθεί με το φορέα έκφρασης της λουσιφεράσης καταστέλλεται από το dsRNA που είναι ειδικό για το γονίδιο της λουσιφεράσης (dsLuc). Στα πειράματα που αφορούν στο «RNAi του RNAi μηχανισμού» (αριστερά), τα dsRNAs που στοχεύουν κάθε έναν από τους RNAi παράγοντες εισάγονται στα κύτταρα μέσω διαμόλυνσης και ακολουθεί μέτρηση της βιοφωταύγειας. Η επαναφορά της βιοφωταύγειας (που αντιστοιχεί στην παρεμπόδιση της αποσιώπησης της λουσιφεράσης) σημαίνει ότι ο RNAi μηχανισμός παρεμποδίστηκε λόγω της στόχευσης ενός βασικού RNAi παράγοντα μέσω του ειδικού dsRNA. Αναφορικά με τα πειράματα διέγερσης του siRNA μονοπατιού (δεξιά), πλασμίδια που εκφράζουν κάθε έναν από τους βασικούς siRNA παράγοντες προς έλεγχο εισάγονται στα κύτταρα μέσω διαμόλυνσης και ακολουθεί μέτρηση της βιοφωταύγειας. Η μείωση στα επίπεδα της βιοφωταύγειας (που αντιστοιχεί σε περαιτέρω αύξηση της αποσιώπησης της λουσιφεράσης) σημαίνει ότι ο RNAi μηχανισμός διεγέρθηκε λόγω της ενισχυμένης έκφρασης ενός βασικού RNAi παράγοντα. Όλες οι μετρήσεις κανονικοποιούνται ως προς τον παραγόμενο βιοφθορισμό.

Πίνακας 3 Τα τμήματα που ανήκουν στα γονίδια του RNAi μηχανισμού του *B. mori*, τα οποία κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pLitmus. *Αυτά τα ενθέματα επιλέχθηκαν έπειτα από στοίχιση των αντίστοιχων γονιδίων της *Drosophila* με τη βάση δεδομένων Kaikoblast που αφορά στο μεταξοσκώληκα (Swevers et al., 2011), καθώς τα γονίδια *BmDcr1* και *BmTrax-B* δεν έχουν καταχωρηθεί προς το παρόν στη GenBank.

Γονίδιο	Accession Number	Μονοπάτι μικρών RNA	Φορέας pLitmus	Μέγεθος ενθέματος (bp)	Θέση σε σχέση με το κωδικόνιο έναρξης ATG
BmAgo1	AB332314	miRNA	38i	444	1508-1951
BmAgo2	NP_001036995	siRNA	38i	370	1150-1519
BmAgo3	NM_001104597.2	piRNA	28i	425	1485-1909
BmAub	NM_001104596.2	piRNA	38i	383	1514-1896
BmDcr1	Μη-καταχωρημένη αλληλουχία*	miRNA	38i	266	-
BmDcr2	NM_001193614	siRNA	38i	449	3903-4351
BmLoqs	NM_001195079	miRNA	38i	500	238-735
BmR2D2	NM_001195078	siRNA	28i	497	-4 -493
BmTranslin	NM_001046817	Βοηθητικός παράγοντας	38i	397	262-652
BmTrax-B	Μη-καταχωρημένη αλληλουχία*	Βοηθητικός παράγοντας	38i	362	-

αναφοράς της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης pbA/EcRE.gfp (Swevers et al., 2004), ο οποίος περιέχει την περιοχή ORF του γονιδίου της GFP. Για την επιβεβαίωση ορισμένων από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρήση του pEcRE.bA.luc, χρησιμοποιήθηκε ακόμη ο μη-επαγόμενος φορέας αναφοράς της λουσιφεράσης pActin.luc, από τον οποίον απουσιάζει το στοιχείο απόκρισης στην εκδυσόνη. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε δίκλωνο RNA το οποίο στοχεύει στην περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου της λουσιφεράσης (dsLuc). Με αυτόν τον τρόπο, ελέγχθηκαν τα dsRNAs βασικών γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια των μικρών RNAs (**Εικόνα 16**) μέσω μελέτης της διέγερσης ή της αναστολής της ενεργότητας της λουσιφεράσης, έπειτα από διαμόλυνση των κυττάρων με τον pEcRE.bA.luc, το dsLuc και το εκάστοτε dsRNA. Ως μάρτυρας κατασκευάστηκε το δίκλωνο RNA dsMalE, το οποίο στοχεύει στο γονίδιο *malE* που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη πρόσδεσης της μαλτόζης (MBP, maltose binding protein) στην *E. coli* (Zhu et al., 2011).

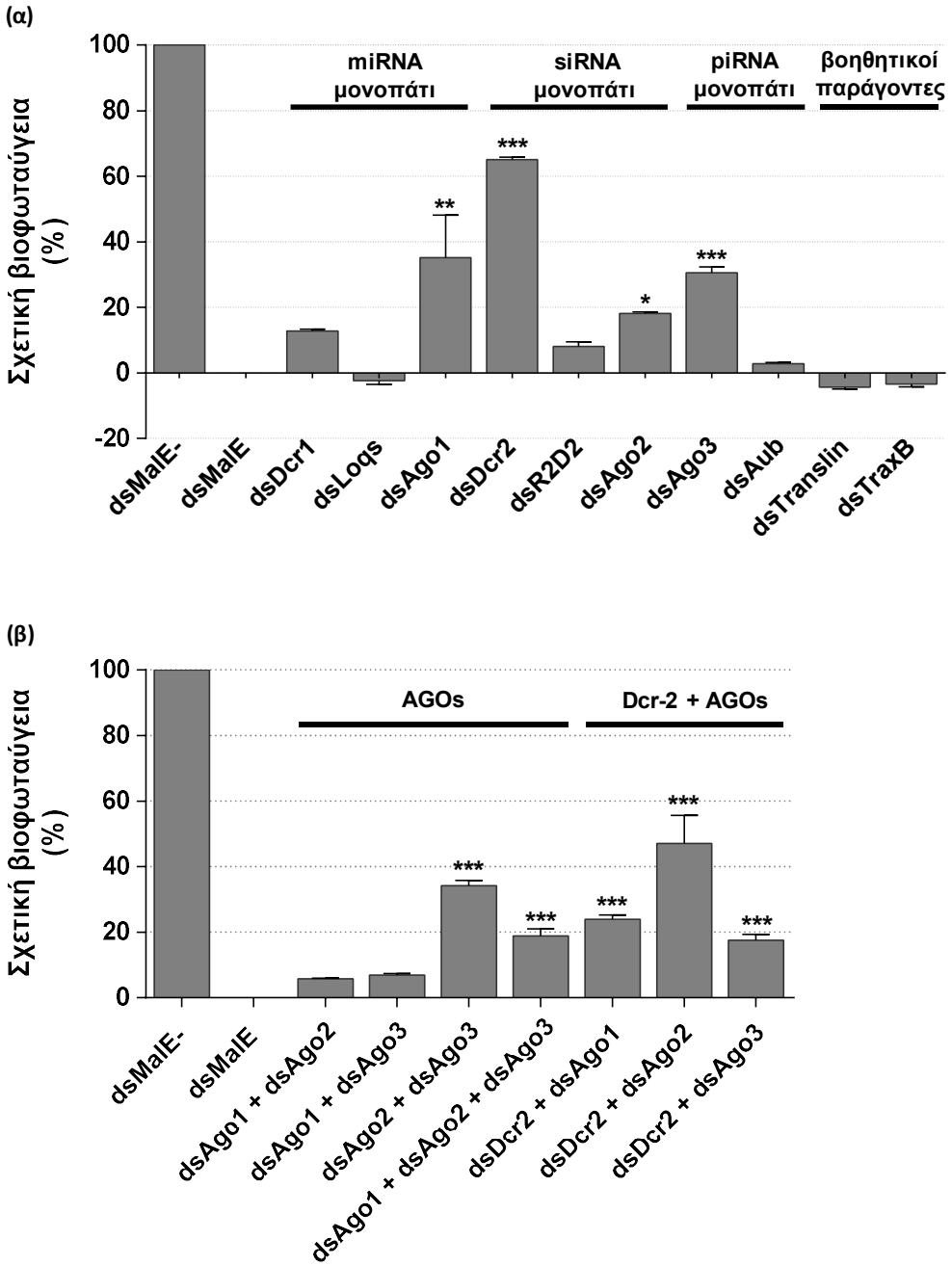
Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των τιμών της επί τοις εκατό (%) σχετικής βιοφωταύγειας, η οποία αποτελεί τον % λόγο της βιοφωταύ-



Εικόνα 16 Τα δίκλωνα RNAs (dsRNAs) που είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να στοχεύουν σε κάθε έναν από τους RNAi παράγοντες οι οποίοι ελέγχθηκαν στα λειτουργικά πειράματα παρεμπόδισης του RNAi μηχανισμού. Η σύνθεση των dsRNAs έγινε με *in vitro* μεταγραφή των μονόκλωνων RNAs με χρήση της T7 RNA πολυμεράσης και υβριδοποίηση των συμπληρωματικών αλυσίδων RNA. Εν συνεχεία, ελέγχθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% ως προς την ακεραιότητα και το μέγεθός τους.

γειας προς τον αντίστοιχο βιοφθορισμό που προκύπτει από κάθε δείγμα και αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων κάθε πειραματικής δοκιμασίας. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 4 (USA).

Όπως παρατηρήθηκε, η καταστολή ορισμένων γονιδίων που προέρχονται και από τα τρία μονοπάτια των μικρών RNA ήταν ικανή να προκαλέσει σημαντική παρεμπόδιση της αποσιωπητικής διαδικασίας. Η ισχυρότερη παρεμπόδιση της γονιδιακής αποσιώπησης παρατηρήθηκε έπειτα από την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *BmDicer2* (*BmDcr2*) του μονοπατιού siRNA (65.1%, **Εικόνα 17α και Πίνακας 4**). Η σημασία του γονιδίου *BmDcr2* για την ορθή λειτουργία του RNAi μηχανισμού επιβεβαιώθηκε και έπειτα από χρήση του μη-επαγόμενου φορέα αναφοράς pActin.luc (**Εικόνα 18**). Σε χαμηλότερα, αλλά στατιστικώς σημαντικά, ποσοστά παρατηρήθηκε παρεμπόδιση του RNAi μηχανισμού έπειτα από την καταστολή της έκφρασης κάθε μίας από τις πρωτεΐνες Argonaute, οι οποίες ανήκουν στα μονοπάτια miRNA, siRNA και piRNA (*BmAgo1*, *BmAgo2* και *BmAgo3*, αντίστοιχα, με ποσοστά που κυμαίνονται από 18.1 έως 35.2%, **Εικόνα 17α και Πίνακας 4**). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute, το γονίδιο της *BmAub*, που είναι ομόλογο του γονιδίου *Aubergine* της *Drosophila*, ανήκει στο μονοπάτι piRNA και είναι επίσης γνωστό ως *BmSiwi* (Kawaoka et al., 2009), ήταν το μοναδικό γονίδιο της οικογένειας του οποίου η



Εικόνα 17 Η λειτουργική δοκιμασία του «RNAi του RNAi μηχανισμού». Λειτουργική δοκιμασία λουσιφεράσης με στόχο (α) μεμονωμένα γονίδια-κλειδιά των μονοπατιών miRNA, siRNA και piRNA, καθώς και βοηθητικών παραγόντων, και (β) συνδυασμών των τεσσάρων βασικών RNAi παραγόντων που ταυτοποιήθηκαν στο πρώτο σκέλος των πειραμάτων. Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της % σχετικής βιοφωταύγειας που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις (+SE, standard error) έπειτα από διαμόλυνση με το κάθε dsRNA. Κάθε στήλη παρουσιάζεται ως % ποσοστό της διαφοράς μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα για το dsLuc (dsMalE-, θεωρείται 100%) και του θετικού μάρτυρα (dsMalE, θεωρείται 0%). Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση του μέσου όρου (n=3) κάθε χειρισμού με το μέσο όρο του θετικού μάρτυρα (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$).

Πίνακας 4 Κανονικοποιημένη % σχετική βιοφωταύγεια που προέκυψε από τα λειτουργικά πειράματα λουσιφεράσης του «RNAi του RNAi μηχανισμού» σε κύτταρα Bm5, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 17. Εδώ παρουσιάζονται οι μέσοι όροι (±SE) της % σχετικής βιοφωταύγειας (κανονικοποιημένης ως προς τον αντίστοιχο βιοφθορισμό) που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, έπειτα από διαμόλυνση με το εκάστοτε dsRNA. Κάθε τιμή παρουσιάζεται ως το % ποσοστό της διαφοράς μεταξύ της % σχετικής βιοφωταύγειας του αρνητικού μάρτυρα για το dsLuc (dsMalE-, θεωρείται 100%) και του θετικού μάρτυρα (dsMalE, θεωρείται 0%).

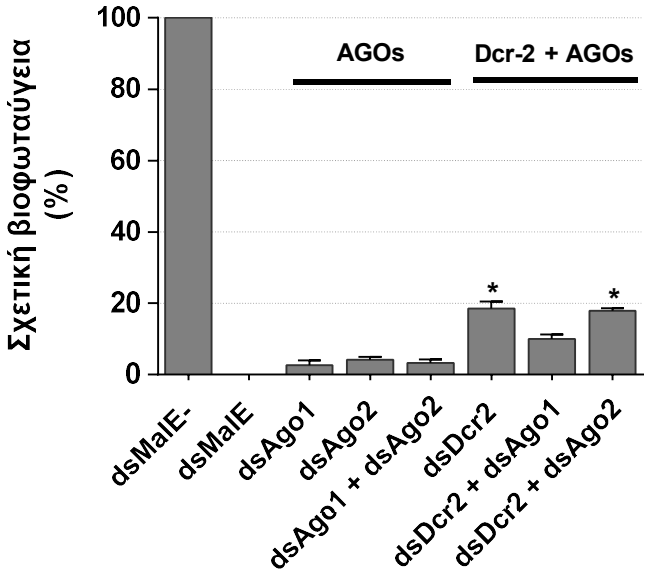
	dsRNA	Κανονικοποιημένη Σχετική βιοφωταύγεια (%)
miRNA	Dcr1	12.83 ± 0.48
	Loqs	-2.33 ± 1.21
	Ago1	35.16 ± 12.96
siRNA	Dcr2	65.06 ± 0.73
	R2D2	8.03 ± 1.46
	Ago2	18.14 ± 0.49
piRNA	Ago3	30.54 ± 1.88
	Aub	2.84 ± 0.35
Βοηθητικοί παράγοντες	Translin	-4.39 ± 0.48
	Trax-B	-3.37 ± 0.86
AGOs	Ago1 + Ago2	5.81 ± 0.20
	Ago1 + Ago3	6.89 ± 0.54
	Ago2 + Ago3	34.20 ± 1.54
	Ago1 + Ago2 + Ago3	18.82 ± 2.23
Dcr2 + AGOS	Dcr2 + Ago1	23.90 ± 1.34
	Dcr2 + Ago2	47.00 ± 8.57
	Dcr2 + Ago3	17.57 ± 1.77

παρεμπόδιση της έκφρασης δεν οδήγησε σε καταστολή της γονιδιακής αποσιώπησης στα κύτταρα Bm5. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η στόχευση του γονιδίου *BmR2D2* δεν προκάλεσε οποιαδήποτε παρεμπόδιση στην αποσιωπητική διαδικασία, γεγονός που ήταν αναμενόμενο καθώς από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το γονίδιο *BmR2D2* δεν εκφράζεται στα κύτταρα Bm5 (Swevers et al., 2011).

Στη συνέχεια, με σκοπό να διερευνηθεί εάν η ταυτόχρονη παρεμπόδιση γονιδίων-κλειδιών που προέρχονται από διαφορετικά μονοπάτια θα μπορούσε να οδηγήσει σε συνεργιστικά αποτελέσματα, τα κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν επίσης με διαφορετικούς συνδυασμούς των τεσσάρων ειδικών ως προς τα γονίδια του RNAi μηχανισμού dsRNAs (**Εικόνα 17β και Πίνακας 4**), τα οποία είχαν προηγουμένως βρεθεί ότι προκαλούν σημαντική παρεμπόδιση της RNAi-αποσιωπητικής διαδικασίας (δηλαδή τα γονίδια

BmDcr2, *BmAgo1*, *BmAgo2* και *BmAgo3*). Είναι αξιοσημείωτο ότι η υψηλότερη παρεμποδιστική δράση της συνδυαστικής αποσιώπησης του RNAi μηχανισμού παρατηρήθηκε μετά από ταυτόχρονη στόχευση των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* που ανήκουν στο μονοπάτι siRNA (47%). Ωστόσο, η ταυτόχρονη στόχευση του γονιδίου *BmDcr2* μαζί με κάποιο από τα γονίδια *BmAgo* των μονοπατιών miRNA και piRNA οδήγησε επίσης σε σημαντική επαναφορά της βιοφωταύγειας (~17.6 έως 23.9%). Τέλος, στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα έδωσε και η συνδυαστική αποσιώπηση των γονιδίων *BmAgo2* και *BmAgo3*, τόσο ως ζεύγος, όσο και σε συνδυασμό με το *BmAgo1* (~18.8 έως 34.2%).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η στόχευση μέσω διαμόλυνσης με τα dsRNA που ήταν ειδικά ως προς αυτά τα τέσσερα γονίδια-κλειδιά ανά δυάδες ή τριάδες είχε γενικότερα μειωμένη παρεμποδιστική δράση στην αποσιώπηση της λουσιφεράσης σε σχέση με την



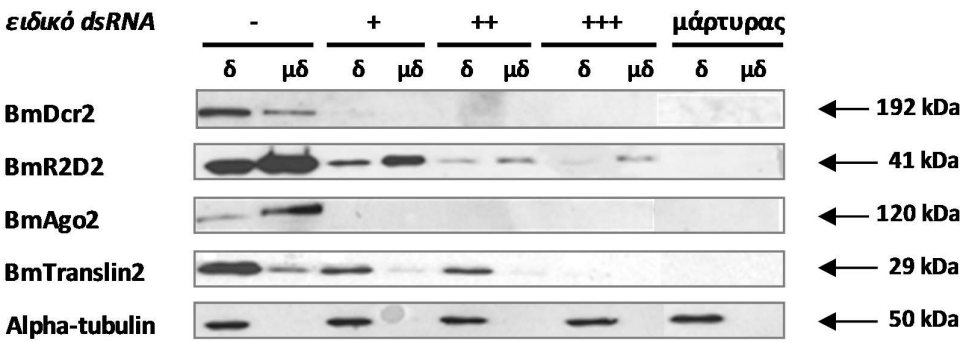
Εικόνα 18 Η λειτουργική δοκιμασία του «RNAi του RNAi μηχανισμού» χρησιμοποιώντας έναν συστατικό (μη-επαγόμενο) φορέα έκφρασης της λουσιφεράσης (pActin.luc). Λειτουργική δοκιμασία λουσιφεράσης με μεμονωμένη ή συνδυαστική στόχευση των γονιδίων *BmAgo1*, *BmAgo2* και *BmDcr2*. Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της % σχετικής βιοφωταύγειας που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις (+SE) έπειτα από διαμόλυνση με το κάθε dsRNA. Κάθε στήλη παρουσιάζεται ως % ποσοστό της διαφοράς μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα για το dsLuc (dsMalE-, θεωρείται 100%) και του θετικού μάρτυρα (dsMalE, θεωρείται 0%). Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση του μέσου όρου (n=3) κάθε χειρισμού με το μέσο όρο του θετικού μάρτυρα (*: $P<0.05$).

παρεμπόδιση που προκλήθηκε όταν αυτά εφαρμόστηκαν ξεχωριστά (**Εικόνα 17β και Πίνακας 4**). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι η ποσότητα του dsRNA που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση δεν ήταν επαρκής για να αποσιωπηθεί κάθε μεμονωμένο γονίδιο όταν αποπειράθηκε η συνδυαστική στόχευση των γονιδίων (2-3 φορές λιγότερη σε σχέση με την ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα στόχευσης μεμονωμένων γονιδίων). Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν παρόμοια παρεμπόδιση της αποδοτικότητας του RNAi μηχανισμού έπειτα από τη χορήγηση πολλαπλών dsRNA κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων γονιδιακής αποσιώπησης, όπου χρησιμοποιήθηκαν έντομα όπως η κατσαρίδα *Blatella germanica* (Mane-Padros et al., 2008).

3.1.1.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας και της εξειδίκευσης της γονιδιακής αποσιώπησης των RNAi παραγόντων που επάγεται μέσω μορίων dsRNA σε κύτταρα Bm5

Ένα ζήτημα που είναι ουσιώδους σημασίας προκειμένου για πειράματα που αφορούν στην προσέγγιση του «RNAi του RNAi μηχανισμού» που περιγράφηκαν νωρίτερα σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση της αποσιώπησης των παραγόντων του RNAi μηχανισμού οι οποίοι στοχεύθηκαν. Στις περισσότερες μελέτες, η αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού προσδιορίζεται συνήθως μέσω ποσοτικοποίησης των επιπέδων του mRNA στόχου μέσω ποσοτικής real-time RT-PCR μετά τον εκάστοτε χειρισμό, ενώ η εξειδίκευση προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας ένα μη-σχετικό dsRNA, όπως για παράδειγμα το dsgfp (Wynant et al., 2012).

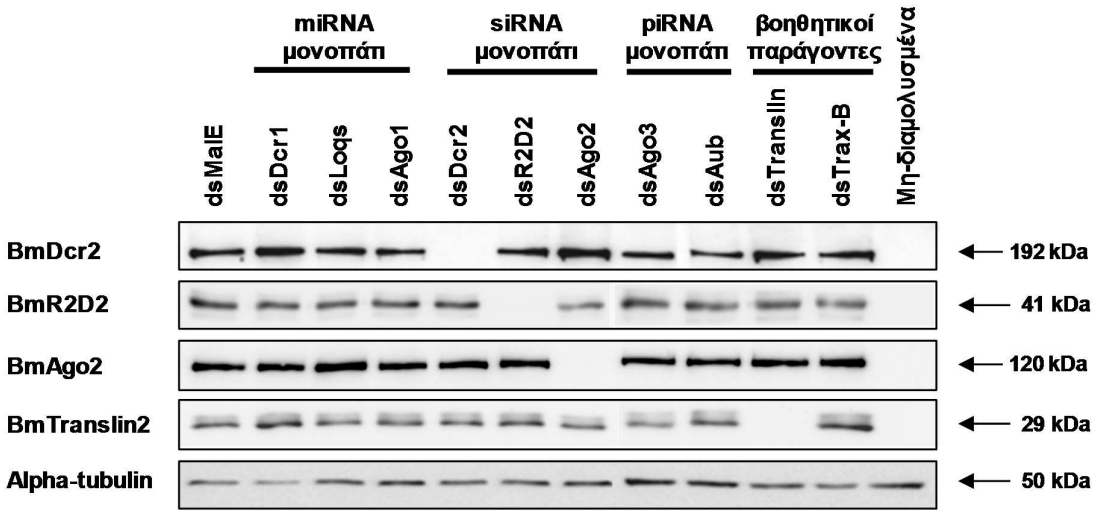
Ενώ αυτή η προσέγγιση είναι εφικτή σε πειράματα όπου η πρόσληψη του dsRNA γίνεται με ευκολία μέσω των ιστών, δεν αποτελεί καλή επιλογή για τα πειράματα διαμόλυνσης τα οποία χαρακτηρίζονται από περιορισμούς όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης. Σύμφωνα με μη-δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, στα κύτταρα Bm5 η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης υπολογίζεται κατά προσέγγιση ως ίση με ~30%. Έτσι, ακόμα και στην περίπτωση πλήρους γονιδιακής αποσιώπησης σε όλα τα διαμολυσμένα κύτταρα, αυτή θα αντιπροσώπευε μόνο έναν μικρό αριθμό κυττάρων του συνολικού πληθυσμού, και συ-



Εικόνα 19 Αποτελεσματική έκφραση τεσσάρων πρωτεϊνών που σχετίζονται με το RNAi και είναι σημασμένες με τον επίτοπο Myc (BmDcr2, BmR2D2, BmAgo2 και BmTranslin2) και απόδειξη της λειτουργικότητας των ειδικών dsRNA σε διαμολυσμένα κύτταρα Bm5. Τα κύτταρα Bm5 συνδιαμολύνθηκαν με τον εκάστοτε φορέα έκφρασης και με βαθμιαία αυξανόμενες συγκεντρώσεις ειδικού dsRNA (+: 0.55 μg/mL, ++: 1.1 μg/mL, +++: 1.65 μg/mL). Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης έγινε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western. Για την κανονικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας φόρτωσης η α-τουμπουλίνη (alpha-tubulin), για την οποία στο τελευταίο πλαίσιο παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα Western. Στο δεξί μέρος της Εικόνας αναγράφονται τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των σημασμένων πρωτεϊνών. Συντομογραφίες: δ: διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, μδ: μη-διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα.

νεπώς θα ήταν δύσκολο να επιβεβαιωθεί η αποσιώπηση σε εκχυλίσματα που αντιπροσώπευαν το συνολικό πληθυσμό. Για το λόγο αυτό, με σκοπό να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα και η εξειδίκευση της γονιδιακής αποσιώπησης στα πειράματά μας, χρησιμοποιήθηκε μία άλλη στρατηγική, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση της παρεμπόδισης διαμολυσμένων φορέων υπερέκφρασης μέσω συνδιαμόλυνσης με το αντίστοιχο ειδικό dsRNA.

Έτσι, εισήχθησαν μέσω διαμόλυνσης σε κύτταρα Bm5 φορείς έκφρασης που αντιστοιχούσαν στους τέσσερις βασικούς RNAi παράγοντες σε συνδυασμό με dsRNA που στόχευαν σε όλα τα υπό μελέτη γονίδια που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό. Συγκεκριμένα, τα γονίδια BmDcr2, BmR2D2, BmAgo2 και BmTranslin2 εκφράστηκαν ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σημασμένες με τον καρβοξυτελικό επίτοπο Myc.His ή τον αμινοτελικό επίτοπο Myc. Αρχικά, για να αποδειχθεί η λειτουργικότητα των εξειδικευμένων dsRNA, εφαρμόστηκαν βαθμιαία αυξανόμενες ποσότητες ειδικού dsRNA στοχεύοντας στον RNAi παράγοντα του φορέα έκφρασης, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης της επιθυμητής πρωτεΐνης κατά έναν δοσοε-



Εικόνα 20 Αποτελεσματική έκφραση και ειδική dsRNA-εξαρτώμενη γονιδιακή αποσιώπηση για τους τέσσερις RNAi παράγοντες που είναι σημασμένοι με τον επίτοπο Myc (BmDcr2, BmR2D2, BmAgo2 and BmTranslin2) έπειτα από διαμόλυνση σε κύτταρα Bm5. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης έγινε μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, ενώ αναγράφονται τα dsRNAs που συνδιαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης. Για την κανονικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας φόρτωσης η α-τουμπουλίνη (alpha-tubulin), για την οποία στο τελευταίο πλαίσιο παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό προφίλ ανοσοαποτυπώματος Western. Στο δεξί μέρος της Εικόνας αναγράφονται τα μοριακά βάρη των σημασμένων πρωτεϊνών.

ξαρτώμενο τρόπο (**Εικόνα 19**). Ακολούθως, για να δειχθεί ότι κάθε dsRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ικανό να προκαλέσει την αποσιώπηση μόνο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης για το γονίδιο της οποίας είχε σχεδιαστεί, κύτταρα Bm5 που εξέφραζαν τους προαναφερθέντες RNAi παράγοντες συνδιαμολύνθηκαν ξεχωριστά με κάθε ένα από τα dsRNA που στοχεύουν στους υπόλοιπους παράγοντες που σχετίζονται με το RNAi. Μέσω ανοσοαποτυπώματος Western αποδείχθηκε ότι η αποσιώπηση ήταν εφικτή μόνο για το dsRNA που ήταν ειδικό ως προς τον υπερεκφρασμένο RNAi παράγοντα, ενώ όλα τα υπόλοιπα dsRNA δεν επηρέασαν την πρωτεϊνική έκφραση (**Εικόνα 20**).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε αποσιώπηση λόγω dsRNAs που στόχευαν γονίδια εντός της ίδιας οικογένειας. Για παράδειγμα, τα dsAgo1 και dsAgo3 δεν προκάλεσαν αποσιώπηση στην υπερέκφραση της BmAgo2, ενώ το dsDcr1 δεν επηρέασε την έκφραση της BmDcr2. Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική, καθώς αποκλείει την πιθανότητα διασταυρούμενης αποσιώπησης συγγενών γονιδίων (π.χ. Argonaute και Dicer) λόγω κάποιου dsRNA της ίδιας οικογένειας στα πειράματα του «RNAi του RNAi μηχανισμού».

3.1.1.3 Διερεύνηση του ρόλου των μονόκλωνων RNAs στην ενδοκυτταρική απόκριση του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5

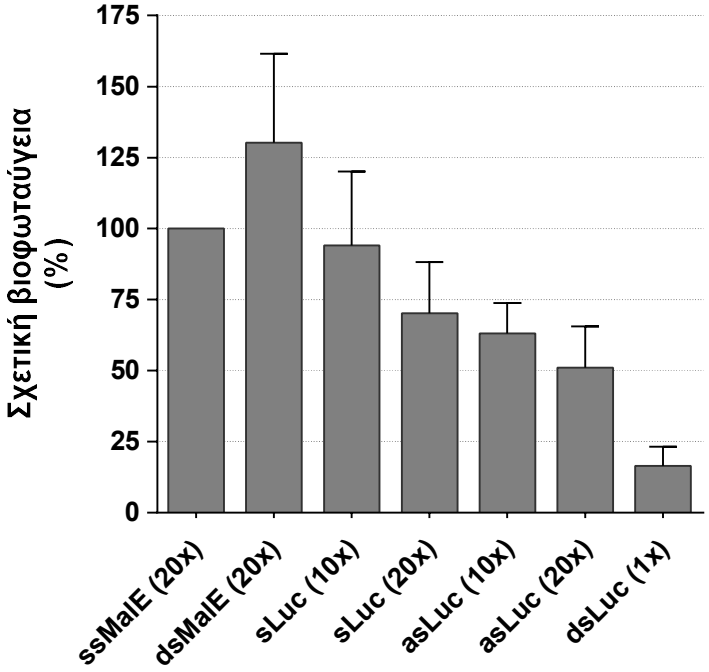
Είναι γνωστό ότι στο πρότυπο βιολογικό σύστημα της *Drosophila* το μονοπάτι piRNA λειτουργεί ανεξάρτητα από τη δράση μίας πρωτεΐνης της κατηγορίας Dicer και ότι η πρωτογενής piRNA απόκριση έχει ως αφετηρία ssRNA μετάγραφα. Στη γαμετική σειρά, το αρχικό ερέθισμα μεγεθύνεται στη συνέχεια μέσω του κύκλου Ping-Pong, σύμφωνα με τον οποίο διαφορετικές πρωτεΐνες Argonaute συνδέονται με piRNAs σε κωδικοποιό (sense, Ago3) ή μη-κωδικοποιό (antisense, Aub/Piwi) πολικότητα, ώστε να παράξουν piRNAs της αντίθετης πολικότητας (Jinek and Doudna, 2009; Siomi and Siomi, 2015; Vodovar et al., 2012).

Το εύρημα ότι το γονίδιο *BmAgo3* ενδέχεται να εμπλέκεται στην RNAi απόκριση των κυττάρων Bm5 (βλ. §3.1.1.1) θα μπορούσε να σημαίνει ότι η αποσιώπηση είναι δυνατό να επιτευχθεί όχι μόνο μέσω dsRNA αλλά επίσης μέσω μονόκλωνων RNA μορίων σε κωδικοποιό ή μη-κωδικοποιό προσανατολισμό (sense - sRNAs, antisense - asRNAs). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα Bm5 διαθέτουν ικανότητα εκτύλιξης του dsRNA (dsRNA-unwinding) (Skeiky and Iatrou, 1991), η οποία θα μπορούσε να δώσει την ευκαιρία έκθεσης των μονόκλωνων περιοχών του διαμολυσμένου dsRNA σε πιθανή επεξεργασία (ανεξάρτητη από πρωτεΐνες Dicer) και φόρτωση στο σύμπλοκο RISC που θα περιέχει την BmAgo3.

Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε η πιθανότητα πρόκλησης αποσιώπησης μέσω κωδικοποιού ή μη RNA (sLuc ή asLuc), το οποίο ήταν έτσι σχεδιασμένο ώστε να στοχεύει ακριβώς στην ίδια περιοχή με το dsLuc που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα πειράματα. Στα πλαίσια διερεύνησης της ανωτέρω υπόθεσης, πραγματοποιήθηκε μία νέα λειτουργική δοκιμασία λουσιφεράσης, κατά την οποία κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν όπως και νωρίτερα με τους επαγόμενους φορείς pEcRE.bA.luc και pbA/EcRE.gfp, ενώ σε αυτή την περίπτωση, ελέγχθηκε εάν το μονόκλωνο μη-κωδικοποιό RNA που στοχεύει στο γονίδιο *Luc* έχει την ικανότητα να αποσιωπήσει το συγκεκριμένο γονίδιο σε συγκρίσιμα επίπεδα με το θετικό μάρτυρα dsLuc. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν, όπως και πριν, το μονόκλωνο ssMalE ή το δίκλωνο RNA dsMalE. Οι ποσότητες του ssRNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 10 έως και 20 φορές υψηλότερες σε σχέση με εκείνη του dsLuc, ούτως ώστε να αντισταθμιστεί η μεγαλύτερη τάση αποδόμησης του ssRNA εντός του κυττάρου σε σχέση με το dsRNA. Όπως φαίνεται

και στην **Εικόνα 21**, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στη έκφραση του φορέα αναφοράς της λουσιφεράσης έπειτα από την εφαρμογή υψηλών συγκεντρώσεων asLuc ή sLuc (3.3 μg/mL). Από την άλλη πλευρά, το dsLuc προκάλεσε αποσιώπηση ακόμη και στην περίπτωση εφαρμογής πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων (0.17 μg/mL). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η απόκριση του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5 δεν μπορεί να πυροδοτηθεί από ένα μονόκλωνο asRNA ή sRNA, τουλάχιστον χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις όπως αυτές που εφαρμόστηκαν στα εν λόγω πειράματα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα συγκλίνουν στην άποψη ότι ο μηχανισμός του RNAi στα κύτταρα Bm5 φαίνεται να λειτουργεί ανεξάρτητα από μονόκλωνα μόρια RNA μη-κωδικοποιού προσανατολισμού, καθώς έπειτα από χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων αυτών δε φαίνεται να προκαλείται στατιστικά σημαντική αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα dsLuc. Συνεπώς, στα κύτταρα Bm5 του μεταξοσκώληκα *B. mori*, η εμπλοκή της BmAgo3 στον RNAi-αποσιωπητικό μηχανισμό



Εικόνα 21 Λειτουργική δοκιμασία του «RNAi του RNAi μηχανισμού» με χρήση μονόκλωνων RNA. Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της % σχετικής βιοφωταύγειας που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις (+SE) έπειτα από διαμόλυνση με ssRNA ή dsRNA. Κάθε στήλη παρουσιάζεται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα (ssMalE-, θεωρείται 100%).

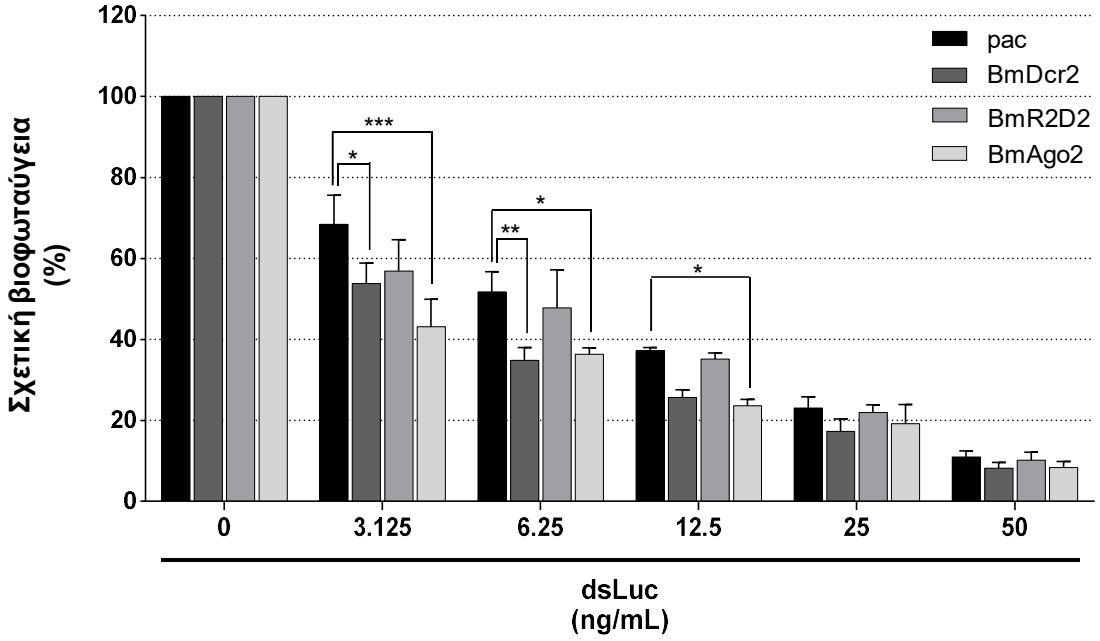
πιθανότατα δε σχετίζεται με μονόκλωνα μόρια RNA μη-κωδικοποιού προσανατολισμού όπως έχει δειχθεί στο piRNA μονοπάτι της *Drosophila*. Έτσι, φαίνεται ότι ενδεχομένως το γονίδιο *BmAgo3* μπορεί να ενσωματώνεται στα μονοπάτια γονιδιακής αποσιώπησης του μεταξοσκώληκα όπου το αρχικό μόριο-ερέθισμα είναι ένα δίκλωνο RNA (π.χ. siRNA).

3.1.1.4 Η επίδραση της υπερέκφρασης πρωτεϊνών-κλειδιών του siRNA μονοπατιού στη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω dsRNA σε κύτταρα Bm5

Τα πειράματα του «RNAi του RNAi μηχανισμού» έδειξαν ότι ορισμένοι παράγοντες του siRNA μονοπατιού (BmDcr2 και BmAgo2) είναι σημαντικοί για την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού (**Εικόνες 17α και 17β**). Νωρίτερα, είχε επίσης δειχθεί ότι από τα κύτταρα Bm5 απουσιάζει η έκφραση του γονιδίου *BmR2D2*, ενός σημαντικού παράγοντα του siRNA μονοπατιού στη *Drosophila* (Swevers et al., 2011). Συνεπώς, θα ήταν ενδιαφέρον αν διερευνηθεί εάν η αποτελεσματικότητα του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα θα μπορούσε να διεγερθεί έπειτα από την υπερέκφραση των γονιδίων *BmDcr2*, *BmAgo2* ή *BmR2D2*. Έτσι, κύτταρα Bm5 συνδιαμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης των παραγόντων siRNA μαζί με τα πλασμίδια αναφοράς pEcRE.bA.luc και pbA/EcRE.gfp, καθώς και dsLuc σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (**Εικόνα 22**). Ως μάρτυρας dsRNA χρησιμοποιήθηκε, όπως και νωρίτερα, το δίκλωνο RNA dsMalE, ενώ ως μάρτυρας για το φορέα pEA χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEA.pac, το οποίο περιέχει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη (*pac*).

Με ενδιαφέρον παρατηρήσαμε ότι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του dsLuc (3.125 έως 6.250 ng/mL), η αυξημένη έκφραση των BmDcr2 και BmAgo2 ήταν ικανή να ενισχύει την αποτελεσματικότητα του dsLuc στην αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς σε σχέση με το μάρτυρα (**Εικόνα 22**, κατά 14.6 ή 16.9% για το *BmDcr2*, και κατά 25.3 ή 15.4% για το *BmAgo2*). Ωστόσο, η έκφραση του *BmR2D2* δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική επίδραση στην RNAi απόκριση των κυττάρων Bm5.

Το γεγονός ότι η υπερέκφραση των BmAgo2 και BmDcr2 προκάλεσε σημαντική ενίσχυση του φαινομένου της γονιδιακής αποσιώπησης επιβεβαιώνει ότι τα γονίδια *BmAgo2* και *BmDcr2* παίζουν σημαντικό ρόλο στον RNAi μηχανισμό των κυττάρων Bm5,



Εικόνα 22 Λειτουργική δοκιμασία έπειτα από συνέκφραση με τους κύριους siRNA παράγοντες. Οι φορείς έκφρασης που ελέγχθηκαν αντιστοιχούσαν στα γονίδια *BmDcr2*, *BmR2D2* και *BmAgo2*. Ο φορέας έκφρασης pEA.pac χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Επιπλέον, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με βαθμιαία αυξανόμενες συγκεντρώσεις dsRNA ειδικού ως προς το γονίδιο της λουσιφεράσης (dsLuc). Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της % σχετικής βιοφωταύγειας που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις (+SE) έπειτα από διαμόλυνση με το dsLuc. Κάθε στήλη παρουσιάζεται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα (dsLuc = 0 ng/mL, θεωρείται 100%). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης αναφέρονται στη σύγκριση του μέσου όρου (n=3) κάθε χειρισμού υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης με το μέσο όρο του μάρτυρα pac (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$).

καθώς τόσο η αναστολή όσο και η ενίσχυση της έκφρασής τους φαίνεται να διαταράσσουν την ισορροπία του μηχανισμού αυτού. Ωστόσο, αναφορικά με το γονίδιο *BmR2D2*, φαίνεται ότι, ανεξάρτητα από το αν αναστέλλεται ή ενισχύεται η έκφρασή του, αυτό δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη λειτουργία του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη γνώση ότι το εν λόγω γονίδιο δεν έκφραζεται στα κύτταρα Bm5 ενισχύει την άποψη ότι το *BmR2D2* δεν αποτελεί γονίδιο-κλειδί για τον RNAi μηχανισμό στον *B. mori* και πιθανώς η λειτουργία του υποκαθιστάται από κάποιο άλλο γονίδιο.

3.1.2 ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ Bm5 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

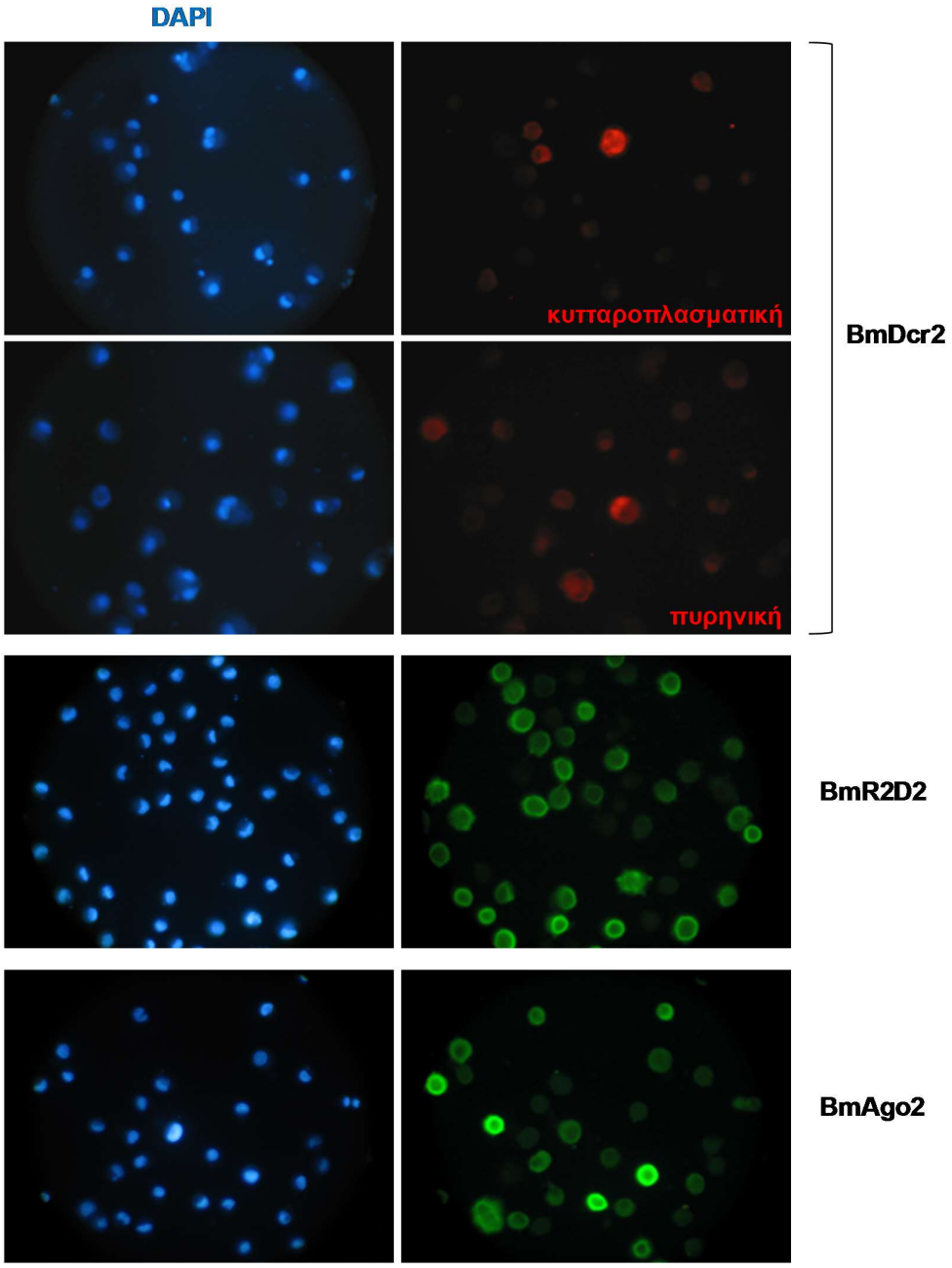
3.1.2.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός των κύριων πρωτεϊνών του siRNA μονοπατιού

Με σκοπό την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών αναφορικά με τον υποκυτταρικό εντοπισμό των κύριων siRNA παραγόντων, ούτως ώστε αυτός να συσχετισθεί με τη λειτουργία τους στο κυτταρικό περιβάλλον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα Bm5 που είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί με φορείς έκφρασης για τις σημασμένες με τους επιτόπους Flag, Myc ή Myc.His πρωτεΐνες BmDcr2, BmR2D2 και BmAgo2.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μικροσκοπίας προσπίπτουσας ακτινοβολίας (epifluorescence) η πρωτεΐνη Flag-BmDcr2 εμφανίστηκε να έχει είτε κυτταροπλασματικό, είτε πυρηνικό εντοπισμό (**Εικόνα 23**). Στη συνέχεια, η συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία laser επιβεβαίωσε τις παραπάνω παρατηρήσεις αναφορικά με τον εν λόγω διττό εντοπισμό της Flag-BmDcr2 πρωτεΐνης στα κύτταρα Bm5 (**Εικόνα 24**). Ωστόσο, όταν τα ίδια πειράματα ανοσοφθορισμού επαναλήφθηκαν με χρήση της πρωτεΐνης BmDcr2 σημασμένης με τον αμινοτελικό επίτοπο Myc (Myc-BmDcr2), η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα με μία ιδιαίτερη προτίμηση για την κυτταρική μεμβράνη, ενώ πολύ σπάνια (<5%) εμφανίστηκε στον κυτταρικό πυρήνα (**Εικόνα 25**).

Ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της πρωτεΐνης BmDcr2 μπορεί να δικαιολογηθεί σύμφωνα με τον αποδεδειγμένο ρόλο της στην επεξεργασία των μεγάλου μήκους dsRNAs από το μονοπάτι siRNA. Παρόμοιο πρότυπο κυτταροπλασματικού εντοπισμού έχει παρατηρηθεί και για τη σημασμένη με τον επίτοπο Flag πρωτεΐνη BmDcr2, όταν αυτή υπερεκφράστηκε σε μία άλλη κυτταρική σειρά Λεπιδοπτέρων, τα κύτταρα Hi5 του είδους *Trichoplusia ni* (Liu et al., 2012). Παράλληλα, παρουσία της Dcr2 στο κυτταρόπλασμα, και ειδικότερα στα σωμάτια D (D bodies), έχει παρατηρηθεί στα κύτταρα S2 της *Drosophila* (Liang et al., 2015; Nishida et al., 2013).

Ο παρατηρούμενος πυρηνικός εντοπισμός της BmDcr2 σηματοδοτεί πιθανώς τη συσχέτιση με μία διαφορετική λειτουργία της ίδιας πρωτεΐνης, η οποία μέχρι πρόσφατα ήταν άγνωστη. Ειδικότερα, σύμφωνα με δεδομένα που προκύπτουν για τη *Drosophila*, η Dcr2 μπορεί να προσδένεται στην πυρηνική χρωματίνη και να παίζει ρυθμιστικό ρόλο

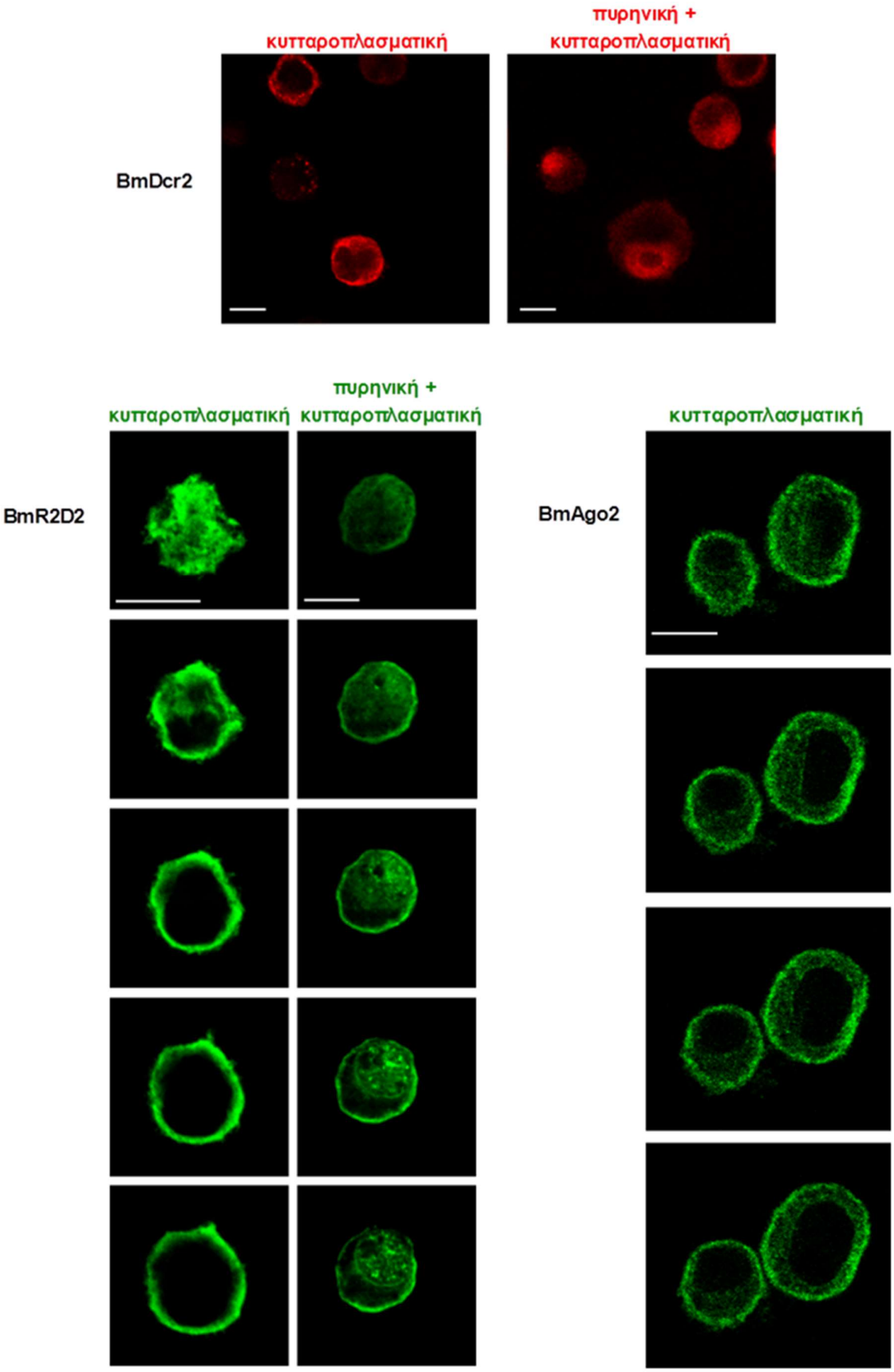


Εικόνα 23 Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών BmDcr2, BmR2D2 και BmAgo2 του *B. mori.* Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης (pEA-Flag-BmDcr2, pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-BmAgo2-Myc.His), σε συνδυασμό με το πλασμίδιο pBmIE1. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται η χρώση των πυρήνων με DAPI (μπλε χρώση). Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η ανίχνευση του επιτόπου Flag με χρήση των αντισωμάτων anti-Flag (1:200) και anti-rabbit Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση) ή του επιτόπου Myc.His με χρήση των αντισωμάτων anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση). Η παρατήρηση έγινε με μικροσκόπιο προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Συντελεστής μεγέθυνσης: 20x).

στη μεταγραφή (Cernilogar et al., 2011). Παρόμοια αποτελέσματα πυρηνικού εντοπισμού έχουν επίσης παρατηρηθεί για τη Dcr2 στα κύτταρα εντόμων S2 και Hi5 (Cernilogar et al., 2011; Liu et al., 2012). Παράλληλα, σε πληθώρα ανθρώπινων κυττάρων, η πρωτεΐνη Dicer ανιχνεύεται επίσης ισχυρά και σε μεγάλο ποσοστό στον πυρήνα (Doyle et al., 2013; Gagnon et al., 2014b; Ohrt et al., 2012). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στα πειράματα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, αν και η ανίχνευση της Flag-BmDcr2 στον πυρήνα ήταν εξίσου συχνή με την παρουσία της στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνες 23 και 24**), η παρουσία της Myc-BmDcr2 στους πυρήνες των κυττάρων Bm5 ήταν ιδιαιτέρως σπάνια (**Εικόνα 25**). Συνεπώς, ενδέχεται η σήμανση με διαφορετικούς επιτόπους να επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης BmDcr2 στα κύτταρα Bm5.

Όσον αφορά στην πρωτεΐνη BmR2D2, πριν από οποιαδήποτε παρατήρηση των Εικόνων που ελήφθησαν μέσω μικροσκοπίας φθορισμού, θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα κύτταρα Bm5 το mRNA της εν λόγω πρωτεΐνης δεν παράγεται (Swevers et al., 2011), και συνεπώς τα συμπεράσματα που θα προκύψουν από τα παρακάτω πειράματα αντικατοπτρίζουν μία τεχνητή κατάσταση για το κύτταρο. Όπως φαίνεται στις Εικόνες που προέκυψαν από τη μικροσκοπία προσπίπτουσας ακτινοβολίας και τη συνεστιακή σαρωτική μικροσκοπία laser, η χρώση της αποκάλυψε ότι μετά από την υπερέκφραση υπό μορφή σημασμένη με τον καρβοξυτελικό επίτοπο Myc.His σε κύτταρα Bm5, αυτή εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια του κυττάρου (**Εικόνες 23 και 24**). Ειδικότερα, η BmR2D2 φαίνεται ότι εκφράζεται με μεγάλη συχνότητα πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης, όπως αποκαλύπτεται και από τη μεμβρανική χρώση με WGA (**Εικόνα 25**). Ωστόσο, όπως προέκυψε από τις Εικόνες που ελήφθησαν μέσω συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser, η πρωτεΐνη BmR2D2-Myc.His εντοπίζεται και στον πυρήνα, με μικρότερη όμως συχνότητα (**Εικόνα 24**). Επιπλέον, η αλλαγή του επιτόπου σήμανσης της πρωτεΐνης στον αμινοτελικό Flag, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια στα πειράματα συνεντοπισμού, έδειξε ότι ενδεχομένως αυξάνει τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης BmR2D2 (βλ. §3.1.2.2).

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, επιβεβαιώθηκε ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της BmR2D2 στο μεταξοσκώληκα, όπου ωστόσο αποτυπώθηκε με μία περισσότερο διάχυτη εικόνα παρουσίας στο κυτταρόπλασμα (Zhu et al., 2015). Έτσι, με βάση τα δεδομένα που είναι γνωστά για το siRNA μονοπάτι στη *Drosophila*, όπου τεκμηριώνεται

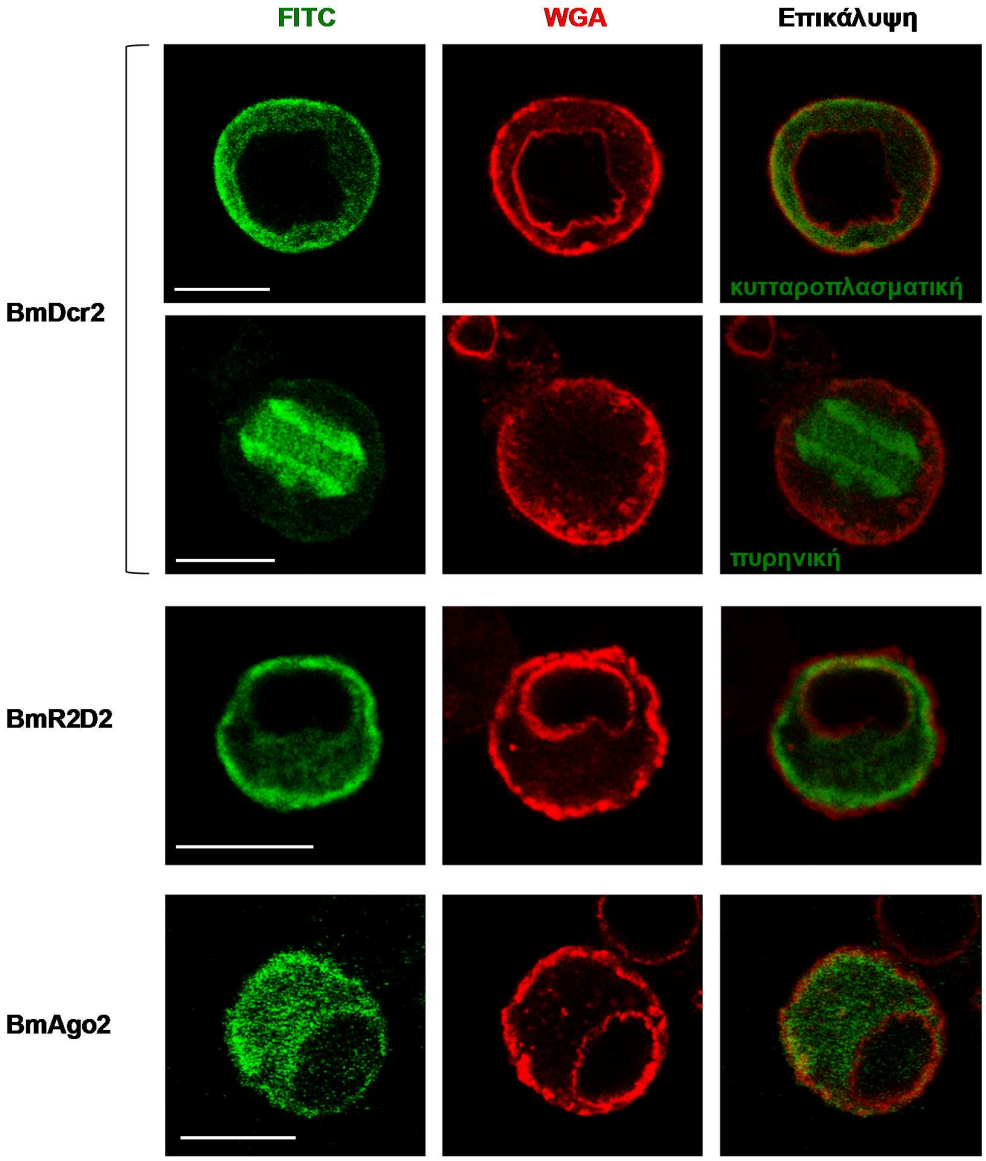

κυτταροπλασματική
πυρηνική +
κυτταροπλασματική
BmDcr2
πυρηνική +
κυτταροπλασματική
κυτταροπλασματική
BmR2D2
κυτταροπλασματική
BmAgo2

Εικόνα 24 Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών BmDcr2, BmR2D2 και BmAgo2 του *B. mori.* Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης (pEA-Flag-BmDcr2, pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-BmAgo2-Myc.His), σε συνδυασμό με το πλασμίδιο pBmIE1. Η ανίχνευση του επιτόπου Flag έγινε με χρήση των αντισωμάτων anti-Flag (1:200) και anti-rabbit Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση), ενώ του επιτόπου Myc.His έγινε με χρήση των αντισωμάτων anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση). Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 100 μm.

η δημιουργία του συμπλόκου Dcr2/R2D2 στα κύτταρα S2 (Liu et al., 2003), η BmR2D2 στον *B. mori* ενδέχεται να σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη BmDcr2 και να συμμετέχει στην πρόσδεση των dsRNAs που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη είναι η πρώτη φορά που, αν και σπάνια, η BmR2D2 εντοπίζεται στον πυρήνα (**Εικόνα 24**). Συνεπώς, ο πυρηνικός εντοπισμός της BmR2D2 ενδεχομένως να συνδέεται με την *in vivo* παρουσία της BmDcr2 στον πυρήνα και υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις να εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής.

Εκτός από τις πρωτεΐνες BmDcr2 και BmR2D2, αναλύθηκε εξίσου εκτενώς και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης BmAgo2. Αρχικά, η μικροσκοπία προσπίπτουσας ακτινοβολίας έδειξε ότι η σημασμένη με τον καρβοξυτελικό επίτοπο Myc.His πρωτεΐνη BmAgo2 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων Bm5 (**Εικόνα 23**). Στη συνέχεια, μέσω συνεστιακής σαρωτικής μικροσκοπίας laser, ο υποκυτταρικός εντοπισμός της BmAgo2-Myc.His πρωτεΐνης προσδιορίστηκε σαφέστερα, καθώς, όπως φαίνεται, η εν λόγω πρωτεΐνη εμφανίζεται κυρίως στην περιφέρεια του κυττάρου (αφού συνεντοπίζεται με τη μεμβρανική χρώση WGA), καθώς και ως ένα διάχυτο πρότυπο έκφρασης στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνες 24 και 25**). Το γεγονός αυτό είναι σύμφωνο με το γνωστό ρόλο της BmAgo2 στη συγκρότηση του συμπλόκου RISC στο κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία στη σάρωση του μεταγραφώματος για τον εντοπισμό συμπληρωματικών ως προς το προσδεδεμένο δίκλωνο μόριο RNA αλληλουχιών.

Εκτός από το κυτταρόπλασμα, έχει γίνει πλέον σαφές από αρκετές μελέτες ότι η Ago2 κατέχει λειτουργικό ρόλο και στον πυρήνα. Ειδικότερα, στη *Drosophila* το ομόλογό της έχει βρεθεί ότι διαθέτει ρόλο πιθανά ανεξάρτητο του RNAi μηχανισμού, καθώς συνδέεται με την ευχρωματίνη στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της απόκρισης στο θερμικό στρες λειτουργώντας πιθανώς ως μεταγραφικός ρυθμιστής (Cernilogar et al., 2011; Moshkovich et al., 2011). Παράλληλα, σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από



Εικόνα 25 Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών BmDcr2, BmR2D2 και BmAgo2 του *B. mori.* Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης της εκάστοτε πρωτεΐνης (pEA-Myc-BmDcr2, pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-BmAgo2-Myc.His), σε συνδυασμό με το πλασμίδιο pBmIE1. Η ανίχνευση του επιτόπου Myc.His έγινε με χρήση των αντισωμάτων anti-myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση, πρώτη στήλη). Η χρώση των κυτταρικών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική WGA (wheat germ agglutinin Texas Red-X conjugate, κόκκινη χρώση, δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο χρώσεων. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 100 μm.

τον άνθρωπο, η Ago2 συχνά εντοπίζεται εκτός από το κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Chu et al., 2010; Rudel et al., 2008; Weinmann et al., 2009), όπου εμπλέκεται στη

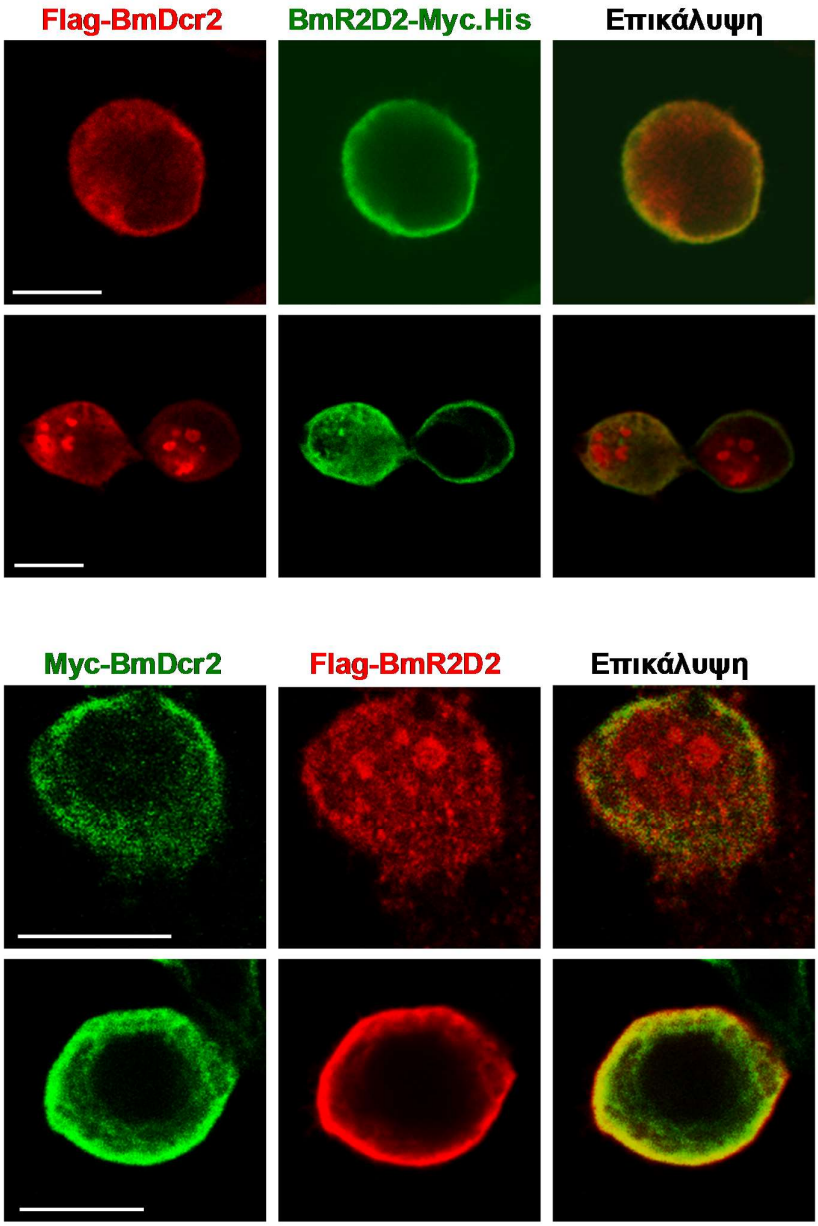
λειτουργία ενός ελαφρώς διαφοροποιημένου αλλά λειτουργικού πυρηνικού RNAi μηχανισμού (Carissimi et al., 2015; Gagnon et al., 2014b; Ohrt et al., 2008) και στη ρύθμιση της έκφρασης των tRNA γονιδίων (Woolnough et al., 2015). Ωστόσο, στα πειράματα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη (**Εικόνες 23-25**), αλλά και σε σχετική μελέτη που αφορά στα κύτταρα BmN4 του μεταξοσκώληκα (Zhu et al., 2013a), η BmAgo2-Myc.His δεν ανιχνεύθηκε ποτέ στον πυρήνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι στον *B. mori* η παρουσία της περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα, ή ότι ο πιθανός εντοπισμός της στον πυρήνα είναι εξαιρετικά σπάνιος, ώστε να μην έχει ακόμα καταστεί δυνατό να αποκαλυφθεί.

3.1.2.2 Υποκυτταρικός συνεντοπισμός των κύριων πρωτεϊνών του siRNA μονοπατιού

Σύμφωνα με μελέτες που αφορούν στη *Drosophila*, οι πρωτεΐνες Dcr2 και R2D2 συνεντοπίζονται στα κυτταροπλασματικά σωμάτια D2, των οποίων ρόλος είναι να εξασφαλίζουν τη φόρτωση των endo- ή exo-siRNAs στην Ago2 (Marques et al., 2010; Nishida et al., 2013). Στα σωμάτια D2, οι πρωτεΐνες Dcr2 και R2D2 σχηματίζουν σύμπλοκο όσον αφορά στο μονοπάτι siRNA στο πλαίσιο μίας αμφίδρομης σχέσης, καθώς η Dcr2 σταθεροποιεί την R2D2, ενώ η R2D2 ρυθμίζει τον εντοπισμό της Dcr2 στα σωμάτια αυτά (Nishida et al., 2013). Σε σχέση με το μεταξοσκώληκα, σε κύτταρα BmN4 πρόσφατα βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη BmDcr2 εντοπίζεται στα κυτταροπλασματικά κοκκία τύπου D2 (D2-body-like granules) και αλληλεπιδρά με τις BmR2D2 και BmAgo2, ενώ για την πρωτεΐνη BmR2D2 δείχθηκε ότι, αν και εδράζεται υπό διάχυτη μορφή στο κυτταρόπλασμα, είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των κοκκίων τύπου D2 και, επιπλέον, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη BmAgo2 (Zhu et al., 2015).

Στην παρούσα μελέτη, για να μελετηθεί εάν οι πρωτεΐνες-κλειδιά του siRNA μονοπατιού συνεντοπίζονται υποκυτταρικά, ούτως ώστε να προκύψουν πιθανά στοιχεία για το ενδεχόμενο να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, κύτταρα Bm5 συνδιαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης των μελετούμενων πρωτεϊνών και, στη συνέχεια, έγινε ανίχνευση αυτών με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

Για τα πειράματα που αφορούσαν στις πρωτεΐνες BmDcr2 και BmR2D2, χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι φορέων ανά πρωτεΐνη, δηλαδή για τη BmDcr2 φορείς με

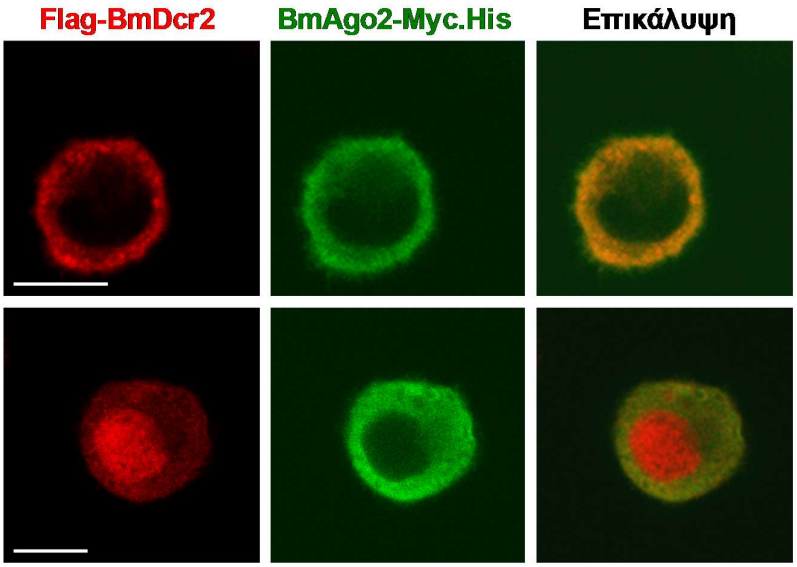


Εικόνα 26 Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών BmDcr2 και BmR2D2 έπειτα από συνέκφραση σε κύτταρα Bm5. Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-Flag-BmDcr2 ή pEA-Myc-BmDcr2 και pBmIE1 σε συνδυασμό με τους pEA-BmR2D2-Myc.His ή pEA-Flag-BmR2D2, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες που έφεραν τον επίτοπο Flag ανιχνεύθηκαν με τα αντισώματα anti-Flag (1:200) και goat anti-rabbit-Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση), ενώ εκείνες που έφεραν τον επίτοπο Myc ανιχνεύθηκαν με τα αντισώματα anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο χρώσεων. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετικό τύπο συνεντοπισμού των BmDcr2 και BmR2D2. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 100 μm.

τον επίτοπο Flag ή Myc και για τη BmR2D2 φορείς με τον επίτοπο Myc.His ή Flag. Στην **Εικόνα 26** παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της συνέκφρασης των πρωτεϊνών BmDcr2 και BmR2D2 φαίνεται ότι υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά πρότυπα αυτής, σύμφωνα με τα οποία: α) οι BmDcr2 και BmR2D2 εκφράζονται ταυτόχρονα μόνο στο κυτταρόπλασμα, β) οι BmDcr2 και BmR2D2 εκφράζονται ταυτόχρονα με μορφή κοκκίων στον πυρήνα και διάχυτα στο κυτταρόπλασμα, γ) η BmDcr2 εκφράζεται τόσο με μορφή πυρηνικών κοκκίων, όσο και διάχυτα στο κυτταρόπλασμα, ενώ η BmR2D2 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα και πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης, και δ) η BmDcr2 εκφράζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα, ενώ η BmR2D2 εκφράζεται τόσο με μορφή πυρηνικών κοκκίων, όσο και διάχυτα στο κυτταρόπλασμα.

Όπως θα ήταν αναμενόμενο, η BmDcr2 συνεντοπίζεται με αρκετά μεγάλη συχνότητα με την BmR2D2, κυρίως στο κυτταρόπλασμα και την περιφέρεια του κυττάρου (κοινή παρατήρηση που αφορά και στους δύο τύπους σήμανσης), γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται με τη δημιουργία ενός συμπλόκου όμοιου με αυτό που προαναφέρθηκε για τη *Drosophila*. Ωστόσο, στην περίπτωση που οι δύο πρωτεΐνες συνυπάρχουν στον πυρήνα του κυττάρου, αυτές δε φαίνεται να συνεντοπίζονται στα πλαίσια της συνύπαρξής τους με μορφή συμπλόκου. Βέβαια, πιθανώς, οι δύο πρωτεΐνες να γειτνιάζουν ως μεμονωμένες πρωτεϊνικές μορφές, ούτως ώστε μόνο στην περίπτωση που απαιτηθεί να είναι διαθέσιμες προς συμπλοκοποίηση στα πλαίσια του μονοπατιού siRNA. Παρόλα αυτά, δεν αποκλείεται οι BmDcr2 και BmR2D2 να εκφράζονται στον πυρήνα με σκοπό την επιτέλεση διαφορετικών λειτουργιών, οπότε και δεν αναμένεται να δρουν ως σύμπλοκο. Οι παραπάνω υποθέσεις θα μπορούσαν να διερευνηθούν σε πειράματα συνδιαμόλυνσης με φθορίζον dsRNA ή siRNA, ώστε να μελετηθεί εάν η παρουσία του «υποστρώματος» του πιθανού συμπλόκου Dcr2/R2D2 μεταβάλλει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των δύο πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν.

Αναφορικά με τη συνέκφραση των πρωτεϊνών BmDcr2 και BmAgo2, χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός φορέων έκφρασης, δηλαδή οι pEA-Flag-BmDcr2 και pEA-BmAgo2-Myc.His. Όπως φαίνεται, ο βαθμός στον οποίο οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται υποκυτταρικά εξαρτάται άμεσα από τον εντοπισμό της BmDcr2 (**Εικόνα 27**). Ειδικότερα, η BmAgo2 παρουσιάζει σταθερά παρόμοιο πρότυπο έκφρασης που μεταφράζεται σε υψηλά πρωτεϊνικά επίπεδα αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα.

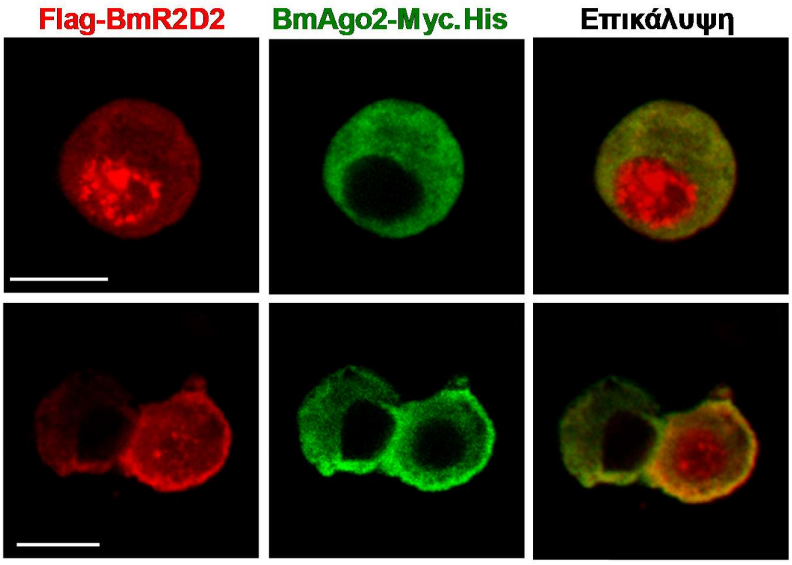


Εικόνα 27 Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών BmDcr2 και BmAgo2 έπειτα από συνέκφραση σε κύτταρα Bm5. Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-Flag-BmDcr2 και pBmIE1 σε συνδυασμό με τον pEA-BmAgo2-Myc.His. Η Flag-BmDcr2 ανιχνεύθηκε με τα αντισώματα anti-Flag (1:200) και goat anti-rabbit-Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση, πρώτη στήλη), ενώ η BmAgo2-Myc.His ανιχνεύθηκε με τα anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση, δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο χρώσεων. Η πρώτη σειρά απεικονίζει τη BmDcr2 σε κυτταροπλασματικό εντοπισμό, ενώ η δεύτερη κυρίως σε πυρηνικό και δευτερευόντως σε κυτταροπλασματικό εντοπισμό. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 100 μm.

Από την άλλη πλευρά, η BmDcr2 μπορεί να εντοπίζεται: α) στο κυτταρόπλασμα, όπου και συνεντοπίζεται πλήρως με την BmAgo2, ή β) κυρίως στον πυρήνα και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα, όπου ο συνεντοπισμός με την BmAgo2 λαμβάνει χώρα μόνο στο κυτταρικό διαμέρισμα του κυτταροπλάσματος με την παρουσία της BmAgo2 να υπερισχύει. Ο συνεντοπισμός των δύο αυτών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα δικαιολογείται από τον κοινό ρόλο που πιθανώς έχουν στην ομαλή λειτουργία του μονοπατιού siRNA, καθώς στη *Drosophila* το σύμπλοκο Dcr2/R2D2 έρχεται σε επαφή μετο σύμπλοκο Ago2/RISC με σκοπό να φορτωθούν τα siRNAs, ώστε μετέπειτα να οδηγηθούν στο mRNA στόχο τους (Marques et al., 2010). Αντίθετα, η παρουσία της BmDcr2 στον πυρήνα πιθανώς εξυπηρετεί κάποιον διαφορετικό ρόλο, όπως ήδη έχει περιγραφεί στη §3.1.2.1. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι ανάλογα με τις

ανάγκες του κυττάρου, οι BmDcr2 και BmAgo2 μπορούν να συμμετέχουν σε κοινά ή διαφορετικά μονοπάτια.

Παρόμοια είναι και η σχέση των πρωτεϊνών BmR2D2 και BmAgo2, όπου χρησιμοποιώντας τους φορείς pEA-Flag-BmR2D2 και pEA-BmAgo2-Myc.His παρατηρήθηκε ότι και σε αυτή την περίπτωση ο υποκυτταρικός συνεντοπισμός τους εξαρτάται από τη θέση που εκφράζεται η BmR2D2 (**Εικόνα 28**). Όπως και προηγουμένως, η BmAgo2 εντοπίζεται πάντα σε υψηλά επίπεδα στο κυτταρόπλασμα, με την έκφρασή της να εμφανίζεται αυξημένη κατά περίπτωση κοντά στην κυτταρική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, η BmR2D2 εντοπίζεται πάντα στο κυτταρόπλασμα, ενίοτε και πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης, και ορισμένες φορές και στον πυρήνα με τη μορφή κοκκίων σε αυξημένα επίπεδα. Έτσι, ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός των BmR2D2 και BmAgo2 μπορεί να ερμηνευθεί, όπως προαναφέρθηκε, λόγω πιθανής επαφής του συμπλόκου Dcr2/R2D2 με το RISC του οποίου καταλυτικός πυρήνας είναι η

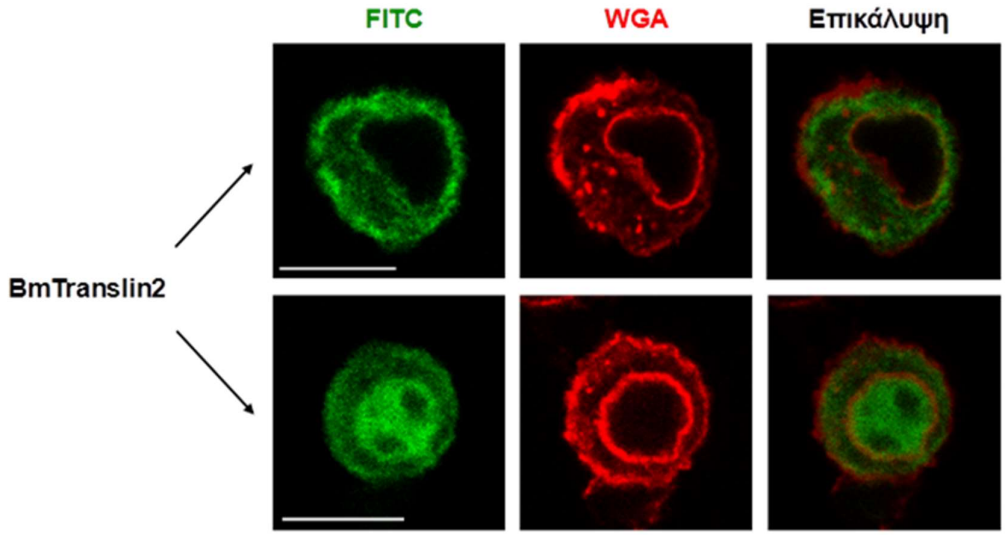


Εικόνα 28 Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών BmR2D2 και BmAgo2 έπειτα από συνέκφραση σε κύτταρα Bm5. Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-Flag-BmR2D2 και pBmIE1, σε συνδυασμό με τον pEA-BmAgo2-Myc.His. Η Flag-BmR2D2 ανιχνεύθηκε με τα αντισώματα anti-Flag (1:200) και goat anti-rabbit-Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση, πρώτη στήλη), ενώ η BmAgo2-Myc.His ανιχνεύθηκε με τα anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση, δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο χρώσεων. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 100 μm.

Ago2. Ο πυρηνικός εντοπισμός της BmR2D2 πιθανώς εξυπηρετεί κάποια άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία που διαθέτει αυτή η πρωτεΐνη δέσμευσης μορίων dsRNA.

3.1.2.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης BmTranslin2

Η πρωτεΐνη Translin είναι γνωστή για τις πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει, όπως τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, την επεξεργασία του mRNA, τη σπερματογένεση, τη νευρωνική ανάπτυξη και λειτουργία, τη σταθερότητα του γονιδιώματος και την καρκινογένεση, ενώ επιπλέον διαθέτει δραστικότητα δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων (Jaendling and McFarlane, 2010). Αναφορικά με το μηχανισμό του RNAi, στη *Drosophila* η πρωτεΐνη Translin δρα σε σύμπλοκο με την Trax-B, ενισχύοντας το έργο της Ago2, απομακρύνοντας τη δεύτερη αλυσίδα (passenger strand) του δίκλωνου siRNA μορίου που έχει προηγουμένως προσδεθεί στο σύμπλοκο Ago2/RISC (Liu et al., 2009). Στο μεταξοσκώληκα, αν και δεν είναι γνωστός ο ρόλος του γονιδίου που κωδικοποιεί για την Translin, ωστόσο αυτή εντοπίζεται σε δύο μορφές: τη



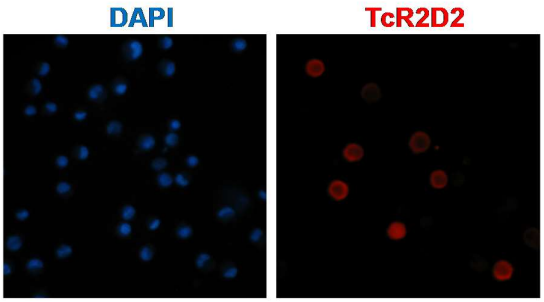
Εικόνα 29 Υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης BmTranslin2 σε κύτταρα Bm5. Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης pEA-BmTranslin2.Myc.His, σε συνδυασμό με το πλασμίδιο pBmIE1. Η ανίχνευση του επιτόπου Myc έγινε με χρήση των αντισωμάτων anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση, πρώτη στήλη). Η χρώση των κυτταρικών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική WGA (wheat germ agglutinin Texas Red-X conjugate, κόκκινη χρώση, δεύτερη στήλη). Στην τρίτη στήλη, παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο χρώσεων. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 100 μm.

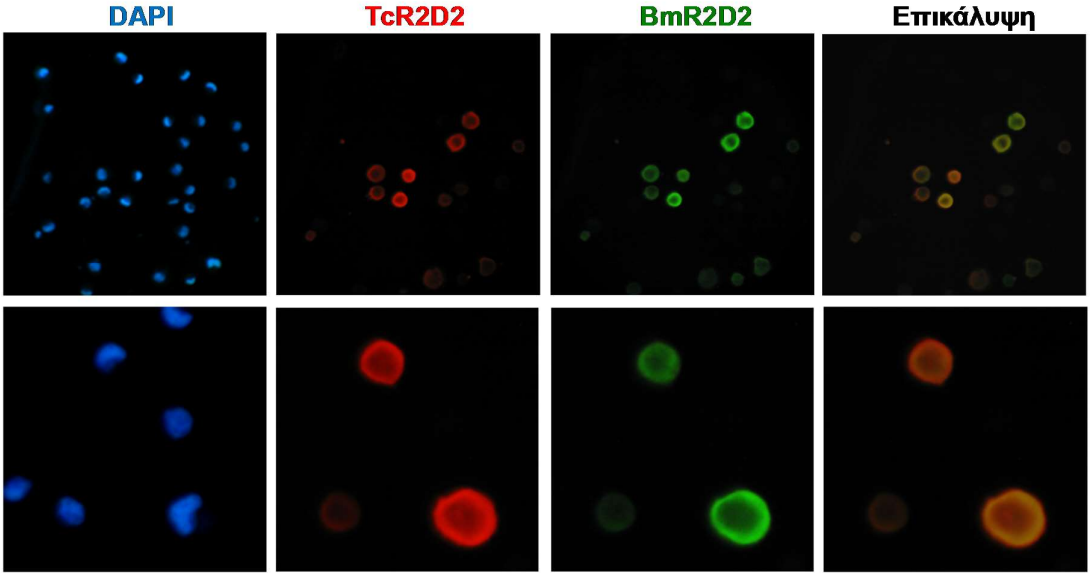
φυσιολογική (BmTranslin2) που διαθέτει το χαρακτηριστικό καρβοξυτελικό άκρο των μελών της οικογένειας Translin, το οποίο ανιχνεύεται σε πληθώρα οργανισμών και ενδεχομένως σχετίζεται με τη λειτουργικότητά της, και τη μεταλλαγμένη (BmTranslin1) που φέρει πρόωρο κωδικόνιο λήξης (Swevers et al., 2011). Ειδικότερα, για τα κύτταρα Bm5, έχει βρεθεί ότι εκφράζουν μόνο τη μεταλλαγμένη μορφή της BmTranslin (Swevers et al., 2011) και άρα θα ήταν ενδιαφέρον να παρατηρηθεί η υποκυτταρική κατανομή της φυσιολογικής πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά.

Στα πειράματα ανοσοφθορισμού που παρουσιάζονται εδώ, η πρωτεΐνη BmTranslin2 εντοπίζεται πάντα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων Bm5, ενώ μπορεί ταυτοχρόνως να εκφράζεται και στον πυρήνα (**Εικόνα 29**). Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις η παρουσία της BmTranslin2 είναι περισσότερο διάχυτη παρά εντοπισμένη σε κοκκία. Ο εντοπισμός της BmTranslin2 τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των κυττάρων Bm5 δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς η Translin είναι γνωστό ότι, ανάλογα με τη λειτουργία την οποία επιτελεί, σε άλλους οργανισμούς μπορεί να συνεντοπίζεται με την Trax-B και στον κυτταρικό πυρήνα (Jaendling and McFarlane, 2010). Βέβαια, αυτό το πρότυπο έκφρασης είναι κάτι νέο για τα κύτταρα Λεπιδοπτέρων, καθώς όπως έχει βρεθεί, έπειτα από ετερόλογη έκφραση της BmTranslin2 σε κύτταρα Hi5, αυτή εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα, όπου σχεδόν κατά 50% εμφανίζεται συγκεντρωμένη σε ολιγάριθμα κοκκία (Swevers et al., 2011).

3.1.2.4 Υποκυτταρικός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών BmR2D2 και TcR2D2

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, το γονίδιο *R2D2* κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη πρόσδεσης του dsRNA, η οποία στη *Drosophila* εντοπίζεται στα κυτταροπλασματικά σωμάτια D2 (Liang et al., 2015; Nishida et al., 2013). Εδώ, σκοπός ήταν να μελετηθούν πιθανές ομοιότητες και διαφορές στα πρότυπα υποκυτταρικής κατανομής δύο ομόλογων πρωτεϊνών R2D2 που προέρχονται από το μεταξοσκώληκα *B. mori* και από το Κολεόπτερο σκούρο σκαθάρι των αλεύρων *T. castaneum* (red flour beetle). Το έντομο αυτό επιλέχθηκε διότι, σε αντίθεση με το μεταξοσκώληκα που παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία στα πειράματα συστημικού RNAi *in vivo*, εμφανίζεται ιδιαίτερα ευαίσθητο και δεκτικό στην πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi (Bucher et al., 2002; Schmitt-Engel et al., 2015; Tribolium Genome Sequencing et al., 2008). Έτσι, πι-





Εικόνα 30 Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών BmR2D2 του *B. mori* και TcR2D2 του *T. castaneum* έπειτα από συνέκφραση σε κύτταρα Bm5. Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-BmR2D2-Myc.His και pEA-Flag-TcR2D2, σε συνδυασμό με το φορέα pBmIE1. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI (μπλε χρώση, πρώτη στήλη). Η Flag-TcR2D2 ανιχνεύθηκε με anti-Flag (1:200) και goat anti-rabbit-Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση, δεύτερη στήλη), ενώ η BmR2D2-Myc.His ανιχνεύθηκε με τα αντισώματα anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση, τρίτη στήλη). Στην τελευταία στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο χρώσεων. Η παρατήρηση έγινε με μικροσκόπιο προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Συντελεστές μεγέθυνσης: 20x και 40x).

θανή διαφοροποίηση στο πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης-κλειδιού για το μονοπάτι siRNA ενδέχεται να συνδέεται με την έλλειψη ευαισθησίας του μεταξοσκώληκα στην τεχνική του RNAi *in vivo*.

Αρχικά, η πρωτεΐνη TcR2D2 υπερεκφράστηκε μόνη της στα κύτταρα Bm5, όπου διαπιστώθηκε η κυτταροπλασματική κατανομή της, με ιδιαίτερη συγκέντρωση κοντά στην περιφέρεια του κυττάρου (**Εικόνα 30**). Το εύρημα αυτό διαφοροποιείται σε σχέση

με παλαιότερες παρατηρήσεις, όπου η ετερόλογη έκφραση της TcR2D2 στα κύτταρα Hi5 οδήγησε στην εντοπισμένη έκφρασή της υπό τη μορφή ολιγάριθμων κυτταροπλασματικών κοκκίων (Swevers et al., 2011). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η σημασμένη με τον αμινοτελικό επίτοπο Flag πρωτεΐνη TcR2D2, στη μελέτη που προαναφέρθηκε η ίδια πρωτεΐνη ήταν σημασμένη με τον καρβοξυτελικό επίτοπο Myc.His (Swevers et al., 2011).

Στη συνέχεια, η συνέκφραση των πρωτεϊνών BmR2D2 και TcR2D2 έδειξε ότι οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και, κατά κύριο λόγο, στην περιφέρεια του κυττάρου (**Εικόνα 30**). Έτσι, παρά το μικρό ποσοστό ομολογίας (29%) στην πρωτεϊνική τους αλληλουχία, ο υποκυτταρικός συνεντοπισμός τους αποτελεί στοιχείο που συντείνει στην άποψη ότι ενδεχομένως οι λειτουργικές ιδιότητές τους εντός του κυττάρου να μη διαφέρουν σημαντικά.

Συνεπώς, τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος δε δικαιολογούν το πρότυπο της υποκυτταρικής κατανομής της πρωτεΐνης BmR2D2 ως πιθανή αιτία ώστε να αποδίδεται σε αυτήν η διαφορά στην απόκριση στο συστημικό RNAi μεταξύ του *B. mori* και του *T. castaneum*. Αντίθετα, τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *BmR2D2* ενδεχομένως να σχετίζονται με την *in vivo* έλλειψη αποτελεσματικότητας των πειραμάτων RNAi.

3.1.2.5 Παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν την αξιοπιστία της τεχνικής του ανοσοφθορισμού ως προς τον πρωτεϊνικό υποκυτταρικό εντοπισμό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε εκτενώς η τεχνική του ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της θέσης της κάθε μελετούμενης πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, στην αλληλουχία που κωδικοποιεί για κάθε μία από τις πρωτεΐνες προστίθεται η κατάλληλη νουκλεοτιδική αλληλουχία, ούτως ώστε μέσω της μετάφρασης της πρωτεΐνης να συντίθεται κάθε φορά ο επιθυμητός επίτοπος (Flag, Myc και Myc.His) στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο της. Με τον τρόπο αυτό, έπειτα από επώαση με πρωτογενές αντίσωμα που ανιχνεύει τον επίτοπο και επακόλουθη επώαση με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα (FITC, Alexa Fluor 568) που ανιχνεύει το πρωτογενές αντίσωμα, καθίσταται δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης που έχει σημανθεί με τον εκάστοτε επίτοπο.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία και τα αποτελέσματά της θεωρούνται αποδεκτά από την επιστημονική κοινότητα. Ωστόσο, σύμφωνα με ενδείξεις, η αξιοπιστία της ως προς την ακρίβεια των αποτελεσμάτων εν μέρει αμφισβητείται, καθώς ενδέχεται να υπάρχουν διαφορές στην εικόνα της υποκυτταρικής κατανομής χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης και της ίδιας πρωτεΐνης σημασμένης με έναν απλό ή φθορίζοντα επίτοπο (Stadler et al., 2013). Επιπλέον, η σήμανση με τον ίδιο επίτοπο σε αμινοτελική ή καρβοξυτελική θέση πιθανώς μπορεί να επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τη θέση της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, αν και ο εντοπισμός στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα φαίνεται να συμπίπτει σε μεγάλο ποσοστό μεταξύ των δύο θέσεων του επιτόπου, ενώ το πρόβλημα αφορά περισσότερο στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (Simpson et al., 2000; Skube et al., 2010). Όπως έχει προταθεί, η καρβοξυτελική σήμανση θεωρείται περισσότερο αξιόπιστη, ειδικότερα προκειμένου για πρωτεΐνες που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον κυτταροσκελετό (Stadler et al., 2013). Τέλος, η υπερέκφραση μίας πρωτεΐνης θα μπορούσε να προκαλέσει κορεσμό, επηρεάζοντας έτσι τη θέση της στο κύτταρο και να αποτελέσει παράγοντα που θα αλλοιώσει τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού (Stadler et al., 2013).

Συνεπώς, παρά τις όποιες αμφιβολίες που ανακύπτουν, η μέθοδος του ανοσοφθορισμού είναι ένα χρήσιμο εργαλείο, το οποίο όμως συνιστάται να συνεκτιμάται μαζί με δεδομένα που προκύπτουν από άλλες πηγές, όπως την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων μέσω φθορισμού, την ανοσοαποτύπωση Western μετά από εφαρμογή πρωτοκόλλων διαχωρισμού κυτταρικών οργανιδίων, καθώς και τη σύγκριση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

3.1.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ piRNA ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ *BmAgo3* ΚΑΙ *BmAub*

Λόγω του μη σαφώς προσδιορισμένου ρόλου των δύο γονιδίων-κλειδιών *BmAgo3* και *BmAub* του piRNA μονοπατιού στο μεταξοσκώληκα, όσον αφορά στη λειτουργία του ίδιου του RNAi μηχανισμού, αλλά και σε λοιπές λειτουργίες, όπως είναι η άμυνα του οργανισμού έναντι ιών, η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της έκφρασης των τρανσποζονίων και η καίρια εμπλοκή τους σε μηχανισμούς διατήρησης της γαμετικής σειράς, τα γονίδια αυτά επιλέχθηκαν ως αντικείμενο περαιτέρω μελέτης στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

3.1.3.1 Μελέτη της υπερέκφρασης των *BmAgo3* και *BmAub* σε σχέση με τον RNAi μηχανισμό

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των βασικών γονιδίων του piRNA μονοπατιού *BmAgo3* και *BmAub* στον RNAi μηχανισμό του μεταξοσκώληκα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μεταβολής της βιοφωταύγειας στο κύτταρο έπειτα από υπερέκφραση των piRNA παραγόντων (**Εικόνα 31,** βλ. §3.1.1.4). Στόχος ήταν να ελεγχθεί εάν η διέγερση της γονιδιακής έκφρασης των *BmAgo3* και *BmAub* είναι σε θέση να επηρεάσει, και σε ποιο βαθμό, την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού εντός του κυττάρου.

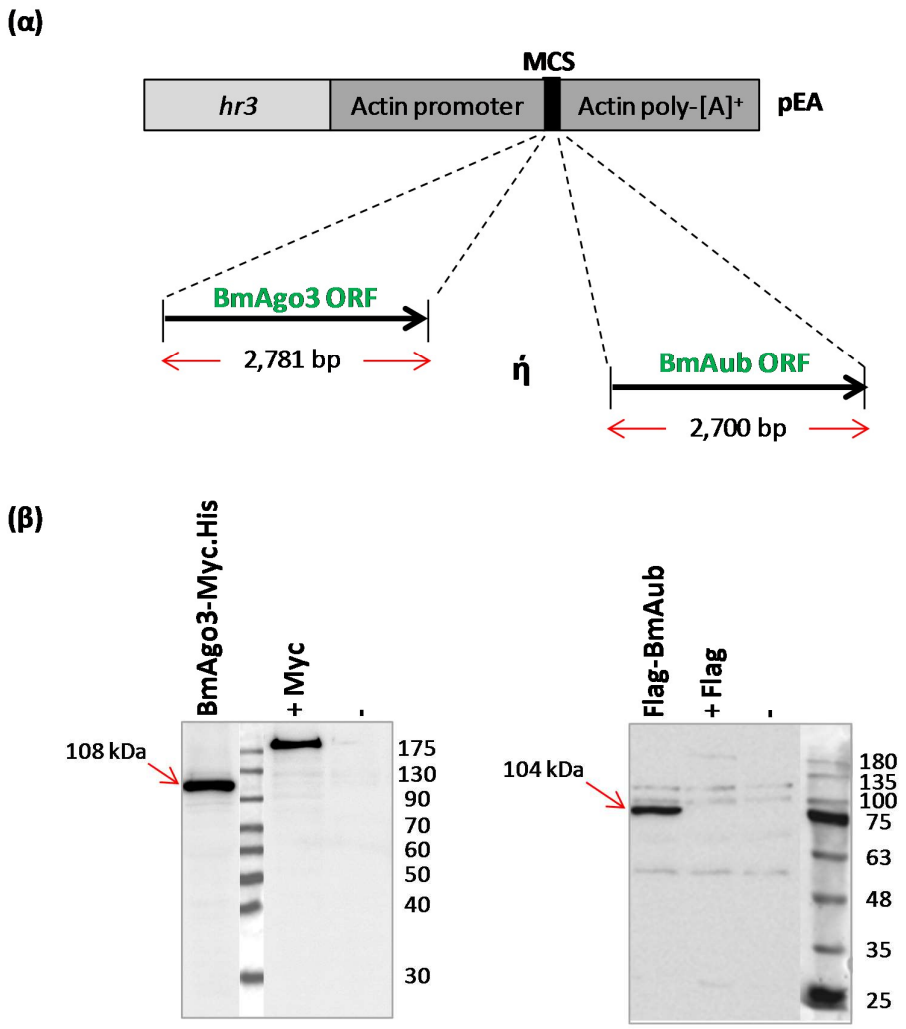
Για το σκοπό αυτό, αρχικά απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) των γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* στο φορέα έκφρασης pEA (**Εικόνα 32α**). Η επιτυχής πρωτεϊνική έκφρασή τους επιβεβαιώθηκε μέσω διαμόλυνσης κυττάρων Λεπιδοπτέρων με τον εκάστοτε φορέα έκφρασης, σε συνδυασμό με το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (**Εικόνα 32β**).

Στη συνέχεια, κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με φορείς για τη μέτρηση της βιοφωταύγειας (pEcRE.bA.luc, Soin et al., 2008) και του βιοφθορισμού (pbA/EcRE.gfp). Ταυτόχρονα, έγινε διαμόλυνση με το φορέα υπερέκφρασης του εκάστοτε piRNA παράγοντα (pEA-BmAgo3-Myc.His ή pEA-Flag-Aub) και με dsRNA έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης (dsLuc) σε φθίνουσες συγκεντρώσεις (25 - 0 ng/mL) (**Εικόνα 33**). Ως μάρτυρας dsRNA χρησιμοποιήθηκε το δίκλωνο RNA dsMalE, ενώ ως μάρτυρας για το φορέα pEA χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEA.pac (βλ. §3.1.1.4). Όλες οι μετρήσεις

Εικόνα 31 Σχηματική αναπαράσταση των πειραμάτων διέγερσης του RNAi μηχανισμού μέσω υπερέκφρασης των βασικών piRNA παραγόντων. Η παραγωγή βιοφωταύγειας από τα κύτταρα Bm5 που έχουν διαμολυνθεί με το φορέα έκφρασης της λουσιφεράσης καταστέλλεται από το dsRNA που είναι ειδικό για το γονίδιο της λουσιφεράσης (dsLuc). Παράλληλα, πλασμίδια που εκφράζουν είτε το γονίδιο *BmAgo3* είτε το *BmAub*, εισάγονται στα κύτταρα μέσω συνδιαμόλυνσης και ακολουθεί μέτρηση της βιοφωταύγειας. Η μείωση στα επίπεδα της βιοφωταύγειας (που αντιστοιχεί σε περαιτέρω αύξηση της αποσιώπησης της λουσιφεράσης) σημαίνει ότι ο RNAi μηχανισμός διεγέρθηκε λόγω της ενισχυμένης έκφρασης ενός βασικού RNAi παράγοντα.

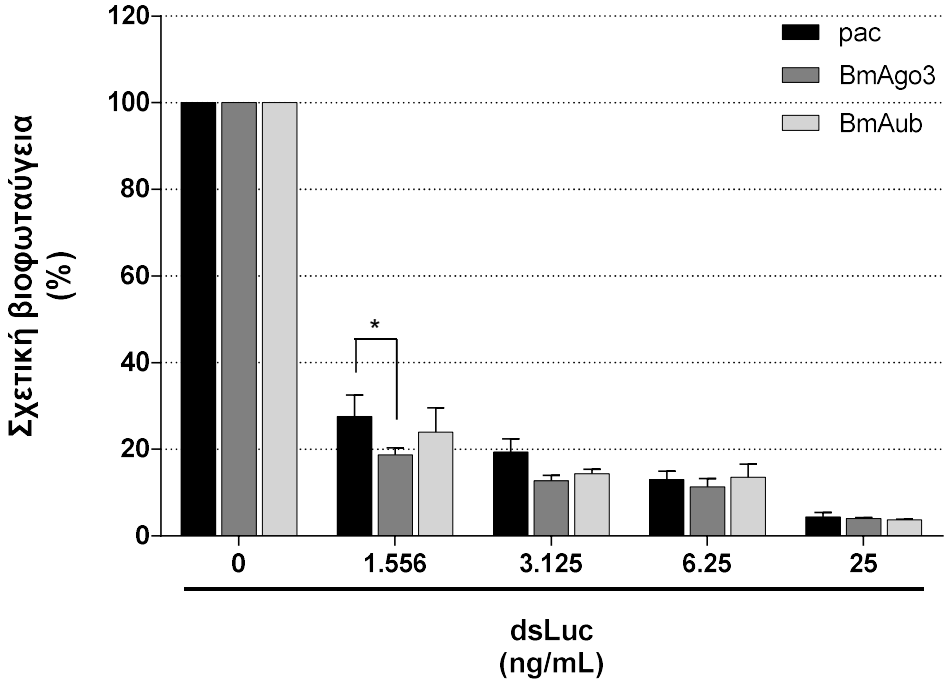
βιοφωταύγειας κανονικοποιήθηκαν ως προς τον παραγόμενο βιοφθορισμό, ούτως ώστε να υπολογιστεί η σχετική βιοφωταύγεια, ενώ εν συνεχεία η σχετική βιοφωταύγεια εκφράστηκε ως ποσοστό επί της μέγιστης παραγόμενης σχετικής βιοφωταύγειας που αντιστοιχεί σε 0 ng/mL dsLuc στο μίγμα διαμόλυνσης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν (**Εικόνα 33**) δείχνουν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης BmAgo3 προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στα ποσοστά της σχετικής βιοφωταύγειας κατά 32% σε σχέση με την πρωτεΐνη μάρτυρα pac στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση του dsLuc ήταν ιδιαιτέρως μικρή (~1.6 ng/mL). Συνεπώς, η αυξημένη έκφραση της BmAgo3 οδήγησε σε ενίσχυση του φαινομένου της αποσιώπησης του γονιδίου της λουσιφεράσης. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ενδυναμώνει το πρότερο εύρημά μας, σύμφωνα με το οποίο σε πειράματα όπου προκλήθηκε παρεμπόδιση της έκφρασης του *BmAgo3* μέσω ειδικού dsRNA, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αποσιωπητικής ικανότητας των κυττάρων Bm5 (**Εικόνα 17**). Έτσι, με αυτό το πείραμα επιβεβαιώνεται ότι, εκτός των *BmAgo2* και *BmDcr2*, το γονίδιο *BmAgo3* παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στον RNAi μηχανισμό του μεταξοσκώληκα, καθώς τόσο η αναστολή όσο και η ενίσχυση της έκφρασής του φαίνεται να διαταράσσει την ισορροπία του μηχανισμού αυτού.



Εικόνα 32 Κλωνοποίηση και *in vitro* έκφραση των γονιδίων-κλειδιών του piRNA μονοπατιού *BmAgo3* και *BmAub* μέσω του φορέα έκφρασης pEA σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων. (α) Σχηματική αναπαράσταση της κλωνοποίησης των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) των γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* στο φορέα pEA. Ο φορέας pEA περιλαμβάνει την ομόλογη περιοχή 3 (hr3, homologous region 3) του ιού BmNPV που αυξάνει κατά 100 φορές την έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου, τον υποκινητή και την 3' μη-μεταφραζόμενη poly-[A]$^+$ περιοχή του γονιδίου της ακτίνης του *B. mori* (actin promoter, actin poly-[A]$^+$), καθώς και μία θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (MCS, multiple cloning site). Επιπλέον, εδώ περιλαμβάνει την αλληλουχία του αμινοτελικού επιτόπου Flag ή του καρβοξυτελικού επιτόπου Myc.His. (β) Απεικόνιση της έκφρασης των πρωτεϊνών BmAgo3 (108 kDa) σε κύτταρα Hi5 και BmAub (104 kDa) σε κύτταρα Bm5, σημασμένων με τον κατάλληλο επίτοπο (Myc.His και Flag, αντίστοιχα). Οι θετικοί μάρτυρες για τα αντισώματα Myc και Flag αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες Myc-BmDcr2 και Flag-BmDcr2 (192 kDa), αντίστοιχα. Η ανοσοαποτύπωση Western της BmAgo3 έγινε με χρήση των αντισωμάτων mouse anti-myc (1:1000) και anti-mouse HRP-conjugated (1:1000), και της BmAub με τα αντισώματα rabbit anti-flag (1:1000) και anti-rabbit HRP conjugated (1:2000).

Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *BmAub* δεν μείωσε περαιτέρω την παραγόμενη βιοφωταύγεια σε σχέση με το μάρτυρα pac σε καμία από τις συγκεντρώσεις του dsLuc που εφαρμόστηκαν κατά τους χειρισμούς (**Εικόνα 33**). Συνεπώς, αντίθετα με το *BmAgo3*, φαίνεται ότι τόσο η αναστολή όσο και η ενίσχυση της έκφρασης του γονιδίου *BmAub* δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη λειτουργία του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5.



Εικόνα 33 Λειτουργική δοκιμασία έπειτα από συνέκφραση με τους κύριους piRNA παράγοντες. Οι φορείς έκφρασης που ελέγχθηκαν αντιστοιχούσαν στα γονίδια *BmAgo3* και *BmAub*. Ο φορέας έκφρασης pEA.pac χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Επιπλέον, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με βαθμιαία αυξανόμενες συγκεντρώσεις dsRNA ειδικού ως προς το γονίδιο της λουσιφεράσης (dsLuc, 1.556 έως 25 ng/mL). Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της % σχετικής βιοφωταύγειας που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις (+SE), έπειτα από διαμόλυνση με το dsLuc. Κάθε στήλη παρουσιάζεται ως % ποσοστό του αρνητικού μάρτυρα (dsLuc = 0 ng/mL, θεωρείται 100%). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης αναφέρονται στη σύγκριση του μέσου όρου (n=3) κάθε χειρισμού υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης με το μέσο όρο του μάρτυρα pac (*: $P<0.05$).

3.1.3.2 Μελέτη της αποσιώπησης των γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* μέσω έκφρασης RNA φουρκετών

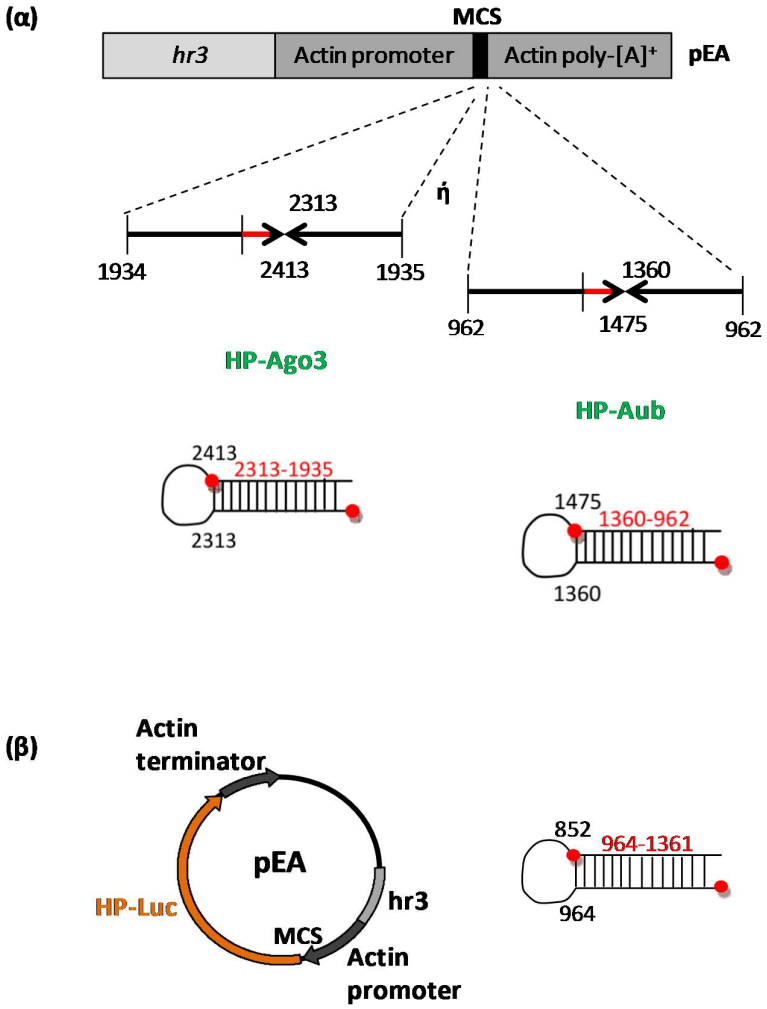
Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος αυτών των γονιδίων ως προς το ευρύτερο πλαίσιο του RNAi μηχανισμού, αλλά και ειδικότερα σε σχέση με την αντιϊκή προστασία του μεταξοσκώληκα, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pEA κατάλληλες αλληλουχίες DNA οι οποίες έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε τα RNA μετάγραφά τους να αυτοϋβριδοποιούνται και να σχηματίζουν φουρκέτες που στοχεύουν το γονίδιο με βάση την αλληλουχία του οποίου σχεδιάστηκαν. Έτσι, αξιοποιώντας τον ενεργό RNAi μηχανισμό του κυττάρου, τα RNAs αναμένεται να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία μέσα στο κύτταρο ούτως ώστε να αποσιωπήσουν το συμπληρωματικό mRNA-στόχο τους.

3.1.3.2.1 Έλεγχος λειτουργικότητας των παραγόμενων RNA φουρκετών

Αρχικά, κατασκευάστηκαν οι φορείς pEA-HP-Ago3 και pEA-HP-Aub (στο εξής μαζί pEA-HP-X, **Εικόνα 34α**), καθώς επίσης και ο φορέας μάρτυρας pEA-HP-Luc (**Εικόνα 34β**). Οι νέοι αυτοί φορείς ελέγχθηκαν ως προς τη λειτουργικότητά τους σε δύο επίπεδα, δηλαδή ως προς την ικανότητά τους να αποσιωπούν, πρώτον, το ενδογονενές γονίδιο-στόχο, και δεύτερον, το γονίδιο-στόχο υπερεκφρασμένο στην ανασυνδυασμένη του μορφή.

Για το σκοπό αυτό, στην πρώτη περίπτωση τα κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα υπερέκφρασης της κάθε RNA φουρκέτας και το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1, ενώ παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το dsAgo3 ή το dsAub αντί του φορέα pEA-HP-X, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας pEA-HP-Luc. Εν συνεχεία, επί τρεις διαδοχικές ημέρες συλλέχθηκε κυτταρικό εκχύλισμα, απομονώθηκε RNA και πραγματοποιήθηκε RT-PCR. Έτσι, τελικά στα δείγματα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τους φορείς pEA-HP-X επιβεβαιώθηκε η έκφραση των διαγονιδίων ήδη στις 24h, ενώ στις 72h τα επίπεδα ήταν πλέον αρκετά υψηλά (κυρίως για τις φουρκέτες HP-Ago3 και HP-Luc, **Εικόνα 35α**).

Το γεγονός ότι στο χειρισμό του θετικού μάρτυρα (dsLuc) ως προς το φορέα pEA-HP-Luc όχι μόνο παρατηρείται προϊόν, αλλά δείχνει να είναι το ίδιο που αντιστοιχεί και στη φουρκέτα HP-Luc, δημιούργησε ερωτηματικά. Ωστόσο, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο



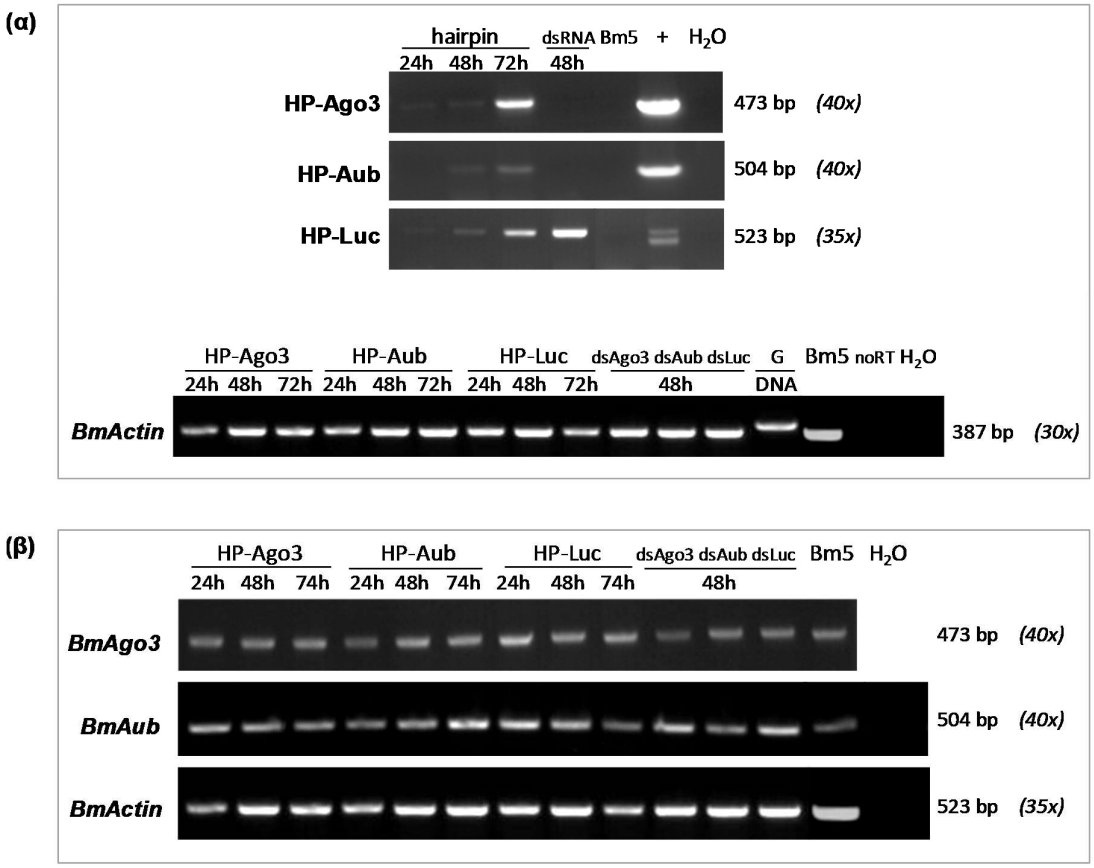
Εικόνα 34 Σχεδιασμός και κλωνοποίηση των φουρκετών που στοχεύουν στα γονίδια-κλειδιά του piRNA μονοπατιού στο φορέα έκφρασης pEA. Σχηματική αναπαράσταση της κλωνοποίησης στο φορέα pEA των φουρκετών που, όπως περιγράφηκε αναλυτικά (§2.2.2.4), στοχεύουν (α) στην περιοχή 1935-2313 του γονιδίου *BmAgo3* ή στην περιοχή 962-1360 του γονιδίου *BmAub*, και (β) στην περιοχή 964-1361 του γονιδίου της λουσιφεράσης που θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας.

να συνέβη λόγω υβριδοποίησης του εκκινητή oligo-[dT] με μία πλούσια σε [dA] περιοχή της αλληλουχίας του dsLuc κατά τη φάση της αντίστροφης μεταγραφής, ο οποίος δημιούργησε το αντίστοιχο cDNA. Άλλωστε, η φουρκέτα και το dsRNA είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να στοχεύουν στην ίδια ακριβώς περιοχή του γονιδίου *Luc*.

Ακολούθως, με χρήση απλής PCR δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα mRNA των ενδογενών γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* (**Εικόνα 35β**). Όμως, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην έκφραση των ενδογενών γονιδίων, ούτε στην περίπτωση των θετικών μαρτύρων, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η

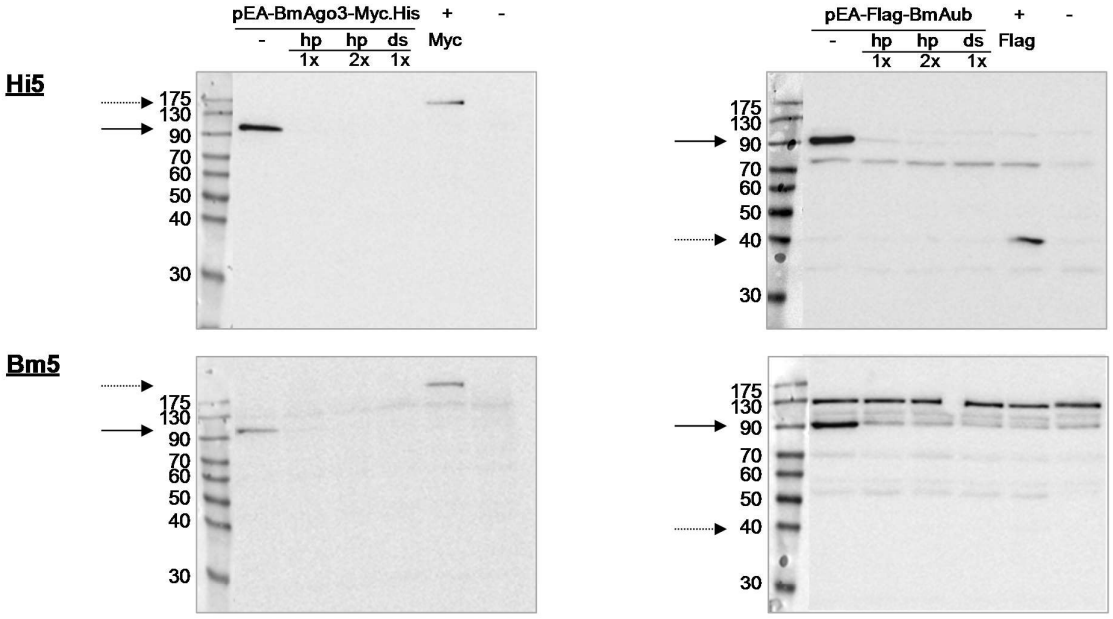
απουσία αποσιώπησης των στόχων πιθανώς οφειλόταν στο μειωμένο ποσοστό επιτυχίας της παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων Bm5, λόγω της οποίας ο αριθμός των παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων συχνά αποδεικνύεται αρκετά χαμηλός (βλ. §3.1.1.2). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι το γονίδιο που εκφράζεται ενδογενώς ενδέχεται να υφίσταται προστασία από το ίδιο το κύτταρο.

Η αποτελεσματικότητα των φορέων που κατασκευάστηκαν ελέγχθηκε περαιτέρω, σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης αυτή τη φορά. Για το λόγο αυτό, κύτταρα Bm5 και Hi5 διαμολύνθηκαν με τον εκάστοτε φορέα υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης piRNA πρωτεΐνης (BmAgo3-Myc.His ή Flag-BmAub) σε συνδυασμό με το φορέα υπερέκφρασης της αντίστοιχης RNA φουρκέτας (HP-Ago3 ή HP-Aub) και τον pBmIE1. Παράλληλα,



Εικόνα 35 Έλεγχος λειτουργικότητας των φορέων που εκφράζουν τις φουρκέτες HP-Ago3 και HP-Aub ως προς την ικανότητά τους να αποσιωπούν το ενδογενές γονίδιο-στόχο σε διάστημα 24, 48 και 72 ωρών από τη διαμόλυνση. RT-PCR για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης (α) του διαγονιδίου και (β) του ενδογενούς γονιδίου-στόχου. (G: genomic DNA - γονιδιωματικό DNA, +: θετικό δείγμα DNA).

χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες τα dsAgo3 ή dsAub, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας pEA-HP-Luc. Έπειτα από λύση των διαμολυσμένων κυττάρων, τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν με ανάλυση Western ως προς την έκφραση της εκάστοτε ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (**Εικόνα 36**). Σύμφωνα με την ανάλυση, επιβεβαιώθηκε η λειτουργικότητα των pEA-HP-Ago3 και pEA-HP-Aub φορέων όσον αφορά στην ικανότητά τους να αποσιωπούν το γονίδιο-στόχο τους, όταν αυτό εκφράζε-



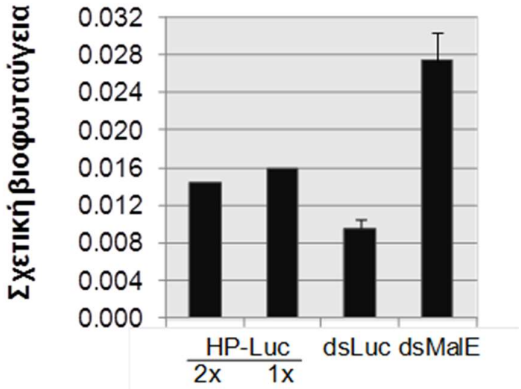
pEA-BmAgo3-Myc.His	+	+	+	+		
pBmIE1	+	+	+	+	+	
pEA-HP-Ago3		+	++			
dsAgo3				+		
pEA.HP-Luc	++	+		+	++	
pEA-Myc.BmDcr2					+	

pEA-Flag-BmAub	+	+	+	+		
pBmIE1	+	+	+	+	+	
pEA-HP-Ago3		+	++			
dsAgo3				+		
pEA.HP-Luc	++	+		+	++	
pEA-Flag-BmR2D2					+	

Εικόνα 36 Έλεγχος λειτουργικότητας των φορέων που εκφράζουν τις φουρκέτες HP-Ago3 και HP-Aub ως προς την ικανότητά τους να αποσιωπούν το γονίδιο-στόχο εκφρασμένο υπό ανασυνδυασμένη μορφή. Ανοσοαποτύπωση Western σε κύτταρα Hi5 και Bm5 που έχουν διαμολυνθεί με τους φορείς έκφρασης για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες BmAgo3-Myc.His και Flag-BmAub, σε συνδυασμό με τους φορείς για τις αντίστοιχες φουρκέτες HP-Ago3 και HP-Aub. Τα dsAgo3 και dsAub χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες αποσιώπησης, ενώ η φουρκέτα HP-Luc ως αρνητικός μάρτυρας. Με απλό βέλος σημειώνονται οι ειδικές ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες BmAgo3-Myc.His και Flag-BmAub, ενώ με στικτό βέλος οι ειδικές ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες μάρτυρες για τα αντισώματα Myc (Myc-BmDcr2, 192 kDa) και Flag (Flag-BmR2D2, 40 kDa). Όλες οι υπόλοιπες ζώνες που δε σημειώνονται με βέλος, αντιστοιχούν σε μη-ειδική πρόσδεση του αντισώματος.

ται σε ανασυνδυασμένη μορφή, σε επίπεδα συγκρίσιμα με τους θετικούς dsRNA μάρτυρες. Παράλληλα, δείχθηκε ότι ο pEA-HP-Luc μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως αρνητικός μάρτυρας ενός φορέα pEA που εκφράζει μία RNA φουρκέτα.

Στη συνέχεια, με σκοπό να δειχθεί ότι ο pEA-HP-Luc δεν είναι απλά ένας φορέας που δεν προκαλεί αποσιώπηση στις μελετούμενες piRNA πρωτεΐνες λόγω μη λειτουργικότητας, αλλά αντίθετα είναι λειτουργικός ως προς την αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου του, πραγματοποιήθηκε λειτουργική δοκιμασία σε κύτταρα μεταξοσκώληκα (**Εικόνα 37**). Ειδικότερα, διαλυτά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από κύτταρα Bm5 τα οποία εξέφραζαν παροδικά τη λουσιφεράση μέσω διαμόλυνσης με τον επαγόμενο φορέα pEcRE.bA.luc ταυτόχρονα με τη φουρκέτα HP-Luc, εμφάνισαν κατά ~50% μειωμένη παραγωγή βιοφωταύγειας μετά την προσθήκη του υποστρώματος (λουσιφερίνη) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (pEA.pac). Παρατηρήθηκε δε ότι, αν και ελαφρώς αυξημένα, τα επίπεδα βιοφωταύγειας στα κύτταρα που εξέφραζαν τη φουρκέτα HP-Luc ήταν συγκρίσιμα με εκείνα του θετικού μάρτυρα (dsLuc). Συνεπώς, αποδείχθηκε η εξειδικευμένη αποσιωπητική ικανότητα του



pEcRE.bA.luc	+	+	+	+
pbA/EcRE.gfp	+	+	+	+
dsMalE	+	+		+
dsLuc			+	
pEA.pac		+	++	++
pEA.HP-Luc	++	+		

Εικόνα 37 Έλεγχος λειτουργικότητας του φορέα μάρτυρα που εκφράζει τη φουρκέτα HP-Luc ως προς την ικανότητά του να αποσιωπεί το γονίδιο της λουσιφεράσης έπειτα από παροδική διαμόλυνση. Λειτουργική δοκιμασία σε κύτταρα Bm5 που εκφράζουν τη λουσιφεράση σε συνδυασμό την αντίστοιχη φουρκέτα HP-Luc. (dsLuc: θετικός μάρτυρας, pEA.pac: αρνητικός μάρτυρας).

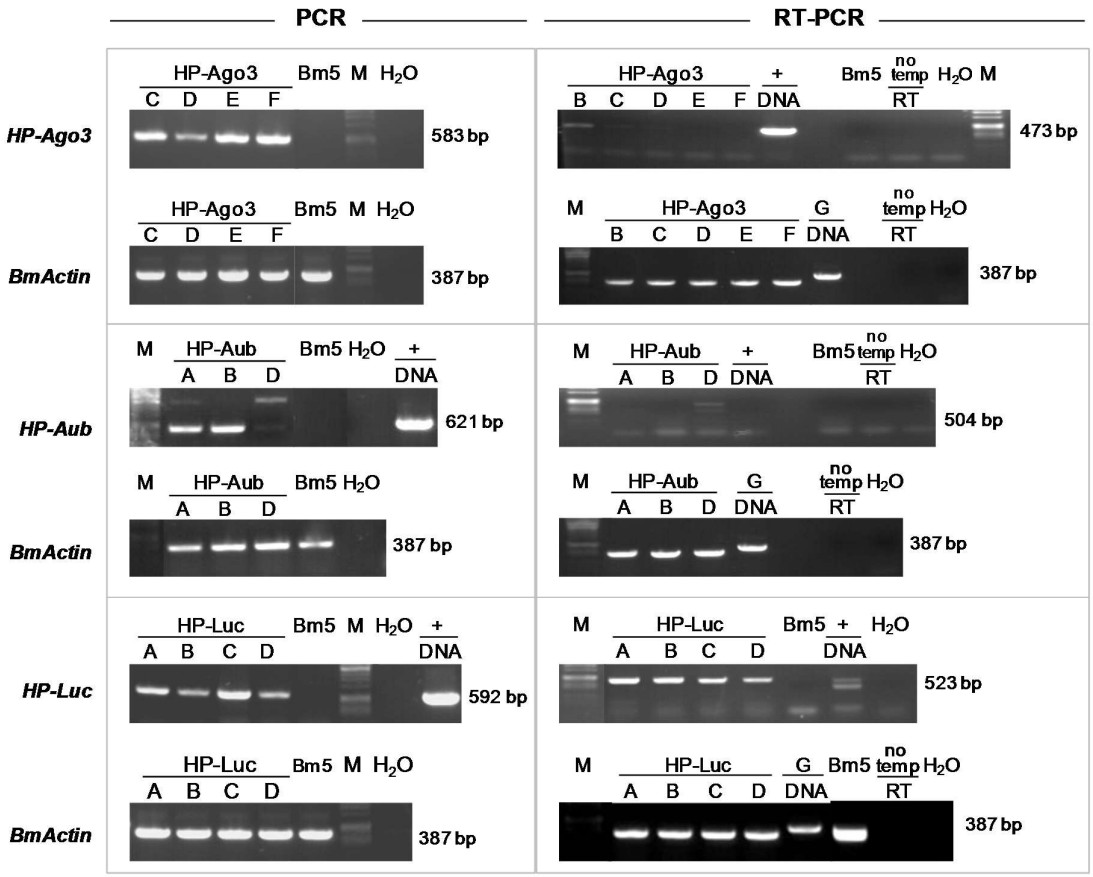
φορέα μάρτυρα pEA-HP-Luc.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι έπειτα από παροδική διαμόλυνση οι διαγονιδιακοί φορείς pEA-HP-Ago3 και pEA-HP-Aub, αν και είναι λειτουργικοί στην αποσιώπηση του στόχου τους όταν αυτός εκφράζεται εκτοπικά σε ανασυνδυασμένη μορφή μέσω του φορέα pEA (**Εικόνα 36**), φαίνεται πως μπορούν να καθίστανται αναποτελεσματικοί στην μειορρύθμιση της έκφρασης του ενδογονενούς γονιδίου-στόχου (**Εικόνα 35**). Παράλληλα, ο φορέας pEA-HP-Luc είναι αποτελεσματικός στην αποσιώπηση της λουσιφεράσης, ενώ δεν φαίνεται να προκαλεί μη-ειδική αποσιώπηση στα μελετούμενα γονίδια, και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός φορέας-μάρτυρας (**Εικόνα 37**).

3.1.3.2.2 Σταθερός μετασχηματισμός κυττάρων Bm5 με τους φορείς έκφρασης των RNA φουρκετών

Εν συνεχεία, για τη διευκόλυνση μελλοντικών πειραμάτων, επιχειρήθηκε να δημιουργηθούν κυτταρικές σειρές Bm5 στις οποίες να αποσιωπείται σταθερά η έκφραση των γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub*. Μετά την κατασκευή τους, οι σειρές αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μόλυνσης ή διαμόλυνσης των κυττάρων με κάποιον ιό, ούτως ώστε να διερευνηθεί εάν η αποσιώπηση του *BmAgo3* ή του *BmAub* επηρεάζει τη δυνατότητα των κυττάρων Bm5 να ανταπεξέρχονται σε διαφορετικές ιϊκές μολύνσεις, καθώς και να επιβιώνουν. Επιπλέον, θα μπορούσαν να μελετηθούν τα επίπεδα ενός ιού που είναι γνωστό ότι διαβιεί στα κύτταρα Bm5 υπό λανθάνουσα μορφή, όπως για παράδειγμα ο Macula-like Virus. Τέλος, θα ήταν χρήσιμο να προσδιοριστούν τυχόν αλλαγές στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης παραγόντων που συμμετέχουν από κοινού στα ίδια μονοπάτια με τα γονίδια *BmAgo3* και *BmAub* που αποσιωπούνται λόγω των παραγόμενων φουρκετών.

Για το σκοπό αυτό, όπως περιγράφεται στην §3.1.3.2.1, κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το εκάστοτε πλασμίδιο pEA-HP (Ago3, Aub) σε συνδυασμό με το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 και το φορέα επιλογής pEA.pac. Συμπληρωματικά, για τον έλεγχο τον πειραμάτων, δημιουργήθηκε μία τρίτη κατηγορία κυτταρικής σειράς ως μάρτυρας στην οποία υπερεκφράζεται η RNA φουρκέτα HP-Luc, πέραν των γονιδίων *pac* και *ie1*. Μέσω της διαδικασίας επιλογής κυττάρων ανθεκτικών στην πουρομυκίνη



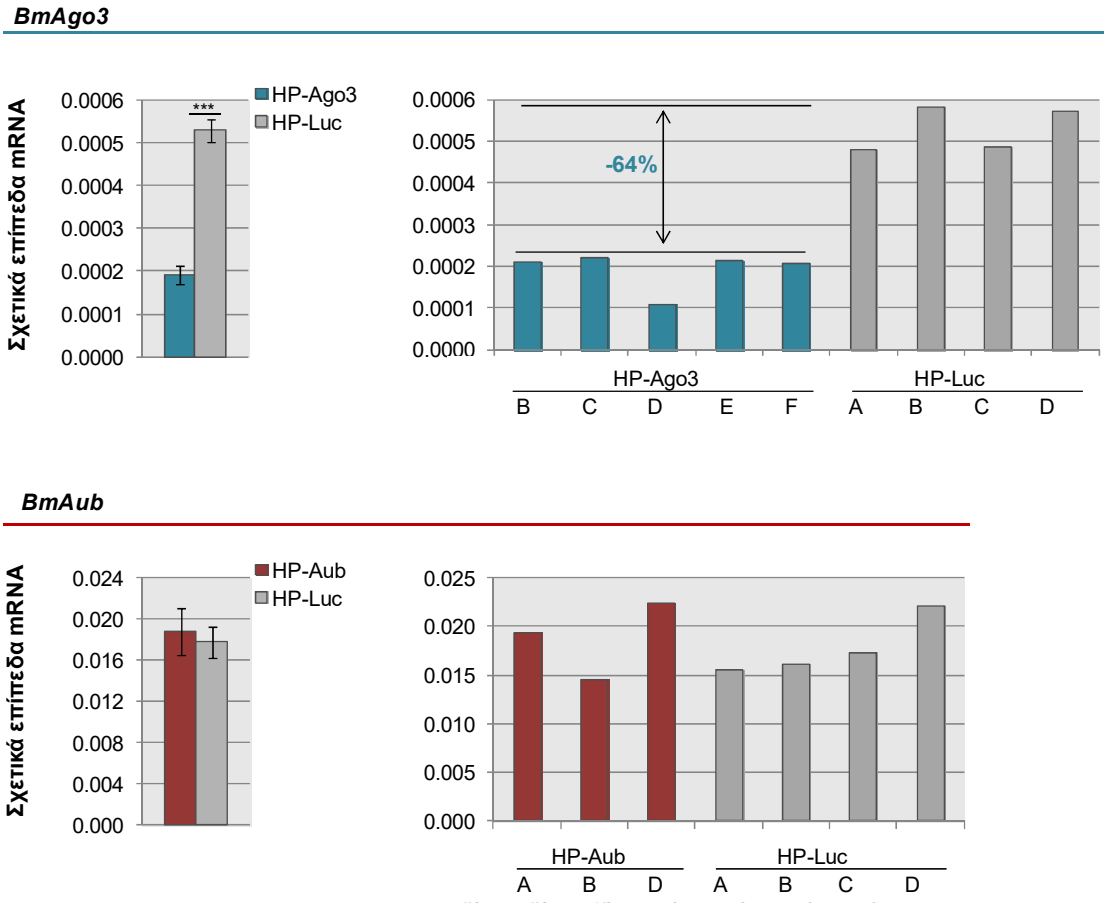
Εικόνα 38 Έλεγχος του σταθερού μετασχηματισμού των κυττάρων Bm5 με τους φορείς έκφρασης των RNA φουρκετών HP-Ago3, HP-Aub και HP-Luc. Έλεγχος της παρουσίας του DNA του κάθε διαγονιδίου με PCR και της έκφρασης του διαγονιδίου (cDNA) με RT-PCR. (M: marker - δείγμα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους. G: genomic DNA - γονιδιωματικό DNA, +: θετικό δείγμα DNA).

για αρκετές εβδομάδες, δημιουργήθηκαν και διατηρήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές: HP-Ago3 (B, C, D, E και F), HP-Aub (A, B και D) και HP-Luc (A, B, C και D). Μετά την επίτευξη ανθεκτικών κυτταρικών πληθυσμών, ακολούθησαν πολλαπλοί έλεγχοι, ούτως ώστε να διαπιστωθεί η ταυτότητα και η λειτουργικότητα των επιλεγμένων κυτταρικών σειρών.

Αρχικά, με σκοπό να ελεγχθεί η επιτυχία εισαγωγής του εκάστοτε HP φορέα στα κύτταρα Bm5, απομονώθηκε DNA από τις κυτταρικές σειρές και επιβεβαιώθηκε μέσω PCR η παρουσία του επιθυμητού διαγονιδίου που κωδικοποιεί την RNA φουρκέτα σε ικανοποιητικά επίπεδα (**Εικόνα 38**). Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η έκφραση του κάθε διαγονιδίου στις σταθερά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές, μετά από απομόνωση RNA και RT-PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις HP-Ago3 και HP-Aub σειρές τα

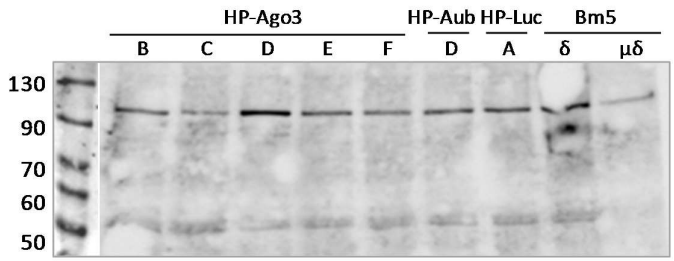
επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμα, ενώ αντίθετα στις αντίστοιχες HP-Luc σειρές το διαγονίδιο φαίνεται να εκφράζεται ικανοποιητικά (**Εικόνα 38**).

Για να ελεγχθεί η επίδραση ακόμα και αυτών των χαμηλών επιπέδων έκφρασης του διαγονιδίου στην έκφραση του ενδογενούς γονιδίου-στόχου του, στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκε απλή και real-time PCR χρησιμοποιώντας τα δείγματα από τις σειρές HP-Luc ως μάρτυρες. Εξαιτίας της ευαισθησίας της δεύτερης τεχνικής, δείχθηκε ότι ενώ στις HP-Ago3 σειρές παρατηρείται αποσιώπηση του *BmAgo3* κατά ~64% (μέσος όρος) όπως προκύπτει από τις μετρήσεις για τις πέντε κυτταρικές σειρές, αντίθετα, στις



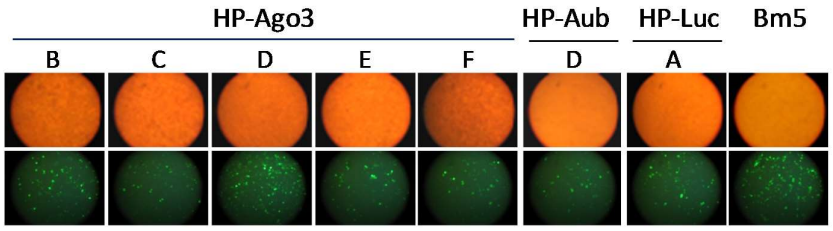
Εικόνα 39 Έλεγχος των επιπέδων mRNA των ενδογενών γονιδίων-στόχων *BmAgo3* και *BmAub* για τις σταθερά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Bm5 που εκφράζουν τις αντίστοιχες RNA φουρκέτες. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin3*. Απεικονίζονται τόσο οι μέσοι όροι (±SE) των επιπέδων έκφρασης για το σύνολο των κυτταρικών σειρών HP-Ago3 (B, C, D, E και F) και HP-Aub (A, B και D), όσο και η έκφραση του ενδογενούς γονιδίου-στόχου ξεχωριστά για κάθε κυτταρική σειρά.

(α)

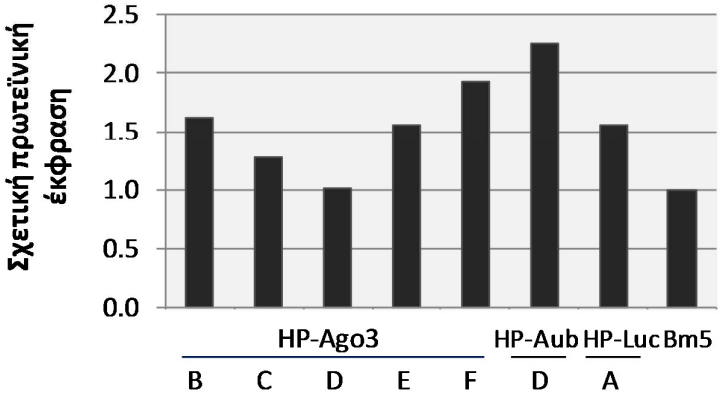


		B	C	D	E	F	D	A	δ	μδ
Διαμόλυνση	pEA-BmAgo3-Myc.His	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pBmIE1	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	pbA/EcRE.gfp	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Σταθερός μετασχηματισμός	pEA-HP-Ago3	-	+	-	-	-	+	-		
	pEA-HP-Aub	+	-	-	-	+	-	-		
	pEA-HP-Luc	-	-	+	-	-	-	+		
	pBmIE1	+	+	+	-	+	+	+		
	pEA.pac	+	+	+	-	+	+	+		

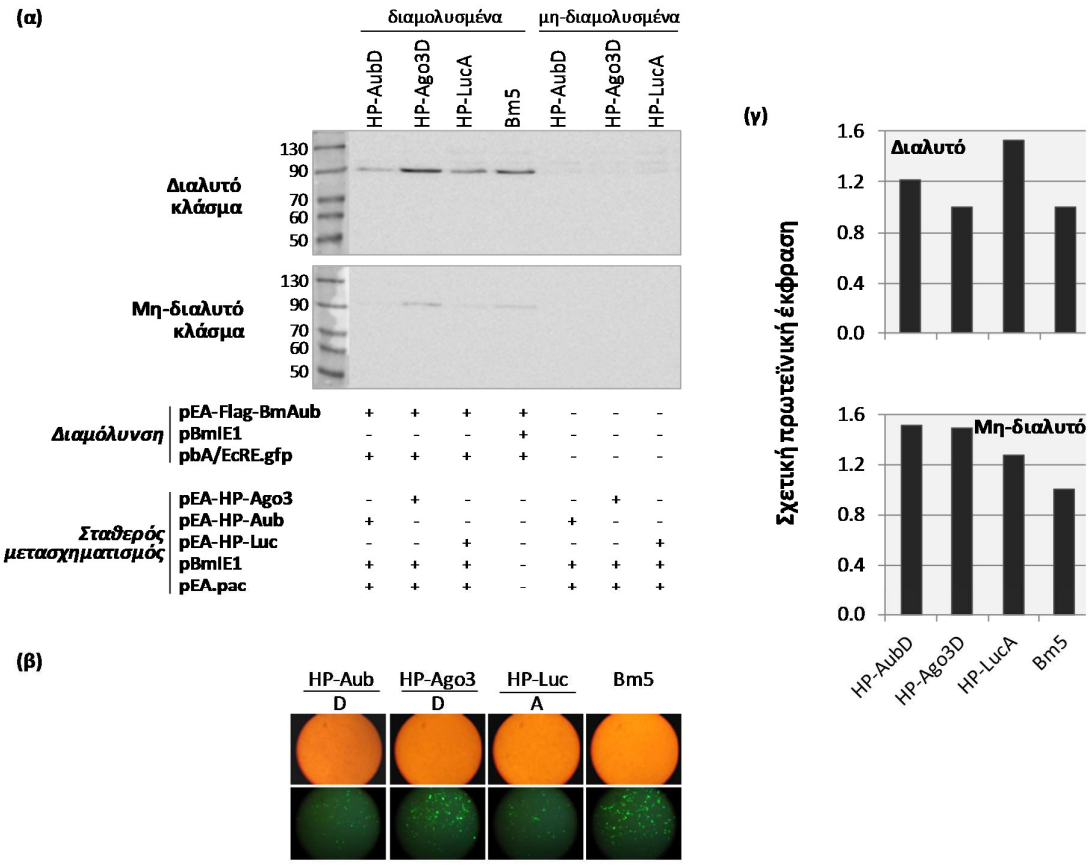
(β)



(γ)



Εικόνα 40 Έλεγχος λειτουργικότητας των HP-Ago3 κυτταρικών σειρών ως προς την ικανότητά τους να αποσιωπούν το γονίδιο-στόχο υπερεκφρασμένο υπό ανασυνδυασμένη μορφή. Οι σταθερά μετασχηματισμένες σειρές HP-Ago3 διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-BmAgo3-Myc.His, καθώς και με τον pBmbA/ERE.gfp για την κανονικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης BmAgo3-Myc.His. (α) Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του διαλυτού κλάσματος, (β) παρατήρηση του εκλυόμενου βιοφθορισμού μέσω μικροσκοπίου (συντελεστής μεγέθυνσης: 5x) και (γ) ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε σχέση με τον εκλυόμενο βιοφθορισμό. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις σειρές HP-AubD, HP-LucA, καθώς και κύτταρα Bm5.



Εικόνα 41 Έλεγχος λειτουργικότητας της HP-AubD κυτταρικής σειράς ως προς την ικανότητά της να αποσιωπεί το γονίδιο-στόχο υπερεκφρασμένο υπό ανασυνδυασμένη μορφή. Η σταθερά μετασχηματισμένη σειρά HP-AubD διαμολύνθηκε με το φορέα pEA-Flag-BmAub, καθώς και με τον pBmbA/ERE.gfp για την κανονικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Flag-BmAub. (α) Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του διαλυτού και μη-διαλυτού κλάσματος, (β) παρατήρηση του εκλυόμενου βιοφθορισμού μέσω μικροσκοπίου (συντελεστής μεγέθυνσης: 5x) και (γ) ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε σχέση με τον εκλυόμενο βιοφθορισμό. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τις σειρές HP-Ago3D, HP-LucA, καθώς και κύτταρα Bm5.

HP-Aub σειρές δεν παρατηρείται καμία μείωση στην έκφραση του γονιδίου *BmAub* (**Εικόνα 39**).

Ακολούθως, για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα των διαγονιδιακών Hairpin (HP) σειρών στην αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων τους υπό ανασυνδυασμένη μορφή, έγινε διαμόλυνση της κάθε σειράς με τον αντίστοιχο φορέα υπερέκφρασης του στόχου του διαγονιδίου. Ειδικότερα, οι κυτταρικές σειρές HP-Ago3 διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-BmAgo3-Myc.His, ενώ οι σειρές HP-Aub με το φορέα

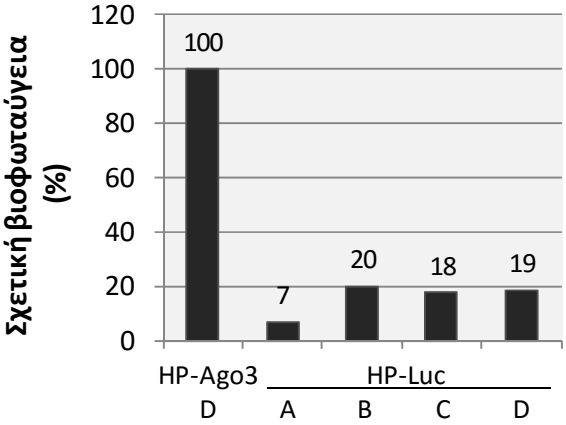
pEA-Flag-BmAub. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων που προέκυψαν από τις σειρές HP-Ago3 και HP-Aub αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση Western. Ωστόσο, σε καμία σειρά HP-Ago3 και HP-Aub δεν προκλήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων της υπερεκφραζόμενης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, πιθανώς λόγω της μεγάλης ποσότητας του DNA των κλωνοποιημένων στον pEA φορέα γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* που χρησιμοποιήθηκε κατά την παροδική διαμόλυνση των κυττάρων (**Εικόνες 40 και 41**). Κατά συνέπεια, κρίθηκε ότι οι δύο τύποι σταθερών κυτταρικών σειρών που δημιουργήθηκαν με στόχο την αποσιώπηση των δύο γονιδίων-κλειδιών του piRNA μονοπατιού, αν και είχαν προσλάβει το διαγονίδιο, δεν εμφανίζονταν αποτελεσματικές στη μειορρύθμιση των στόχων τους σε πρωτεϊνικό επίπεδο έπειτα από υπερέκφραση αυτών στη ανασυνδυασμένη τους μορφή.

Παράλληλα, έγινε λειτουργικός έλεγχος των σειρών ελέγχου HP-Luc, έπειτα από παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τον επαγόμενο φορέα pEcRE.bA.Luc/EcRE.bA.gfp. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε λειτουργική δοκιμασία στα διαλυτά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από τα εν λόγω διαμολυσμένα κύτταρα και, μέσω της μειωμένης παρατηρούμενης βιοφωταύγειάς τους σε σχέση με άλλες σειρές HP ή με τα κύτταρα Bm5, διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητα των σειρών αυτών στην ικανότητά τους να αποσιωπούν το γονίδιο της λουσιφεράσης (**Εικόνα 42**).

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι τα σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα με το φορέα pEA-HP-Ago3 είναι αποτελεσματικά στην αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου *BmAgo3*, αλλά όχι του ίδιου γονιδίου υπερεκφρασμένου υπό ανασυνδυασμένη μορφή έπειτα από διαμόλυνση. Αναφορικά με τις σταθερά μετασχηματισμένες σειρές με τον pEA-HP-Aub φορέα, παρατηρήθηκε ότι ενώ το διαγονίδιο ανιχνεύεται σε επίπεδο DNA, το cDNA του δεν παράγεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, και αυτές είναι μη-λειτουργικές στο να αποσιωπούν το γονίδιο-στόχο όταν αυτό εκφράζεται τόσο ενδογενώς, όσο μέσω του ανασυνδυασμένου φορέα έπειτα από νέα παροδική διαμόλυνση. Τέλος, στην περίπτωση των σταθερών σειρών HP-Luc, αυτές αποδείχθηκαν λειτουργικές σε κάθε επίπεδο στο οποίο ελέγχθηκαν, αφού σε αυτές το διαγονίδιο ανιχνεύεται τόσο σε επίπεδο DNA όσο και cDNA, ενώ η έκφραση του γονιδίου-στόχου της λουσιφεράσης παρεμποδίζεται με επιτυχία.

Συνεπώς, σε αντιδιαστολή με τις σειρές που εκφράζουν σταθερά HP-Ago3 και HP-Luc, όλα τα στάδια ελέγχου του ανασυνδυασμένου φορέα pEA-HP-Aub, καθώς και των

κυτταρικών σειρών που προέκυψαν από σταθερό μετασχηματισμό με αυτόν, καταδεικνύουν την αδυναμία δημιουργίας κυττάρων Bm5 στα οποία να μειορρυθμίζεται σταθερά το γονίδιο *BmAub*. Ενδεχομένως, η παρατηρούμενη αποτυχία να σχετίζεται με τη διαδικασία δημιουργίας αυτών των ανθεκτικών στην πουρομυκίνη σειρών, καθώς οι προσπάθειες επίτευξης των σειρών HP-Aub ήταν επαναλαμβανόμενες και χρονοβόρες, σε αντίθεση με τις HP-Ago3 και πολύ περισσότερο με τις HP-Luc σειρές, των οποίων η δημιουργία κατέστη εφικτή έπειτα από μία ιδιαίτερα απλή και γρήγορη διαδικασία επιλογής. Η αδυναμία δημιουργίας των σταθερών HP-Aub σειρών, σε αντίθεση με τις HP-Ago3 και HP-Luc σειρές, πιθανώς σχετίζεται με τη δυσκολία αποσιώπησης σε μόνιμη βάση του συγκεκριμένου γονιδίου του piRNA μονοπατιού. Πιθανώς, λοιπόν, το *BmAub* να εμπλέκεται σε σημαντικές διαδικασίες που σχετίζονται όχι απλά με την άμυνα ή τη ρύθμιση των τρανσποζονίων, αλλά με την ίδια την επιβίωση



		HP-Ago3 D	HP-Luc A	HP-Luc B	HP-Luc C	HP-Luc D
Διαμόλυνση	**pEcRE.Luc/EcRE.gfp**	+	+	+	+	+
Σταθερός μετασχηματισμός	**pEA-HP-Ago3**	+	-	-	-	-
	pEA-HP-Aub	-	-	-	-	-
	pEA-HP-Luc	-	+	+	+	+
	pBmIE1	+	+	+	+	+
	pEA.pac	+	+	+	+	+

Εικόνα 42 Έλεγχος λειτουργικότητας των HP-Luc κυτταρικών σειρών ως προς την ικανότητά τους να αποσιωπούν το γονίδιο-στόχο της λουσιφεράσης. Οι σταθερά μετασχηματισμένες σειρές HP-Luc διαμολύνθηκαν με τον επαγόμενο φορέα pEcRE.bA.Luc/EcRE.bA.gfp, και ακολούθησε λειτουργική δοκιμασία λουσιφεράσης για τη μέτρηση της εκλυόμενης βιοφωταύγειας από τα διαλυτά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από κύτταρα HP-Ago3D.

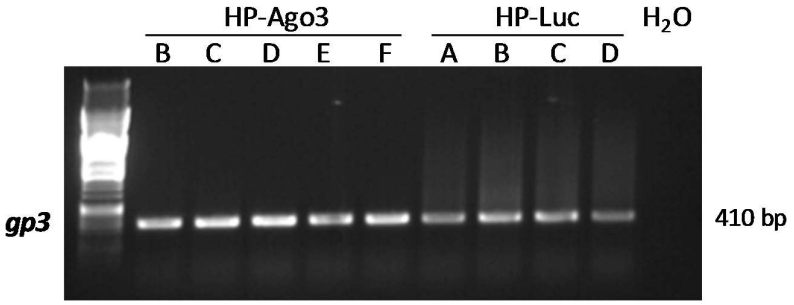
του κυττάρου. Ακόμη, το γεγονός ότι όλοι οι χειρισμοί που αφορούσαν στον pEA-HP-Luc ήταν επιτυχείς πιθανώς ερμηνεύεται από το ότι το γονίδιο της λουσιφεράσης δεν πρόκειται για ένα ενδογενές γονίδιο. Αντίθετα, το γονίδιο *BmAub* εκφράζεται φυσιολογικά στο κύτταρο, και μάλιστα σε πολλαπλάσια επίπεδα σε σχέση με το *BmAgo3*, και συνεπώς ο φορέας που εκφράζει τη φουρκέτα HP-Aub ίσως πρέπει να εισαχθεί σε μεγαλύτερες ποσότητες ώστε να είναι αποτελεσματική η αποσιώπηση. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με τις HP-Aub σειρές χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

3.1.3.2.3 Οι επιπτώσεις της μειορρύθμισης του *BmAgo3* σε σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα Bm5

3.1.3.2.3.1 Ο ιός Macula-like Virus (BmMLV)

Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία (Katsuma et al., 2005), αλλά και από πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας (Swevers L., αδημοσίευτα δεδομένα), πολλές κυτταρικές σειρές μεταξοσκώληκα (π.χ. BmN4 και Bm5) έχουν βρεθεί να είναι μολυσμένες υπό εμμένουσα μορφή με τον (+)-RNA ιό Macula-like (BmMLV).

Σύμφωνα με πρόσφατη αναφορά, δείχθηκε ότι η μειορρύθμιση ορισμένων από τα γονίδια-κλειδιά του siRNA (*BmAgo2*, *BmDcr2* και *BmR2D2*) και miRNA (*BmAgo1*, *BmDcr1*, *BmLoqs*, *BmDrosha* και *BmPasha*) μονοπατιού προκαλεί αύξηση των επιπέδων του γονιδίου της ρεπλικάσης του BmMLV στα κύτταρα BmN4-SID-1 του μεταξοσκώληκα (Zhu et al., 2013b). Συνεπώς, αν υποτεθεί ότι και το piRNA μονοπάτι εμπλέκεται στην αντιϊκή απόκριση του *B. mori*, όπως άλλωστε συμβαίνει και στα κουνούπια (Vodovar



Εικόνα 43 Ανίχνευση του γονιδίου *gp3* του ιού BmMLV σε κύτταρα Bm5 υπό εμμένουσα μόλυνση. Το γονίδιο *gp3* ανιχνεύθηκε μέσω της τεχνικής RT-PCR έπειτα από 28 κύκλους σε δείγματα RNA από κύτταρα Bm5.

and Saleh, 2012), θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί εάν η μειορρύθμιση του γονιδίου *BmAgo3* έχει κάποια ουσιαστική επίδραση στα επίπεδα του ιού BmMLV.

Για το λόγο αυτό, δείγματα cDNA από τις λειτουργικές σειρές HP-Ago3 και HP-Luc ελέγχθηκαν με PCR ούτως ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *gp3* του BmMLV. Η PCR έπειτα από 28 κύκλους έδειξε τα επίπεδα έκφρασης του ιϊκού γονιδίου να είναι ελαφρώς αυξημένα στις HP-Ago3 σειρές (**Εικόνα 43**). Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι η μερική αποσιώπηση του *BmAgo3* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του ιού στα κύτταρα Bm5, τα οποία μέχρι τη στιγμή του μετασχηματισμού ήταν ήδη φορείς του ιού σε εμμένουσα μορφή. Άρα, φαίνεται ότι, όπως και αρκετά από τα γονίδια των μονοπατιών siRNA και miRNA, το *BmAgo3* εμπλέκεται σε διαδικασίες που επηρεάζουν τα επίπεδα ενός λανθανόντως διαβιούντος ιού, όπως είναι ο BmMLV. Δεν αποκλείεται δε, η αδυναμία επίτευξης των HP-Aub σειρών να σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων του ιού BmMLV, ο οποίος θα μπορούσε να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των σταθερά μετασχηματισμένων κυττάρων.

3.1.3.2.3.2 Γονίδια που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό

Τα cDNAs που προέκυψαν από τις σταθερά μετασχηματισμένες HP σειρές αναλύθηκαν περαιτέρω με χρήση real-time PCR, ούτως ώστε να διερευνηθεί εάν η μερική αποσιώπηση του βασικού γονιδίου *BmAgo3* του piRNA μονοπατιού μπορεί να επηρεάσει με τη σειρά της την έκφραση άλλων βασικών γονιδίων του RNAi μηχανισμού. Επιπλέον, ελέγχθηκε η έκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό, αλλά διατηρούν ένα ρόλο περισσότερο περιφερειακό ή μη σαφώς προσδιορισμένο.

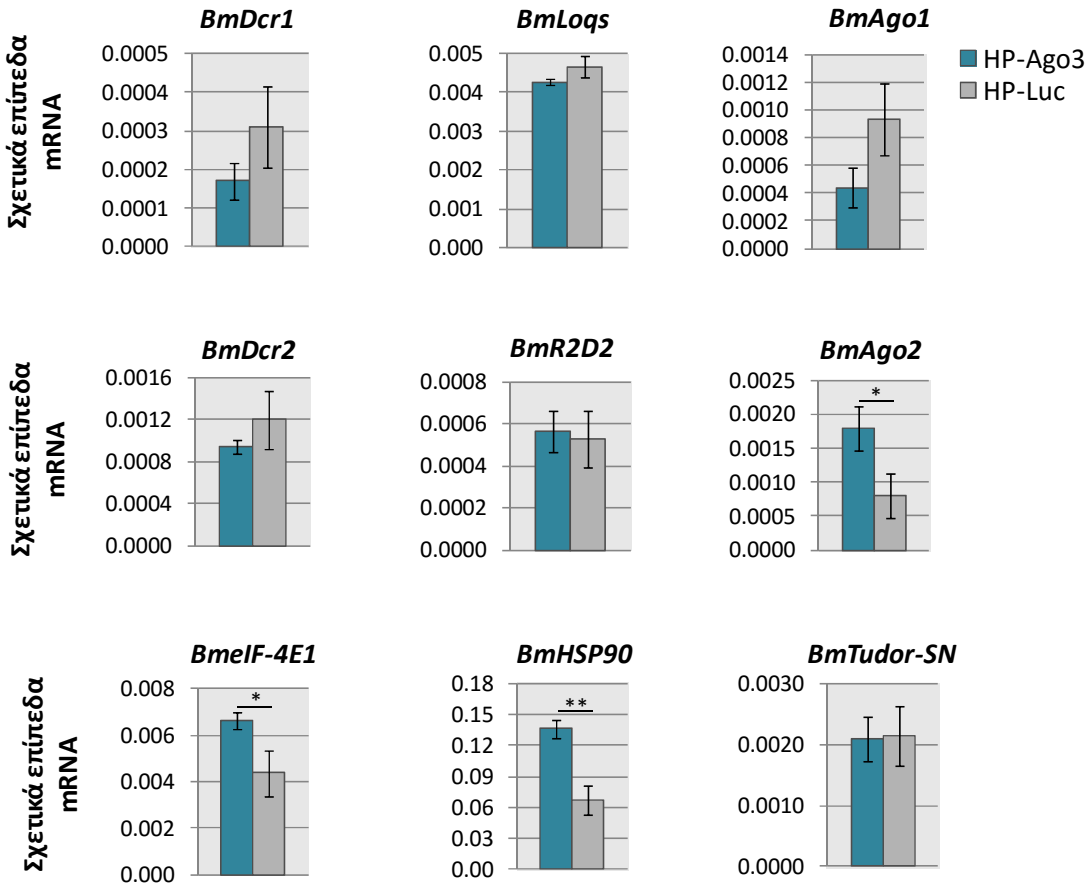
Από την ανάλυση προέκυψε ότι όταν το *BmAgo3* μειορρυθμίστηκε, τότε τα γονίδια *BmAgo2*, *BmeIF-4E1* και *BmHSP90* αυξορρυθμίστηκαν σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες που εξέφραζαν τη φουρκέτα HP-Luc (**Εικόνα 44**). Ειδικότερα, το *BmAgo2* αυξήθηκε κατά 224% (P = 0.0374), το *BmeIF-4E1* κατά 152% (P = 0.0247) και το *BmHSP90* κατά 203% (P = 0.0017). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BmAgo1*, *BmAub*, *BmDcr1*, *BmDcr2*, *BmLoqs*, *BmR2D2* και *BmTudor-SN.*

Η αποσιώπηση του *BmAgo3*, όπως και του γονιδίου-κλειδιού του siRNA μονοπατιού

BmAgo2, φαίνεται να διαταράσσει τις ισορροπίες του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5 αφού μειώνει την ικανότητά τους να προκαλούν αποσιώπηση μέσω μορίων dsRNA (βλ. §3.1.1.1). Υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις, λοιπόν, η BmAgo3 ενδέχεται να δρα ανεξάρτητα από το καθιερωμένο piRNA μονοπάτι στο οποίο ανήκει, αλλά με τρόπο που να προσομοιάζει στις ιδιότητες του siRNA μονοπατιού, όπως π.χ. στην αποσιώπηση μέσω μορίων dsRNA, και άρα ίσως παρουσιάζει κοινά στοιχεία με τη BmAgo2. Σειρές της *Drosophila* που έφεραν μεταλλαγή ώστε το μονοπάτι piRNA να μην είναι λειτουργικό στην αποσιώπηση ορισμένων μεταθετών γενετικών στοιχείων, παρουσίασαν αντίστοιχα αντισταθμιστική δράση από την πλευρά του siRNA μονοπατιού ώστε να ξεπεραστεί η ανεπαρκής παραγωγή piRNAs (Rozhkov et al., 2013). Ακόμη, ορισμένα siRNA γονίδια έχουν χαρακτηριστεί ως απαραίτητα για την αποσιωπητική δράση των piRNAs στο *C. elegans*, καθώς υπάρχουν piRNAs που αποσιωπούν ενδογενή μετάγραφα μέσω μίας δευτερογενούς απόκρισης του siRNA μονοπατιού (Bagijn et al., 2012). Φαίνεται λοιπόν ότι, αφού σε ορισμένες περιπτώσεις τα μονοπάτια siRNA και piRNA μπορούν να αλληλεπιδρούν και να έχουν συμπληρωματική δράση, κατά συνέπεια και ο ρόλος των γονιδίων *BmAgo2* και *BmAgo3* της οικογένειας Argonaute δύναται να είναι υπό τις κατάλληλες συνθήκες αλληλο-επικαλυπτόμενος.

Λόγω της αποσιώπησης του *BmAgo3*, τα επίπεδα mRNA του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης BmeIF-4E1, ο οποίος αναγνωρίζει και δεσμεύει τη δομή cap που βρίσκεται στο 5'-άκρο των ώριμων mRNAs, βρέθηκαν να είναι επίσης αυξημένα (**Εικόνα 44**). Αναφορικά με τον BmeIF-4E1, είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Argonaute (BmAgo1 και BmAgo2), καθώς συμμετέχουν παράλληλα στο σχηματισμό των κοκκίων στρες στο μεταξοσκώληκα (Zhu et al., 2013a). Πρόσφατα βρέθηκε ότι το *BmeIF-4E1* αυξορρυθμίζεται παράλληλα με την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *BmAgo2* και *BmDcr2* που παρατηρείται κατόπιν μόλυνσης του μεταξοσκώληκα με τον BmCPV (βλ. §3.2.2.4.3).

Παράλληλα, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA του γονιδίου της συνοδού πρωτεΐνης θερμικού σοκ BmHSP90 (**Εικόνα 44**), η οποία εμπλέκεται σε πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών και αλληλεπιδρά τόσο με τον BmeIF-4E1, όσο και με τις BmAgo2 και BmAgo3. Συγκεκριμένα, η HSP90 εμπλέκεται στη διαδικασία έναρξης της μετάφρασης και τη δημιουργία των κοκκίων στρες, ενώ η παρεμπόδισή της προκαλεί



Εικόνα 44 Έκφραση των γονιδίων-κλειδιών που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό στις κυτταρικές σειρές HP-Ago3. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin3.* Απεικονίζονται οι μέσοι όροι (±SE) των επιπέδων έκφρασης για το σύνολο των κυτταρικών σειρών HP-Ago3 (n=5). Η στατιστική ανάλυση αφορά στη σύγκριση με τις τιμές γονιδιακής έκφρασης για τις σειρές HP-Luc (n=4) (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

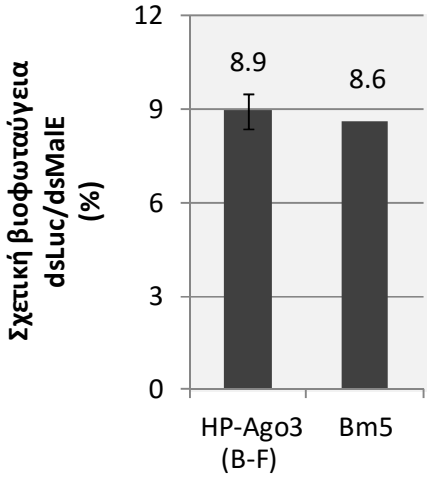
απομάκρυνση του BmeIF-4E1 από αυτά (Matsumoto et al., 2011; Suzuki et al., 2009). Επίσης, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ενσωμάτωση των piRNAs στην BmAgo3, αλλά και στην απομάκρυνση των παραπροϊόντων της διαδικασίας αυτής μέσω αλλαγών στη διαμόρφωση της BmAgo3 (Izumi et al., 2013; Xiol et al., 2012). Παράλληλα, η HSP90 σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ Ago2 και Dicer στα θηλαστικά (Tahbaz et al., 2004), ενώ στη *Drosophila* καταναλώνει ATP ούτως ώστε προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση της Ago2 και να διευκολύνει τη φόρτωση των siRNAs σε αυτήν (Iwasaki et al., 2010; Miyoshi et al., 2010b). Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών συνοδών HSP90/HSC70 με την Ago2 είναι απαραίτητη, ούτως ώστε να παραταθεί η διάρκεια παραμονής του συμπλόκου Dcr2-R2D2-siRNA σε επαφή με την Ago2 και να διασφαλιστεί η σωστή συναρμολόγηση του RISC (Iwasaki et al., 2015).

Συνεπώς, φαίνεται ότι οι δράσεις των πρωτεϊνών BmAgo3, BmAgo2, BmHSP90 και BmeIF-4E1 είναι άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους, και το κοινό τους δίκτυο αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω. Ωστόσο, ενδιαφέρον προκαλεί επίσης το εύρημα ότι τα επίπεδα έκφρασης του *BmAub* δεν διαταράχθηκαν εξαιτίας της μείωσης στην έκφραση του *BmAgo3* (**Εικόνα 44**), παρά το γεγονός ότι οι λειτουργίες τους θεωρούνται αλληλένδετες στο piRNA μονοπάτι. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να ερμηνευτεί αφενός ως αποτέλεσμα της πιθανής αναπλήρωσης των λειτουργιών της BmAgo3 από την BmAgo2, αφετέρου δε ως απόδειξη της δυνατότητας ανεξάρτητης λειτουργίας των δύο αυτών γονιδίων κατά περίπτωση.

3.1.3.2.3.3 Αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού

Σε πειράματα που περιγράφηκαν νωρίτερα δείχθηκε ότι η αποσιώπηση του γονιδίου *BmAgo3* μέσω διαμόλυνσης με dsAgo3 προκαλεί σημαντική παρεμπόδιση του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5 (βλ. §3.1.1.1). Αντίστροφα, επιβεβαιώθηκε η θετική επίδραση της υπερέκφρασης της BmAgo3 στην αποσιώπηση του γονιδίου της λουσιφεράσης (βλ. §3.1.3.1). Για να διερευνηθεί εάν ισχύει το ίδιο και σε κύτταρα Bm5 που εκφράζουν σταθερά τη φουρκέτα HP-Ago3, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία του «RNAi του RNAi μηχανισμού», όπως έχει ήδη περιγραφεί αναλυτικά στις προηγούμενες παραγράφους (π.χ. §3.1.1.1). Ειδικότερα, κύτταρα Bm5 των σειρών HP-Ago3 (B, C, D, E και F) διαμολύνθηκαν με το φορέα αναφοράς pEcRE.bA.Luc/EcRE.bA.gfp, καθώς και με dsLuc. Ως dsRNA ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το dsMalE, ενώ ως κυτταρική σειρά ελέγχου τα κύτταρα Bm5.

Από τη δοκιμασία αυτή προέκυψε ότι παρά τη μερική αποσιώπηση του *BmAgo3* στα σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα Bm5/HP-Ago3, ο RNAi μηχανισμός λειτουργεί κανονικά. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα αποσιώπησης του γονιδίου της λουσιφεράσης είναι συγκρίσιμα μεταξύ των HP-Ago3 σειρών και των απλών Bm5 κυττάρων, με το μέσο όρο του λόγου της % σχετικής βιοφωταύγειας dsLuc/dsMalE από τις πέντε κυτταρικές σειρές να ισούται με 8.9% (**Εικόνα 45**). Ενδεχομένως, αυτό το φαινόμενο να οφείλεται στο γεγονός ότι η μειορρύθμιση του *BmAgo3* οδηγεί σε παράλληλη αυξορρύθμιση του *BmAgo2*, που έχει ως συνέπεια η έλλειψη του ενός να αντισταθμίζεται από την υπερπαραγωγή του άλλου, όπως παρατηρήθηκε στην §3.1.3.2.3.2.



Διαμόλυνση	**pEcRE.bA.Luc/EcRE.bA.gfp**	+	+
	dsLuc ή dsMalE	+	+
Σταθερός μετασχηματισμός	**pEA-HP-Ago3**	+	-
	pBmIE1	+	-
	pEA.pac	+	-

Εικόνα 45 Έλεγχος της αποδοτικότητας του RNAi μηχανισμού μέσω της λειτουργικής δοκιμασίας του «RNAi του RNAi μηχανισμού» στις σταθερές HP-Ago3 κυτταρικές σειρές. Τόσο οι σταθερά μετασχηματισμένες σειρές HP-Ago3, όσο και μη-μετασχηματισμένα κύτταρα Bm5, διαμολύνθηκαν με τον επαγόμενο φορέα pEcRE.bA.Luc/EcRE.bA.gfp, καθώς και με dsRNA (dsLuc ή dsMalE). Η λειτουργική δοκιμασία λουσιφεράσης για τη μέτρηση της εκλυόμενης βιοφωταύγειας έγινε σε διαλυτά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο επί τοις εκατό (%) λόγος της σχετικής βιοφωταύγειας που παρήχθη από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με dsLuc προς τα αντίστοιχα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με dsMalE.

3.1.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΣΥΣΤΗΜΙΚΟΥ RNAi ΣΤΟΝ *B. mori*

3.1.4.1 Η έκφραση των βασικών siRNA γονιδίων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και όργανα των στελεχών του *B. mori* P50 και Daizo

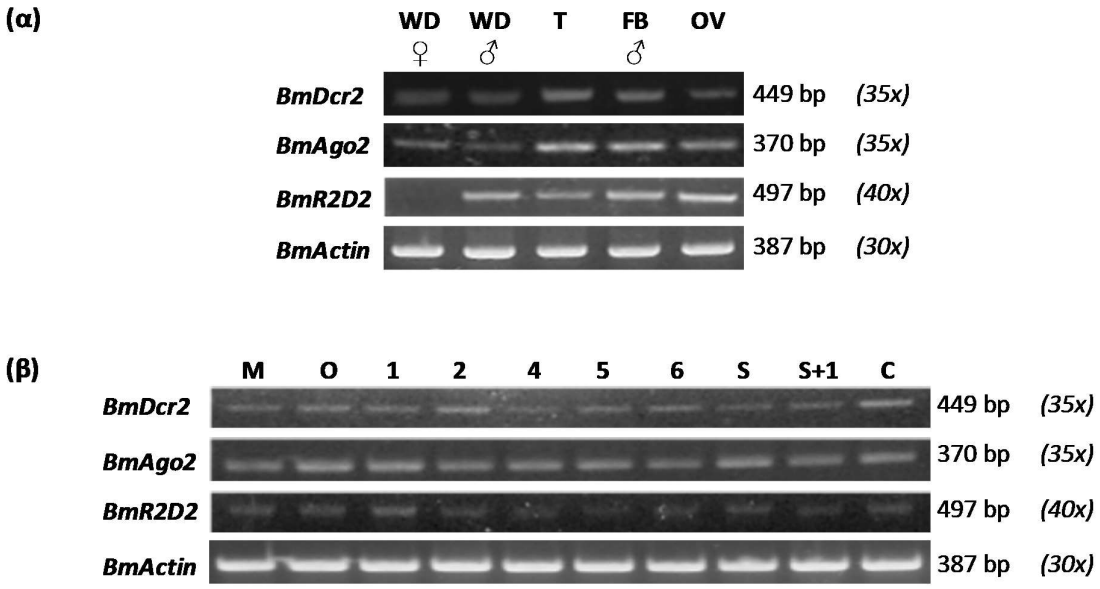
Στο μεταξοσκώληκα, η ποικιλομορφία που παρατηρείται ως προς την απόκριση σε πειράματα επαγωγής *in vivo* συστημικού RNAi είναι σημαντική (Terenius et al., 2011). Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη του προφίλ έκφρασης των ενζύμων-κλειδιών του siRNA μονοπατιού (*BmAgo2*, *BmDcr2* και *BmR2D2*), πραγματοποιώντας ταυτόχρονα σύγκριση μεταξύ διαφορετικών: α) αναπτυξιακών σταδίων, β) ιστών, και γ) στελεχών του *B. mori*.

Αρχικά, για να επιβεβαιωθεί η έκφραση των siRNA γονιδίων, ενδεικτικά, σε ορισμένα όργανα, απομονώθηκε RNA από ιστούς αρσενικών και θηλυκών νυμφών του στελέχους P50 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε RT-PCR. Σύμφωνα με την **Εικόνα 46α**, έπειτα από 35 κύκλους η έκφραση των *BmDcr2* και *BmAgo2* εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένη στους όρχεις και το λιπαρό σώμα αρσενικών νυμφών, ενώ έπειτα από 40 κύκλους το γονίδιο *BmR2D2* εκφράζεται επαρκώς σε όλα τα όργανα που μελετήθηκαν πλην του δίσκου πτερύγων (WD) των θηλυκών νυμφών όπου φαίνεται να μην εκφράζεται καθόλου. Έτσι, δείχθηκε ότι τα βασικά γονίδια του siRNA μονοπατιού εκφράζονται στην πλειοψηφία των οργάνων από τις νύμφες του στελέχους P50 που ελέγχθηκαν. Σημαντική διαφορά που φαίνεται να υπάρχει σε σχέση με προηγούμενη μελέτη για την έκφραση των εν λόγω γονιδίων στο στέλεχος Daizo του *B. mori* (Swevers et al., 2011) είναι η παρατηρούμενη έκφραση του γονιδίου *BmR2D2* στα περισσότερα από τα δείγματα που ελέγχθηκαν (**Εικόνα 46α**).

Στη συνέχεια, με σκοπό να μελετηθούν περαιτέρω τα επίπεδα έκφρασης των βασικών siRNA γονιδίων του μεταξοσκώληκα κατά τη διάρκεια μετάβασης από το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης σε αυτό της νύμφης, προνύμφες του στελέχους Daizo συγχρονίστηκαν κατά τη φάση της 4^{ης} έκδυσης. Από αυτές, συλλέχθηκε δείγμα επιδερμικού ιστού για 11 διαδοχικές ημέρες, έως και το στάδιο πλήρους σχηματισμού του κουκουλιού, από το οποίο απομονώθηκε RNA. Τα αποτελέσματα της RT-PCR (**Εικόνα 46β**) δείχνουν ότι και τα 3 γονίδια που μελετώνται εκφράζονται στις προνύμφες του στελέχους Daizo καθ' όλο το διάστημα ανάπτυξης από το 4^{ο} στάδιο έκδυσης έως και τον πλήρη σχηματισμό του κουκουλιού. Επίσης, παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασης

του *BmAgo2* είναι υψηλότερα τόσο σε σχέση με εκείνα του *BmDcr2* (35 κύκλοι), όσο και με εκείνα *BmR2D2* που διατηρούνται σταθερά ιδιαιτέρως χαμηλά σε όλη τη διάρκεια του 5^{ου} σταδίου έκδυσης μέχρι το σχηματισμό του κουκουλιού (40 κύκλοι). Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η έκφραση των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* του siRNA μονοπατιού στην επιδερμίδα των μεταξοσκωλήκων του στελέχους Daizo κατά το 5^{ο} προνυμφικό στάδιο έως και το σχηματισμό του κουκουλιού (Swevers et al., 2011), ενώ τα μόλις ανιχνεύσιμα επίπεδα έκφρασης του *BmR2D2* παρατηρούνται για πρώτη φορά.

Ακολούθως, προκειμένου να μελετηθούν οι ενδεχόμενες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των 3 βασικών γονιδίων του siRNA μονοπατιού (*BmDcr2*, *BmAgo2* και *BmR2D2*) με μεγαλύτερη λεπτομέρεια σε σχέση με όση μπορεί να αποδώσει η απλή PCR, πραγματοποιήθηκε μία εκτενέστερη διερεύνηση του προφίλ έκφρασης με χρήση της τεχνικής qRT-PCR. Η μελέτη αυτή περιλάμβανε, όπως και προηγουμένως, συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων του μεταξοσκώληκα, έχοντας ως



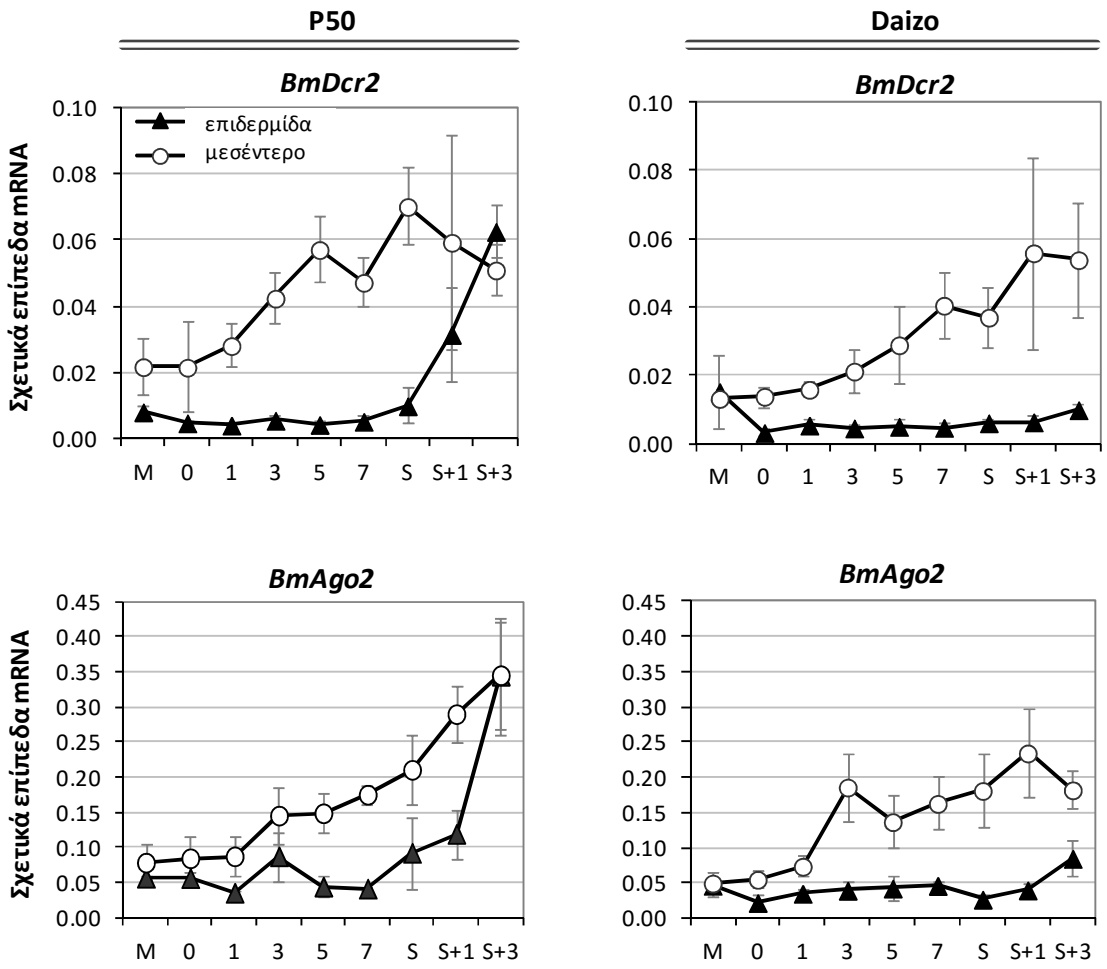
Εικόνα 46 Η έκφραση των βασικών γονιδίων του siRNA μονοπατιού στον *B. mori.* RT-PCR σε δείγματα RNA (α) από όργανα νυμφών του στελέχους P50, και (β) από την επιδερμίδα του στελέχους Daizo κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εντόμου από την έναρξη του 5^{ο} προνυμφικού σταδίου μέχρι και τον πλήρη σχηματισμό του κουκουλιού. WD (wing disk): δίσκος πτερύγων, T (testis): όρχις, FB (fat body): λιπαρό σώμα, OV (ovariole): ωοθυλάκιο, M (molting): 4^{η} έκδυση, 0-6: διαδοχικές ημέρες μετά την 4^{η} έκδυση, S (spinning): ακριβώς πριν την έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού, S+1: 1^{η} ημέρα μετά έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού, C (cocoon): πλήρως σχηματισμένο κουκούλι. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *BmActin*.

αφετηρία το τελευταίο στάδιο της έκδυσης (προνύμφη) έως και τρεις ημέρες μετά τη δημιουργία του κουκουλιού (νύμφη), σε δύο διαφορετικά στελέχη του *B. mori*. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που ελέγχθηκαν ήταν το Daizo (στέλεχος Ιαπωνικής προέλευσης) και το P50 (στέλεχος Κινεζικής προέλευσης). Έτσι, για το συγχρονισμό των ζώων, άτομα *Bombyx* που βρίσκονταν ταυτόχρονα στο 4^{ο} στάδιο έκδυσης τοποθετήθηκαν στον ίδιο χώρο και αποτέλεσαν την πηγή του ζωικού δείγματος.

Εδώ, επιλέχθηκε να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση τόσο στον επιδερμικό ιστό, καθώς έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στον παρελθόν σε πειράματα RNAi στον *B. mori*, όσο και στο μεσέντερο, διότι αποτελεί το κύριο όργανο στο οποίο οδηγούνται και απελευθερώνονται οι ιοί που εισέρχονται στο σώμα του ζώου μέσω της τροφής. Άλλωστε, το μεσέντερο είναι το μοναδικό τμήμα του εντέρου που διαθέτει επιφάνεια εκτεθειμένων κυττάρων που επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ της αιμολέμφου και του περιεχομένου του εντέρου, σε αντίθεση με το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο που είναι καλυμμένα με χιτίνη (Price and Gatehouse, 2008).

Σύμφωνα με την **Εικόνα 47**, φαίνεται ότι ανιχνεύεται γονιδιακή έκφραση τόσο για το *BmDcr2* όσο και για το *BmAgo2* και, άρα, το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί ένδειξη της ενεργότητας του siRNA μονοπατιού στα στελέχη του *B. mori* που μελετώνται εδώ. Ειδικότερα, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης για το γονίδιο *BmAgo2*, παρατηρείται υψηλότερη έκφραση τόσο στην επιδερμίδα, όσο και στο μεσέντερο, σε σχέση με το γονίδιο *BmDcr2*. Αναφορικά με την επιδερμίδα, τα εν λόγω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα αντίστοιχα δεδομένα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως (**Εικόνα 46β**). Επιπλέον, ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι η έκφραση στα γονίδια *BmAgo2* και *BmDcr2* εμφανίζεται αυξημένη στον ιστό του μεσεντέρου σε σχέση με τον επιδερμικό ιστό, καθ' όλο το μελετούμενο διάστημα, με εξαίρεση την τελευταία ημέρα στο στέλεχος P50. Παράλληλα, είναι αξιοσημείωτη η σταδιακή αύξηση της έκφρασης των *BmDcr2* και *BmAgo2* κυρίως στο μεσέντερο, κατά τη διάρκεια της πορείας προς τη μετάβαση στο στάδιο της νύμφης.

Η αυξημένη έκφραση των *BmAgo2* και *BmDcr2* στο μεσέντερο μπορεί να δικαιολογηθεί εάν ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι ο μεταξοσκώληκας μολύνεται μέσω της τροφής με ιούς που στοχεύουν πρωταρχικά στο μεσέντερο, όπου λόγω του κατάλληλου pH γίνεται και η λύση των πολυέδρων που περιέχονται οι ιοί. Πιθανώς



Εικόνα 47 Το προφίλ των φυσιολογικών επιπέδων έκφρασης 2 βασικών γονιδίων του siRNA μονοπατιού του *B. mori* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εντόμου από το τελευταίο στάδιο έκδυσης έως τη μεταμόρφωσή του σε νύμφη. (α) Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *BmDcr2* και *BmAgo2* στα στελέχη P50 και Daizo. Απεικονίζονται οι μέσοι όροι 3 βιολογικών επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα. M: 4η έκδυση, 0-7: διαδοχικές ημέρες μετά την έκδυση, S: ακριβώς πριν την έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού, S+: ημέρες μετά έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης *BmTIF*.

λοιπόν, ο μηχανισμός του RNAi να αξιοποιεί το siRNA μονοπάτι για να ενισχύσει την άμυνα του *B. mori* έναντι πιθανών ιϊκών μολύνσεων.

Συνοψίζοντας, η διαπίστωση της έκφρασης και των 3 βασικών siRNA γονιδίων υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη ποικιλομορφία ως προς την αποδοτικότητα των πειραμάτων πρόκλησης συστημικού RNAi *in vivo* δε φαίνεται να σχετίζεται με την απουσία έκφρασης κάποιου από τα γονίδια του siRNA μονοπατιού. Ακόμη, έπειτα από

τη σύγκριση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων, ιστών και στελεχών του *B. mori* που μελετήθηκαν εδώ (**Εικόνα 47**), προκύπτει ότι πιθανόν να υπάρχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε πειράματα επαγωγής συστημικού RNAi μέσω dsRNA εάν προτιμηθεί: α) το στέλεχος P50 αντί του Daizo, β) ο ιστός του μεσεντέρου αντί της επιδερμίδας και γ) το στάδιο σχηματισμού του κουκουλιού αντί του τελευταίου προνυμφικού σταδίου.

3.1.4.2 Πειράματα πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω ενέσεων dsRNA *in vivo*

Για να διερευνηθούν οι δυνατότητες επαγωγής συστημικού RNAi στον *B. mori*, αλλά και οι παράγοντες που την επηρεάζουν, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις δίκλωνου RNA (dsRNA) με στόχο κάποιο γονίδιο τόσο σε προνύμφες Daizo, όσο και σε προνύμφες P50.

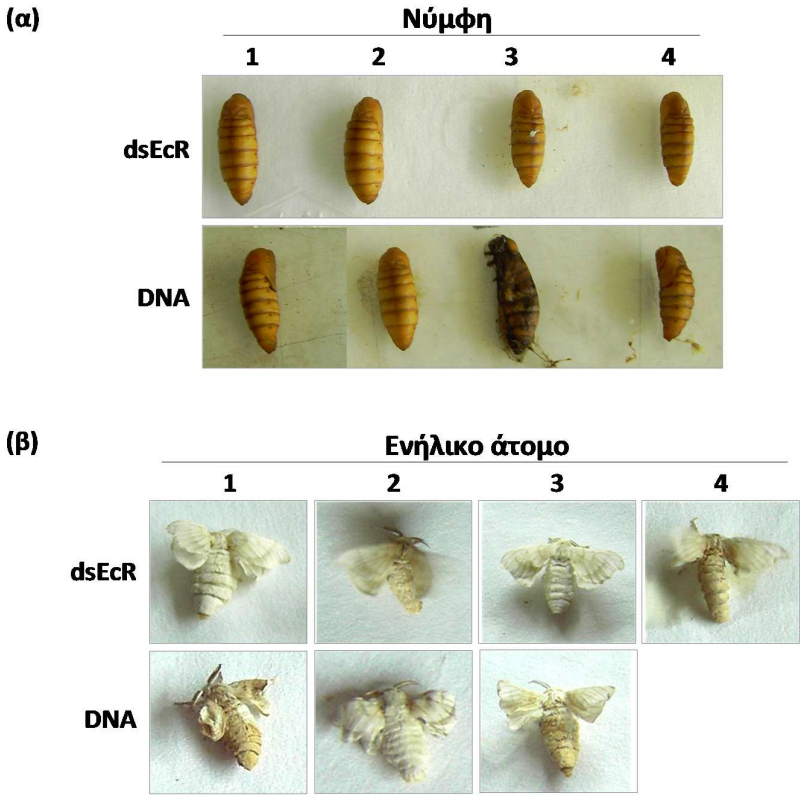
3.1.4.2.1 Απόπειρα αποσιώπησης του γονιδίου *BmEcR*

Αρχικά, ως στόχος επιλέχθηκε το γονίδιο του υποδοχέα της εκδυσόνης (ecdysone receptor, *BmEcR*). Ο EcR είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας που στα έντομα συμμετέχει κυρίως στη σηματοδότηση της στεροειδούς ορμόνης εκδυσόνης, ενώ εμπλέκεται και σε πλήθος άλλων λειτουργιών που σχετίζονται με την ανάπτυξη (Qian et al., 2015). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε σύνθεση ειδικού dsRNA μέσω του φορέα pLitmus-38i όπου ήταν κλωνοποιημένο ένα τμήμα του γονιδίου *BmEcR* (dsEcR). Σε περίπτωση επιτυχούς πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης του EcR, μέσω της χορήγησης του ειδικού dsEcR, ήταν αναμενόμενο τα άτομα που υποβλήθηκαν στην ένεση να μην καταφέρουν να ολοκληρώσουν την έκδυση που οδηγεί στο στάδιο της νύμφης.

Οι ενέσεις έγιναν σε ζώα που βρίσκονταν στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο (5^{ο}), λίγο πριν την εκκένωση του εντέρου και την έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού. Κάθε ζώο ενέθηκε με 5 μg dsEcR (~1 μg/μL) στη βάση του 2^{ου} πλεοπόδιου με τη βοήθεια μίας πιπέτας Hamilton, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Tian et al., 2010b; Tian et al., 2010a). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ζώα στα οποία ενέθηκαν 5 μg μη-ειδικού DNA (άδειου φορέα pBluescript) με τον ίδιο τρόπο. Ενέσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο στο στέλεχος P50, όσο και στο στέλεχος Daizo.

Η εξέλιξη της ανάπτυξης των ζώων που ενέθηκαν με το dsEcR παρατηρήθηκε φαινοτυπικά για χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων (**Εικόνες 48α και 48β**). Όπως φαίνεται ενδεικτικά για τα ζώα του στελέχους P50, τα ζώα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά και μεταμορφώθηκαν επιτυχώς σε ενήλικα άτομα. Εξαίρεση αποτέλεσε ένα ζώο μάρτυρας, το οποίο πέθανε στο στάδιο της νύμφης, πιθανώς λόγω τραυματισμού ή μόλυνσης που προέκυψε από τη διαδικασία της ένεσης.

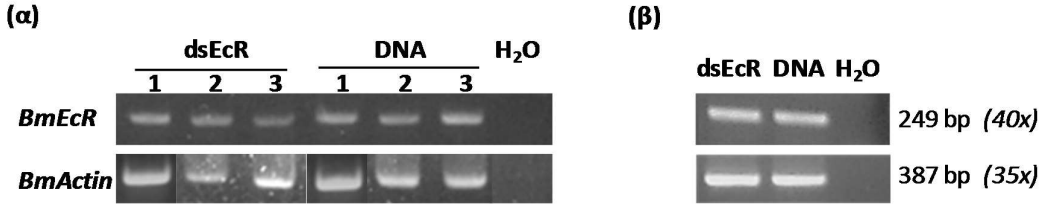
Παράλληλα με τη φαινοτυπική παρατήρηση των ζώων, συλλέχθηκε επιδερμικός ιστός από τα άτομα που ενέθηκαν 3-5 ημέρες μετά την πραγματοποίηση της ένεσης, ενώ από τον ιστό που συλλέχθηκε έγινε απομόνωση ολικού RNA για να χρησιμοποιηθεί σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με χρήση oligo-[dT]. Τα cDNAs που προέκυψαν



Εικόνα 48 Άτομα του στελέχους P50 που υποβλήθηκαν σε ενέσεις dsRNA έναντι του γονιδίου *BmEcR*. Τα άτομα P50 ενέθηκαν με dsEcR ή με μη ειδικό DNA. Εδώ απεικονίζονται (α) νύμφες (7 ημέρες μετά την ένεση) και (β) ενήλικα άτομα (14 ημέρες μετά την ένεση).

ελέγχθηκαν με PCR για το γονίδιο *BmEcR* με βάση το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης (*BmActin*). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σχεδιασμένοι να περικλείουν εσώνια μήκους 95 bp για το γονίδιο *BmActin* και 2.5 kb για το *BmEcR,* έτσι ώστε να αποφεύγεται η μεγέθυνση αλληλουχιών γονιδιωματικού DNA. Όπως παρατηρείται (**Εικόνες 49α και 49β**), δεν υπάρχει κάποια εμφανής διαφορά στην έκφραση του *BmEcR* στα ζώα που ενέθηκαν με το dsEcR σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες, ενώ επιπλέον τα αποτελέσματα είναι παρόμοια τόσο για τα ζώα του στελέχους Daizo, όσο και για εκείνα του στελέχους P50. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με τη φυσιολογική μεταμόρφωση των ζώων που ενέθηκαν συντείνει στην άποψη ότι η εν λόγω προσπάθεια πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi δεν ήταν επιτυχής.

Η μη πρόκληση συστημικού RNAi με την παραπάνω μεθοδολογία μπορεί να ερμηνευτεί ποικιλοτρόπως. Σε πρώτο επίπεδο, υποδεικνύει την πιθανή ελλιπή λειτουργικότητα του RNAi μηχανισμού στον *B. mori*, διότι ίσως δεν κατέστη δυνατή η πρόσληψη των δίκλωνων μορίων RNA από το σύμπλοκο RISC έτσι ώστε αυτά να διοχετευτούν προς το mRNA του γονιδίου-στόχου *BmEcR* και να παρεμποδίσουν την λειτουργία του. Ενδεχομένως, η παρατηρούμενη αποτυχία να οφείλεται σε κατακερματισμό των dsRNAs μετά την εισαγωγή τους στον οργανισμό του μεταξοσκώληκα από αποικοδομητικά ένζυμα (π.χ. νουκλεάσες) πριν αυτά προλάβουν να έρθουν σε επαφή με το στόχο τους. Επιπλέον, ενδεχομένως, η ποσότητα του dsRNA που χρησιμοποιήθηκε να ήταν μικρή για τα ζώα που ενέθηκαν, ώστε ακόμα και αν



Εικόνα 49 Η έκφραση του γονιδίου *BmEcR* έπειτα από ενέσεις με dsEcR σε προνύμφες μεταξοσκώληκα. Τα αποτελέσματα της PCR μετά από 35 κύκλους για το γονίδιο *BmEcR* σε προνύμφες των στελεχών (α) Daizo και (β) P50. DNA: ζώα που ενέθηκαν με μη-ειδικό DNA (άδειος φορέας pBluescript), H_2O: ο αρνητικός μάρτυρας της PCR που αντιστοιχεί σε δείγμα νερού. Στην Εικόνα (α) το δείγμα 1 προέκυψε από διαφορετικές αντιδράσεις σε σχέση με τα 2 και 3. Δεν απεικονίζεται μάρτυρας για γονιδιωματικό DNA, γιατί δεν υπήρξε προϊόν υπό αυτές τις συνθήκες της PCR λόγω του μεγάλου μήκους του εσωνίου. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *BmActin*.

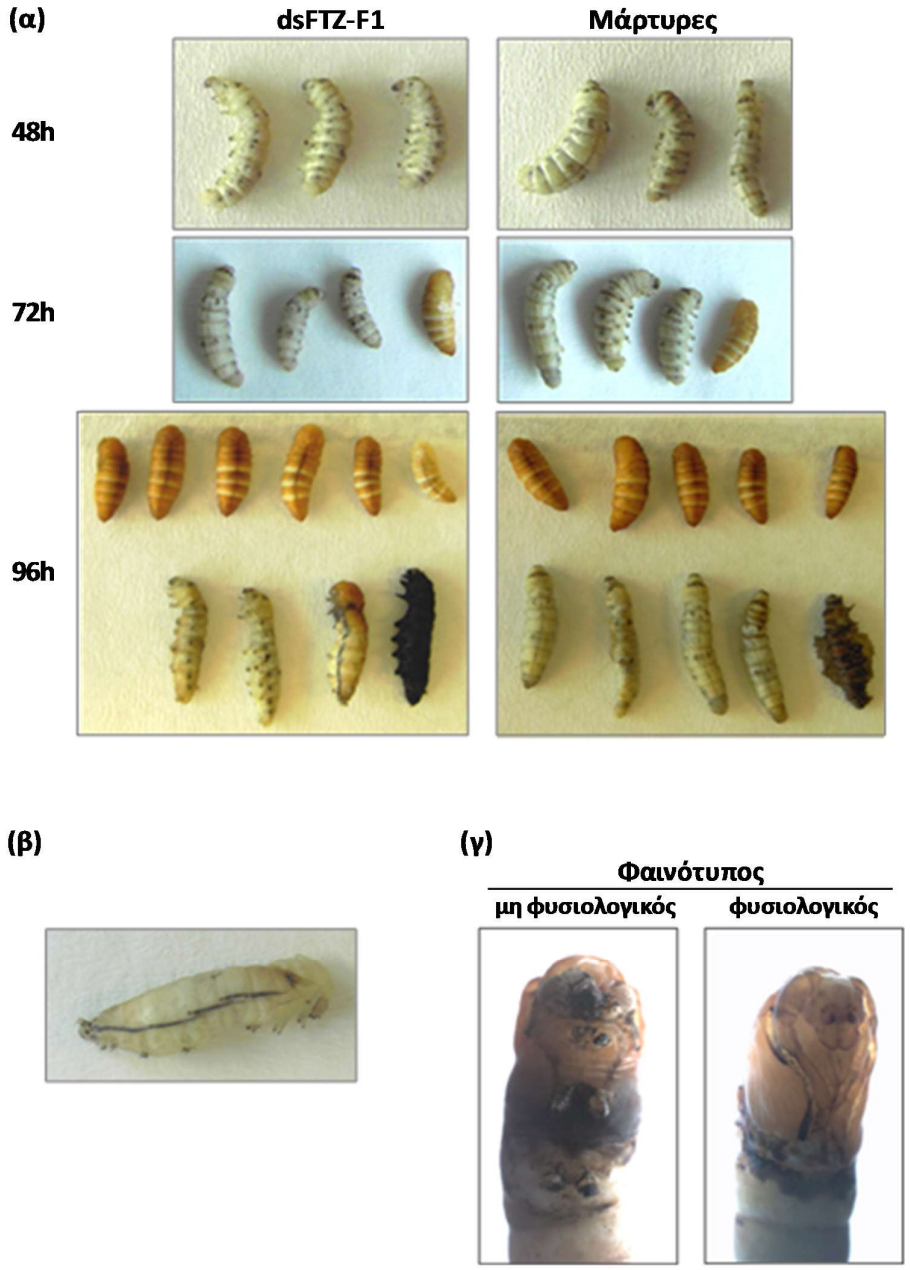
υπήρξε δράση του dsEcR, η γονιδιακή αποσιώπηση που προκλήθηκε δεν ήταν ανιχνεύσιμη.

Σε μελλοντικά πειράματα, θα ήταν σκόπιμο χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα dsEcR για την ένεση των ζώων, καθώς και να συσχετιστεί η ποσότητα του dsRNA που ενίεται με το βάρος του κάθε ζώου. Ακόμη, η χρήση real-time PCR για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που στοχεύτηκε αναμένεται να δώσει πιο ακριβή αποτελέσματα σχετικά με το αποτέλεσμα ως προς την αποσιώπηση του επιθυμητού γονιδίου. Τέλος, σε περίπτωση παρατήρησης φαινοτύπου που να αποδεικνύει την πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης σε κάποιο βαθμό στα ζώα που ενέθηκαν με το dsEcR, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί διασταύρωση των ίδιων ζώων, έτσι ώστε να μελετηθεί η ύπαρξη πιθανής μεταφοράς του αποσιωπητικού μηνύματος έναντι του γονιδίου-στόχου στην επόμενη γενιά.

3.1.4.2.2 Απόπειρα αποσιώπησης του γονιδίου *BmFTZ-F1*

Στη συνέχεια, ως στόχος επιλέχθηκε το γονίδιο του *fushi tarazu factor 1* του μεταξοσκώληκα (*BmFTZ-F1*), το οποίο κωδικοποιεί για έναν ορφανό πυρηνικό υποδοχέα πρόσδεσης του DNA, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, την προνυμφική έκδυση και τα πρώιμα στάδια της μεταμόρφωσης (Sultan et al., 2014). Έτσι, πραγματοποιήθηκε σύνθεση dsRNA ειδικού ως προς τον FTZ-F1 (dsFTZ-F1) μέσω του φορέα pLitmus-38i, όπου ήταν κλωνοποιημένο τμήμα του γονιδίου-στόχου. Σε περίπτωση επιτυχούς γονιδιακής αποσιώπησης του *BmFTZ-F1* μέσω της χορήγησης του ειδικού dsFTZ-F1, στα άτομα που ενέθηκαν θα παρεμποδιζόταν η πορεία του εντόμου προς τη μεταμόρφωση, σύμφωνα με αντίστοιχες προσπάθειες στόχευσης του *BmFTZ-F1* μέσω RNAi στο παρελθόν που προκάλεσαν ανωμαλίες στη διαδικασία μετάβασης από το τελευταίο στάδιο της προνύμφης σε αυτό της νύμφης (Cheng et al., 2008).

Σε συμφωνία με την §3.1.4.2.1, οι ενέσεις έγιναν σε ζώα του στελέχους P50 κατά το 5^{ο} προνυμφικό στάδιο, λίγο πριν την εκκένωση του εντέρου και την έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Cheng et al., 2008). Λόγω της αποτυχίας του προηγούμενου πειράματος, σε αυτό το πείραμα χορηγήθηκαν 30 μg dsFTZ-F1 (1.4 μg/μL σε διάλυμα 150 mM NaCl) με μία πιπέτα Hamilton πλευρικά στο



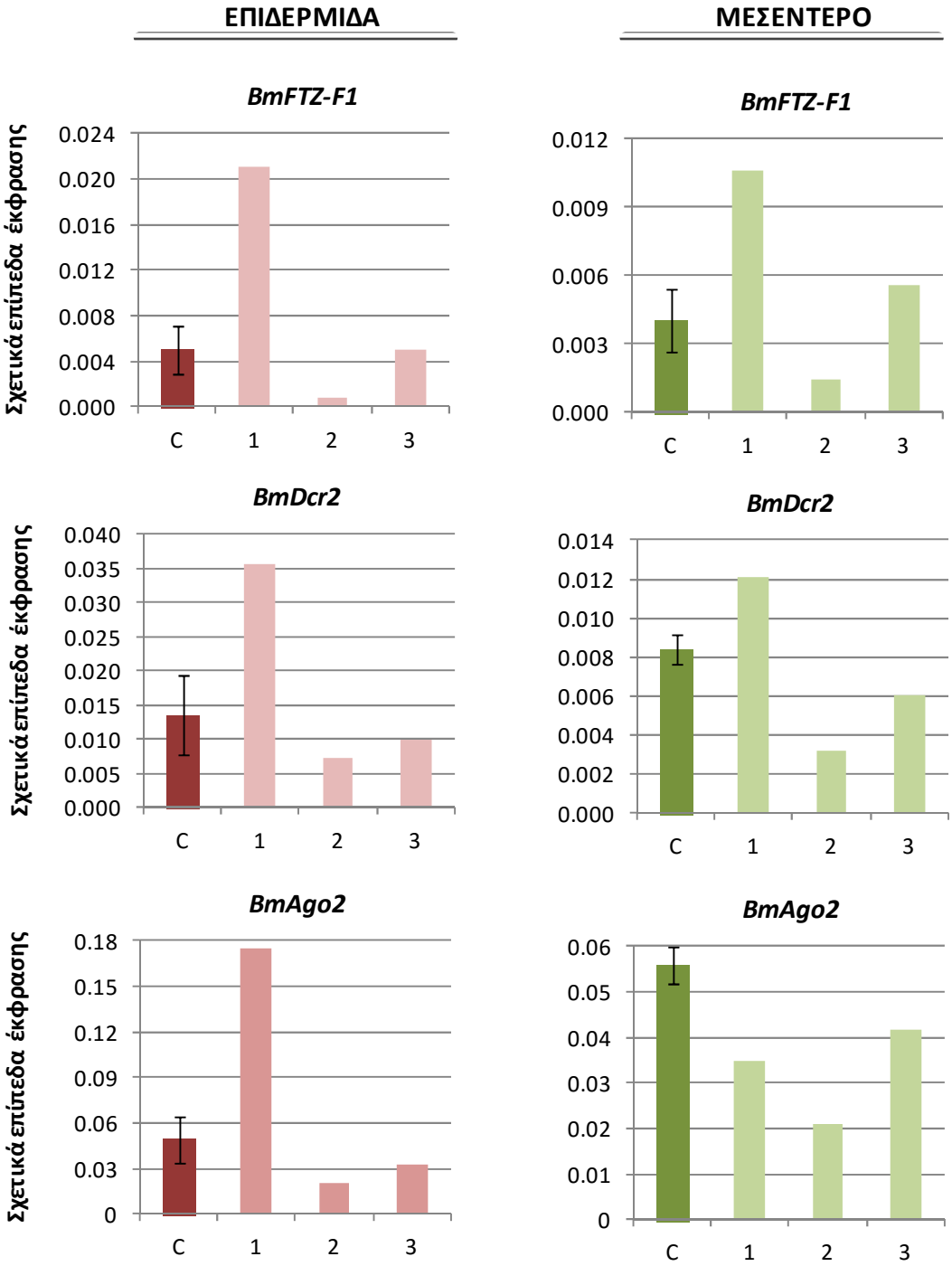
Εικόνα 50 Άτομα του στελέχους P50 που υποβλήθηκαν σε ενέσεις έναντι του γονιδίου *BmFTZ-F1*. Τα άτομα P50 ενέθηκαν με dsFTZ-F1 ή με διάλυμα NaCl (150 mM). (α) Τα άτομα στα οποία έγινε η ένεση 48h, 72h και 96h μετά. (β) Ένα άτομο με μη-φυσιολογικό φαινότυπο έπειτα από ένεση με dsFTZ-F1. (γ) Σύγκριση μη-φυσιολογικού και φυσιολογικού φαινότυπου στις 96h μετά την ένεση.

σώμα κάθε ζώου (n=13). Ακολούθως ζυγίστηκαν όλα τα ζώα και προσδιορίστηκε η αναλογία dsRNA που ενέθηκε ανά γραμμάριο ζώου σε 25.4 μg/g, ενώ το μέσο βάρος των ζώων ήταν 1.18 g. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ισάριθμα ζώα στα οποία ενέθηκε ίσος όγκος διαλύματος 150 mM NaCl.

Από τη μακροσκοπική εξέταση των ζώων δεν παρατηρήθηκε κάποια εμφανής διαφορά μεταξύ αυτών που ενέθηκαν με το dsFTZ-F1 και των μαρτύρων (**Εικόνα 50**). Ειδικότερα, αν και παρουσιάστηκε καθυστέρηση στην ανάπτυξη σε νύμφη και ποσοστό θνησιμότητας ~40%, το φαινόμενο αυτό ήταν όμοιο και για τις δύο κατηγορίες ζώων. Μόνο ένα ζώο που ενέθηκε με dsFTZ-F1 παρουσίασε μη-αναμενόμενο φαινότυπο (**Εικόνες 50β και 50γ**), ωστόσο το γεγονός αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί με βεβαιότητα ότι ήταν αποτέλεσμα της αποσιώπησης του γονιδίου.

Στη συνέχεια, 48h μετά την πραγματοποίηση της ένεσης, ακολούθησε συλλογή ιστού από την επιδερμίδα και το μεσέντερο των ατόμων που ενέθηκαν, καθώς τότε τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FTZ-F1 αναμένονται να είναι υψηλά (Cheng et al., 2008). Έπειτα, έγινε απομόνωση ολικού RNA και αντίστροφη μεταγραφή, ενώ ακολούθησε ποσοτική real-time PCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου αλλά και των γονιδίων του siRNA μονοπατιού *BmDcr2* και *BmAgo2*. Η μοριακή ανάλυση που ακολούθησε (**Εικόνα 51**) δεν οδήγησε σε σαφή συμπεράσματα σε σχέση με την αποσιώπηση του γονιδίου *BmFTZ-F1* μεταξύ των ζώων που ενέθηκαν με dsFTZ-F1 σε σχέση με τους μάρτυρες, εκτός ίσως από το ζώο #2 που εμφανίζει ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το μάρτυρα. Ενδιαφέρον προκαλεί η περίπτωση του ζώου #1, όπου με εξαίρεση την έκφραση του *BmAgo2* στο μεσέντερο, στις υπόλοιπες περιπτώσεις γονιδιακής έκφρασης που ελέγχθηκαν εμφανίζει σαφώς αυξημένες τιμές ως προς το μάρτυρα. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τη στιγμή της δειγματοληψίας στο συγκεκριμένο ζώο τα επίπεδα του *BmFTZ-F1* ενδεχομένως βρίσκονταν στο αποκορύφωμά τους.

Σαν γενικότερη παρατήρηση, επισημαίνεται ότι η συλλογή του δείγματος μπορεί να μην έγινε την κατάλληλη χρονική στιγμή ώστε να συμπέσει με την φυσιολογικά υψηλή έκφραση του γονιδίου, καθώς και στους μάρτυρες τα επίπεδα έκφρασης είναι ιδιαιτέρως χαμηλά (**Εικόνα 51**). Άλλωστε, οι διακυμάνσεις της έκφρασης του *BmFTZ-F1* μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των στελεχών του μεταξοσκώληκα, ενώ το χρονικό «παράθυρο» που εμφανίζεται αυξημένη είναι σχετικά σύντομο (Cheng et al., 2008) και άρα ίσως δύσκολο να προβλεφθεί επακριβώς. Κρίνοντας και από τη φαινοτυπική παρατήρηση των ζώων (**Εικόνα 50**), βέβαιο είναι πάντως ότι ακόμα και αν υπήρξε απόκριση του RNAi μηχανισμού, αυτή δεν ήταν αρκετή ώστε να ανακόψει την πορεία των εντόμων προς τη μεταμόρφωση (πλην ενός ατόμου).



Εικόνα 51 Η έκφραση του γονιδίου *BmFTZ-F1* και των γονιδίων-κλειδιών (*BmDcr2* και *BmAgo2*) του siRNA μονοπατιού έπειτα από ενέσεις dsFTZ-F1 σε προνύμφες μεταξοσκώληκα P50. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της qRT-PCR για τα γονίδια *BmFTZ-F1*, *BmDcr2* και *BmAgo2*. Για τον μάρτυρα (C), που αντιστοιχεί σε ζώα που ενέθηκαν με διάλυμα NaCl (150 mM), απεικονίζεται ο μέσος όρος 3 βιολογικών επαναλήψεων (1 άτομο ανά επανάληψη) ± τυπικό σφάλμα. Για τα ζώα που ενέθηκαν με dsFTZ-F1 απεικονίζεται η τιμή της κάθε επανάληψης ξεχωριστά (1, 2 και 3). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης *BmTIF*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΜΙΑΣ ΙΪΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

3.2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΙΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΩΝ

3.2.1.1 Διερεύνηση του ρόλου του miRNA μονοπατιού στην αυτορρύθμιση του γονιδίου *VP1* του ιού BmCPV

Ένα από τα κύρια μονοπάτια του RNAi μηχανισμού στο μεταξοσκώληκα είναι το miRNA, ενώ όπως έχει προαναφερθεί, ο ρόλος των microRNAs σε σχέση με τους ιούς δύναται να είναι ισχυρά ρυθμιστικός και να επηρεάζει τα επίπεδα τους μέσα στον ξενιστή τους υπό τις κατάλληλες συνθήκες (§1.3.3.1). Στη παρούσα μελέτη, σκοπός ήταν να ελεγχθούν αλληλουχίες pre-microRNAs που είχαν προβλεφθεί μέσω εργαλείων Βιοπληροφορικής ως πιθανές δομές οι οποίες ενδέχεται να εκφράζονται από τον ιό BmCPV, να σχηματίζουν φουρκέτες μέσα στο μολυσμένο κύτταρο και με αυτό τον τρόπο να ελέγχουν τα επίπεδα του ιού.

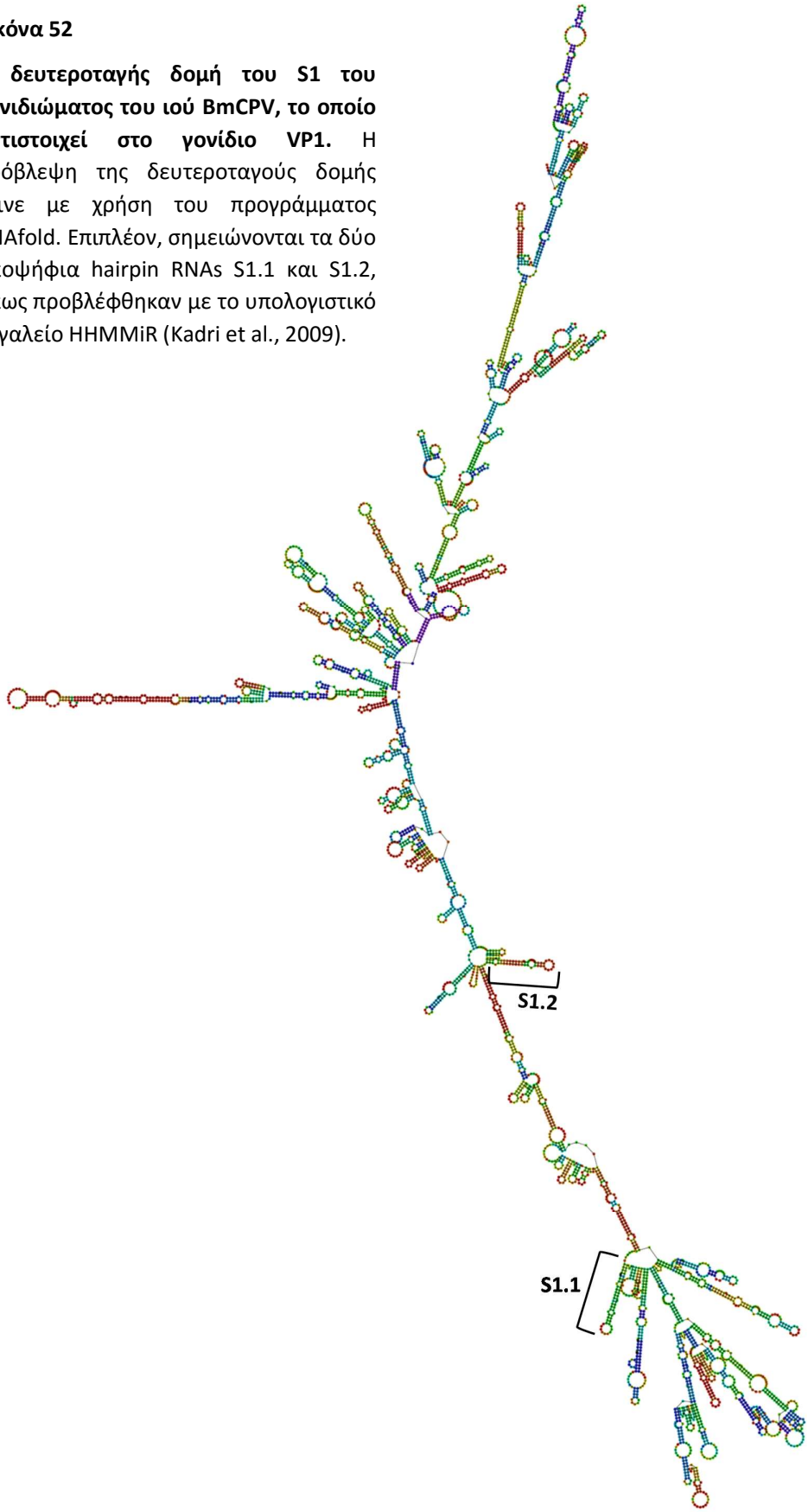
Δύο από τα προβλεπόμενα pre-microRNAs (S1.1 και S1.2) είχαν ως στόχο το τμήμα 1 (S1) του γονιδιώματος του ιού BmCPV, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1 του ιού (**Εικόνα 52**). Με σκοπό να διερευνήσουμε εάν κάποιο από τα προβλεπόμενα pre-miRNAs (hairpins) είναι πράγματι λειτουργικό, επιλέχθηκε να απομονωθεί και να κλωνοποιηθεί το pre-microRNA S1.2-WT (wild type, φυσικού τύπου) μήκους 70 βάσεων, το οποίο θεωρητικά προκύπτει από και ταυτόχρονα στοχεύει το γονίδιο της πρωτεΐνης VP1 του BmCPV. Παράλληλα, όπως περιγράφεται στην §2.2.2.5, σχεδιάστηκε και κλωνοποιήθηκε το pre-microRNA S1.2-MUT (mutant, μεταλλαγμένο) που αποτελεί μία παραλλαγή του S1.2-WT, η οποία έφερε πολλαπλές μεταλλαγές που θα επηρέαζαν τη δευτεροταγή δομή του έτσι ώστε να μην μπορεί να αναγνωριστεί από τα ένζυμα του miRNA μονοπατιού (**Εικόνες 53α και 53β**).

3.2.1.1.1 Έκφραση των pre-microRNAs που στοχεύουν τη VP1 μέσω του φορέα pEA-EYFP

Τα δύο pre-microRNAs κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pEA-EYFP έπειτα από το ένθεμα EYFP, έτσι ώστε η έκφραση του microRNA να μπορεί να πιστοποιηθεί με απλή παρατήρηση του εκλυόμενου φθορισμού σε λάμπα UV (υπεριώδους φωτός). Έτσι, ο φθορισμός θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μέσο κανονικοποίησης της πρωτεϊνικής έκφρασης στα επακόλουθα πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western της VP1. Εκτός από

Εικόνα 52

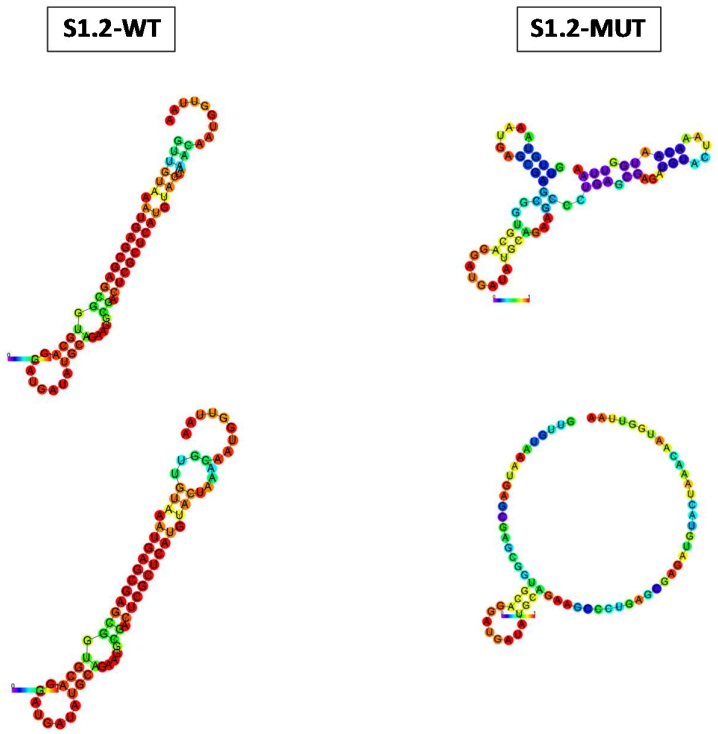
Η δευτεροταγής δομή του S1 του γονιδιώματος του ιού BmCPV, το οποίο αντιστοιχεί στο γονίδιο VP1. Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής έγινε με χρήση του προγράμματος RNAfold. Επιπλέον, σημειώνονται τα δύο υποψήφια hairpin RNAs S1.1 και S1.2, όπως προβλέφθηκαν με το υπολογιστικό εργαλείο HHMMiR (Kadri et al., 2009).



(α)

S1.2-WT: GUUGUAAAUGAGCGAGCGGUGCAGGAUGAUAUGCAGAAGGCGACUCGCUCAUGUACUAAACAAUGGUUAA
S1.2-MUT: GUUGUAAAUGAGCGAGCGGUGCAGGAUGAUAUGCAGAAGCCCUGAGCGAGAUGUACUAAACAAUGGUUAA

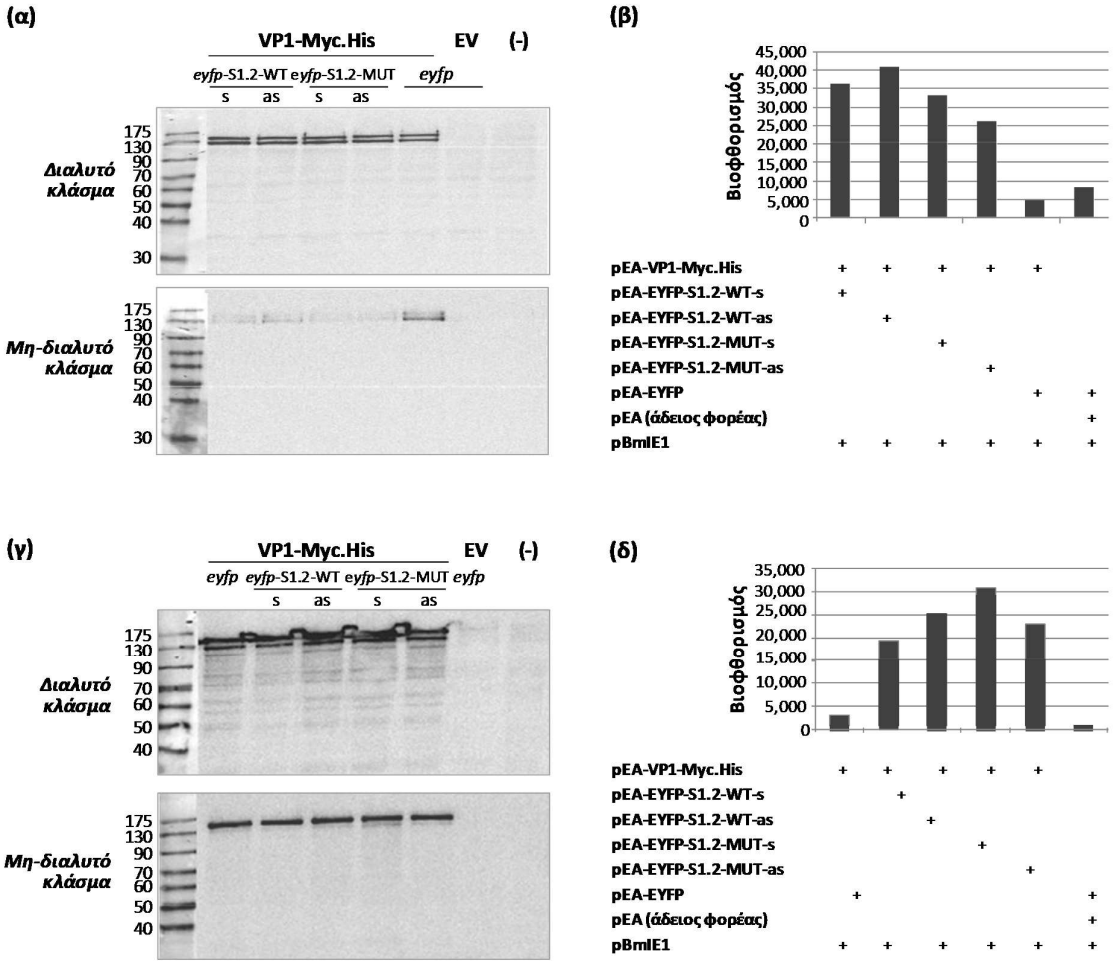
(β)



Εικόνα 53 Σχηματική αναπαράσταση των pre-microRNAs S1.2-WT και -MUT. (α) Η αλληλουχία του pre-microRNA S1.2-WT, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα του εργαλείου HHMMiR (Kadri et al., 2009). Με βάση την αλληλουχία του S1.2-WT, σχεδιάστηκε για χρήση του ως μάρτυρας το pre-microRNA S1.2-MUT, όπου με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι μεταλλαγές σε σχέση με το S1.2-WT. (β) Η δευτεροταγής δομή των pre-microRNAs S1.2-WT και -MUT, όπως προβλέπεται με χρήση του εργαλείου RNAfold. Όπως φαίνεται, δίνονται δύο πιθανές δομές για κάθε ένα pre-microRNA.

τον κωδικοποιό (sense) προσανατολισμό, κάθε ένα από τα ενθέματα S1.2-WT και S1.2-MUT κλωνοποιήθηκε και με τον μη-κωδικοποιό (antisense) προσανατολισμό, με σκοπό να επιτευχθεί από ένας αρνητικός μάρτυρας για κάθε hairpin RNA.

Στη συνέχεια, κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης pEA-VP1-Myc.His και το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1, σε συνδυασμό με το φορέα έκφρασης του εκάστοτε hairpin (pEA-EYFP-S1.2 hairpin). Ως μάρτυρας για τους φορείς των hairpins χρησιμοποιήθηκε ο pEA-EYFP και για το φορέα έκφρασης της VP1 ο κενός pEA. Τα δείγματα συλλέχθηκαν δύο ημέρες αργότερα, διαχωρίστηκαν σε διαλυτό και μη-διαλυτό



Εικόνα 54 Διερεύνηση του πιθανού ρόλου του miRNA μονοπατιού στη ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης VP1 του ιού BmCPV μέσω του προβλεπόμενου pre-miRNA S1.2 έπειτα από έκφρασή του μέσω του φορέα pEA-EYFP. (α) Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης Western της ικανότητας των pre-miRNAs S1.2 (WT και MUT), σε κωδικοποιό (sense) και μη-κωδικοποιό (antisense) προσανατολισμό, να ρυθμίζουν την έκφραση της VP1 σε κύτταρα Bm5. (β) Μέτρηση του βιοφθορισμού που παράχθηκε από τα κύτταρα Bm5 του (α). Τα (γ) και (δ) αντιπροσωπεύουν τους ίδιους χειρισμούς όπως τα (α) και (β) σε κύτταρα Hi5. (EV: empty vector, άδειος φορέας pEA).

πρωτεϊνικό κλάσμα, και αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων.

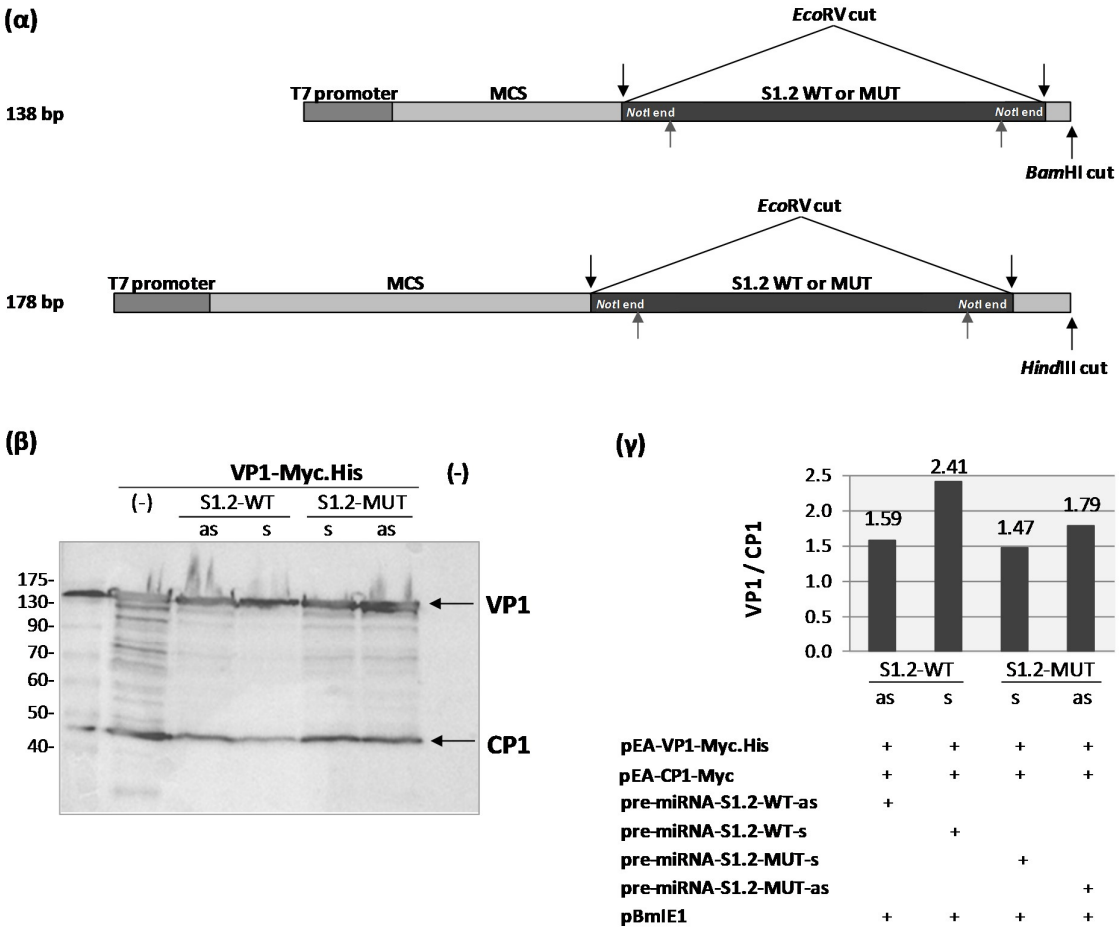
Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η VP1-Myc.His (152 kDa) εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα, χωρίς όμως να φαίνεται κάποια σημαντική επίδραση του S1.2-WT-sense hairpin στην έκφραση της ανασυνδυασμένης VP1 (**Εικόνες 54α και 54β**). Αναφορικά με το μη-διαλυτό κλάσμα, η VP1-Myc.His εκφράζεται σε χαμηλά

επίπεδα στα κύτταρα μάρτυρες που δεν εκφράζουν κάποια φουρκέτα, ωστόσο η έκφρασή της καταστέλλεται εντελώς σε όλους τους χειρισμούς που περιλαμβάνουν οποιαδήποτε φουρκέτα, φυσικού ή μεταλλαγμένου, κωδικοποιού ή μη τύπου. Συνεπώς, οποιαδήποτε επίδραση στη έκφραση της VP1-Myc.His δεν μπορεί να οφείλεται σε πιθανή στόχευση από την ειδικά σχεδιασμένη φουρκέτα. Επιπλέον, η χρήση του παραγόμενου βιοφθορισμού ως μέσου κανονικοποίησης δεν αποδείχθηκε ιδιαίτερα αξιόπιστη, καθώς τα δείγματα όπου εκφραζόταν οποιαδήποτε από τις φουρκέτες παρουσίαζαν πολύ υψηλά επίπεδα βιοφθορισμού, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα μάρτυρες όπου εκφραζόταν ο απλός pEA-EYFP έδιναν βιοφθορισμό κατά 3 έως 8 φορές χαμηλότερο. Τα ίδια πειράματα με παρόμοια αποτελέσματα επαναλήφθηκαν και σε κύτταρα Hi5, με τη μόνη διαφορά το εύρημα ότι η VP1-Myc.His εκφράζεται τόσο στο διαλυτό όσο και στο μη-διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα (**Εικόνες 54γ και 54δ**).

Τα ευρήματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα δεν έδειξαν να υπάρχει σημαντική επίδραση της προβλεπόμενης φουρκέτας S1.2 στη ρύθμιση της έκφρασης της VP1. Άλλωστε, όπως δείχθηκε, η μέθοδος για την κανονικοποίηση της έκφρασης της πρωτεΐνης μέσω βιοφθορισμού δεν κρίνεται ως αξιόπιστη, και άρα συμβάλλει στην αδυναμία εξαγωγής σαφών συμπερασμάτων ως προς το αρχικό ερώτημα. Συνεπώς, απαιτείται έκφραση των φουρκετών με άλλο τρόπο, ενδεχομένως, για να δώσει απάντηση στην ύπαρξη λειτουργικότητας ή μη της φουρκέτας S1.2-WT-sense.

3.2.1.1.2 *In vitro* σύνθεση των pre-microRNAs που στοχεύουν στην πρωτεΐνη VP1

Ένας δεύτερος τρόπος για να ελεγχθούν οι φουρκέτες S1.2-WT και S1.2-MUT είναι μετά από κλωνοποίηση του DNA τους στο φορέα pLitmus 38i. Έτσι, τα DNAs των φουρκετών κλωνοποιήθηκαν στη θέση *Eco*RV του pLitmus, ενώ οι φορείς που προέκυψαν αλληλουχήθηκαν και στη συνέχεια ευθυγραμμίστηκαν με χρήση των περιοριστικών ενζύμων *Bam*HI ή *Hind*III (**Εικόνα 55α**). Εν συνεχεία, αξιοποιώντας τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης που περιλαμβάνεται και στις δύο αλυσίδες του φορέα έγινε *in vitro* μεταγραφή του ενθέματος σε RNA με χρήση του ενζύμου T7 RNA πολυμεράση. Τα RNAs που προέκυψαν, λαμβάνοντας υπόψιν την αλληλουχία της θέσης πολλαπλής κλωνοποίησης που παρεμβάλλεται μεταξύ του υποκινητή T7 και του ενθέματος, είχαν μήκος 138 ή 178 βάσεις, προκειμένου για πέψη με το ένζυμο *Bam*HI ή



Εικόνα 55 Διερεύνηση του πιθανού ρόλου του miRNA μονοπατιού στη ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης VP1 του ιού BmCPV μέσω του προβλεπόμενου pre-miRNA S1.2 έπειτα από *in vitro* μεταγραφή του από το φορέα pLitmus 38i. (α) Σχηματική αναπαράσταση των κλωνοποιημένων pre-miRNAs S1.2 (WT και MUT) στο φορέα pLitmus 38i, τόσο σε κωδικοποιό (sense), όσο και σε μη-κωδικοποιό (antisense) προσανατολισμό. (β) Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης Western της ικανότητας των pre-miRNAs S1.2 (WT και MUT) που μεταγράφηκαν *in vitro* να ρυθμίζουν την έκφραση της VP1 σε κύτταρα Hi5. (γ) Η κανονικοποιημένη έκφραση της πρωτεΐνης VP1 σε σχέση με την πρωτεΐνη αναφοράς CP1 του ιού FHV.

το *Hind*III αντίστοιχα. Μετά τη σύνθεση, η συγκέντρωσή τους εκτιμήθηκε με τη βοήθεια πηκτής αγαρόζης και σύγκρισης με μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης.

Ακολούθως, κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-VP1-Myc.His, το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 και την εκάστοτε φουρκέτα σε υψηλή συγκέντρωση (200 nM). Επιπρόσθετα, για την κανονικοποίηση της έκφρασης της VP1, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με το φορέα κανονικοποίησης pEA-FHV-CP1-Myc, ο οποίος εκφράζει την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού FHV (44 kDa). Έπειτα από τρεις ημέρες, τα κύτταρα

συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης Western ως ολικά εκχυλίσματα κυττάρων.

Η έκφραση της ανασυνδυασμένης VP1, κανονικοποιημένης ως προς την CP1-Myc, φάνηκε να επηρεάζεται θετικά από την προσθήκη της φουρκέτας S1.2-WT-sense, καθώς αυτή εμφανίστηκε αυξημένη κατά 64% σε σχέση με την έκφραση παρουσία της φουρκέτας S1.2-MUT-sense (**Εικόνες 55β και 55γ**). Τα παραπάνω ευρήματα έδειξαν ότι η προβλεπόμενη φουρκέτα δε φαίνεται να μειώνει την έκφραση της VP1, ωστόσο μπορεί, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, να αυξάνει την έκφραση αυτής και άρα μπορεί εν δυνάμει να λειτουργεί ρυθμιστικά ως προς τα επίπεδα του ιού BmCPV. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, με σαφέστερες απεικονιστικές μεθόδους (π.χ. Northern blot) και τεχνικές (π.χ. deep sequencing), για να αποδειχθεί άμεσα η επεξεργασία των φουρκετών από τον κυτταρικό μηχανισμό των miRNAs.

3.2.1.2 Μελέτη της επίδρασης των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα στην ανάπτυξη του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-EYFP

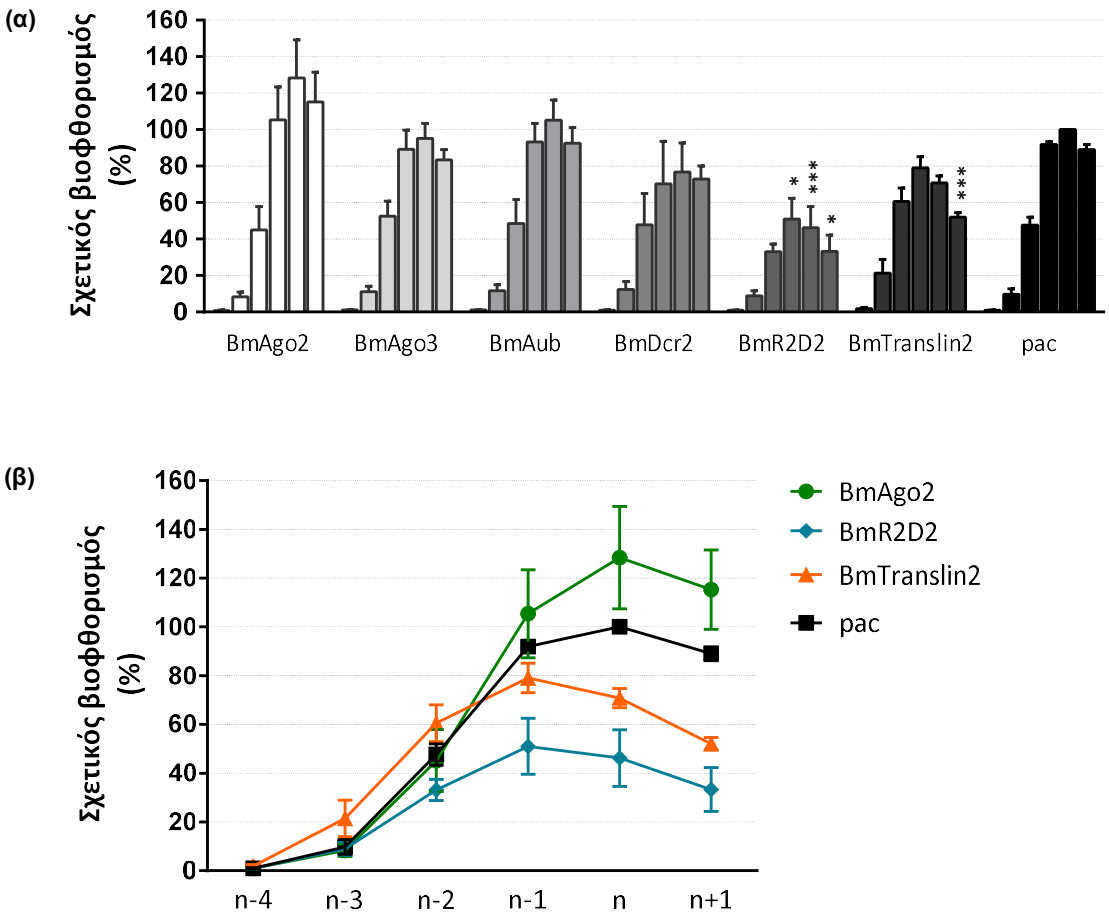
Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ο RNAi μηχανισμός, μέσω των τριών κύριων μονοπατιών που έχουν χαρακτηριστεί εκτεταμένα, εμπλέκεται στην απόκριση των εντόμων σε μία ιϊκή μόλυνση (Gammon and Mello, 2015). Έτσι, έχει βρεθεί ότι το siRNA, το miRNA και το piRNA μονοπάτι οδηγούν στην παραγωγή μικρών RNAs που είτε καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του ιού, είτε λειτουργούν ρυθμιστικά στην έκφραση των γονιδίων του ανάλογα με το στάδιο του κύκλου του. Όπως περιγράφηκε στην §1.3.3, υπάρχουν αναφορές που πραγματεύονται το θέμα της αντιϊκής απόκρισης μέσω RNAi στα Λεπιδόπτερα (Chen et al., 2014b; Jayachandran et al., 2012; Mehrabadi et al., 2013; Wu et al., 2013). Έτσι, στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, κρίθηκε σκόπιμο να εμβαθύνουμε περαιτέρω στον πιθανό αντιϊκό ρόλο ορισμένων παραγόντων του RNAi μηχανισμού που προέρχονται από το μεταξοσκώληκα και παράλληλα θεωρούνται ως βασικοί συντελεστές των προαναφερθέντων μονοπατιών στα έντομα εν γένει (όπως π.χ. στη *Drosophila* και τα κουνούπια).

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια του RNAi μηχανισμού των κυττάρων Sf21 που προέρχονται από το Λεπιδόπτερο έντομο *Spodoptera frugiperda* και βρέθηκε ότι παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά ομολογίας με αυτά του *B. mori* (Ghosh et al., 2014).

Επιπλέον, κατά τη μόλυνση κυττάρων Λεπιδοπτέρων (*Trichoplusia ni*) με τον μπακουλοϊό AcMNPV παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα των γονιδίων *Ago2* και *Dcr2*, και αντίστοιχα αύξηση στα επίπεδα των *R3D1 (Loqs)*, *R2D2* και *Ago3*, σηματοδοτώντας έτσι έναν κρίσιμο ρόλο για τα γονίδια αυτά στην εν λόγω μόλυνση (Chen et al., 2014b). Ο ιός AcMNPV είναι ένας από τους καλύτερα μελετημένους ιούς που αφορούν στα Λεπιδόπτερα, ο οποίος όμως δε μολύνει τα κύτταρα Bm5 του μεταξοσκώληκα, αλλά αναπτύσσεται φυσιολογικά στα κύτταρα Sf21 και Hi5. Συνεπώς, επιλέχθηκε να μελετηθεί η επίδραση των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα στη μόλυνση με τον ανασυνδυασμένο ιό AcMNPV-EYFP στο σύστημα των κυττάρων Sf21.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε αρχικά ετερόλογη υπερέκφραση των RNAi παραγόντων του *B. mori* σε κύτταρα Sf21, ταυτόχρονα με διαμόλυνση με το γονιδίωμα του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-EYFP. Χρησιμοποιώντας αυτό το σύστημα, στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα στην ανάπτυξη του φθορίζοντος ιού και άρα να προσδιοριστεί ο πιθανός αντιϊκός τους ρόλος. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες (500 ng) από το γονιδίωμα του ιού AcMNPV-EYFP και του εκάστοτε φορέα έκφρασης (pEA) του επιθυμητού RNAi γονιδίου. Τα γονίδια που ελέγχθηκαν ήταν τα *BmAgo2*, *BmAgo3*, *BmAub*, *BmDcr2*, *BmR2D2* και *BmTranslin2*, ενώ ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη *pac*. Τα κύτταρα Sf21 καλλιεργήθηκαν για 7-8 ημέρες, ενώ λαμβάνονταν μετρήσεις του εκλυόμενου βιοφθορισμού καθημερινά. Όλες οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν ως προς τη μέγιστη μέτρηση βιοφθορισμού που αντιστοιχούσε στο γονίδιο μάρτυρα *pac* (και ορίστηκε ως ημέρα «n») και υπολογίστηκαν ως % ποσοστό αυτής, ενώ όλοι οι χειρισμοί επαναλήφθηκαν τέσσερις ανεξάρτητες φορές (**Εικόνα 56α**).

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα μέγιστα επίπεδα βιοφθορισμού, που μεταφράζονται σε μέγιστα επίπεδα ιϊκών αντιγράφων, παρατηρήθηκαν κυρίως μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας μετά τη διαμόλυνση. Μεταξύ όλων των παραγόντων που ελέγχθηκαν, η πρωτεΐνη BmR2D2 φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του ιού σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα σε σχέση με το μάρτυρα pac κατά τις ημέρες n-1 (-51%), n (-46%) και n+1 (-33%), ενώ το ίδιο ισχύει για την BmTranslin2 κατά την ημέρα n-1 (-52%) (**Εικόνες 56α και 56β**). Η παρεμπόδιση της ιϊκής ανάπτυξης αντικατοπτρίζεται επίσης στην ημέρα κατά την οποία καταγράφεται η κορυφή της καμπύλης της, καθώς τα



Εικόνα 56 Η ανάπτυξη του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-EYFP έπειτα από υπερέκφραση ορισμένων RNAi παραγόντων του *B. mori* σε κύτταρα Sf21. (α) Η μεταβολή της καμπύλης ανάπτυξης του AcMNPV-EYFP σε συνάρτηση με την υπερέκφραση βασικών RNAi παραγόντων από τη μέρα n-4 έως τη n+1, όπου το n αντιστοιχεί στη μέρα του μέγιστου βιοφθορισμού για το μάρτυρα PAC. (β) Συγκριτική παρουσίαση της μεταβολής της καμπύλης ανάπτυξης του AcMNPV-EYFP σε συνάρτηση με την υπερέκφραση των πρωτεϊνών που επέδειξαν σημαντικές στατιστικές διαφορές σε σχέση με το pac (BmR2D2 και BmTranslin2), και των πρωτεϊνών μαρτύρων pac και BmAgo2. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν από 4 ανεξάρτητες επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη σύγκριση του μέσου όρου κάθε χειρισμού με το μέσο όρο του μάρτυρα pac (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$).

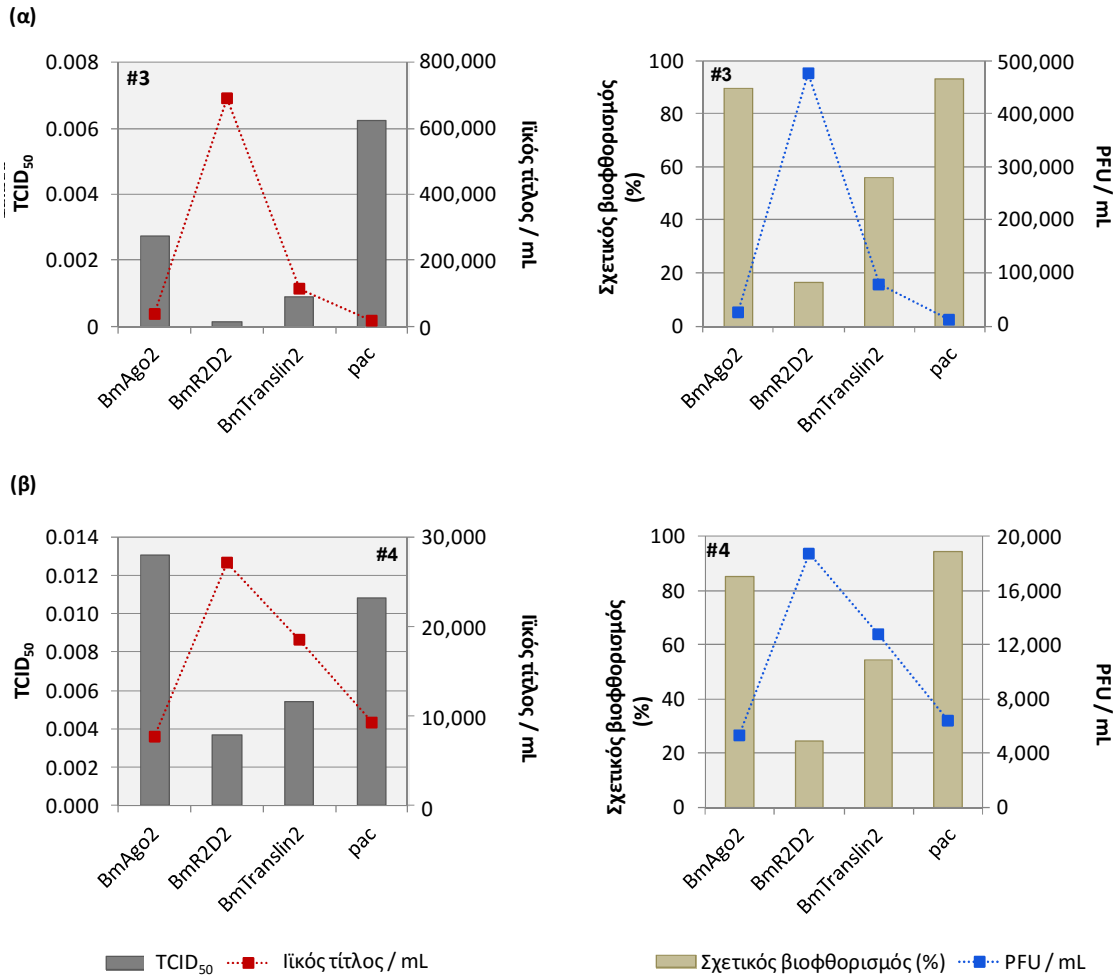
μέγιστα επίπεδα του ιού στα κύτταρα όπου υπερεκφράζονταν οι BmR2D2 και BmTranslin2 παρατηρούνταν σε όλες τις επαναλήψεις μία ημέρα νωρίτερα (n-1) σε σχέση με το μάρτυρα και γενικότερα με τους υπόλοιπους RNAi παράγοντες. Συνεπώς, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες BmR2D2 και BmTranslin2 εμπλέκονται ενεργά στην

αντιμετώπιση ενός DNA ιού, όπως είναι ο AcMNPV-EYFP, και αναστέλλουν την ανάπτυξή του σε σημαντικό βαθμό.

Στη συνέχεια, για να υπολογιστεί η ποσότητα του παραγόμενου ιού στα δείγματα που αναλύθηκαν, έγινε προσδιορισμός του τίτλου του ιού με χρήση της μεθόδου Reed-Müench (Reed and Muench, 1938). Έτσι, κατά την 8^{η} ημέρα μετά τη διαμόλυνση, συλλέχθηκαν υπερκείμενα από κύτταρα Sf21 που αντιπροσώπευαν τους χειρισμούς με τους παράγοντες BmR2D2, BmTranslin2, pac (1^{ος} μάρτυρας) και BmAgo2 (2^{ος} μάρτυρας). Τα υπερκείμενα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} έως 10^{-6}) για να μολύνουν υγιή κύτταρα Sf21 σε πλάκες των 96-μικροβοθρίων, όπου σε κάθε αραίωση αντιστοιχούσαν 10 μικροβοθρία. Η εξέλιξη της μόλυνσης των κυττάρων παρακολουθήθηκε για 10 ημέρες, όπου και προσδιορίστηκε ο τίτλος του αρχικού υπερκειμένου που περιείχε τον ιό. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν λαμβάνοντας υπόψιν διαφορές στον όγκο του αρχικού μολύσματος (υπερκειμένου) και κανονικοποιήθηκαν ως προς το πυκνότερο.

Από την ανάλυση, που αφορούσε τις δύο τελευταίες από τις τέσσερις επαναλήψεις, υπολογίστηκε η μέση λοιμογόνος δόση του ιού για την κυτταροκαλλιέργεια (tissue culture infectious dose, $TCID_{50}$), ο τίτλος του ιϊκού φορτίου ανά mL (virus titer/mL), και οι μονάδες σχηματισμού πλάκας ανά mL (plaque forming units, PFU/mL) (**Εικόνες 57α και 57β**). Τα αποτελέσματα έδειξαν κατά αύξουσα σειρά τους εξής ιϊκούς τίτλους εκφρασμένους ως PFU/mL για κάθε ένα από τα δείγματα στην 3^{η} και την 4^{η} επανάληψη: pac (1.28×10^4 και 6.37×10^3), BmAgo2 (2.52×10^4 και 5.29×10^3), BmTranslin2 (7.77×10^4 και 1.28×10^4) και BmR2D2 (4.76×10^5 και 1.87×10^4). Από τους υπολογισμούς, είναι φανερό ότι το ιϊκό φορτίο του χειρισμού BmR2D2 είναι υψηλότερο (3 έως 43 φορές) σε σχέση με το μάρτυρα pac, ενώ παρόμοια είναι τα αποτελέσματα για το χειρισμό BmTranslin2 (2 έως 7 φορές). Αντίθετα, ο επιπλέον μάρτυρας BmAgo2 παρουσιάζει όμοια έως 2 φορές υψηλότερα επίπεδα ιϊκού φορτίου σε σχέση με τον pac.

Παρά την απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου χειρισμού στην 3^{η} και 4^{η} επανάληψη σε επίπεδο τάξης μεγέθους, είναι φανερό ότι το ιϊκό φορτίο παρουσιάζεται αντιστρόφως ανάλογο του παρατηρούμενου βιοφθορισμού των αντίστοιχων κυττάρων που συζητήθηκε νωρίτερα (**Εικόνα 57**). Έτσι, φαίνεται ότι στα δείγματα με υψηλό βιοφθορισμό (BmAgo2 και pac) ο ιός υπάρχει σε αφθονία στα κύτταρα, αλλά δεν ισχύει



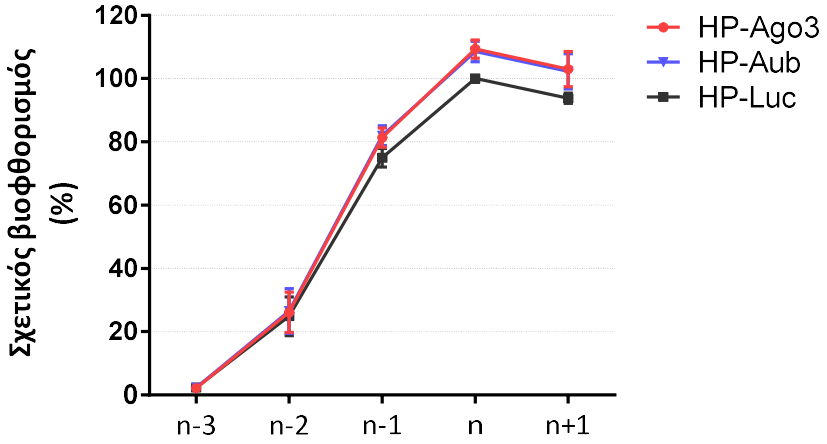
Εικόνα 57 Υπολογισμός παραμέτρων που σχετίζονται με την ιϊκή ανάπτυξη σύμφωνα με τη μέθοδο Reed-Müench (Reed and Muench, 1938). Κύτταρα Sf21 μολύνθηκαν με τον ιό AcMNPV-EYFP μέσω διαδοχικών αραιώσεων των υπερκειμένων που συλλέχθηκαν από τα μολυσμένα κύτταρα της Εικόνας 56β κατά τη μέρα n+2. Έπειτα από παρατήρηση της μόλυνσης των νέων κυττάρων Sf21, προσδιορίστηκε η τιμή $TCID_{50}$, ο ιϊκός τίτλος ανά mL, ο σχετικός βιοφθορισμός (%) και η τιμή PFU/mL. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν υπερκείμενα από (α) την 3η και (β) την 4η πειραματική επανάληψη της Εικόνας 56β.

το ίδιο για το εξωκυττάριο μέσο. Αντίθετα, στα δείγματα με χαμηλά επίπεδα βιοφθορισμού (BmR2D2 και BmTranslin2) ο φθορίζων ιός δεν αφθονεί εντός των κυττάρων, όμως το κυτταρικό υπερκείμενο είναι πυκνό σε ιϊκό φορτίο. Ενδέχεται λοιπόν ο ιός να απελευθερώνεται από τα μολυσμένα κύτταρα στο εξωκυττάριο μέσο πιο σύντομα απ' ό,τι συμβαίνει στα κύτταρα μάρτυρες. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η εξέλιξη της καμπύλης ανάπτυξης του ιού είναι πιο σύντομη στους

χειρισμούς BmR2D2 και BmTranslin2, και συνεπώς το προβάδισμα αυτό ίσως να αντικατοπτρίζει τον ιό που υπάρχει στο υπερκείμενο των κυττάρων.

Ακολούθως, για να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των γονιδίων *Ago3* και *Aub* σε μονοπάτια αντιϊκής προστασίας στα Λεπιδόπτερα (όπως έχει ήδη περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 3.1.3.2), κρίθηκε χρήσιμο να πραγματοποιηθεί στα κύτταρα Sf21 ετερόλογη υπερέκφραση των φουρκετών που στοχεύουν στα γονίδια *Ago3* και *Aub* του piRNA μονοπατιού, οι οποίες έχουν σχεδιαστεί για τον *B. mori*, με ταυτόχρονη διαμόλυνση με το γονιδίωμα του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-EYFP. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι επειδή οι αλληλουχίες των φουρκετών σχεδιάστηκαν για την αποσιώπηση των γονιδίων του *B. mori*, χρειάστηκε να διευρευνηθεί εάν οι συγκεκριμένες φουρκέτες μπορούν να είναι λειτουργικές και στο *S. frugiperda*. Για το σκοπό αυτό, αναζητήθηκε η ομολογία των στοχευόμενων γονιδίων μεταξύ των δύο οργανισμών.

Αναφορικά με το *SfAgo3*, προς το παρόν, η αλληλουχία του δεν είναι καταχωρημένη στη GenBank. Ωστόσο, σε πρόσφατο άρθρο αναφέρεται ότι οι αλληλουχίες του γονιδίου *Ago3* των *B. mori* και *S. frugiperda* παρουσιάζουν κατά 69% ταυτότητα (identity) μεταξύ των δύο οργανισμών (Ghosh et al., 2014). Παράλληλα, με τη βοήθεια του αλγορίθμου TBLASTN στις βάσεις δεδομένων NCBI (ESTs) και SPODOBASE, και χρησιμοποιώντας τις γνωστές γονιδιακές αλληλουχίες του *Ago3* από το *B. mori* (BAF98575.1), το *T. castaneum* (XP_968053.2) και τη *D. melanogaster* (ABO27430.1), βρέθηκε ότι η περιοχή του γονιδίου που στοχεύεται από τη φουρκέτα παρουσιάζει κατά 59% ομολογία με το είδος *S. frugiperda*. Στην περίπτωση του *SfAub*, η αναζήτηση του ποσοστού ομολογίας ανάμεσα στα διαφορετικά είδη Λεπιδοπτέρων ήταν πιο εύκολη, καθώς αυτό το γονίδιο πρόσφατα καταχωρήθηκε στη GenBank (AGS40930.1). Έτσι, σε πρόσφατο άρθρο αναφέρεται 69% ομολογία με το γονίδιο *BmAub* του μεταξοσκώληκα (Ghosh et al., 2014), ενώ από την ανάλυση με βάση την αλληλουχία της ειδικά σχεδιασμένης φουρκέτας η ομολογία φτάνει το 66%. Αν και από τον έλεγχο της ομολογίας για τα δύο γονίδια δεν εντοπίστηκαν αλληλουχίες μήκους 19-21 νουκλεοτιδίων χωρίς αναντιστοιχίες (mismatches), εντούτοις πιθανώς μέσω επεξεργασίας τους από το μονοπάτι miRNA να είναι δυνατή η αξιοποίησή τους από το κύτταρο προς αποσιώπηση των στόχων *Ago3* και *Aub*. Συνεπώς, κρίθηκε ότι οι δύο φουρκέτες θα μπορούσαν να αποδειχθούν, έστω μερικώς, λειτουργικές και για τα κύτταρα Sf21.



Εικόνα 58 Η ανάπτυξη του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-EYFP έπειτα από υπερέκφραση φουρκετών έναντι γονιδίων του piRNA μονοπατιού του *B. mori* σε κύτταρα Sf21. Η μεταβολή της καμπύλης ανάπτυξης του AcMNPV-EYFP σε συνάρτηση με την υπερέκφραση φουρκετών έναντι των γονιδίων *Ago3* και *Aub* του *B. mori* από την ημέρα n-3 έως τη n+1, όπου το n αντιστοιχεί στην ημέρα του μέγιστου βιοφθορισμού για τον μάρτυρα HP-Luc. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν από 4 ανεξάρτητες επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση που αφορούσε στη σύγκριση του μέσου όρου κάθε χειρισμού με το μέσο όρο του μάρτυρα δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Με τη βοήθεια του συστήματος συνδιαμόλυνσης bacmid AcMNPV-EYFP και φορέα υπερέκφρασης piRNA φουρκέτας, θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση των piRNA γονιδίων του μεταξοσκώληκα στην ανάπτυξη του φθορίζοντος DNA ιού, ούτως ώστε να συλλεχθούν περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τον πιθανό ρόλο τους στην αντιϊκή προστασία. Οι διαμολύνσεις, οι μετρήσεις και οι υπολογισμοί έγιναν όπως έχει ήδη περιγραφεί για 4 επαναλήψεις, και οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pEA-HP-Ago3, pEA-HP-Aub και pEA-HP-Luc (φορέας μάρτυρας).

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα μέγιστα επίπεδα βιοφθορισμού παρατηρήθηκαν μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας μετά τη διαμόλυνση (**Εικόνα 58**), όπως και στην **Εικόνα 56**. Όσον αφορά στους χειρισμούς που περιελάμβαναν τις φουρκέτες HP-Ago3 και HP-Luc παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 8-10% στα επίπεδα βιοφθορισμού κατά τις ημέρες n-1 έως n+1 σε σχέση με το μάρτυρα HP-Luc, η οποία ωστόσο δεν χαρακτηρίζεται ως στατιστικά σημαντική διαφορά έπειτα από στατιστική ανάλυση. Ωστόσο, η παρατηρούμενη αύξηση στο βιοφθορισμό των διαμολυσμένων με AcMNPV-EYFP κυττάρων Sf21 δε μπορεί να παραβλεφθεί, καθώς αντικατοπτρίζει μία σταθερά μικρή αύξηση της ανάπτυξης του ιού, η οποία πιθανώς οφείλεται στην

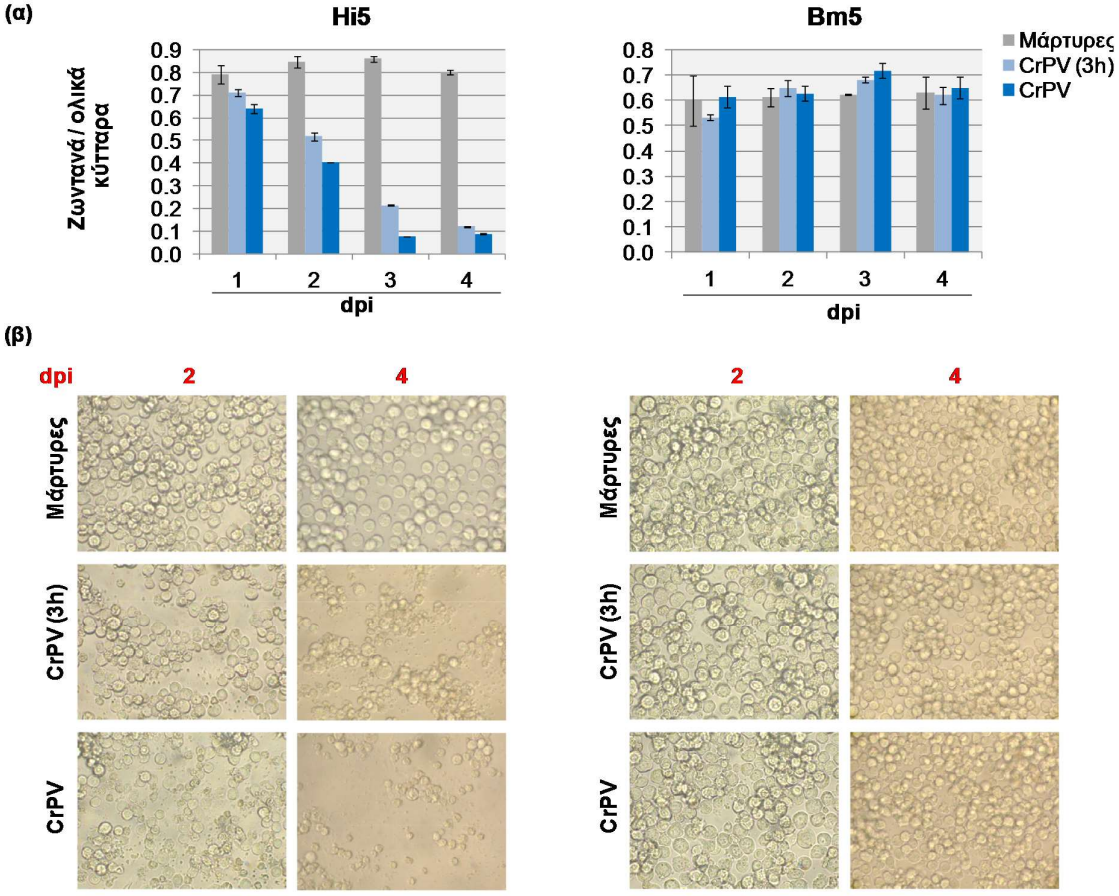
αποσιώπηση των piRNA γονιδίων λόγω υπερέκφρασης των ειδικών φουρκετών HP-Ago3 και HP-Aub.

Συνεπώς, από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι τα δύο βασικά piRNA γονίδια, *Ago3* και *Aub*, πιθανώς εμπλέκονται σε διαδικασίες που προστατεύουν τα κύτταρα των Λεπιδοπτέρων από μία ιϊκή προσβολή, καθώς η αποσιώπησή τους προκαλεί αύξηση της ανάπτυξης του ανασυνδυασμένου DNA ιού AcMNPV-EYFP. Βέβαια, όπως ήδη αναφέρθηκε, η αντίστοιχη υπερέκφραση αυτών των παραγόντων του μεταξοσκώληκα στα κύτταρα Sf21 δεν επηρέασε σημαντικά τα επίπεδα του ίδιου ιού. Άρα, φαίνεται ότι η εμπλοκή τους στην αντιϊκή προστασία επηρεάζεται και από άλλους άγνωστους παράγοντες, και συνεπώς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ενδεχομένως δοκιμάζοντας σε άλλα κύτταρα Λεπιδοπτέρων και άλλους DNA ή RNA ιούς.

3.2.1.3 Δοκιμή μόλυνσης με τον ιό Cricket Paralysis Virus (CrPV)

Σύμφωνα με προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου μας, ο ιός CrPV της οικογένειας *Dicistroviridae* μπορεί να μολύνει κύτταρα Λεπιδοπτέρων (Hi5) και να προκαλεί τελικά το θάνατό τους. Ωστόσο, στο πλαίσιο αυτών των πειραμάτων βρέθηκε ότι η υπερέκφραση των παραγόντων *BmAgo2* και *BmR2D2* του μεταξοσκώληκα μπορεί να καθυστερήσει αυτή τους την πορεία προς το θάνατο για έως και τρεις ημέρες μετά τη μόλυνση (Wynant N., αδημοσίευτα δεδομένα). Όσον αφορά δε στο μεταξοσκώληκα, δεν είναι γνωστή η επίδραση του ιού CrPV στα κύτταρά του.

Με στόχο να μελετηθεί σε πρώτη φάση η μολυσματικότητα του CrPV, ώστε στη συνέχεια να διερευνηθεί η επίδραση των παραγόντων του RNAi μηχανισμού του μεταξοσκώληκα στην ανάπτυξη του ιού και την επιβίωση των κυττάρων, επιλέχθηκαν τα κύτταρα Bm5. Η επιλογή της ποσότητας του ιού που αντιστοιχεί σε κάθε κύτταρο έγινε με βάση τα δεδομένα που έχουν συλλεγεί για τα συγγενή κύτταρα Λεπιδοπτέρων Hi5. Έτσι, τα κύτταρα μολύνθηκαν προσθέτοντας τον ιό CrPV στο θρεπτικό μέσο με αναλογία ενός ιϊκού σωματίου ανά κύτταρο. Μετά την προσθήκη του ιού, τα κύτταρα είτε αφέθηκαν να αναπτυχθούν ως είχαν, είτε μετά από 3 ώρες αφαιρέθηκε το μολυσμένο υπερκείμενο και προστέθηκε νέο στείρο θρεπτικό μέσο. Παράλληλα με τη μόλυνση των Bm5 κυττάρων, ως θετικοί μάρτυρες της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα Hi5,



Εικόνα 59 Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων Λεπιδοπτέρων έπειτα από μόλυνση με τον ιό CrPV. Κύτταρα Hi5 και Bm5 μολύνθηκαν με τον ιό CrPV σε αναλογία 1 ιϊκού σωματίου ανά κύτταρο, και στη συνέχεια τα κύτταρα είτε αφέθηκαν απλώς να αναπτυχθούν (CrPV), είτε μετά από 3 ώρες αντικαταστάθηκε το μολυσμένο με στείρο θρεπτικό μέσο (CrPV (3h)). (α) Ο λόγος ζωντανών κυττάρων προς ολικά όπως υπολογίστηκε έπειτα από χρώση με trypan blue, για 4 διαδοχικές ημέρες μετά τη μόλυνση. (β) Η εικόνα των μολυσμένων με τον ιό CrPV κυττάρων έπειτα από 2 και 4 ημέρες μετά τη μόλυνση (dpi: days post infection). Οι μάρτυρες αντιστοιχούν σε κύτταρα που δε μολύνθηκαν. (Συντελεστής μεγέθυνσης: 20x).

για τα οποία ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία για μέχρι και 96 ώρες μετά τη μόλυνση.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ζωντανών και νεκρών κυττάρων έδειξαν ότι τα κύτταρα Bm5 δεν επηρεάζονται από τη μόλυνση με τον ιό CrPV. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε καμιά σημαντική διαφορά στους αριθμούς ζωντανών κυττάρων μεταξύ των αρνητικών μαρτύρων Bm5 (μη-μολυσμένα) και των δύο κατηγοριών μολυσμένων κυττάρων (**Εικόνα 59α**). Αντίθετα, οι θετικοί μάρτυρες, δηλαδή τα κύτταρα Hi5, παρουσίασαν ραγδαία σημεία μόλυνσης ήδη από την πρώτη ημέρα μετά την προσθήκη

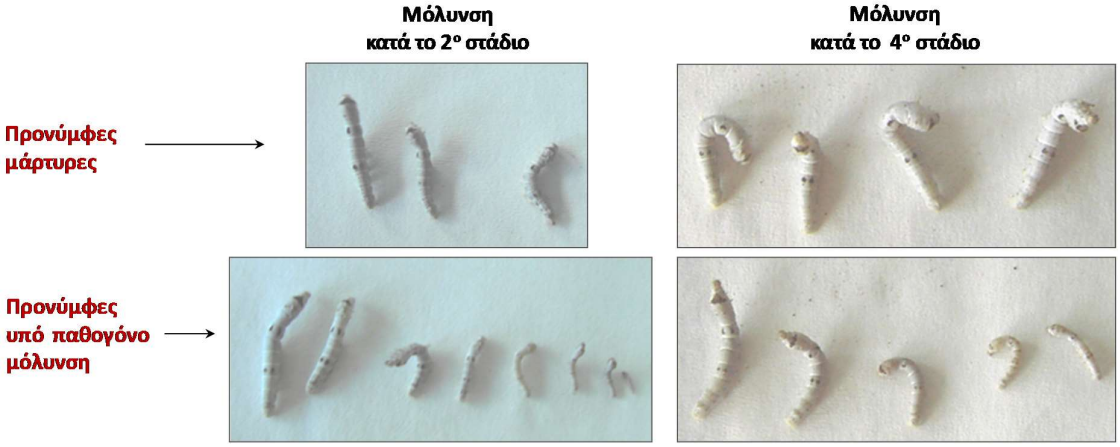
του ιού CrPV, και επίσης αυτό παρατηρήθηκε και στην κατηγορία όπου η παρουσία του ιού στο κυτταρικό μέσο διήρκεσε μόλις 3 ώρες. Άλλωστε, 96 ώρες μετά τη μόλυνση, τα επίπεδα των ζωντανών κυττάρων πλησίαζαν στο μηδέν.

Παράλληλα με την καταμέτρηση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε και μικροσκοπική παρατήρησή τους. Έτσι, σε μικροσκοπικό επίπεδο, δείχθηκε ότι τα κύτταρα Bm5 δε φαίνεται να προσβάλλονται από τον CrPV, καθώς δεν υπήρξε κάποια αλλοίωση στη γενική εικόνα των μολυσμένων κυττάρων, ενώ επίσης δε διέφεραν από τα υγιή (μη-μολυσμένα) κύτταρα Bm5 (**Εικόνα 59β**). Σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα μεταξοσκώληκα, τα κύτταρα του *T. ni* (Hi5) εμφανίστηκαν να επηρεάζονται σημαντικά από τη μόλυνση, καθώς ήταν σαφώς λιγότερα λόγω του ραγδαίου ρυθμού θνησιμότητας, αλλά ακόμη εξαιτίας της όψης τους που διέφερε κατά πολύ από τα μη-μολυσμένα. Ειδικότερα, τα μολυσμένα κύτταρα εμφανίζονται είτε διογκωμένα, είτε με ανωμαλίες στη δομή της κυτταρικής τους μεμβράνης, ενώ τα μικροβοθρία βρίθουν λυμμένων και άρα νεκρών κυττάρων. Συνεπώς, όπως προκύπτει, τα κύτταρα Bm5 δεν κρίνονται κατάλληλα για συνέχιση των πειραμάτων που αφορούν στη μελέτη της επίδρασης των RNAi παραγόντων στη βιωσιμότητά τους έπειτα από μία ιϊκή μόλυνση, όπως αυτή του CrPV.

3.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA ΣΤΟ ΜΕΣΕΝΤΕΡΟ ΤΟΥ *B. mori* ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ BmCPV

Η ύπαρξη ιϊκών μολύνσεων υπό εμμένουσα μορφή είναι ένα φαινόμενο διαδεδομένο ανάμεσα στους οργανισμούς. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία για την επίδραση που μπορεί να έχει μία παθογόνος (οξεία) ιϊκή μόλυνση σε έναν οργανισμό που ήδη είναι φορέας μίας εμμένουσας μόλυνση από κάποιον άλλον ιό (βλ. §1.3.1). Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα αναφορικά με την περίπτωση ταυτόχρονης μόλυνσης υπό εμμένουσα και παθογόνο μορφή με τον ίδιο παθογόνο ιό.

Με σκοπό τη μελέτη αυτού του φαινομένου, αξιοποιήθηκε το στέλεχος Daizo του μεταξοσκώληκα *B. mori*, το οποίο υπάρχει στο εργαστήριό μας και φέρει εμμένουσα μόλυνση από τον dsRNA ιό BmCPV. Τα ζώα αυτά επαναμολύνθηκαν με τον ίδιο ιό στο εργαστήριο τεχνητά, και έτσι, έγινε μελέτη εκ παραλλήλου ζώων υπό εμμένουσα και υπό παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV, ώστε να διερευνήσουμε τη μεταγραφική απόκριση του *B. mori* στη μόλυνση με τον ιό αυτό. Στη μελέτη αυτή ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στον τρόπο που ανταποκρίθηκε ο ενδογενής RNAi μηχανισμός και ο μηχανισμός της φυσικής ανοσίας του εντόμου, ενώ επιπλέον μελετήθηκαν πιθανές μεταβολές στην



Εικόνα 60 Προνύμφες *B. mori* που μολύνθηκαν με τον ιό BmCPV. Οι προνύμφες του στελέχους Daizo μολύνθηκαν μέσω της τροφής με πολύεδρα του ιού BmCPV κατά την έναρξη του 2ου ή του 4ου προνυμφικού σταδίου. Οι προνύμφες μάρτυρες ακολούθησαν διατροφή ελεύθερη του ιού BmCPV. Εδώ, απεικονίζονται προνύμφες 20 και 14 ημέρες μετά τη μόλυνση, για μολύνσεις που έλαβαν χώρα κατά το 2ο ή το 4ο στάδιο, αντίστοιχα. Όπως αποδεικνύεται στη συνέχεια, τα ζώα μάρτυρες βρίσκονταν ήδη σε εμμένουσα μόλυνση με τον ιό BmCPV.

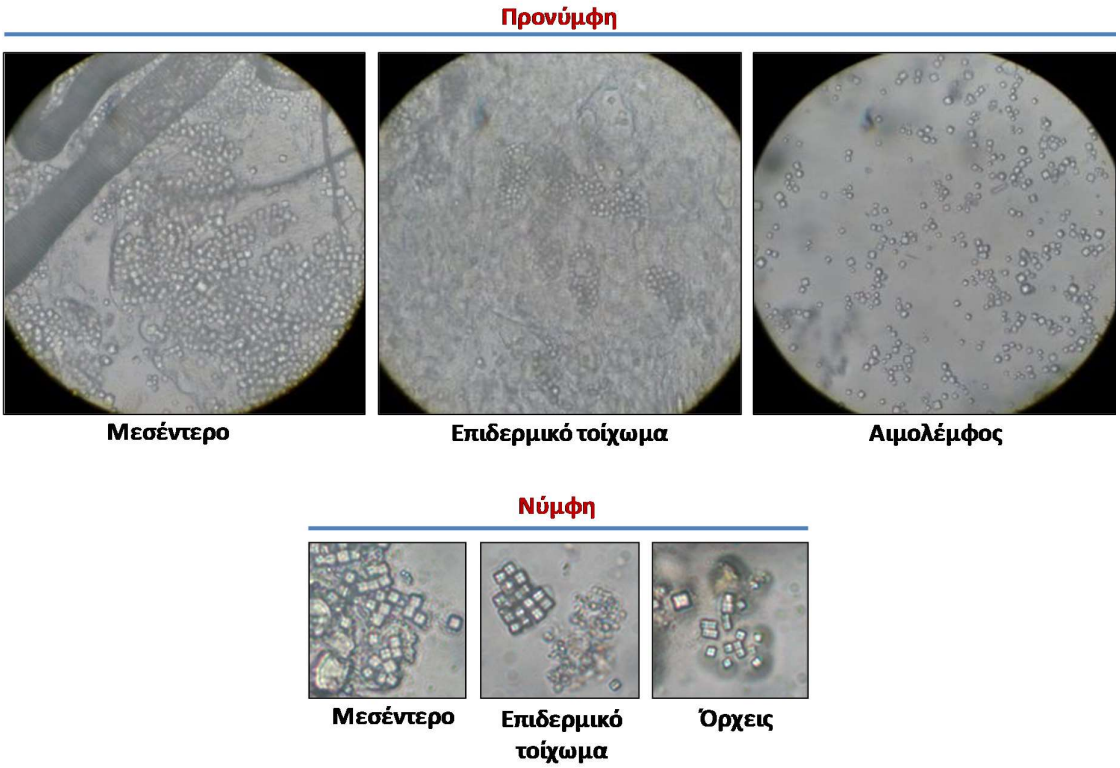
έκφραση γονιδίων που μέχρι τώρα δεν έχει ταυτοποιηθεί σαφώς ο ρόλος τους σε περίπτωση μόλυνσης, είτε από τον ιό BmCPV, είτε από κάποιον άλλο μολυσματικό παράγοντα.

Απαραίτητο εργαλείο για τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η χρήση νέων τεχνικών ανάλυσης του μεταγραφώματος, όπως είναι η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS, next generation sequencing). Με την εν λόγω τεχνική συγκεντρώθηκαν στοιχεία για το σύνολο των μεταγράφων που υπήρχαν στα δείγματα μεσεντέρου ζώων υπό παθογόνο ή εμμένουσα μόλυνση, κατά τη στιγμή της συλλογής του ιστού. Έπειτα από ανάλυση των δεδομένων, προέκυψαν ενδιαφέροντα στοιχεία που παρατίθενται στη συνέχεια, ενώ σημαντικά ευρήματα επιβεβαιώθηκαν μέσω της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR).

3.2.2.1 Φαινοτυπική παρατήρηση προνυμφών μεταξοσκώληκα Daizo μολυσμένων με τον ιό BmCPV

Προνύμφες που βρίσκονταν στην έναρξη του 2^{ου} και του 4^{ου} αναπτυξιακού σταδίου μολύνθηκαν μέσω της τροφής με 5.5 x 10^4 πολύεδρα του ιού BmCPV ανά προνύμφη. Η μόλυνση επιβεβαιώθηκε μακροσκοπικά μέσω παρατήρησης των μολυσμένων προνυμφών (**Εικόνα 60**), καθώς επίσης και μικροσκοπικά μέσω ανίχνευσης των ιϊκών πολυέδρων στον προνυμφικό ιστό του μεσεντέρου (**Εικόνα 61**). Όπως παρατηρήθηκε, τα μεγέθη των προνυμφών υπό παθογόνο μόλυνση ποίκιλαν σημαντικά από ζώο σε ζώο. Ωστόσο, σημειώνεται ότι εντοπίστηκαν πολύεδρα σε προνύμφες όλων των μεγεθών, δείχνοντας με αυτό τον τρόπο ότι η επίδραση της μόλυνσης στο μέγεθος του σώματος του ζώου δε συσχετίζεται με την παρουσία ή όχι μόλυνσης, αλλά ενδεχομένως με την έκταση αυτής.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο BmCPV στοχεύει αποκλειστικά στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου (Wu et al., 2011a) και άρα δεν αναμένεται να επεκταθεί σε άλλα σημεία του σώματος της προνύμφης. Ωστόσο, η παρατήρηση διαφόρων προνυμφικών οργάνων στο μικροσκόπιο έδειξε ότι πολύεδρα ανιχνεύθηκαν επίσης στο εσωτερικό τμήμα της επιδερμίδας καθώς και στην αιμολέμφο των προνυμφών.



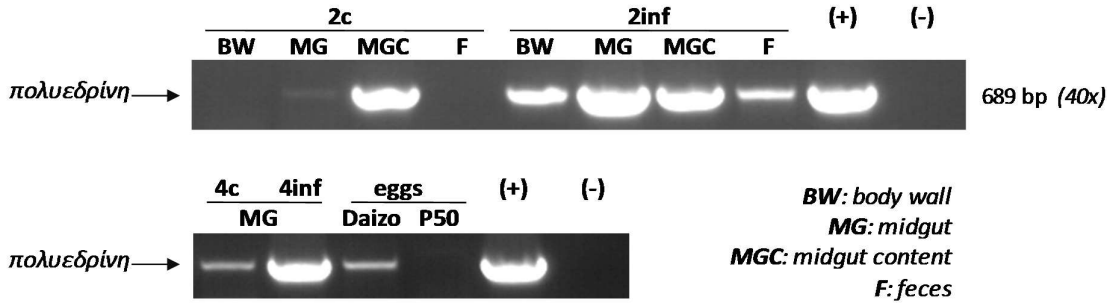
Εικόνα 61 Ανίχνευση πολυέδρων του ιού BmCPV σε προνύμφες και νύμφες υπό παθογόνο μόλυνση. Ο εντοπισμός των κυβικών κρυσταλλικών δομών (δηλαδή των ιϊκών πολυέδρων) πραγματοποιήθηκε με χρήση οπτικού μικροσκοπίου (Συντελεστής μεγέθυνσης: 40x).

Τα ζώα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 2-3 εβδομάδες (2^{ου} σταδίου) ή 1.5 εβδομάδα (4^{ου} σταδίου), έως ότου πραγματοποιηθεί συλλογή ιστού από το μεσέντερο των ζώων.

3.2.2.2 Ανίχνευση παθογόνου και εμμένουσας μόλυνσης

Για την ανίχνευση της μόλυνσης των προνυμφών με τον ιό BmCPV, πραγματοποιήθηκε RT-PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές ως προς το ιϊκό γονίδιο της πολυεδρίνης (polyhedrin). Τα cDNAs που ελέγχθηκαν προέκυψαν από το ολικό RNA που συλλέχθηκε από διαφορετικά είδη δειγμάτων, όπως επιδερμικό τοίχωμα, μεσέντερο, περιεχόμενο του μεσεντέρου και περιττώματα (**Εικόνα 62**).

Προκειμένου για παθογόνες μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα κατά το 2^{ο} (2inf) ή το 4^{ο} (4inf) στάδιο, το προϊόν της PCR που αντιστοιχεί στο γονίδιο της πολυεδρίνης ανιχνεύθηκε σε υψηλά επίπεδα σε όσα δείγματα αναλύθηκαν. Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι ότι σχετικά υψηλά επίπεδα RNA πολυεδρίνης ανιχνεύθηκαν επίσης στο περιεχόμενο του μεσεντέρου στα ζώα μάρτυρες του 2^{ου} σταδίου (δηλαδή που δε



Εικόνα 62 Ανίχνευση του γονιδίου της πολυεδρίνης του ιού BmCPV σε μεταξοσκώληκες υπό εμμένουσα και παθογόνο μόλυνση. Η πολυεδρίνη ανιχνεύθηκε μέσω της τεχνικής RT-PCR έπειτα από 40 κύκλους σε δείγματα RNA που ελήφθησαν από ιστούς και αυγά προνυμφών υπό εμμένουσα και παθογόνο μόλυνση. Συντομογραφίες: 2inf και 4inf: δείγματα από ζώα που μολύνθηκαν στο 2ο ή το 4ο στάδιο, 2c και 4c: δείγματα μάρτυρες από ζώα συγχρονισμένα με τα 2inf ή 4inf. Eggs: δείγματα από αυγά των στελεχών Daizo και P50. BW (body wall): επιδερμικό τοίχωμα, MG (midgut): μεσέντερο, MGC (midgut content): περιεχόμενο μεσεντέρου, F (feces): περιττώματα, (+): θετικός μάρτυρας που αντιστοιχεί σε RNA από πολύεδρα του ιού BmCPV, (-): αρνητικός μάρτυρας (δείγμα νερού).

μολύνθηκαν μέσω της τροφής - 2c), καθώς επίσης και στον ιστό του μεσεντέρου τόσο στην κατηγορία 2c όσο και στην 4c (**Εικόνα 62**). Επιπλέον, τα δείγματα cDNA που προέκυψαν από τα αυγά του ιδίου στελέχους με αυτό των προνυμφών (Daizo) ήταν επίσης θετικά για το RNA της πολυεδρίνης, σε αντίθεση με τα αυγά του στελέχους P50 που δεν έδωσαν καθόλου προϊόν στην PCR.

Η DNA αλληλούχιση των προϊόντων της PCR που προέκυψαν από τα δείγματα περιεχομένου του μεσεντέρου (2MGC), μεσεντέρου (4C) και των αυγών Daizo (Daizo eggs) επιβεβαίωσε ότι αντιστοιχούν στο γονίδιο της πολυεδρίνης του BmCPV (**Εικόνα 63**). Κατά συνέπεια, η ανίχνευση RNA της πολυεδρίνης στο περιεχόμενο του μεσεντέρου, στο ίδιο το μεσέντερο, αλλά και στα αυγά του στελέχους Daizo, που διατηρούνταν στο εργαστήριό μας, ήταν ενδεικτική της προϋπάρχουσας παρουσίας του ιού BmCPV στους μεταξοσκώληκες υπό μορφή εμμένουσας μόλυνσης. Αξίζει να σημειωθεί δε ότι η στοίχιση αυτών των αλληλουχιών ως προς τμήμα της αλληλουχίας της πολυεδρίνης που προέκυψε από παλαιότερο δείγμα παθογόνου μόλυνσης (4INF), και η σύγκριση με την καταχωρημένη αλληλουχία στη GenBank (NCBI S10), αναδεικνύει την ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών στο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας σε σχέση με την αυθεντική αλληλουχία.

```
                                70        80        90       100       110       120
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     61      CAAGTAACCGAGACTTTCGCGGACGCGAACAAAGACTATTCAATAGCGAACAATACAACT
2C MGC       1       ----------------------GACGCGAACAAAGACTATTCAGTAGCGAACAATACAACT
4C MG        1       ----------------------GACGCGAACAAAGACTATTCAATAGCGAACAATACAACT
Daizo eggs   1       ----------------------GACGCGAACAAAGACTATTCAATAGCGAACAATACAACT
4INF         1       ------------------------------------------------------------

                               130       140       150       160       170       180
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     121     ATAACAACAGCTTGAACGGAGAAGTGAGCGTGTGGGTATACGCATACTACTCAGACGGGT
2C MGC       40      ATAACAACAGCTTGAACGGAGAAGTGAGCGTGTGGGTATACGCATACTACTCAGACGGGT
4C MG        40      ATAACAACAGCTTGAACGGAGAAGTGAGCGTGTGGGTATACGCATACTACTCAGACGGGT
Daizo eggs   40      ATAACAACAGCTTGAACGGAGAAGTGAGCGTGTGGGTATACGCATACTACTCAGACGGGT
4INF         1       ------------------------------------------------------------

                               190       200       210       220       230       240
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     181     CTGTACTCGTAATCAACAAGAACTCGCAATACAAGGTTGGCATTTCAGAGACATTCAAGG
2C MGC       100     CTGTACTCGTAATCAACAAGAACTCGCAATACAAGGTTGGCATTTCAGAGACATTCAAGG
4C MG        100     CTGTACTCGTAATCAACAAGAACTCGCAATACAAGGTTGGCATTTCAGAGACATTCAAGG
Daizo eggs   100     CTGTACTCGTAATCAACAAGAACTCGCAATACAAGGTTGGCATTTCAGAGACATTCAAGG
4INF         1       ------------------------------------------------------------

                               250       260       270       280       290       300
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     241     CACTTAAGGAATATCGCGAGGGACAACACAACGACTCTTACGATGAGTATGAAGTGAATC
2C MGC       160     CACTTAAGGAATATCGCGAGGGACAACACAACGACTCTTACGATGAGTATGAAGTGAATC
4C MG        160     CACTTAAGGAATATCGCGAGGGACAACACAACGACTCTTACGATGAGTATGAAGTGAATC
Daizo eggs   160     CACTTAAGGAATATCGCGAGGGACAACACAACGACTCTTACGATGAGTATGAAGTGAATC
4INF         1       ------------------------------------------------------------

                               310       320       330       340       350       360
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     301     AGAGCATCTACTATCCTAACGGCGGTGACGCTCGCAAATTCCATTCAAATGCTAAACCAC
2C MGC       220     AGAGCATCTACTATCCTAACGGCGGTGACGCTCGCAAATTCCACTCAAATGCTAAACCAC
4C MG        220     AGAGCATCTACTATCCTAACGGCGGTGACGCTCGCAAATTCCACTCAAATGCTAAACCAC
Daizo eggs   220     AGAGCATCTACTATCCTAACGGCGGTGACGCTCGCAAATTCCACTCAAATGCTAAACCAC
4INF         1       ------------------------------------------------------------

                               370       380       390       400       410       420
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     361     GCGCGATCCAGATCATCTTCAGTCCTAGTGTGAATGTGCGTACTATCAAGATGGCTAAAG
2C MGC       280     GCGCGATCCAGATCATCTTCAGTCCTAGTGTGAATGTGCGTACTATCAAGATGGCCAAAG
4C MG        280     GCGCGATCCAGATCATCTTCAGTCCTAGTGTGAATGTGCGTACTATCAAGATGGCCAAAG
Daizo eggs   280     GCGCGATCCAGATCATCTTCAGTCCTAGTGTGAATGTGCGTACTATCAAGATGGCCAAAG
4INF         1       ------------------------------------------------------------

                               430       440       450       460       470       480
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     421     GCAACGCGGTATCCGTGCCCGATGAGTACCTACAGCGATCTCACCCATGGGAAGCGACCG
2C MGC       340     GTAACGCGGTATCCGTGCCCGATGAGTACCTACAGCGATCTCACCCATGGGAAGCGACCG
4C MG        340     GTAACGCGGTATCCGTGCCCGATGAGTACCTACAGCGATCTCACCCATGGGAAGCGACCG
Daizo eggs   340     GTAACGCGGTATCCGTGCCCGATGAGTACCTACAGCGATCTCACCCATGGGAAGCGACCG
4INF         1       -----GCGGTATCCGTGCCCGATGAGTACCTACAGCGATCTCACCCATGGGAAGCGACCG

                               490       500       510       520       530       540
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     481     GAATCAAGTACCGCAAGATTAAGAGAGACGGGGAAATCGTTGGTTACAGCCATTACTTTG
2C MGC       400     GAATCAAGTACCGCAAGATTAAGAGAGACGGGGAAATCGTTGGTTACAGCCATTACTTCG
4C MG        400     GAATCAAGTACCGCAAGATTAAGAGAGACGGGGAAATCGTTGGTTACAGCCATTACTTCG
Daizo eggs   400     GAATCAAGTACCGCAAGATTAAGAGAGACGGGGAAATCGTTGGTTACAGCCATTACTTCG
4INF         56      GAATCAAGTACCGCAAGATTAAGAGAGACGGGGAAATCGTTGGTTACAGCCATTACTTCG

                               550       560       570       580       590       600
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     541     AACTACCCCATGAATACAACTCCATCTCCCTAGCGGTAAGTGGTGTACATAAGAACCCAT
2C MGC       460     AACTACCCCACGAATACAACTCCATCTCCCTAGCGGTAAGTGGTGTACATAAGAACCCAT
4C MG        460     AACTACCCCACGAATACAACTCCATCTCCCTAGCGGTAAGTGGTGTACATAAGAACCCAT
Daizo eggs   460     AACTACCCCACGAATACAACTCCATCTCCCTAGCGGTAAGTGGTGTACATAAGAACCCAT
4INF         116     AACTACCCCACGAATACAACTCCATCTCCCTAGCGGTAAGTGGTGTACATAAGAACCCAT

                               610       620       630       640       650       660
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     601     CATCATACAATGTCGGATCAGCACATAACGTAATGGACGTCTTCCAATCATGCGACTTGG
2C MGC       520     CATCATACAATGTCGGATCAGCACATAACGTAATGGACGTCTTCCAATCATGCGACTTGG
4C MG        520     CATCATACAATGTCGGATCAGCACATAACGTAATGGACGTCTTCCAATCATGCGACTTGG
Daizo eggs   520     CATCATACAATGTCGGATCAGCACATAACGTAATGGACGTCTTCCAATCATGCGACTTGG
4INF         176     CATCATACAATGTCGGATCAGCACATAACGTAATGGACGTCTTCCAATCATGCGACTTGG

                               670       680       690       700       710       720
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     661     CTCTCAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCCGAACTCGAATTGGTGAACCACTACATTTCGC
2C MGC       580     CTCTCAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCCGAACTCGAATTGGTGAACCACTACATTTCGC
4C MG        580     CTCTCAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCCGAACTCGAATTGGTGAACCACTACATTTCGC
Daizo eggs   580     CTCTCAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCCGAACTCGAATTGGTGAACCACTACATTTCGC
4INF         236     CTCTCAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCCGAACTCGAATTGGTGAACCACTACATTTCGC

                               730       740       750       760       770       780
                     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NCBI S10     721     CGAACGCCTACCCATACCTCGATATTAACAATCATAGCTATGGAGTAGCTCTGAGTAACC
2C MGC       640     CGAACGCCTA----------------------------------------------------
4C MG        640     CGAACGCCTA----------------------------------------------------
Daizo eggs   640     CGAACGCCTA----------------------------------------------------
4INF         296     CGAACGCCTACCCATACCTCGATATCAACAATCATAGCTATGGAGTAGCTCTGAGTAACC
```

Εικόνα 63 Στοίχιση των αλληλουχιών που προέκυψαν από τα προϊόντα της αντίδρασης PCR για το γονίδιο της πολυεδρίνης του ιού BmCPV. Τα προϊόντα PCR από ζώα υπό εμμένουσα (2C MGC, 4C MG και Daizo eggs, νουκλεοτίδια 82-730) ή παθογόνο μόλυνση (4INF, 426-780 νουκλεοτίδια) αλληλουχήθηκαν και στοιχήθηκαν ως προς την αλληλουχία αναφοράς του S10 (GenBank: M19112.1) που αντιστοιχεί στην πολυεδρίνη, με χρήση του εργαλείου ClustalW του προγράμματος BioEdit. Με μαύρο περίγραμμα σημειώνονται οι σημειακές μεταλλαγές σε σχέση με την αλληλουχία αναφοράς.

Συνεπώς, οι προνύμφες του στελέχους Daizo που μολύνθηκαν με τον BmCPV μέσω της τροφής (παθογόνος μόλυνση) ήταν ήδη μολυσμένες υπό εμμένουσα μορφή με τον ίδιο ιό σε χαμηλά επίπεδα. Η εμμένουσα μόλυνση δε συσχετίστηκε άμεσα με αποτελέσματα παθογένειας, καθώς οι προνύμφες φαινομενικά αναπτύσσονταν, εκδύονταν και μεταμορφώνονταν με τρόπο που δε διέφερε από το φυσιολογικό.

Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι σε κανένα από τα ζώα που αναπτύσσονταν υπό φυσιολογικές (μη-παθογόνες) συνθήκες δεν ανιχνεύθηκαν ιϊκά πολύεδρα έπειτα από μικροσκοπική παρατήρηση. Ακόμη, η RT-PCR αποκάλυψε την παρουσία RNA της πολυεδρίνης κυρίως στο περιεχόμενο του μεσεντέρου των προνυμφών μαρτύρων και μόνο λίγα «ίχνη» στον καθεαυτό ιστό μεσεντέρου. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι στις υπό εμμένουσα μόλυνση προνύμφες, η μόλυνση στον ιστό του μεσεντέρου (επιθήλιο και συνδεόμενος μυϊκός/συνδετικός ιστός) έχει εξαλειφθεί ολοκληρωτικά, ούτως ώστε να μην εμφανίζονται συμπτώματα παθογένειας. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με την κατάσταση των προνυμφών υπό παθογόνο μόλυνση, όπου εντοπίστηκαν υψηλές ποσότητες RNA της πολυεδρίνης στον ιστό του μεσεντέρου, γεγονός που υποδηλώνει υψηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού και παραγωγής του ιού.

Τέλος, μικρά RNAs ιϊκής προέλευσης (virus-derived small RNAs, vsRNAs) ανιχνεύθηκαν και στις 2 κατηγορίες προνυμφών, δηλαδή τόσο στην εμμένουσα, όσο και στην παθογόνο μόλυνση (**Εικόνα 69**, βλ. §3.2.2.5). Βέβαια, τα επίπεδα ανίχνευσης των vsRNAs στις προνύμφες μάρτυρες ήταν εξαιρετικά χαμηλά, γεγονός που συνδέεται άμεσα με τα χαμηλά επίπεδα ιϊκού RNA στους υπό εμμένουσα μόλυνση ιστούς.

3.2.2.3 Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας

Με χρήση της τεχνολογίας του RNA-seq, δείγματα μεσεντέρου από προνύμφες μεταξοσκώληκα που μολύνθηκαν με τον BmCPV στο 2^{ο} και στο 4^{ο} αναπτυξιακό στάδιο

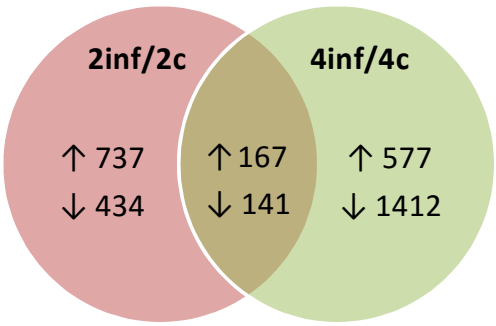
αναλύθηκαν, ούτως ώστε να ανιχνευθούν μετάγραφα που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση μεταξύ παθογόνου και εμμένουσας μόλυνσης. Αντί της ανάλυσης περισσότερων της μίας βιολογικών επαναλήψεων για τη μόλυνση στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης, η τεχνική της αλληλούχισης νέας γενιάς εφαρμόστηκε σε δείγματα που προέκυψαν από μόλυνση σε δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ($2^{ο}$ και $4^{ο}$).

Από την ανάλυση του μεταγραφώματος ταυτοποιήθηκαν 13,769 μεταγραφικώς ενεργά γονίδια και στα 4 δείγματα RNA, ενώ μετά από το φιλτράρισμα των δεδομένων σύμφωνα με τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν (βλ. §2.2.4.4) αναγνωρίστηκαν 167 μετάγραφα που αυξορρυθμίστηκαν και 141 μετάγραφα που μειορρυθμίστηκαν, και στα δύο αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν (**Εικόνα 64**).

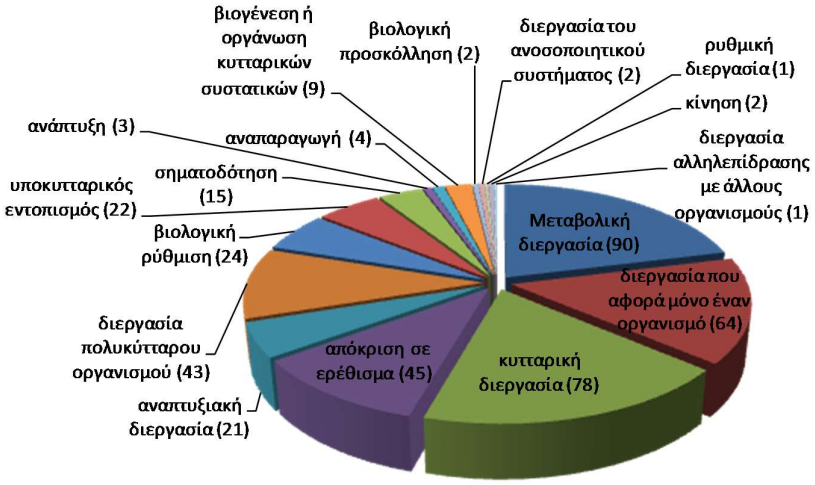
Η ανάλυση των δεδομένων του RNA-seq ως προς τη γονιδιακή οντολογία (GO, gene ontology) ανέδειξε 201 από τα 308 μετάγραφα που παρουσίαζαν διαφορική έκφραση, τα οποία είναι καταχωρημένα ως προς τη GO τους. Τα μετάγραφα αυτά αρχικά ταξινομήθηκαν ως προς τη συσχέτισή τους με τρεις κύριες λειτουργικές κατηγορίες: α) βιολογικές διαδικασίες, β) μοριακές λειτουργίες και γ) κυτταρικά συστατικά. Στη συνέχεια, τα γονίδια της κάθε κατηγορίας ταξινομήθηκαν περαιτέρω στο επόμενο επίπεδο GO (#2) για κάθε λειτουργική κατηγορία (**Εικόνα 65**).

Εικόνα 64

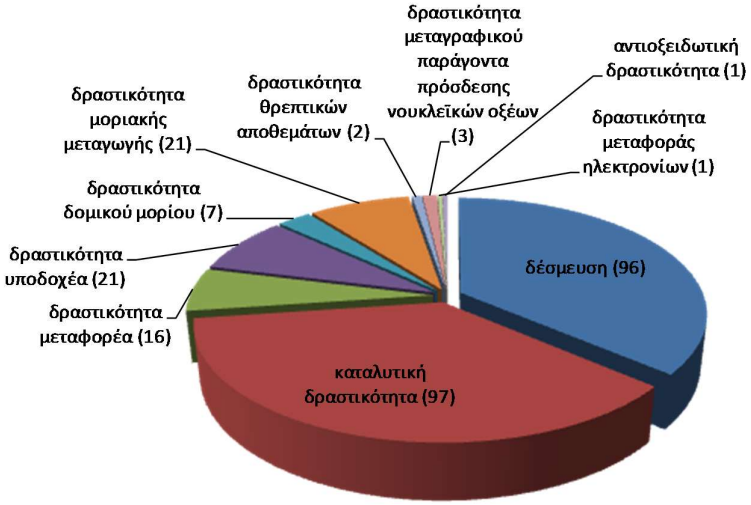
Τα γονίδια που παρουσίασαν διαφορική έκφραση στο μεσέντερο έπειτα από παθογόνο μόλυνση κατά το $2^{ο}$ ή το $4^{ο}$ προνυμφικό στάδιο. Στην Εικόνα αναγράφονται οι αριθμοί των γονιδίων που αυξορρυθμίστηκαν ή μειορρυθμίστηκαν μετά την παθογόνο μόλυνση, όπως προσδιορίστηκε μέσω ανάλυσης NGS και σύγκρισης των τιμών RPKM των ταυτοποιημένων γονιδίων μεταξύ των βιβλιοθηκών 2inf και 2c (μόλυνση $2^{ου}$ σταδίου) ή 4inf και 4c (μόλυνση $4^{ου}$ σταδίου). Η τομή των δύο συνόλων αντιστοιχεί στα γονίδια που αυξορρυθμίστηκαν ή μειορρυθμίστηκαν ταυτόχρονα και στους δύο τύπους βιβλιοθηκών.



Βιολογικές διαδικασίες



Μοριακές λειτουργίες



Κυτταρικά συστατικά

Εικόνα 65 Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO) των γονιδίων που παρουσίασαν διαφορική έκφραση σε προνύμφες υπό παθογόνο μόλυνση. Τα γονίδια που αυξορρυθμίστηκαν ή μειορρυθμίστηκαν κατά τη διάρκεια της παθογόνου μόλυνσης στο 2^{ο} και το 4^{ο} προνυμφικό στάδιο κατανεμήθηκαν με χρήση εργαλείων GO ως προς τη συμμετοχή τους σε βιολογικές διαδικασίες, μοριακές λειτουργίες και κυτταρικά συστατικά. Οι αριθμοί που αναγράφονται δίπλα από τα στοιχεία κάθε κατηγορίας αντιστοιχούν στον αριθμό των γονιδίων που σχετίζονται με κάθε μία εξ' αυτών.

Τα μετάγραφα των γονιδίων που βρέθηκαν να έχουν τουλάχιστον μία καταχώρηση ως «βιολογικές διαδικασίες» (426) κατατάχθηκαν ακολούθως σε 17 υποκατηγορίες, από τις οποίες οι πιο σημαντικές ήταν εκείνες της: μεταβολικής διεργασίας (21.1%), κυτταρικής διεργασίας (18.3%), διεργασίας που αφορά ένα μόνο οργανισμό (15%), απόκρισης σε ερέθισμα (10.6%) και διεργασίας πολυκύτταρου οργανισμού (10.1%). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η κατηγορία «διεργασία του ανοσοποιητικού συστήματος», η οποία θα αναμενόταν να παρουσιάζει διαφορική έκφραση λόγω της μόλυνσης, αντιπροσωπεύθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό (2%).

Τα μετάγραφα γονιδίων με καταχωρήσεις ως «μοριακές λειτουργίες» (265) κατανεμήθηκαν περαιτέρω σε 10 υποκατηγορίες, μεταξύ των οποίων η καταλυτική δραστικότητα (36.6%) και η δέσμευση (36.2%) αποτελούν τις πιο πολυάριθμες ομάδες, ενώ ακόμη σημαντικές είναι οι υποκατηγορίες δραστικότητας υποδοχέα (7.9%) και μοριακής μεταγωγής (7.9%). Επίσης, γονίδια που σχετίζονται με πολυμεράσες, πρωτεΐνες πρόσδεσης νουκλεϊκών οξέων και δραστικότητας νουκλεασών είχαν αρκετά σημαντικά ποσοστά.

Τέλος, 117 αλληλουχίες γονιδίων καταχωρήθηκαν ως «κυτταρικά συστατικά», και εν συνεχεία κατηγοριοποιήθηκαν σε 8 ομάδες, από τις οποίες η μεμβράνη (38.5%), το κύτταρο (25.6%), η εξωκυττάρια περιοχή (14.5%) και το οργανίδιο (12%) ήταν οι βασικότερες, λόγω πιθανώς των γενικευμένων αλλοιώσεων που επιφέρει η μόλυνση με τον BmCPV σε ολόκληρο το μολυσμένο κύτταρο.

3.2.2.4 Ανάλυση μεταγραφώματος

3.2.2.4.1 Γενικές παρατηρήσεις

Η βιβλιογραφία βρίθει αναφορών που έχουν ασχοληθεί στο πρόσφατο παρελθόν με τη μεταγραφική απόκριση του μεταξοσκώληκα στη μόλυνση με τον BmCPV,

χρησιμοποιώντας ωστόσο προνύμφες που ήταν υγιείς πριν τη μόλυνση (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011a). Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εμβαθύνει στο φαινόμενο της εμμένουσας μόλυνσης από τον BmCPV. Εξαιτίας του όγκου των δεδομένων, η σύγκριση με τη σχετική βιβλιογραφία περιορίστηκε μόνο στα γονίδια που η διαφορική έκφρασή τους επιβεβαιώθηκε με qRT-PCR (**Πίνακας 5**).

Κοινό στοιχείο στις βιβλιογραφικές μελέτες ήταν η μείωση της γονιδιακής έκφρασης για αρκετά πεπτικά ένζυμα, αλλά και η διαφορική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αποτοξίνωση και το μεταβολισμό. Ακόμη, στην παρούσα μελέτη, αλλά και σε δύο ακόμα ανεξάρτητες μελέτες, δείχθηκε ότι επάγεται μία μικρή ομάδα γονιδίων ανοσολογικής απόκρισης, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη insulin-related peptide-binding protein 2 (IBP2) (Gao et al., 2014a; Wu et al., 2011a). Παράλληλα, σύμφωνα με την παρούσα και τρεις ακόμα μελέτες (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009), επάγεται το μονοπάτι της απόπτωσης και ταυτόχρονα καταστέλλονται αναστολείς της απόπτωσης. Σημαντικό εύρημα αποτελεί η αυξορρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του επιθηλίου του μεσεντέρου κατά τη μόλυνση (Gao et al., 2014a), ενώ σε δύο από τις μελέτες παρατηρείται αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες (Wu et al., 2011a, και για την παρούσα βλ. **Πίνακα 6**). Επίσης, ο πιθανός ρόλος του μονοπατιού σηματοδότησης του ασβεστίου στην επαγωγή απόπτωσης στα μολυσμένα κύτταρα ήταν ένα πεδίο που τονίστηκε σε δύο από τις μελέτες σε σχέση με τον BmCPV (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a), ωστόσο δεν αναλύθηκε εξίσου εκτενώς στις υπόλοιπες μελέτες. Ακόμη, ο μεταβολισμός του σιδήρου (Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009) και η λειτουργία των ριβοσωμάτων (Wu et al., 2009; Wu et al., 2011a) φαίνεται να επηρεάζονται από τη μόλυνση με τον BmCPV, ενώ κατηγορίες που αναδείχθηκαν από μεμονωμένες μελέτες είναι η λειτουργία του πρωτεασώματος (Gao et al., 2014a) και τα γονίδια του RNAi μηχανισμού, που θα αναλυθούν περαιτέρω στη

Πίνακας 5 Ταξινόμηση των γονιδίων που επάγονται ή καταστέλλονται έπειτα από παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV. Σύγκριση μεταξύ πέντε διαφορετικών μελετών που αφορούν στη μόλυνση του *B. mori* από τον ιό BmCPV. Στην τελευταία στήλη παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. (SH: subtractive hybridization, MA: microarray analysis και DS: deep sequencing).

Γονίδια	SH (p50) (Wu et al., 2009)	MA (p50) (Wu et al., 2011a)	DS (4008) (Gao et al., 2014b)	DS (4008) (Gao et al., 2014a)	DS (p50) (Gao et al., 2014a)	DS (Daizo) (παρούσα μελέτη)
Πεπτικά ένζυμα (πρωτεάσες, λιπάσες και νουκλεάσες)						
Acidic lipase			↓			
Alkaline nuclease	↑					
Chymotrypsin-like			↓		↓	
Hemocyte protease-2		↑				
Insect intestinal lipase-6					↓	
Lipase-1		↑	↓		↓	
Pancreatic lipase-like					↑	
Serine protease	↓					
Trypsin-like	↓					↓
Zinc carboxypeptidase A1						↓
Αποτοξινωτικά/μεταβολικά ένζυμα						
Antennal esterase CXE14			↓			
Aquaporin				↑		
Cytochrome P450		↑				
Dicarbonyl/L-xylulose reductase						↓
Esterase FE4						↓
Farnesyl diphosphate synthase				↑		
Fatty acid binding protein			↓			
Similar to carboxylesterase		↓				
Sugar transporter			↓			
Putative galactose UDP 4-epimerase			↑			
Απόκριση στο στρες						
eIF-4E1						↑
HSP 20.8						↑
HSP 23.7		↑				
HSP25.4						↑
Σηματοδότηση						
Calreticulin			↑			
Coiled-coil & C2 domain-containing 2A					↑	
Ecdysteroid-22 kinase				↑		
Famesoic acid O-methyltransferase			↑			
FK506-binding protein precursor			↑			
GTP:AMP phosphotransferase		↓				
GTP-binding protein RAB2				↑		
Inorganic phosphate transporter 1			↓			
Juvenile hormone diol kinase		↑			↑	
Neuropeptide-like 4E (NPLP4E)						↓
Palmityl transferase (P260)				↓	↓	
Protein kinase C inhibitor			↑			
Troponin-C					↑	

Γονίδια	**SH (p50)** (Wu et al., 2009)	**MA (p50)** (Wu et al., 2011a)	**DS (4008)** (Gao et al., 2014b)	**DS (4008)** (Gao et al., 2014a)	**DS (p50)** (Gao et al., 2014a)	**DS (Daizo)** (παρούσα μελέτη)
Ανοσολογική απόκριση						
Antitrypsin precursor		↓				
Insulin-related peptide-binding protein 2 (IBP2)		↑			↑	↑
Peptidoglycan recognition protein LB-like						↑
Serpin-5		↑				
Serpin-28				↑		
Thioredoxin-like				↑		
Tumor necrosis factor 13 (TNFSF13)				↑		
RNAi						
Argonaute2						↑
Dicer2						↑
Απόπτωση						
Carboxypeptidase B						↑
Caspase-8						↑
Inhibitor-of-apoptosis	↓					
Programmed cell death protein 5			↑			
Putative apoptosis inhibitor 5				↓		
30K protein 26					↓	
Ουβικιτίνη-πρωτεάσωμα						
Goliath E3 ubiquitin ligase				↑		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1-like				↑		
Αναδόμηση μεσεντέρου-επιδερμίδα						
CPH43						↑
Urbain precursor				↑		
37 kDa protease precursor				↑		
Μεταβολισμός σιδήρου						
Ferritin	↑					
Transferrin				↑	↑	
Ριβοσωμικές πρωτεΐνες						
L11	↑					
P0		↑				
Άγνωστης λειτουργίας						
LOC101735726						↓
Protein KGM_04122					↓	
Protein KGM16290					↓	
Similar to CG10527					↑	
Similar to CG8927				↑		
Unknown secreted protein			↑			
30 kDa protein					↑	

συνέχεια.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στη μεταγραφική απόκριση μεταξύ των πέντε μελετών μπορούν να ερμηνευθούν εξαιτίας της χρήσης διαφορετικών στελεχών μεταξοσκώληκα. Επιπλέον, η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, ενώ ο χρόνος συλλογής των δειγμάτων διέφερε και ενδεχομένως αντιστοιχούσε σε διαφορετικό στάδιο της μόλυνσης. Άλλωστε, η σύγκριση ακόμα και εντός της ίδιας μελέτης ενός σχετικά ανθεκτικού (p50) και ενός ευπαθούς στελέχους (4008) μεταξοσκώληκα οδήγησε στην επισήμανση σημαντικών διαφορών ως προς την απόκριση στην ιϊκή μόλυνση, όπου, για παράδειγμα, βρέθηκε ότι το γονίδιο *IBP2* αυξορρυθμίστηκε σημαντικά μόνο στο ανθεκτικό στέλεχος, και άρα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα γονίδιο που σχετίζεται με την άμυνα έναντι του ιού BmCPV (Gao et al., 2014a). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης για το *IBP2* (βλ. §3.2.2.4.2) είναι σε συμφωνία με τα παραπάνω, γεγονός που υποδεικνύει την ενεργοποίηση της άμυνας έναντι του BmCPV, ακόμη και υπό την παρουσία προϋπάρχουσας εμμένουσας μόλυνσης.

3.2.2.4.2 Γονίδια που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση και η πιθανή σχέση τους με την αντιϊκή απόκριση έναντι του BmCPV

Από την ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχιση NGS, αναδείχθηκαν πολυάριθμα γονίδια των οποίων τα επίπεδα έκφρασης στο μεσέντερο των προνυμφών μεταξοσκώληκα αυξάνονται ή μειώνονται σημαντικά κατόπιν της μετάβασης από την εμμένουσα στην παθογόνο μόλυνση και, συνεπώς, ενδέχεται να έχουν καθοριστικό ρόλο στην απόκριση του οργανισμού του μεταξοσκώληκα έναντι της μόλυνσης από τον BmCPV.

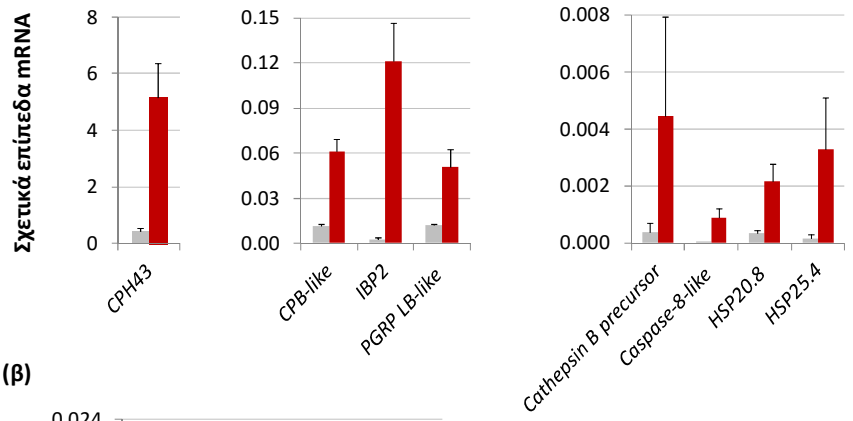
Η διαφορική έκφραση ορισμένων από τα γονίδια που παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μέσω qRT-PCR (**Εικόνα 66**). Τα γονίδια που επιλέχθηκαν για έλεγχο μπορούν να ταξινομηθούν βάσει της λειτουργία τους σε κατηγορίες, όπως οι φυσιολογικοί φραγμοί, η ανοσολογική απόκριση, τα πρωτεολυτικά ένζυμα, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, τα μεταβολικά ένζυμα, τα γονίδια που εμπλέκονται στην ορμονική σηματοδότηση, καθώς και μη-χαρακτηρισμένα ως προς τη λειτουργία τους γονίδια. Στο σύνολό τους, αυτά τα γονίδια συνιστούν το πλέγμα μίας σύνθετης απόκρισης του μεταξοσκώληκα ως άμυνας έναντι του ιού BmCPV.

Ένα από τα γονίδια που βρέθηκε ότι αυξορρυθμίζονται σημαντικά μετά τη μόλυνση ήταν αυτό της CPH43, μίας υποθετικής πρωτεΐνης της επιδερμίδας (**Εικόνες 66α και 66γ**). Τα επίπεδα έκφρασης του *CPH43* βρέθηκε ότι αυξάνονται κατά ~12 φορές σε ζώα που μολύνθηκαν στο 2^{ο} στάδιο, ενώ φαίνεται ότι διπλασιάζονται έπειτα από μόλυνση σε ζώα 4^{ου} σταδίου. Ωστόσο, αν και πιθανολογείται η εμπλοκή της πρωτεΐνης στην έκδυση των προνυμφών (Liang et al., 2010), προς το παρόν δεν είναι γνωστό εάν εμπλέκεται με κάποιον άλλο τρόπο στην αντιμετώπιση της μόλυνσης από τον BmCPV.

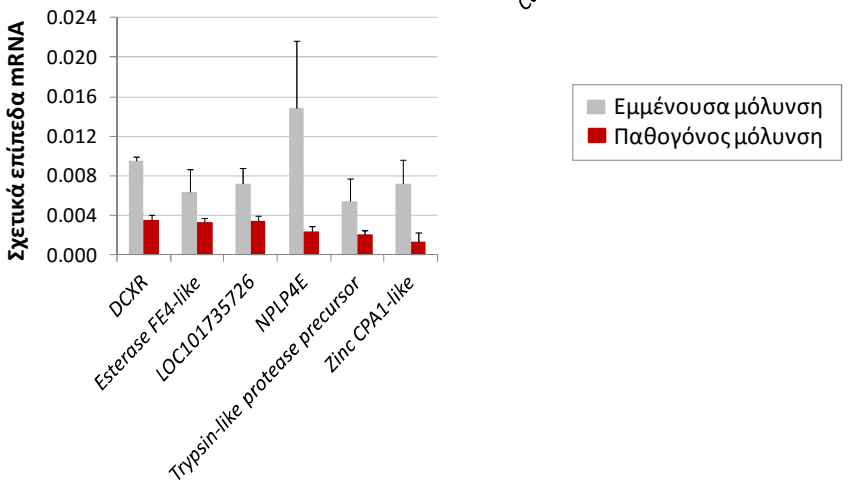
Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα γονίδια *IBP2* (insulin-related peptide-binding protein 2) και *PGRP LB-like* (peptidoglycan recognition protein LB-like), τα οποία μπορούν να καταταχθούν στην κατηγορία των γονιδίων που σχετίζονται με τον ανοσοποιητικό μηχανισμό. Ειδικά για το *IBP2*, έχει βρεθεί ότι σε μόλυνση του μεταξοσκώληκα με τον BmCPV αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασής του στο μεσέντερο ήδη από τις πρώτες 12 ώρες κατά 20 φορές, ενώ μετά από 48 ώρες αυτά ανιχνεύονται αυξημένα κατά 100 φορές σε σχέση με τα μη-μολυσμένα ζώα (Wu et al., 2011a). Σύμφωνα με τη δική μας μελέτη, το *IBP2* συνεχίζει να ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μερικές εβδομάδες μετά την έναρξη της μόλυνσης (**Εικόνες 66α και 66γ**). Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε στον *B. mori* η ύπαρξη του ενδογενούς miR-278-3p, το οποίο έχει την ικανότητα να καταστέλλει την έκφραση του *IBP2* (Wu et al., 2016). Επιπλέον, ο παράγοντας IBP2 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον IGFBP7 των σπονδυλωτών, όπου έχει ογκοκατασταλτική δράση η οποία οδηγεί σε απόπτωση, ενώ πιθανώς εμπλέκεται σε ενδοκρινείς και ανοσολογικές αποκρίσεις (Chen et al., 2007; Chen et al., 2011; Ruan et al., 2006; Ruan et al., 2007; Wajapeyee et al., 2008). Η ινσουλίνη των σπονδυλωτών μπορεί να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι ERK, το οποίο προστατεύει το εντερικό επιθήλιο από ιϊκές μολύνσεις στη *Drosophila* και το κουνούπι *Aedes* (Xu et al., 2013b), ενώ στο *C. elegans* το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης έχει επίσης αμυντική δράση (Chen et al., 2010). Έτσι, η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *IBP2* στο μεταξοσκώληκα θα μπορούσε να έχει ενεργό ρόλο στην άμυνα έναντι του πολλαπλασιαζόμενου γενετικού υλικού του BmCPV, μέσω ανοσολογικής ή αντιϊκής απόκρισης που θα σχετίζεται με το μονοπάτι της απόπτωσης (Wu et al., 2011a).

Αναφορικά με την PGRP LB-like, είναι μία πρωτεΐνη που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των PGRPs, οι οποίες αυξορρυθμίζονται έπειτα από έκθεση του εντόμου σε

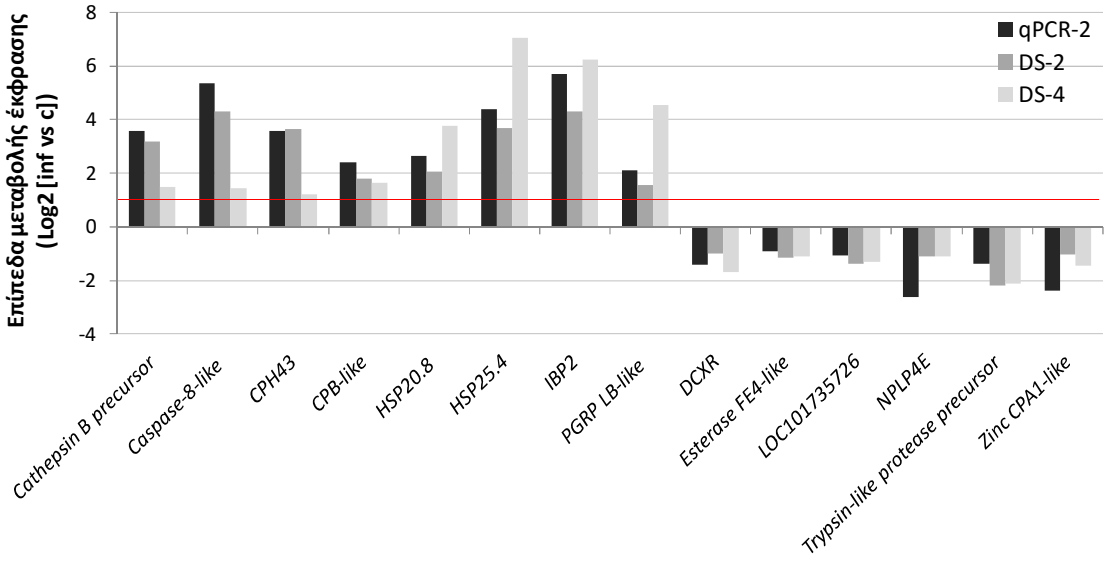
(α)


Σχετικά επίπεδα mRNA
8
6
4
2
0
CPH43
0.15
0.12
0.09
0.06
0.03
0.00
CPB-like
IBP2
PGRP LB-like
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
Cathepsin B precursor
Caspase-8-like
HSP20.8
HSP25.4

(β)


Σχετικά επίπεδα mRNA
0.024
0.020
0.016
0.012
0.008
0.004
0.000
DCXR
Esterase FE4-like
LOC101735726
NPLP4E
Trypsin-like protease precursor
Zinc CPA1-like
Εμμένουσα μόλυνση
Παθογόνος μόλυνση

(γ)


Επίπεδα μεταβολής έκφρασης (Log2 [inf vs c])
8
6
4
2
0
-2
-4
qPCR-2
DS-2
DS-4
Cathepsin B precursor
Caspase-8-like
CPH43
CPB-like
HSP20.8
HSP25.4
IBP2
PGRP LB-like
DCXR
Esterase FE4-like
LOC101735726
NPLP4E
Trypsin-like protease precursor
Zinc CPA1-like

Εικόνα 66 Η διαφορική έκφραση επιλεγμένων γονιδίων στο μεσέντερο έπειτα από παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV. Ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης για γονίδια τα οποία ανήκουν στην κατηγορία που επέδειξε τη σημαντικότερη διαφορική έκφραση μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του NGS. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης για τα γονίδια που (α) αυξορρυθμίστηκαν ή (β) μειορρυθμίστηκαν, αφορούσε δείγματα μεσεντέρου από προνύμφες οι οποίες είχαν μολυνθεί στο 2^{ο} προνυμφικό στάδιο και έγινε μέσω της τεχνικής qRT-PCR. Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της έκφρασης σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς *BmActin3*, όπως προέκυψαν από τη μέτρηση δύο βιολογικών και δύο τεχνικών επαναλήψεων (+SE). Τα μεγάλα τυπικά σφάλματα πιθανώς αντικατοπτρίζουν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ως προς το ακριβές αναπτυξιακό στάδιο ή την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης. (γ) Η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης στο μεσέντερο σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική qRT-PCR για τα δείγματα από ζώα που μολύνθηκαν στο 2^{ο} στάδιο (qPCR-2) και από την τεχνική NGS για αντίστοιχα δείγματα που αφορούσαν ζώα 2^{ου} (DS-2) ή 4^{ου} (DS-4) σταδίου. Σημειώνεται, ότι οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως τιμές log2, όπου η αύξηση ή η μείωση της έκφρασης κατά 2 φορές ισοδυναμεί με μία τιμή log2 ίση με 1 ή -1, αντίστοιχα.

βακτηριακή μόλυνση και δρουν αναγνωρίζοντας την πεπτιδογλυκάνη που αποτελεί βασικό συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Dziarski and Gupta, 2006). Στη *Drosophila* οι PGRPs μπορούν είτε να δεσμεύουν και να αναγνωρίζουν την πεπτιδογλυκάνη, είτε επιπλέον να υδρολύουν το μόριο επιδεικνύοντας δραστικότητα αμιδάσης (Girardin and Philpott, 2006). Η PGRP LB έχει ρόλο αμιδάσης, ενεργοποιείται από Gram αρνητικά βακτήρια των οποίων την πεπτιδογλυκάνη υδρολύει, ενώ εμμέσως δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού IMD και ορισμένων αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), διατηρώντας έτσι την ισορροπία μεταξύ ομοιόστασης και ενεργοποίησης του ανοσολογικού μηχανισμού (Girardin and Philpott, 2006; Wang and Beerntsen, 2015; Zaidman-Remy et al., 2006). Εδώ, αν και πρόκειται για ιϊκή μόλυνση, η αυξορρύθμιση του *PGRP LB* θα μπορούσε να δικαιολογηθεί, καθώς οι προνύμφες καθίστανται πιο ευπαθείς σε βακτηριακές μολύνσεις λόγω της ήδη εδραιωμένης μόλυνσης από τον BmCPV, στις οποίες πρέπει να ανταπεξέλθουν τα ζώα παράλληλα με τον πολλαπλασιαζόμενο ιό (**Εικόνες 66α και 66γ**). Πρόσφατη μελέτη (Liu et al., 2015a) επιβεβαιώνει τα αποτελέσματά μας σχετικά με την αυξορρύθμιση του *PGRP LB*, όπου το ίδιο γονίδιο εμφανίζεται αυξημένο έπειτα από μόλυνση με τον BmCPV ή τον BmBDV (*Bombyx mori* Bidensovirus, DNA ιός), αλλά όχι με τον BmNPV. Ένας τέτοιος ρόλος του

PGRP LB μπορεί να ερμηνεύσει το αμετάβλητο των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του IMD μονοπατιού όπως ίσως θα ήταν αναμενόμενο.

Ένα ακόμη σημαντικό γονίδιο που αυξορρυθμίστηκε κατά την παθογόνο μόλυνση ήταν το *caspase-8-like* (**Εικόνες 66α και 66γ**). Η κασπάση-8 είναι μία ενδοπρωτεάση που ανήκει στις εναρκτήριες κασπάσες και η οποία στα θηλαστικά σχετίζεται με την απόπτωση (McIlwain et al., 2013). Σε περίπτωση επαγωγής απόπτωσης που οφείλεται σε μόλυνση με κάποιον ρεοϊό, αυτή αναμένεται να ενεργοποιηθεί (Kominsky et al., 2002; Stewart and Roy, 2010; Tyler et al., 2001). Το ομόλογο γονίδιο *Dredd* της κασπάσης-8 στη *Drosophila* πρόσφατα βρέθηκε ότι ευθύνεται για τη διάσπαση των παραγόντων Imd και Relish του μονοπατιού IMD (Kim et al., 2014). Ωστόσο, αν και εδώ αυξορρυθμίστηκε σε υψηλά επίπεδα για τα ζώα του 2^{ου} σταδίου (41 φορές με qRT-PCR, 20 φορές με NGS), δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη μεταβολή στα συγκεκριμένα AMPs (**Πίνακας 9**). Ενδεχομένως, η αύξηση αυτή να υποδεικνύει την ύπαρξη ενεργοποίησης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω του μονοπατιού της απόπτωσης στο μεσέντερο των μολυσμένων με BmCPV προνυμφών, ως στοιχείο της ανοσολογικής απόκρισης έναντι της εξαπλούμενης μόλυνσης.

Μία άλλη οικογένεια γονιδίων που παρουσιάζουν σημαντική απόκριση στη μόλυνση από τον BmCPV είναι οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins), στις οποίες περιλαμβάνεται η πρόδρομη μορφή της HSP25.4, η HSP20.8, καθώς και η HSP19.9 (**Εικόνες 66α και 66γ, και Πίνακας 6**). Οι HSPs είναι μοριακοί συνοδοί που εν δυνάμει μπορούν να λειτουργήσουν ως σήματα ενεργοποίησης της άμυνας του ξενιστή (Giuliano et al., 2011; Li et al., 2009b), ενώ προκειμένου για ρεοϊούς συχνά αναφέρεται αυξορρύθμιση κάποιας HSP κατά τη διάρκεια μίας τέτοιας μόλυνσης (Li et al., 2010; Smith et al., 2006; Wu et al., 2011a). Ένας ιός μπορεί να «εκμεταλλεύεται» προς δικό του όφελος τις δυνατότητες του κυττάρου που προσβάλλει, ώστε μέσω αυτού να πολλαπλασιάζεται και να επεκτείνει τη μόλυνση, προκαλώντας παράλληλα αυξορρύθμιση σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες θερμικού σοκ, όπως οι *HSP70*, *HSP90* και *HSC70* (Iwanaga et al., 2013; Liu et al., 2013a; Sagisaka et al., 2010). ‘Ετσι, πιθανώς και ο ιός BmCPV να αξιοποιεί τους μοριακούς πρωτεϊνικούς συνοδούς που βρίσκονται στα κύτταρα του μεσεντέρου, ώστε να αντιγράψει το γενετικό του υλικό.

Πίνακας 6 Τα επίπεδα μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων που ταυτοποιήθηκαν και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης με τον ιό BmCPV. Για την εκτίμηση των μεταβολών στην έκφραση υπολογίστηκε ο λόγος της τιμής RPKM για τα δείγματα που προέκυψαν από ζώα που μολύνθηκαν κατά το 2ο ή το 4ο προνυμφικό στάδιο (2inf ή 4inf, αντίστοιχα) προς την τιμή RPKM των αντίστοιχων δειγμάτων που προήλθαν από ζώα υπό εμμένουσα μόλυνση (2c ή 4c). Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι περιπτώσεις διαφορικής έκφρασης >2 ή <0.5.

Γονίδιο	ID γονιδίου	$RPKM_{2inf}/RPKM_{2c}$	$RPKM_{4inf}/RPKM_{4c}$
HSP19.9	BGIBMGA004540	**8.18**	**20.38**
HSP20.8	BGIBMGA004605	**4.14**	**13.48**
HSP70	BGIBMGA006313	**2.11**	1.97
	BGIBMGA004614	**2.37**	**2.19**
HSP70, HSC70	BGIBMGA002381	0.96	0.98
sHSP 19.1	BGIBMGA004606	0.88	**2.10**
sHSP 19.5	BGIBMGA013545	0.58	**8.33**
sHSP 20.2	BGIBMGA005784	**4.52**	-
sHSP 20.4	BGIBMGA004541	**2.71**	-
sHSP 21.4	BGIBMGA000944	1.02	1.02
sHSP 22.6	BGIBMGA004103	1.03	1.15
sHSP 23.8	BGIBMGA004515	**2.78**	1.88
sHSP 24.2	BGIBMGA005780	**3.01**	0.75
sHSP 26.6	BGIBMGA005755	**2.09**	**2.18**
sHSP 27.4	BGIBMGA005823	1.97	**5.26**
sHSP 42.3	BGIBMGA004101	0.99	**0.44**

Μία ενδιαφέρουσα κατηγορία γονιδίων προς μελέτη είναι αυτή των πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στο μεσέντερο λόγω του ρόλου τους είτε στην πέψη της τροφής, είτε στην αποτοξίνωση του οργανισμού από τοξικές πρωτεΐνες που μπορεί να εισέλθουν στο οργανισμό μέσω της τροφής. Γενικότερα, όμως, στο σώμα του εντόμου τα πρωτεολυτικά ένζυμα εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως είναι η έκδυση, η μεταμόρφωση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.

Ορισμένα από αυτά τα πρωτεολυτικά ένζυμα εμφανίζουν αυξορρύθμιση, όπως στην περίπτωση των γονιδίων της καρβοξυπεπτιδάσης Β (*carboxypeptidase B-like*, *CPB*) και της πρόδρομης μορφής της καθεψίνης Β (*cathepsin B precursor*) (**Εικόνες 66α και 66γ**). Η συγκεκριμένη καρβοξυπεπτιδάση (CPB) του μεσεντέρου έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να αυξορρυθμίζεται έπειτα από μόλυνση κουνουπιών *A. gambiae* με το παράσιτο *Plasmodium falciparum*, ενώ παράλληλα όταν εκφραστεί σε μολυσμένα ποντίκια με το αντίστοιχο παράσιτο *P. berghei* των τρωκτικών αυτό παρουσιάζει μειωμένους ρυθμούς

ανάπτυξης (Lavazec et al., 2007). Παράλληλα, πρόσφατα βρέθηκε ότι η CPB1 εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων του ιού DENV2 σε μολυσμένα κύτταρα του μεσεντέρου του *Ae. aegypti* (Tham et al., 2014). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της καρβοξυπεπτιδάσης Β του μεσεντέρου στην αντιμετώπιση μολύνσεων που οφείλονται σε ποικίλους μολυσματικούς παράγοντες.

Από την άλλη πλευρά, η καθεψίνη Β είναι μία κυστεϊνική πρωτεάση που εκφράζεται στο λιπαρό σώμα του μεταξοσκώληκα, επάγεται από την ορμόνη 20-υδρόξυ-εκδυσόνη κατά τη διάρκεια της έκδυσης και μεταμόρφωσης, και επιπλέον συμμετέχει στη μεταμόρφωση και στον συνεπαγόμενο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Lee et al., 2009a). Η καθεψίνη Β, σε συνεργασία με την καθεψίνη L, παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο ρεοϊών σε ινοβλάστες ποντικού, ενώ ποντικοί που στερούνται αυτών των δύο ενζύμων εμφανίζουν χαμηλούς τίτλους ρεοϊών (Ebert et al., 2002; Johnson et al., 2009). Συνεπώς, ενδέχεται να παίζει ρόλο στο αποπτωτικό μονοπάτι που φαίνεται να λαμβάνει χώρα στα μολυσμένα κύτταρα του μεσεντέρου, και παράλληλα να διευκολύνει την εγκαθίδρυση μίας μόλυνσης από ρεοϊούς (**Εικόνες 66α και 66γ**).

Δύο ακόμα πρωτεολυτικά ένζυμα αναδείχθηκαν από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, τα οποία μειορρυθμίζονται στα ζώα υπό παθογόνο μόλυνση. Αυτά είναι, η πρόδρομη μορφή της πρωτεάσης τρυψίνης (*trypsin-like protease precursor*) και η ψευδαργυρική μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάση Α1 (*zinc carboxypeptidase A1-like, CPA1*) (**Εικόνες 66β και 66γ**). Η τρυψίνη είναι μία αλκαλική πρωτεάση που είναι λειτουργική στο αλκαλικό περιβάλλον του μεσεντέρου του μεταξοσκώληκα και συμμετέχει στην υδρόλυση της εισερχόμενης τροφής, ενώ σε περίπτωση μόλυνσης με τον BmNPV αναφέρεται ότι συμμετέχει στην υδρόλυση των πολυέδρων, ούτως ώστε τελικά ο ιός να απελευθερωθεί στο εσωτερικό του μεσεντέρου και να μολύνει τα κύτταρα-στόχους του (Ponnuvel et al., 2012). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ φέρεται να έχει φυσιολογικά αντιϊκό ρόλο, η συγκεκριμένη πρωτεάση εμφανίζεται μειορρυθμισμένη σε ευπαθή στελέχη του μεταξοσκώληκα έπειτα από μόλυνση με τους ιούς DNV (Densonucleosis Virus) και BmNPV (Bao et al., 2008; Ponnuvel et al., 2012), ενώ επίσης διευκολύνει τη μόλυνση του *Ae. aegypti* από τον ιό DENV2 (Molina-Cruz et al., 2005).

Σχετικά με την μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάση που περιλαμβάνει ένα κατιόν ψευδαργύρου στην καταλυτική της θέση, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης παρουσιάζονται μειωμένα στα μολυσμένα ζώα, τόσο σε αυτά του 2^{ου} σταδίου όσο και

σε εκείνα του 4^{ου} σταδίου (**Εικόνες 66β και 66γ**). Μία εξήγηση είναι ότι η συγκεκριμένη πρωτεάση παρεμποδίζεται μέσω κάποιου ιϊκού αναστολέα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της καρβοξυπεπτιδάσης A1, η οποία παρεμποδίζεται μέσω έκφρασης του αναστολέα ACI (*Ascaris* metallocarboxypeptidase inhibitor) από το παράσιτο *Ascaris* που μολύνει το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Sanglas et al., 2009).

Ένα ακόμη γονίδιο που μειορρυθμίζεται στα μολυσμένα ζώα είναι αυτό της αναγωγάσης των δικαρβονυλικών και της L-ξυλουλόζης (*dicarbonyl/L-xylulose reductase*, *DCXR*, **Εικόνες 66β και 66γ**). Στην πρώτη περίπτωση, η αναγωγάση έχει αποτοξινωτικό ρόλο καθώς ανάγει τις α-δι-καρβονυλικές ενώσεις που παράγονται σε διάφορες φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες, ενώ στη δεύτερη εμπλέκεται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων αφού μετατρέπει την L-ξυλουλόζη σε ξυλιτόλη (Lee et al., 2013). Στο *C. elegans*, έχει βρεθεί ότι το ορθόλογό της γονίδιο *DHS-21* είναι σημαντικό σε διαδικασίες που σχετίζονται με τη μακροζωΐα και την αναπαραγωγή του (Son le et al., 2011). Εδώ, τα επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης αναγωγάσης μπορεί να μειώνονται λόγω κάποιου παρεμποδιστικού παράγοντα που εκφράζεται από τον ιό ή λόγω της γενικότερης κατάστασης στρες και των στοιχείων απόπτωσης που παρατηρούνται στα ζώα που έχουν νοσήσει.

Στα αποτοξινωτικά ένζυμα των οποίων τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης, επίσης, μειώνονται στα μολυσμένα ζώα ανήκει και η υποθετική εστεράση FE4 (esterase FE4-like, **Εικόνες 66β και 66γ**). Οι εστεράσες, συνήθως, δραστηριοποιούνται σε διαδικασίες όπως η απόκτηση ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνες ουσίες, τις οποίες και υδρολύουν, και έτσι απενεργοποιούν (Field and Devonshire, 1998), χωρίς να αποκλείεται να ενισχύουν και με κάποιον άλλον τρόπο, τον αποτοξινωτικό μηχανισμό του μεταξοσκώληκα. Το γεγονός ότι στην προκειμένη περίπτωση η εστεράση FE4 μειορρυθμίζεται στα ζώα με παθογόνο μόλυνση ίσως οφείλεται σε κάποιο μηχανισμό παρεμπόδισης που έχει ενεργοποιηθεί από τον ιό ώστε να αντιπαρέλθει την άμυνα του *B. mori*. Αξίζει να σημειωθεί, δε, ότι παρόμοια μείωση της έκφρασης μίας καρβοξυλεστεράσης του μεταξοσκώληκα έχει παρατηρηθεί 72 ώρες μετά από μόλυνση με τον BmCPV σε προνύμφες P50 του μεταξοσκώληκα (Wu et al., 2011a).

Ένα γονίδιο που φαίνεται να κατέχει σηματοδοτικό ρόλο και μειορρυθμίζεται κατά τη μόλυνση είναι αυτό του προδρόμου που ομοιάζει με νευροπεπτίδιο 4E μορίου (*neuropeptide-like precursor 4E*, *NPLP4E*, **Εικόνες 66β και 66γ**). Όπως είναι γνωστό, τα

νευροπεπτίδια εμπλέκονται σε ποικίλες διαδικασίες στα έντομα, όπως είναι η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός και η συμπεριφορά (Altstein and Nassel, 2010). Για το ρόλο του συγκεκριμένου νευροπεπτιδίου στο μεταξοσκώληκα υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα, ενώ αναφέρεται ότι ίσως σχετίζεται με τη διαδικασία της έκδυσης (Liang et al., 2010). Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, η επιδερμίδα, η ωοθήκη και ο προθωρακικός αδένας (Gan et al., 2011). Πιθανώς, λοιπόν, η μείωση των επιπέδων έκφρασής του να μπλοκάρεται από την εκτεταμένη παρουσία του ιού στο μεσέντερο, και, με αυτό τον τρόπο, να παρεμποδίζονται σημαντικές λειτουργίες που σχετίζονται με τους ιστούς που προαναφέρθηκαν.

Τέλος, στατιστικά σημαντική μειορρύθμιση παρουσιάζει το μη-χαρακτηρισμένο γονίδιο *LOC101735726* (XM_004922709, **Εικόνες 66β, 66γ και 67**). Έπειτα από εφαρμογή του αλγορίθμου DELTA-BLAST στη βάση δεδομένων του NCBI, φαίνεται ότι η υποθετική πρωτεΐνη που προκύπτει από την αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου διαθέτει μία περιοχή ελικάσης PIF1, η οποία έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη δράση της τελομεράσης και να ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο, ενώ το μοτίβο P-θηλειάς που περιέχεται σε αυτή την περιοχή σχετίζεται με τη δέσμευση νουκλεοτιδίων. Μία δεύτερη χαρακτηρισμένη περιοχή αυτής της πρωτεΐνης είναι η RecD, που προσδίδει ATP-εξαρτώμενη δραστικότητα εξωνουκλεάσης V (exoDNAse) και επιπλέον αποτελεί μέλος της οικογένειας I των ελικασών α-υπομονάδας, η οποία σχετίζεται με την αντιγραφή, τον ανασυνδυασμό και την επιδιόρθωση του DNA. Η δομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (περιοχές ελικάσης και εξωνουκλεάσης) υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο της στη διαδικασία αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA που φυσιολογικά συμβαίνει σε ένα υγιές κύτταρο, αν και στην περίπτωση της μόλυνσης φαίνεται να παρεμποδίζονται από την παρουσία του ιού.

Εικόνα 67 Η δομή της μη-χαρακτηρισμένης πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *LOC101735726*. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής δομής έγινε με χρήση του αλγορίθμου DELTA-BLAST. Απεικονίζονται οι περιοχές ελικάσης PIF1 και εξωνουκλεάσης RecD.

Συνεπώς, παρατηρώντας συνολικά τα γονίδια που παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην έκφρασή τους μετά τη μόλυνση από τον BmCPV, μπορούμε να τα κατατάξουμε σε ορισμένες βασικές κατηγορίες, όπως: α) γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση (*IBP2* και *PGRP LB-like*) τα οποία αυξορρυθμίζονται, β) γονίδια που εκφράζουν πρωτεολυτικά ένζυμα και ίσως σχετίζονται με την απόπτωση τα οποία είτε αυξορρυθμίζονται (*Caspase-8-like*, *CPB-like* και *Cathepsin B precursor*) είτε μειορρυθμίζονται (*Trypsin-like protease precursor* και *Zinc CPA1-like*) ανάλογα με το ρόλο που εξυπηρετούν, γ) γονίδια που σχετίζονται με καταστάσεις στρες τα οποία συνήθως αυξορρυθμίζονται (*HSP25.4*, *HSP20.8* και *HSP19.9*), δ) γονίδια που κωδικοποιούν για αποτοξινωτικά ένζυμα τα οποία μειορρυθμίζονται (*DCXR* και *Esterase FE4-like*), ε) γονίδια σηματοδότησης που μειορρυθμίζονται (*NPLP4E*) και στ) γονίδια που σχετίζονται με βασικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η έκδυση (*CPH43*, αυξορρυθμίζεται) και πιθανώς η αντιγραφή του DNA (*LOC101735726*, μειορρυθμίζεται) για τα οποία δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση με την παρουσία του ιού στον οργανισμό.

Τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση του μεταγραφώματος είναι σημαντικά, καθώς δίνουν ενδιαφέρουσες και πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη γενικότερη απόκριση του μεταξοσκώληκα στη μόλυνση από τον BmCPV. Μία συγκριτική μελέτη αντίστοιχων στοιχείων που προκύπτουν από άλλα είδη μολύνσεων ή παρεμβάσεων στη φυσιολογική πορεία ζωής του μεταξοσκώληκα θα ήταν χρήσιμη στην εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων σχετικά με την εξειδίκευση των παρατηρούμενων μεταβολών ως προς το συγκεκριμένο ιό.

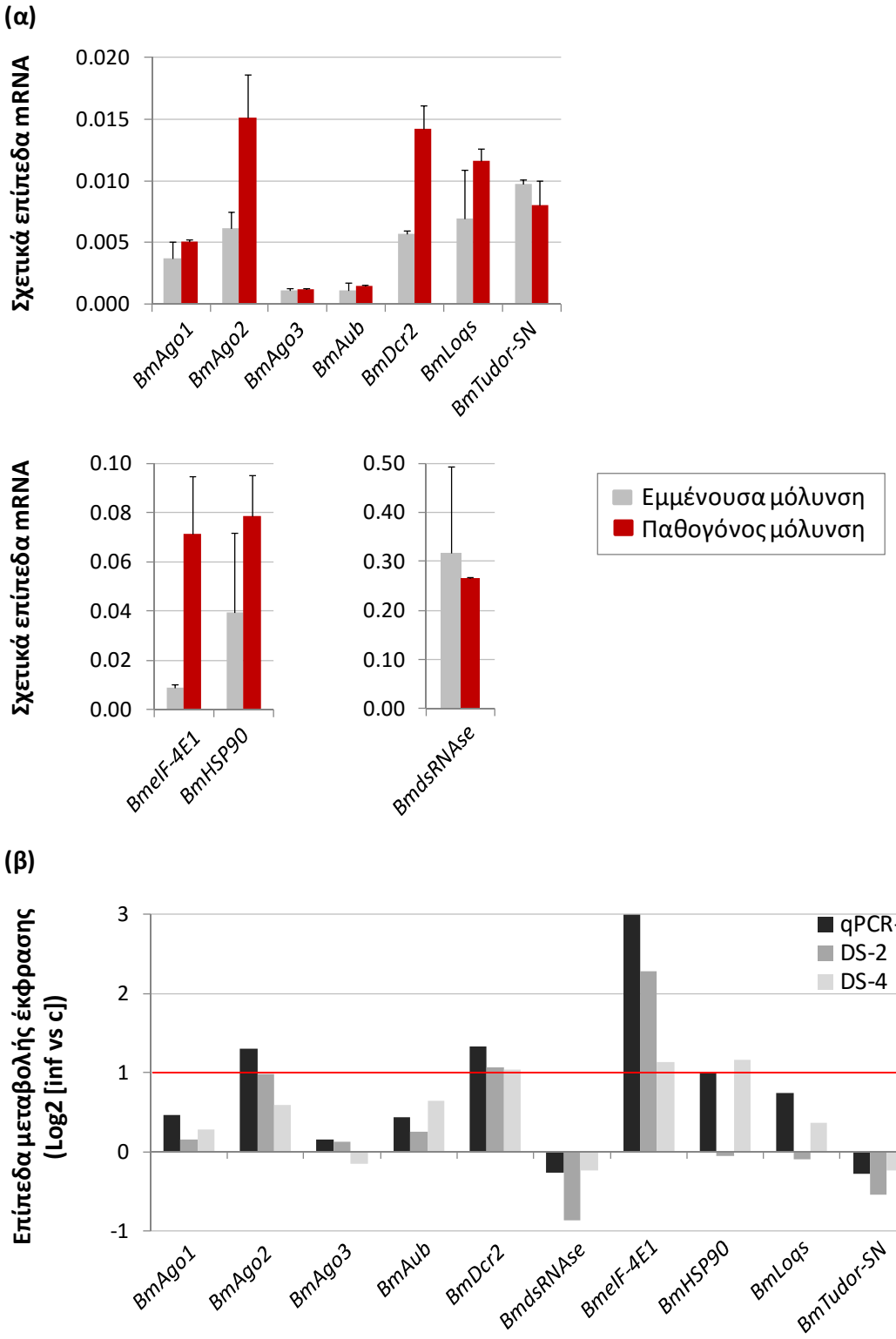
3.2.2.4.3 Γονίδια που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό

Στη *Drosophila* και τα κουνούπια, τα μονοπάτια siRNA και piRNA διαθέτουν ενεργό ρόλο στην άμυνα έναντι εξωγενών δίκλωνων RNA, όπως είναι για παράδειγμα ένα ιϊκό γονιδίωμα (Chotkowski et al., 2008; Zambon et al., 2006). Δεδομένου ότι το γονιδίωμα του ιού BmCPV αποτελείται από 10 μόρια dsRNA, θεωρήθηκε πιθανό αυτό να αποτελεί στόχο του RNAi μηχανισμού έπειτα από την εδραίωση ιϊκής μόλυνσης σε προνύμφες μεταξοσκώληκα. Έτσι, κρίθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί κατά πόσο και με ποιο τρόπο επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του *B. mori* από αυτόν τον ιό.

Όπως προαναφέρθηκε (§3.2.2.4.1), αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που πραγματεύονται το αντικείμενο της μόλυνσης του μεταξοσκώληκα από τον ιό BmCPV, ελάχιστα είναι τα γνωστά δεδομένα που αφορούν ειδικά στην απόκριση του μηχανισμού του RNAi. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία αποτελεί μία λεπτομερή μελέτη συγκεκριμένα σε γονίδια του μεταξοσκώληκα που θα μπορούσαν να σχετίζονται άμεσα με το RNAi. Έτσι, τα γονίδια που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν: α) ορισμένα γονίδια-κλειδιά που φαίνεται να εμπλέκονται στα μονοπάτια του RNAi μηχανισμού εν γένει στα έντομα, καθώς και β) ορισμένα γονίδια για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχουν στην ευρύτερη διαδικασία της γονιδιακής αποσιώπησης στον *Bombyx* ή σε άλλα έντομα, όπως π.χ. στη *Drosophila*.

Έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου BLASTP της βάσης δεδομένων NCBI, καθώς και τη χρήση του εργαλείου BLAST της βάσης δεδομένων που παρέχεται από τον ιστότοπο www.silkdb.org, έγινε η ταυτοποίηση στο γονιδίωμα του *B. mori* πολλών ομολόγων (επίσημα καταχωρημένων ή μη) γονιδίων που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi σε άλλους οργανισμούς. Στη συνέχεια, τα δεδομένα της αλληλούχισης με NGS αναλύθηκαν ώστε να εντοπιστούν πιθανές μεταβολές στην έκφραση των ταυτοποιημένων γονιδίων του RNAi εξαιτίας της παθογόνου μόλυνσης με τον BmCPV. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκαν μέσω qRT-PCR τα αποτελέσματα για ορισμένα από τα γονίδια στα δείγματα cDNA που προέκυψαν από τα ζώα που μολύνθηκαν στο 2^{ο} στάδιο.

Σύμφωνα με πειράματα που παρουσιάστηκαν νωρίτερα (§3.1.1.1), δείχθηκε ότι η παρεμπόδιση της μετάφρασης μέσω «RNAi του RNAi μηχανισμού» τριών γονιδίων της οικογένειας Argonaute (*BmAgo1*, *BmAgo2* και *BmAgo3,* που αντιπροσωπεύουν τα μονοπάτια miRNA, siRNA και piRNA, αντίστοιχα), καθώς και της *BmDcr2* του siRNA μονοπατιού σε κύτταρα Bm5 του μεταξοσκώληκα, αναστέλλει σημαντικά την αποσιωπητική ικανότητα των εν λόγω κυττάρων και άρα τα γονίδια αυτά θεωρείται ότι ανήκουν στον πυρήνα του RNAi μηχανισμού του μεταξοσκώληκα. Εκτός από τα παραπάνω γονίδια, συμπληρωματικά κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί το γονίδιο *BmAubergine* (*BmAub*) που αποτελεί το δεύτερο γονίδιο-κλειδί του piRNA μονοπατιού, και το *BmLoquacious* (*BmLoqs*) του miRNA μονοπατιού που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη δέσμευσης του dsRNA, τόσο στη βάση δεδομένων της αλληλούχισης νέας γενιάς όσο και μέσω qRT-PCR.



Εικόνα 68 Τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-κλειδιών που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό στο μεσέντερο έπειτα από παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV. (α) Ο προσδιορισμός των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης αφορά δείγματα μεσεντέρου από προνύμφες οι οποίες μολύνθηκαν στο 2^{ο} προνυμφικό στάδιο και έγινε μέσω της τεχνικής qRT-PCR. Στα γραφήματα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της έκφρασης σε

σχέση με το γονίδιο αναφοράς *BmActin3*, όπως προέκυψαν από τη μέτρηση δύο βιολογικών και δύο τεχνικών επαναλήψεων (+SE). Τα τυπικά σφάλματα πιθανώς αντικατοπτρίζουν διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ως προς το ακριβές αναπτυξιακό στάδιο ή την πρόοδο της ιϊκής μόλυνσης. (β) Μεταβολή των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης στο μεσέντερο σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική qRT-PCR για τα δείγματα από ζώα που μολύνθηκαν στο 2^{ο} στάδιο (qPCR-2) και από την τεχνική NGS για αντίστοιχα δείγματα που αφορούσαν ζώα 2^{ου} (DS-2) ή 4^{ου} σταδίου (DS-4). Σημειώνεται, ότι οι μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζονται ως τιμές log2, όπου η αύξηση ή η μείωση της έκφρασης κατά 2 φορές ισοδυναμεί με μία τιμή log2 ίση με 1 ή -1, αντίστοιχα.

Τα ευρήματα δείχνουν διπλασιασμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *BmAgo2* και *BmDcr2* για τα ζώα 2^{ου} σταδίου υπό παθογόνο μόλυνση, τόσο στην qRT-PCR όσο και στο NGS (**Εικόνες 68α και 68β, και Πίνακας 7**). Η αύξηση στην έκφραση των δύο αυτών γονιδίων μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι ανήκουν τυπικά στο siRNA μονοπάτι το οποίο σε άλλα έντομα είναι υπεύθυνο για την άμυνα του οργανισμού έναντι εξωγενών RNA με δίκλωνη δομή, όπως είναι το γονιδίωμα του ιού BmCPV. Ωστόσο, το εύρημα αυτό διαφέρει από πρόσφατη μελέτη όπου τα επίπεδα των *BmAgo2* και *BmDcr2* δεν μεταβάλλονται μετά από μόλυνση με τον BmCPV σε προνύμφες *B. mori* 3^{ου} σταδίου (Liu et al., 2015a). Ενδεχομένως, οι όποιες διαφορές στην απόκριση των δύο αυτών γονιδίων στη μόλυνση να οφείλεται σε διαφορές στη χρονική στιγμή της δειγματοληψίας ή ακόμα και στο γεγονός ότι τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν εδώ είχαν προενεργοποιηθεί στην προστασία κατά του BmCPV μέσω της προϋπάρχουσας εμμένουσας μόλυνσης.

Αναφορικά με το γονίδιο *BmAub*, αυτό βρέθηκε να αυξάνεται κατά 1.5 φορά στα ζώα 4^{ου} σταδίου, όμως το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε για τα ζώα 2^{ου} σταδίου υπό παθογόνο μόλυνση. Τέλος, για τα γονίδια *BmAgo1*, *BmAgo3* και *BmLoqs* δεν ανιχνεύτηκε σημαντική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης με καμιά από τις δύο τεχνικές μεταξύ ζώων υπό εμμένουσα ή παθογόνο μόλυνση (**Εικόνες 68α και 68β, και Πίνακας 7**).

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός των γονιδίων του «πυρήνα» του RNAi, επιλέχθηκε να μελετηθούν ορισμένα γονίδια που διαθέτουν πιο περιφερειακό ρόλο στο μονοπάτι της γονιδιακής αποσιώπησης, όπως το γονίδιο της νουκλεάσης *BmTudor-SN* για την οποία πρόσφατα δείχθηκε ότι αποτελεί βασικό παράγοντα για τον σχηματισμό των κοκκίων

Πίνακας 7 Τα επίπεδα μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων-κλειδιών του RNAi μηχανισμού μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης με τον ιό BmCPV. Για την εκτίμηση των μεταβολών στην έκφραση επιλεγμένων γονιδίων που ανήκουν στα μονοπάτια miRNA, siRNA και piRNA, υπολογίστηκε ο λόγος της τιμής RPKM για τα δείγματα που προέκυψαν από ζώα που μολύνθηκαν κατά το 2^{ο} ή το 4^{ο} προνυμφικό στάδιο (2inf ή 4inf, αντίστοιχα) προς την τιμή RPKM των αντίστοιχων δειγμάτων που προήλθαν από ζώα υπό εμμένουσα μόλυνση (2c ή 4c). Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι περιπτώσεις αυξορρύθμισης ή μειορρύθμισης κατά >1.5.

RNAi γονίδια	$RPKM_{2inf}/RPKM_{2c}$	$RPKM_{4inf}/RPKM_{4c}$
Μονοπάτι miRNA		
Pasha (part 1)	0.86	1.19
Pasha (part 2)	0.81	1.18
Dicer1-like (part 1)	0.97	0.96
Dicer1-like (part 2)	1.03	0.91
Loquacious	0.94	1.28
Argonaute1	1.12	1.20
Μονοπάτι siRNA		
Dicer2 (part 1)	**2.20**	**2.08**
Dicer2 (part 2)	**2.01**	**1.97**
R2D2	1.20	1.06
Argonaute2	**1.98**	1.48
Μονοπάτι piRNA		
Argonaute3	1.10	0.89
Piwi/Aubergine	1.20	**1.54**

στρες (stress granules, SGs) στα κύτταρα BmN4 του μεταξοσκώληκα, ενώ παράλληλα φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες BmAgo1 και BmAgo2 των miRNA και siRNA μονοπατιών, αντίστοιχα (Zhu et al., 2013a). Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη η έκφρασή της δεν μεταβλήθηκε σημαντικά μετά την παθογόνο μόλυνση με τον BmCPV (**Εικόνες 68α και 68β, και Πίνακας 7**).

Ακόμη, μελετήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης *BmeIF-4E1*, ο οποίος είναι γνωστό ότι επίσης συμμετέχει στο σχηματισμό των SGs μαζί με mRNAs που φέρουν πολυ-$[A]^+$ άκρα αλλά και άλλους παράγοντες, όπως την BmTudor-SN (Zhu et al., 2013a). Το γονίδιο *BmeIF-4E1* βρέθηκε να αυξορρυθμίζεται (κατά 8 φορές με qRT-PCR, κατά 2-5 φορές με NGS), και σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνεται ότι ανήκει στην κατηγορία των μεταγράφων που παρουσίασαν πολύ σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασής τους (**Εικόνες 68α και**

68β, και Πίνακας 7). Αυτή η αυξορρύθμιση ενδέχεται να σχετίζεται είτε με τη γενικότερη κατάσταση στρες στην οποία βρίσκονταν τα ζώα λόγω της μόλυνσης, είτε με κάποιον πιο εξειδικευμένο ρόλο του BmeIF-4E1 στην απόκριση του μεταξοσκώληκα έναντι της εδραίωσης του BmCPV στα άτομα που ελέχθηκαν. Σε κάθε περίπτωση, ο ρόλος του BmeIF-4E1 χρήζει περαιτέρω διερεύνησης σε σχέση με τον BmCPV (βλ. επίσης §3.1.3.2.3.2).

Παράλληλα, ελέχθηκε το γονίδιο της πρωτεΐνης θερμικού σοκ *BmHSP90* (heat shock protein 90), για την οποία πρόσφατες δημοσιεύσεις δείχνουν ενεργό συμμετοχή στο piRNA μονοπάτι στα κύτταρα ωοθήκης BmN4 του μεταξοσκώληκα, μέσω καθοδήγησης των πρόδρομων μορίων piRNA στις πρωτεΐνες PIWI (Izumi et al., 2013; Xiol et al., 2012). Ωστόσο, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *BmHSP90* αυξήθηκαν κατά >2 φορές έπειτα από την παθογόνο μόλυνση στα ζώα 4^{ου} σταδίου, το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στα ζώα 2^{ου} σταδίου (**Εικόνες 68α και 68β, και Πίνακας 7**). Έτσι, σε σχέση με τα γονίδια άλλων μικρών HSPs που ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση NGS (**Εικόνες 68α και 68β, και Πίνακας 6**), ο ρόλος που παίζει η BmHSP90 στη μόλυνση από τον BmCPV, τουλάχιστον κατά τη χρονική φάση της δειγματοληψίας, δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα καθοριστικός.

Όσον αφορά σε γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη μορίων dsRNA, αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της αλκαλικής νουκλεάσης (*BmdsRNAse*) που εκφράζεται στο μεσέντερο του μεταξοσκώληκα και ως κύρια ενεργότητα έχει την υδρόλυση δίκλωνων μορίων RNA (Arimatsu et al., 2007; Liu et al., 2012), όπως το γονιδίωμα του BmCPV. Θα ήταν αναμενόμενο να παρατηρηθεί μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης της αλκαλικής νουκλεάσης δίκλωνου RNA λόγω παρουσίας του ιού στο μεσέντερο των ζώων. Παρόλα αυτά, ανιχνεύθηκε διαφορική έκφραση του γονιδίου αυτού έπειτα από παθογόνο μόλυνση μόνο για την κατηγορία ζώων του 2^{ου} σταδίου μέσω NGS (**Εικόνες 68α και 68β, και Πίνακας 8**). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην ήδη υπάρχουσα μόλυνση υπό εμμένουσα μορφή, η οποία ίσως να είχε ήδη προκαλέσει αυξορρύθμιση στο γονίδιο της *BmdsRNAse.* Ακόμη, δύο γονίδια (*CG4966* ή *HPS4*, και *CG4562*), που επίσης εμπλέκονται στην πρόσληψη του dsRNA στη *Drosophila*, παρατηρήθηκε ότι παρουσίασαν διαφορική έκφραση μεταξύ παθογόνου και εμμένουσας μόλυνσης μόνο για τα ζώα του 4^{ου} σταδίου (**Πίνακας 8**). Ειδικότερα, ο παράγοντας HSP4 σχετίζεται με την ωρίμανση των όψιμων ενδοσωμάτων σε

λυσοσώματα, ενώ λειτουργεί ανασταλτικά ως προς την αποσιώπηση που επάγεται μέσω των μονοπατιών siRNA και miRNA (Lee et al., 2009b). Αντίστοιχα, αν και η ακριβής λειτουργία του γονιδίου *CG4572* δεν είναι γνωστή, φαίνεται ότι κωδικοποιεί για μία πρωτεάση η οποία εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την αντιϊκή άμυνα στη *Drosophila* (Saleh et al., 2009; Swevers et al., 2013a). Τέλος, η διαφορική έκφραση που σημειώνεται για το γονίδιο *Scavenger Receptor C* (*SR-C*, **Πίνακας 8**), για το οποίο έχει βρεθεί ότι χρησιμοποιείται από κύτταρα S2 για την αναγνώριση μορίων dsRNA ως προσδετών και την ενδοκύτωσή τους (Ulvila et al., 2006), διαφέρει ως προς την κατεύθυνσή της (αυξορρύθμιση ή μειορρύθμιση) μεταξύ των ζώων 2^{ου} και 4^{ου} σταδίου, και έτσι δεν οδηγεί σε σαφή συμπεράσματα για το ρόλο αυτού του γονιδίου στην παρούσα μόλυνση.

Πίνακας 8 Τα επίπεδα μεταβολής της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης με τον ιό BmCPV. Οι πιθανές μεταβολές στην έκφραση μελετήθηκαν για γονίδια που αφορούν ενδοκυτταρικούς βοηθητικούς παράγοντες, την πρόσληψη του dsRNA, το αντιϊκό RNAi, νουκλεάσες και άλλους μη-ταξινομημένους παράγοντες (Swevers et al., 2013a). Για την εκτίμηση των μεταβολών στην έκφραση των μελετούμενων γονιδίων, υπολογίστηκε ο λόγος της τιμής RPKM για τα δείγματα που προέκυψαν από ζώα που μολύνθηκαν κατά το 2^{ο} ή το 4^{ο} προνυμφικό στάδιο (2inf ή 4inf, αντίστοιχα) προς την τιμή RPKM των αντίστοιχων δειγμάτων που προήλθαν από ζώα υπό εμμένουσα μόλυνση (2c ή 4c). Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι περιπτώσεις αυξορρύθμισης ή μειορρύθμισης κατά >1.5. Η συντομογραφία μ.α. αντιστοιχεί σε γονίδια που ήταν μη-ανιχνεύσιμα στα δεδομένα που προέκυψαν από το NGS.

RNAi γονίδια	Πλησιέστερο ομόλογο στον *B. mori*	GenBank Accession Number	ID γονιδίου	$RPKM_{2inf}/RPKM_{2c}$	$RPKM_{4inf}/RPKM_{4c}$
Ενδοκυτταρικοί βοηθητικοί παράγοντες					
Arginine methyltransferase PRMT5 (*dPRMT5* ή *capsuleen* ή *dart5*)	Arginine N-methyltransferase 5-like isoform X1 or X2 (predicted)	XP_004928553.1/ XP_004928554.1	BGIBMGA007842	1.11	1.46
Armitage	Probable RNA helicase armi-like (predicted)	XP_004933936.1	BGIBMGA005056	1.13	0.95
ATP-dependent RNA helicase Belle	ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform X1 or X2 (predicted)	XP_004924684.1 / XP_004924685.1	BGIBMGA007594	1.05	1.26
Clp1 homolog (*kinase*)	Protein CLP1 homolog (predicted)	XP_004923397.1	BGIBMGA004784	1.03	1.20
Drosophila homolog of p68 RNA helicase	DEAD box polypeptide 5 isoform 1 or 2	NP_001037582.1/ NP_001166829.1	BGIBMGA011746	1.31	1.42
			BGIBMGA011754	1.12	1.15
			BGIBMGA011965	1.05	1.22
			BGIBMGA012013	0.88	0.87
Elp-1	Elongator complex protein 1	NP_001182006.1	BGIBMGA001538	0.94	0.97
Eukaryotic initiation factor 4E-1	Eukaryotic initiation factor 4E-1	NP_001091832.1	BGIBMGA012675	**4.89**	**2.16**
Gawky CG31992-PA (similar)	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein-like (predicted)/protein Gawky-like (predicted)	XP_004922030.1/ XP_004922029.1	BGIBMGA005589	1.12	0.90
Gemin 3 homolog	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20-like (predicted)	XP_004931522.1	BGIBMGA011804	0.77	1.41
HEN1	Small RNA 2'-O-methyltransferase-like (predicted)	XP_004928786.1	BGIBMGA007679	1.21	0.79
Homeless (*Spindle-E*)	Probable ATP-dependent RNA helicase spindle-E-like (predicted)	XP_004924494.1	BGIBMGA004949	0.92	1.43
Maelstrom	Protein maelstrom homolog (predicted)	XP_004928380.1	BGIBMGA008424	1.08	1.32
Putative translin-associated factor X	Translin-associated protein X-like (predicted)	XP_004927402.1	BGIBMGA004644	μ.α	μ.α
Staufen	Maternal effect protein staufen-like (predicted)	XP_004932448.1	BGIBMGA002695	1.12	0.88
Translin	Translin	ABD36365.1	BGIBMGA009726	1.07	1.38
Tudor-SN	Tudor staphylococcus/micrococcal nuclease	NP_001182009.1	BGIBMGA013328	0.69	0.85
Vasa intronic gene (*VIG*)	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein-like	NP_001266293.1	BGIBMGA006704	1.07	0.86
Πρόσληψη dsRNA					
CG4966 (orthologous to the *Hermansky-Pudlak Syndrome 4*, *HPS4*)	Uncharacterized protein LOC101743016 (predicted)	XP_004923697.1	BGIBMGA009850	1.16	**0.51**
Eater	Neurogenic locus notch homolog protein 1-like (predicted)	XP_004931260.1	BGIBMGA002383	1.33	0.79

FBX011 ortholog	F-box only protein 11-like isoform X1 or X2 (predicted)	XP_004924574.1/ XP_004924575.1	BGIBMGA005003	1.09	1.12
Scavenger receptor SR-C-like protein	Scavenger receptor type C precursor	NP_001128387.1	BGIBMGA004577	**2.15**	**0.33**
Sid-1-like protein 1	Sid-1-related gene 1 precursor/low quality protein: SID1 transmembrane family member 1 (predicted)	NP_001106735.1 / XP_004930735.1	BGIBMGA011251	1.14	0.95
	Sid-1-related gene 1 precursor	NP_001106735.1	BGIBMGA011160	0.92	0.87
		NP_001106735.1	BGIBMGA011161	0.71	1.15
	Low quality protein: SID1 transmembrane family member 1 (predicted)	XP_004930735.1	BGIBMGA011250	0.99	1.08
Sid-1-like protein 2	Sid-1-like protein 2	BAF95807.1	BGIBMGA011251	1.14	0.95
Sid-1-like protein 3	Sid-1-related gene 3 precursor	NP_001106736.1	BGIBMGA005847	0.93	0.84
Αντιϊκό RNAi					
Ars2	Low quality protein: serrate RNA effector molecule homolog (predicted)	XP_004930189.1	BGIBMGA003480	0.94	1.08
CG4572	Venom serine carboxypeptidase-like (predicted)	XP_004929002.1	BGIBMGA013085	1.01	**1.85**
Egghead	Glycosyltransferase precursor	NP_001243979.1	BGIBMGA001169	1.34	1.52
NinaC	Myosin-IIIa-like (predicted)	XP_004930229.1	BGIBMGA003454	1.46	0.67
Νουκλεάσες					
dsRNase	Alkaline nuclease precursor	NP_001091744.1	BGIBMGA001173	**0.55**	0.85
Exosome	PM-Scl autoantigen-like protein	NP_001108472.1	BGIBMGA000626	1.34	0.77
Nibbler	Probable exonuclease mut-7 homolog (predicted)	XP_004931095.1	BGIBMGA002947	0.84	0.94
Poly(A) polymerase (*Pla1* homolog *Schizosaccharomyces*)	Poly(A) polymerase gamma-like isoform X1 (predicted)	XP_004923145.1	BGIBMGA000084	1.29	1.02
Sdn1-like (*small RNA-degrading nuclease 1*)	Putative RNA exonuclease NEF-sp-like (predicted)	XP_004931480.1	BGIBMGA011782	0.84	1.31
Άλλοι παράγοντες					
Exportin-5	Exportin-5-like (predicted)	XP_004928015.1	BGIBMGA001123	0.92	1.02
HSP90	HSP90, partial	AEB39782.1	BGIBMGA004612	0.96	**2.24**

3.2.2.4.4 Γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση

Με τη βοήθεια του εργαλείου BLAST ταυτοποιήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω NGS γονίδια που ανήκουν στα κλασσικά μονοπάτια της φυσικής ανοσίας (**Πίνακας 9**). Ειδικότερα, μελετήθηκε ποια από αυτά παρουσιάζουν διαφορική έκφραση μετά την ιϊκή μόλυνση. Αν και παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές στην έκφραση (αύξηση ή μείωση κατά >2 φορές), θεωρήθηκε παρακινδυνευμένο αυτές να θεωρηθούν ως βιολογικά σημαντικές λόγω των ιδιαιτέρως χαμηλών επιπέδων έκφρασης που αντικατοπτρίζονται από τις τιμές RPKM στην πλειοψηφία των γονιδίων.

Ωστόσο, αναφορικά με τα γονίδια *Toll* στην περίπτωση παθογόνου μόλυνσης, το *Toll6* μειορρυθμίστηκε κατά 2 φορές σε ζώα 2^{ου} και 4^{ου} σταδίου, ενώ αντίθετα το *Toll10-3* αυξορρυθμίστηκε κατά 2 φορές μόνο σε ζώα 4^{ου} σταδίου. Ακόμη, το γονίδιο *Toll9-1* για το οποίο έχει βρεθεί πως μειορρυθμίζεται έπειτα από χορήγηση dsRNA (Liu et al., 2013b), μειορρυθμίστηκε κατά 1.5 φορά μόνο σε ζώα 4^{ου} σταδίου, ενώ δεν παρουσίασε διαφορική έκφραση σε ζώα 2^{ου} σταδίου (**Πίνακας 9**).

Επιπλέον, στα ζώα υπό παθογόνο μόλυνση το γονίδιο της πρωτεΐνης *beta-1,3-glucan recognition protein 2* παρουσίασε αύξηση της έκφρασης κατά ~2-3 φορές, ενώ 5 ομόλογα των Κεκρωπινών (*CecropinA-B*) έδειξαν τάση αύξηση της έκφρασης από 1.5 έως 11 φορές. Τέλος, ένα ομόλογο γονίδιο της *Attacin1* βρέθηκε να μειορρυθμίζεται κατά >2 φορές, ενώ μόνο στα ζώα 4^{ου} σταδίου το γονίδιο του αντιμικροβιακού πεπτιδίου *Gloverin 2* αυξορρυθμίστηκε κατά 1.5 φορά (**Πίνακας 9**).

Πίνακας 9 Τα επίπεδα μεταβολής της έκφρασης βασικών γονιδίων της φυσικής ανοσίας μεταξύ εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης με τον ιό BmCPV. Οι πιθανές μεταβολές στην έκφραση μελετήθηκαν για γονίδια που ανήκουν στα μονοπάτια Toll, IMD, PPO, JAK/STAT, καθώς και για γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς αναγνώρισης αναπτυξιακών προτύπων και αντιμικροβιακά πεπτίδια. Για την εκτίμηση των μεταβολών στην έκφραση των μελετούμενων γονιδίων, υπολογίστηκε ο λόγος της τιμής RPKM για τα δείγματα που προέκυψαν από ζώα που μολύνθηκαν κατά το 2^{ο} ή το 4^{ο} προνυμφικό στάδιο (2inf ή 4inf), αντίστοιχα, προς την τιμή RPKM των αντίστοιχων δειγμάτων που προήλθαν από ζώα υπό εμμένουσα μόλυνση (2c ή 4c). Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι περιπτώσεις αυξορρύθμισης ή μειορρύθμισης κατά >1.5. Η συντομογραφία μ.α. αντιστοιχεί σε γονίδια που ήταν μη-ανιχνεύσιμα στα δεδομένα που προέκυψαν από το NGS**.**

Περιγραφή γονιδίου	ID γονιδίου	2inf RPKM	2c RPKM	4inf RPKM	4c RPKM	inf M.O.	c M.O.	$RPKM_{2inf}/RPKM_{2c}$	$RPKM_{4inf}/RPKM_{4c}$
Μονοπάτι Toll									
MYD88	BGIBMGA002869	9.68	8.97	7.46	8.64	8.57	8.80	1.08	0.86
RelA	BGIBMGA010496	1.49	1.35	0.89	1.04	1.19	1.20	1.10	0.85
RelB	BGIBMGA010497	1.83	1.38	1.24	1.21	1.54	1.30	1.32	1.03
Toll3-1	BGIBMGA014370	2.53	2.75	2.84	2.65	2.68	2.70	0.92	1.07
Toll3-2	BGIBMGA014373	23.77	25.15	25.60	36.49	24.68	30.82	0.95	0.70
	BGIBMGA014372	0.17	0.24	0.05	0.19	0.11	0.22	0.70	**0.24**
Toll3-3	BGIBMGA010304	0.04	0.05	0.02	0.04	0.03	0.05	0.75	**0.44**
Toll6	BGIBMGA011084	0.68	1.27	0.06	0.11	0.37	0.69	**0.54**	**0.53**
Toll7-1/7-2	BGIBMGA011037	1.56	1.12	0.37	0.20	0.97	0.66	1.40	**1.90**
Toll7-2	BGIBMGA011034	3.53	3.75	2.09	2.46	2.81	3.10	0.94	0.85
Toll7-3	BGIBMGA011038	0.64	0.32	0.00	0.02	0.32	0.17	**1.98**	0.00
Toll8	BGIBMGA011085	1.25	0.77	1.31	1.18	1.28	0.97	1.63	1.12
Toll9-1	BGIBMGA011216	17.21	16.50	20.90	30.49	19.05	23.49	1.04	0.69
Toll9-2	BGIBMGA008840	0.53	0.55	0.44	1.25	0.48	0.90	0.96	**0.35**
Toll10-2	BGIBMGA011025	1.85	2.28	0.50	0.28	1.17	1.28	0.81	**1.75**
Toll10-3	BGIBMGA011082	6.02	6.30	2.76	1.38	4.39	3.84	0.96	**2,00**
Toll12	BGIBMGA006244	0.81	0.96	0.29	0.10	0.55	0.53	0.84	**2.96**
Tube	BGIBMGA002494	11.09	10.93	8.48	9.71	9.78	10.32	1.01	0.87
Μονοπάτι IMD									
Ikkβ	BGIBMGA008389	21.76	22.15	15.64	18.38	18.70	20.26	0.98	0.85
Imd	BGIBMGA003655	2.42	2.30	1.75	2.20	2.08	2.25	1.05	0.79
Relish1	BGIBMGA002465	6.44	5.83	4.27	4.10	5.36	4.97	1.10	1.04
	BGIBMGA002464	1.16	1.31	3.01	3.74	2.08	2.53	0.88	0.80
Tak1	BGIBMGA008980	7.20	6.79	4.51	5.21	5.86	6.00	1.06	0.87
Μονοπάτι PPO									
Prophenoloxidase activating enzyme	BGIBMGA013746	0.25	0.12	0.17	0.39	0.21	0.26	**2.11**	**0.44**
Serine protease inhibitor	BGIBMGA009047	11.71	11.48	32.27	27.01	21.99	19.25	1.02	1.19
Serine protease inhibitor 6	BGIBMGA007729	1.57	1.52	1.03	0.48	1.30	1.00	1.03	**2.16**

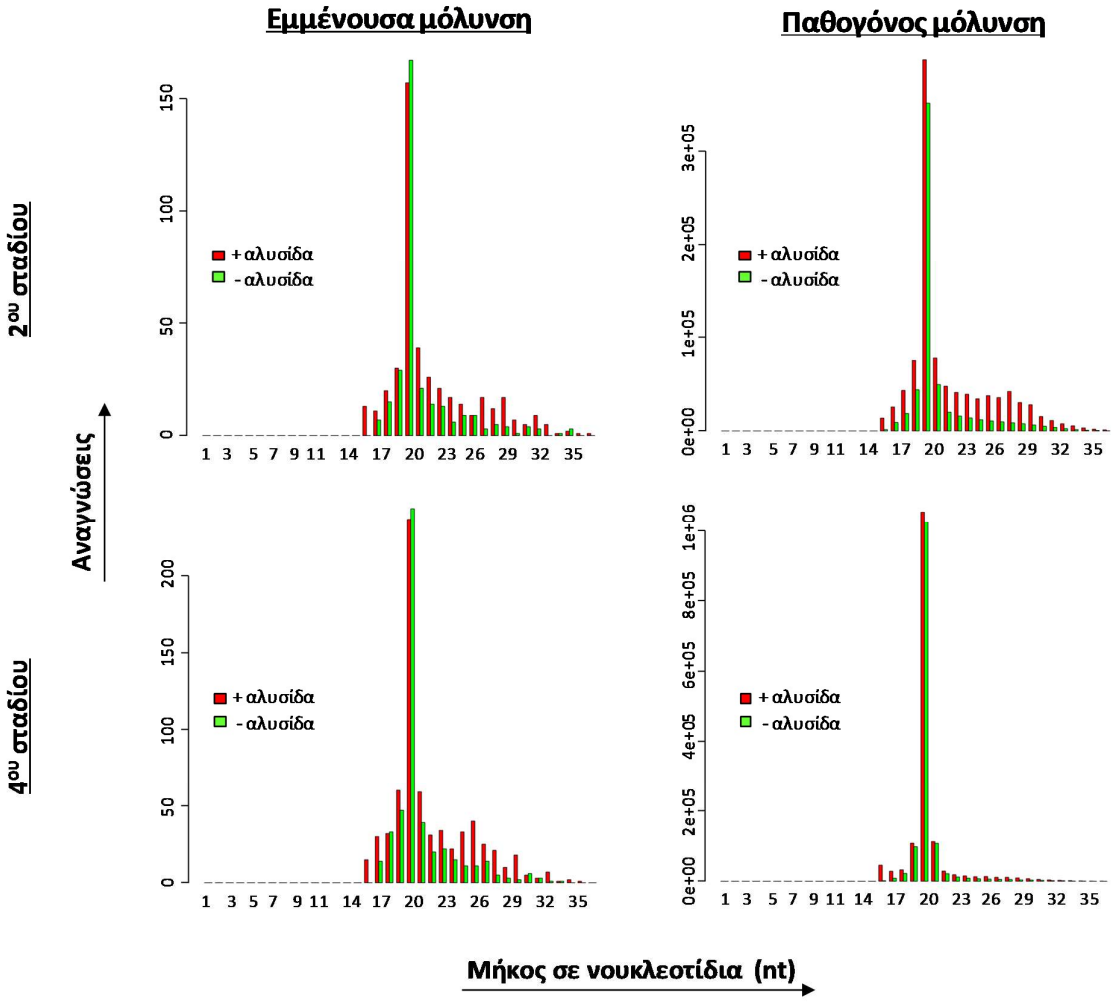
Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων									
C-type lectin 10	BGIBMGA006768	1.40	2.27	0.25	0.12	0.83	1.19	**0.62**	**2.14**
C-type lectin 21	BGIBMGA002288	0.23	0.29	0.23	0.11	0.23	0.20	0.79	**2.14**
Beta-1,3-glucan recognition protein 2	BGIBMGA011609	3.28	1.72	1.26	0.46	2.27	1.09	**1.91**	**2.74**
Peptidoglycan recognition protein (PGRP-L2)	BGIBMGA000584	2.92	2.67	1.81	2.58	2.36	2.63	1.09	0.70
Peptidoglycan recognition protein S6	BGIBMGA012866	0.52	0.29	0.38	0.29	0.45	0.29	**1.83**	1.32
Αντιμικροβιακά πεπτίδια									
Attacin1	BGIBMGA002739	0.72	0.19	0.27	0.00	0.50	0.10	**3.77**	μ.α.
Attacin1	BGIBMGA002747	0.86	2.29	0.14	0.31	0.50	1.30	**0.38**	**0.44**
CecropinA, CecropinB	BGIBMGA000024	0.22	0.22	0.11	0.00	0.16	0.11	1.00	μ.α.
	BGIBMGA000036	1.18	0.78	0.00	0.00	0.59	0.39	**1.51**	μ.α.
	BGIBMGA000037	6.12	3.54	0.00	0.00	3.06	1.77	**1.73**	μ.α.
	BGIBMGA000021	23.38	8.49	0.00	0.00	11.69	4.24	**2.75**	μ.α.
	BGIBMGA000038	2.15	0.78	0.00	0.00	1.07	0.39	**2.76**	μ.α.
	BGIBMGA000023	0.00	0.52	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	μ.α.
CecropinA, CecropinE	BGIBMGA006280	3.16	1.90	2.45	0.22	2.80	1.06	**1.67**	**11.18**
Defensin	BGIBMGA014360	0.00	0.16	0.08	0.11	0.04	0.14	**0.00**	**0.66**
Gloverin	BGIBMGA013866	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.16	**0.00**	μ.α.
	BGIBMGA013864	5.89	5.69	5.98	7.29	5.94	6.49	1.04	0.82
	BGIBMGA013863	0.17	0.37	0.21	0.19	0.19	0.28	**0.46**	1.10
Gloverin 2	BGIBMGA005658	1.52	1.53	12.97	8.28	7.25	4.91	0.99	**1.57**
Gloverin 3	BGIBMGA013803	0.06	0.08	0.17	0.13	0.11	0.10	0.75	1.32
Gloverin 4	BGIBMGA013865	0.16	0.14	0.05	0.11	0.10	0.13	1.13	**0.44**
Hemolin	BGIBMGA008736	0.11	0.44	0.22	0.31	0.16	0.37	**0.26**	0.69
Lebocin 1/2/3/4	BGIBMGA006775	0.22	1.15	1.24	0.79	0.73	0.97	**0.19**	**1.58**
Lysozyme	BGIBMGA007458	0.63	0.66	0.17	0.43	0.40	0.55	0.95	**0.39**
Moricin	BGIBMGA011495	0.67	0.44	0.11	0.33	0.39	0.39	**1.51**	**0.33**
Μονοπάτι JAK/STAT									
STAT	BGIBMGA001739	4.04	3.35	4.10	4.36	4.07	3.86	1.21	0.94

3.2.2.5 Ανίχνευση και ανάλυση των μικρών RNAs του ιού BmCPV (vsRNAs)

Το εργαλείο της αλληλούχισης NGS χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μικρών RNAs που εντοπίστηκαν σε δείγματα προνυμφών υπό παθογόνο ή εμμένουσα μόλυνση με τον BmCPV. Από τα δεδομένα που αφορούσαν στα μικρά RNAs επιλέχθηκαν μόνο εκείνες οι αναγνώσεις που αντιστοιχούσαν στο γονιδίωμα του ιού BmCPV, με αποτέλεσμα να προκύψουν συνολικά 4,487,417 αναγνώσεις και για τα τέσσερα δείγματα. Μετά από τη γραφική αναπαράσταση ως προς το μήκος τους σε νουκλεοτίδια (nt), παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα δείγματα είναι ξεκάθαρη η επικράτηση των vsRNAs με μήκος 20 νουκλεοτίδια, τα οποία είναι ισάριθμα κατανεμημένα και στις δύο αλυσίδες του γονιδιωματικού dsRNA (**Εικόνα 69**). Ωστόσο, όπως ήταν αναμενόμενο, η αφθονία των αναγνώσεων διέφερε σημαντικά μεταξύ παθογόνου και εμμένουσας μόλυνσης, καθώς στη δεύτερη περίπτωση οι μετρήσεις ήταν πολύ λιγότερες. Έτσι, οι αναγνώσεις των μικρών RNAs μήκους 20 νουκλεοτιδίων ήταν 749,372 και 2,079,497 για τα δείγματα υπό παθογόνο μόλυνση 2^{ου} και 4^{ου} σταδίου, αντίστοιχα. Στα δείγματα υπό εμμένουσα μόλυνση, οι αναγνώσεις ήταν 324 και 481 για τα δείγματα 2c και 4c, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, ο μηχανισμός του RNAi εμφανίζεται ενεργός ως προς την απόκρισή του έναντι της μόλυνσης με τον BmCPV, είτε αυτή είναι παθογόνος, είτε εμμένουσα. Επιπλέον, το πλήθος των παραγόμενων vsRNAs συσχετίζεται άμεσα με τη δριμύτητα της μόλυνσης. Ακόμη, το εύρημα ότι τα vsRNAs προέκυψαν τόσο από την κωδικοποιό (sense), όσο και από τη μη-κωδικοποιό αλυσίδα (antisense), αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι πηγή των vsRNAs δεν είναι απλά δομές δίκλωνου RNA που σχηματίζονται από το ιϊκό mRNA, και εν συνεχεία υδρολύονται από τη Dcr2, αλλά, αντίθετα, προέρχονται από το γονιδίωμα του ιού που έχει τη δομή dsRNA.

Η περαιτέρω έρευνα του θέματος στο εργαστήριό μας απέδειξε την εμπλοκή της Dcr2, αλλά και μίας άλλης άγνωστης RNάσης, στη δημιουργία των vsRNAs με προέλευση το dsRNA του BmCPV, τόσο κατά την εμμένουσα, όσο και κατά την παθογόνο μόλυνση, ενώ φαίνεται ότι η (+) αλυσίδα του S10 αποτελεί ξεχωριστή πηγή vsRNAs που παράγονται μέσω ενώ ξεχωριστού μονοπατιού. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην αποτελεσματικότητα των vsRNAs που να οφείλονται στη θέση τους σε σχέση με το γονιδίωμα (cold spots ή hot spots) (Zografidis et al., 2015).



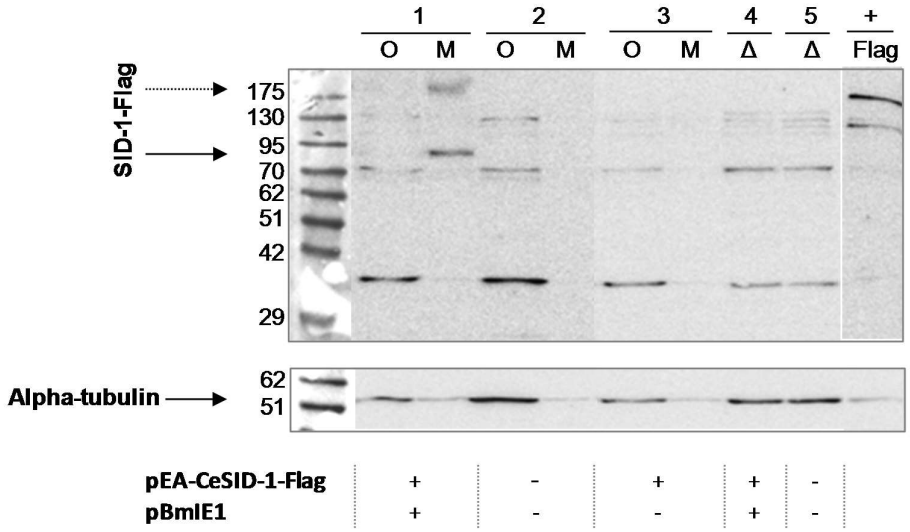
Εικόνα 69 Κατανομή των μικρών ιϊκών RNAs (vsRNAs) σύμφωνα με το μέγεθός τους σε δείγματα μεσεντέρου προνυμφών *B. mori* υπό συνθήκες εμμένουσας και παθογόνου μόλυνσης με τον ιό BmCPV. Στα γραφήματα απεικονίζονται οι αναγνώσεις των vsRNAs διαφορετικών μηκών που αντιστοιχούν στη θετική και την αρνητική αλυσίδα του γονιδιώματος του BmCPV σε δείγματα που προέκυψαν από προνύμφες που βρίσκονταν σε εμμένουσα μόλυνση, ή που μολύνθηκαν μέσω ένεσης κατά το 2ο ή το 4ο προνυμφικό στάδιο. Ο κάθετος άξονας αναπαριστά τους αριθμούς των αναγνώσεων, ενώ ο οριζόντιος άξονας το μήκος των vsRNAs σε νουκλεοτίδια (nt). Σε όλα τα δείγματα παρατηρείται μία σαφής κορυφή στο μέγεθος των 20 νουκλεοτιδίων. Αξιοσημείωτες διαφορές παρατηρούνται στους αριθμούς των αναγνώσεων μεταξύ εμμένουσας (150 - 200) και παθογόνου (3×10^5 - 1×10^6) μόλυνσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ dsRNA ΑΠΟ ΤΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΜΕΣΟ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

3.3.1 Μελέτη ετερόλογης έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CeSID-1-Flag του *Caenorhabditis elegans* σε κύτταρα Bm5

Όπως ήδη περιγράφηκε (§1.2.3), η πρωτεΐνη CeSID-1 συμμετέχει ενεργά στη μεταφορά των μορίων dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο εντός του κυττάρου στον *C. elegans*. Εδώ, για να μελετήσουμε την έκφρασή της στο σύστημα του *B. mori*, κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-CeSID-1-Flag, απουσία ή παρουσία του πλασμιδίου pBmIE1. Σκοπός ήταν να αποδειχθεί η ικανότητα του πλασμιδίου που φέρει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου *sid-1* του *C. elegans* να υπερεκφράζει την επιθυμητή πρωτεΐνη, ούτως ώστε αυτή να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά *in vitro* πειράματα εμβαπτισμού σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsRNA. Παράλληλα, ήταν επιθυμητό να προσδιοριστεί η ιδανική ποσότητα νουκλεϊκών οξέων που απαιτείται για την επαρκή έκφραση της CeSID-1-Flag στα κύτταρα Bm5, ώστε να είναι ανιχνεύσιμη μέσω ανοσοαποτύπωσης Western.



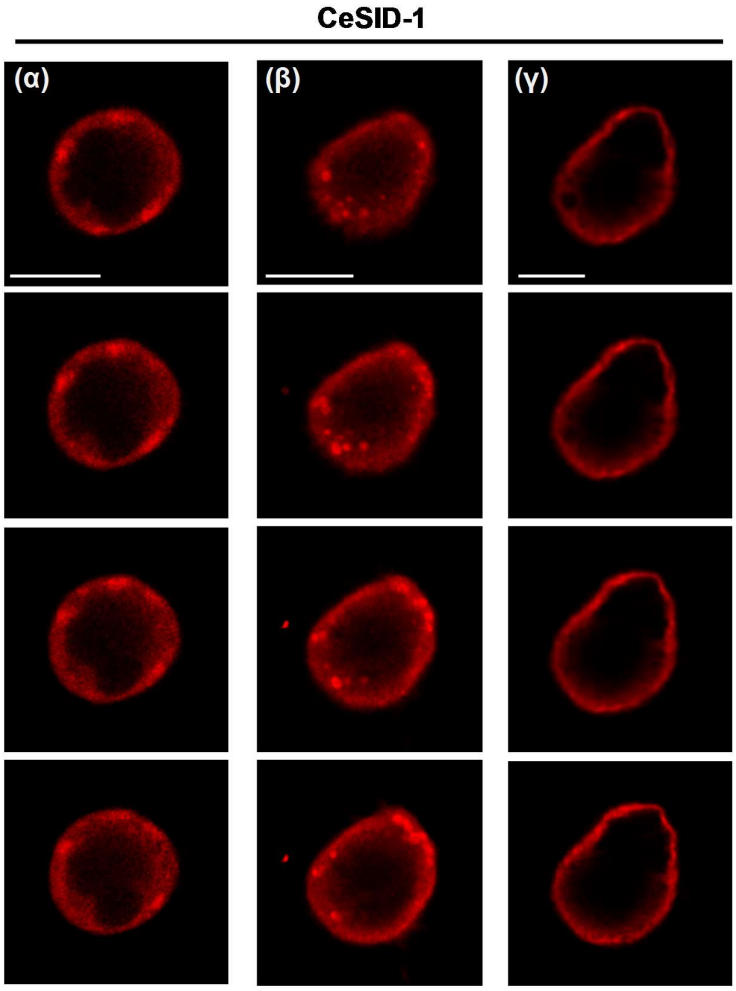
Εικόνα 70 Ανοσοαποτύπωση Western για την ανίχνευση της πρωτεΐνης CeSID-1. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με χρήση αντισωμάτων anti-flag (1:1000) και anti-rabbit HRP (1:2500) για την ανίχνευση της πρωτεΐνης CeSID-1 που εκφράζεται από το φορέα pEA-CeSID-1-Flag. Για τον έλεγχο φόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα rat anti-tubulin alpha HRP-conjugated (1:800). Οι διαδρομές 1 και 4 αντιστοιχούν σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το φορέα pEA-CeSID-1-Flag παρουσία του φορέα pBmIE1, ενώ η διαδρομή 3 αντιστοιχεί σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν μόνο με το φορέα pEA-CeSID-1-Flag. Η διαδρομές 2 και 5 αντιστοιχούν σε εκχυλίσματα κυττάρων που δε διαμολύνθηκαν. Ο: ολικό πρωτεϊνικό κλάσμα, Μ: μη-διαλυτό κλάσμα και Δ: διαλυτό κλάσμα.

Όπως προέκυψε, η πρωτεΐνη CeSID-1-Flag μεγέθους 88.94 kDa εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο μη-διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα (**Εικόνα 70**). Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με το δεδομένο ότι η CeSID-1 φυσιολογικά εκφράζεται διαμεμβρανικά (Winston et al., 2002), αφού οι μεμβράνες ανήκουν στα μη-διαλυτά μέρη του κυττάρου. Ωστόσο, φαίνεται ότι στα κύτταρα Bm5 σχηματίζει πιθανώς κάποιο διμερές, αφού παρατηρείται μία επιπλέον ζώνη πλησίον των 180 kDa, το οποίο αντιστοιχεί στο διπλάσιο του μεγέθους της CeSID-1-Flag. Άλλωστε, έχει παρατηρηθεί ότι σε κύτταρα S2 της *Drosophila* η CeSID-1 ενδέχεται να λειτουργεί ως πολυμερές μοριακό σύμπλοκο (Shih et al., 2009), ενώ οι εξωκυττάριες περιοχές των ομόλογων μορφών της SID-1 που προέρχονται από τον ποντικό ή τον άνθρωπο φαίνεται ότι σχηματίζουν μονο-, δι- ή τετραμερή (Li et al., 2015b; Pratt et al., 2012). Τέλος, όπως φαίνεται η συνδιαμόλυνση με το φορέα pBmIE1 είναι απαραίτητη για την έκφραση της CeSID-1-Flag στα κύτταρα Bm5, καθώς απουσία του pBmIE1 η πρωτεΐνη δεν είναι ανιχνεύσιμη μέσω ανοσοαποτύπωσης Western.

3.3.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης CeSID-1 του *C. elegans* σε κύτταρα Bm5

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η θέση της πρωτεΐνης CeSID-1 υποκυτταρικά σε κύτταρα μεταξοσκώληκα, ούτως ώστε να προκύψουν στοιχεία σχετικά με πιθανή λειτουργικότητά της στη διαμεμβρανική μεταφορά μορίων dsRNA, πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση της CeSID-1 σε κύτταρα Bm5 και προσδιορίστηκε η υποκυτταρική κατανομή της με χρήση ανοσοφθορισμού.

Όπως προέκυψε, η CeSID-1 εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια των κυττάρων Bm5 (**Εικόνα 71**), όπως άλλωστε παρατηρείται για την ίδια πρωτεΐνη στο *C. elegans*, αλλά και την ομόλογή της που προέρχεται από τα θηλαστικά σε κύτταρα ανθρώπου (Duxbury et al., 2005). Είναι, δε, αξιοσημείωτο ότι η CeSID-1 στην παρούσα μελέτη εμφανίζεται συχνά συσσωρευμένη σε φθορίζοντα μη-διαλυτά κοκκία που εντοπίζονται πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης και σπανιότερα προς το εσωτερικό του κυτταροπλάσματος (**Εικόνες 71α και 71β**), κατ' αντιστοιχία με το πρότυπο υποκυτταρικής έκφρασης της CeSID-1 σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων Sf9 (Xu et al., 2013d) και της LmSID-1 του εντόμου *Locusta migratoria* σε κύτταρα S2 (Luo et al., 2012).



Εικόνα 71 Υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης CeSID-1 του *C. elegans.* Κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης pEA-CeSID-1-Flag σε συνδυασμό με το φορέα pBmIE1. Η ανίχνευση του επιτόπου Flag έγινε με τα αντισώματα anti-Flag (1:200) και goat anti-rabbit-Alexa Fluor 568 (1:1000), ενώ η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό σαρωτικό μικροσκόπιο laser. Η CeSID-1-Flag εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (α και β) σε φθορίζουσες μη-διαλυτές κοκκιώδεις εστίες, ή (γ) διάχυτη πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης.

Ωστόσο, σε πειράματα ετερόλογης έκφρασης της CeSID-1 σε κύτταρα μεταξοσκώληκα BmN4 αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη ναι μεν εντοπίζεται υπό μορφή συσσωματωμάτων τα οποία όμως βρίσκονται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και όχι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Kobayashi et al., 2012; Mon et al., 2012). Πιθανώς, η υποκυτταρική κατανομή της CeSID-1 να διακρίνεται σε μεμβρανική ή κυτταροπλασματική ανάλογα με την αφθονία της πρωτεΐνης στο κύτταρο, αλλά και τις ανάγκες του κυττάρου προς αξιοποίηση της λειτουργία της. Έτσι, φαίνεται ότι η παρουσία της πρωτεΐνης CeSID-1 υπό τη μορφή μη-διαλυτών κοκκίων αποτελεί δομή-

κλειδί αναφορικά με το ρόλο της στη μεταφορά δίκλωνων RNA εντός και εκτός του κυττάρου, ενώ δεν αποκλείεται να διαθέτει κάποιον επιπρόσθετο λειτουργικό ρόλο.

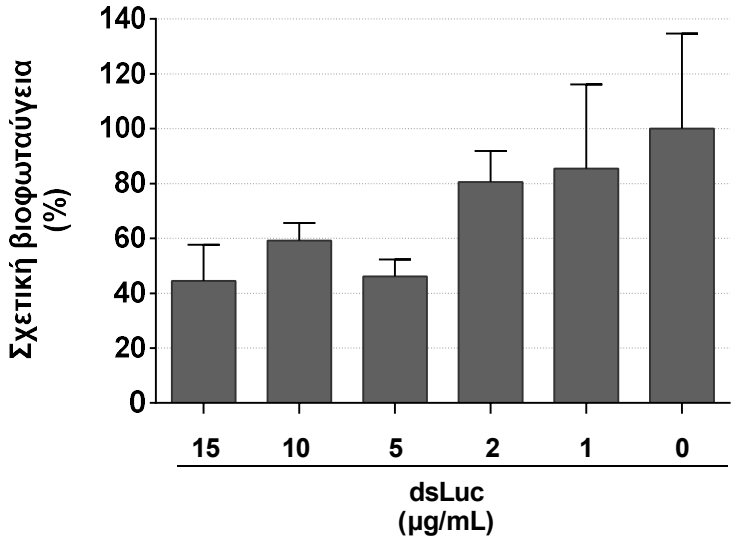
3.3.3 Διερεύνηση της δυνατότητας πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω εμβαπτισμού κυττάρων μεταξοσκώληκα σε μέσο που περιέχει dsRNA

Δεδομένης της απουσίας λειτουργικότητας της πρωτεΐνης SID-1 του μεταξοσκώληκα ως καναλιού μεταφοράς μορίων dsRNA, σκοπός ήταν να διερευνηθεί η ικανότητα των κυττάρων Bm5 να εσωτερικεύουν dsRNA με κάποιον άλλο τρόπο από το εξωκυττάριό τους μέσο και να το αξιοποιούν προς αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου του. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα στόχευσης διαφορετικών γονιδίων κάθε φορά, χρησιμοποιώντας μετασχηματισμένα ή μη κύτταρα Bm5, με κοινό χαρακτηριστικό τον εμβαπτισμό σε μέσο που περιέχει dsRNA σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0 έως 15 μg/mL.

3.3.3.1 Εμβαπτισμός κυττάρων L6Q-Luc σε μέσο που περιέχει dsLuc

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά L6Q-Luc, η οποία είναι μετασχηματισμένη ώστε να εκφράζει σταθερά το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον υποκινητή της ακτίνης και, έπειτα από επαγωγή του στοιχείου EcRE, το γονίδιο *gfp* (Swevers et al., 2004). Έτσι, πραγματοποιήθηκε εμβαπτισμός των κυττάρων L6Q-Luc σε μέσο που περιείχε dsLuc, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το μη-ειδικό dsMalE. Μετά το πέρας 48h, πραγματοποιήθηκε επαγωγή με τον αγωνιστή της εκδυσόνης RH-5992 (500 nM), και 24h αργότερα ακολούθησε το καθορισμένο πρωτόκολλο συλλογής και λύσης των κυττάρων.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 72**, παρατηρείται μία τάση μείωσης του ποσοστού (%) της σχετικής βιοφωταύγειας που παράγεται από κύτταρα εμβαπτισμένα σε υψηλές συγκεντρώσεις dsLuc (5-15 μg/mL) σε σχέση με την τιμή του μάρτυρα. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων.



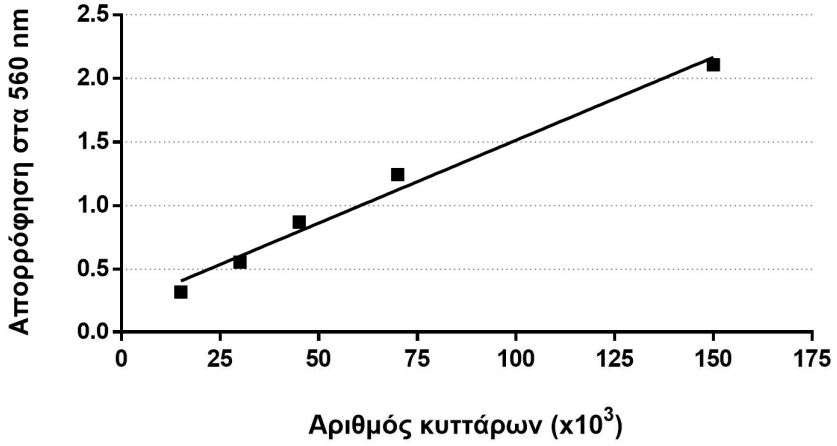
Εικόνα 72 Λειτουργική δοκιμασία έπειτα από εμβαπτισμό σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsLuc. Η λειτουργική δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα L6Q-Luc, τα οποία είναι μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν λουσιφεράση και GFP. Στο γράφημα απεικονίζονται οι μέσοι όροι της επί τοις εκατό (%) σχετικής βιοφωταύγειας που παράχθηκε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις (+SE) έπειτα από εμβαπτισμό των κυττάρων σε dsLuc. Η κανονικοποίηση των μετρήσεων έγινε ως προς το βιοφθορισμό των κυττάρων που δεν υπέστησαν επαγωγή με RH-5992. Κάθε στήλη παρουσιάζεται ως % ποσοστό βιοφωταύγειας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα για το dsLuc (0, που ισοδυναμεί με 15 μg/mL dsMalE και θεωρείται 100%). Από τη στατιστική ανάλυση που αναφέρεται στη σύγκριση του μέσου όρου (n=3) κάθε χειρισμού με το μέσο όρο του αρνητικού μάρτυρα δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

3.3.3.2 Εμβαπτισμός κυττάρων Bm5 σε μέσο που περιέχει dsVH-ATPase

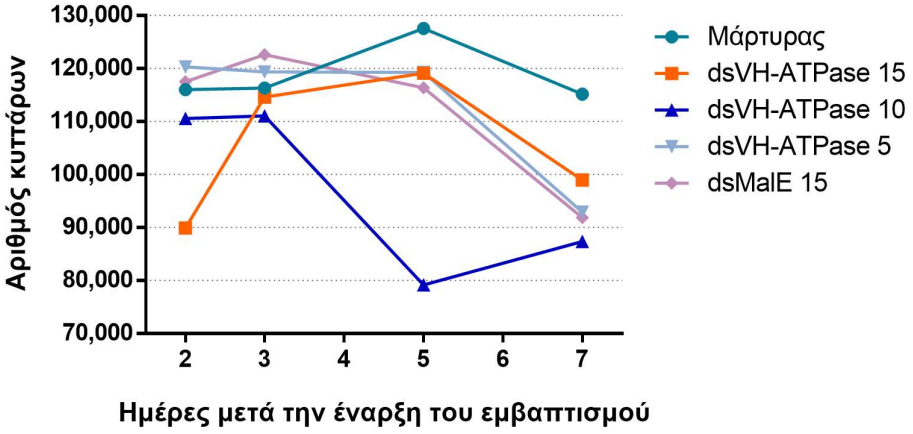
Στη συνέχεια, ακολούθησε έλεγχος των κυττάρων Bm5 ως προς την ικανότητα εσωτερίκευσης dsRNA εφαρμόζοντας dsRNA ειδικό ως προς το γονίδιο *VH-ATPase*. Το γονίδιο αυτό είναι κρίσιμο για την επιβίωση των ευκαρυωτικών οργανισμών, καθώς κωδικοποιεί για μία αντλία πρωτονίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης (Beyenbach and Wieczorek, 2006). Έτσι, στην περίπτωση που το dsRNA εισαγόταν επιτυχώς στα κύτταρα μέσω του εμβαπτισμού, αυτό θα είχε τοξική επίδραση που θα τα οδηγούσε στο θάνατο.

Για το σκοπό αυτό, κύτταρα Bm5 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε dsVH-ATPase ή μη ειδικό dsMalE, και ακολούθησε έλεγχος των κυττάρων για τις επόμενες

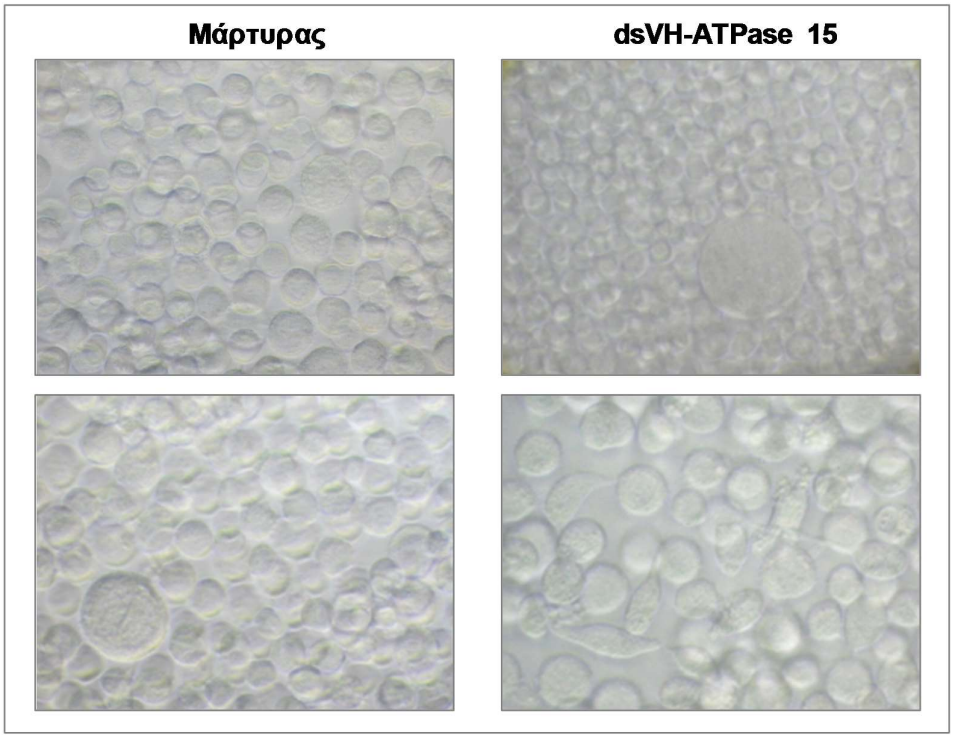
(α)


Απορρόφηση στα 560 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
25
50
75
100
125
150
175
Αριθμός κυττάρων (x10^3)

(β)


Αριθμός κυττάρων
130,000
120,000
110,000
100,000
90,000
80,000
70,000
2
3
4
5
6
7
Ημέρες μετά την έναρξη του εμβαπτισμού
Μάρτυρας
dsVH-ATPase 15
dsVH-ATPase 10
dsVH-ATPase 5
dsMalE 15

(γ)


Μάρτυρας
dsVH-ATPase 15

Εικόνα 73 Βιωσιμότητα κυττάρων Bm5 έπειτα από εμβαπτισμό τους σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsVH-ATPase. (α) Καμπύλη αναφοράς για τη δοκιμασία MTT, από την οποία προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων ανάλογα με την απορρόφησή τους στα 560 nm. (β) Δοκιμασία MTT σε κύτταρα Bm5 που εμβαπτίστηκαν σε dsVH-ATPase. (γ) Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου για κύτταρα εμβαπτισμένα σε dsVH-ATPase (15 μg/mL) ή μη εμβαπτισμένα κύτταρα, έπειτα από 6 ημέρες (συντελεστής μεγέθυνσης: 40x). Όλα τα αποτελέσματα αφορούν μία βιολογική επανάληψη.

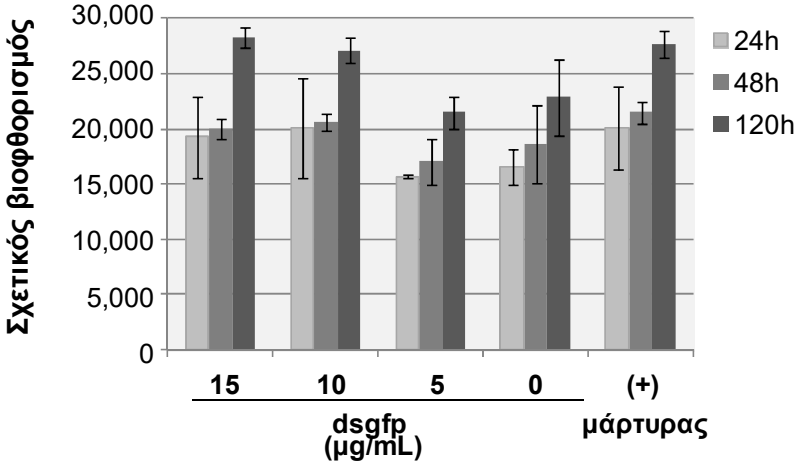
7 ημέρες. Έτσι, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βιωσιμότητας μέσω της δοκιμασίας MTT, καθώς και μικροσκοπική παρατήρηση. Παράλληλα, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων από τη δοκιμασία MTT (**Εικόνα 73α**).

Αν και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ είναι προκαταρκτικά, από τις μετρήσεις βιωσιμότητας φαίνεται να υπάρχει κάποια διαταραχή στην επιβίωση των κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις dsVH-ATPase (10 και 15 μg/mL), η οποία τελικά οδηγείται σε ισορροπία μετά το πέρας 7 ημερών σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα dsMalE 15 (**Εικόνα 73β**). Ωστόσο, πιθανώς και μόνο η παρουσία dsRNA σε τελική συγκέντρωση 15 μg/mL (ανεξαρτήτως εξειδίκευσης) στο θρεπτικό μέσο να έχει κυτταροτοξική δράση, καθώς παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων μεταξύ όλων των χειρισμών που περιλαμβάνουν dsRNA και του μάρτυρα που αντιπροσωπεύει κύτταρα Bm5 χωρίς dsRNA στο θρεπτικό μέσο. Στη μικροσκοπική ανάλυση, 6 ημέρες μετά την εφαρμογή του dsVH-ATPase σε συγκέντρωση 15 μg/mL δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην όψη των κυττάρων σε σχέση με τα μη-εμβαπτισμένα κύτταρα (**Εικόνα 73γ**).

3.3.3.3 Εμβαπτισμός κυττάρων L6Q σε μέσο που περιέχει dsgfp

Στην τρίτη προσπάθεια αποσιώπησης μέσω εμβαπτισμού σε dsRNA, κύτταρα L6Q τα οποία μπορούσαν να εκφράσουν την πρωτεΐνη GFP έπειτα από επαγωγή τους με RH-5992 (Swevers et al., 2004), καλλιεργήθηκαν σε μέσο που περιείχε dsRNA ειδικό ως προς το γονίδιο *gfp*. Σε περίπτωση επιτυχούς εισόδου του dsRNA στα κύτταρα μέσω του εμβαπτισμού και επεξεργασίας του από τον RNAi μηχανισμό, αυτό θα οδηγούσε σε μειωμένη παραγωγή βιοφθορισμού.

Τα κύτταρα L6Q καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε dsgfp ή μη-ειδικό dsMalE και ακολούθησε έλεγχος των κυττάρων για τις επόμενες 5 ημέρες. Μετά την ε-



Εικόνα 74 Ο σχετικός βιοφθορισμός που παράγεται έπειτα από εμβαπτισμό κυττάρων L6Q σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsgfp. Τα κύτταρα L6Q είναι μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν GFP, έπειτα από επαγωγή με RH-5992. Στο γράφημα απεικονίζονται οι μέσοι όροι του σχετικού βιοφθορισμού που παράχθηκε από δύο βιολογικές επαναλήψεις (±SE) έπειτα από εμβαπτισμό των κυττάρων σε dsgfp για 1-5 ημέρες. Η κανονικοποίηση των μετρήσεων έγινε ως προς το βιοφθορισμό των κυττάρων που δεν υπέστησαν επαγωγή με RH-5992.

παγωγή με RH-5992 (500 nM), έγινε μέτρηση του παραγόμενου βιοφθορισμού σε φθορισμόμετρο Tecan (Switzerland).

Από το γράφημα, δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών με ειδικό ή μη-ειδικό dsRNA (**Εικόνα 74**). Βέβαια, το στοιχείο EcRE μετά την προσθήκη της ορμόνης καθίσταται πολύ ισχυρό ώστε να επάγει έντονα την έκφραση του γονιδίου *gfp* που ακολουθεί. Έτσι, ενδεχομένως το mRNA του *gfp* να παράγεται σε σταθερά υψηλές ποσότητες ώστε ακόμα και αν υπάρχουν siRNA-*gfp* αυτά να μην μπορούν να καταστείλουν σημαντικά την έκφρασή του. Συνεπώς, η εφαρμογή χαμηλότερης συγκέντρωσης RH-5992, αλλά και η μέτρηση νωρίτερα από τις 24 ώρες ίσως μπορέσει να αναδείξει ακόμα και μικρά ποσοστά αποσιώπησης του γονιδίου *gfp*.

3.3.3.4 Έλεγχος των πρωτεϊνών BmR2D2 και BmTranslin2 ως προς την πιθανή συμμετοχή τους στην ενίσχυση της γονιδιακής αποσιώπησης έπειτα από εμβαπτισμό κυττάρων σε μέσο που περιέχει dsRNA

Με σκοπό την επίτευξη ενός σταθερού κυτταρικού συστήματος για τον έλεγχο της ικανότητας πρόσληψης dsRNA από το θρεπτικό μέσο και, μέσω αυτού, αποτελεσματικής αποσιώπησης στα κύτταρα μεταξοσκώληκα, πραγματοποιήθηκε

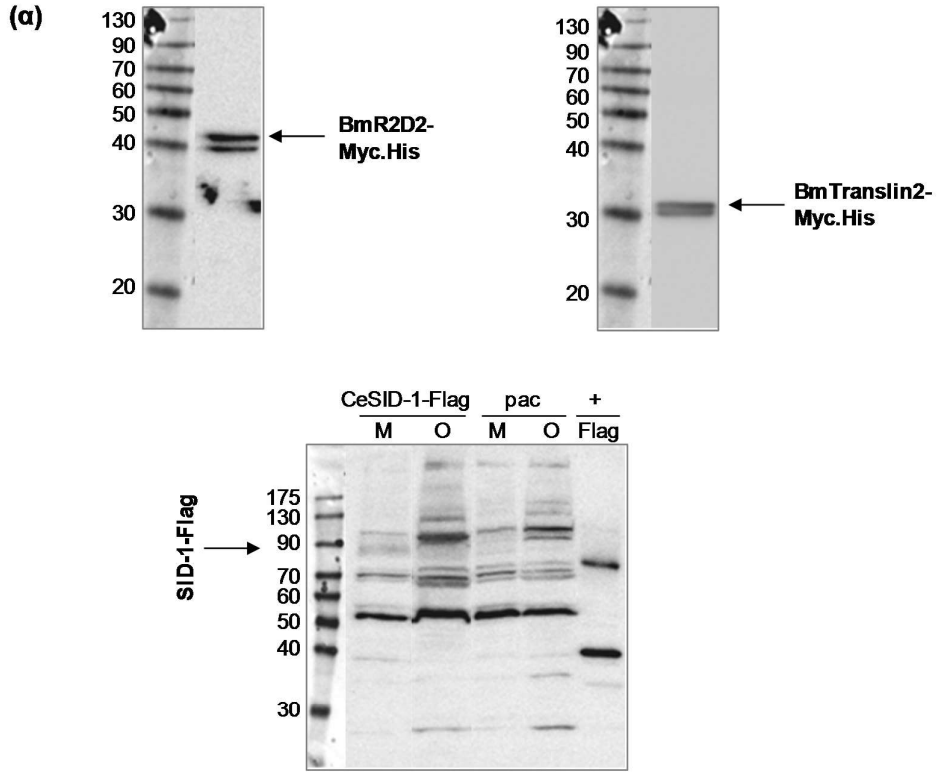
σταθερός μετασχηματισμός κυττάρων Bm5 με κατάλληλα πλασμίδια. Μέσω του μετασχηματισμού αυτού ήταν επιθυμητό να ελεγχθούν πρωτεΐνες του RNAi μηχανισμού που όμως δεν εκφράζονται φυσιολογικά στα κύτταρα Bm5 (Swevers et al., 2011), και άρα είναι πιθανό η έλλειψη αυτή να σχετίζεται με μειωμένη ή ανύπαρκτη ικανότητα πρόκλησης αποσιώπησης μετά από απλό εμβαπτισμό σε μέσο που περιέχει dsRNA.

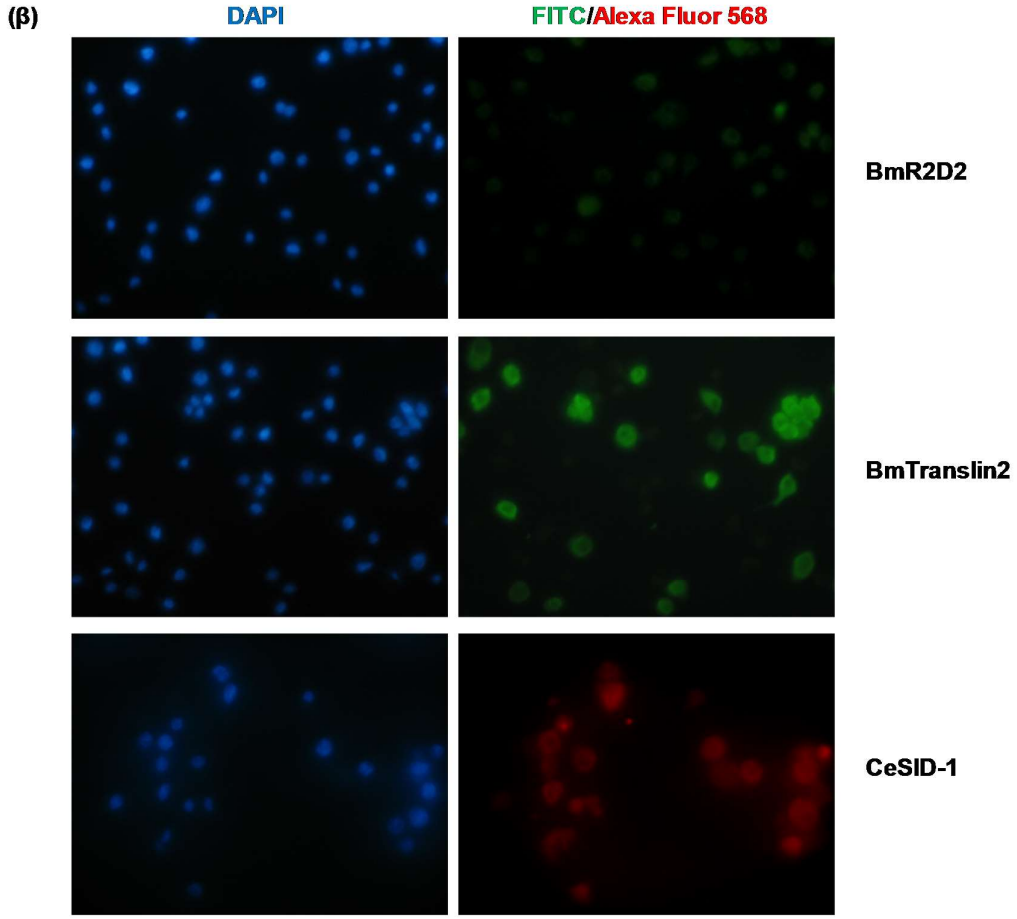
Ειδικότερα, οι προς έλεγχο παράγοντες ήταν τα γονίδια *BmR2D2* (§1.2.6 και 1.2.7) και *BmTranslin2* (§3.1.2.3), ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *CeSID-1* του *C. elegans*. Έτσι, κύτταρα Bm5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς pEcRE.bA.luc, pbA/EcRE.gfp, pBmIE1 και pEA.pac, ενώ για το διαχωρισμό των 3 διαφορετικών σειρών χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ένας από τους ακόλουθους φορείς: pEA-BmR2D2-Myc.His, pEA-BmTranslin2-Myc.His ή pEA-CeSID-1-Flag. Τέλος, για την κατασκευή μίας τέταρτης κυτταρικής σειράς ως αρνητικού μάρτυρα, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEA.pac σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η επιλογή και διατήρηση των μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών έγινε σε πουρομυκίνη (15 μg/mL).

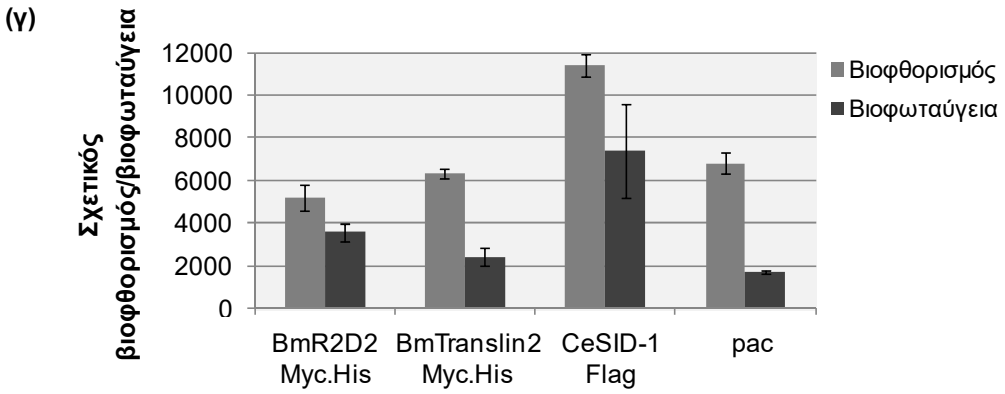
Ακολούθως, η επιτυχία επίτευξης των σταθερών κυτταρικών σειρών ελέγχθηκε μέσω ανάλυσης ανοσοαποτυπώματος Western, όπου επιβεβαιώθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών που ήταν σημασμένες με τον κατάλληλο επίτοπο (Myc και Flag) (**Εικόνα 75α**). Για τις πρωτεΐνες BmR2D2-Myc.His και BmTranslin2-Myc.His είναι εμφανές ότι εκφράζονται επαρκώς, ενώ για τη CeSID-1-Flag εμφανίζεται μία διάχυτη αλλά αρκετά εμφανής ζώνη στο σωστό μοριακό βάρος στο δείγμα του μη-διαλυτού κλάσματος (M).

Στη συνέχεια, μέσω ανοσοφθορισμού ανιχνεύθηκε εκ νέου η έκφραση των σημασμένων πρωτεϊνών, με την BmTranslin2-Myc.His να εμφανίζει ικανοποιητική έκφραση τουλάχιστον σε σχέση με τη BmR2D2-Myc.His (**Εικόνα 75β**). Αναφορικά με τη CeSID-1-Flag, σε αντίθεση με το ανοσοαποτύπωμα Western, στον ανοσοφθορισμό είναι πιο εμφανής η έκφρασή της.

Τέλος, για να ελεγχθεί η έκφραση της λουσιφεράσης και της πρωτεΐνης GFP, κύτταρα από κάθε σειρά καλλιεργήθηκαν και στην συνέχεια δέχτηκαν επαγωγή με την ορμόνη RH-5992 (500 nM). Εν συνεχεία, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν, για να μετρηθεί η παραγόμενη βιοφωταύγεια και ο βιοφθορισμός τους. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 75γ**, αποδεικνύεται ότι όλες οι κυτταρικές σειρές (συμπεριλαμβανομένου και του αρνη-


(α)
130
90
70
60
50
40
30
20
BmR2D2-
Myc.His
BmTranslin2-
Myc.His
CeSID-1-Flag
pac
+
M
O
M
O
Flag
SID-1-Flag
175
130
90
70
60
50
40
30


(β)
DAPI
FITC/Alexa Fluor 568
BmR2D2
BmTranslin2
CeSID-1



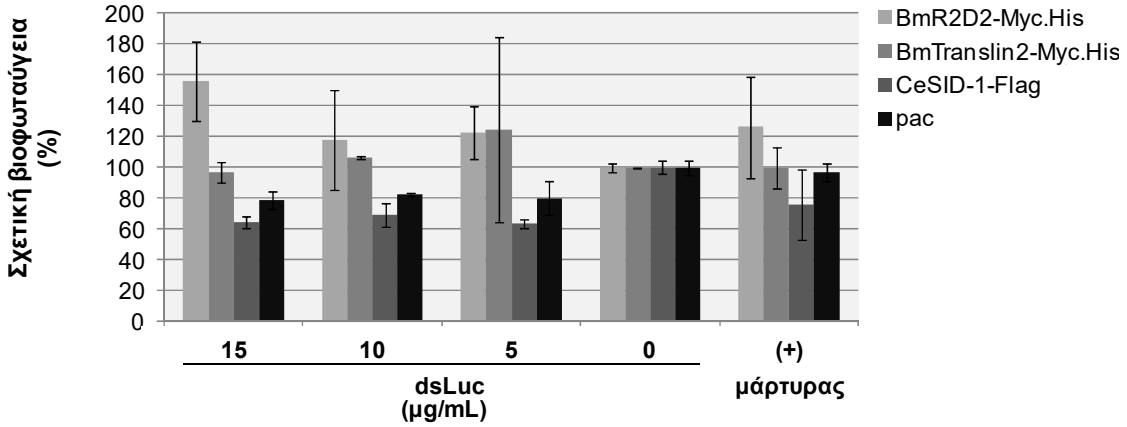
Εικόνα 75 Επιβεβαίωση της επιτυχούς κατασκευής τεσσάρων κυτταρικών σειρών για χρήση τους σε πειράματα εμβαπτισμού σε μέσο που περιέχει dsRNA. Οι σειρές που κατασκευάστηκαν εκφράζουν, μεταξύ άλλων, κάποια από τις πρωτεΐνες BmR2D2-Myc.His, BmTranslin2-Myc.His, CeSID-1-Flag και pac. (α) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης Western για τις σειρές που εκφράζουν κάποια από τις σημασμένες με επίτοπο Myc.His ή Flag πρωτεΐνες. (β) Δοκιμή ανοσοφθορισμού για τις σειρές που εκφράζουν κάποια από τις σημασμένες με επίτοπο Myc.His ή Flag πρωτεΐνες. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται η χρώση των πυρήνων με DAPI (μπλε χρώση). Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η ανίχνευση του επιτόπου Myc.His με χρήση των αντισωμάτων anti-Myc (1:200) και anti-mouse-FITC (1:200, πράσινη χρώση) ή του επιτόπου Flag με χρήση των αντισωμάτων anti-Flag (1:200) και anti-rabbit Alexa Fluor 568 (1:1000, κόκκινη χρώση). Η παρατήρηση έγινε με μικροσκόπιο προσπίπτουσας ακτινοβολίας. (γ) Μέτρηση του βιοφθορισμού και της βιοφωταύγειας που παράγονται από όλες τις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές με χρήση του φθορισμόμετρου Tecan (Switzerland).

τικού μάρτυρα pac) παράγουν λουσιφεράση και GFP. Βέβαια, είναι γεγονός ότι υπάρχουν διακυμάνσεις στα μεγέθη ανάμεσα στις διαφορετικές σειρές, όμως αυτό δε συνιστά απαραίτητα πρόβλημα, καθώς όλες οι μετρήσεις πάντα κανονικοποιούνται πρώτα ως προς τα κύτταρα μάρτυρες (που δεν έχουν δεχτεί κανέναν χειρισμό) της κάθε σειράς ξεχωριστά.

Στη συνέχεια, με σκοπό την αποσιώπηση του γονιδίου της λουσιφεράσης που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του επαγόμενου στοιχείου EcRE στις μετασχηματισμένες σειρές που ήδη περιγράφηκαν, πραγματοποιήθηκε εμβαπτισμός κυττάρων κάθε κατηγορίας σε μέσο που περιείχε dsLuc σε συγκεντρώσεις από 0 έως 15 μg/mL. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 2.5 ημέρες, έγινε επαγωγή τους με RH-5992 (500 nM), και ακολούθησε η συλλογή τους 24h αργότερα. Ακολουθώντας το σύνηθες πρωτόκολλο κυτταρικής λύσης, τελικά μετρήθηκε ο βιοφθορισμός και η βιοφωταύγειά τους. Για την εξαγωγή των τιμών που απεικονίζονται στο γράφημα, αρχικά υπολογίστηκε η σχετική

βιοφωταύγεια κάθε δείγματος και εν συνεχεία εκφράστηκε ως % ποσοστό του μάρτυρα που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση dsLuc ίση με 0 μg/mL.

Από την **Εικόνα 76** αρχικά προκύπτει ότι η CeSID-1-Flag λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας, αν και όχι με εντυπωσιακά ποσοστά αποσιώπησης (~36%). Επιπλέον, ο αρνητικός μάρτυρας pac δίνει σταθερά ποσοστά αποσιώπησης περίπου στο 20%, με σχετικά μικρές αποκλίσεις. Τέλος, τα αποτελέσματα για τις πρωτεΐνες BmR2D2-Myc.His και BmTranslin2-Myc.His δεν είναι ενθαρρυντικά ως προς την πιθανή ενίσχυση της γονιδιακής αποσιώπησης. Προκειμένου ειδικά για το χειρισμό με την BmR2D2-Myc.His, όχι μόνο δεν παρουσιάζει μειωμένα ποσοστά βιοφωταύγειας, αλλά αντίθετα διαφαίνεται μία τάση αύξησής της. Ωστόσο, επειδή τα αποτελέσματα δεν προέρχονται από τον απαραίτητο αριθμό βιολογικών επαναλήψεων, στην παρούσα φάση δεν μπορούν να εξαχθούν αξιοποιήσιμα και τελικά συμπεράσματα.



Εικόνα 76 Η % σχετική βιοφωταύγεια που παράγεται έπειτα από εμβαπτισμό μετασχηματισμένων κυττάρων Bm5 σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsLuc. Τα κύτταρα των 4 σειρών είναι μετασχηματισμένα ώστε να εκφράζουν λουσιφεράση και GFP, έπειτα από επαγωγή με RH-5992. Στο γράφημα απεικονίζονται οι μέσοι όροι του σχετικού βιοφθορισμού που παράχθηκε από μία έως δύο βιολογικές επαναλήψεις (±SE), έπειτα από εμβαπτισμό των κυττάρων σε dsLuc για 3.5 ημέρες. Η κανονικοποίηση των μετρήσεων έγινε ως προς την % σχετική βιοφωταύγεια των κυττάρων του χειρισμού 0 μg/mL dsLuc.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ RNAi ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

Στο πρώτο μέρος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής διερευνήθηκαν οι παράγοντες που αποτελούν τα κύρια συστατικά του RNAi μηχανισμού στο μεταξοσκώληκα *B. mori* και ο βαθμός στον οποίον επηρεάζουν την αποδοτικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης. Ειδικότερα, αρχικά «παραπλανώντας» τον RNAi μηχανισμό μέσω χορήγησης ειδικά σχεδιασμένων μορίων dsRNA έναντι πιθανών παραγόντων που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη λειτουργία του RNAi μηχανισμού, μελετήθηκε η επίδραση της στοχευμένης αποσιώπησης ορισμένων γονιδίων-κλειδιών στη λειτουργικότητα του μηχανισμού του RNAi *in vitro*. Επεκτείνοντας τη μελέτη αυτή, και με σκοπό να εξαχθούν σαφέστερα συμπεράσματα αναφορικά με τη λειτουργία που επιτελούν ορισμένα γονίδια-κλειδιά του μονοπατιού siRNA, διερευνήθηκε ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους έπειτα από ετερόλογη υπερέκφραση σε κύτταρα Bm5. Ακόμη, αξιοποιώντας δεδομένα που προέκυψαν από την αρχική ανάλυση του RNAi μηχανισμού, εξετάστηκε λεπτομερέστερα ο μη-συμβατικός ρόλος που πιθανώς κατέχουν παράγοντες του μονοπατιού piRNA στην αποσιωπητική διαδικασία που πυροδοτείται από μόρια dsRNA. Τέλος, μελετήθηκε *in vivo* το πρότυπο έκφρασης των βασικών siRNA γονιδίων σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, ιστούς και στελέχη μεταξοσκώληκα, και ακολούθησαν δοκιμές ενέσεων dsRNA με σκοπό την πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης.

Λειτουργική ανάλυση της απόκρισης του RNAi μηχανισμού σε κύτταρα Bm5

Στα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ, αξιοποιήθηκε η αποσιωπητική απόκριση που προκαλείται όταν μόρια dsRNA εισαχθούν τεχνητά στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (π.χ. μέσω διαμόλυνσης), λειτουργώντας με αυτόν τον τρόπο ως ερέθισμα για τον RNAi μηχανισμό. Ο λόγος ενασχόλησης με αυτόν το μηχανισμό ήταν η ανάγκη να διερευνηθούν οι πιθανοί περιοριστικοί παράγοντες που θα μπορούσαν να δώσουν απάντηση στην παρατηρούμενη ανομοιογένεια στην RNAi απόκριση που ανιχνεύεται στα *in vivo* πειράματα πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης στα Λεπιδόπτερα (Swevers et al., 2013b; Terenius et al., 2011). Έτσι, αξιοποιώντας τα σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στη *Drosophila*, πραγματοποιήθηκε σάρωση μέσω της τεχνολογίας του *in vitro* RNAi αρκετών ομόλογων παραγόντων που θεωρήθηκαν ως

υποψήφιοι βασικοί συντελεστές της dsRNA-εξαρτώμενης γονιδιακής αποσιώπησης στο μεταξοσκώληκα. Η πειραματική διαδικασία, που τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση παραγόντων που εμπλέκονται σε διαδικασίες του RNAi σε διάφορους οργανισμούς, περιγράφεται ως «RNAi του RNAi μηχανισμού» (**Εικόνα 15**).

Ένα βασικό εύρημα ήταν ότι και τα τρία κύρια μονοπάτια των μικρών RNA βρέθηκαν να εμπλέκονται στη γονιδιακή αποσιώπηση που προκαλείται μέσω dsRNA στα κύτταρα Bm5, αφού η αποσιώπηση των γονιδίων *BmAgo1* (μονοπάτι miRNA), *BmAgo2*/*BmDcr2* (μονοπάτι siRNA) και *BmAgo3* (μονοπάτι piRNA) προκάλεσε σημαντική παρεμπόδιση της αποσιώπησης της λουσιφεράσης μέσω RNAi, όπως αυτή εκτιμήθηκε εμμέσως από την παραγόμενη (%) σχετική βιοφωταύγεια (**Εικόνα 17 και Πίνακας 4**). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία, η οποία αποκάλυψε τους σημαντικούς RNAi παράγοντες στα κύτταρα Bm5, η επαναφορά της δραστικότητας της λουσιφεράσης δεν έφτασε ποτέ σε επίπεδα μεγαλύτερα του 65% της μέγιστης βιοφωταύγειας. Ίσως λοιπόν, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί, να υπάρχουν τεχνικοί περιορισμοί που εμποδίζουν την πλήρη αποσιώπηση ενός γονιδίου, του οποίου η έκφραση είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του ίδιου του μηχανισμού της γονιδιακής αποσιώπησης (Ulvila et al., 2006).

Σε μία πρόσφατη μελέτη που αφορούσε σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα BmN4 του *B. mori* που εξέφραζαν τις πρωτεΐνες CeSID-1 και λουσιφεράση επιβεβαιώθηκε, έπειτα από εμβαπτισμό τους σε μέσο που περιείχε dsRNA, η συμμετοχή των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* στην dsRNA-εξαρτώμενη αποσιώπηση, ενώ πιο ήπια αλλά υπαρκτή φαίνεται να είναι η συνεισφορά των *BmR2D2* και *BmLoqs* (Zhu et al., 2015). Οι παρατηρούμενες διαφορές σε σχέση με τα αποτελέσματα αυτής της Διδακτορικής Διατριβής ενδεχομένως να σχετίζονται με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των dsRNAs στα κύτταρα, δηλαδή τον εμβαπτισμό αντί της διαμόλυνσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, με εξαίρεση το γονίδιο *Ago1*, τα ευρήματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με μία παρόμοια μελέτη που αφορά σε αιμοκύτταρα κουνουπιού *A. gambiae*, όπου τα γονίδια *Ago2*, *Ago3* και *Dcr2* βρέθηκαν να είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του RNAi μηχανισμού (Hoa et al., 2003). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ένα ερέθισμα μη-ειδικού dsRNA έχει τη δυνατότητα να επάγει την έκφραση ορισμένων γονιδίων-κλειδιών του RNAi μηχανισμού (*Dcr2*, *Ago1* και *Ago2*) στα έντομα (Garbutt and

Reynolds, 2012; Liu et al., 2013b; Lozano et al., 2012), αλλά και στα αρθρόποδα, γενικότερα (Labreuche et al., 2010).

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα και την εξειδίκευση της αποσιώπησης, αρκετές παρατηρήσεις μας επιβεβαιώνουν την επιτυχία που σχετίζεται με αυτές τις παραμέτρους προκειμένου για την πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα Bm5. Συγκεκριμένα, η συνδιαμόλυνση ειδικών dsRNAs με τους αντίστοιχους φορείς των βασικών siRNA παραγόντων κατέστειλε κατά 90-100% την έκφραση των στοχευόμενων ανασυνδυασμένων πρωτεΐνών (**Εικόνα 19**). Ένα άλλο πείραμα απέδειξε ότι ο φορέας αναφοράς της λουσιφεράσης είναι δυνατό να κατασταλεί κατά περίπου 50%, χρησιμοποιώντας απειροελάχιστη ποσότητα του dsLuc (6.25 ng/mL) στο μίγμα διαμόλυνσης (**Εικόνα 22**). Όσον αφορά δε στην εξειδίκευση, στα πειράματα παροδικής συνδιαμόλυνσης παρατηρήθηκε ότι, τουλάχιστον για τα τέσσερα από τα γονίδια που ελέγχθηκαν, το κάθε ένα ειδικό dsRNA προκάλεσε ολοκληρωτική καταστολή της έκφρασης του στόχου του, ενώ κανένα από τα υπόλοιπα 9 μη-ειδικά dsRNAs που είχαν ως στόχο κάποιον άλλο παράγοντα του RNAi δεν κατάφερε να επηρεάσει την πρωτεϊνική έκφραση με μη-ειδικό τρόπο (**Εικόνα 20**). Έτσι, αποκλείεται για παράδειγμα το ενδεχόμενο η παρεμπόδιση του μηχανισμού της αποσιώπησης μέσω του dsAgo1 ή του dsAgo3 να δημιουργήσει υπόνοιες για την ύπαρξη ενδεχόμενης διασταυρούμενης αποσιώπησης του συγγενούς παράγοντα του siRNA μονοπατιού BmAgo2. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά ενδυναμώνουν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από το εύρημα ότι μέλη και από τα τρία μονοπάτια του RNAi μηχανισμού φαίνεται να εμπλέκονται στον αποσιωπητικό μηχανισμό.

Σύμφωνα με το καθιερωμένο μοντέλο που ισχύει για τη *Drosophila*, η εμπλοκή των *Dcr2* και *Ago2* στην αποσιωπητική διαδικασία ήταν κάτι αναμενόμενο, αφού αυτά τα δύο γονίδια κωδικοποιούν για τους κύριους RNAi παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν την πρόκληση αποσιώπησης ως απόκριση στη χορήγηση εξωγενών dsRNA μέσω του μονοπατιού siRNA (Siomi and Siomi, 2009). Ακόμη, τα στοιχεία που υποδεικνύουν σημαντική αλλά λιγότερο ισχυρή εμπλοκή του *BmAgo1* θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως μερική αλληλεπικάλυψη των μονοπατιών siRNA και miRNA σε επίπεδο RISC, όπως άλλωστε έχει παρατηρηθεί στη *Drosophila* (Tomari et al., 2007).

Στον αντίποδα της αναμενόμενης συμμετοχής των *BmDcr2* και *BmAgo2* στην αποσιωπητική διαδικασία, πολλά ερωτήματα γεννήθηκαν από την απουσία απόδειξης

της εμπλοκής κάποιας πρωτεΐνης δέσμευσης του dsRNA (dsRBP: BmLoqs και BmR2D2) στην απόκριση του RNAi μηχανισμού μετά από τον έλεγχο όλων των κύριων παραγόντων του RNAi μηχανισμού στην παρούσα εργασία, αφού η ύπαρξη μίας dsRBP θεωρείται απαραίτητη και για τα δύο μονοπάτια miRNA και siRNA στη *Drosophila* (Liu et al., 2003; Tomari et al., 2007). Βέβαια, το γεγονός ότι το γονίδιο *BmR2D2* δεν εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα Bm5 (Swevers et al., 2011) συνηγορεί στο περιττό της παρουσίας του σε σχέση με την αποσιωπητική διαδικασία. Προκειμένου τώρα για το *BmLoqs*, ενδέχεται να αντισταθμίζει την απουσία του *BmR2D2*, όπως έχει δειχθεί και στη *Drosophila* (Marques et al., 2010), ενώ δεν αποκλείεται η αποσιώπησή του στα πειράματά μας μέσω του ειδικά σχεδιασμένου dsRNA να ήταν ανεπαρκής ως προς την πρόκληση φαινοτυπικών αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *BmLoqs* θα μπορούσε πιθανώς υπό συνθήκες αυξημένων αναγκών του RNAi μηχανισμού να εκφράζεται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα γονίδια *Dicer* ή *Argonaute*, ούτως ώστε τελικά να μην επηρεάζεται από τη χορήγηση του dsLoqs. Κατ' επέκταση, και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ενδεχομένως, η BmLoqs να παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με άλλους παράγοντες του RNAi μηχανισμού.

Από την άλλη πλευρά, η απουσία εμπλοκής κάποιας από τις γνωστές dsRBPs στον μηχανισμό RNAi των κυττάρων Bm5 θα μπορούσε να ερμηνευτεί μέσω δύο εναλλακτικών μηχανισμών, οι οποίοι μπορεί να δρουν εκ παραλλήλου. Ειδικότερα, μία άλλη άγνωστη πρωτεΐνη dsRBP μπορεί να εκτελεί τη λειτουργία της BmR2D2 ή της BmLoqs στα κύτταρα Bm5, ή ακόμα ενδέχεται να υπάρχει ένα εναλλακτικό μονοπάτι αποσιώπησης μέσω RNA, το οποίο να δρα παράλληλα με το μονοπάτι siRNA και να μην απαιτεί την ύπαρξη κάποιας πρωτεΐνης δέσμευσης του dsRNA. Η πρώτη υπόθεση ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η εκτοπική έκφραση της BmR2D2 δε διεγείρει τον αποσιωπητικό μηχανισμό που πυροδοτείται μέσω μορίων dsRNA (**Εικόνα 22**). Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών BmDcr2 ή BmAgo2 προκαλεί επίσης μικρή βελτίωση στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού, η οποία παρατηρείται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις του dsLuc, υποδεικνύοντας ότι οι BmDcr2 και BmAgo2 βρίσκονται κοντά στα βέλτιστα επίπεδα έκφρασής τους για την επίτευξη ενός αποτελεσματικού RNAi μηχανισμού. Η δεύτερη υπόθεση θα μπορούσε να συσχετιστεί με το εύρημα ότι η αποσιώπηση του *BmAgo3*, ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη Argonaute του μονοπατιού piRNA, το οποίο δεν εξαρτάται από κάποια πρωτεΐνη Dicer, προκάλεσε

σημαντική επαναφορά στην παρατηρούμενη βιοφωταύγεια (30.5%, **Εικόνα 17 και Πίνακας 4**) και άρα στην ενεργότητα της λουσιφεράσης. Συνεπώς, η BmAgo3 μπορεί να είναι το μόριο-κλειδί που επεξεργάζεται το dsRNA μέσω ενός άγνωστου μονοπατιού, για το οποίο δεν απαιτείται η συνεργιστική δράση των BmDcr2 και BmR2D2.

Προκειμένου για το γονίδιο *BmAgo3*, η συμμετοχή του στην αποσιωπητική απόκριση δεν ήταν αναμενόμενη, καθώς ανήκει στην κλάση Piwi των πρωτεϊνών Argonaute, οι οποίες όπως είναι γνωστό ρυθμίζουν διαδικασίες που σχετίζονται με την αποσιώπηση τρανσποζονίων, την ανάπτυξη, και ενδεχομένως την αντιϊκή προστασία (βλ. §1.1.2). Μάλιστα, τα πρωτογενή ερεθίσματα του μονοπατιού piRNA θεωρείται ότι είναι μονόκλωνα μετάγραφα τα οποία προκύπτουν από τη μεταγραφή τρανσποζονίων ή από θέσεις piRNA που βρίσκονται μέσα στο γονιδίωμα (Siomi et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, όμως, η πρωτεΐνη BmAgo3 φαίνεται να εμπλέκεται στη dsRNA-εξαρτώμενη γονιδιακή αποσιώπηση απουσία μονόκλωνων RNAs (ssRNAs, **Εικόνα 17**). Επιπλέον, ακόμα και παρουσία πολύ υψηλών δόσεων ssRNA δεν ήταν εφικτό να προκληθεί αποτελεσματική αποσιώπηση της λουσιφεράσης στα κύτταρα Bm5 (**Εικόνα 21**). Κατά συνέπεια, προτείνεται ότι η BmAgo3 ενδέχεται να λειτουργεί ανεξάρτητα από το καθιερωμένο μονοπάτι piRNA στα κύτταρα Bm5, το οποίο πυροδοτείται από μονόκλωνα μετάγραφα. Αντιθέτως, μόρια dsRNA φαίνεται να λειτουργούν ως ερέθισμα για τη λειτουργία της, κατά τρόπο όμοιο με το μονοπάτι siRNA.

Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται περαιτέρω από την απουσία οποιασδήποτε επίδρασης του dsRNA που είναι ειδικό ως προς το γονίδιο *BmAub* (**Εικόνα 17**) στην RNAi απόκριση, αποκλείοντας με αυτόν τον τρόπο οποιαδήποτε συσχέτιση του μηχανισμού Ping-Pong με την παρατηρούμενη αποσιωπητική διαδικασία. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα κύτταρα BmN4, μία εμβρυϊκή κυτταρική σειρά του *B. mori* όπου τα γονίδια *BmAgo3* και *BmAub* εκφράζονται ενδογενώς, και τα δύο βασικά μονοπάτια βιογένεσης των piRNA (πρωτογενές και δευτερογενές) είναι λειτουργικά (Kawaoka et al., 2009). Σε μελλοντικές μελέτες, η κλωνοποίηση και η αλληλούχιση νέας γενιάς των μικρών μορίων RNA που προέρχονται από κύτταρα Bm5 θα μπορούσε να αποκαλύψει τη συνεισφορά των συντελεστών των μονοπατιών siRNA και piRNA στη γονιδιακή αποσιώπηση των κυττάρων BmN4 και Bm5.

Ένας προβληματισμός που σχετίζεται με την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προκύπτει από το επιχείρημα ότι η αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού

ίσως ποικίλλει ανάλογα με τη σχετική χρονική απόσταση μεταξύ της χορήγησης του ερεθίσματος dsRNA και της έναρξης παραγωγής του mRNA του γονιδίου-στόχου, και άρα γι' αυτό το λόγο συνιστάται προ-επώαση με το ειδικό dsRNA ώστε να αυξηθεί η επίδραση της αποσιώπησης (Terenius et al., 2011). Έτσι, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του δικού μας συστήματος μελέτης που αφορά στη χρήση επαγόμενων φορέων αναφοράς, οι οποίοι ανταποκρίνονται στη χορήγηση εκδυσόνης, αποσκοπούσε στην ενίσχυση της ευαισθησίας της RNAi απόκρισης. Στα RNAi πειράματα που περιγράφονται εδώ, η έναρξη της έκφρασης του φορέα πυροδοτούνταν από έναν αγωνιστή της εκδυσόνης (tebufenozide, RH-5992) μετά το πέρας 48h από τη διαμόλυνση με το dsRNA, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο ότι κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού «παραθύρου» τα dsRNAs θα είχαν ήδη υποστεί την επεξεργασία τους σε μικρά μόρια RNA και άρα, θα είχαν αποσιωπήσει τους στόχους τους, δηλαδή τους RNAi παράγοντες. Όπως αναμενόταν, αυτή η διαδικασία θα αύξανε την ευαισθησία των πειραμάτων της γονιδιακής αποσιώπησης. Βέβαια, παρόλο που η συμμετοχή της BmDcr2 στην απόκριση του RNAi μηχανισμού επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του μη-επαγόμενου (συστατικού) φορέα αναφοράς pActin-Luc (**Εικόνα 18**), είναι ξεκάθαρο ότι η χρήση ενός φορέα συνεχούς έκφρασης οδηγεί σε μειωμένη ευαισθησία αφού σε αυτά τα πειράματα τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς τη συμμετοχή των BmAgo1 και BmAgo2 στην αποσιωπητική διαδικασία.

Για μία πιο ουσιαστική εμβάθυνση, λοιπόν, στον RNAi μηχανισμό των κυττάρων Bm5, σε μελλοντικά πειράματα απαιτείται περαιτέρω βιοχημική ανάλυση, η οποία να βασίζεται στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων RISC από κύτταρα του *B. mori*, με τον τρόπο που έχει μελετηθεί σε εμβρυϊκά εκχυλίσματα και σε κύτταρα S2 της *Drosophila* (Sontheimer, 2005; Tomari et al., 2004).

Υποκυτταρικός εντοπισμός βασικών παραγόντων του RNAi μηχανισμού σε κύτταρα Bm5 με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, η μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών-κλειδιών του μονοπατιού siRNA ανέδειξε την έκφραση παραγόντων του RNAi, πέραν του κυτταροπλάσματος, και στον πυρήνα. Προκειμένου για το κυτταρόπλασμα, όπως έχει ήδη περιγραφεί (βλ. §1.1.2.2), στο μονοπάτι siRNA της *Drosophila*, μόρια dsRNA προερχόμενα από διαφορετικές ενδογενείς ή εξωγενείς πηγές

υφίστανται επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα από τη Dcr2, είτε μόνη της, είτε σε συνεργασία με μία πρωτεΐνη dsRBP (Loqs-PD, R2D2), ώστε τελικά το μονόκλωνο siRNA μέσω της Ago2 και του συμπλόκου RISC να εντοπίσει το στόχο του αποσιωπώντας τον. Στα κύτταρα S2, μέρος των διεργασιών αυτών λαμβάνει χώρα στα κυτταροπλασματικά σωμάτια D2, όπου εδράζονται οι πρωτεΐνες Dcr2, R2D2 και Ago2. Ειδικότερα, η R2D2 είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό της Dcr2 στα σωμάτια D2, η οποία με τη σειρά της τη σταθεροποιεί, ενώ ακόμη είναι υπεύθυνη για τη σωστή ταξινόμηση των endo-siRNAs στην Ago2 και όχι στην Ago1 (Liang et al., 2015; Nishida et al., 2013). Κατ' επέκταση, στα κύτταρα μεταξοσκώληκα Bm5 και BmN4 ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός των BmDcr2, BmR2D2 και BmAgo2 μπορεί να δικαιολογηθεί από τις ανάλογες λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών (**Εικόνες 23-28**) (Zhu et al., 2015). Στα πλαίσια του μονοπατιού siRNA, λοιπόν, αν και η BmR2D2 δεν εντοπίζεται σε κυτταροπλασματικά κοκκία τύπου D2, ωστόσο η έκφρασή της στο κυτταρόπλασμα είναι καθοριστική για το σχηματισμό τους, όπου συμμετέχουν οι πρωτεΐνες BmLoqs και BmDcr2 (Zhu et al., 2015). Επιπλέον, ένας ακόμη λόγος για την BmAgo2 να εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, πέραν της κυτταροπλασματικής της θέσης ως μέλος του συμπλόκου RISC, είναι και ο εντοπισμός της σε κυτταροπλασματικές μορφές διαφορετικού τύπου, όπως είναι τα κοκκία στρες (Zhu et al., 2013a).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες εμφανίζουν τους παράγοντες-κλειδιά του μονοπατιού siRNA και στον πυρήνα σε πλήθος οργανισμών, όπως φυτά, μύκητες, νηματώδεις, έντομα και θηλαστικά (Castel and Martienssen, 2013; Moazed, 2009). Έτσι, για παράδειγμα στη *Drosophila*, πρωτεΐνες του πυρηνικού RNAi μηχανισμού (Dcr2 και Ago2) προσδένονται στη χρωματίνη και αλληλεπιδρούν με στοιχεία της μεταγραφικής μηχανής (π.χ. RNA πολυμεράση II) (Cernilogar et al., 2011), ενώ η πυρηνική Dcr2 συμμετέχει στη ρύθμιση της πυρηνικής οργάνωσης ορισμένων γονιδίων-στόχων των πρωτεϊνών της ομάδας Polycomb (PcG) (Grimaud et al., 2006). Ακόμη, σε ανθρώπινα κύτταρα, η Dicer εμποδίζει την υπερ-συσσώρευση ενδογενών μορίων dsRNA, ώστε να αποφευχθεί η πυροδότηση μηχανισμών που επιφέρουν απόπτωση (White et al., 2014). Στην παρούσα μελέτη, αν και με διαφορετική συχνότητα ανάλογα με τον επίτοπο σήμανσης (Flag ή Myc), η πρωτεΐνη BmDcr2 εντοπίστηκε και στον πυρήνα (**Εικόνες 23-27**). Η πυρηνική της παρουσία αποτελεί ένδειξη ότι μπορεί να επιτελεί εκεί κάποιον επιπρόσθετο ρόλο πέραν της συμμετοχής της στο κυτταροπλασματικό RNAi, όπως

άλλωστε περιγράφηκε για τη *Drosophila* και άλλους οργανισμούς. Επίσης, για τον λιγότερο συχνό πυρηνικό εντοπισμό της σε σχέση με τον αντίστοιχο κυτταροπλασματικό μπορεί να ευθύνεται είτε η μεγαλύτερη συγγένεια του μηχανισμού πυρηνικής πρωτεϊνικής μεταφοράς προς την ενδογενώς παραγόμενη Dcr2, είτε η μεγάλη ακρίβεια του κυτταρικού μηχανισμού που επιτρέπει μόνο στις απαραίτητες ποσότητες της πρωτεΐνης Dcr2 να εισέλθουν στον πυρήνα (White et al., 2014).

Στο πλαίσιο της συμμετοχής της στη ρύθμιση της μεταγραφής (Cernilogar et al., 2011), η Ago2 έχει δειχθεί ότι μπορεί να δρα ανεξάρτητα του RNAi μηχανισμού συμμετέχοντας καθοριστικά στον προσδιορισμό των περιοχών που πρόκειται να μεταγραφούν κατά μήκος του γονιδιώματος (Moshkovich et al., 2011), ενώ έχει ρυθμιστικό ρόλο στο εναλλακτικό μάτισμα του pre-mRNA και την καταστολή της μεταγραφής (Taliaferro et al., 2013). Στο μεταξοσκώληκα, η επίδραση της BmAgo2 στη λειτουργία της ετεροχρωματίνης, δρώντας ως καταστολέας του ομόλογου ανασυνδυασμού όσον αφορά σε εξω-χρωμοσωμικές περιοχές, και με αυτόν τον τρόπο προστατεύοντας το γονιδίωμα από εξωγενή DNA, όπως για παράδειγμα γονιδιώματα μπακουλοϊών (Tsukioka et al., 2006), θα μπορούσε να σχετίζεται με πυρηνικό εντοπισμό της. Ωστόσο, τόσο στα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ, όσο και σε παράλληλες μελέτες (Zhu et al., 2013a), δεν έχει προκύψει πυρηνικός εντοπισμός για τη BmAgo2.

Αναφορικά με την πρωτεΐνη πρόσδεσης dsRNA R2D2, στη *Drosophila* έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε μικρά ποσοστά και στον πυρήνα (Liang et al., 2015). Ακόμη, σε κύτταρα ανθρώπου, μία άλλη πρωτεΐνη πρόσδεσης μορίων dsRNA, η TRBP, εντοπίζεται επίσης εκτός του κυτταροπλάσματος και στον πυρήνα (Gagnon et al., 2014a; Ohrt et al., 2012; Redfern et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη, η BmR2D2 εμφανίζει, επίσης, πυρηνικό εντοπισμό, τόσο όταν εκφράζεται μόνη της, όσο και έπειτα από συνέκφραση με τις πρωτεΐνες BmDcr2 και BmAgo2 (**Εικόνες 24 και 26**). Πιθανώς, λοιπόν, να υπάρχει κινητικότητα μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα όσον αφορά στις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη φόρτωση των siRNAs στο σύμπλοκο RISC (BmDcr2/BmR2D2), ούτως ώστε να διευκολύνεται η πρόσβαση σε στόχους που βρίσκονται και στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα, όπως έχει παρατηρηθεί και σε ανθρώπινα κύτταρα (Ohrt et al., 2008).

Αναφορικά με την BmTranslin2, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού της ως μέλους του μονοπατιού siRNA, αλλά ακόμα και λόγω της έκφρασης μόνο της μεταλλαγμένης μορφής του γονιδίου *BmTranslin* στα κύτταρα Bm5. Σύμφωνα

με τη βιβλιογραφία, η Translin μπορεί να μεταφέρεται από το κυτταρικό διαμέρισμα του κυτταροπλάσματος στον πυρήνα, και αντιστρόφως, ανάλογα με τη λειτουργία που επιτελεί κάθε φορά. Έτσι, η Translin στα λεμφοκύτταρα εμπλέκεται σε πυρηνικές διαδικασίες όπως είναι η επιδιόρθωση, η αντιγραφή και ο ανασυνδυασμός του DNA (Aoki et al., 1995), ενώ σε κύτταρα HeLa παράγοντες που προκαλούν φθορά στο DNA επάγουν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που θα οδηγήσει στη μεταφορά της Translin από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Kasai et al., 1997). Κατά τη μείωση, δε, σε αρσενικά γαμετικά κύτταρα ποντικού, η TB-RBP (ομόλογο της Translin) εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ αργότερα στη μετα-μειωτική φάση συμμετέχει στη μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, και μέσω διακυτταρικών γεφυρών σε άλλα κύτταρα (Morales et al., 1998). Ακόμα, έχει βρεθεί ότι η υποκυτταρική θέση αυτής και της TRAX εξαρτάται από το σχετικό ποσοστό της μίας έναντι της άλλης, προκαλώντας ανάλογα τη μεταφορά τους από κοινού από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, και αντίστροφα (Cho et al., 2004). Στα πειράματα που παρουσιάζονται εδώ, παρατηρήθηκε ότι η BmTranslin2 εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 29**), γεγονός που θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη συμμετοχή της στον RNAi μηχανισμό των κυττάρων Bm5. Παράλληλα, η BmTranslin2 εντοπίστηκε ορισμένες φορές και στον πυρήνα (**Εικόνα 29**), όπου ενδέχεται να κατέχει ρόλους ανεξάρτητους του RNAi μηχανισμού, όπως ήδη περιγράφηκαν.

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοφθορισμού που παρουσιάζονται εδώ και αφορούν στους βασικούς siRNA παράγοντες, αναφέρονται στην υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και αντικατοπτρίζουν μία τεχνητή κατάσταση για το κύτταρο. Εναλλακτικά, η χρήση ειδικών αντισωμάτων για κάθε μία από τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν θα μπορούσε στο μέλλον να προσφέρει πιο αντικειμενικές απαντήσεις σε σχέση με την πραγματική υποκυτταρική κατανομή της ενδογενούς μορφής της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Ακόμη, η συνδιαμόλυνση των φορέων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του RNAi μαζί με μόρια dsRNA ή siRNA θα μπορούσε να δώσει σαφέστερες πληροφορίες αναφορικά με την πραγματική δράση των πρωτεϊνών αυτών στο πλαίσιο του RNAi μηχανισμού.

Ανάλυση του ρόλου των γονιδίων του piRNA μονοπατιού *BmAgo3* και *BmAub*

Λόγω των πρόσφατων στοιχείων που έχουν φέρει στο φως έρευνες σχετικά με τον αντιϊκό ρόλο όχι μόνο του siRNA μονοπατιού, αλλά και του piRNA, στα έντομα (Hess et al., 2011; Miesen et al., 2015; Morazzani et al., 2012; Schnettler et al., 2013a; Vodovar et al., 2012; Wu et al., 2010), κρίθηκε ότι η περαιτέρω εμβάθυνση στο εν λόγω μονοπάτι στο μεταξοσκώληκα *B. mori* συνάδει με τους στόχους της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Αναφορικά με το γονίδιο *BmAgo3*, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφρασή του στα κύτταρα Bm5 είναι ικανή να προκαλέσει σημαντική ενίσχυση του φαινομένου της γονιδιακής αποσιώπησης που προκαλείται από ειδικά μόρια dsRNA (**Εικόνα 33**). Το αποτέλεσμα αυτό ουσιαστικά επιβεβαίωσε το εύρημα όπου μέσω του «RNAi του RNAi μηχανισμού», όπως περιγράφηκε στην §3.1.1, είχε αποδειχθεί η σημασία του γονιδίου αυτού για τον RNAi μηχανισμό των κυττάρων Bm5. Βέβαια, σε αντίθεση με τα παραπάνω, ο σταθερός μετασχηματισμός των ίδιων κυττάρων μέσω της ειδικά σχεδιασμένης φουρκέτας HP-Ago3 που προκαλεί αποσιώπηση του *BmAgo3* δεν επέφερε σημαντική αλλοίωση της αποδοτικότητας της γονιδιακής αποσιώπησης που πυροδοτείται από μόρια dsRNA στα κύτταρα αυτά (**Εικόνα 45**). Η παρατηρούμενη ασυμφωνία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μέσα από τη χρήση διαφορετικών παραλλαγών της ίδιας μεθοδολογίας, ενδεχομένως, σχετίζεται με την παροδικότητα ή μη της αποσιώπησης του γονιδίου-κλειδιού *BmAgo3*. Ειδικότερα, η κατάσταση της παροδικής διαμόλυνσης με dsAgo3 μπορεί να περιγραφεί ως μία κατάσταση αιφνίδιου «βομβαρδισμού» των κυττάρων με siRNAs που καταστέλλουν τον RNAi μηχανισμό. Αντίθετα, στην περίπτωση των σταθερά μετασχηματισμένων HP-Ago3 κυτταρικών σειρών, τα κύτταρα έχουν επιλεγεί έπειτα από μία μακρά διαδικασία προσαρμογής στην κατάσταση μόνιμης καταστολής του *BmAgo3*, κατά την οποία ενδεχομένως μόνο κύτταρα τα οποία ανέπτυξαν τον αντισταθμιστικό μηχανισμό της αυξορρύθμισης του *BmAgo2* μπόρεσαν να πολλαπλασιαστούν ώστε να αποτελέσουν έναν πληθυσμό που επιβιώνει υπό φυσιολογικές συνθήκες ακόμη και απουσία του *BmAgo3*.

Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι οι ενδείξεις που μαρτυρούν την ύπαρξη συνεργιστικής δράσης μεταξύ των μονοπατιών siRNA και piRNA, καθώς η σταθερή μειορρύθμιση του *BmAgo3* οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης του *BmAgo2* (**Εικόνα 44**). Στη *Drosophila*, έχει αναφερθεί στο παρελθόν η αντισταθμιστική δράση του

μονοπατιού endo-siRNA έναντι της μειωμένης παραγωγής piRNAs ως προς τον έλεγχο της έκφρασης ορισμένων μεταθετών γενετικών στοιχείων, λόγω αποσιώπησης του βασικού γονιδίου του μονοπατιού piRNA *piwi* (Rozhkov et al., 2013). Ωστόσο, ακόμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του εντόμου ευνοείται η παραγωγή μικρών RNAs μίας εκ των δύο κατηγοριών. Ειδικότερα, σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, όπως είναι το έμβρυο, παρατηρείται αυξημένη παρουσία piRNAs, ενώ με την πάροδο της ηλικίας παράγονται περισσότερα siRNAs (Fagegaltier et al., 2009). Όσον αφορά, δε, τους Νηματώδεις σκώληκες, από τους οποίους απουσιάζει ο κύκλος Ping-Pong που οδηγεί στην παραγωγή δευτερογενών piRNAs, η διαδοχική παραγωγή piRNAs και endo-siRNAs αποτελεί μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας που επιστρατεύεται προκειμένου να κατασταλεί η έκφραση ενδογενών γονιδίων και τρανσποζονίων (Bagijn et al., 2012; Das et al., 2008; Lee et al., 2012). Έτσι, φαίνεται ότι τα μονοπάτια siRNA και piRNA μπορούν να δρουν διαδοχικά, ή και να αλληλοεπικαλυφθούν όταν παραστεί η ανάγκη, προς την επίτευξη του κοινού στόχου αποσιώπησης γονιδίων ή μεταθετών γενετικών στοιχείων.

Προκειμένου για το γονίδιο *BmAub* (*BmSIWI*), όπως είδαμε, δεν κατέστη δυνατό να αποσιωπηθεί μόνιμα στα κύτταρα Bm5 έπειτα από διαμόλυνση με το φορέα που εξέφραζε την ειδικά σχεδιασμένη και λειτουργική φουρκέτα (HP-Aub, **Εικόνα 39**). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στη συμμετοχή του σε ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι το μονοπάτι παραγωγής πρωτογενών piRNAs, οι οποίες αν διαταραχθούν δεν επιτρέπουν την επιβίωση των κυττάρων Bm5. Συνεπώς, θα άξιζε να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος του γονιδίου *BmAub* στον μεταξοσκώληκα, και αυτό θα ήταν εφικτό δημιουργώντας ένα κυτταρικό μοντέλο που θα διαθέτει την κατάλληλη μεταλλαγή του γονιδίου, η οποία αφενός θα διαταράσσει τη λειτουργία του, αφετέρου δε δεν θα την καταστέλλει ολοκληρωτικά, ώστε αυτό να είναι βιώσιμο.

Όπως παρατηρήθηκε, στις HP-Ago3 σειρές, η έκφραση του *BmAub* δε μεταβλήθηκε παρά τη μειορρύθμιση του *BmAgo3* κατά 64% (**Εικόνα 39**). Άλλωστε, αμετάβλητη παρέμεινε και η έκφραση της πρωτεΐνης Aub σε κύτταρα της *Drosophila* που φέρουν μεταλλαγή ώστε να μην εκφράζεται το γονίδιο *Ago3*, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της πρωτεΐνης Ago3 δεν είναι απαραίτητη για την έκφραση και τη σταθερότητα της Aub (Li et al., 2009a). Όπως προκύπτει, λοιπόν, τα γονίδια *BmAgo3* και *BmAub*, εκτός του δευτερογενούς μονοπατιού piRNA του *B. mori* στο οποίο δρουν μαζί

ως «πρωτεϊνικό δίδυμο», ενδεχομένως επιτελούν και επιπρόσθετες λειτουργίες για τις ανάγκες των οποίων οφείλουν να διατηρούν την πρωτεϊνική έκφραση στα απαιτούμενα επίπεδα. Για παράδειγμα, όπως βρέθηκε, η BmAgo3 συμμετέχει ενεργά στον dsRNA-εξαρτώμενο αποσιωπητικό μηχανισμό (βλ. §3.1.1), ενώ ακόμη υπάρχουν ενδείξεις ότι μαζί με την BmAub έχουν την ιδιότητα να λειτουργούν ανασταλτικά στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη συγκεκριμένων εμμενουσών και παθογόνων ιϊκών μολύνσεων (βλ. §3.2.1.2 και συνέχεια).

Ειδικότερα, δείχθηκε η πολύ σημαντική συμβολή του *BmAgo3* στη διατήρηση του ιού BmMLV σε τέτοια επίπεδα ώστε να συνυπάρχει με τα κύτταρα του ξενιστή αρμονικά, επιτυγχάνοντας μία κατάσταση εμμένουσας μόλυνσης, δεδομένου ότι στην περίπτωση καταστολής του κατά τα 2/3 σε σχέση με το φυσιολογικό (σειρές μάρτυρες HP-Luc), αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα της ιϊκής γονιδιακής έκφρασης (*gp3*, **Εικόνα 43**). Όπως αποδεικνύεται, λοιπόν, πέραν των μονοπατιών miRNA και siRNA, και το piRNA μονοπάτι συμμετέχει στη δυναμική ρύθμιση των επιπέδων μίας εμμένουσας μόλυνσης, όπως αυτή του BmMLV (Zhu et al., 2013b). Συνεπώς, στην περίπτωση αυτή, φαίνεται να υπάρχει συνεργιστική δράση και των τριών βασικών μονοπατιών του RNAi μηχανισμού προκειμένου να διατηρηθεί στα επιθυμητά επίπεδα ο ιός BmMLV.

Ένα πιθανό σενάριο το οποίο ερμηνεύει τις παρατηρούμενες αλλαγές που επιφέρει η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *BmAgo3* στα κύτταρα Bm5 μπορεί να συνοψιστεί στα εξής βήματα: α) η ανάπτυξη του ιού BmMLV που διαβιεί λανθανόντως ευνοείται από τη μειορρύθμιση του *BmAgo3*, β) η έκφραση του *BmAgo2* αυξάνεται ώστε να αντισταθμίσει την υποέκφραση του *BmAgo3* στο πλαίσιο του αντιϊκού RNAi μηχανισμού, και γ) η αύξηση των επιπέδων της ιϊκής μόλυνσης προκαλεί τη δημιουργία κοκκίων στρες, στα οποία συμμετέχει τόσο η BmAgo2, όσο και οι πρωτεΐνες-κλειδιά BmHSP90 και BmeIF-4E1 που αυξορρυθμίζονται, ούτως ώστε να περιοριστεί η έκφραση ορισμένων mRNA προς όφελος του ξενιστή *B. mori*.

Σε μελλοντικά πειράματα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί λεπτομερέστερη εμβάθυνση στο ρόλο του piRNA γονιδίου *BmAgo3* στο μεταξοσκώληκα *B. mori*, αξιοποιώντας ως εργαλείο τις σταθερά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές HP-Ago3 και HP-Luc. Ειδικότερα, η πραγματοποίηση μολύνσεων με RNA ή DNA ιούς στα κύτταρα αυτά, θα προσφέρει ουσιαστικές πληροφορίες αναφορικά με τη σημασία του *BmAgo3* στην εξέλιξη μίας ιϊκής μόλυνσης. Επιπλέον, αξίζει να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης

ορισμένων μεταθετών γενετικών στοιχείων παρουσία ή απουσία του *BmAgo3*, ώστε να διακριβωθεί εάν το γονίδιο αυτό σχετίζεται όντως με τη σταθερότητα του γονιδιώματος στα κύτταρα Bm5. Τέλος, θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον η ποσοτική και ποιοτική μελέτη των παραγόμενων piRNAs, για παράδειγμα μέσω στυπώματος Northern και αλληλούχισης νέας γενιάς, ώστε να ανιχνευθούν πιθανές διαταραχές στα επίπεδα των piRNAs λόγω της μειορρύθμισης του γονιδίου *BmAgo3.*

Μελέτη της δυνατότητας πρόκλησης συστημικού RNAi στον *Bombyx mori*

Με σκοπό να αποκομίσουμε στοιχεία που αφορούν στην εφαρμογή της τεχνικής του συστημικού RNAi *in vivo* στο μεταξοσκώληκα *B. mori*, ούτως ώστε στη συνέχεια να υπάρξει δυνατότητα βελτιστοποίησής της με αποτέλεσμα την επιτυχή γονιδιακή αποσιώπηση, αρχικά μελετήθηκε το πρότυπο της έκφρασης των βασικών γονιδίων του μονοπατιού siRNA σε διάφορους ιστούς, αναπτυξιακά στάδια και στελέχη. Η έκφραση γονιδίων των μονοπατιών miRNA και siRNA, αλλά και piRNA (**Εικόνα 14**), έχει ήδη δειχθεί σε πλήθος ιστών του μεταξοσκώληκα στα στελέχη Daizo και p50T, αντίστοιχα (Kawaoka et al., 2008b; Swevers et al., 2011). Επιπλέον, η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό σε πλήθος ιστών έχει παρατηρηθεί και σε άλλα έντομα (Wynant et al., 2012; Wynant et al., 2015) ή θηλαστικά (Gonzalez-Gonzalez et al., 2008; Sago et al., 2004). Εδώ, επιβεβαιώθηκε ότι τα γονίδια *BmDcr2* και *BmAgo2* εκφράζονται σε διάφορους προνυμφικούς και νυμφικούς ιστούς, όπως είναι η επιδερμίδα, το μεσέντερο, ο δίσκος πτερύγων, το λιπαρό σώμα, οι όρχεις και οι ωοθήκες (**Εικόνα 46**). Αναφορικά, δε, με το γονίδιο *BmR2D2,* που σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη δεν εκφράζεται φυσιολογικά στο στέλεχος Daizo (Swevers et al., 2011), εδώ δείχθηκε ότι εκφράζεται φυσιολογικά στο στέλεχος P50, ενώ ανιχνεύθηκε και στο στέλεχος Daizo, αν και σε ιδιαιτέρως χαμηλά επίπεδα.

Σύμφωνα με την αναπτυξιακή μελέτη της έκφρασης των *BmDcr2* και *BmAgo2* από την έναρξη του 5^{ου} προνυμφικού σταδίου έως το στάδιο της νύμφης, προέκυψαν ενδιαφέροντα στοιχεία, καθώς βρέθηκε ότι και τα δύο γονίδια εκφράζονται περισσότερο στο μεσέντερο σε σχέση με την επιδερμίδα (**Εικόνα 47**). Το εύρημα αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό, καθώς καταδεικνύει το μεσέντερο ως τον κατεξοχήν ιστό όπου ο μηχανισμός του RNAi είναι σε εγρήγορση, ώστε το ζώο να προστατεύεται από επίδοξους παθογόνους οργανισμούς που θα εισέλθουν στο σώμα του μέσω της τροφής.

Βέβαια, σε άλλα έντομα όπως το *S. gregaria*, αν και το μεσέντερο αποτελεί έναν από τους πιο δεκτικούς ιστούς στην πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi, η έκφραση των γονιδίων *dcr2* και *ago2* δεν υπερέχει σε σχέση με άλλους ιστούς υπό φυσιολογικές συνθήκες (Wynant et al., 2012).

Όπως παρατηρήθηκε στα πειράματά μας, η έκφραση του γονιδίου *BmAgo2* είναι πολλαπλάσια αυτής του *BmDcr2* στην πλειοψηφία των αναπτυξιακών σταδίων που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι απαιτήσεις του οργανισμού του μεταξοσκώληκα για το ένζυμο BmAgo2 χωρίς να βρίσκεται σε κατάσταση απειλής από κάποιο παρασιτικό dsRNA (για παράδειγμα λόγω κάποιας ιϊκής μόλυνσης) είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές για το BmDcr2, και ενδεχομένως γι' αυτό να ευθύνεται η συμμετοχή του BmAgo2 σε επιπρόσθετες λειτουργίες πέραν του RNAi, όπως ήδη περιγράφηκε (π.χ. ρύθμιση μεταγραφής, εναλλακτικό μάτισμα και επιδιόρθωση του DNA) (Meister, 2013). Άλλωστε, τα σχετικά ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με την έκφραση αυτών των γονιδίων στο μεσέντερο του Λεπιδόπτερου εντόμου *M. sexta* (Garbutt and Reynolds, 2012), αλλά και στα κύτταρα Bm5 (Liu et al., 2014).

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η έκφραση των siRNA γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* παρουσιάζει μία τάση αύξησης από τη φάση της 4^{ης} έκδυσης έως και το στάδιο της νύμφης. Από την άλλη πλευρά, η μελέτη των piRNA γονιδίων *BmAgo3* και *BmAub* στο στέλεχος p50T του *B. mori* κατά το ίδιο χρονικό διάστημα έδειξε βαθμιαία μείωση της έκφρασής τους στους όρχεις, ενώ στις ωοθήκες η έκφρασή τους ήταν αυξημένη μόνο κατά το στάδιο της νυμφοποίησης (S έως S+3) (Kawaoka et al., 2008b). Αντίστοιχα, σε σχετική μελέτη που αφορούσε στο Ημίπτερο έντομο *Laodelphax striatellus*, τα γονίδια *ls-AGO1* και *ls-AGO2* παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής τους μεταξύ των ανωτέρων νυμφικών σταδίων και του ενηλίκου (Zhou et al., 2016). Ως γνωστόν, κατά το 5^{ο} προνυμφικό στάδιο, αλλά και πριν από κάθε μετάβαση στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, παρατηρείται ραγδαία αύξηση του τίτλου των εκδυστεροϊδών με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκδυσης στα έντομα (Calvez et al., 1976; Gilbert and Rewitz, 2009; Kamimura et al., 1997; Li et al., 2015a; Parthasarathy et al., 2008). Ενδεχομένως, λοιπόν, η έκφραση αυτών των γονιδίων του RNAi μηχανισμού να είναι ισχυρά ορμονο-εξαρτώμενη, και άρα να μεταβάλλεται σύμφωνα με τις μεταβολές των εκδυστεροϊδών. Μάλιστα, θα ήταν σημαντική η διερεύνηση αυτής της

υπόθεσης χορηγώντας ανάλογα της 20-υδρόξυ-εκδυσόνης και της ορμόνης νεότητας *in vivo*, και μελετώντας παράλληλα τα επίπεδα έκφρασης των RNAi γονιδίων.

Το εύρημα αναφορικά με την ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* λίγο πριν την έναρξη σχηματισμού του κουκουλιού, τουλάχιστον στο μεσέντερο, αξιοποιήθηκε περαιτέρω προκειμένου να επιτευχθεί η αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου στα επακόλουθα πειράματα συστημικού RNAi μέσω ενέσεων dsRNA. Μάλιστα, ήδη υπάρχουσες μελέτες αναφέρουν επιτυχία στην αποσιώπηση σε αντίστοιχα πειράματα για τα γονίδια που επιλέχθηκαν ως στόχοι, δηλαδή τόσο για το *BmEcR* (Qian et al., 2015; Tian et al., 2010b; Tian et al., 2010a), όσο και για το *BmFTZ-F1* (Cheng et al., 2008; Tian et al., 2013). Ωστόσο, στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, οι ενέσεις με dsEcR ή dsFTZ-F1 δεν κατέστη δυνατό να επιφέρουν την ανακοπή της ανάπτυξης των ζώων μέσω αποσιώπησης των στόχων τους, ενώ επιπλέον δεν προέκυψαν σαφή συμπεράσματα από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του RNAi (βλ. §3.1.4.2). Η έλλειψη αποτελεσματικότητας των πειραμάτων του RNAi στην παρούσα μελέτη μπορεί να αποδοθεί σε παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο εισαγωγής του dsRNA στο σώμα του ζώου, την ποσότητα και αναλογία του dsRNA σε σχέση με το βάρος του κάθε ζώου, τη χρονική στιγμή της χορήγησής του σε σχέση με την έκφραση του εκάστοτε γονιδίου-στόχου, και το στέλεχος που επιλέχθηκε να μελετηθεί. Βέβαια, επειδή οι παραπάνω παράγοντες προσδιορίστηκαν με μεγάλη προσοχή πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων, ενδεχομένως, η συνύπαρξη με κάποιον ιό υπό μορφή εμμένουσας μόλυνσης να μην επέτρεψε στο μηχανισμό του RNAi να δράσει αποδοτικά ώστε από τα ειδικά dsRNAs να προκύψουν siRNAs που θα αποσιωπήσουν το στόχο τους.

Συνεπώς, αν και με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία η γονιδιακή αποσιώπηση είναι εφικτή υπό προϋποθέσεις στον *B. mori in vivo*, εδώ δεν κατέστη εφικτή η επιτυχία αυτών των πειραμάτων. Ωστόσο, τα ευρήματα που προέκυψαν σε σχέση με την έκφραση των βασικών γονιδίων του μονοπατιού siRNA κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων που μελετήθηκαν αποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη ποικιλομορφία στα πειράματα του RNAi δεν οφείλεται στη μη-επαρκή έκφραση παραγόντων-κλειδιών, όπως τα γονίδια *BmDcr2* και *BmAgo2*.

4.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΜΙΑΣ ΙΪΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

Στο δεύτερο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής, σκοπός ήταν να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο μία ιϊκή μόλυνση δύναται να επηρεάσει τον RNAi μηχανισμό του *B. mori.* Έτσι, αρχικά σε *in vitro* πειράματα ελέγχθηκε εάν ο RNA ιός BmCPV έχει την ικανότητα να αυτορρυθμίζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης VP1 που κωδικοποιείται από το γονιδίωμά του μέσω ενός πρόδρομου microRNA, για το οποίο και έχει προβλεφθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει με αυτόν τον τρόπο σύμφωνα με την αλληλουχία του. Επίσης, μελετήθηκε η ανάπτυξη του ανασυνδυασμένου DNA ιού AcMNPV-EYFP, έπειτα από ετερόλογη υπερέκφραση ή υποέκφραση ορισμένων siRNA και piRNA παραγόντων του μεταξοσκώληκα σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν κάποια εισαγωγικά πειράματα, όπου εξετάστηκε ακροθιγώς η επίδραση της χορήγησης του ιού CrPV σε κύτταρα μεταξοσκώληκα. Στη συνέχεια, σε *in vivo* πειράματα, αναλύθηκε η σύνθετη μεταγραφική απόκριση, με έμφαση στο μηχανισμό του RNAi, και η παραγωγή μικρών ιϊκών μορίων RNA έπειτα από παθογόνο ή εμμένουσα μόλυνση με τον ιό BmCPV.

Μελέτη της επίδρασης του RNAi μηχανισμού στην ιϊκή ανάπτυξη σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων

Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει κατά τα τελευταία χρόνια την ικανότητα ορισμένων ιών να αυτορρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων τους μέσω έκφρασης πρόδρομων microRNAs (pre-miRNAs), τα οποία κωδικοποιούνται από την αλληλουχία του ίδιου του ιϊκού γονιδιώματος (Vijayendran et al., 2013). Για τον RNA ιό BmCPV, έχει επιβεβαιωθεί ότι κωδικοποιεί τουλάχιστον ένα pre-miRNA, το οποίο έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης της ιϊκής πολυεδρίνης (Zografidis et al., 2015). Εδώ, αφού μελετήθηκε η αλληλουχία του dsRNA γονιδιώματος του BmCPV με χρήση υπολογιστικών εργαλείων Βιοπληροφορικής, ανιχνεύθηκαν ορισμένες αλληλουχίες, των οποίων η δομή δικαιολογεί έναν πιθανό ρόλο τους ως pre-miRNAs. Κατόπιν επιλογής του pre-miRNA S1.2 (WT) που προβλέπεται ότι στοχεύει στο τμήμα S1 του ιϊκού γονιδιώματος, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1, σχεδιάστηκε και μία παραλλαγή αυτού (MUT) που περιελάμβανε μεταλλαγές ώστε η δευτεροταγής δομή

του μορίου να μη σχηματίζει φουρκέτα και άρα αυτό να καθίσταται μη-λειτουργικό (**Εικόνα 53**).

Από τη συνδιαμόλυνση κυττάρων Λεπιδοπτέρων με φορείς υπερέκφρασης τόσο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης VP1-Myc.His, όσο και των φουρκετών S1.2 (WT ή MUT), δεν προέκυψαν στοιχεία που να στηρίζουν την ύπαρξη ρυθμιστικού ρόλου από την πλευρά του pre-miRNA S1.2 (**Εικόνα 54**). Σε μία παραλλαγή του ίδιου πειράματος, όπου το pre-miRNA S1.2 δε συντέθηκε από τα κύτταρα, αλλά χορηγήθηκε εξωγενώς κατόπιν *in vitro* μεταγραφής του, δε δείχθηκε η ύπαρξη ικανότητάς του για μειορρύθμιση της VP1-Myc.His (**Εικόνα 55**). Ωστόσο, προέκυψαν στοιχεία που ενδεχομένως υποδεικνύουν κάποιον ρόλο του pre-miRNA S1.2 στην αυξορρύθμιση της VP1 *in vitro*. Καθώς τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων δεν οδήγησαν σε σαφή συμπεράσματα ως προς την ύπαρξη λειτουργικότητας του pre-miRNA S1.2, θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος του μορίου αυτού και η λειτουργική του σημασία στο κύτταρο χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως στύπωμα Northern και NGS. Επίσης, θα ήταν δόκιμο να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της φουρκέτας S1.2 στην ανάπτυξη του ιού BmCPV, έπειτα από μόλυνση κυττάρων μεταξοσκώληκα με αυτόν τον ιό.

Ακολούθως, με σκοπό να εμβαθύνουμε στον πιθανό αντιϊκό ρόλο ορισμένων RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση αυτών, σε συνδυασμό με διαμόλυνση κυττάρων Λεπιδοπτέρων Sf21, με το γονιδίωμα του ανασυνδυασμένου μπακουλοϊού AcMNPV-EYFP, ο οποίος κατασκευάστηκε έτσι ώστε το γονίδιο *eyfp* να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πολυεδρίνης (P_{PH}). Όπως παρατηρήθηκε, οι πρωτεΐνες BmR2D2 και BmTranslin2 επηρέασαν αρνητικά την καμπύλη ανάπτυξης του ιού, καθώς δεν επέτρεψαν σε αυτόν να αναπτυχθεί σε επίπεδα αντίστοιχα με εκείνα του μάρτυρα pac, σύμφωνα με τις μετρήσεις του παραγόμενου βιοφθορισμού (**Εικόνα 56**). Βέβαια, ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο προσδιορισμός του ιϊκού τίτλου στα υπερκείμενα που προέκυψαν από τους χειρισμούς με BmR2D2 και BmTranslin2 κατέδειξε την ύπαρξη του ιού σε πολύ μεγαλύτερη αφθονία σε σχέση με τον χειρισμό pac (**Εικόνα 57**).

Εάν δεχθούμε ότι η παραγωγή της πολυεδρίνης συσχετίζεται με τη μολυσματική μορφή του ιού ως έγκλειστου ιϊκού σωματίου (ODV), αναμένεται και ο P_{PH} να επάγει την έκφραση του γονιδίου *eyfp* κατά την κατάσταση του AcMNPV-EYFP σε μορφή ODV. Συνεπώς, εάν ο μετρούμενος βιοφθορισμός αντικατοπτρίζει μόνο τα υπάρχοντα ODVs,

τότε στην πρώτη φάση των πειραμάτων που περιγράφηκαν, η καμπύλη ανάπτυξης αντιστοιχεί στον ιό που βρίσκεται στη φάση του ODV. Αντίθετα, το κυτταρικό υπερκείμενο, που χρησιμοποιήθηκε για την εκ νέου μόλυνση των κυττάρων κατά τον προσδιορισμό του ιϊκού τίτλου, περιείχε και την εκβλαστημένη μορφή του ιού (BV), η οποία δεν μπορεί να προσδιοριστεί μέσω βιοφθορισμού καθώς δεν παράγεται πολυεδρίνη σε αυτή τη φάση. Άρα, με αυτό τον τρόπο μπορεί να δικαιολογηθεί η φαινομενική ασυμφωνία μεταξύ της αρχικής καμπύλης ανάπτυξης και του ιϊκού τίτλου του υπερκειμένου των ίδιων κυττάρων. Ενδεχομένως λοιπόν, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών BmR2D2 και BmTranslin2 να ευνοεί τη μετάβαση του ιού από την φάση του ODV στην BV, με αποτέλεσμα την ευκολότερη διάδοσή του από κύτταρο σε κύτταρο.

Αναφορικά, δε, με το ρόλο των piRNA γονιδίων στην ανάπτυξη ενός ιού, στο παρελθόν έχει δειχθεί ότι μεταλλαγές ή αποσιωπήσεις αυτών (piRNA γονιδίων) μπορούν να ευνοήσουν την ιϊκή ανάπτυξη στο κουνούπι (Schnettler et al., 2013a) και τη *Drosophila* (Chotkowski et al., 2008; Zambon et al., 2006). Προκειμένου για την επίδραση των γονιδίων *Ago3* και *Aub* στην ανάπτυξη του AcMNPV-EYFP, όπως παρατηρήθηκε, αν και η ετερόλογη υπερέκφραση αυτών δεν επηρέασε τον παραγόμενο βιοφθορισμό (**Εικόνα 56α**), αντίθετα η υπερέκφραση των φουρκετών που στόχευαν σε αυτά είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του βιοφθορισμού που αντιστοιχούσε στον AcMNPV-EYFP (**Εικόνα 58**). Παρόλο που οι διαφορές σε σχέση με το χειρισμό του μάρτυρα HP-Luc δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, εντούτοις φαίνεται ότι η στόχευση των δύο piRNA γονιδίων ευνόησε την ανάπτυξη του ιού. Κατά συνέπεια, πιθανώς οι παράγοντες του μονοπατιού piRNA εμπλέκονται με κάποιον τρόπο στην αντιϊκή προστασία των κυττάρων Sf21. Ωστόσο, ο αντιϊκός ρόλος αυτών των παραγόντων απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, μέσω υπερέκφρασης ή στόχευσης αυτών των piRNA γονιδίων με ειδικά σχεδιασμένα dsRNAs για τον εκάστοτε ξενιστή που ανήκει στα Λεπιδόπτερα, παράλληλα με τη μόλυνση με κάποιον DNA ή RNA ιό.

Με σκοπό τη μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός ακόμα τύπου ιϊκής μόλυνσης με τον RNAi μηχανισμό του μεταξοσκώληκα, πραγματοποιήθηκαν ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα χρησιμοποιώντας τον RNA ιό CrPV της οικογένειας *Dicistroviridae.* Για τον CrPV είναι γνωστό ότι διαθέτει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, καθώς εκτός από το γρύλλο (cricket, Ορθόπτερα) μπορεί να μολύνει τουλάχιστον 12 είδη που ανήκουν στην τάξη των Λεπιδοπτέρων (Bonning and Miller, 2010). Ωστόσο, στο παρελθόν έχει βρεθεί ότι

δεν ήταν εφικτή η μόλυνση του μεταξοσκώληκα από τον CrPV *in vivo* (Reinganum, 1975). Όπως διαπιστώθηκε στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, ο CrPV δε μπορεί να μολύνει το μεταξοσκώληκα ούτε σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας, τουλάχιστον όσον αφορά στα κύτταρα Bm5 (**Εικόνα 59**).

Η αδυναμία μόλυνσης των κυττάρων του *B. mori* από τον CrPV μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως είναι η απουσία εξειδικευμένων υποδοχέων που σε άλλα είδη πιθανώς εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχουν στην αναγνώριση του CrPV, ή/και η έλλειψη των κυτταρικών εκείνων παραγόντων που είναι απαραίτητοι για τον ιϊκό πολλαπλασιασμό μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Παράλληλα, η ταυτόχρονη συνύπαρξη με κάποιον άλλο ιό υπό εμμένουσα μορφή στα ίδια κύτταρα, όπως για παράδειγμα ο BmMLV, θα μπορούσε να λειτουργεί αποτρεπτικά ως προς τη δεκτικότητα των κυττάρων σε μία νέα ιϊκή μόλυνση. Τέλος, ενδέχεται ο RNAi μηχανισμός των κυττάρων Bm5 να εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του CrPV, που στην περίπτωση των κυττάρων Hi5 οδηγεί στο θάνατό τους σε σύντομο χρονικό διάστημα. Όπως φαίνεται, λοιπόν, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθούν μελλοντικά οι παράγοντες που συμμετέχουν στην παρατηρούμενη ανθεκτικότητα των κυττάρων Bm5 έναντι της μόλυνσης με τον ιό CrPV, σε αντίθεση με πληθώρα άλλων ειδών Λεπιδοπτέρων. Έτσι, πειράματα που θα περιλαμβάνουν χορήγηση του CrPV σε συνδυασμό με την αποσιώπηση βασικών RNAi παραγόντων, μέσω διαμόλυνσης ειδικών dsRNA ή κατασκευής σταθερών «knockdown» κυτταρικών σειρών, θα μπορούσαν να προσδιορίσουν εάν ο μηχανισμός του RNAi σχετίζεται όντως με την ανθεκτικότητα των κυττάρων Bm5 στον ιό CrPV.

Ανάλυση της μεταγραφικής απόκρισης και των μικρών μορίων RNA στο μεσέντερο του *Bombyx mori* έπειτα απο εμμένουσα και παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV

Η παρατήρηση της ύπαρξης εμμένουσας μόλυνσης από τον ιό BmCPV στην αποικία μεταξοσκωλήκων που διατηρείτο στο εργαστήριό μας αποτέλεσε την ευκαιρία να μελετηθεί η μεταγραφική απόκριση έπειτα από την πρόκληση παθογόνου μόλυνσης με τον ίδιο ιό. Ακόμη, σύμφωνα με στοιχεία που προέρχονται από τη σχετική βιβλιογραφία, επιχειρήθηκε να συγκριθεί η μεταγραφική απόκριση στην παθογόνο μόλυνση μεταξύ προνυμφών που βρίσκονταν ήδη υπό εμμένουσα μόλυνση και απολύτως υγιών προνυμφών. Παράλληλα, στα πλαίσια αυτής της μελέτης, δόθηκε

ιδιαίτερη έμφαση στην απόκριση του RNAi μηχανισμού, τόσο κατά την παθογόνο, όσο και κατά την εμμένουσα μόλυνση.

Με ενδιαφέρον, παρατηρήθηκε ότι τα δεδομένα που προέκυψαν αποτελούν απόδειξη ότι η μεταγραφική απόκριση έναντι μίας παθογόνου μόλυνσης παρουσιάζει πολλά κοινά σημεία με προηγούμενες μελέτες όπου τα ζώα δεν έφεραν σημάδια εμμένουσας μόλυνσης (**Πίνακας 5**) (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011a). Ειδικότερα, στις ομοιότητες αυτές ανήκουν οι διαταραχές στην έκφραση πεπτικών, αποτοξινωτικών και μεταβολικών ενζύμων, και η επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με το στρες, την ανοσολογική απόκριση, την απόπτωση και την αναδιαμόρφωση του επιθηλίου του μεσεντέρου. Βέβαια, υπήρξαν και κατηγορίες γονιδίων που παρουσίασαν διαφορική έκφραση σε άλλες μελέτες, αλλά όχι στην παρούσα, και οι οποίες σχετίζονταν με το μονοπάτι σηματοδότησης του ασβεστίου, το μεταβολισμό του σιδήρου, και τη λειτουργία των ριβοσωμάτων και του πρωτεασώματος. Πάντως, είναι γεγονός ότι η φύση της μελέτης δεν επέτρεψε τον εντοπισμό στοιχείων της μεταγραφικής απόκρισης που να συνδέονται αποκλειστικά με την κατάσταση της προϋπάρχουσας εμμένουσας μόλυνσης. Για παράδειγμα, το γονίδιο *IBP2*, για το οποίο έχει προταθεί πως κωδικοποιεί για έναν παράγοντα ανθεκτικότητας έναντι της μόλυνσης με τον BmCPV, καθώς επάγεται σε ένα ανθεκτικό στέλεχος του *B. mori* (Gao et al., 2014a), βρέθηκε επίσης να επάγεται και σε προνύμφες που πριν εμφανίσουν την παθογόνο μόλυνση βρίσκονταν ήδη σε κατάσταση εμμένουσας μόλυνσης. Συνεπώς, το εύρημα αυτό συνηγορεί στην άποψη ότι η προϋπάρχουσα εμμένουσα μόλυνση με τον BmCPV δεν επηρεάζει σημαντικά τη μεταγραφική απόκριση του *B. mori* έναντι μίας παθογόνου μετέπειτα μόλυνσης με τον ίδιο ιό.

Επιχειρώντας να ταξινομήσουμε τα γονίδια που παρουσίασαν υψηλή διαφορική έκφραση έπειτα από την παθογόνο μόλυνση και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία μέσω NGS και qRT-PCR (**Εικόνα 66**), αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ορισμένες βασικές λειτουργικές ομάδες, όπως είναι τα: α) γονίδια που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση (*IBP2* και *PGRP LB-like*) που αυξορρυθμίστηκαν, β) πρωτεολυτικά ένζυμα που είτε αυξορρυθμίστηκαν και πιθανώς συνδέονται με την επαγωγή απόπτωσης (*Caspase-8*, *Cathepsin B precursor* και *CPB*), είτε μειορρυθμίστηκαν (*Trypsin-like protease precursor* και *Zinc CPA1*), γ) ένζυμα απόκρισης στο στρες, που στην πλειοψηφία τους αυξορρυθμίστηκαν (*BmeIF-4E1*, *HSP25.4* και

HSP20.8) εκτός της *BmHSP90*, δ) αποτοξινωτικά ένζυμα που μειορρυθμίστηκαν (*DCXR* και *Esterase FE4-like*), ε) γονίδια που κωδικοποιούν για σηματοδοτικά μόρια (*NPLP4E*) τα οποία παρεμποδίστηκαν, και στ) γονίδια αγνώστων λειτουργιών που πιθανώς σχετίζονται με βασικές φυσιολογικές λειτουργίες του εντόμου, όπως είναι η έκδυση (*CPH43*, αυξορρυθμίστηκε) και η αντιγραφή του DNA (*LOC101735726*, μειορρυθμίστηκε).

Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι η μόλυνση με τον BmCPV ανιχνεύεται όχι μόνο στο μεσέντερο, που αποτελεί το φυσικό στόχο του BmCPV, αλλά και σε άλλα σημεία του σώματος των ζώων. Συγκεκριμένα, η μικροσκοπική παρατήρηση ζώων υπό παθογόνο μόλυνση κατέδειξε την ύπαρξη πολυέδρων στο μεσέντερο, αλλά και σε δείγματα όπως το επιδερμικό τοίχωμα, η αιμολέμφος και οι όρχεις (**Εικόνα 61**). Ακόμη, ιϊκό RNA που αντιστοιχούσε στο γονίδιο της πολυεδρίνης ανιχνεύθηκε με RT-PCR εκτός από το μεσέντερο και το περιεχόμενό του, και στο επιδερμικό τοίχωμα στην περίπτωση παθογόνου μόλυνσης (**Εικόνα 62**). Όσον αφορά δε στην κατάσταση εμμένουσας μόλυνσης, το cDNA που ήταν ειδικό για την πολυεδρίνη έδωσε επίσης προϊόν στο μεσέντερο και το περιεχόμενό του, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και σε δείγμα αυγών του στελέχους Daizo που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μελέτης της μεταγραφικής απόκρισης στη συνέχεια. Συνεπώς, αυτά τα στοιχεία συνηγορούν στην άποψη ότι ο ιός BmCPV μπορεί να επεκτείνεται σε ολόκληρο το σώμα του μεταξοσκώληκα, σε περιπτώσεις όπου η μόλυνση είναι εκτεταμένη ή προϋπάρχει σε εμμένουσα μορφή, ενώ αυτό μπορεί να σχετίζεται ακόμη και με το βαθμό ευαισθησίας ενός στελέχους απέναντι στον συγκεκριμένο ιό.

Όπως δείχθηκε από τα προϊόντα της RT-PCR, κατά την εμμένουσα μόλυνση ο αριθμός των ιϊκών RNA αντιγράφων που υπάρχουν στο μεσέντερο είναι μικρός σε σχέση με αυτόν του περιεχομένου αυτού. Λόγω της απουσίας εμφανών συμπτωμάτων παθογένειας στα ζώα αυτά (**Εικόνα 60**), και συνεπώς λόγω της μειωμένης μολυσματικότητας του BmCPV υπό αυτές τις συνθήκες, είναι πολύ πιθανό να είναι εφικτός ο έλεγχος του ιού χωρίς την ανάγκη επαγωγής εξειδικευμένης μεταγραφικής απόκρισης για την αντιμετώπισή του. Βέβαια, για την απόδειξη αυτής της υπόθεσης είναι αναγκαία η πραγματοποίηση στο μέλλον μίας μελέτης που θα συγκρίνει παράλληλα τα μεταγραφώματα μεταξύ υγιών ζώων και ζώων υπό εμμένουσα μόλυνση. Η αντικειμενικότητα αυτής της μελέτης θα διασφαλιστεί από τη χρήση ζώων του ιδίου

στελέχους και αναπτυξιακού σταδίου, τα οποία θα δεχθούν παράλληλους πειραματικούς χειρισμούς. Άλλωστε, γι' αυτό το λόγο, τυχόν διαφορές που προέκυψαν κατά τη σύγκριση των μελετών που πραγματεύτηκαν την παθογόνο μόλυνση του *B. mori* με τον ιό BmCPV (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011a) οφείλουν να αντιμετωπιστούν με επιφύλαξη, καθώς χαρακτηρίζονται από ποικιλία ως προς τα στελέχη μεταξοσκώληκα, τις αναλυτικές μεθόδους, τους πειραματικούς σχεδιασμούς και τα ιϊκά στοκ του BmCPV.

Πέραν της γενικότερης μεταγραφικής απόκρισης έναντι του BmCPV, στην παρούσα εργασία εστιάσαμε επιπλέον στη λεπτομερή ανάλυση της απόκρισης του RNAi μηχανισμού σε αυτήν τη μόλυνση, καθώς καμία από τις προηγούμενες μελέτες δεν είχε δώσει τη σχετική έμφαση σε αυτήν (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011a). Για το λόγο αυτό, ασχοληθήκαμε με δύο βασικές όψεις του «νομίσματος» της RNAi απόκρισης, που είναι η μεταγραφική απόκριση των γονιδίων που σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό και η παραγωγή vsRNAs.

Η μεταγραφική απόκριση του RNAi μηχανισμού που έπεται μίας ιϊκής μόλυνσης είναι ένα θέμα που έχει ειδικά αποδειχθεί τα τελευταία χρόνια από αρκετές μελέτες που αφορούν στα έντομα, που ανήκουν στα Ημίπτερα (Lan et al., 2015; Lan et al., 2016; Xu et al., 2012b), τα Ομόπτερα (Xu et al., 2014) και τα Δίπτερα (Campbell et al., 2008; Chauhan et al., 2012; Khoo et al., 2010; Ocampo et al., 2013; Xu et al., 2012a). Ακόμα, αντίστοιχη RNAi απόκριση έχει παρατηρηθεί και σε μύκητες (Chiba and Suzuki, 2015; Sun et al., 2009). Αυτά τα δεδομένα συγκλίνουν στην άποψη ότι η επαγωγή του RNAi μηχανισμού παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια μίας ιϊκής μόλυνσης. Άλλωστε, όπως ήδη συζητήθηκε, ακόμα και ένα μη-ειδικό dsRNA μπορεί να επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην RNAi απόκριση των εντόμων (Garbutt and Reynolds, 2012; Liu et al., 2013b; Lozano et al., 2012).

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογώντας το dsRNA ως ένα σημαντικό μόριο PAMP που παράγεται κατά τη διάρκεια μίας ιϊκής μόλυνσης, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί εάν κατά τη μόλυνση με τον ιό BmCPV παρατηρείται αντίστοιχη μεταγραφική απόκριση σε σχέση με αυτές που προαναφέρθηκαν. Με μεγάλο ενδιαφέρον ανακαλύφθηκε ότι τα βασικά γονίδια του RNAi μηχανισμού *BmDcr2* και *BmAgo2*, τα οποία συμμετέχουν στο exo-siRNA μονοπάτι, παρουσίασαν αυξορρύθμιση κατά τη διάρκεια της παθογόνου μόλυνσης με τον BmCPV σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής τους κατά την εμμένουσα

μόλυνση (**Εικόνα 68**). Αυτού του είδους η μεταγραφική απόκριση θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ενεργοποίηση του αντιϊκού μηχανισμού άμυνας. Το γεγονός ότι η αυξορρύθμιση δεν ήταν εντυπωσιακή, καθώς αφορούσε μόνο διπλασιασμό των επιπέδων των μεταγράφων των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2*, θα μπορούσε να αποδοθεί στην προϋπάρχουσα παρουσία του ιού στα ζώα πριν από την πρόκληση της παθογόνου μόλυνσης, δηλαδή στο γεγονός ότι τα επίπεδα των RNAi γονιδίων μπορεί να ήταν ήδη αυξημένα λόγω της εμμένουσας μόλυνσης. Συνεπώς, σε μελλοντικά πειράματα όπου θα χρησιμοποιηθούν ζώα κατά το δυνατόν ελεύθερα οποιασδήποτε ιϊκής μόλυνσης, θα είναι εφικτή η επαλήθευση της παραπάνω υπόθεσης και η εκτίμηση της σημασίας του RNAi μηχανισμού στην αντιμετώπιση του BmCPV.

Εκτός όμως από τη μελέτη της μεταγραφικής απόκρισης, η αντιϊκή δράση του RNAi μηχανισμού μπορεί να πιστοποιηθεί μέσω της ανίχνευσης μικρών μορίων RNA που προέρχονται από το ιϊκό γονιδίωμα ή τα ενδιάμεσά του (vsRNAs). Ανεξάρτητα, δηλαδή, από το αν τα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό του RNAi επάγονται ή όχι σε μεταγραφικό επίπεδο, είναι πλέον γνωστό ότι στη *Drosophila* και το κουνούπι ανιχνεύονται siRNAs ή piRNAs κατόπιν κάποιας ιϊκής μόλυνσης, γεγονός που υποδεικνύει εμμέσως τον ενεργό ρόλο των παραγόντων του RNAi στην αντιϊκή προστασία (Karlikow et al., 2014; Olson and Blair, 2015). Στην παρούσα μελέτη, τα δεδομένα που αφορούσαν στην ταυτότητα των μικρών RNAs έδειξαν ότι τόσο κατά την εμμένουσα, όσο και κατά την παθογόνο μόλυνση, στο μεσέντερο των προνυμφών ανιχνεύθηκαν vsRNAs με πιο άφθονα εκείνα που είχαν μήκος 20 νουκλεοτίδια (nt) (σε αντίθεση με τα 21 nt που παρατηρούνται συνήθως στη *Drosophila*, **Εικόνα 69**), γεγονός που όπως αποδείχθηκε στη συνέχεια οφείλεται πιθανότατα στη δράση της BmDcr2 (Zografidis et al., 2015). Μάλιστα, δείχθηκε ότι τα vsRNAs προέρχονταν σχεδόν σε ισάριθμες ποσότητες τόσο από την κωδικοποιό, όσο και από τη μη-κωδικοποιό αλυσίδα του γονιδιώματος του BmCPV. Η ανίχνευση των vsRNAs που προέρχονται και από τις δύο αλυσίδες του ιϊκού γονιδιώματος, προκειμένου για έναν dsRNA ιό της οικογένειας *Reoviridae*, έχει άλλωστε παρατηρηθεί και στο παρελθόν (Li et al., 2013; Nandety et al., 2013; Schnettler et al., 2013b; van Cleef et al., 2014). Συνεπώς, με βάση τα ευρήματά μας που αφορούν στην κατανομή των vsRNAs ως προς το μήκος τους και την πολικότητά τους, ο RNAi μηχανισμός εμφανίζεται ενεργός έναντι της μόλυνσης με τον BmCPV, κατά παρόμοιο τρόπο με αυτόν που έχει παρατηρηθεί στη *Drosophila* έναντι

ορισμένων RNA ιών. Βέβαια, και στο επίπεδο των παραγόμενων vsRNAs, η προϋπάρχουσα εμμένουσα μόλυνση ενδέχεται να επηρέασε την απόκριση του RNAi μηχανισμού κατά την μετέπειτα παθόγονο μόλυνση. Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο RNAi μηχανισμός είναι καθοριστικός για την αναγνώριση και αλληλεπίδραση με τον ιό BmCPV, ώστε η μόλυνση να διατηρηθεί σε αυτή τη λανθάνουσα μορφή, όπως έχει άλλωστε παρατηρηθεί και σε άλλες ασυμπτωματικές ιϊκές μολύνσεις στα έντομα (Lan et al., 2016; Nandety et al., 2013; Wu et al., 2010). Ακόμη, η μη-σημαντική απόκριση του μηχανισμού της φυσικής ανοσίας ενδεχομένως να ερμηνεύεται, επίσης, από την προϋπαρξη της εμμένουσας μόλυνσης με τον ιό BmCPV, γεγονός που θα μπορούσε να έχει καταστείλει την αναμενόμενη ανοσολογική απόκριση (**Πίνακας 9**).

Συνεπώς, τα δεδομένα που προέκυψαν μαρτυρούν την ύπαρξη σύνθετης μεταγραφικής απόκρισης στις προνύμφες του *B. mori*, οι οποίες έχουν υποστεί μόλυνση με τον ιό BmCPV, μέσω της οποίας αναδεικνύονται για πρώτη φορά ομάδες γονιδίων που φαίνεται να έχουν εξειδικευμένη δράση έναντι της συγκεκριμένης μόλυνσης. Ακόμη, σε αντίθεση με τη γνωστή δυσκολία πρόκλησης *in vivo* RNAi στο μεταξοσκώληκα, όπως δείχθηκε στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή (βλ. §3.1.4.2) και σε παλαιότερες μελέτες (Swevers et al., 2013b; Terenius et al., 2011), τα ευρήματά μας υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός ενεργού exo-siRNA μονοπατιού που αντιμετωπίζει με επιτυχία μία μόλυνση από έναν dsRNA ερέθισμα, όπως είναι το γονιδίωμα του ιού BmCPV. Βέβαια, η παρούσα μελέτη είναι μοναδική στο είδος της όσον αφορά στην ανάλυση μίας εμμένουσας μόλυνσης, και στο μέλλον θα ήταν χρήσιμο να επιβεβαιωθεί και από άλλες ανεξάρτητες προσεγγίσεις και εργασίες.

4.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΟΥ dsRNA ΑΠΟ ΤΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΜΕΣΟ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής επιχειρήθηκε να μελετηθεί η επίδραση που μπορεί να έχει η πρόσληψη του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού, και κατά συνέπεια, στην πρόκληση της γονιδιακής αποσιώπησης. Για το σκοπό αυτό, αρχικά εξετάστηκε η εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης CeSID-1, η οποία λειτουργεί ως μεταφορέας μορίων dsRNA, σε κύτταρα μεταξοσκώληκα, και το επακόλουθο πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής της με χρήση τεχνικών ανοσοφθορισμού. Ακολούθως, διενεργήθηκαν

ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα εμβαπτισμού κυττάρων Bm5 σε μέσο που περιείχε ειδικό dsRNA, ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης. Τέλος, διερευνήθηκε ο ρόλος των RNAi παραγόντων BmR2D2 και BmTranslin2 στην ικανότητα των κυττάρων μεταξοσκώληκα να διευκολύνουν την πρόσληψη dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο και την επακόλουθη πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης, μέσω σταθερού μετασχηματισμού με φορείς υπερέκφρασης για τα γονίδια αυτά.

Μελέτη ετερόλογης υπερέκφρασης και υποκυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης CeSID-1 του *Caenorhabditis elegans* σε κύτταρα Bm5

Από τα αποτελέσματα της εκτοπικής έκφρασης της πρωτεΐνης CeSID-1 στα κύτταρα Bm5 (**Εικόνα 70**) προέκυψε ότι εκφράζεται ως μονομερές (~89 kDa) ή διμερές (~180 kDa), όπως έχει άλλωστε ήδη περιγραφεί για τη *Drosophila*, αλλά και ορισμένα θηλαστικά (Li et al., 2015b; Pratt et al., 2012; Shih et al., 2009). Ο σχηματισμός του διμερούς (ή πολυμερούς) φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του καναλιού ή του πόρου που θα έχει το κατάλληλο μέγεθος για τη μεταφορά μορίων dsRNA, ενώ προτείνεται ότι η ίδια η πρόσδεση ενός μορίου dsRNA ίσως είναι αυτή που πυροδοτεί τον πολυμερισμό της SID-1 και τον επακόλουθο σχηματισμό του καναλιού μεταφοράς του (Shih et al., 2009). Σε υποκυτταρικό επίπεδο, η CeSID-1 εντοπίζεται συχνά στο όριο της κυτταρικής μεμβράνης (**Εικόνα 71**), γεγονός που δικαιολογείται από τη διαμεμβρανική δομή της η οποία διευκολύνει την είσοδο μορίων dsRNA στο κύτταρο. Παράλληλα, τα κοκκία που σχηματίζονται λόγω της συσσωρευμένης έκφρασης της CeSID-1 στο κυτταρόπλασμα πιθανώς αντιστοιχούν στον εντοπισμό της CeSID-1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi (Feinberg and Hunter, 2003).

Διερεύνηση της δυνατότητας πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης μέσω εμβαπτισμού κυττάρων μεταξοσκώληκα σε μέσο που περιέχει dsRNA

Αναφορικά με τον εμβαπτισμό κυττάρων σε μέσο που περιέχει dsRNA, όπως ήδη περιγράφηκε (§1.2.6), δύο βασικές προϋποθέσεις για την επιτυχία της επιθυμητής γονιδιακής αποσιώπησης είναι η επιτυχής πρόσληψη του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, αλλά και η αποδοτική ενσωμάτωσή του στο μηχανισμό του RNAi που ευθύνεται για την επακόλουθη πρόκληση της αποσιώπησης. Ως προς την πρώτη παράμετρο, προκειμένου ειδικά για τα Λεπιδόπτερα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι τα κύτταρα

Hi5, Sl2 και Bm5 έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν φθορίζοντα μόρια dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, αν και δεν είναι γνωστό το ποσοστό των κυττάρων στα οποία αυτό επιτυγχάνεται (Swevers and Smagghe, 2012; Terenius et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη, εστιάσαμε στην παράμετρο της ενσωμάτωσης του dsRNA στον RNAi μηχανισμό, καθώς μέσω πειραμάτων εμβαπτισμού κυττάρων *B. mori* σε μέσο που περιείχε dsRNA εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα πρόκλησης γονιδιακής αποσιώπησης. Στην περίπτωση των μετασχηματισμένων κυττάρων L6Q-Luc που εξέφραζαν σταθερά τη λουσιφεράση, αν και η διαφορά σε σχέση με το μάρτυρα δεν προσδιορίστηκε ως στατιστικά σημαντική, ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση της βιοφωταύγειας των κυττάρων έπειτα από εμβαπτισμό σε μεγάλες συγκεντρώσεις dsLuc (**Εικόνα 72**). Αντίστοιχα, στην περίπτωση του εμβαπτισμού κυττάρων Bm5 σε μέσο που περιείχε dsVH-ATPase, η βιωσιμότητα των κυττάρων φάνηκε επίσης να επηρεάζεται σε σχέση με το μάρτυρα dsMalE 15 (**Εικόνα 73**). Πιθανότατα, ο απλός εμβαπτισμός ακόμα και σε μη-ειδικό dsRNA σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις, όπως αυτή του μάρτυρα dsMalE 15, θα μπορούσε να έχει τοξικές επιπτώσεις για τα κύτταρα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση σε σχέση με το μάρτυρα που δε δέχτηκε κανένα χειρισμό με dsRNA. Βέβαια, στην τελευταία περίπτωση εμβαπτισμού κυττάρων σε μέσο που περιείχε dsRNA, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις του dsgfp δεν υπήρξε καμία σημαντική επίδραση στον παραγόμενο βιοφθορισμό των κυττάρων L6Q που εξέφραζαν την πρωτεΐνη GFP (**Εικόνα 74**).

Τέλος, έγινε απόπειρα κατασκευής ενός σταθερού κυτταρικού συστήματος για τη μελέτη της πρόσληψης μορίων dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο, όπου σκοπός ήταν να ελεγχθεί ο ρόλος σε αυτή τη διαδικασία ορισμένων πρωτεϊνών πρόσδεσης μορίων dsRNA που εμπλέκονται στο RNAi αλλά δεν εκφράζονται φυσιολογικά στα κύτταρα Bm5. Από τα αποτελέσματα ορισμένων εισαγωγικών πειραμάτων, προέκυψε ότι η υπερέκφραση της BmR2D2 σε μεγάλες συγκεντρώσεις dsLuc στο εξωκυττάριο μέσο ενδέχεται να προκαλέσει ενίσχυση και όχι αποσιώπηση της έκφρασης της λουσιφεράσης, όπως υπολογίζεται από την παραγόμενη βιοφωταύγεια (**Εικόνα 76**). Αντίθετα, η υπερέκφραση της BmTranslin2 δεν εμφάνισε ουδεμία επίδραση ως προς τη διευκόλυνση της παθητικής μεταφοράς μορίων dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο.

Τα αποτελέσματα από τα παραπάνω προκαταρκτικά πειράματα εμβαπτισμού κυττάρων σε dsRNA προσφέρουν ενδείξεις για την ύπαρξη κάποιου είδους επίδρασης

της πρόσληψης μορίων dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο στον RNAi μηχανισμό του μεταξοσκώληκα. Ωστόσο, απαιτείται πιο συστηματική μελέτη του αντικειμένου, με περισσότερες βιολογικές επαναλήψεις και κάνοντας χρήση μεγαλύτερης ποικιλίας στοχευόμενων γονιδίων, καθώς και μορίων dsRNA διαφορετικού μεγέθους, ούτως ώστε να υπάρξει η δυνατότητα εξαγωγής σαφέστερων και ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

4.4 ΣΥΝΟΨΗ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ

Εξετάζοντας συνολικά τα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, καταλήγουμε σε ορισμένα βασικά συμπεράσματα που αφορούν στα μονοπάτια των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα και τους παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού (**Εικόνα 77**).

Αναφορικά με τα γονίδια *BmDcr2* και *BmAgo2*, μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αναδείχθηκε ο καθοριστικός ρόλος τους σε σημαντικές διαδικασίες του RNAi μηχανισμού, όπως είναι η γονιδιακή αποσιώπηση που προκαλείται μέσω μορίων dsRNA και η απόκριση σε μία ιϊκή μόλυνση. Μάλιστα, η ανίχνευση vsiRNAs τόσο στην περίπτωση της εμμένουσας μόλυνσης με τον BmCPV, όσο και σε αυτήν της παθογόνου, επιβεβαίωσε την εμπλοκή της ριβονουκλεάσης BmDcr2 και στις δύο καταστάσεις. Άλλωστε, οι δύο αυτές πρωτεΐνες βρέθηκαν να συνεντοπίζονται συχνά στο υποκυτταρικό περιβάλλον, γεγονός που υπογραμμίζει τη δράση τους σε ένα κοινό μονοπάτι. Ακόμη, η μελέτη του μεταγραφικού προφίλ τους στο μεσέντερο σηματοδότησε έναν πιθανό ρόλο τους στην άμυνα έναντι εξωγενών νουκλεϊκών οξέων, αλλά και την ενδεχόμενη ορμονο-εξαρτώμενη ρύθμιση της έκφρασής τους.

Προκειμένου για το γονίδιο *BmAgo3*, είναι πλέον ξεκάθαρο ότι διαθέτει ουσιαστικό ρόλο στη dsRNA-εξαρτώμενη γονιδιακή αποσιώπηση του *B. mori*, ενώ τα ευρήματά μας δεν υποστηρίζουν τη συμμετοχή του σε μονοπάτια γονιδιακής αποσιώπησης που αφορούν μονόκλωνα μόρια RNA, όπως περιγράφεται για τη *Drosophila*. Επιπλέον, φαίνεται ότι συμμετέχει ουσιαστικά στον έλεγχο των επιπέδων μίας ιϊκής μόλυνσης, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του BmMLV στα κύτταρα Bm5 (εμμένουσα μόλυνση) ή του AcMNPV-EYFP στα κύτταρα Sf21 (οξεία μόλυνση).

Όπως προκύπτει, λοιπόν, τα στοιχεία αυτής της μελέτης στηρίζουν την ύπαρξη αλληλεπικάλυψης μεταξύ των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του κυττάρου. Έτσι, προκειμένου για

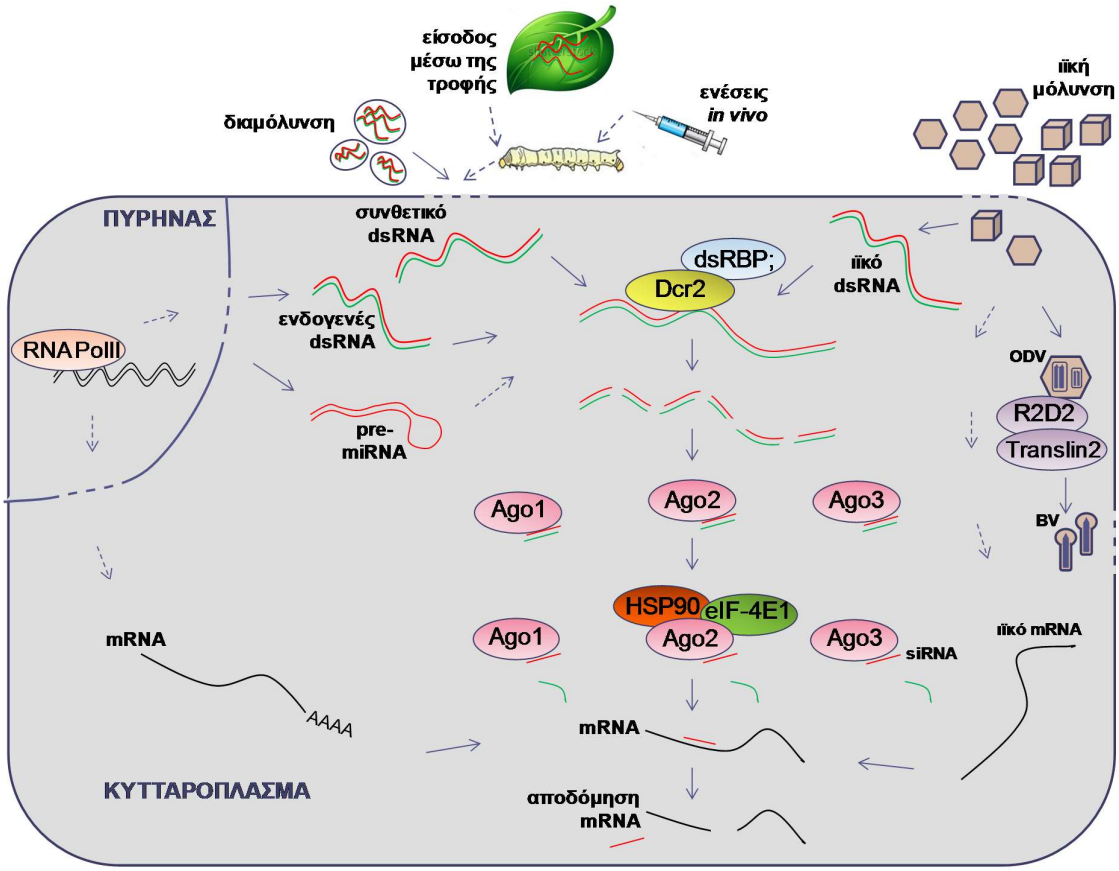
την dsRNA-εξαρτώμενη γονιδιακή αποσιώπηση, η συμμετοχή και των τριών μονοπατιών (miRNA, siRNA και piRNA) μέσω των παραγόντων κλειδιών BmAgo1, BmAgo2, BmAgo3 και BmDcr2 αποδεικνύεται ως απαραίτητη για την ορθή λειτουργία του RNAi μηχανισμού. Μάλιστα, η συνεργιστική, και εν δυνάμει αντισταθμιστική, δράση παραγόντων των μονοπατιών siRNA και piRNA αποκαλύφθηκε όταν η αποσιώπηση του γονιδίου *BmAgo3* παράλληλα με την ύπαρξη εμμένουσας μόλυνσης με τον BmMLV οδήγησε σε αυξορρύθμιση του *BmAgo2* σε συνδυασμό με τα *BmHSP90* και *BmeIF-4E1*. Βέβαια, δεν αποκλείεται η δράση του γονιδίου *BmAgo3* να σχετίζεται με την κατάσταση εμμένουσας μόλυνσης από τον BmMLV, ενώ αντίστοιχα το *BmAgo2* να επάγεται σε πιο οξείες φάσεις της ιϊκής μόλυνσης.

Σχετικά με το δεύτερο γονίδιο του μονοπατιού piRNA που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, το *BmAub*, η συμπεριφορά του ως προς τον RNAi μηχανισμό βρέθηκε να παρουσιάζει μεγάλες διαφορές σε σχέση με το *BmAgo3*. Συγκεκριμένα, το γονίδιο αυτό δε βρέθηκε να συμμετέχει στο μηχανισμό της γονιδιακής αποσιώπησης που προκαλείται μέσω dsRNA στα κύτταρα Bm5, ενώ τα επίπεδα έκφρασής του δεν επηρεάστηκαν έπειτα από τη μόνιμη μερική αποσιώπηση του *BmAgo3*. Αν και δεν ανιχνεύθηκε κάποιος εμφανής ρόλος του σε σχέση με τη γονιδιακή αποσιώπηση στο μεταξοσκώληκα, εντούτοις φαίνεται ότι είναι αναγκαίο να εκφράζεται σε φυσιολογικά επίπεδα για την επιβίωση των κυττάρων Bm5. Επιπλέον, φαίνεται ότι με κάποιον τρόπο παρεμβαίνει στην έκβαση μίας ιϊκής μόλυνσης, καθώς παρόλο που η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από την παθογόνο μόλυνση με τον ιό BmCPV, σε περίπτωση αποσιώπησής του ενισχύεται πιθανότατα η παραγωγή ODVs από τον ιό AcMNPV-EYFP.

Προκειμένου για τα δύο γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες δέσμευσης μορίων dsRNA, *BmR2D2* και *BmTranslin2*, τα πειράματά μας οδήγησαν σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Καταρχήν, κανένα από τα δύο γονίδια δεν αναδείχθηκε ως σημαντικό για την πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω dsRNA στα κύτταρα Bm5. Ωστόσο, εντοπίστηκαν τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα, έπειτα από υπερέκφρασή τους, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη επιπρόσθετων ρόλων που ενδεχομένως δε σχετίζονται με τον RNAi μηχανισμό. Από την άλλη πλευρά, σημαντικό εύρημα αποτέλεσε η κρίσιμη επίδραση και των δύο γονιδίων στην ανάπτυξη του ιού AcMNPV-EYFP στα κύτταρα Sf21, και ειδικότερα στη μετάβασή του από την έγκλειστη στη βλαστητική φάση, η οποία ευνοεί τη διακυτταρική διάδοση του ιού.

Επιπλέον, η BmR2D2 εντοπίζεται συχνά στην περιφέρεια του κυττάρου, συνεπώς πλησίον της κυτταρικής μεμβράνης. Η παρατήρηση αυτή θα άξιζε να μελετηθεί περαιτέρω μελλοντικά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι σε κύτταρα όπου η BmR2D2 υπερεκφράζεται σταθερά και υφίστανται εμβαπτισμό σε μέσο που περιέχει ειδικό dsRNA, υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του γονιδίου-στόχου παραδόξως ενισχύεται.

Τέλος, δύο γονίδια που δε συμμετέχουν στον πυρήνα του RNAi μηχανισμού, αλλά αναδείχθηκαν για την αλληλεπίδρασή τους με το μηχανισμό της γονιδιακής αποσιώπησης μέσα από την παρούσα Διδακτορική Διατριβή, είναι εκείνα που κωδικοποιούν για τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης BmeIF-4E1 και τη συνοδό-πρωτεΐνη BmHSP90. Όπως δείχθηκε, η αποσιώπηση του *BmAgo3* και η επακόλουθη ενίσχυση της ανάπτυξης του ιού BmMLV είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της



Εικόνα 77 Το μοντέλο που περιγράφει τα μονοπάτια των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*. Ο τρόπος δράσης των βασικών παραγόντων του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα του *B. mori*, όπως συνοψίζεται σύμφωνα με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

έκφρασης, εκτός από το γονίδιο-κλειδί του μονοπατιού siRNA *BmAgo2*, και των γονιδίων *BmeIF-4E1* και *BmHSP90*. Και στη συνθήκη της παθογόνου μόλυνσης από τον BmCPV, όμως, παρατηρήθηκε επαγωγή του *BmeIF-4E1*, αλλά και του *BmHSP90* μόνο στην περίπτωση των ζώων 4^{ου} σταδίου όπου η μόλυνση ήταν πιο έντονη. Φαίνεται, λοιπόν, ότι τα γονίδια αυτά πιθανότατα συγκροτούν από κοινού ένα δυναμικό δίκτυο, το οποίο σχετίζεται με την κατάσταση της ιϊκής μόλυνσης και του επακόλουθου κυτταρικού στρες με εν δυνάμει ικανότητα να μπλοκάρει το μηχανισμό της μετάφρασης και αντίθετα να επάγει το σχηματισμό κοκκίων στρες. Εναλλακτικά, το *BmHSP90* θα μπορούσε να επάγεται εξαιτίας της αυξορρύθμισης του *BmAgo2*, το οποίο απαιτεί τη συνδρομή της BmHSP90 για την ορθή συγκρότηση του RISC, ή ακόμη λόγω συμμετοχής της BmHSP90 στην παραγωγή δευτερογενών piRNAs λόγω της υφιστάμενης ιϊκής μόλυνσης.

4.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ RNAi ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ *DROSOPHILA*

Τα μονοπάτια των μικρών μορίων RNA έχουν κατανοηθεί σε μεγάλο βαθμό στη *Drosophila*, η οποία αντιπροσωπεύει ένα γένος πρότυπο για την τάξη των Διπτέρων. Εντούτοις, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη εμπεριστατωμένη προσπάθεια κατανόησης του μηχανισμού του RNAi σε ένα Λεπιδόπτερο έντομο, όπως είναι ο μεταξοσκώληκας *B. mori*. Δεδομένης λοιπόν της αφθονίας των ήδη υπαρχόντων γνώσεων που αφορούν στη *Drosophila*, κρίνεται σκόπιμο να επισημανθούν οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ των δύο αυτών εντόμων-πρότυπων συστημάτων.

Όσον αφορά στους κύριους παράγοντες που συνιστούν τον RNAi μηχανισμό, τόσο στο μεταξοσκώληκα (§3.1.1) όσο και στη *Drosophila* (Ghildiyal and Zamore, 2009), τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Dcr2 και Ago2 συμμετέχουν ενεργά σε αυτόν. Επιπλέον, η εμπλοκή του γονιδίου *BmAgo1* του μεταξοσκώληκα στην αποσιώπηση που προκαλείται μέσω δίκλωνων μορίων RNA είναι ένα εύρημα που έχει ήδη περιγραφεί και για το ομόλογο γονίδιο της *Drosophila* (Siomi and Siomi, 2009; Tomari et al., 2007).

Ωστόσο, μεταξύ των δύο εντόμων εντοπίζονται ορισμένες σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους RNAi παράγοντες-κλειδιά, όπως είναι τα γονίδια *R2D2* και *Ago3*, και τους ρόλους τους στην dsRNA-εξαρτώμενη γονιδιακή αποσιώπηση. Ειδικότερα, προκειμένου

για το γονίδιο *BmR2D2*, η παρουσία του δεν επηρεάζει την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού (§3.1.1), ενώ αντίθετα το ομόλογο γονίδιο στη *Drosophila* κατέχει κρίσιμο ρόλο για τη λειτουργικότητα του RNAi (Liu et al., 2003). Ωστόσο, ανεξάρτητα από την απουσία συμμετοχής του στην απόκριση του RNAi μηχανισμού που πυροδοτείται μέσω μορίων dsRNA, το γονίδιο *BmR2D2* βρέθηκε να επηρεάζει την έκβαση ενός συγκεκριμένου τύπου ιϊκής μόλυνσης, όπως αυτή του μπακουλοϊού AcMNPV-EYFP, γεγονός που ενδεχομένως συνδέεται με το ρόλο του γονιδίου *r2d2* της *Drosophila* (Kemp et al., 2013; Marques et al., 2013; Wang et al., 2006). Όσον αφορά, δε, στο γονίδιο *BmAgo3*, από την παρούσα Διδακτορική Διατριβή συνάγεται το συμπέρασμα ότι συνιστά βασικό παράγοντα του μηχανισμού της γονιδιακής αποσιώπησης στα κύτταρα Bm5 του μεταξοσκώληκα, και εμπλέκεται σε διαδικασίες που πυροδοτούνται από μόρια dsRNA (§3.1.1, 3.1.3), σε αντίθεση με τη *Drosophila* όπου η συμμετοχή του ομόλογού του γονιδίου έχει αποδειχθεί μόνο σε σχέση με το μονοπάτι piRNA, το οποίο αφορά σε μόρια ssRNA (Gammon and Mello, 2015). Επιπλέον, και για το *BmAgo3* βρέθηκε ότι εμπλέκεται στο μηχανισμό διαχείρισης μίας ιϊκής μόλυνσης, η οποία προκαλείται από DNA (AcMNPV-EYFP, §3.2.1.2) ή RNA ιούς (BmMLV, §3.1.3).

Εξετάζοντας την περίπτωση της ιϊκής μόλυνσης από την οπτική γωνία των vsiRNAs που εντοπίζονται, προκύπτει ότι ο μηχανισμός του RNAi είναι ενεργός και στα δύο είδη εντόμων που συγκρίνονται εδώ. Όπως έχει δειχθεί και στο παρελθόν, στον *B. mori* κατόπιν μόλυνσης από κάποιον DNA (Jayachandran et al., 2012; Mehrabadi et al., 2015) ή RNA ιό (Wu et al., 2013), τα ιϊκά μικρά RNAs που παράγονται έχουν το χαρακτηριστικό μέγεθος των 20 νουκλεοτιδίων (nt), και στην παρούσα μελέτη εντυπωσιακά επιβεβαιώνεται η ανίχνευση vsiRNAs του ιδίου μεγέθους (**Εικόνα 69**). Αντίθετα, στη *Drosophila* υπερισχύει η παραγωγή vsiRNAs μεγέθους 21 νουκλεοτιδίων. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση θα μπορούσε να οφείλεται σε λειτουργικές διαφορές μεταξύ των ομολόγων πρωτεϊνών Dcr2 που προέρχονται από το κάθε είδος εντόμου, και ειδικότερα μεταξύ των περιοχών ελικάσης που είναι κρίσιμες για την αναγνώριση του dsRNA υποστρώματος και τον επακόλουθο κατακερματισμό του σε siRNAs (Sinha et al., 2015; Welker et al., 2011). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι από τη σχετική βιβλιογραφία που αναφέρεται στη *Drosophila* απουσιάζουν αντίστοιχες μελέτες στις οποίες να ερευνώνται vsiRNAs που προκύπτουν έπειτα από μόλυνση με κάποιον ιό την

οικογένειας *Reoviridae*, όπως είναι στην προκειμένη περίπτωση ο BmCPV, και συνεπώς δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεση σύγκριση.

Τέλος, σχετικά με την πρόσληψη του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο και την επακόλουθη πρόκληση εξειδικευμένης γονιδιακής αποσιώπησης, όπως παρατηρείται σε κυτταροσειρές της *Drosophila* (π.χ. στα κύτταρα S2) η σύνθετη αυτή διαδικασία επιτελείται αποτελεσματικά μέσω του μηχανισμού της ενδοκύτωσης (Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006). Ωστόσο, οι παρατηρήσεις που αφορούν στον *B. mori* δεν οδηγούν σε αντίστοιχα συμπεράσματα, καθώς, ναι μεν υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την επιτυχία της πρόσληψης μορίων dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο (Swevers and Smagghe, 2012; Terenius et al., 2011), αλλά από τα ενδεικτικά πειράματα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη (§3.3.1.3) προκύπτει ότι πιθανώς στο μεταξοσκώληκα εντοπίζεται κάποιου είδους ανθεκτικότητα κατά τη φάση της ενσωμάτωσης του dsRNA στο μηχανισμό του RNAi, έτσι ώστε να μην επιτυγχάνεται η επιθυμητή αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου. Από την άλλη πλευρά, στα πειράματα διαμόλυνσης όπου η διαδικασία της ενδοκύτωσης υποκαθιστάται από την εφαρμογή του πολυκατιονικού λιπιδικού παράγοντα Escort^{TM}, παρατηρείται μεγάλη αποτελεσματικότητα ως προς τη γονιδιακή αποσιώπηση (§3.1.1, 3.1.3). Συνεπώς, η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα στην πρόκληση αποσιώπησης μέσω εμβαπτισμού κυττάρων σε μέσο που περιέχει dsRNA πιθανώς οφείλεται σε κάποιο δυσλειτουργικό γονίδιο που εμπλέκεται στη μετάβαση από τη φάση της πρόσληψης του dsRNA στην ενσωμάτωσή στον RNAi μηχανισμό.

4.6 Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αναπτύχθηκε εκτενώς προς την κατεύθυνση της μελέτης ορισμένων από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού στο μεταξοσκώληκα *B. mori*. Κατ' επέκταση, τα συμπεράσματα που προέκυψαν θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν με τέτοιον τρόπο, ώστε η μελέτη αυτή να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των παραγόντων αυτών σε σχέση με τη λειτουργία του μηχανισμού του RNAi στην τάξη των Λεπιδοπτέρων εν γένει.

Ειδικότερα, σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, ταυτοποιήθηκαν ορισμένοι παράγοντες που ευθύνονται για την εύρυθμη λειτουργία του RNAi μηχανισμού σε κυτταροκαλλιέργειες μεταξοσκώληκα. Επεκτείνοντας λοιπόν τα ευρήματά μας σε

πειράματα *in vivo*, θα ήταν χρήσιμο να δοκιμαστεί εάν η υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ενδονουκλεάσες BmAgo1, BmAgo2 και BmAgo3, καθώς και για τη ριβονουκλεάση BmDcr2, επηρεάζει εξίσου σημαντικά την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού και στο επίπεδο του ζωντανού οργανισμού. Μάλιστα, ήδη έχουν προκύψει θετικές ενδείξεις ως προς τη χρήση αυτής της στρατηγικής, καθώς τα ανωτέρω αποτελέσματα αναφορικά με το γονίδιο *BmAgo2* πρόσφατα επιβεβαιώθηκαν από ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα, μέσω πραγματοποίησης ενέσεων dsRNA σε διαγονιδιακά ζώα όπου υπερεκφράζεται η BmAgo2 (Li et al., 2015e).

Αναφορικά με την επίδραση μίας προϋπάρχουσας (εμμένουσας) ιϊκής μόλυνσης στη λειτουργικότητα του RNAi μηχανισμού, δεν προέκυψε ότι έχει αρνητικό χαρακτήρα. Η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι παρατηρήθηκαν μεγάλες ομοιότητες στη μεταγραφική απόκριση μεταξύ των ζώων υπό παθογόνο μόλυνση της παρούσας μελέτης (όπου προϋπήρχε ο ιός BmCPV σε εμμένουσα μορφή) και των σχετικών αναφορών που πραγματεύονται μόλυνση του ιδίου τύπου σε μεταξοσκώληκες που δεν έφεραν ήδη τον ιό (**Πίνακας 5**) (Gao et al., 2014b; Gao et al., 2014a; Wu et al., 2009; Wu et al., 2011a). Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε αυξορρύθμιση των γονιδίων *BmAgo2* και *BmDcr2* του siRNA μονοπατιού (**Εικόνα 38**) και παραγωγή vsiRNAs (**Εικόνα 69**), συνεπώς ο μηχανισμός του RNAi ήταν λειτουργικός.

Όπως είναι γνωστό, η φυσική έκθεση σε κάποιο μολυσματικό παράγοντα είναι σε θέση να δημιουργήσει ένα είδος ανοσολογικής μνήμης μέσω του μηχανισμού της ανοσολογικής διέγερσης (immune priming) (Hillyer, 2016; Masri and Cremer, 2014; Schmid-Hempel, 2005). Έτσι, λοιπόν, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η εμμένουσα μόλυνση με τον ιό BmCPV να λειτούργησε θετικά ως προς την αντιμετώπιση της επικείμενης παθογόνου μόλυνσης με τον ίδιο ιό λόγω της ήδη υπάρχουσας ευαισθητοποίησης του *B. mori*. Βέβαια, αναφορικά με την ευαισθησία των ίδιων ζώων σε κάποιο άλλο επακόλουθο dsRNA ερέθισμα, η προϋπάρχουσα εμμένουσα μόλυνση ενδεχομένως να ευθύνεται για μία γενικευμένη κατάσταση μη-ειδικής ενεργού ανοσολογικής απόκρισης, η οποία θα μπορούσε να αποτρέπει οποιοδήποτε «παρασιτικό» dsRNA να επιτελέσει τη λειτουργία του. Για παράδειγμα, στην περίπτωση προσβολής από ένα διαφορετικό είδος ιού ή ένεσης με dsRNA που έχει συντεθεί *in vitro*, η προϋπάρχουσα εμμένουσα μόλυνση θα μπορούσε να δράσει θετικά ως προς την υγεία του ξενιστή-μεταξοσκώληκα και αρνητικά ως προς την έκβαση της νέας ιϊκής

μόλυνσης ή των πειραμάτων γονιδιακής αποσιώπησης, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, αξίζει να προτιμηθεί η χρήση πλήρως υγιών ζώων σε σχέση με ζώα υπό εμμένουσα μόλυνση για την πραγματοποίηση πειραμάτων γονιδιακής αποσιώπησης με μεγαλύτερη επιτυχία.

Ακόμη, όπως έχει δειχθεί, τα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi έπειτα από διαμόλυνση κυττάρων Bm5 είναι επιτυχή (§3.1.1, 3.1.3). Αντίστροφα, όμως, είναι προφανής η δυσκολία να αποσιωπηθούν γονίδια έπειτα από εμβαπτισμό των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει dsRNA (§3.3.1.3) ή μετά από την πραγματοποίηση ενέσεων ειδικού dsRNA *in vivo* (§3.1.4.2). Ως αποτέλεσμα των παραπάνω παρατηρήσεων, η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αναδεικνύει τη διαδικασία πρόσληψης του dsRNA στο εσωτερικό του κυττάρου και τη μετάβαση στο μετέπειτα στάδιο της ενσωμάτωσής του στον RNAi μηχανισμό ως πολύ σημαντικούς και καθοριστικούς παράγοντες που πιθανότατα ευθύνονται για την έλλειψη ευαισθησίας του μεταξοσκώληκα σε πειράματα που περιλαμβάνουν ενέσεις ειδικού dsRNA, και τη δυστοκία και ανεπιτυχή εφαρμογή αυτών των πειραμάτων στα Λεπιδόπτερα, γενικότερα. Συνεπώς, θα ήταν χρήσιμο μελλοντικά να μελετηθεί περαιτέρω σε βάθος το κομμάτι αυτό της διαδικασίας που αφορά στη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω RNAi.

4.7 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα Διδακτορική Διατριβή αναφορικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού στον *B. mori* θα μπορούσαν υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις να αποτελέσουν τη βάση για τη δημιουργία αποτελεσματικών εργαλείων που θα διευκολύνουν το επιστημονικό πεδίο της Βιοτεχνολογίας εντόμων.

Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε σε μεγάλο βαθμό στην «ευφυΐα» του επαγόμενου συστήματος αναφοράς του «RNAi του RNAi μηχανισμού», το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί πρωτοποριακά από το εργαστήριό μας για την ταυτοποίηση παραγόντων που είναι σημαντικοί και ελέγχουν καθοριστικά τη σωστή λειτουργία του αποσιωπητικού μηχανισμού στον *B. mori* (Swevers et al., 2011). Το σύστημα αυτό παρουσιάζει πλεονεκτήματα, όπως είναι η υψηλή απόδοση (high-throughput), λόγω της δυνατότητας ταυτόχρονου ελέγχου πολυάριθμων παραγόντων, και η ευαισθησία, λόγω

της χρήσης των επαγόμενων από την εκδυσόνη φορέων αναφοράς. Η συγκεκριμένη τεχνολογία θα μπορούσε να καθιερωθεί ως το κατεξοχήν εργαλείο για την ανίχνευση νέων γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό του μεταξοσκώληκα ή άλλων εντόμων που διαθέτουν εμπορικό και ερευνητικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, επειδή είναι πιθανό οι παράγοντες του RNAi μηχανισμού που σχετίζονται με την αντιμετώπιση κάποιας ιϊκής μόλυνσης να διαφέρουν μεταξύ παθογόνων, θα ήταν χρήσιμο το εν λόγω σύστημα αναφοράς να αξιοποιηθεί σε συνδυασμό με κάποια συνυπάρχουσα ιϊκή μόλυνση, ούτως ώστε να ταυτοποιηθούν οι παράγοντες του RNAi μηχανισμού που συσχετίζονται με συγκεκριμένα είδη ιϊκών μολύνσεων. Τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από μία ανάλυση αυτού του είδους μπορούν να κριθούν επωφελή για την ενίσχυση πληθυσμών εντόμων με παράγοντες που είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στην αντιμετώπιση κάποιου ιδιαιτέρως επιβλαβούς ιϊκού παθογόνου.

Ακόμη, η πληθώρα πληροφοριών που προέκυψαν μέσω της ανάλυσης των αποτελεσμάτων αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) από δείγματα μολυσμένων με τον ιό BmCPV ζώων μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη μεθόδων ελέγχου του συγκεκριμένου ιού στο μεταξοσκώληκα, αλλά και γενικότερα των ιϊκών μολύνσεων σε ωφέλιμα έντομα (π.χ. μέλισσα). Πιο συγκεκριμένα, καθώς η ανάλυση του μεταγραφώματος των ζώων υπό παθογόνο μόλυνση ανέδειξε μία ευρεία ομάδα mRNAs που παρουσίαζαν αυξορρύθμιση σε σχέση με τα ζώα υπό εμμένουσα μόλυνση, αυτή τους η απόκριση θα μπορούσε να συσχετιστεί με πιθανή συμμετοχή τους στην αντιϊκή προστασία των προνυμφών έναντι της μόλυνσης. Συνεπώς, σύμφωνα με το πρότυπο της *Drosophila*, εάν η περιοχή ελικάσης της BmDcr2 λειτουργεί ως PRR, είναι αναμενόμενο να αναγνωρίζει τον παθογόνο ιό και ενδεχομένως να σηματοδοτεί την παραγωγή μορίων με χαρακτηριστικά κυτοκίνης, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του Vago (Deddouche et al., 2008). Έτσι, για παράδειγμα, γονίδια που κωδικοποιούν για παράγοντες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, όπως είναι η πρωτεΐνη IBP2, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια Cecropin και Attacin, ή ορισμένες πρωτεΐνες θερμικού σοκ, θα μπορούσαν να κλωνοποιηθούν, να εκφραστούν ως πρωτεϊνικά μόρια και να χορηγηθούν μέσω ένεσης σε προνύμφες μεταξοσκώληκα που είναι μολυσμένες με τον ιό BmCPV, με σκοπό την πρόκληση συστημικής ανοσολογικής απόκρισης. Αντίστοιχα, βάσει της ανάλυσης NGS μπορούν να επιλεγούν vsiRNAs για τα οποία κρίνεται ότι πιθανώς διαθέτουν ρυθμιστικό ρόλο και, μέσω χημικής σύνθεσης/τροποποίησής τους

που θα ευνοεί τη σταθερότητα και την ανίχνευσή τους (π.χ. μέσω σήμανσης με κάποιο φθορίζον μόριο) (Kanasty et al., 2013), να χορηγηθούν μέσω της τροφής σε μολυσμένα ζώα με σκοπό τον περιορισμό της ιϊκής μόλυνσης. Τέλος, η ίδια τεχνολογία θα ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί ώστε να συντεθούν αντίστοιχα ολιγονουκλεοτίδια που θα στοχεύουν σε συγκεκριμένα miRNAs του μεταξοσκώληκα, για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι καταστέλλουν την έκφραση αντιϊκών παραγόντων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, προς όφελος του μολυσμένου ξενιστή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα Διδακτορική Διατριβή μπορούν να εξαχθούν συνοπτικά τα εξής συμπεράσματα αναφορικά με κάθε έναν από τους παράγοντες που εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού του *B. mori*:

Κύριοι RNAi παράγοντες

Μετά τη σάρωση των παραγόντων με τη μέθοδο του «RNAi του RNAi μηχανισμού», ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια *BmAgo1*, *BmAgo2*, *BmAgo3* και *BmDcr2* του μεταξοσκώληκα ως υποψήφιοι συντελεστές της RNAi απόκρισης που συντελείται μέσω μορίων dsRNA στα κύτταρα Bm5. Προκειμένου ειδικά για το γονίδιο *BmAgo3*, η συμμετοχή του στην πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω dsRNA στα κύτταρα Bm5 φαίνεται ότι συμβαίνει ανεξάρτητα από τη δράση του στο μονοπάτι piRNA, και η φυσιολογική έκφρασή του είναι πιθανότατα καθοριστική για τη διατήρηση της εμμένουσας μόλυνσης από τον RNA ιό BmMLV, καθώς στην αντίθετη περίπτωση παρατηρείται επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι siRNA και πιθανότατα το σχηματισμό κοκκίων στρες.

Η BmR2D2, μία πρωτεΐνη πρόσδεσης του dsRNA στο μονοπάτι siRNA, η οποία δρα ως συμπαράγοντας της Dcr2 στη *Drosophila*, βρέθηκε ότι είναι περιττή για την επίτευξη αποτελεσματικής dsRNA-εξαρτώμενης γονιδιακής αποσιώπησης στα κύτταρα Bm5. Πιθανά, υπάρχει κάποιος μηχανισμός που υποκαθιστά τη λειτουργία της πρωτεΐνης BmR2D2, γεγονός που υποστηρίζεται και από τη χαμηλή έκφραση του ίδιου γονιδίου σε ιστούς μεταξοσκώληκα, καθώς και από την πλήρη απουσία έκφρασής του στα κύτταρα Bm5 (Swevers et al., 2011).

Τέλος, όπως συνάγεται από τη μελέτη των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* στο μεσέντερο, η παρατηρούμενη ποικιλομορφία των πειραμάτων της γονιδιακής αποσιώπησης στο μεταξοσκώληκα δεν οφείλεται στην απουσία έκφρασης των βασικών RNAi παραγόντων.

Ιϊκή μόλυνση

Η ετερόλογη υπερέκφραση RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων έδειξε ότι ο μηχανισμός του RNAi επηρεάζει την πορεία μίας ιϊκής μόλυνσης, καθώς οι πρωτεΐνες BmR2D2 και BmTranslin2 επηρεάζουν τη μετάβαση του DNA ιού AcMNPV-EYFP από τη μολυσματική φάση του ODV στη φάση του BV, ενώ η

καταστολή της έκφρασης των Ago3 και Aub ευνοεί την ανάπτυξη του ιού υπό την ODV μορφή του. Στο πλαίσιο της μελέτης άλλων δύο ιών σε σχέση με τον RNAi μηχανισμό του μεταξοσκώληκα, βρέθηκε ότι τα κύτταρα Bm5 δε μολύνονται από τον RNA ιό CrPV, ενώ ο RNA ιός BmCPV ενδέχεται να αυτορρυθμίζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης του γονιδίου *VP1* μέσω έκφρασης ενός ειδικού pre-miRNA (S1.2).

Παράλληλα, σε *in vivo* πειράματα δείχθηκε ότι η μεταγραφική απόκριση έναντι μίας παθογόνου μόλυνσης με τον BmCPV είναι μία σύνθετη διαδικασία και υποδηλώνει τη συμμετοχή αρκετών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου του RNAi, όπου παρατηρείται αυξορρύθμιση των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2*. Μάλιστα, η ανίχνευση vsRNAs μέσω τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) υποδεικνύει την ενεργοποίηση της απόκρισης του RNAi μηχανισμού στο μεταξοσκώληκα τόσο υπό εμμένουσα, όσο και υπό παθογόνο μόλυνση με τον BmCPV. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η προϋπάρχουσα εμμένουσα μόλυνση δεν επηρεάζει την αντιϊκή απόκριση έναντι της παθογόνου μόλυνσης με τον ίδιο ιό, όπως προκύπτει από την ανάλυση των δικών μας αποτελεσμάτων σε σχέση με παλαιότερες δημοσιευμένες μελέτες. Ακόμη, ο μηχανισμός της φυσικής ανοσίας δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική απόκριση του *B. mori* έναντι της παθογόνου μόλυνσης με τον BmCPV.

Πρόσληψη του dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο

Κατά την ετερόλογη έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης CeSID-1 σε κύτταρα Bm5, αυτή βρέθηκε να εμφανίζεται ως μονομερές ή διμερές, ενώ, επιπλέον, να εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα συχνά με τη μορφή κοκκίων. Τα κύτταρα Bm5 δεν ανταποκρίνονται ιδιαίτερα στην πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης έπειτα από εμβαπτισμό σε dsRNA μέσα στο καλλεργητικό μέσο, όμως τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση της BmR2D2 ενδεχομένως να εμπλέκεται στη διαδικασία αυτή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εστιάζει στη μελέτη των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori*, υπό το πρίσμα των παραγόντων που επηρεάζουν την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν αφορούσαν κυρίως στην έκφραση γονιδίων-κλειδιών του RNAi μηχανισμού και στην ύπαρξη ιϊκής μόλυνσης (εμμένουσας ή παθογόνου), ενώ ακόμα έγιναν αναφορές στους μηχανισμούς της ενδογενούς φυσικής ανοσίας και της ικανότητας πρόσληψης dsRNA από το εξωκυττάριο μέσο. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων στην αποδοτικότητα του μηχανισμού του RNAi στο μεταξοσκώληκα.

Από τη λειτουργική ανάλυση της απόκρισης του RNAi μηχανισμού στα κύτταρα Bm5 προέκυψαν στοιχεία που συνηγορούν υπέρ της πιθανής αλληλοεπικάλυψης, υπό τις κατάλληλες προϋποθέσεις, μονοπατιών καλά χαρακτηρισμένων σε άλλα έντομα (π.χ. *Drosophila*), όπως το miRNA, το siRNA και το piRNA. Συγκεκριμένα, αναδεικνύονται τέσσερα βασικά γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της αποσιώπησης μέσω dsRNA στο μεταξοσκώληκα *in vitro*: το *BmAgo1* του miRNA μονοπατιού, τα *BmDcr2*/*BmAgo2* του siRNA μονοπατιού και το *BmAgo3* του piRNA μονοπατιού. Η εμπλοκή των γονιδίων *BmDcr2* και *BmAgo2* ήταν αναμενόμενη λόγω της διαθέσιμης βιβλιογραφίας που αφορά στη *Drosophila*. Ωστόσο, η ανάδειξη του *BmAgo3* στην αποσιώπηση μέσω μορίων dsRNA, και όχι ssRNA, ώθησε την παρούσα μελέτη στην ανάγκη να αναλυθεί μεθοδικότερα ο ρόλος των δύο βασικών γονιδίων του piRNA μονοπατιού στον *B. mori.*

Από τα δεδομένα που προέκυψαν, το *BmAgo3* φαίνεται να εμπλέκεται σε ένα δυναμικό δίκτυο μαζί με άλλα γονίδια (π.χ. *BmAgo2*, *BmeIF-4E1* και *BmHSP90*) που θεωρούνται σημαντικά για την εύρυθμη λειτουργία του RNAi στο μεταξοσκώληκα, δίνοντας με αυτόν τον τρόπο περισσότερες αποδείξεις για την εν δυνάμει συνεργατική δράση των μονοπατιών siRNA και piRNA. Βέβαια, ενώ το γονίδιο *BmAgo3* έχει ουσιαστικό ρόλο στο RNAi, η έκφρασή του σε φυσιολογικά επίπεδα δεν είναι απαραίτητη τουλάχιστον για την επιβίωση κυττάρων μεταξοσκώληκα όπου είναι μονίμως κατασταλμένο κατά τα 2/3 της φυσιολογικής έκφρασής του μέσω δράσης μίας

ειδικά σχεδιασμένης RNA φουρκέτας. Στον αντίποδα, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το γονίδιο *BmAub* δε θεωρείται σημαντικό για τη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω RNAi, όμως πιθανώς να είναι κρίσιμο για τη βιωσιμότητα των κυττάρων μεταξοσκώληκα, καθώς ήταν ανέφικτο να επιτευχθεί κυτταρική σειρά όπου θα ήταν μόνιμα κατασταλμένο.

Εν συνεχεία, γνωρίζοντας ότι τα κύτταρα Bm5 είναι δεκτικά στην πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω dsRNA έπειτα από διαμόλυνση, επιχειρήθηκε να διερευνηθεί, επιπροσθέτως, η ικανότητα πρόσληψης dsRNA από το εξωκυττάριο περιβάλλον διαμέσου κάποιου πιθανώς άγνωστου καναλιού μεταφοράς dsRNA, σύμφωνα με το πρότυπο δράσης της πρωτεΐνης SID-1 στο Νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Ωστόσο, ορισμένα προκαταρκτικά πειράματα εμβαπτισμού κυττάρων σε μέσο που περιείχε dsRNA δεν έδειξαν σημαντική επίδραση στην έκφραση του εκάστοτε γονιδίου-στόχου, ενώ η έκφραση των παραγόντων BmR2D2 και BmTranslin2 δε φάνηκε να βελτιώνει την ικανότητα πρόσληψης dsRNA από τα κύτταρα και άρα την απόδοση της γονιδιακής αποσιώπησης έπειτα από τον εμβαπτισμό.

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση των επιπέδων έκφρασης ορισμένων RNAi παραγόντων του *B. mori* σε μία ιϊκή μόλυνση που αφορά σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων. Σε μία εμμένουσα μόλυνση κυττάρων μεταξοσκώληκα (Bm5) από τον RNA ιό BmMLV δείχθηκε ότι η μόνιμη καταστολή της έκφρασης του piRNA γονιδίου *BmAgo3* ευνοεί την αύξηση των ιϊκών επιπέδων. Αντίστροφα, στην περίπτωση οξείας μόλυνσης κυττάρων *Spodoptera frugiperda* (Sf21) με τον ανασυνδυασμένο DNA ιό AcMNPV-EYFP, η ετερόλογη έκφραση των γονιδίων *BmR2D2* και *BmTranslin2* οδηγεί σε μείωση της ιϊκής ανάπτυξης εντός των κυττάρων και σε ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης των ιϊκών σωματίων στο εξωκυττάριο μέσο. Ακόμη, είναι ενδιαφέρον ότι στα ίδια κύτταρα η καταστολή των *Ago3* και *Aub* μέσω ειδικών RNA φουρκετών ευνοεί την ανάπτυξη του AcMNPV-EYFP. Συνεπώς, προκύπτει ότι ορισμένοι siRNA και piRNA παράγοντες ελέγχουν κρίσιμες λειτουργίες που σχετίζονται με την εξέλιξη μίας ιϊκής μόλυνσης εντός των κυττάρων των Λεπιδοπτέρων.

Με σκοπό να συσχετιστεί περαιτέρω ο RNAi μηχανισμός με τις ιϊκές μολύνσεις, διερευνήθηκε επίσης η δυνατότητα του RNA ιού BmCPV να αυτορρυθμίζει τα επίπεδα των γονιδίων του μέσω έκφρασης από το ίδιο το γονιδίωμά του πρόδρομων microRNAs. Όπως έχει ήδη δειχθεί, ο συγκεκριμένος ιός εκφράζει ένα pre-miRNA που στοχεύει στο τμήμα S10 του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για την πολυεδρίνη, το οποίο μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκε εάν η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης VP1 ρυθμίζεται από την έκφραση του pre-miRNA S1.2, όμως τα αποτελέσματα δεν οδήγησαν σε σαφή συμπεράσματα, καθώς τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης είτε δεν επηρεάστηκαν, είτε αυξήθηκαν από την παρουσία του pre-miRNA S1.2.

Στη συνέχεια, η ανακάλυψη της ύπαρξης εμμένουσας μόλυνσης από τον ιό BmCPV στην αποικία μεταξοσκωλήκων του στελέχους Daizo που διατηρείτο στο εργαστήριό μας αξιοποιήθηκε καταλλήλως, ούτως ώστε να μελετηθεί η επίδρασή της σε μία παθογόνο μόλυνση με τον ίδιο ιό. Η ύπαρξη εμμένουσας μόλυνσης, η οποία προηγείται της παθογόνου, δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αντιϊκή απόκριση κατά του BmCPV, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με προϋπάρχουσες σχετικές μελέτες στη βιβλιογραφία. Από τη μελέτη αυτή είδαμε ότι η μεταγραφική απόκριση στο μεσέντερο του μεταξοσκώληκα έναντι της παθογόνου μόλυνσης με τον BmCPV είναι μία σύνθετη διαδικασία στην οποία εμπλέκεται πλήθος διαφορετικών μηχανισμών, μεταξύ των οποίων αυτός του RNAi (π.χ. *BmDcr2*, *BmAgo2* και *BmeIF-4E1*) και, σε μικρότερο βαθμό, ο αντίστοιχος της ενδογενούς φυσικής ανοσίας. Άλλωστε, αναφορικά με τον RNAi μηχανισμό, στην παρούσα μελέτη, έχει δειχθεί ότι τα γονίδια *BmDcr2* και *BmAgo2*, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στο μεσέντερο σε σχέση με ιστούς που δεν αποτελούν φυσική πύλη εισόδου παθογόνων στο σώμα του ζώου, όπως είναι η επιδερμίδα. Εκτός των προαναφερθέντων μηχανισμών, στην απόκριση έναντι του BmCPV εμπλέκονται, επίσης, γονίδια που ελέγχουν κυτταρικές διαδικασίες όπως η ανοσολογική απόκριση, πρωτεόλυση, απόπτωση, αποτοξίνωση, ορμονική σηματοδότηση, έκδυση, αντιγραφή DNA και το στρες. Τέλος, η ανίχνευση ιϊκών μικρών RNAs (vsRNAs) μεγέθους 20 νουκλεοτιδίων μέσω αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS: next generation sequencing) αποτελεί ισχυρή απόδειξη της ενεργοποίησης του RNAi

μηχανισμού ως άμυνα κατά της ιϊκής μόλυνσης με τον BmCPV, είτε αυτή πρόκειται για εμμένουσα, είτε για παθογόνο μορφή.

Τα ευρήματά μας αποκαλύπτουν πιθανή αλληλοεπικάλυψη των βασικών μονοπατιών του RNAi στο μεταξοσκώληκα *in vitro*, κατά την πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω dsRNA (miRNA, siRNA και piRNA), ή μέσω φουρκέτας RNA (siRNA και piRNA). Επιπλέον, πέραν της εμπλοκής τους στο μηχανισμό γονιδιακής αποσιώπησης μέσω dsRNA, τα γονίδια *BmDcr2* και *BmAgo2* του μονοπατιού siRNA αναδεικνύονται ως καίριοι παράγοντες για το μεσέντερο του μεταξοσκώληκα, τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες, όσο και υπό συνθήκες ιϊκής μόλυνσης (BmCPV). Όμως, και το γονίδιο *BmAgo3* του piRNA μονοπατιού φαίνεται να συνιστά σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού στο μεταξοσκώληκα, ενώ μπορεί επίσης μαζί με τους παράγοντες BmR2D2 και BmTranslin2, και ενδεχομένως και τον BmAub, να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο για την αντιϊική απόκριση (BmMLV και AcMNPV) στα Λεπιδόπτερα. Ακόμη, η παρουσία μίας εμμένουσας μόλυνσης δε φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού (BmMLV) και στην αντιϊική προστασία του μεταξοσκώληκα (BmCPV). Τέλος, τα κλασσικά μονοπάτια της ενδογενούς φυσικής ανοσίας του *B. mori* δεν αποκρίνονται έντονα κατά τη διάρκεια της αντιϊκής προστασίας (BmCPV), και κατά συνέπεια δε φαίνεται να αλληλεπιδρούν σημαντικά με τον RNAi μηχανισμό, ούτως ώστε να επηρεάζουν την αποδοτικότητά του. Ωστόσο, από την παρούσα έρευνα αναδεικνύονται νέα γονίδια που ενδεχομένως διαθέτουν στρατηγικής σημασίας ρόλους για την αντιϊική απόκριση του μεταξοσκώληκα σε συνδυασμό με τη δράση του RNAi μηχανισμού.

ABSTRACT

The present PhD Thesis has focused on the study of the small RNA pathways in the silkworm *Bombyx mori*, highlighting the factors that affect the efficiency of the RNAi mechanism. The factors examined here, mostly, involved the expression of key-genes belonging to the RNA machinery and the presence of a viral infection (persistent or pathogenic), while the mechanisms of the innate immune response and the dsRNA uptake ability from the extracellular medium were also investigated. Analysis of the results yielded important findings and conclusions regarding the impact of the aforementioned factors on the efficiency of silkworm's RNAi mechanism.

Data resulting from the functional analysis of RNAi mechanism response in Bm5 cells support a possible overlap of well-characterized pathways in other insects (for example *Drosophila*), such as miRNA, siRNA and piRNA, under certain conditions. More specifically, four basic genes that participate in the dsRNA-mediated silencing process in the silkworm are highlighted here: *BmAgo1* of the miRNA pathway, *BmDcr2*/*BmAgo2* of the siRNA pathway and *BmAgo3* of the piRNA pathway. The implication of *BmDcr2* and *BmAgo2* was expected due to the literature available in *Drosophila.* However, the indicated role of *BmAgo3* in gene-silencing caused by dsRNA, and not ssRNA, molecules motivated the necessity of a systematic analysis regarding the role of the two genes in piRNA pathway of *B. mori.*

Based on the acquired data, *BmAgo3* seems to be implicated into a dynamic network together with other genes (*BmAgo2*, *BmeIF-4E1* and *BmHSP90*), which are important for the effective function of RNAi in the silkworm, thus providing more evidence on the possible synergistic action of siRNA and piRNA pathways. Nevertheless, while *BmAgo3* clearly plays a substantial role in RNAi, its expression at normal levels is not necessary, at least for the survival of silkworm cells, where it has been permanently suppressed by 2/3 through the expression of a RNA hairpin. In sharp contrast, according to our results, *BmAub* is not considered as important for gene-silencing through RNAi, but it could be possibly crucial for the survival of silkworm cells, as it was impossible to obtain a transformed cell line where this gene could be permanently downregulated.

While being aware of the susceptibility of Bm5 cells to dsRNA-mediated gene silencing by transfection, it was additionally attempted to investigate the dsRNA uptake ability from the extracellular medium through a likely novel and unknown dsRNA transfer channel, with similar mode of action to CeSID-1 protein in the nematode *C. elegans*. Nevertheless, preliminary experiments of cell soaking in a dsRNA-containing medium did not show significant impact on the expression of each target gene, while expression of BmR2D2 and BmTranslin2 factors did not seem to improve the capacity of the cells to take up dsRNA, and therefore the efficiency of gene-silencing following soaking.

Next, the effect of expression levels of certain RNAi factors of *B. mori* on viral infections in Lepidopteran cells was examined. It was demonstrated that under persistent infection with the RNA virus BmMLV, the permanent suppression of the piRNA gene *BmAgo3* favors the increase of viral levels. Conversely, in case of an acute infection with the recombinant DNA virus AcMNPV-EYFP, expression of *BmR2D2* and *BmTranslin2* leads to a reduction of viral growth inside the cells, and to a concomitant increase of viral particles concentration in the extracellular medium. Moreover, it is interesting that the hairpin RNA-mediated suppression of *Ago3* and *Aub* genes favors the growth of AcMNPV-EYFP virus. Hence, it is concluded that certain siRNA and piRNA factors control crucial functions that are related to the progress of a viral infection in Lepidopteran cells.

To further elucidate the involvement of RNAi mechanism in viral infections, the capability of the RNA virus BmCPV to auto-regulate its own genes' levels by expressing precursor microRNAs from its genome was investigated. As it was shown, this particular virus expresses a pre-miRNA that targets the genome segment S10 coding for polyhedrin, which is able to regulate the levels of this specific protein (Zografidis et al., 2015). Here, it was examined whether the expression of the recombinant protein VP1 is being controlled by the expression of pre-miRNA S1.2. However, the results did not lead to clear conclusions, as the protein expression levels were either unaffected, or increased due to the presence of pre-miRNA S1.2.

Next, the discovery of persistent infection by BmCPV virus in the silkworm colony of Daizo strain maintained in our lab was accordingly used, so as to study its effect on a pathogenic infection with the same virus. The existence of a persistent infection preceding the pathogenic one does not seem to significantly affect the antiviral response against BmCPV, as it is concluded by the comparison with already published reports in the literature. This study revealed that the transcriptome response of the silkworm midgut against the pathogenic infection with BmCPV is a complex process, which embraces a variety of different mechanisms, with the RNAi mechanism being critically represented among them (*BmDcr2*, *BmAgo2* and *BmeIF-4E1*) and the innate immunity one to a lesser extent as well. Moreover, regarding the RNAi mechanism, the present study has shown that *BmDcr2* and *BmAgo2* genes under normal conditions present elevated expression levels in the midgut, in comparison to tissues which do not form a normal infection route for pathogens in the rest of animal's body, such as epidermis. Apart from the aforementioned mechanisms, the response against BmCPV includes genes controlling cellular processes such as: immune response, proteolysis, apoptosis, stress, detoxification, hormonal signaling, ecdysis and DNA replication. Finally, the detection of 20 nucleotides (nt) viral small RNAs (vsRNAs), through next generation sequencing (NGS), constitutes a strong proof of the RNAi mechanism activation, as a defense mechanism against the viral infection by BmCPV, irrespectively the type of infection (persistent or pathogenic).

Our findings reveal possible overlaps of the main RNAi pathways in the silkworm *in vitro*, during the gene-silencing process mediated by dsRNA (miRNA, siRNA and piRNA), or hairpin RNA (siRNA and piRNA). Interestingly, except for their implication in the dsRNA-mediated silencing, the genes *BmDcr2* and *BmAgo2* of the siRNA pathway have proved to operate as key factors in silkworm' s midgut, both under normal and viral infection (BmCPV) conditions. Additionally, *BmAgo3* of the piRNA pathway is an important component affecting the efficiency of the RNAi mechanism in the silkworm, while it can also, together with BmR2D2 and BmTranslin2, and likely BmAub as well, play a crucial role in the antiviral response (BmMLV and AcMNPV) in Lepidoptera. Furthermore, the presence of a persistent infection does not seem to negatively

influence the efficiency of the RNAi mechanism (BmMLV) and the antiviral defense (BmCPV) of the silkworm. Finally, the classical pathways of the endogenous innate immunity of *B. mori* do not respond strongly during antiviral defense (BmCPV) and therefore they do not seem to significantly interact or crosstalk with the RNAi machinery, so as to affect its proficiency. However, the present research highlights new genes that presumably play strategic roles in the antiviral response of the silkworm in combination with the RNAi mechanism.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ PCR

Πίνακας Π1 Οι συνθήκες της PCR που εφαρμόστηκαν για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μέσω RT-PCR και της παρουσίας συγκεκριμένων γονιδίων μέσω PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής F	Εκκινητής R	Αποδιάταξη	Υβριδοποίηση	Επιμήκυνση	Κύκλοι	Υποσημείωση (§)
BmActin	Actin-1	Actin-2	94 °C (30”)	60 °C (30”)	72 °C (30”)	30	3.1.3.2.1, 3.1.3.2.2, 3.1.4.1, 3.1.4.2.1
BmAgo2	Ago2-F (1150)	Ago2-R (1519)	94 °C (45”)	55 °C (45”)	72 °C (30”)	35	3.1.4.1
BmAgo3	BmSIWI 1485 F	BmSIWI 1909 R	94 °C (30”)	60 °C (30”)	72 °C (30”)	35	3.1.1, 3.1.3.2.1
BmAub	NIWI-F 1514	NIWI-R 1896	94 °C (30”)	60 °C (30”)	72 °C (30”)	35	3.1.1, 3.1.3.2.1
BmDcr2	Dcr2-F (3903)	Dcr2-R (4351)	94 °C (45”)	55 °C (45”)	72 °C (30”)	35	3.1.4.1
BmEcR	EcR-F	EcR-R	94 °C (30”)	60 °C (30”)	72 °C (30”)	35	3.1.4.2.1
BmR2D2	R2D2-F-ORF	R2D2-R	94 °C (45”)	55 °C (45”)	72 °C (30”)	40	3.1.4.1
gp3 (BmMLV)	MLV-sORF-F	MLV-sORF-R	94 °C (30”)	55 °C (30”)	72 °C (30”)	28	3.1.3.2.3.1
HP-Ago3	HP-Ago3-F-BamHI	Actin-R	94 °C (30”)	60 °C (30”)	72 °C (30”)	40	3.1.3.2.1, 3.1.3.2.2 (RT-PCR)
HP-Ago3	Actin-1	HP-Ago3-R-BamHI	94 °C (40”)	52 °C (40”)	72 °C (45”)	35	3.1.3.2.2 (PCR)
HP-Aub	HP-Aub-F-BamHI	Actin-R	94 °C (30”)	60 °C (30”)	72 °C (30”)	40	3.1.3.2.1, 3.1.3.2.2 (RT-PCR)
HP-Aub	Actin-1	HP-Aub-R-BamHI	94 °C (40”)	52 °C (40”)	72 °C (45”)	35	3.1.3.2.2 (PCR)
HP-Luc	Luc-5’ (1)	Luc-3’ BamHI	94 °C (30”)	58 °C (30”)	72 °C (40”)	35	3.1.3.2.1, 3.1.3.2.2 (RT-PCR)
HP-Luc	Actin-1	Luc-5’ (1)	94 °C (40”)	52 °C (40”)	72 °C (45”)	35	3.1.3.2.2 (PCR)
Polyhedrin (BmCPV)	BmCPV-Ph-ORF-F	BmCPV-Ph-689-R	94 °C (30”)	50 °C (30”)	72 °C (45”)	40	3.2.2.2

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Πίνακας Π2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της έκφρασης και της παρουσίας γονιδίων μέσω PCR στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
Actin-1	GACGAAGAAGTTGCCGCGTTGG
Actin-2	GGCGGGCGTGTTGAATGTTTCG
Actin-R	GCCTCTGGGCAACGGAATCT
BmCPV-Ph-ORF-F	AGGATCATGGCAGACGTAGC
BmCPV-Ph-689-R	TAGGCGTTCGGCGAAATGT
EcR-250 5'(Soin et al., 2008)	ACCTCGACAGCAAGAGGAGC
EcR-250 3'(Soin et al., 2008)	ACTGGGCTCCTGTATGACAC
Luc-3' BamHI	AATTGGATCCAATTCAGCGGGGGCCACCTG
Luc-5' (1)	CATGGAATTCTGCGTTGCTAGTACCAACCC
MLV-sORF-F	ATGATGAATCACAAGCTTCGCG
MLV-sORF-R	TTAAGATTTTACGTAGACTCCA
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
YFP-130F	GCCACCTACGGCAAGCTGAC

Πίνακας Π3 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αλληλουχιών που προέρχονται από τα RNAi γονίδια του *B. mori* και την κλωνοποίησή τους στο φορέα pLitmus (Swevers et al., 2011).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
BmAgo1 F	GGGCGATAGCATGTTTCGCG
BmAgo1 R	TCACGTCCACGCCCAGGAAG
BmAgo2 F	TCTCCGATTGACTTGGGCGAC
BmAgo2 R	ATACGGTCATCCTAACCGGCG
BmAgo3 1485 F	CGAAACTGCCAAGAGTCGTC
BmAgo3 1909 R	TAATGGCCGCGTATCTGTCG
BmAub 1514 F	AATACCCTGCAGGAGACACC
BmAub 1896 R	GCTACTCATGTTACGAGCGC
BmDcr1 F	TGAAGCCGGGTGAGGTGTTC
BmDcr1 R	GGGAGTGAGGAGGTTGAGTC
BmDcr2 F	CATACAGTTCACCGAAGAGG
BmDcr2 R	GGATGTACGACGAGTGAGAC
BmLoqs F	GAGCTGTTGGCACGTCGTGG
BmLoqs R	GTTGTCCTGTAAGGCCTGCC
BmR2D2 F	CAAGATGAAAACTCCCATAACAGTACTG
BmR2D2 R	TTTGTCGCGCCTGTCGCTTG
BmTranslin F	AGGTATCAGGATCACTGGAG
BmTranslin R	TGATGCTGAGATCGTAGACG
BmTrax-B F	ACAGTCCGATCTTAGCCATG
BmTrax-B R	TTCATCTCGTATCTCTGGCC

Πίνακας Π4 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και κλωνοποίηση στο φορέα pEA αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα ORFs ορισμένων RNAi γονιδίων του *B. mori* ή σε φουρκέτες που στοχεύουν σε γονίδια του μονοπατιού piRNA. Με έντονα γράμματα επισημαίνονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση (*Bam*HI, *Bgl*II, *Sma*I και *Not*I). Ακόμη, με υπογράμμιση επισημαίνονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης των γονιδίων προς κλωνοποίηση, ενώ με πλάγια γράμματα η αλληλουχία Kozak (Kozak, 1987).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
BmAgo2-BglII-F	AGTA**AGATCT***CACC*ATGGCTAGAGGAAAAAACAAAGG
BmAgo2-BglII-R	TATA**AGATCT**GACGAAGAACATACGGCTCTGTTTC
BmAgo3-BglII-F	ATAT**AGATCT***CAAC*ATGGCAGACCCAGGCAAAGGC
BmAgo3-BglII-R	CCAT**AGATCT**CAAAAAGAACAGCTTATCGACTAAAAC
BmAgo3-ORF-F	ATGGCAGACCCAGGCAAAGG
BmAgo3-ORF-R	CTACAAAAAGAACAGCTTATCGA
BmAub-BglII-F	AGTA**AGATCT***CAAC*ATGTCAGAACCGAGAGGTAGAG
BmAub-ORF-F	ATGTCAGAACCGAGAGGTAGAG
BmAub-ORF-R	GTTAGAGGAAATATAAAGTTTCAT
BmDcr2-BglII-F(Liu et al., 2012)	AATT**AGATCT***CAAC*ATGACTACAACAGAAGGAATACAG
BmDcr2-BglII-R(Liu et al., 2012)	AATT**AGATCT**GAATTAAGAGTCTAATATTTTGAG
BmR2D2-BglII-F	CCAT**AGATCT***CAAC*ATGAAAACTCCCATAACAGTACTG
BmR2D2-BglII-R	CCAT**AGATCT**CAGAGCGGCGGGCGGCGGA
BmR2D2-R2	TCCGCCGCCCGCCGCTCTGTGAC
HP-Ago3-F-BamHI	ATCA**GGATCC**GTCGCCTACACCGTCTCTG
HP-Ago3-F-SmaI	ATAT**CCCGGG**CCGTGCCTTCACAGGTTATA
HP-Ago3-R-BamHI	TACT**GGATCC**CGACAACATAGGTCAGGGTAG
HP-Ago3-R-NotI	TATT**GCGGCCGC**CGTGCCTTCACAGGTTATAA
HP-Aub-F-BamHI	AGCA**GGATCC**AGCTTTTCAATGCGCTTGTC
HP-Aub-F-SmaI	ATAT**CCCGGG**TGTTGAGTGAATATGCCGCA
HP-Aub-R-BamHI	TACT**GGATCC**TGGCGACCCTTTATTTTTAC
HP-Aub-R-NotI	TATT**GCGGCCGC**TGTTGAGTGAATATGCCGCA

Πίνακας Π5 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και την κλωνοποίηση στο φορέα pEA-EYFP των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στις φουρκέτες S1.2-WT και S1.2-MUT, οι οποίες έχουν σχεδιαστεί ώστε να στοχεύουν στην πρωτεΐνη VP1 του ιού BmCPV. Με έντονα γράμματα επισημαίνεται η θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *Not*I, ενώ με υπογράμμιση οι μεταλλαγές που εισήχθησαν στην αλληλουχία miR-S1.2-MUT ώστε να διαφοροποιείται από τη φυσικού τύπου αλληλουχία miR-S1.2-WT.

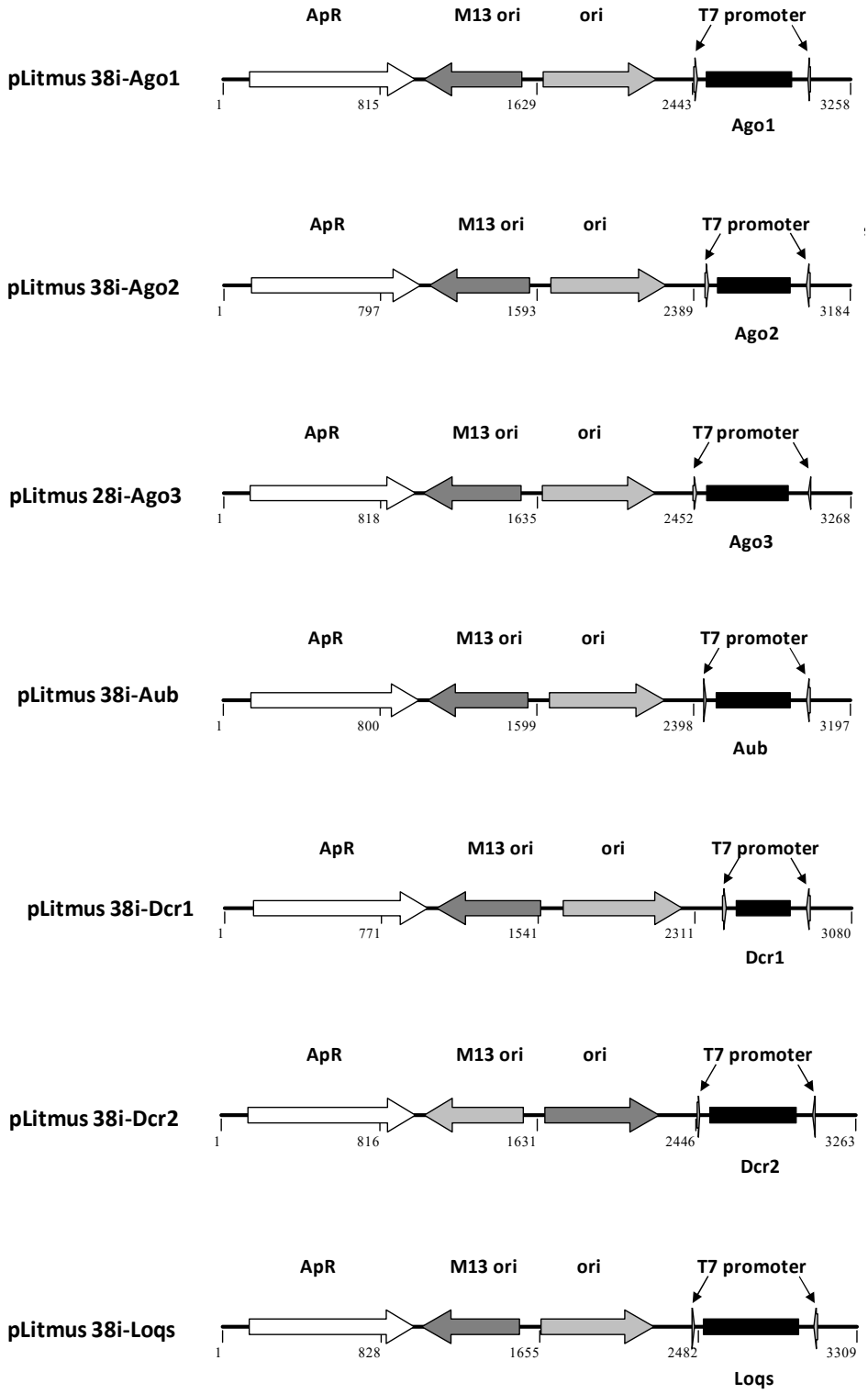
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
miR-S1.2-WT-F [NotI]	AATA**GCGGCCGC**GTTGTAAATGAGCGAGCGGT
miR-S1.2-WT-R [NotI]	TAAT**GCGGCCGC**TTAACCATTGTTTAGTACAT
miR-S1.2-MUT-F	GTTGTAAATGAGCGAGCGGTGCAGGATGATATGCAGAAGCCCTGA
miR-S1.2-MUT-R	TTAACCATTGTTTAGTACATCTCGCTCAGGGCTTCTGCATATCAT

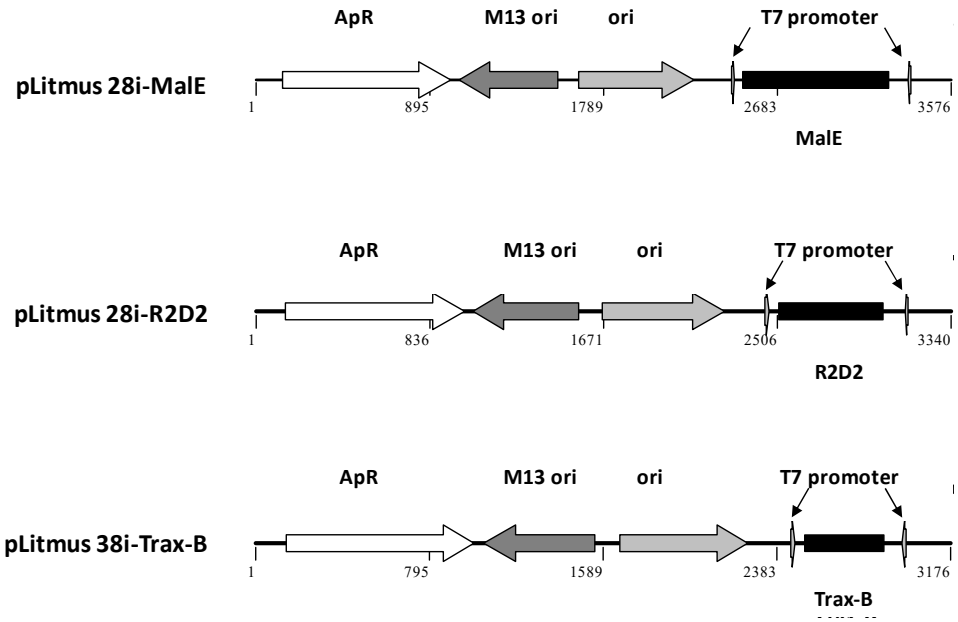
Πίνακας Π6 Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μέσω qPCR στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Στη στήλη «SilkDB ID» αναφέρεται ο κωδικός του μεταγράφου σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Silkworm Genome Database (www.silkdb.org), ενώ στη στήλη «GenBank Accession Number» αναφέρεται ο αντίστοιχος κωδικός στη βάση δεδομένων του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Γονίδιο	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	SilkDB ID	GenBank Acc. Number
Actin A3[(Gao et al., 2012)]	Actin-qF	CCGTATGCAAAAGGAAATCA	BGIBMGA013945	AB701689.1
	Actin-qR	TTGGAAGGTAGAGAGGGAGG		
Alkaline nuclease precursor (dsRNAse)	dsRNAse-650F	TCTTGCATCGTGCATCCAAC	BGIBMGA001173	NM_001098274.1
	dsRNAse-734R	AGGCGACGAGAGGAGTCATG		
Argonaute1	AGO1-1708F	GTTGTCGTCGTGTTACCAGGA	BGIBMGA003670	NM_001102461.1
	AGO1-1784R	GCCATTCCCAATACTGTGTCA		
Argonaute2[(Liu et al., 2014)]	AGO2-2349F	CGAAGCTAATGAATACCGGTCG	BGIBMGA010406	AB206986.2
	AGO2-2453R	CGTGCAGCATACTCTTGTGCA		
Argonaute3[(Liu et al., 2014)]	AGO3-2449F	TCGAGAGACGGCTACGACAAT	BGIBMGA009037	NM_001104597.2
	AGO3-2541R	CTGCGAGACGATCAGGAAATC		
Aubergine	Aub-2142F	TTTCAATATCGCGTCCGCC	BGIBMGA010644	NM_001104596.2
	Aub-2225R	ACACCGTCGCGGTAAATGAAG		
Carboxypeptidase B-like (predicted)	CarboxypeptidaseB-549F	AGAATGGATTTCCCCACCGA	BGIBMGA009487	XM_004922757.1
	CarboxypeptidaseB-639R	CCAATCAAACCGGTCCAAAAG		
Caspase-8-like (predicted)	Caspase8-3F	GCAATCTTCGAGTCCTGGACC	BGIBMGA008021	XM_004922839.1
	Caspase8-73R	GGTTGCTGTGCAACACAAGG		
Cathepsin B precursor	CathepsinBp-251F	CGGAAAACTTCGATCCCAGAG	BGIBMGA007061	NM_001043385.1
	CathepsinBp-332R	CAACTGCCACAAGACCCTTGA		
Dicarbonyl/L-xylulose reductase	LXReductase-406F	TCGCAAGCTTCTAAGGCAGC	BGIBMGA007259	NM_001046967.1
	LXReductase-519R	TCGTATGCCCAAAGGTCCC		
Dicer2[(Liu et al., 2014)]	Dcr2-4463F	AAATGACTGACCTGAGATCCGC	BGIBMGA011542	AB566386.1
	Dcr2-4549R	AGCAGAGGTACTTGTGCAATCC	BGIBMGA011543	
Esterase FE4-like (predicted)	EsteraseFE4-68F	AGTTCGGTGGTGATCGTGAGA	BGIBMGA001963	XM_004933446.1
	EsteraseFE4-152R	GCGGACGAATGCATAAGCA		

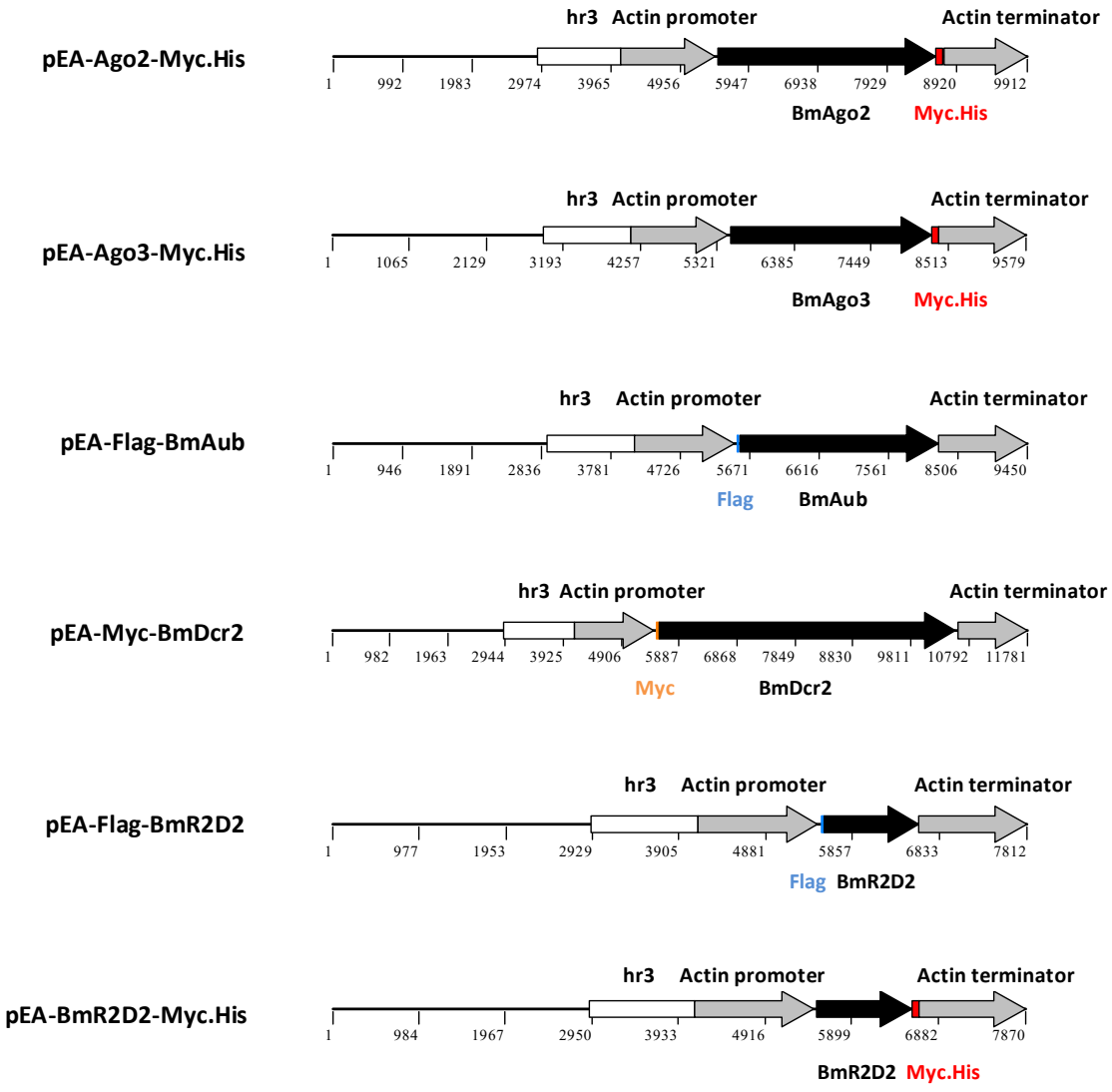
Eukaryotic initiation factor 4E-1	eIF4E1-19F	CAACATGAGACGCGAGATGGT	BGIBMGA012675	NM_001098362.1
	eIF4E1-99R	CCAAGTGTGCTCGAGAGGATG		
Eukaryotic translation initiation factor 4A	BmTIF F	TTCGTACTGGCTCTTCTCGT	BGIBMGA003186	DQ443290.1
	BmTIF R	CAAAGTTGATAGCAATTCCCT		
Fushi tarazu factor 1	FTZ-F1-164F	TAGATCCTACAACTGGCACTGGA	BGIBMGA000716	AF426830.1
	FTZ-F1-234R	TTGGTCGCAAACTGTTCCTG		
Heat shock protein 20.8	HSP20.8-76F	CAAGATTTTGGATTGGCGCT	BGIBMGA004605	FJ602772.1
	HSP20.8-205R	TTATGCTGGAACCGAGGTCAC		
Heat shock protein 25.4 precursor	HSP25.4p-75F	TTGGCCGTATCACCATTACGA	BGIBMGA005781	NM_001118903.1
	HSP25.4p-157R	CAAGGTTGGACCAAAGCGAA		
Heat shock protein 90	HSP90-1768F	GGATGGTCTGCCAACATGGA	BGIBMGA004612	NM_001043411.1
	HSP90-1844R	GCAGCCATGTATCCCATTGTG		
IBP2 (insulin-related peptide binding protein 2)	IBP2-172F	CATCATACCACTGGCTCGCAA	BGIBMGA008146	JX133233.1
	IBP2-270R	TTCCTCTATCGGTTCCCCGTT		
Loquacious	Loqs-444F	CAATGGCAATGTTCCTGAAAC	BGIBMGA005395	NM_001195079.1
	Loqs-531R	ACAACTCCTGAAGCCATCCAAC		
Neuropeptide-like precursor 4E	NLP4E-126F	TTTCGCATCAGCCAAGCCT	BGIBMGA011764	HQ386681.1
	NLP4E-254R	GCAACCGGAGAATATGCAGAG		
Peptidoglycan-recognition protein LB-like (predicted)	PeptidoglycanRP-47F	AATCCGTCAAGGACCTGATCG	BGIBMGA012865	XM_004928822.1
	PeptidoglycanRP-130R	TGACTTGTCTGTGTCCGACGA		
Putative cuticle protein CPH43	CPH43-300F	ATTAGTGGTAAACGCGGTCGG	BGIBMGA005302	GU070728.1
	CPH43-399R	TATTCCCGCTGAGCTGAAACC		
Trypsin-like protease precursor	ProteaseP-488F	CTGACGGCAACCTCCACAAG	BGIBMGA010024	NM_001099803.1
	ProteaseP-571R	CGACGCGATCATGACCCTT		
Tudor staphylococcus/micrococcal nuclease (Tudor-SN)	TudorSN-2017F	AACAGTCACCCATTGCCTGG	BGIBMGA013328	NM_001195080.1
	TudorSN-2097R	CCATTGGTCATCGGCTGTAAA		
Uncharacterized protein LOC101735726 (predicted)	LOC101735726-432F	CGGCATCGAGCTTCAACAGTA	BGIBMGA013209	XM_004922709.1
	LOC101735726-538R	TGTTCACATCACCAGGCGAA		
Zinc carboxypeptidase A1-like (predicted)	ZCarboxypeptidaseA1-323F	GGCTGTCACCAACAGTCCTCA	BGIBMGA004800	XM_004923324.1
	ZCarboxypeptidaseA1-418R	TGTGCCACTCGAAATCCTCC		

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΧΑΡΤΕΣ

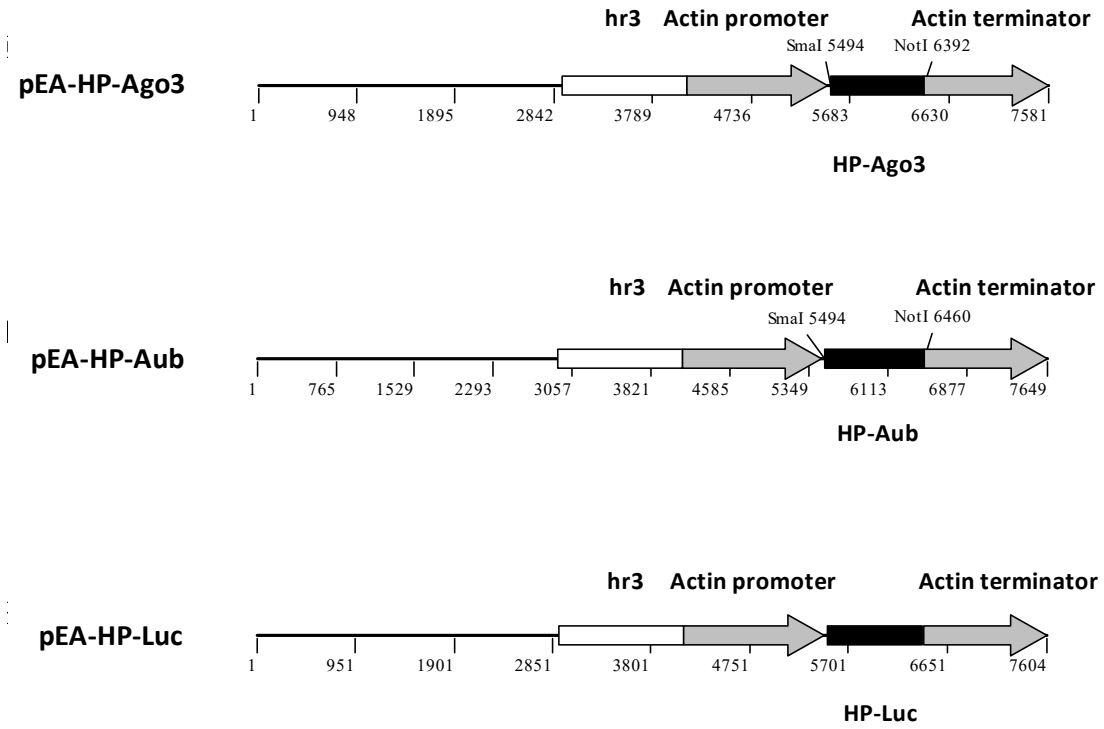




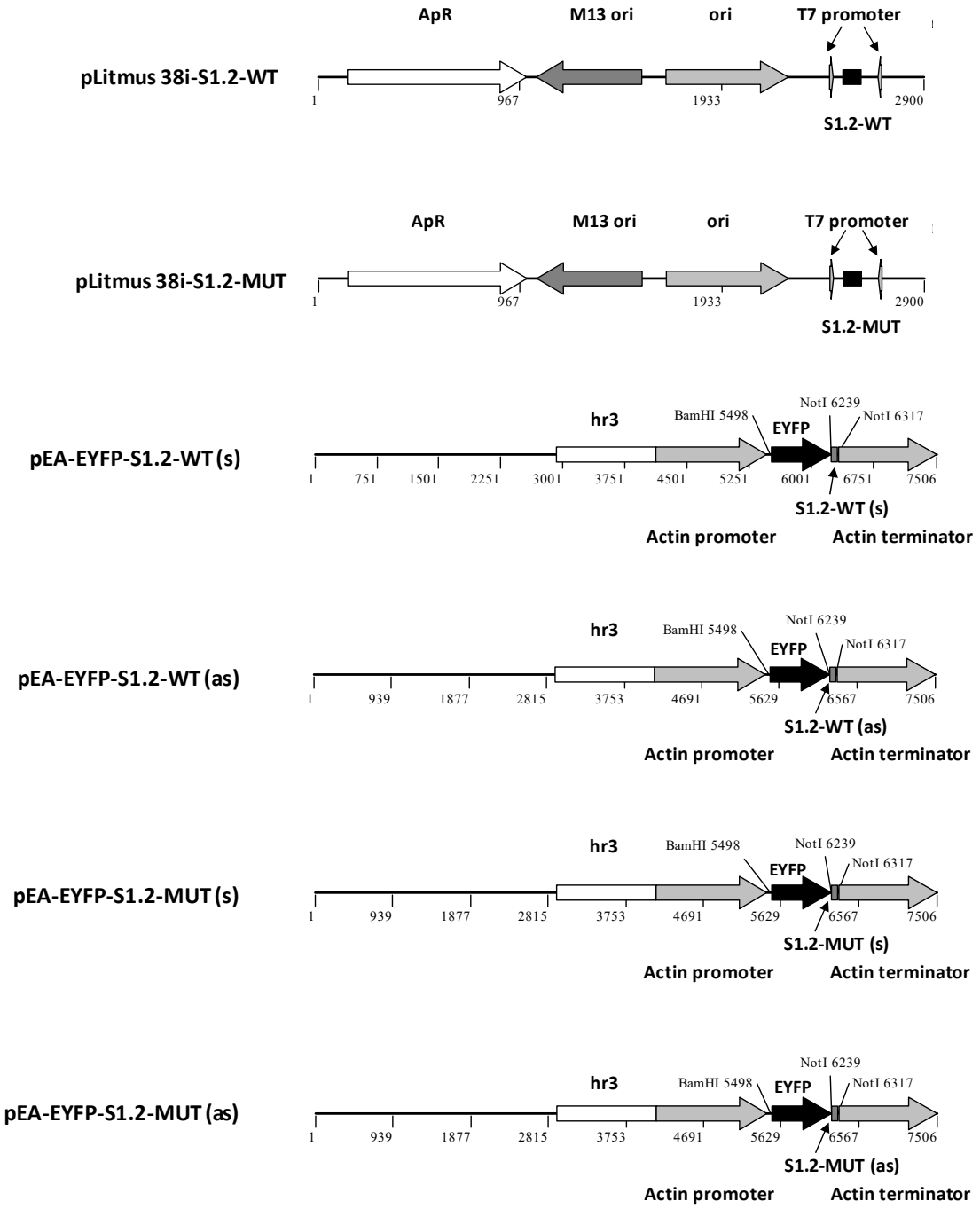
Εικόνα Π1 Χάρτες των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν έπειτα από την κλωνοποίηση τμημάτων των γονιδίων του RNAi μηχανισμού του μεταξοσκώληκα στο φορέα pLitmus. Σύμφωνα με την §2.2.2.2, τμήματα των γονιδίων *BmAgo1*, *BmAgo2*, *BmAgo3*, *BmAub*, *BmDcr1*, *BmDcr2*, *BmLoqs*, *BmR2D2*, *BmTranslin* και *BmTrax-B*, καθώς και του γονιδίου-μάρτυρα *malE*, εισήχθησαν ως ενθέματα στο φορέα pLitmus (28i ή 38i, **Πίνακας Π3**), με σκοπό τη μετέπειτα *in vitro* μεταγραφή, αντιστοίχως, ειδικού dsRNA.



Εικόνα Π2 Χάρτες των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν έπειτα από την κλωνοποίηση των ORFs ορισμένων γονιδίων του RNAi μηχανισμού του μεταξοσκώληκα στο φορέα pEA. Σύμφωνα με την §2.2.2.3, τα ORFs των γονιδίων *BmAgo2*, *BmAgo3*, *BmAub*, *BmDcr2* και *BmR2D2*, εισήχθησαν ως ενθέματα στο φορέα pEA (Douris et al., 2006), με σκοπό τη μετέπειτα, αντίστοιχη, έκφρασή τους σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων.



Εικόνα Π3 Χάρτες των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν έπειτα από την κλωνοποίηση ενθεμάτων που κωδικοποιούν για RNA φουρκέτες έναντι βασικών piRNA γονιδίων του μεταξοσκώληκα στο φορέα pEA. Σύμφωνα με την §2.2.2.4, οι ειδικά σχεδιασμένες αλληλουχίες που στοχεύουν στα γονίδια *BmAgo3* και *BmAub* εισήχθησαν ως ενθέματα στο φορέα pEA (Douris et al., 2006), με σκοπό τη μετέπειτα αποσιώπηση των αντίστοιχων γονιδίων σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων.



Εικόνα Π4 Χάρτες των πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν με σκοπό τον έλεγχο των κλωνοποιημένων ενθεμάτων S1.2-WT και S1.2-MUT ως προς την ικανότητά τους να αποσιωπούν το γονίδιο VP1 του ιού BmCPV στο φορέα pEA. Σύμφωνα με την §2.2.2.5, οι επιλεγμένες αλληλουχίες που θα μπορούσαν να στοχεύουν στο γονίδιο VP1 εισήχθησαν ως ενθέματα στο φορέα pLitmus 38i (με σκοπό τη σύνθεση ειδικού dsRNA) ή στο φορέα pEA-EYFP (sense: κωδικοποιός προσανατολισμός, antisense: μη-κωδικοποιός προσανατολισμός), με σκοπό την αντίστοιχη έκφρασή τους σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων. Στο φορέα pEA-EYFP αναγράφονται οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή του ενθέματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements. Nucleic Acids Res 38, D331-335.

Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. Biophotonics Int. 11, 36-42.

Aliyari, R., Wu, Q., Li, H.W., Wang, X.H., Li, F., Green, L.D., Han, C.S., Li, W.X., Ding, S.W., 2008. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in Drosophila. Cell Host Microbe 4, 387-397.

Allen, M.L., Walker, W.B., 3rd, 2012. Saliva of Lygus lineolaris digests double stranded ribonucleic acids. J Insect Physiol 58, 391-396.

Altstein, M., Nassel, D.R., 2010. Neuropeptide signaling in insects. Adv Exp Med Biol 692, 155-165.

Ando, T., Fujiwara, H., 2013. Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. Development 140, 454-458.

Aoki, K., Suzuki, K., Sugano, T., Tasaka, T., Nakahara, K., Kuge, O., Omori, A., Kasai, M., 1995. A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. Nature genetics 10, 167-174.

Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., Tabara, H., 2007. In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in C. elegans. EMBO J 26, 5007-5019.

Aravin, A.A., Hannon, G.J., Brennecke, J., 2007. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. Science 318, 761-764.

Arbouzova, N.I., Zeidler, M.P., 2006. JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development 133, 2605-2616.

Arensburger, P., Hice, R.H., Wright, J.A., Craig, N.L., Atkinson, P.W., 2011. The mosquito Aedes aegypti has a large genome size and high transposable element load but contains a low proportion of transposon-specific piRNAs. BMC Genomics 12, 606.

Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y., Furusawa, T., 2007. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 37, 176-183.

Aronstein, K., Pankiw, T., Saldivar, E., 2006. SID-1 is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. J Apic Res 45, 20-24.

Aronstein, K., Oppert, B., Lorenzen, M.D., 2011. RNAi in Agriculturally-Important Arthropods, in: P., G. (Ed.), RNA processing. InTech, p. 258.

Asgari, S., 2013. MicroRNA functions in insects. Insect Biochem Mol Biol 43, 388-397.

Asgari, S., 2014. Role of microRNAs in arbovirus/vector interactions. Viruses 6, 3514-3534.

Attardo, G.M., Higgs, S., Klingler, K.A., Vanlandingham, D.L., Raikhel, A.S., 2003. RNA interference-mediated knockdown of a GATA factor reveals a link to anautogeny in the mosquito Aedes aegypti. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 13374-13379.

Aung, K.M., Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Xuenan, X., Suzuki, H., Galay, R.L., Tanaka, T., Fujisaki, K., 2011. Scavenger receptor mediates systemic RNA interference in ticks. PLoS One 6, e28407.

Avadhanula, V., Weasner, B.P., Hardy, G.G., Kumar, J.P., Hardy, R.W., 2009. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. PLoS Pathog 5, e1000582.

Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., Possee, R.D., 1994. The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Virology 202, 586-605.

Backes, S., Shapiro, J.S., Sabin, L.R., Pham, A.M., Reyes, I., Moss, B., Cherry, S., tenOever, B.R., 2012. Degradation of host microRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism. Cell Host Microbe 12, 200-210.

Bagijn, M.P., Goldstein, L.D., Sapetschnig, A., Weick, E.M., Bouasker, S., Lehrbach, N.J., Simard, M.J., Miska, E.A., 2012. Function, targets, and evolution of Caenorhabditis elegans piRNAs. Science 337, 574-578.

Bansal, R., Michel, A.P., 2013. Core RNAi Machinery and Sid1, a Component for Systemic RNAi, in the Hemipteran Insect, Aphis glycines. Int J Mol Sci 14, 3786-3801.

Bao, Y.Y., Li, M.W., Zhao, Y.P., Ge, J.Q., Wang, C.S., Huang, Y.P., Zhang, C.X., 2008. Differentially expressed genes in resistant and susceptible Bombyx mori strains infected with a densonucleosis virus. Insect Biochem Mol Biol 38, 853-861.

Bartholomay, L.C., Loy, D.S., Dustin Loy, J., Harris, D.L., 2012. Nucleic-acid based antivirals: augmenting RNA interference to 'vaccinate'Litopenaeus vannamei. J Invertebr Pathol 110, 261-266.

Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nat Biotechnol 25, 1322-1326.

Belles, X., 2010. Beyond Drosophila: RNAi in vivo and functional genomics in insects. Annu Rev Entomol 55, 111-128.

Berezikov, E., 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. Nat Rev Genet 12, 846-860.

Berry, B., Deddouche, S., Kirschner, D., Imler, J.L., Antoniewski, C., 2009. Viral suppressors of RNA silencing hinder exogenous and endogenous small RNA pathways in Drosophila. PLoS One 4, e5866.

Besnard-Guerin, C., Jacquier, C., Pidoux, J., Deddouche, S., Antoniewski, C., 2015. The cricket paralysis virus suppressor inhibits microRNA silencing mediated by the Drosophila Argonaute-2 protein. PLoS One 10, e0120205.

Beyenbach, K.W., Wieczorek, H., 2006. The V-type H+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. The Journal of experimental biology 209, 577-589.

Biessmann, H., Andronopoulou, E., Biessmann, M.R., Douris, V., Dimitratos, S.D., Eliopoulos, E., Guerin, P.M., Iatrou, K., Justice, R.W., Krober, T., Marinotti, O., Tsitoura, P., Woods, D.F., Walter, M.F., 2010. The Anopheles gambiae odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. PLoS One 5, e9471.

Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W.S., Khvorova, A., 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nature methods 3, 199-204.

Blair, C.D., 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. Future Microbiol 6, 265-277.

Blair, C.D., Olson, K.E., 2015. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. Viruses 7, 820-843.

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., Gorlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA 10, 185-191.

Boisson, B., Jacques, J.C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K., Bourgouin, C., 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. FEBS Lett 580, 1988-1992.

Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G., Segers, G., 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (Diabrotica virgifera virgifera LeConte). PLoS One 7, e47534.

Bonning, B.C., Miller, W.A., 2010. Dicistroviruses. Annu Rev Entomol 55, 129-150.

Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., Pasquinelli, A.E., 2004. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. RNA 10, 1586-1594.

Brackney, D.E., Beane, J.E., Ebel, G.D., 2009. RNAi targeting of West Nile virus in mosquito midguts promotes virus diversification. PLoS Pathog 5, e1000502.

Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., Ebel, G.D., 2010. C6/36 Aedes albopictus cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. PLoS Negl Trop Dis 4, e856.

Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. Cell 128, 1089-1103.

Brennecke, J., Malone, C.D., Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Stark, A., Hannon, G.J., 2008. An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. Science 322, 1387-1392.

Bronkhorst, A.W., van Rij, R.P., 2014. The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. Curr Opin Virol 7, 19-28.

Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M., 2002. Parental RNAi in Tribolium (Coleoptera). Curr Biol 12, R85-86.

Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in Drosophila melanogaster--from microbial recognition to whole-organism physiology. Nature reviews. Immunology 14, 796-810.

Burand, J.P., Hunter, W.B., 2012. RNAi: Future in insect management. J Invertebr Pathol.

Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. RNA 10, 1957-1966.

Calvez, B., Hirn, M., De Reggi, M., 1976. Ecdysone changes in the haemolymph to two silkworms (Bombyx mori and Philosamia cynthia) during larval and pupal development. FEBS Lett 72, 57-61.

Campbell, C.L., Keene, K.M., Brackney, D.E., Olson, K.E., Blair, C.D., Wilusz, J., Foy, B.D., 2008. Aedes aegypti uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. BMC Microbiol 8, 47.

Campbell, E.M., Budge, G.E., Bowman, A.S., 2010. Gene-knockdown in the honey bee mite Varroa destructor by a non-invasive approach: studies on a glutathione S-transferase. Parasites & vectors 3, 73.

Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., Morgan, R.A., 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 252, 95-105.

Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C.J., Shu, S., Marshall, B., Lewis, S., 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data. Bioinformatics 25, 288-289.

Carinhas, N., Robitaille, A.M., Moes, S., Carrondo, M.J., Jenoe, P., Oliveira, R., Alves, P.M., 2011. Quantitative proteomics of Spodoptera frugiperda cells during growth and baculovirus infection. PLoS One 6, e26444.

Carissimi, C., Laudadio, I., Cipolletta, E., Gioiosa, S., Mihailovich, M., Bonaldi, T., Macino, G., Fulci, V., 2015. ARGONAUTE2 cooperates with SWI/SNF complex to determine nucleosome occupancy at human Transcription Start Sites. Nucleic Acids Res 43, 1498-1512.

Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 136, 642-655.

Castel, S.E., Martienssen, R.A., 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. Nat Rev Genet 14, 100-112.

Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., Lo Sardo, F., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., Siomi, M.C., Carninci, P., Gilmour, D.S., Corona, D.F., Orlando, V., 2011. Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in Drosophila. Nature 480, 391-395.

Charley, P.A., Wilusz, J., 2014. Sponging of cellular proteins by viral RNAs. Curr Opin Virol 9, 14-18.

Chauhan, C., Behura, S.K., Debruyn, B., Lovin, D.D., Harker, B.W., Gomez-Machorro, C., Mori, A., Romero-Severson, J., Severson, D.W., 2012. Comparative expression profiles of midgut genes in dengue virus refractory and susceptible Aedes aegypti across critical period for virus infection. PLoS One 7, e47350.

Chawla, G., Sokol, N.S., 2011. MicroRNAs in Drosophila development. International review of cell and molecular biology 286, 1-65.

Chen, A., Gao, P., Zhao, Q., Tang, S., Shen, X., Zhang, G., Qiu, Z., Xia, D., Huang, Y., Xu, Y., He, N., 2013a. Mutation of a vitelline membrane protein, BmEP80, is responsible for the silkworm "Ming" lethal egg mutant. Gene 515, 313-319.

Chen, C.S., Bellier, A., Kao, C.Y., Yang, Y.L., Chen, H.D., Los, F.C., Aroian, R.V., 2010. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in Caenorhabditis elegans. PLoS One 5, e9494.

Chen, P., Tong, X.L., Li, D.D., Fu, M.Y., He, S.Z., Hu, H., Xiang, Z.H., Lu, C., Dai, F.Y., 2013b. Antennapedia is involved in the development of thoracic legs and segmentation in the silkworm, Bombyx mori. Heredity 111, 182-188.

Chen, Y., Pacyna-Gengelbach, M., Ye, F., Knosel, T., Lund, P., Deutschmann, N., Schluns, K., Kotb, W.F., Sers, C., Yasumoto, H., Usui, T., Petersen, I., 2007. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) has potential tumour-suppressive activity in human lung cancer. J Pathol 211, 431-438.

Chen, Y., Cui, T., Knosel, T., Yang, L., Zoller, K., Petersen, I., 2011. IGFBP7 is a p53 target gene inactivated in human lung cancer by DNA hypermethylation. Lung Cancer 73, 38-44.

Chen, Y.P., Siede, R., 2007. Honey bee viruses. Advances in virus research 70, 33-80.

Chen, Y.P., Pettis, J.S., Corona, M., Chen, W.P., Li, C.J., Spivak, M., Visscher, P.K., DeGrandi-Hoffman, G., Boncristiani, H., Zhao, Y., vanEngelsdorp, D., Delaplane, K., Solter, L., Drummond, F., Kramer, M., Lipkin, W.I., Palacios, G., Hamilton, M.C., Smith, B., Huang, S.K., Zheng, H.Q., Li, J.L., Zhang, X., Zhou, A.F., Wu, L.Y., Zhou, J.Z., Lee, M.L., Teixeira, E.W., Li, Z.G., Evans, J.D., 2014a. Israeli acute paralysis virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. PLoS Pathog 10, e1004261.

Chen, Y.R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J.Z., Zhang, S., Blissard, G.W., 2013c. The transcriptome of the baculovirus Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus in Trichoplusia ni cells. J Virol 87, 6391-6405.

Chen, Y.R., Zhong, S., Fei, Z., Gao, S., Zhang, S., Li, Z., Wang, P., Blissard, G.W., 2014b. Transcriptome responses of the host Trichoplusia ni to infection by the baculovirus Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus. J Virol 88, 13781-13797.

Cheng, D., Xia, Q., Duan, J., Wei, L., Huang, C., Li, Z., Wang, G., Xiang, Z., 2008. Nuclear receptors in Bombyx mori: insights into genomic structure and developmental expression. Insect Biochem Mol Biol 38, 1130-1137.

Cheng, D., Qian, W., Wang, Y., Meng, M., Wei, L., Li, Z., Kang, L., Peng, J., Xia, Q., 2014. Nuclear import of transcription factor BR-C is mediated by its interaction with RACK1. PLoS One 9, e109111.

Chevignon, G., Cambier, S., Da Silva, C., Poulain, J., Drezen, J.M., Huguet, E., Moreau, S., 2015. Transcriptomic response of Manduca sexta immune tissues to parasitization by the bracovirus associated wasp Cotesia congregata. Insect Biochem Mol Biol.

Chiba, S., Suzuki, N., 2015. Highly activated RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated virus. Proc Natl Acad Sci U S A 112, E4911-4918.

Cho, Y.S., Chennathukuzhi, V.M., Handel, M.A., Eppig, J., Hecht, N.B., 2004. The relative levels of translin-associated factor X (TRAX) and testis brain RNA-binding protein determine their nucleocytoplasmic distribution in male germ cells. J Biol Chem 279, 31514-31523.

Chotkowski, H.L., Ciota, A.T., Jia, Y., Puig-Basagoiti, F., Kramer, L.D., Shi, P.Y., Glaser, R.L., 2008. West Nile virus infection of Drosophila melanogaster induces a protective RNAi response. Virology 377, 197-206.

Christiaens, O., Swevers, L., Smagghe, G., 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (Acyrthosiphon pisum) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. Peptides 53, 307-314.

Chu, Y., Yue, X., Younger, S.T., Janowski, B.A., Corey, D.R., 2010. Involvement of argonaute proteins in gene silencing and activation by RNAs complementary to a non-coding transcript at the progesterone receptor promoter. Nucleic Acids Res 38, 7736-7748.

Ciudad, L., Belles, X., Piulachs, M.D., 2007. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. BMC Mol Biol 8, 53.

Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., Dixon, J.E., 2000. Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 6499-6503.

Core Team, R., 2012. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., Schneider, D., 2009. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in Drosophila. PLoS One 4, e7436.

Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P.W., Schulze-Briese, C., Mori, H., Metcalf, P., 2007. The molecular organization of cypovirus polyhedra. Nature 446, 97-101.

Crochu, S., Cook, S., Attoui, H., Charrel, R.N., De Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.J., de Micco, P., de Lamballerie, X., 2004. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of Aedes spp. mosquitoes. J Gen Virol 85, 1971-1980.

Cullen, B.R., 2011. Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. Genes Dev 25, 1881-1894.

Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Brennecke, J., 2008. An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. Nature 453, 798-802.

Czech, B., Hannon, G.J., 2016. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. Trends in biochemical sciences.

Dai, H., Jiang, R., Wang, J., Xu, G., Cao, M., Wang, Z., Fei, J., 2007. Development of a heat shock inducible and inheritable RNAi system in silkworm. Biomol Eng 24, 625-630.

Dai, H., Ma, L., Wang, J., Jiang, R., Wang, Z., Fei, J., 2008. Knockdown of ecdysis-triggering hormone gene with a binary UAS/GAL4 RNA interference system leads to lethal ecdysis deficiency in silkworm. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 40, 790-795.

Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., Liu, Y., 2011. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. Eukaryotic cell 10, 1148-1155.

Das, P.P., Bagijn, M.P., Goldstein, L.D., Woolford, J.R., Lehrbach, N.J., Sapetschnig, A., Buhecha, H.R., Gilchrist, M.J., Howe, K.L., Stark, R., Matthews, N., Berezikov, E., Ketting, R.F., Tavare, S., Miska, E.A., 2008. Piwi and piRNAs act upstream of an endogenous siRNA pathway to suppress Tc3 transposon mobility in the Caenorhabditis elegans germline. Mol Cell 31, 79-90.

Das, S., Debnath, N., Cui, Y., Unrine, J., Palli, S.R., 2015. Chitosan, Carbon Quantum Dot, and Silica Nanoparticle Mediated dsRNA Delivery for Gene Silencing in Aedes aegypti: A Comparative Analysis. ACS applied materials & interfaces 7, 19530-19535.

de Faria, I.J., Olmo, R.P., Silva, E.G., Marques, J.T., 2013. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 33, 239-253.

de Miranda, J.R., Cornman, R.S., Evans, J.D., Semberg, E., Haddad, N., Neumann, P., Gauthier, L., 2015. Genome Characterization, Prevalence and Distribution of a Macula-Like Virus from Apis mellifera and Varroa destructor. Viruses 7, 3586-3602.

Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2008. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. Nat Immunol 9, 1425-1432.

Deng, H., Zhang, J., Li, Y., Zheng, S., Liu, L., Huang, L., Xu, W.H., Palli, S.R., Feng, Q., 2012. Homeodomain POU and Abd-A proteins regulate the transcription of pupal genes during metamorphosis of the silkworm, Bombyx mori. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 12598-12603.

Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature 432, 231-235.

Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 18466-18471.

Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell 130, 413-426.

Ding, S.W., 2010. RNA-based antiviral immunity. Nature reviews. Immunology 10, 632-644.

Dong, Y., Friedrich, M., 2005. Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. BMC Biotechnol 5, 25.

Dorner, S., Lum, L., Kim, M., Paro, R., Beachy, P.A., Green, R., 2006. A genomewide screen for components of the RNAi pathway in Drosophila cultured cells. Proc Natl Acad Sci USA 103, 11880-11885.

Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. Nat Immunol 6, 946-953.

Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R., Moritz, R.F., Paxton, R.J., 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. Environmental microbiology 17, 969-983.

Douris, V., Swevers, L., Labropoulou, V., Andronopoulou, E., Georgoussi, Z., Iatrou, K., 2006. Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. Advances in virus research 68, 113-156.

Doyle, M., Badertscher, L., Jaskiewicz, L., Guttinger, S., Jurado, S., Hugenschmidt, T., Kutay, U., Filipowicz, W., 2013. The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal. RNA 19, 1238-1252.

Du, M., Zhang, S., Zhu, B., Yin, X., An, S., 2012a. Identification of a diacylglycerol acyltransferase 2 gene involved in pheromone biosynthesis activating neuropeptide stimulated pheromone production in Bombyx mori. J Insect Physiol 58, 699-703.

Du, M., Yin, X., Zhang, S., Zhu, B., Song, Q., An, S., 2012b. Identification of lipases involved in PBAN stimulated pheromone production in Bombyx mori using the DGE and RNAi approaches. PLoS One 7, e31045.

Du, M., Liu, X., Liu, X., Yin, X., Han, S., Song, Q., An, S., 2015. Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase is required for PBAN-induced sex pheromone biosynthesis in Bombyx mori. Sci Rep 5, 8110.

Du, T., Zamore, P.D., 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development 132, 4645-4652.

Dubelman, S., Fischer, J., Zapata, F., Huizinga, K., Jiang, C., Uffman, J., Levine, S., Carson, D., 2014. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. PLoS One 9, e93155.

Durdevic, Z., Hanna, K., Gold, B., Pollex, T., Cherry, S., Lyko, F., Schaefer, M., 2013. Efficient RNA virus control in Drosophila requires the RNA methyltransferase Dnmt2. EMBO reports 14, 269-275.

Duxbury, M.S., Ashley, S.W., Whang, E.E., 2005. RNA interference: a mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. Biochem Biophys Res Commun 331, 459-463.

Dziarski, R., Gupta, D., 2006. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Genome Biol 7, 232.

Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., Manev, H., 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult Drosophila triggers RNA interference in the central nervous system. Molecular psychiatry 6, 665-670.

Eaton, B.A., Fetter, R.D., Davis, G.W., 2002. Dynactin is necessary for synapse stabilization. Neuron 34, 729-741.

Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., Dermody, T.S., 2002. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. J Biol Chem 277, 24609-24617.

Edayoshi, M., Yamaguchi, J., Fujiwara, H., 2015. Protruding structures on caterpillars are controlled by ectopic Wnt1 expression. PLoS One 10, e0121736.

Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001a. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. EMBO J 20, 6877-6888.

Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 15, 188-200.

Elias-Neto, M., Soares, M.P., Simoes, Z.L., Hartfelder, K., Bitondi, M.M., 2010. Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, Apis mellifera (Hymenoptera, Apinae). Insect Biochem Mol Biol 40, 241-251.

Evans, P.D., Cook, S.N., Riggs, P.D., Noren, C.J., 1995. LITMUS: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional in vitro transcription. Biotechniques 19, 130-135.

Fablet, M., 2014. Host control of insect endogenous retroviruses: small RNA silencing and immune response. Viruses 6, 4447-4464.

Fagegaltier, D., Bouge, A.L., Berry, B., Poisot, E., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., Theodore, L., Voinnet, O., Antoniewski, C., 2009. The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 21258-21263.

Fan, G., Li, J., 2011. Regions identity between the genome of vertebrates and non-retroviral families of insect viruses. Virol J 8, 511.

Fay, N., Pante, N., 2015. Nuclear entry of DNA viruses. Frontiers in microbiology 6, 467.

Feinberg, E.H., Hunter, C.P., 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. Science 301, 1545-1547.

Feltzin, V.L., Khaladkar, M., Abe, M., Parisi, M., Hendriks, G.J., Kim, J., Bonini, N.M., 2015. The exonuclease Nibbler regulates age-associated traits and modulates piRNA length in Drosophila. Aging cell 14, 443-452.

Field, L.M., Devonshire, A.L., 1998. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid Myzus persicae (Sulzer) are part of a gene family. Biochem J 330 (Pt 1), 169-173.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391, 806-811.

Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. Developmental and comparative immunology 31, 217-231.

Flenniken, M.L., Andino, R., 2013. Non-specific dsRNA-mediated antiviral response in the honey bee. PLoS One 8, e77263.

Flynt, A., Liu, N., Martin, R., Lai, E.C., 2009. Dicing of viral replication intermediates during silencing of latent Drosophila viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 5270-5275.

Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., Zamore, P.D., 2005. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. PLoS Biol 3, e236.

Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.H., Xu, J., Weng, Z., Zamore, P.D., 2012. Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. Cell 151, 533-546.

Fullaondo, A., Lee, S.Y., 2012. Regulation of Drosophila-virus interaction. Developmental and comparative immunology 36, 262-266.

Furusawa, T., Takayama, E., Ishihara, R., Hayashi, Y., 1993. Double-stranded ribonuclease activity in the digestive juice and midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol 104B, 795-801.

Gagnon, K.T., Li, L., Janowski, B.A., Corey, D.R., 2014a. Analysis of nuclear RNA interference in human cells by subcellular fractionation and Argonaute loading. Nat Protoc 9, 2045-2060.

Gagnon, K.T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B.A., Corey, D.R., 2014b. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. Cell reports 6, 211-221.

Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2006. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. Nat Immunol 7, 590-597.

Gammon, D.B., Mello, C.C., 2015. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. Curr Opin Insect Sci 8, 111-120.

Gan, L., Liu, X., Xiang, Z., He, N., 2011. Microarray-based gene expression profiles of silkworm brains. BMC Neurosci 12, 8.

Gandhe, A.S., Janardhan, G., Nagaraju, J., 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. Insect Biochem Mol Biol 37, 655-666.

Gao, K., Deng, X.Y., Qian, H.Y., Wu, P., Qin, G.X., Liu, T., Shen, Z.Y., Guo, X.J., 2012. Novel protein of IBP from silkworm, Bombyx mori, involved in cytoplasmic polyhedrosis virus infection. J Invertebr Pathol 110, 83-91.

Gao, K., Deng, X.Y., Qian, H.Y., Qin, G.X., Hou, C.X., Guo, X.J., 2014a. Cytoplasmic polyhedrosis virus-induced differential gene expression in two silkworm strains of different susceptibility. Gene 539, 230-237.

Gao, K., Deng, X.Y., Qian, H.Y., Qin, G., Guo, X.J., 2014b. Digital Gene Expression analysis in the midgut of 4008 silkworm strain infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. J Invertebr Pathol 115, 8-13.

Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S., Sela, I., 2012. Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and Varroa destructor: Varroa gene silencing reduces Varroa population. PLoS Pathog 8, e1003035.

Garbutt, J.S., Reynolds, S.E., 2012. Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. Insect Biochem Mol Biol 42, 621-628.

Garbutt, J.S., Belles, X., Richards, E.H., Reynolds, S.E., 2013. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: Evidence from Manduca sexta and Blattella germanica. J Insect Physiol.

Gene Ontology, C., 2010. The Gene Ontology in 2010: extensions and refinements. Nucleic Acids Res 38, D331-335.

Ghildiyal, M., Zamore, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nat Rev Genet 10, 94-108.

Ghosh, S., Kakumani, P.K., Kumar, A., Malhotra, P., Mukherjee, S.K., Bhatnagar, R.K., 2014. Genome wide screening of RNAi factors of Sf21 cells reveal several novel pathway associated proteins. BMC Genomics 15, 775.

Gilbert, L.I., Rewitz, K.F., 2009. The Function and Evolution of the Halloween Genes: The Pathway to the Arthropod Molting Hormone, in: Smagghe, G. (Ed.), Ecdysone: Structures and Functions. Springer Science + Business Media B.V., pp. 231-269.

Girardin, S.E., Philpott, D.J., 2006. PGRP-LB minds the fort. Immunity 24, 363-366.

Giuliano, J.S., Lahni, P.M., Wong, H.R., Wheeler, D.S., 2011. Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. The Open Inflammation Journal 4, 49-60.

Goic, B., Saleh, M.C., 2012. Living with the enemy: viral persistent infections from a friendly viewpoint. Curr Opin Microbiol 15, 531-537.

Goic, B., Vodovar, N., Mondotte, J.A., Monot, C., Frangeul, L., Blanc, H., Gausson, V., Vera-Otarola, J., Cristofari, G., Saleh, M.C., 2013. RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model Drosophila. Nat Immunol 14, 396-403.

Gong, L., Chen, Y., Hu, Z., Hu, M., 2013. Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against Plutella xylostella under laboratory and field conditions. PLoS One 8, e62990.

Gonzalez-Gonzalez, E., Lopez-Casas, P.P., del Mazo, J., 2008. The expression patterns of genes involved in the RNAi pathways are tissue-dependent and differ in the germ and somatic cells of mouse testis. Biochimica et biophysica acta 1779, 306-311.

Gordon, K.H., Waterhouse, P.M., 2007. RNAi for insect-proof plants. Nat Biotechnol 25, 1231-1232.

Goto, A., Blandin, S., Royet, J., Reichhart, J.M., Levashina, E.A., 2003. Silencing of Toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into Drosophila adult flies. Nucleic Acids Res 31, 6619-6623.

Grace, T.D.C., 1967. Establishment of a Line of Cells from the Silkworm Bombyx mori. 216.

Granados, R.R., Derksen, A.C., Dwyer, K.G., 1986. Replication of the Trichoplusia ni granulosis and nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. Virology 152, 472-476.

Granados, R.R., Li, G.X., Derksen, A.C.G., Mckenna, K.A., 1994. **A** New Insect Cell Line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) Susceptible to *Trichoplusia ni* Single Enveloped Nuclear Polyhedrosis Virus. J Invertebr Pathol 64, 260-266.

Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Ghana, P., Bhadra, U., Cavalli, G., 2006. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. Cell 124, 957-971.

Gu, J., Huang, L.X., Gong, Y.J., Zheng, S.C., Liu, L., Huang, L.H., Feng, Q.L., 2013. De novo characterization of transcriptome and gene expression dynamics in epidermis during the larval-pupal metamorphosis of common cutworm. Insect Biochem Mol Biol 43, 794-808.

Gu, L., Knipple, D.C., 2013. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. Crop Protection 45, 36-40.

Gui, Z.Z., Lee, K.S., Kim, B.Y., Choi, Y.S., Wei, Y.D., Choo, Y.M., Kang, P.D., Yoon, H.J., Kim, I., Je, Y.H., Seo, S.J., Lee, S.M., Guo, X., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2006. Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. BMC developmental biology 6, 49.

Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C., 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in Drosophila. Science 315, 1587-1590.

Guo, E., He, Q., Liu, S., Tian, L., Sheng, Z., Peng, Q., Guan, J., Shi, M., Li, K., Gilbert, L.I., Wang, J., Cao, Y., Li, S., 2012. MET is required for the maximal action of 20-hydroxyecdysone during Bombyx metamorphosis. PLoS One 7, e53256.

Habayeb, M.S., Ekstrom, J.O., Hultmark, D., 2009. Nora virus persistent infections are not affected by the RNAi machinery. PLoS One 4, e5731.

Hagiwara, K., Rao, S., Scott, S.W., Carner, G.R., 2002. Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of Bombyx mori cypovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively. J Gen Virol 83, 1477-1482.

Hajos, J.P., Vermunt, A.M., Zuidema, D., Kulcsar, P., Varjas, L., de Kort, C.A., Zavodszky, P., Vlak, J.M., 1999. Dissecting insect development: baculovirus-mediated gene silencing in insects. Insect Mol Biol 8, 539-544.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature 404, 293-296.

Han, B.W., Wang, W., Li, C., Weng, Z., Zamore, P.D., 2015. Noncoding RNA. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. Science 348, 817-821.

Hannan, G.N., Hill, R.J., Dedos, S.G., Swevers, L., Iatrou, K., Tan, A., Parthasarathy, R., Bai, H., Zhang, Z., Palli, S.R., 2009. Applications of RNA Interference in Ecdysone Research, in: Smagghe, G. (Ed.), Ecdysone: Structures and Functions. Springer Science + Business Media B.V., pp. 205-227.

Hartig, J.V., Esslinger, S., Bottcher, R., Saito, K., Forstemann, K., 2009. Endo-siRNAs depend on a new isoform of loquacious and target artificially introduced, high-copy sequences. EMBO J 28, 2932-2944.

Hess, A.M., Prasad, A.N., Ptitsyn, A., Ebel, G.D., Olson, K.E., Barbacioru, C., Monighetti, C., Campbell, C.L., 2011. Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. BMC Microbiol 11, 45.

Hillyer, J.F., 2016. Insect immunology and hematopoiesis. Developmental and comparative immunology 58, 102-118.

Hinas, A., Wright, A.J., Hunter, C.P., 2012. SID-5 is an endosome-associated protein required for efficient systemic RNAi in C. elegans. Curr Biol 22, 1938-1943.

Hirai, M., Terenius, O., Li, W., Faye, I., 2004. Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in Antheraea pernyi. Insect Mol Biol 13, 399-405.

Hoa, N.T., Keene, K.M., Olson, K.E., Zheng, L., 2003. Characterization of RNA interference in an Anopheles gambiae cell line. Insect Biochem Mol Biol 33, 949-957.

Hogenhout, S.A., Redinbaugh, M.G., Ammar el, D., 2003. Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. Trends Microbiol 11, 264-271.

Honda, S., Kirino, Y., Maragkakis, M., Alexiou, P., Ohtaki, A., Murali, R., Mourelatos, Z., 2013. Mitochondrial protein BmPAPI modulates the length of mature piRNAs. RNA 19, 1405-1418.

Horwich, M.D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., Zamore, P.D., 2007. The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. Curr Biol 17, 1265-1272.

Hossain, M., Shimizu, S., Matsuki, M., Imamura, M., Sakurai, S., Iwami, M., 2008. Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. Insect Biochem Mol Biol 38, 1001-1007.

Hossain, M.S., Liu, Y., Zhou, S., Li, K., Tian, L., Li, S., 2013. 20-Hydroxyecdysone-induced transcriptional activity of FoxO upregulates brummer and acid lipase-1 and promotes lipolysis in Bombyx fat body. Insect Biochem Mol Biol 43, 829-838.

Hu, C., Wang, F., Ma, S., Li, X., Song, L., Hua, X., Xia, Q., 2015. Suppression of intestinal immunity through silencing of TCTP by RNAi in transgenic silkworm, Bombyx mori. Gene 574, 82-87.

Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4, 44-57.

Huang, J., Zhang, Y., Li, M., Wang, S., Liu, W., Couble, P., Zhao, G., Huang, Y., 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. FEBS Lett 581, 697-701.

Huang, Z., Kingsolver, M.B., Avadhanula, V., Hardy, R.W., 2013. An antiviral role for antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication. J Virol 87, 4272-4280.

Hughes, D.S., Possee, R.D., King, L.A., 1993. Activation and detection of a latent baculovirus resembling Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus in M. brassicae insects. Virology 194, 608-615.

Hull, J.J., Lee, J.M., Kajigaya, R., Matsumoto, S., 2009. Bombyx mori homologs of STIM1 and Orai1 are essential components of the signal transduction cascade that regulates sex pheromone production. J Biol Chem 284, 31200-31213.

Hull, J.J., Lee, J.M., Matsumoto, S., 2010. Gqalpha-linked phospholipase Cbeta1 and phospholipase Cgamma are essential components of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) signal transduction cascade. Insect Mol Biol 19, 553-566.

Hunter, W., Ellis, J., Vanengelsdorp, D., Hayes, J., Westervelt, D., Glick, E., Williams, M., Sela, I., Maori, E., Pettis, J., Cox-Foster, D., Paldi, N., 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (Apis mellifera, Hymenoptera: Apidae). PLoS Pathog 6, e1001160.

Hussain, M., Taft, R.J., Asgari, S., 2008. An insect virus-encoded microRNA regulates viral replication. J Virol 82, 9164-9170.

Hussain, M., Abraham, A.M., Asgari, S., 2010. An Ascovirus-encoded RNase III autoregulates its expression and suppresses RNA interference-mediated gene silencing. J Virol 84, 3624-3630.

Hussain, M., Torres, S., Schnettler, E., Funk, A., Grundhoff, A., Pijlman, G.P., Khromykh, A.A., Asgari, S., 2012. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. Nucleic Acids Res 40, 2210-2223.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science 293, 834-838.

Huvenne, H., Smagghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. J Insect Physiol 56, 227-235.

Ikeda, K., Nakazawa, H., Alain, R., Belloncik, S., Mori, H., 1998. Characterizations of natural and induced polyhedrin gene mutants of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis viruses. Arch Virol 143, 241-248.

Ikeda, M., Yamada, H., Hamajima, R., Kobayashi, M., 2013. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. Virology 435, 1-13.

Ipsaro, J.J., Haase, A.D., Knott, S.R., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2012. The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. Nature 491, 279-283.

Ishizu, H., Siomi, H., Siomi, M.C., 2012. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. Genes Dev 26, 2361-2373.

Isobe, R., Kojima, K., Matsuyama, T., Quan, G.X., Kanda, T., Tamura, T., Sahara, K., Asano, S.I., Bando, H., 2004. Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms. Arch Virol 149, 1931-1940.

Iwanaga, M., Hitotsuyama, T., Katsuma, S., Ishihara, G., Daimon, T., Shimada, T., Imanishi, S., Kawasaki, H., 2012. Infection study of Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) using a BmMLV-negative cell line and an infectious cDNA clone. J Virol Methods 179, 316-324.

Iwanaga, M., Shibano, Y., Ohsawa, T., Fujita, T., Katsuma, S., Kawasaki, H., 2013. Involvement of HSC70-4 and other inducible HSPs in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection. Virus Res.

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., Tomari, Y., 2010. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. Mol Cell 39, 292-299.

Iwasaki, S., Sasaki, H.M., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Tadakuma, H., Tomari, Y., 2015. Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex. Nature 521, 533-536.

Izumi, N., Kawaoka, S., Yasuhara, S., Suzuki, Y., Sugano, S., Katsuma, S., Tomari, Y., 2013. Hsp90 facilitates accurate loading of precursor piRNAs into PIWI proteins. RNA 19, 896-901.

Jackson, A.L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B.N., Cleary, M., Lim, L., Linsley, P.S., 2006. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. RNA 12, 1179-1187.

Jaendling, A., McFarlane, R.J., 2010. Biological roles of translin and translin-associated factor-X: RNA metabolism comes to the fore. Biochem J 429, 225-234.

Jayachandran, B., Hussain, M., Asgari, S., 2012. RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus. J Virol 86, 13729-13734.

Jayachandran, B., Hussain, M., Asgari, S., 2013. Regulation of Helicoverpa armigera ecdysone receptor by miR-14 and its potential link to baculovirus infection. J Invertebr Pathol 114, 151-157.

Jiang, F., Ye, X., Liu, X., Fincher, L., McKearin, D., Liu, Q., 2005. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila. Genes Dev 19, 1674-1679.

Jiang, L., Zhao, P., Wang, G., Cheng, T., Yang, Q., Jin, S., Lin, P., Xiao, Y., Sun, Q., Xia, Q., 2013. Comparison of factors that may affect the inhibitory efficacy of transgenic RNAi targeting of baculoviral genes in silkworm, Bombyx mori. Antiviral research 97, 255-263.

Jinek, M., Doudna, J.A., 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature 457, 405-412.

Johnson, E.M., Doyle, J.D., Wetzel, J.D., McClung, R.P., Katunuma, N., Chappell, J.D., Washington, M.K., Dermody, T.S., 2009. Genetic and pharmacologic alteration of cathepsin expression influences reovirus pathogenesis. J Virol 83, 9630-9640.

Jose, A.M., Kim, Y.A., Leal-Ekman, S., Hunter, C.P., 2012. Conserved tyrosine kinase promotes the import of silencing RNA into Caenorhabditis elegans cells. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 14520-14525.

Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2011. Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3, a003772.

Kadri, S., Hinman, V., Benos, P.V., 2009. HHMMiR: efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models. BMC bioinformatics 10 Suppl 1, S35.

Kamimura, M., Tomita, S., Kiuchi, M., Fujiwara, H., 1997. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms -- ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. European journal of biochemistry / FEBS 248, 786-793.

Kanasty, R., Dorkin, J.R., Vegas, A., Anderson, D., 2013. Delivery materials for siRNA therapeutics. Nature materials 12, 967-977.

Kanginakudru, S., Royer, C., Edupalli, S.V., Jalabert, A., Mauchamp, B., Prasad, S.V., Chavancy, G., Couble, P., Nagaraju, J., 2007. Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. Insect Mol Biol 16, 635-644.

Karim, S., Troiano, E., Mather, T.N., 2010. Functional genomics tool: gene silencing in Ixodes scapularis eggs and nymphs by electroporated dsRNA. BMC Biotechnol 10, 1.

Karlikow, M., Goic, B., Saleh, M.C., 2014. RNAi and antiviral defense in Drosophila: setting up a systemic immune response. Developmental and comparative immunology 42, 85-92.

Kasai, M., Matsuzaki, T., Katayanagi, K., Omori, A., Maziarz, R.T., Strominger, J.L., Aoki, K., Suzuki, K., 1997. The translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hot spots in the human genome. J Biol Chem 272, 11402-11407.

Katoch, R., Thakur, N., 2013. Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants. Applied biochemistry and biotechnology 169, 1579-1605.

Katoch, R., Sethi, A., Thakur, N., Murdock, L.L., 2013. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. Applied biochemistry and biotechnology 171, 847-873.

Katsuma, S., Tanaka, S., Omuro, N., Takabuchi, L., Daimon, T., Imanishi, S., Yamashita, S., Iwanaga, M., Mita, K., Maeda, S., Kobayashi, M., Shimada, T., 2005. Novel macula-like virus identified in Bombyx mori cultured cells. J Virol 79, 5577-5584.

Kawamata, T., Seitz, H., Tomari, Y., 2009. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. Nat Struct Mol Biol 16, 953-960.

Kawaoka, S., Hayashi, N., Katsuma, S., Kishino, H., Kohara, Y., Mita, K., Shimada, T., 2008a. Bombyx small RNAs: genomic defense system against transposons in the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 38, 1058-1065.

Kawaoka, S., Minami, K., Katsuma, S., Mita, K., Shimada, T., 2008b. Developmentally synchronized expression of two Bombyx mori Piwi subfamily genes, SIWI and BmAGO3 in germ-line cells. Biochem Biophys Res Commun 367, 755-760.

Kawaoka, S., Hayashi, N., Suzuki, Y., Abe, H., Sugano, S., Tomari, Y., Shimada, T., Katsuma, S., 2009. The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. RNA 15, 1258-1264.

Kawaoka, S., Kadota, K., Arai, Y., Suzuki, Y., Fujii, T., Abe, H., Yasukochi, Y., Mita, K., Sugano, S., Shimizu, K., Tomari, Y., Shimada, T., Katsuma, S., 2011a. The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs. RNA 17, 2144-2151.

Kawaoka, S., Arai, Y., Kadota, K., Suzuki, Y., Hara, K., Sugano, S., Shimizu, K., Tomari, Y., Shimada, T., Katsuma, S., 2011b. Zygotic amplification of secondary piRNAs during silkworm embryogenesis. RNA 17, 1401-1407.

Kayukawa, T., Nagamine, K., Ito, Y., Nishita, Y., Ishikawa, Y., Shinoda, T., 2016. Kruppel Homolog 1 Inhibits Insect Metamorphosis via Direct Transcriptional Repression of Broad-Complex, a Pupal Specifier Gene. J Biol Chem 291, 1751-1762.

Keene, K.M., Foy, B.D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E., 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of Anopheles gambiae. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 17240-17245.

Kemp, C., Imler, J.L., 2009. Antiviral immunity in drosophila. Curr Opin Immunol 21, 3-9.

Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., Troxler, L., Hetru, C., Meignin, C., Pfeffer, S., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2013. Broad RNA interference-mediated antiviral immunity and virus-specific inducible responses in Drosophila. J Immunol 190, 650-658.

Kennerdell, J.R., Carthew, R.W., 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. Cell 95, 1017-1026.

Kennerdell, J.R., Carthew, R.W., 2000. Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. Nat Biotechnol 18, 896-898.

Kerr, C.H., Wang, Q.S., Keatings, K., Khong, A., Allan, D., Yip, C.K., Foster, L.J., Jan, E., 2015. The 5' untranslated region of a novel infectious molecular clone of the dicistrovirus cricket paralysis virus modulates infection. J Virol 89, 5919-5934.

Khoo, C.C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Franz, A.W., 2010. The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in Aedes aegypti. BMC Microbiol 10, 130.

Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 115, 209-216.

Kim, C.H., Paik, D., Rus, F., Silverman, N., 2014. The caspase-8 homolog Dredd cleaves Imd and Relish but is not inhibited by p35. J Biol Chem 289, 20092-20101.

Kim, K., Lee, Y.S., Carthew, R.W., 2007. Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. RNA 13, 22-29.

Kim, N.Y., Baek, J.Y., Choi, H.S., Chung, I.S., Shin, S., Lee, J.I., Choi, J.Y., Yang, J.M., 2012. Short-hairpin RNA-mediated gene expression interference in Trichoplusia ni cells. J Microbiol Biotechnol 22, 190-198.

Kim, V.N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 376-385.

Kim, Y.H., Soumaila Issa, M., Cooper, A.M., Zhu, K.Y., 2015. RNA interference: Applications and advances in insect toxicology and insect pest management. Pesticide biochemistry and physiology 120, 109-117.

Kingsolver, M.B., Huang, Z., Hardy, R.W., 2013. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. J Mol Biol 425, 4921-4936.

Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Ishihara, G., Kawaoka, S., Sugano, S., Shimada, T., Suzuki, Y., Suzuki, M.G., Katsuma, S., 2014. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. Nature 509, 633-636.

Kobayashi, I., Tsukioka, H., Komoto, N., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., Kusakabe, T., Tomita, S., 2012. SID-1 protein of Caenorhabditis elegans mediates uptake of dsRNA into Bombyx cells. Insect Biochem Mol Biol 42, 148-154.

Kominsky, D.J., Bickel, R.J., Tyler, K.L., 2002. Reovirus-induced apoptosis requires both death receptor- and mitochondrial-mediated caspase-dependent pathways of cell death. Cell Death Differ 9, 926-933.

Kozak, M., 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol 196, 947-950.

Kumar, P., Pandit, S.S., Steppuhn, A., Baldwin, I.T., 2014. Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense. Proc Natl Acad Sci U S A 111, 1245-1252.

Kurscheid, S., Lew-Tabor, A.E., Rodriguez Valle, M., Bruyeres, A.G., Doogan, V.J., Munderloh, U.G., Guerrero, F.D., Barrero, R.A., Bellgard, M.I., 2009. Evidence of a tick RNAi pathway by comparative genomics and reverse genetics screen of targets with known loss-of-function phenotypes in Drosophila. BMC Mol Biol 10, 26.

Labreuche, Y., Veloso, A., de la Vega, E., Gross, P.S., Chapman, R.W., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2010. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp Litopenaeus vannamei. Developmental and comparative immunology 34, 1209-1218.

Lan, H., Chen, H., Liu, Y., Jiang, C., Mao, Q., Jia, D., Chen, Q., Wei, T., 2015. Small Interfering RNA Pathway Modulates Initial Viral Infection in Midgut Epithelium of Insect after Ingestion of Virus. J Virol 90, 917-929.

Lan, H., Wang, H., Chen, Q., Chen, H., Jia, D., Mao, Q., Wei, T., 2016. Small interfering RNA pathway modulates persistent infection of a plant virus in its insect vector. Sci Rep 6, 20699.

Langlois, R.A., Shapiro, J.S., Pham, A.M., tenOever, B.R., 2012. In vivo delivery of cytoplasmic RNA virus-derived miRNAs. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 20, 367-375.

Lavazec, C., Boudin, C., Lacroix, R., Bonnet, S., Diop, A., Thiberge, S., Boisson, B., Tahar, R., Bourgouin, C., 2007. Carboxypeptidases B of Anopheles gambiae as targets for a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine. Infect Immun 75, 1635-1642.

Lee, H.C., Gu, W., Shirayama, M., Youngman, E., Conte, D., Jr., Mello, C.C., 2012. C. elegans piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. Cell 150, 78-87.

Lee, K.S., Kim, B.Y., Choo, Y.M., Yoon, H.J., Kang, P.D., Woo, S.D., Sohn, H.D., Roh, J.Y., Gui, Z.Z., Je, Y.H., Jin, B.R., 2009a. Expression profile of cathepsin B in the fat body of Bombyx mori during metamorphosis. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 154, 188-194.

Lee, S.K., Son le, T., Choi, H.J., Ahnn, J., 2013. Dicarbonyl/l-xylulose reductase (DCXR): The multifunctional pentosuria enzyme. Int J Biochem Cell Biol 45, 2563-2567.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J 21, 4663-4670.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425, 415-419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J 23, 4051-4060.

Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim do, H., Cho, I.S., Nakahara, K., Preall, J.B., Bellare, P., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., 2009b. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. Nat Cell Biol 11, 1150-1156.

Leger, P., Lara, E., Jagla, B., Sismeiro, O., Mansuroglu, Z., Coppee, J.Y., Bonnefoy, E., Bouloy, M., 2013. Dicer-2- and Piwi-mediated RNA interference in Rift Valley fever virus-infected mosquito cells. J Virol 87, 1631-1648.

Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of Drosophila melanogaster. Annu Rev Immunol 25, 697-743.

Li, C., Vagin, V.V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H., Seitz, H., Horwich, M.D., Syrzycka, M., Honda, B.M., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Klattenhoff, C., Schulz, N., Theurkauf, W.E., Weng, Z., Zamore, P.D., 2009a. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. Cell 137, 509-521.

Li, H., Li, W.X., Ding, S.W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. Science 296, 1319-1321.

Li, J., Andika, I.B., Shen, J., Lv, Y., Ji, Y., Sun, L., Chen, J., 2013. Characterization of rice black-streaked dwarf virus- and rice stripe virus-derived siRNAs in singly and doubly infected insect vector Laodelphax striatellus. PLoS One 8, e66007.

Li, K., Guo, E., Hossain, M.S., Li, Q., Cao, Y., Tian, L., Deng, X., Li, S., 2015a. Bombyx E75 isoforms display stage- and tissue-specific responses to 20-hydroxyecdysone. Sci Rep 5, 12114.

Li, L., Sevinsky, J.R., Rowland, M.D., Bundy, J.L., Stephenson, J.L., Sherry, B., 2010. Proteomic analysis reveals virus-specific Hsp25 modulation in cardiac myocytes. J Proteome Res 9, 2460-2471.

Li, W., Koutmou, K.S., Leahy, D.J., Li, M., 2015b. Systemic RNA Interference Deficiency-1 (SID-1) Extracellular Domain Selectively Binds Long Double-stranded RNA and Is Required for RNA Transport by SID-1. J Biol Chem 290, 18904-18913.

Li, X., Dong, X., Zou, C., Zhang, H., 2015c. Endocytic pathway mediates refractoriness of insect Bactrocera dorsalis to RNA interference. Sci Rep 5, 8700.

Li, X.T., Yu, Q., Zhou, Q.S., Zhao, X., Liu, Z.Y., Cui, W.Z., Liu, Q.X., 2016a. BmRobo1a and BmRobo1b control axon repulsion in the silkworm Bombyx mori. Gene 577, 215-220.

Li, X.T., Yu, Q., Zhou, Q.S., Zhao, X., Liu, Z.Y., Cui, W.Z., Liu, Q.X., 2016b. BmRobo2/3 is required for axon guidance in the silkworm Bombyx mori. Gene 577, 174-179.

Li, Y., Dou, K., Gao, S., Sun, J., Wang, M., Fu, K., Yu, C., Wu, Q., Li, Y., Chen, J., 2015d. Impacts on silkworm larvae midgut proteomics by transgenic Trichoderma strain and analysis of glutathione S-transferase sigma 2 gene essential for anti-stress response of silkworm larvae. J Proteomics 126, 218-227.

Li, Y., Jiang, F., Shi, X., Liu, X., Yang, H., Zhang, Z., 2016c. Identification and Characterization of the Cyclin-Dependent Kinases Gene Family in Silkworm, Bombyx mori. DNA and cell biology 35, 13-23.

Li, Z., Zeng, B., Ling, L., Xu, J., You, L., Aslam, A.F., Tan, A., Huang, Y., 2015e. Enhancement of larval RNAi efficiency by over-expressing Argonaute2 in Bombyx mori. Int J Biol Sci 11, 176-185.

Li, Z.W., Li, X., Yu, Q.Y., Xiang, Z.H., Kishino, H., Zhang, Z., 2009b. The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, Bombyx mori, and comparative analysis with other insect sHSP genes. BMC Evol Biol 9, 215.

Liang, C., Wang, Y., Murota, Y., Liu, X., Smith, D., Siomi, M.C., Liu, Q., 2015. TAF11 Assembles the RISC Loading Complex to Enhance RNAi Efficiency. Mol Cell 59, 807-818.

Liang, J., Zhang, L., Xiang, Z., He, N., 2010. Expression profile of cuticular genes of silkworm, Bombyx mori. BMC Genomics 11, 173.

Lin, X., Ruan, X., Anderson, M.G., McDowell, J.A., Kroeger, P.E., Fesik, S.W., Shen, Y., 2005. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. Nucleic Acids Res 33, 4527-4535.

Lindbo, J.A., 2012. A historical overview of RNAi in plants. Methods Mol Biol 894, 1-16.

Lipardi, C., Wei, Q., Paterson, B.M., 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. Cell 107, 297-307.

Lipardi, C., Paterson, B.M., 2009. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in Drosophila involved in RNAi and transposon suppression. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 15645-15650.

Lipardi, C., Paterson, B.M., 2011. Retraction for Lipardi and Paterson, "Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in Drosophila involved in RNAi and transposon suppression". Proc Natl Acad Sci U S A 108, 15010.

Liu, C., Yamamoto, K., Cheng, T.C., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Liu, S.P., Han, Y., Futahashi, R., Kidokoro, K., Noda, H., Kobayashi, I., Tamura, T., Ohnuma, A., Banno, Y., Dai, F.Y., Xiang, Z.H., Goldsmith, M.R., Mita, K., Xia, Q.Y., 2010a. Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, Bombyx mori. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 12980-12985.

Liu, H., Cheng, L., 2015. Cryo-EM shows the polymerase structures and a nonspooled genome within a dsRNA virus. Science 349, 1347-1350.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 305, 1437-1441.

Liu, J., Swevers, L., Iatrou, K., Huvenne, H., Smagghe, G., 2012. Bombyx mori DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. J Insect Physiol 58, 1166-1176.

Liu, J., Bai, J., Zhang, L., Jiang, Z., Wang, X., Li, Y., Jiang, P., 2013a. Hsp70 positively regulates porcine circovirus type 2 replication in vitro. Virology 447, 52-62.

Liu, J., Smagghe, G., Swevers, L., 2013b. Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of Bombyx mori. J Insect Physiol 59, 646-654.

Liu, J., Kolliopoulou, A., Smagghe, G., Swevers, L., 2014. Modulation of the transcriptional response of innate immune and RNAi genes upon exposure to dsRNA and LPS in silkmoth-derived Bm5 cells overexpressing BmToll9-1 receptor. J Insect Physiol.

Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., Wang, X., 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. Science 301, 1921-1925.

Liu, S., Xia, Q., Zhao, P., Cheng, T., Hong, K., Xiang, Z., 2007. Characterization and expression patterns of let-7 microRNA in the silkworm (Bombyx mori). BMC developmental biology 7, 88.

Liu, W., Yang, F., Jia, S., Miao, X., Huang, Y., 2008. Cloning and characterization of Bmrunt from the silkworm Bombyx mori during embryonic development. Arch Insect Biochem Physiol 69, 47-59.

Liu, W., 2012. Functional analyses in the silkworm, Bombyx mori, support a role for Notch signaling in appendage development but not the groucho-dependent pair-rule process. Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution 318, 651-662.

Liu, W., 2013. Bmdelta phenotype implies involvement of Notch signaling in body segmentation and appendage development of silkworm, Bombyx mori. Arthropod structure & development 42, 143-151.

Liu, W., Liu, J., Lu, Y., Gong, Y., Zhu, M., Chen, F., Liang, Z., Zhu, L., Kuang, S., Hu, X., Cao, G., Xue, R., Gong, C., 2015a. Immune signaling pathways activated in response to different pathogenic micro-organisms in Bombyx mori. Molecular immunology 65, 391-397.

Liu, X., Jiang, F., Kalidas, S., Smith, D., Liu, Q., 2006. Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. RNA 12, 1514-1520.

Liu, X., Zhang, Y., Yan, X., Han, R., 2010b. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in Apis cerana using RNA interference. Current microbiology 61, 422-428.

Liu, X., Dai, F., Guo, E., Li, K., Ma, L., Tian, L., Cao, Y., Zhang, G., Palli, S.R., Li, S., 2015b. 20-Hydroxyecdysone (20E) Primary Response Gene E93 Modulates 20E Signaling to Promote Bombyx Larval-Pupal Metamorphosis. J Biol Chem 290, 27370-27383.

Liu, Y., Ye, X., Jiang, F., Liang, C., Chen, D., Peng, J., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Liu, Q., 2009. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. Science 325, 750-753.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.

Longdon, B., Cao, C., Martinez, J., Jiggins, F.M., 2013. Previous exposure to an RNA virus does not protect against subsequent infection in Drosophila melanogaster. PLoS One 8, e73833.

Lozano, J., Gomez-Orte, E., Lee, H.J., Belles, X., 2012. Super-induction of Dicer-2 expression by alien double-stranded RNAs: an evolutionary ancient response to viral infection? Dev Genes Evol 222, 229-235.

Lu, M., Farrell, P.J., Johnson, R., Iatrou, K., 1997. A baculovirus (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. J Biol Chem 272, 30724-30728.

Lu, M., Iatrou, K., 1997. Characterization of a domain of the genome of BmNPV containing a functional gene for a small capsid protein and harboring deletions eliminating three open reading frames that are present in AcNPV. Gene 185, 69-75.

Lu, Y., Park, Y., Gao, X., Zhang, X., Yao, J., Pang, Y.P., Jiang, H., Zhu, K.Y., 2012. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in Tribolium castaneum. Sci Rep 2, 288.

Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. Science 303, 95-98.

Luo, Y., Wang, X., Yu, D., Kang, L., 2012. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. RNA Biol 9, 663-671.

Luo, Y., Wang, X., Yu, D., Chen, B., Kang, L., 2013. Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. Insect Mol Biol 22, 574-583.

Ma, X., Li, X., Dong, S., Xia, Q., Wang, F., 2015. A Fas associated factor negatively regulates anti-bacterial immunity by promoting Relish degradation in Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 63, 144-151.

Malone, C.D., Hannon, G.J., 2009. Small RNAs as guardians of the genome. Cell 136, 656-668.

Malone, C.D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W.R., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., 2009. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the Drosophila ovary. Cell 137, 522-535.

Mane-Padros, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Pascual, N., Belles, X., Martin, D., 2008. The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect Blattella germanica. Dev Biol 315, 147-160.

Mao, Y.B., Cai, W.J., Wang, J.W., Hong, G.J., Tao, X.Y., Wang, L.J., Huang, Y.P., Chen, X.Y., 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. Nat Biotechnol 25, 1307-1313.

Mao, Y.B., Tao, X.Y., Xue, X.Y., Wang, L.J., Chen, X.Y., 2011. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. Transgenic research 20, 665-673.

Mao, Y.B., Xue, X.Y., Tao, X.Y., Yang, C.Q., Wang, L.J., Chen, X.Y., 2013. Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference. Plant molecular biology 83, 119-129.

Maori, E., Tanne, E., Sela, I., 2007. Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. Virology 362, 342-349.

Maori, E., Paldi, N., Shafir, S., Kalev, H., Tsur, E., Glick, E., Sela, I., 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. Insect Mol Biol 18, 55-60.

Marques, J.T., Carthew, R.W., 2007. A call to arms: coevolution of animal viruses and host innate immune responses. Trends Genet 23, 359-364.

Marques, J.T., Kim, K., Wu, P.H., Alleyne, T.M., Jafari, N., Carthew, R.W., 2010. Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in Drosophila. Nat Struct Mol Biol 17, 24-30.

Marques, J.T., Wang, J.P., Wang, X., de Oliveira, K.P., Gao, C., Aguiar, E.R., Jafari, N., Carthew, R.W., 2013. Functional specialization of the small interfering RNA pathway in response to virus infection. PLoS Pathog 9, e1003579.

Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem Sabanadzovic, N., Edwards, M.C., Dreher, T., 2002. The family Tymoviridae. Arch Virol 147, 1837-1846.

Martinez, J., Tuschl, T., 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. Genes Dev 18, 975-980.

Masri, L., Cremer, S., 2014. Individual and social immunisation in insects. Trends Immunol 35, 471-482.

Masumoto, M., Yaginuma, T., Niimi, T., 2009. Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, Bombyx mori, using RNAi. Dev Genes Evol 219, 437-444.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., Zamore, P.D., 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell 123, 607-620.

Matsumoto, K., Minami, M., Shinozaki, F., Suzuki, Y., Abe, K., Zenno, S., Matsumoto, S., Minami, Y., 2011. Hsp90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. Biochem Biophys Res Commun 407, 720-724.

Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J., Matzke, A.J., 1989. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. EMBO J 8, 643-649.

Maule, A.G., McVeigh, P., Dalzell, J.J., Atkinson, L., Mousley, A., Marks, N.J., 2011. An eye on RNAi in nematode parasites. Trends Parasitol 27, 505-513.

McEwan, D.L., Weisman, A.S., Hunter, C.P., 2012. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. Mol Cell 47, 746-754.

McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W., 2013. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harbor perspectives in biology 5, a008656.

Mehrabadi, M., Hussain, M., Asgari, S., 2013. MicroRNAome of Spodoptera frugiperda cells (Sf9) and its alteration following baculovirus infection. J Gen Virol 94, 1385-1397.

Mehrabadi, M., Hussain, M., Matindoost, L., Asgari, S., 2015. The Baculovirus Antiapoptotic p35 Protein Functions as an Inhibitor of the Host RNA Interference Antiviral Response. J Virol 89, 8182-8192.

Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. Nat Rev Genet 14, 447-459.

Mertens, P., 2004. The dsRNA viruses. Virus Res 101, 3-13.

Mertens, P.P.C., Rao, S., Zhou, H., 2004. *Cypovirus*, in: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), Virus Taxonomy: eighth report of the International Committe on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London England, pp. 522-533.

Miesen, P., Girardi, E., van Rij, R.P., 2015. Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in Aedes aegypti mosquito cells. Nucleic Acids Res 43, 6545-6556.

Miller, S.C., Brown, S.J., Tomoyasu, Y., 2008. Larval RNAi in Drosophila? Dev Genes Evol 218, 505-510.

Miller, S.C., Miyata, K., Brown, S.J., Tomoyasu, Y., 2012. Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle Tribolium castaneum: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. PLoS One 7, e47431.

Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., Siomi, M.C., 2010a. Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in Drosophila. RNA 16, 506-515.

Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H., Siomi, M.C., 2010b. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in Drosophila. Nat Struct Mol Biol 17, 1024-1026.

Moazed, D., 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. Nature 457, 413-420.

Mohn, F., Handler, D., Brennecke, J., 2015. Noncoding RNA. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis. Science 348, 812-817.

Molina-Cruz, A., Gupta, L., Richardson, J., Bennett, K., Black, W.t., Barillas-Mury, C., 2005. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in Aedes aegypti. Am J Trop Med Hyg 72, 631-637.

Mon, H., Kobayashi, I., Ohkubo, S., Tomita, S., Lee, J., Sezutsu, H., Tamura, T., Kusakabe, T., 2012. Effective RNA interference in cultured silkworm cells mediated by overexpression of Caenorhabditis elegans SID-1. RNA Biol 9, 40-46.

Mon, H., Li, Z., Kobayashi, I., Tomita, S., Lee, J., Sezutsu, H., Tamura, T., Kusakabe, T., 2013. Soaking RNAi in Bombyx mori BmN4-SID1 cells arrests cell cycle progression. J Insect Sci 13, 155.

Mon, H., Lee, J.M., Mita, K., Goldsmith, M.R., Kusakabe, T., 2014. Chromatin-induced spindle assembly plays an important role in metaphase congression of silkworm holocentric chromosomes. Insect Biochem Mol Biol 45, 40-50.

Moore, N.F., Reavy, B., Pullin, J.S., 1981. Processing of cricket paralysis virus induced polypeptides in Drosophila cells: production of high molecular weight polypeptides by treatment with iodoacetamide. Arch Virol 68, 1-8.

Morales, C.R., Wu, X.Q., Hecht, N.B., 1998. The DNA/RNA-binding protein, TB-RBP, moves from the nucleus to the cytoplasm and through intercellular bridges in male germ cells. Dev Biol 201, 113-123.

Morazzani, E.M., Wiley, M.R., Murreddu, M.G., Adelman, Z.N., Myles, K.M., 2012. Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. PLoS Pathog 8, e1002470.

Mori, H., Metcalf, P., 2010. Cypoviruses, in: Asgari, S., Johnson, K.N. (Eds.), Insect Virology. Horizon Scientific Press, pp. 307-323.

Moshkovich, N., Nisha, P., Boyle, P.J., Thompson, B.A., Dale, R.K., Lei, E.P., 2011. RNAi-independent role for Argonaute2 in CTCF/CP190 chromatin insulator function. Genes Dev 25, 1686-1701.

Mrinal, N., Nagaraju, J., 2008. Intron loss is associated with gain of function in the evolution of the gloverin family of antibacterial genes in Bombyx mori. J Biol Chem 283, 23376-23387.

Mueller, S., Gausson, V., Vodovar, N., Deddouche, S., Troxler, L., Perot, J., Pfeffer, S., Hoffmann, J.A., Saleh, M.C., Imler, J.L., 2010. RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 19390-19395.

Mutti, N.S., Park, Y., Reese, J.C., Reeck, G.R., 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, Acyrthosiphon pisum. J Insect Sci 6, 1-7.

Myles, K.M., Wiley, M.R., Morazzani, E.M., Adelman, Z.N., 2008. Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 19938-19943.

Nagata, Y., Lee, J.M., Mon, H., Imanishi, S., Hong, S.M., Komatsu, S., Oshima, Y., Kusakabe, T., 2013. RNAi suppression of beta-N-acetylglucosaminidase (BmFDL) for complex-type N-linked glycan synthesis in cultured silkworm cells. Biotechnol Lett 35, 1009-1016.

Nakamoto, M., Moy, R.H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S.S., Gold, B., Cherry, S., 2012. Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in Drosophila. Immunity 36, 658-667.

Nakao, H., 2012. Anterior and posterior centers jointly regulate Bombyx embryo body segmentation. Dev Biol 371, 293-301.

Nakao, H., 2015. Analyses of interactions among pair-rule genes and the gap gene Kruppel in Bombyx segmentation. Dev Biol 405, 149-157.

Nandety, R.S., Fofanov, V.Y., Koshinsky, H., Stenger, D.C., Falk, B.W., 2013. Small RNA populations for two unrelated viruses exhibit different biases in strand polarity and proximity to terminal sequences in the insect host Homalodisca vitripennis. Virology 442, 12-19.

Nandety, R.S., Kuo, Y.W., Nouri, S., Falk, B.W., 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. Bioengineered 6, 8-19.

Nayak, A., Berry, B., Tassetto, M., Kunitomi, M., Acevedo, A., Deng, C., Krutchinsky, A., Gross, J., Antoniewski, C., Andino, R., 2010. Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. Nat Struct Mol Biol 17, 547-554.

Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., Pennacchio, F., 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. PLoS Pathog 8, e1002735.

Nie, H., Cheng, T., Huang, X., Zhou, M., Zhang, Y., Dai, F., Mita, K., Xia, Q., Liu, C., 2015. Functional Loss of Bmsei Causes Thermosensitive Epilepsy in Contractile Mutant Silkworm, Bombyx mori. Sci Rep 5, 12308.

Nishida, K.M., Miyoshi, K., Ogino, A., Miyoshi, T., Siomi, H., Siomi, M.C., 2013. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in Drosophila. Mol Cell 49, 680-691.

Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M.K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., Ishitani, R., Siomi, H., Siomi, M.C., Nureki, O., 2012. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. Nature 491, 284-287.

Niu, Y.S., Cai, Z.Z., Lu, Y., Wang, M.X., Liang, S., Zhou, F., Miao, Y.G., 2013. Characterization of adaptor protein complex-1 in the silkworm, Bombyx mori. Arch Insect Biochem Physiol 82, 84-95.

Nobiron, I., O'Reilly, D.R., Olszewski, J.A., 2003. Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection of Spodoptera frugiperda cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach. J Gen Virol 84, 3029-3039.

Nomura, T., Suganuma, M., Higa, Y., Kataoka, Y., Funaguma, S., Okazaki, H., Suzuki, T., Kobayashi, I., Sezutsu, H., Fujiyama, K., 2015. Improvement of glycosylation structure by suppression of beta-N-acetylglucosaminidases in silkworm. Journal of bioscience and bioengineering 119, 131-136.

Noreen, F., Akbergenov, R., Hohn, T., Richert-Poggeler, K.R., 2007. Distinct expression of endogenous Petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two Petunia hybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production. The Plant journal : for cell and molecular biology 50, 219-229.

Obbard, D.J., Jiggins, F.M., Halligan, D.L., Little, T.J., 2006. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes. Curr Biol 16, 580-585.

Obbard, D.J., Gordon, K.H., Buck, A.H., Jiggins, F.M., 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364, 99-115.

Ocampo, C.B., Caicedo, P.A., Jaramillo, G., Ursic Bedoya, R., Baron, O., Serrato, I.M., Cooper, D.M., Lowenberger, C., 2013. Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of Aedes aegypti with different susceptibilities to dengue virus. PLoS One 8, e61187.

Ohnishi, A., Hull, J.J., Matsumoto, S., 2006. Targeted disruption of genes in the Bombyx mori sex pheromone biosynthetic pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 4398-4403.

Ohnishi, A., Hashimoto, K., Imai, K., Matsumoto, S., 2009. Functional characterization of the Bombyx mori fatty acid transport protein (BmFATP) within the silkmoth pheromone gland. J Biol Chem 284, 5128-5136.

Ohrt, T., Mutze, J., Staroske, W., Weinmann, L., Hock, J., Crell, K., Meister, G., Schwille, P., 2008. Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. Nucleic Acids Res 36, 6439-6449.

Ohrt, T., Muetze, J., Svoboda, P., Schwille, P., 2012. Intracellular localization and routing of miRNA and RNAi pathway components. Current topics in medicinal chemistry 12, 79-88.

Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., Lai, E.C., 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. Cell 130, 89-100.

Okamura, K., Chung, W.J., Ruby, J.G., Guo, H., Bartel, D.P., Lai, E.C., 2008. The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. Nature 453, 803-806.

Okamura, K., Robine, N., Liu, Y., Liu, Q., Lai, E.C., 2011. R2D2 organizes small regulatory RNA pathways in Drosophila. Mol Cell Biol 31, 884-896.

Olson, K.E., Blair, C.D., 2015. Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. Curr Opin Virol 15, 119-126.

Orville Singh, C., Xin, H.H., Chen, R.T., Wang, M.X., Liang, S., Lu, Y., Cai, Z.Z., Miao, Y.G., 2014. BmPLA2 containing conserved domain WD40 affects the metabolic functions of fat body tissue in silkworm, Bombyx mori. Insect Sci.

Osanai-Futahashi, M., Tatematsu, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Uchino, K., Kayukawa, T., Shinoda, T., Banno, Y., Tamura, T., Sezutsu, H., 2012. Identification of the Bombyx red egg gene reveals involvement of a novel transporter family gene in late steps of the insect ommochrome biosynthesis pathway. J Biol Chem 287, 17706-17714.

Pak, J., Fire, A., 2007. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in C. elegans. Science 315, 241-244.

Paldi, N., Glick, E., Oliva, M., Zilberberg, Y., Aubin, L., Pettis, J., Chen, Y., Evans, J.D., 2010. Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (Apis mellifera) colony declines. Applied and environmental microbiology 76, 5960-5964.

Palli, S.R., 2014. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. Curr Opin Insect Sci 6, 1-8.

Pan, Z.H., Gao, K., Hou, C.X., Wu, P., Qin, G.X., Geng, T., Guo, X.J., 2015. dsRNA interference on expression of a RNA-dependent RNA polymerase gene of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus. Gene 565, 56-61.

Pandey, R.R., Tokuzawa, Y., Yang, Z., Hayashi, E., Ichisaka, T., Kajita, S., Asano, Y., Kunieda, T., Sachidanandam, R., Chuma, S., Yamanaka, S., Pillai, R.S., 2013. Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 16492-16497.

Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.B., Walker, P.J., 2012. Secreted Vago restricts West Nile virus infection in Culex mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 18915-18920.

Parthasarathy, R., Tan, A., Bai, H., Palli, S.R., 2008. Transcription factor broad suppresses precocious development of adult structures during larval-pupal metamorphosis in the red flour beetle, Tribolium castaneum. Mech Dev 125, 299-313.

Paul, M., Goldsmith, M.R., Hunsley, J.R., Kafatos, F.C., 1972. Specific protein synthesis in cellular differentiation. Production of eggshell proteins by silkmoth follicular cells. Cell Biology 55, 653-680

Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S., 2002. Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin Immunol 14, 123-128.

Perrimon, N., Mathey-Prevot, B., 2007. Applications of high-throughput RNA interference screens to problems in cell and developmental biology. Genetics 175, 7-16.

Peters, L., Meister, G., 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. Mol Cell 26, 611-623.

Petruk, S., Sedkov, Y., Riley, K.M., Hodgson, J., Schweisguth, F., Hirose, S., Jaynes, J.B., Brock, H.W., Mazo, A., 2006. Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. Cell 127, 1209-1221.

Pitaluga, A.N., Mason, P.W., Traub-Cseko, Y.M., 2008. Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, Lutzomyia longipalpis. Developmental and comparative immunology 32, 191-197.

Ponnuvel, K.M., Nithya, K., Sirigineedi, S., Awasthi, A.K., Yamakawa, M., 2012. In vitro antiviral activity of an alkaline trypsin from the digestive juice of Bombyx mori larvae against nucleopolyhedrovirus. Arch Insect Biochem Physiol 81, 90-104.

Popham, H.J., Grasela, J.J., Goodman, C.L., McIntosh, A.H., 2010. Baculovirus infection influences host protein expression in two established insect cell lines. J Insect Physiol 56, 1237-1245.

Pratt, A.J., Rambo, R.P., Lau, P.W., MacRae, I.J., 2012. Preparation and characterization of the extracellular domain of human Sid-1. PLoS One 7, e33607.

Price, D.R., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. Trends Biotechnol 26, 393-400.

Prisco, G.D., Zhang, X., Pennacchio, F., Caprio, E., Li, J., Evans, J.D., Degrandi-Hoffman, G., Hamilton, M., Chen, Y.P., 2011. Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, Apis mellifera. Viruses 3, 2425-2441.

Qi, N., Zhang, L., Qiu, Y., Wang, Z., Si, J., Liu, Y., Xiang, X., Xie, J., Qin, C.F., Zhou, X., Hu, Y., 2012. Targeting of dicer-2 and RNA by a viral RNA silencing suppressor in Drosophila cells. J Virol 86, 5763-5773.

Qian, W., Kang, L., Zhang, T., Meng, M., Wang, Y., Li, Z., Xia, Q., Cheng, D., 2015. Ecdysone receptor (EcR) is involved in the transcription of cell cycle genes in the silkworm. Int J Mol Sci 16, 3335-3349.

Quan, G.X., Kanda, T., Tamura, T., 2002. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. Insect Mol Biol 11, 217-222.

Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2010. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse Ae. aegypti strains and against multiple dengue virus serotypes. Developmental and comparative immunology 34, 625-629.

Rechav, Y., Zyzak, M., Fielden, L.J., Childs, J.E., 1999. Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with Ehrlichia chaffeensis. Journal of medical entomology 36, 414-419.

Redfern, A.D., Colley, S.M., Beveridge, D.J., Ikeda, N., Epis, M.R., Li, X., Foulds, C.E., Stuart, L.M., Barker, A., Russell, V.J., Ramsay, K., Kobelke, S.J., Li, X., Hatchell, E.C., Payne, C., Giles, K.M., Messineo, A., Gatignol, A., Lanz, R.B., O'Malley, B.W., Leedman, P.J., 2013. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 6536-6541.

Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Epidemiol 27, 493-497.

Reinganum, C., 1975. The isolation of cricket paralysis virus from the emperor gum moth, Antheraea eucalypti Scott, and its infectivity towards a range of insect species. Intervirology 5, 97-102.

Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. Developmental and comparative immunology 31, 539-547.

Roberts, A.F., Devos, Y., Lemgo, G.N., Zhou, X., 2015. Biosafety research for non-target organism risk assessment of RNAi-based GE plants. Frontiers in plant science 6, 958.

Rocheleau, C.E., 2012. RNA interference: Systemic RNAi SIDes with endosomes. Curr Biol 22, R873-875.

Rodriguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borras-Hidalgo, O., Wright, D.J., Ayra-Pardo, C., 2010. RNAi-mediated knockdown of a Spodoptera frugiperda trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a Bacillus thuringiensis Cry1Ca1 protoxin. Environmental microbiology 12, 2894-2903.

Rohrmann, G.F., 2013. Introduction to the baculoviruses and their taxonomy, Baculovirus Molecular Biology: Third Edition, Bethesda (MD).

Roignant, J.Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.A., Antoniewski, C., 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila. RNA 9, 299-308.

Romano, N., Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 6, 3343-3353.

Roossinck, M.J., 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. Nature reviews. Microbiology 9, 99-108.

Rouha, H., Thurner, C., Mandl, C.W., 2010. Functional microRNA generated from a cytoplasmic RNA virus. Nucleic Acids Res 38, 8328-8337.

Rozhkov, N.V., Hammell, M., Hannon, G.J., 2013. Multiple roles for Piwi in silencing Drosophila transposons. Genes Dev 27, 400-412.

Ruan, W., Xu, E., Xu, F., Ma, Y., Deng, H., Huang, Q., Lv, B., Hu, H., Lin, J., Cui, J., Di, M., Dong, J., Lai, M., 2007. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis. Cancer Biol Ther 6, 354-359.

Ruan, W.J., Lin, J., Xu, E.P., Xu, F.Y., Ma, Y., Deng, H., Huang, Q., Lv, B.J., Hu, H., Cui, J., Di, M.J., Dong, J.K., Lai, M.D., 2006. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role against colorectal carcinogenesis with its expression associated with DNA hypomethylation of exon 1. J Zhejiang Univ Sci B 7, 929-932.

Rubinstein, R., Harley, E.H., Losman, M., Lutton, D., 1976. The nucleic acids of viruses infecting Heliothis armigera. Virology 69, 323-326.

Ruby, J.G., Jan, C.H., Bartel, D.P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature 448, 83-86.

Ruckert, C., Bell-Sakyi, L., Fazakerley, J.K., Fragkoudis, R., 2014. Antiviral responses of arthropod vectors: an update on recent advances. Virusdisease 25, 249-260.

Rudel, S., Flatley, A., Weinmann, L., Kremmer, E., Meister, G., 2008. A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. RNA 14, 1244-1253.

Sabin, L.R., Zheng, Q., Thekkat, P., Yang, J., Hannon, G.J., Gregory, B.D., Tudor, M., Cherry, S., 2013. Dicer-2 processes diverse viral RNA species. PLoS One 8, e55458.

Sagisaka, A., Fujita, K., Nakamura, Y., Ishibashi, J., Noda, H., Imanishi, S., Mita, K., Yamakawa, M., Tanaka, H., 2010. Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. Virus Res 147, 166-175.

Sago, N., Omi, K., Tamura, Y., Kunugi, H., Toyo-oka, T., Tokunaga, K., Hohjoh, H., 2004. RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. Biochem Biophys Res Commun 319, 50-57.

Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., Siomi, M.C., 2005. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells. PLoS Biol 3, e235.

Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H., Siomi, M.C., 2007. Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. Genes Dev 21, 1603-1608.

Saito, K., Inagaki, S., Mituyama, T., Kawamura, Y., Ono, Y., Sakota, E., Kotani, H., Asai, K., Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila. Nature 461, 1296-1299.

Saleh, M.C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P.H., Andino, R., 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. Nat Cell Biol 8, 793-802.

Saleh, M.C., Tassetto, M., van Rij, R.P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C., Andino, R., 2009. Antiviral immunity in Drosophila requires systemic RNA interference spread. Nature 458, 346-350.

Salem, T.Z., Zhang, F., Xie, Y., Thiem, S.M., 2011. Comprehensive analysis of host gene expression in Autographa californica nucleopolyhedrovirus-infected Spodoptera frugiperda cells. Virology 412, 167-178.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5463-5467.

Sanglas, L., Aviles, F.X., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X., Arolas, J.L., 2009. Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of Ascaris parasite. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 1743-1747.

Sato, A., Sokabe, T., Kashio, M., Yasukochi, Y., Tominaga, M., Shiomi, K., 2014. Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, Bombyx mori. Proc Natl Acad Sci U S A 111, E1249-1255.

Schmid-Hempel, P., 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu Rev Entomol 50, 529-551.

Schmitt-Engel, C., Schultheis, D., Schwirz, J., Strohlein, N., Troelenberg, N., Majumdar, U., Dao, V.A., Grossmann, D., Richter, T., Tech, M., Donitz, J., Gerischer, L., Theis, M., Schild, I., Trauner, J., Koniszewski, N.D., Kuster, E., Kittelmann, S., Hu, Y., Lehmann, S., Siemanowski, J., Ulrich, J., Panfilio, K.A., Schroder, R., Morgenstern, B., Stanke, M., Buchhholz, F., Frasch, M., Roth, S., Wimmer, E.A., Schoppmeier, M., Klingler, M., Bucher, G., 2015. The iBeetle large-scale RNAi screen reveals gene functions for insect development and physiology. Nat Commun 6, 7822.

Schneider, I., 1964. Differentiation of Larval Drosophila Eye-Antennal Discs in Vitro. The Journal of experimental zoology 156, 91-103.

Schnettler, E., Donald, C.L., Human, S., Watson, M., Siu, R.W., McFarlane, M., Fazakerley, J.K., Kohl, A., Fragkoudis, R., 2013a. Knockdown of piRNA pathway proteins results in enhanced Semliki Forest virus production in mosquito cells. J Gen Virol 94, 1680-1689.

Schnettler, E., Ratinier, M., Watson, M., Shaw, A.E., McFarlane, M., Varela, M., Elliott, R.M., Palmarini, M., Kohl, A., 2013b. RNA interference targets arbovirus replication in Culicoides cells. J Virol 87, 2441-2454.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 115, 199-208.

Schwarz, D.S., Tomari, Y., Zamore, P.D., 2004. The RNA-induced silencing complex is a Mg2+-dependent endonuclease. Curr Biol 14, 787-791.

Scolari, F., Siciliano, P., Gabrieli, P., Gomulski, L.M., Bonomi, A., Gasperi, G., Malacrida, A.R., 2011. Safe and fit genetically modified insects for pest control: from lab to field applications. Genetica 139, 41-52.

Scott, J.C., Brackney, D.E., Campbell, C.L., Bondu-Hawkins, V., Hjelle, B., Ebel, G.D., Olson, K.E., Blair, C.D., 2010. Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. PLoS Negl Trop Dis 4, e848.

Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E., 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. J Insect Physiol 59, 1212-1221.

Seyhan, A.A., 2011. RNAi: a potential new class of therapeutic for human genetic disease. Hum Genet 130, 583-605.

Shapiro, J.S., Varble, A., Pham, A.M., Tenoever, B.R., 2010. Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. RNA 16, 2068-2074.

Shapiro, J.S., Langlois, R.A., Pham, A.M., Tenoever, B.R., 2012. Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. RNA 18, 1338-1346.

Shi, Y., Li, K., Tang, P., Li, Y., Zhou, Q., Yang, K., Zhang, Q., 2015. Three-dimensional visualization of the Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virion envelopment process gives new clues as to its mechanism. Virology 476, 298-303.

Shih, J.D., Fitzgerald, M.C., Sutherlin, M., Hunter, C.P., 2009. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length. RNA 15, 384-390.

Shih, J.D., Hunter, C.P., 2011. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. RNA 17, 1057-1065.

Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., Fire, A., 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. Cell 107, 465-476.

Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., Plasterk, R.H., 2007. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. Science 315, 244-247.

Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R., Wiemann, S., 2000. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. EMBO reports 1, 287-292.

Singh, C.P., Singh, J., Nagaraju, J., 2012. A baculovirus-encoded MicroRNA (miRNA) suppresses its host miRNA biogenesis by regulating the exportin-5 cofactor Ran. J Virol 86, 7867-7879.

Singh, C.P., Singh, J., Nagaraju, J., 2014. bmnpv-miR-3 facilitates BmNPV infection by modulating the expression of viral P6.9 and other late genes in Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 49, 59-69.

Singh, J., Singh, C.P., Bhavani, A., Nagaraju, J., 2010. Discovering microRNAs from Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus. Virology 407, 120-128.

Sinha, N.K., Trettin, K.D., Aruscavage, P.J., Bass, B.L., 2015. Drosophila dicer-2 cleavage is mediated by helicase- and dsRNA termini-dependent states that are modulated by Loquacious-PD. Mol Cell 58, 406-417.

Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. Nature 457, 396-404.

Siomi, H., Siomi, M.C., 2015. RNA. Phased piRNAs tackle transposons. Science 348, 756-757.

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., Aravin, A.A., 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 246-258.

Siu, R.W., Fragkoudis, R., Simmonds, P., Donald, C.L., Chase-Topping, M.E., Barry, G., Attarzadeh-Yazdi, G., Rodriguez-Andres, J., Nash, A.A., Merits, A., Fazakerley, J.K., Kohl, A., 2011. Antiviral RNA interference responses induced by Semliki Forest virus infection of mosquito cells: characterization, origin, and frequency-dependent functions of virus-derived small interfering RNAs. J Virol 85, 2907-2917.

Skeiky, Y.A., Iatrou, K., 1991. Developmental regulation of covalent modification of double-stranded RNA during silkmoth oogenesis. J Mol Biol 218, 517-527.

Skube, S.B., Chaverri, J.M., Goodson, H.V., 2010. Effect of GFP tags on the localization of EB1 and EB1 fragments in vivo. Cytoskeleton 67, 1-12.

Smith, J.A., Schmechel, S.C., Raghavan, A., Abelson, M., Reilly, C., Katze, M.G., Kaufman, R.J., Bohjanen, P.R., Schiff, L.A., 2006. Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. J Virol 80, 2019-2033.

Soares, C.A., Lima, C.M., Dolan, M.C., Piesman, J., Beard, C.B., Zeidner, N.S., 2005. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal Ixodes scapularis ticks. Insect Mol Biol 14, 443-452.

Soares, Z.G., Goncalves, A.N., de Oliveira, K.P., Marques, J.T., 2014. Viral RNA recognition by the Drosophila small interfering RNA pathway. Microbes and infection / Institut Pasteur 16, 1013-1021.

Soin, T., Swevers, L., Mosallanejad, H., Efrose, R., Labropoulou, V., Iatrou, K., Smagghe, G., 2008. Juvenile hormone analogs do not affect directly the activity of the ecdysteroid receptor complex in insect culture cell lines. J Insect Physiol 54, 429-438.

Son le, T., Ko, K.M., Cho, J.H., Singaravelu, G., Chatterjee, I., Choi, T.W., Song, H.O., Yu, J.R., Park, B.J., Lee, S.K., Ahnn, J., 2011. DHS-21, a dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR) ortholog, regulates longevity and reproduction in Caenorhabditis elegans. FEBS Lett 585, 1310-1316.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 305, 1434-1437.

Sontheimer, E.J., 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 127-138.

Sorrell, I., White, A., Pedersen, A.B., Hails, R.S., Boots, M., 2009. The evolution of covert, silent infection as a parasite strategy. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society 276, 2217-2226.

Souza-Neto, J.A., Sim, S., Dimopoulos, G., 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 17841-17846.

Specchia, V., Piacentini, L., Tritto, P., Fanti, L., D'Alessandro, R., Palumbo, G., Pimpinelli, S., Bozzetti, M.P., 2010. Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. Nature 463, 662-665.

Stadler, C., Rexhepaj, E., Singan, V.R., Murphy, R.F., Pepperkok, R., Uhlen, M., Simpson, J.C., Lundberg, E., 2013. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. Nature methods 10, 315-323.

Stewart, M.E., Roy, P., 2010. Role of cellular caspases, nuclear factor-kappa B and interferon regulatory factors in Bluetongue virus infection and cell fate. Virol J 7, 362.

Subbaiah, E.V., Royer, C., Kanginakudru, S., Satyavathi, V.V., Babu, A.S., Sivaprasad, V., Chavancy, G., Darocha, M., Jalabert, A., Mauchamp, B., Basha, I., Couble, P., Nagaraju, J., 2013. Engineering silkworms for resistance to baculovirus through multigene RNA interference. Genetics 193, 63-75.

Sultan, A.R., Oish, Y., Ueda, H., 2014. Function of the nuclear receptor FTZ-F1 during the pupal stage in Drosophila melanogaster. Development, growth & differentiation 56, 245-253.

Sun, Q., Choi, G.H., Nuss, D.L., 2009. A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 17927-17932.

Suzuki, M.G., Suzuki, K., Aoki, F., Ajimura, M., 2012. Effect of RNAi-mediated knockdown of the Bombyx mori transformer-2 gene on the sex-specific splicing of Bmdsx pre-mRNA. Int J Dev Biol 56, 693-699.

Suzuki, M.G., Ito, H., Aoki, F., 2014. Effects of RNAi-mediated knockdown of histone methyltransferases on the sex-specific mRNA expression of Imp in the silkworm Bombyx mori. Int J Mol Sci 15, 6772-6796.

Suzuki, Y., Minami, M., Suzuki, M., Abe, K., Zenno, S., Tsujimoto, M., Matsumoto, K., Minami, Y., 2009. The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. J Biol Chem 284, 35597-35604.

Swevers, L., Iatrou, K., 1992. Early Establishment and Autonomous Implementation of a Developmental Program Controlling Silkmoth Chorion Gene Expression Developmental Biology 150, 12-22.

Swevers, L., Iatrou, K., 1999. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkmoth oogenesis at mid-vitellogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29, 955-963.

Swevers, L., Kravariti, L., Ciolfi, S., Xenou-Kokoletsi, M., Ragoussis, N., Smagghe, G., Nakagawa, Y., Mazomenos, B., Iatrou, K., 2004. A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 18, 134-136.

Swevers, L., Liu, J., Huvenne, H., Smagghe, G., 2011. Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkmoth tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and Translin. PLoS One 6, e20250.

Swevers, L., Smagghe, G., 2012. Use of RNAi for control of insect crop pests, in: Smagghe, G., Diaz, I. (Ed.), Arthropod-Plant interactions: Novel insights and approaches for IPM Dordrecht : Springer, ©2012., pp. 177-197.

Swevers, L., Huvenne, H., Menschaert, G., Kontogiannatos, D., Kourti, A., Pauchet, Y., Ffrench-Constant, R.H., Smagghe, G., 2013a. Colorado potato beetle (Coleoptera) gut transcriptome analysis: expression of RNA interference-related genes. Insect Mol Biol 22, 668-684.

Swevers, L., Vanden Broeck, J., Smagghe, G., 2013b. The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis. Front Physiol 4, 319.

Szakmary, A., Reedy, M., Qi, H., Lin, H., 2009. The Yb protein defines a novel organelle and regulates male germline stem cell self-renewal in Drosophila melanogaster. The Journal of cell biology 185, 613-627.

Tabara, H., Grishok, A., Mello, C.C., 1998. RNAi in C. elegans: soaking in the genome sequence. Science 282, 430-431.

Tabunoki, H., Higurashi, S., Ninagi, O., Fujii, H., Banno, Y., Nozaki, M., Kitajima, M., Miura, N., Atsumi, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Sato, R., 2004. A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (Bombyx mori) larvae. FEBS Lett 567, 175-178.

Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W., Hobman, T.C., 2004. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. EMBO reports 5, 189-194.

Taliaferro, J.M., Aspden, J.L., Bradley, T., Marwha, D., Blanchette, M., Rio, D.C., 2013. Two new and distinct roles for Drosophila Argonaute-2 in the nucleus: alternative pre-mRNA splicing and transcriptional repression. Genes Dev 27, 378-389.

Tan, A., Palli, S.R., 2008. Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, Tribolium castaneum. Insect Biochem Mol Biol 38, 430-439.

Tanaka, H., Fujita, K., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Imanishi, S., Yamakawa, M., 2009. shRNA expression plasmids generated by a novel method efficiently induce gene-specific knockdown in a silkworm cell line. Mol Biotechnol 41, 173-179.

Tao, X.Y., Xue, X.Y., Huang, Y.P., Chen, X.Y., Mao, Y.B., 2012. Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. Molecular ecology 21, 4371-4385.

Tatsuke, T., Sakashita, K., Masaki, Y., Lee, J.M., Kawaguchi, Y., Kusakabe, T., 2010. The telomere-specific non-LTR retrotransposons SART1 and TRAS1 are suppressed by Piwi subfamily proteins in the silkworm, Bombyx mori. Cellular & molecular biology letters 15, 118-133.

Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, M., Ryazanov, A., Driscoll, M., 2000. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. Nature genetics 24, 180-183.

Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalier, F., Collinge, D.P., Crava, C.M., de Maagd, R.A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felfoldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A.S., Gatehouse, H.S., Gatehouse, L.N., Giebultowicz, J.M., Gomez, I., Grimmelikhuijzen, C.J., Groot, A.T., Hauser, F., Heckel, D.G., Hegedus, D.D., Hrycaj, S., Huang, L., Hull, J.J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M.R., Kotwica, J., Li, C., Li, J., Liu, J., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P.J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam, M.V., Saenko, S., Simpson, R.M., Soberon, M., Strand, M.R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C.W., Whyard, S., Zhang, W., Nagaraju, J., Ffrench-Constant, R.H., Herrero, S., Gordon, K., Swevers, L., Smagghe, G., 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. J Insect Physiol 57, 231-245.

Terra, W.R., Ferreira, C., Baker, J.E., 1996. Compartmentalization of digestion, in: J., L.M., F., B.P. (Eds.), Biology of the insect midgut. Chapman & Hall, pp. 206-235.

Tham, H.W., Balasubramaniam, V.R., Tejo, B.A., Ahmad, H., Hassan, S.S., 2014. CPB1 of Aedes aegypti interacts with DENV2 E protein and regulates intracellular viral accumulation and release from midgut cells. Viruses 6, 5028-5046.

Theron, E., Dennis, C., Brasset, E., Vaury, C., 2014. Distinct features of the piRNA pathway in somatic and germ cells: from piRNA cluster transcription to piRNA processing and amplification. Mobile DNA 5, 28.

Thomas-Orillard, M., 1996. A virus-Drosophila association: first steps towards co-evolution? Biodivers. Conserv. , 1015-1021.

Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., Zhang, W., 2009. Developmental control of a lepidopteran pest Spodoptera exigua by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. PLoS One 4, e6225.

Tian, L., Guo, E., Wang, S., Liu, S., Jiang, R.J., Cao, Y., Ling, E., Li, S., 2010a. Developmental regulation of glycolysis by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in fat body tissues of the silkworm, Bombyx mori. J Mol Cell Biol 2, 255-263.

Tian, L., Guo, E., Diao, Y., Zhou, S., Peng, Q., Cao, Y., Ling, E., Li, S., 2010b. Genome-wide regulation of innate immunity by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone in the Bombyx fat body. BMC Genomics 11, 549.

Tian, L., Liu, S., Liu, H., Li, S., 2012. 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the Bombyx fat body. Arch Insect Biochem Physiol 79, 207-219.

Tian, L., Ma, L., Guo, E., Deng, X., Ma, S., Xia, Q., Cao, Y., Li, S., 2013. 20-Hydroxyecdysone upregulates Atg genes to induce autophagy in the Bombyx fat body. Autophagy 9, 1172-1187.

Timmons, L., Fire, A., 1998. Specific interference by ingested dsRNA. Nature 395, 854.

Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D.S., Bennett, R., Cook, H.A., Koppetsch, B.S., Theurkauf, W.E., Zamore, P.D., 2004. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. Cell 116, 831-841.

Tomari, Y., Zamore, P.D., 2005. Perspective: machines for RNAi. Genes Dev 19, 517-529.

Tomari, Y., Du, T., Zamore, P.D., 2007. Sorting of Drosophila small silencing RNAs. Cell 130, 299-308.

Tomita, S., Kikuchi, A., 2009. Abd-B suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. Dev Biol 328, 403-409.

Tomoyasu, Y., Denell, R.E., 2004. Larval RNAi in Tribolium (Coleoptera) for analyzing adult development. Dev Genes Evol 214, 575-578.

Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., Bucher, G., 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in Tribolium. Genome Biol 9, R10.

Tribolium Genome Sequencing, C., Richards, S., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Brown, S.J., Denell, R., Beeman, R.W., Gibbs, R., Beeman, R.W., Brown, S.J., Bucher, G., Friedrich, M., Grimmelikhuijzen, C.J., Klingler, M., Lorenzen, M., Richards, S., Roth, S., Schroder, R., Tautz, D., Zdobnov, E.M., Muzny, D., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Attaway, T., Bell, S., Buhay, C.J., Chandrabose, M.N., Chavez, D., Clerk-Blankenburg, K.P., Cree, A., Dao, M., Davis, C., Chacko, J., Dinh, H., Dugan-Rocha, S., Fowler, G., Garner, T.T., Garnes, J., Gnirke, A., Hawes, A., Hernandez, J., Hines, S., Holder, M., Hume, J., Jhangiani, S.N., Joshi, V., Khan, Z.M., Jackson, L., Kovar, C., Kowis, A., Lee, S., Lewis, L.R., Margolis, J., Morgan, M., Nazareth, L.V., Nguyen, N., Okwuonu, G., Parker, D., Richards, S., Ruiz, S.J., Santibanez, J., Savard, J., Scherer, S.E., Schneider, B., Sodergren, E., Tautz, D., Vattahil, S., Villasana, D., White, C.S., Wright, R., Park, Y., Beeman, R.W., Lord, J., Oppert, B., Lorenzen, M., Brown, S., Wang, L., Savard, J., Tautz, D., Richards, S., Weinstock, G., Gibbs, R.A., Liu, Y., Worley, K., Weinstock, G., Elsik, C.G., Reese, J.T., Elhaik, E., Landan, G., Graur, D., Arensburger, P., Atkinson, P., Beeman, R.W., Beidler, J., Brown, S.J., Demuth, J.P., Drury, D.W., Du, Y.Z., Fujiwara, H., Lorenzen, M., Maselli, V., Osanai, M., Park, Y., Robertson, H.M., Tu, Z., Wang, J.J., Wang, S., Richards, S., Song, H., Zhang, L., Sodergren, E., Werner, D., Stanke, M., Morgenstern, B., Solovyev, V., Kosarev, P., Brown, G., Chen, H.C., Ermolaeva, O., Hlavina, W., Kapustin, Y., Kiryutin, B., Kitts, P., Maglott, D., Pruitt, K., Sapojnikov, V., Souvorov, A., Mackey, A.J., Waterhouse, R.M., Wyder, S., Zdobnov, E.M., Zdobnov, E.M., Wyder, S., Kriventseva, E.V., Kadowaki, T., Bork, P., Aranda, M., Bao, R., Beermann, A., Berns, N., Bolognesi, R., Bonneton, F., Bopp, D., Brown, S.J., Bucher, G., Butts, T., Chaumot, A., Denell, R.E., Ferrier, D.E., Friedrich, M., Gordon, C.M., Jindra, M., Klingler, M., Lan, Q., Lattorff, H.M., Laudet, V., von Levetsow, C., Liu, Z., Lutz, R., Lynch, J.A., da Fonseca, R.N., Posnien, N., Reuter, R., Roth, S., Savard, J., Schinko, J.B., Schmitt, C., Schoppmeier, M., Schroder, R., Shippy, T.D., Simonnet, F., Marques-Souza, H., Tautz, D., Tomoyasu, Y., Trauner, J., Van der Zee, M., Vervoort, M., Wittkopp, N., Wimmer, E.A., Yang, X., Jones, A.K., Sattelle, D.B., Ebert, P.R., Nelson, D., Scott, J.G., Beeman, R.W., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Arakane, Y., Beeman, R.W., Zhu, Q., Hogenkamp, D., Dixit, R., Oppert, B., Jiang, H., Zou, Z., Marshall, J., Elpidina, E., Vinokurov, K., Oppert, C., Zou, Z., Evans, J., Lu, Z., Zhao, P., Sumathipala, N., Altincicek, B., Vilcinskas, A., Williams, M., Hultmark, D., Hetru, C., Jiang, H., Grimmelikhuijzen, C.J., Hauser, F., Cazzamali, G., Williamson, M., Park, Y., Li, B., Tanaka, Y., Predel, R., Neupert, S., Schachtner, J., Verleyen, P., Raible, F., Bork, P., Friedrich, M., Walden, K.K., Robertson, H.M., Angeli, S., Foret, S., Bucher, G., Schuetz, S., Maleszka, R., Wimmer, E.A., Beeman, R.W., Lorenzen, M., Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Grossmann, D., Bucher, G., 2008. The genome of the model beetle and pest Tribolium castaneum. Nature 452, 949-955.

Tsang, S.Y., Moore, J.C., Huizen, R.V., Chan, C.W., Li, R.A., 2007. Ectopic expression of systemic RNA interference defective protein in embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 357, 480-486.

Tsukioka, H., Takahashi, M., Mon, H., Okano, K., Mita, K., Shimada, T., Lee, J.M., Kawaguchi, Y., Koga, K., Kusakabe, T., 2006. Role of the silkworm argonaute2 homolog gene in double-strand break repair of extrachromosomal DNA. Nucleic Acids Res 34, 1092-1101.

Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P., Newcomb, R.D., 2006. RNA interference in the light brown apple moth, Epiphyas postvittana (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. Insect Mol Biol 15, 383-391.

Tyler, K.L., Clarke, P., DeBiasi, R.L., Kominsky, D., Poggioli, G.J., 2001. Reoviruses and the host cell. Trends Microbiol 9, 560-564.

Tzou, P., De Gregorio, E., Lemaitre, B., 2002. How Drosophila combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol 5, 102-110.

Uhlirova, M., Foy, B.D., Beaty, B.J., Olson, K.E., Riddiford, L.M., Jindra, M., 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 15607-15612.

Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R.A., Kocks, C., Ramet, M., 2006. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in Drosophila S2 cells. J Biol Chem 281, 14370-14375.

Umbach, J.L., Cullen, B.R., 2009. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. Genes Dev 23, 1151-1164.

Upadhyay, S.K., Dixit, S., Sharma, S., Singh, H., Kumar, J., Verma, P.C., Chandrashekar, K., 2013. siRNA machinery in whitefly (Bemisia tabaci). PLoS One 8, e83692.

Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D., 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. Science 313, 320-324.

Valdes, V.J., Athie, A., Salinas, L.S., Navarro, R.E., Vaca, L., 2012. CUP-1 is a novel protein involved in dietary cholesterol uptake in Caenorhabditis elegans. PLoS One 7, e33962.

van Cleef, K.W., van Mierlo, J.T., Miesen, P., Overheul, G.J., Fros, J.J., Schuster, S., Marklewitz, M., Pijlman, G.P., Junglen, S., van Rij, R.P., 2014. Mosquito and Drosophila entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. Nucleic Acids Res 42, 8732-8744.

van Mierlo, J.T., Bronkhorst, A.W., Overheul, G.J., Sadanandan, S.A., Ekstrom, J.O., Heestermans, M., Hultmark, D., Antoniewski, C., van Rij, R.P., 2012. Convergent evolution of argonaute-2 slicer antagonism in two distinct insect RNA viruses. PLoS Pathog 8, e1002872.

Van Regenmortel, M.H., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., 2000a. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., 2000b. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.

van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in Drosophila melanogaster. Genes Dev 20, 2985-2995.

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P., 1977. The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). In vitro 13, 213-217.

Vijayendran, D., Airs, P.M., Dolezal, K., Bonning, B.C., 2013. Arthropod viruses and small RNAs. J Invertebr Pathol 114, 186-195.

Villarreal, L.P., Defilippis, V.R., Gottlieb, K.A., 2000. Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. Virology 272, 1-6.

Villarreal, L.P., 2009. Persistence pays: how viruses promote host group survival. Curr Opin Microbiol 12, 467-472.

Vodovar, N., Bronkhorst, A.W., van Cleef, K.W., Miesen, P., Blanc, H., van Rij, R.P., Saleh, M.C., 2012. Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. PLoS One 7, e30861.

Vodovar, N., Saleh, M.C., 2012. Of insects and viruses: The role of small RNAs in insect defence, in: Jockusch, E.L. (Ed.), Small RNAs Their Diversity, Roles and Practical uses. Academic Press, pp. 1-36.

Volz, J., Muller, H.M., Zdanowicz, A., Kafatos, F.C., Osta, M.A., 2006. A genetic module regulates the melanization response of Anopheles to Plasmodium. Cell Microbiol 8, 1392-1405.

Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., Green, M.R., 2008. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. Cell 132, 363-374.

Wan, P.J., Guo, W.Y., Yang, Y., Lu, F.G., Lu, W.P., Li, G.Q., 2014. RNAi suppression of the ryanodine receptor gene results in decreased susceptibility to chlorantraniliprole in Colorado potato beetle Leptinotarsa decemlineata. J Insect Physiol 63, 48-55.

Wang, G., Xia Q., Cheng, D., Duan, J., Zha, P., Chen, J., Zhu, L., 2008. Reference genes identified in the silkworm *Bombyx mori* during metamorphism based on oligonucleotide microarray and confirmed by qRT-PCR. Insect Science 15, 405-413.

Wang, H., Gong, L., Qi, J., Hu, M., Zhong, G., Gong, L., 2014. Molecular cloning and characterization of a SID-1-like gene in Plutella xylostella. Arch Insect Biochem Physiol 87, 164-176.

Wang, H., Ma, Z., Niu, K., Xiao, Y., Wu, X., Pan, C., Zhao, Y., Wang, K., Zhang, Y., Liu, N., 2015a. Antagonistic roles between Nibbler and Hen1 modulate piRNA 3' ends in Drosophila. Development.

Wang, L., Lv, X., Zhai, Y., Fu, S., Wang, D., Rayner, S., Tang, Q., Liang, G., 2012. Genomic characterization of a novel virus of the family Tymoviridae isolated from mosquitoes. PLoS One 7, e39845.

Wang, L., Kiuchi, T., Fujii, T., Daimon, T., Li, M., Banno, Y., Kikuta, S., Kikawada, T., Katsuma, S., Shimada, T., 2013a. Mutation of a novel ABC transporter gene is responsible for the failure to incorporate uric acid in the epidermis of ok mutants of the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 43, 562-571.

Wang, M.X., Cai, Z.Z., Lu, Y., Xin, H.H., Chen, R.T., Liang, S., Singh, C.O., Kim, J.N., Niu, Y.S., Miao, Y.G., 2013b. Expression and functions of dopa decarboxylase in the silkworm, Bombyx mori was regulated by molting hormone. Mol Biol Rep 40, 4115-4122.

Wang, M.X., Lu, Y., Cai, Z.Z., Liang, S., Niu, Y.S., Miao, Y.G., 2013c. Phenol oxidase is a necessary enzyme for the silkworm molting which is regulated by molting hormone. Mol Biol Rep 40, 3549-3555.

Wang, S., Beerntsen, B.T., 2015. Functional implications of the peptidoglycan recognition proteins in the immunity of the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. Insect Mol Biol 24, 293-310.

Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., Ding, S.W., 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult Drosophila. Science 312, 452-454.

Wang, Y., Zhang, H., Li, H., Miao, X., 2011. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. PLoS One 6, e18644.

Wang, Z., Wu, D., Liu, Y., Xia, X., Gong, W., Qiu, Y., Yang, J., Zheng, Y., Li, J., Wang, Y.F., Xiang, Y., Hu, Y., Zhou, X., 2015b. Drosophila Dicer-2 has an RNA interference-independent function that modulates Toll immune signaling. Science advances 1, e1500228.

Weick, E.M., Miska, E.A., 2014. piRNAs: from biogenesis to function. Development 141, 3458-3471.

Weinmann, L., Hock, J., Ivacevic, T., Ohrt, T., Mutze, J., Schwille, P., Kremmer, E., Benes, V., Urlaub, H., Meister, G., 2009. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. Cell 136, 496-507.

Weisheit, S., Villar, M., Tykalova, H., Popara, M., Loecherbach, J., Watson, M., Ruzek, D., Grubhoffer, L., de la Fuente, J., Fazakerley, J.K., Bell-Sakyi, L., 2015. Ixodes scapularis and Ixodes ricinus tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis. Parasites & vectors 8, 599.

Welker, N.C., Maity, T.S., Ye, X., Aruscavage, P.J., Krauchuk, A.A., Liu, Q., Bass, B.L., 2011. Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode. Mol Cell 41, 589-599.

Weng, K.F., Hung, C.T., Hsieh, P.T., Li, M.L., Chen, G.W., Kung, Y.A., Huang, P.N., Kuo, R.L., Chen, L.L., Lin, J.Y., Wang, R.Y., Chen, S.J., Tang, P., Horng, J.T., Huang, H.I., Wang, J.R., Ojcius, D.M., Brewer, G., Shih, S.R., 2014. A cytoplasmic RNA virus generates functional viral small RNAs and regulates viral IRES activity in mammalian cells. Nucleic Acids Res 42, 12789-12805.

Whangbo, J.S., Hunter, C.P., 2008. Environmental RNA interference. Trends Genet 24, 297-305.

White, E., Schlackow, M., Kamieniarz-Gdula, K., Proudfoot, N.J., Gullerova, M., 2014. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. Nat Struct Mol Biol 21, 552-559.

Wilson, J.E., Powell, M.J., Hoover, S.E., Sarnow, P., 2000. Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. Mol Cell Biol 20, 4990-4999.

Winston, W.M., Molodowitch, C., Hunter, C.P., 2002. Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1. Science 295, 2456-2459.

Winston, W.M., Sutherlin, M., Wright, A.J., Feinberg, E.H., Hunter, C.P., 2007. Caenorhabditis elegans SID-2 is required for environmental RNA interference. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 10565-10570.

Woolnough, J.L., Atwood, B.L., Giles, K.E., 2015. Argonaute 2 Binds Directly to tRNA Genes and Promotes Gene Repression in cis. Mol Cell Biol 35, 2278-2294.

Wu, K., Hoy, M.A., 2014. Clathrin heavy chain is important for viability, oviposition, embryogenesis and, possibly, systemic RNAi response in the predatory mite Metaseiulus occidentalis. PLoS One 9, e110874.

Wu, P., Li, M., Wang, X., Zhao, P., Wang, X., Liu, T., Qin, G., Guo, X., 2009. Differentially expressed genes in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. Afr J Biotechnol 8, 3711-3720.

Wu, P., Wang, X., Qin, G.X., Liu, T., Jiang, Y.F., Li, M.W., Guo, X.J., 2011a. Microarray analysis of the gene expression profile in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. Mol Biol Rep 38, 333-341.

Wu, P., Han, S., Chen, T., Qin, G., Li, L., Guo, X., 2013. Involvement of microRNAs in infection of silkworm with bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). PLoS One 8, e68209.

Wu, P., Qin, G., Qian, H., Chen, T., Guo, X., 2016. Roles of miR-278-3p in IBP2 regulation and Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus replication. Gene 575, 264-269.

Wu, Q., Luo, Y., Lu, R., Lau, N., Lai, E.C., Li, W.X., Ding, S.W., 2010. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 1606-1611.

Wu, Y.L., Wu, C.P., Liu, C.Y., Hsu, P.W., Wu, E.C., Chao, Y.C., 2011b. A non-coding RNA of insect HzNV-1 virus establishes latent viral infection through microRNA. Sci Rep 1, 60.

Wynant, N., Verlinden, H., Breugelmans, B., Simonet, G., Vanden Broeck, J., 2012. Tissue-dependence and sensitivity of the systemic RNA interference response in the desert locust, Schistocerca gregaria. Insect Biochem Mol Biol 42, 911-917.

Wynant, N., Santos, D., Van Wielendaele, P., Vanden Broeck, J., 2014. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, Schistocerca gregaria. Insect Mol Biol 23, 320-329.

Wynant, N., Santos, D., Subramanyam, S.H., Verlinden, H., Vanden Broeck, J., 2015. Drosha, Dicer-1 and Argonaute-1 in the desert locust: phylogenetic analyses, transcript profiling and regulation during phase transition and feeding. J Insect Physiol 75, 20-29.

Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The Aedes aegypti toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog 4, e1000098.

Xiang, H., Li, M.W., Guo, J.H., Jiang, J.H., Huang, Y.P., 2011. Influence of RNAi knockdown for E-complex genes on the silkworm proleg development. Arch Insect Biochem Physiol 76, 1-11.

Xiao, D., Gao, X., Xu, J., Liang, X., Li, Q., Yao, J., Zhu, K.Y., 2015. Clathrin-dependent endocytosis plays a predominant role in cellular uptake of double-stranded RNA in the red flour beetle. Insect Biochem Mol Biol 60, 68-77.

Xiol, J., Cora, E., Koglgruber, R., Chuma, S., Subramanian, S., Hosokawa, M., Reuter, M., Yang, Z., Berninger, P., Palencia, A., Benes, V., Penninger, J., Sachidanandam, R., Pillai, R.S., 2012. A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. Mol Cell 47, 970-979.

Xiol, J., Spinelli, P., Laussmann, M.A., Homolka, D., Yang, Z., Cora, E., Coute, Y., Conn, S., Kadlec, J., Sachidanandam, R., Kaksonen, M., Cusack, S., Ephrussi, A., Pillai, R.S., 2014. RNA clamping by Vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts. Cell 157, 1698-1711.

Xiong, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Xu, D., Qiu, D., 2013. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt Helicoverpa armigera development. Int J Biol Sci 9, 370-381.

Xu, H.J., Chen, T., Ma, X.F., Xue, J., Pan, P.L., Zhang, X.C., Cheng, J.A., Zhang, C.X., 2013a. Genome-wide screening for components of small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA) pathways in the brown planthopper, Nilaparvata lugens (Hemiptera: Delphacidae). Insect Mol Biol 22, 635-647.

Xu, J., Grant, G., Sabin, L.R., Gordesky-Gold, B., Yasunaga, A., Tudor, M., Cherry, S., 2012a. Transcriptional pausing controls a rapid antiviral innate immune response in Drosophila. Cell Host Microbe 12, 531-543.

Xu, J., Hopkins, K., Sabin, L., Yasunaga, A., Subramanian, H., Lamborn, I., Gordesky-Gold, B., Cherry, S., 2013b. ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 15025-15030.

Xu, J., Mon, H., Kusakabe, T., Li, Z., Zhu, L., Iiyama, K., Masuda, A., Mitsudome, T., Lee, J.M., 2013c. Establishment of a soaking RNA interference and Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV)-hypersensitive cell line using Bme21 cell. Appl Microbiol Biotechnol 97, 10435-10444.

Xu, J., Nagata, Y., Mon, H., Li, Z., Zhu, L., Iiyama, K., Kusakabe, T., Lee, J.M., 2013d. Soaking RNAi-mediated modification of Sf9 cells for baculovirus expression system by ectopic expression of Caenorhabditis elegans SID-1. Appl Microbiol Biotechnol 97, 5921-5931.

Xu, J., Cherry, S., 2014. Viruses and antiviral immunity in Drosophila. Developmental and comparative immunology 42, 67-84.

Xu, W., Han, Z., 2008. Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. J Insect Sci 8, 1-6.

Xu, Y., Fu, Q., Li, S., He, N., 2011. Silkworm egg proteins at the germ-band formation stage and a functional analysis of BmEP80 protein. Insect Biochem Mol Biol 41, 572-581.

Xu, Y., Zhou, W., Zhou, Y., Wu, J., Zhou, X., 2012b. Transcriptome and comparative gene expression analysis of Sogatella furcifera (Horvath) in response to southern rice black-streaked dwarf virus. PLoS One 7, e36238.

Xu, Y., Huang, L., Wang, Z., Fu, S., Che, J., Qian, Y., Zhou, X., 2014. Identification of Himetobi P virus in the small brown planthopper by deep sequencing and assembly of virus-derived small interfering RNAs. Virus Res 179, 235-240.

Xue, R., Hu, X., Cao, G., Huang, M., Xue, G., Qian, Y., Song, Z., Gong, C., 2014. Bmovo-1 regulates ovary size in the silkworm, Bombyx mori. PLoS One 9, e104928.

Yamaguchi, J., Mizoguchi, T., Fujiwara, H., 2011. siRNAs induce efficient RNAi response in Bombyx mori embryos. PLoS One 6, e25469.

Yang, C., Lin, Y., Liu, H., Shen, G., Luo, J., Zhang, H., Peng, Z., Chen, E., Xing, R., Han, C., Xia, Q., 2014a. The Broad Complex isoform 2 (BrC-Z2) transcriptional factor plays a critical role in vitellogenin transcription in the silkworm Bombyx mori. Biochimica et biophysica acta 1840, 2674-2684.

Yang, C., Lin, Y., Shen, G., Chen, E., Wang, Y., Luo, J., Zhang, H., Xing, R., Xia, Q., 2014b. Female qualities in males: vitellogenin synthesis induced by ovary transplants into the male silkworm, Bombyx mori. Biochem Biophys Res Commun 453, 31-36.

Yang, G., You, M., Vasseur, L., Zhao, Y., Liu, C., 2011. Development of RNAi in Insects and RNAi-Based Pest Control in: Stoytcheva, M. (Ed.), Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. InTech, pp. 27-38.

Yang, J., Cheng, Z., Zhang, S., Xiong, W., Xia, H., Qiu, Y., Wang, Z., Wu, F., Qin, C.F., Yin, L., Hu, Y., Zhou, X., 2014c. A cypovirus VP5 displays the RNA chaperone-like activity that destabilizes RNA helices and accelerates strand annealing. Nucleic Acids Res 42, 2538-2554.

Yang, J., Wang, X., Tang, S., Shen, Z., Wu, J., 2015. Peptidoglycan recognition protein S2 from silkworm integument: characterization, microbe-induced expression, and involvement in the immune-deficiency pathway. J Insect Sci 15.

Yang, Y., Wan, P.J., Hu, X.X., Li, G.Q., 2014d. RNAi mediated knockdown of the ryanodine receptor gene decreases chlorantraniliprole susceptibility in Sogatella furcifera. Pesticide biochemistry and physiology 108, 58-65.

Ye, X., Huang, N., Liu, Y., Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q., Zhang, H., 2011. Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. Nat Struct Mol Biol 18, 650-657.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 17, 3011-3016.

Yoda, S., Yamaguchi, J., Mita, K., Yamamoto, K., Banno, Y., Ando, T., Daimon, T., Fujiwara, H., 2014. The transcription factor Apontic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars. Nat Commun 5, 4936.

Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H., Smagghe, G., 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. Insect Sci 20, 4-14.

Yu, Q., Li, X.T., Liu, C., Cui, W.Z., Mu, Z.M., Zhao, X., Liu, Q.X., 2014. Evolutionarily conserved repulsive guidance role of slit in the silkworm Bombyx mori. PLoS One 9, e109377.

Yu, X., Jin, L., Zhou, Z.H., 2008. 3.88 A structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. Nature 453, 415-419.

Yu, X., Ge, P., Jiang, J., Atanasov, I., Zhou, Z.H., 2011. Atomic model of CPV reveals the mechanism used by this single-shelled virus to economically carry out functions conserved in multishelled reoviruses. Structure 19, 652-661.

Yu, X., Guo, C., Fisher, P.B., Subjeck, J.R., Wang, X.Y., 2015. Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. Advances in cancer research 128, 309-364.

Zaidman-Remy, A., Herve, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.S., Blanot, D., Oh, B.H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D., Lemaitre, B., 2006. The Drosophila amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. Immunity 24, 463-473.

Zambon, R.A., Vakharia, V.N., Wu, L.P., 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in Drosophila melanogaster. Cell Microbiol 8, 880-889.

Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R., 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. EMBO J 24, 138-148.

Zhang, C., Ruvkun, G., 2012. New insights into siRNA amplification and RNAi. RNA Biol 9, 1045-1049.

Zhang, H., Li, H.C., Miao, X.X., 2013. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. Insect Sci 20, 15-30.

Zhang, J., Khan, S.A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D.G., Bock, R., 2015. Pest control. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. Science 347, 991-994.

Zhang, P., Wang, J., Lu, Y., Hu, Y., Xue, R., Cao, G., Gong, C., 2014a. Resistance of transgenic silkworm to BmNPV could be improved by silencing ie-1 and lef-1 genes. Gene therapy 21, 81-88.

Zhang, S., Liu, X., Zhu, B., Yin, X., Du, M., Song, Q., An, S., 2014b. Identification of differentially expressed genes in the pheromone glands of mated and virgin Bombyx mori by digital gene expression profiling. PLoS One 9, e111003.

Zhang, S.D., Li, X., Bin, Z., Du, M.F., Yin, X.M., An, S.H., 2014c. Molecular identification of a pancreatic lipase-like gene involved in sex pheromone biosynthesis of Bombyx mori. Insect Sci 21, 459-468.

Zhang, X., Zhang, J., Zhu, K.Y., 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (Anopheles gambiae). Insect Mol Biol 19, 683-693.

Zhang, Z., Teng, X., Chen, M., Li, F., 2014d. Orthologs of human disease associated genes and RNAi analysis of silencing insulin receptor gene in Bombyx mori. Int J Mol Sci 15, 18102-18116.

Zhao, G.D., Huang, M.X., Zhang, Y.L., Wang, X.C., Du, J., Li, B., Chen, Y.H., Xu, Y.X., Shen, W.D., Wei, Z.G., 2014. Expression analysis and RNA interference of BmCarE-10 gene from Bombyx mori. Mol Biol Rep 41, 1607-1616.

Zhou, R., Czech, B., Brennecke, J., Sachidanandam, R., Wohlschlegel, J.A., Perrimon, N., Hannon, G.J., 2009. Processing of Drosophila endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. RNA 15, 1886-1895.

Zhou, X., Oi, F.M., Scharf, M.E., 2006. Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 4499-4504.

Zhou, X., Wheeler, M.M., Oi, F.M., Scharf, M.E., 2008. RNA interference in the termite Reticulitermes flavipes through ingestion of double-stranded RNA. Insect Biochem Mol Biol 38, 805-815.

Zhou, Y.R., Li, L.Y., Li, J.M., Sun, Z.T., Xie, L., Chen, J.P., 2016. ARGONAUTE SUBFAMILY GENES IN THE SMALL BROWN PLANTHOPPER, Laodelphax striatellus (HEMIPTERA: DELPHACIDAE). Arch Insect Biochem Physiol 91, 37-51.

Zhu, F., Xu, J., Palli, R., Ferguson, J., Palli, S.R., 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata. Pest Manag Sci 67, 175-182.

Zhu, J., Chen, L., Raikhel, A.S., 2003. Posttranscriptional control of the competence factor betaFTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito Aedes aegypti. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 13338-13343.

Zhu, J.Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J.Q., Qi, H.S., Wei, Z.J., Yao, Q., Zhang, W.Q., Li, S., 2012. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. PLoS One 7, e38572.

Zhu, L., Tatsuke, T., Mon, H., Li, Z., Xu, J., Lee, J.M., Kusakabe, T., 2013a. Characterization of Tudor-sn-containing granules in the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol 43, 664-674.

Zhu, L., Li, Z., Tatsuke, T., Cheng, D., Xu, J., Yoshimura, K., Mon, H., Iiyama, K., Lee, J.M., Xia, Q., Kusakabe, T., 2013b. Genome-wide identification of Argonaute 1- and Argonaute 2-regulating genes revealed an inhibition of macula-like virus by RNAi pathway in the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Biotech Seric, 19-23.

Zhu, L., Tatsuke, T., Xu, J., Li, Z., Mon, H., Lee, J.M., Kusakabe, T., 2015. Loqs depends on R2D2 to localize in D2 body-like granules and functions in RNAi pathways in silkworm cells. Insect Biochem Mol Biol 64, 78-90.

Zhu, M., Wang, J., Deng, R., Xiong, P., Liang, H., Wang, X., 2013c. A microRNA encoded by Autographa californica nucleopolyhedrovirus regulates expression of viral gene ODV-E25. J Virol 87, 13029-13034.

Zhuo, W., Fang, Y., Kong, L., Li, X., Sima, Y., Xu, S., 2014. Chitin synthase A: a novel epidermal development regulation gene in the larvae of Bombyx mori. Mol Biol Rep 41, 4177-4186.

Zografidis, A., Van Nieuwerburgh, F., Kolliopoulou, A., Apostolou-Karampelis, K., Head, S.R., Deforce, D., Smagghe, G., Swevers, L., 2015. Viral small RNA analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. J Virol.

Χαριζάνης, Π.Χ., 2006. Εγχειρίδιο Σηροτροφίας: Η εκτροφή του μεταξοσκώληκα. Η καλλιέργεια της μουριάς., in: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Σ.Ε. (Ed.), Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

CV

Άννα Ν. Κολλιοπούλου

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ:

Ημ. Γέννησης	27 / 1 / 1983
Πατρώνυμο	Νικόλαος
Διεύθυνση Οικίας	Κ. Λουκάρεως 75, Αθήνα, 114 75
Τηλέφωνο	Κινητό: 6936792709, Οικίας: 210 6411184
E-mail	a.kolliopoulou@bio.demokritos.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

2011-2016 **Υποψήφια διδάκτωρ Βιολογίας, *Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)***

Επιβλέποντες: Δρ. Δ. Ι. Στραβοπόδης (ΕΚΠΑ), Δρ. L. Swevers, Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων & Βιοτεχνολογίας, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών (ΙΒΕ), ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

- Θέμα Διατριβής: Μελέτη των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*): μια *in vitro* και *in vivo* προσέγγιση

2009 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία (Ειδίκευση: Μοριακή Οικολογία & Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών), *Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΓΠΑ)***

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Ε. Φλεμετάκης, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας ΓΠΑ

- Θέμα μελέτης: Μελέτη του μεταβολισμού του CO_2 στα φυμάτια του *Lotus japonicus*

2006 **Πτυχίο: Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, *Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ***

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Ε. Φλεμετάκης, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας ΓΠΑ

- Θέμα μελέτης: Μελέτη της ενσωμάτωσης ανόργανου άνθρακα σε συμβιωτικά και μη-συμβιωτικά όργανα του ψυχανθούς *Lotus japonicus* με τη χρήση σταθερών ισοτόπων άνθρακα

ΛΟΙΠΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

Δεκ. '10 - Φεβ. '11 ***ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»***

Ενημερωτική εργαστηριακή εξάσκηση (Rotation) στα εργαστήρια Χρονοβιολογίας, Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων & Εξωκυττάριου Χώρου, και Κυτταρικής Σηματοδότησης & Μοριακής Φαρμακολογίας

Ιούλ. '07 - Ιαν. '08 ***Τμήμα Έρευνας Λιπιδίων & Καρδιαγγειακής Επιδημιολογίας, IMIM (Instituto Municipal de Investigación Médica), PRBB, Βαρκελώνη, Ισπανία***

Πρακτική εξάσκηση με συμμετοχή στη μελέτη της επίδρασης της μεσογειακής διατροφής στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

Νοέ. '11 «Κοινωνία & Υγεία, με αναφορά στη συμβολή της Χημείας», Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)

Μάρ. - Μάι. '10 «Προχωρημένα μαθήματα σε θέματα Βιοχημείας, Βιοτεχνολογίας & Βιοϊατρικής», ΕΙΕ

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

Μάρ. - Νοέ. '10 ***Εκδόσεις «Φαρμακευτικός Κόσμος»***
Επιστημονική σύνταξη για την υποστήριξη/ενημέρωση ηλεκτρονικής φαρμακευτικής βιβλιοθήκης

Μάρ. - Ιούν. '09 ***Βοτανικός Κήπος Ι. & Α. Διομήδους***
Ξενάγηση και ενημέρωση των επισκεπτών του κήπου

Σεπ. '08 - Ιούν. '09 ***Εκδόσεις «ΙΩΝ»***
Μετάφραση του επιστημονικού βιβλίου: *"Food microbiology, An introduction"* (T. J. Montville, K. R. Matthews, ASM Press) από τα Αγγλικά στα Ελληνικά (Ελληνική έκδοση: Δεκ. '10)

Ιούλ. - Αύγ. '05 ***Τμήμα Αγροτικής Μηχανολογίας & Τεχνολογίας, Universidad Politécnica de Valencia, Ισπανία***
Πρακτική εξάσκηση με αντικείμενο τον έλεγχο της ορθής λειτουργίας και συντήρησης αγροτικού εξοπλισμού

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ:

2015 Από το 3^{ο} **Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων** για τη συμμετοχή στο 66^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας

2011-2014 Από το **ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»** για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής

2012 Από την **ΕΕΒΜΒ** για τη συμμετοχή στο 63^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας

2012 Από το **FEBS/IUBMB** για τη συμμετοχή στο 12º Young Scientists Forum και το συνέδριο 22^{ο} IUBMB/ 37^{ο} FEBS

2007 Από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα **Leonardo Da Vinci** σε νέους πτυχιούχους για την πραγματοποίηση 6μηνης πρακτικής εξάσκησης

2005 Από τον οργανισμό International Association for the Exchange of Students for Technical Experience (**IAESTE**) σε προπτυχιακούς φοιτητές για την πραγματοποίηση 2μηνης πρακτικής εξάσκησης

ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ:

- Τεχνολογία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, RT-PCR και qRT-PCR)
- Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων - πρωτεϊνών
- Απομόνωση ολικού RNA και DNA, και Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA
- Βασικές τεχνικές Μοριακής Γενετικής (Περιοριστική υδρόλυση πλασμιδιακού DNA, Αντίδραση σύνδεσης με φορέα κλωνοποίησης, και Βακτηριακός μετασχηματισμός)
- Ανάλυση αλληλούχισης DNA, Δευτερεύουσα ανάλυση αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS)
- Χειρισμός & διατήρηση κυτταρικών καλλιεργειών
- Διαμόλυνση κυτταρικών καλλιεργειών
- Ανοσοαποτύπωμα Western
- Ανοσοφθορισμός

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

Αγγλικά Άριστη γνώση *(Certificate of Proficiency in English, Michigan University)*

Ισπανικά Άριστη γνώση *(Diploma Superior de Español como Lengua Extranjera, Instituto Cervantes)*

Γερμανικά Καλή γνώση *(Zentrale Mittelstufeprüfung, Goethe Institut)*

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ:

Σεπ. - Δεκ. '09 Πιστοποίηση ECDL Core (Windows, Microsoft Office, Internet, e-mail)

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:

2015 Zografidis A., Van Nieuwerburgh F., **Kolliopoulou A.**, Apostolou-Karampelis K., Head S., Deforce D., Smagghe G. and Swevers L. Viral small RNA analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. J Virol. 89 (22): 11473-86.

2015 **Kolliopoulou A.**, Van Nieuwerburgh F., Stravopodis D.J., Deforce D., Swevers L. and Smagghe G. Transcriptome analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. PLoS ONE. 10 (3): e0121447.

2014 **Kolliopoulou A.** and Swevers L. Recent progress in RNAi research in Lepidoptera: intracellular machinery, antiviral immune response and prospects for insect pest control. Curr Opin Insect Science. 6: 28-34.

2014 Liu J., **Kolliopoulou A.**, Smagghe G. and Swevers L. Modulation of the transcriptional response of innate immune and RNAi genes upon exposure to dsRNA and LPS in silkmoth-derived Bm5 cells overexpressing BmToll9-1 receptor. Insect Physiol. 66: 10-19.

2014 Swevers L., **Kolliopoulou A.**, Li Z., Daskalaki M., Verret F., Kalantidis K., Smagghe G. and Sun J. Transfection of BmCPV genomic dsRNA in silkmoth-derived Bm5 cells: Stability and interactions with the core RNAi machinery. Insect Physiol. 64: 21-29.

2013 **Kolliopoulou A.** and Swevers L. Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkmoth Bm5 cells. Insect Biochem. Mol. Biol. 43 (8): 654-663.

2011 Fotelli M.N., Tsikou D., **Kolliopoulou A.**, Aivalakis G., Katinakis P., Udvardi M.K., Rennenberg H. and Flemetakis E. Nodulation enhances dark CO_2 fixation and recycling in the model legume *Lotus japonicus*. J. Exp. Bot. 62 (8): 2959-2971.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Προφορικές ανακοινώσεις

2014 **Kolliopoulou A.**, Van Nieuwerburgh F., Zografidis A., Stravopodis D.J., Deforce D., Swevers L., and Smagghe G. Transcriptome and small RNA analysis in silkmoth larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. 9th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, 17-23 Αυγούστου, Ορθόδοξος Ακαδημία Κρήτης (ΟΑΚ), Κολυμπάρι Κρήτης.

2012 **Kolliopoulou A.**, Iatrou K. and Swevers L. Functional analysis of the RNAi response in transfected silkmoth-derived Bm5 cells. 63° Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), 9-11 Νοεμβρίου, Ηράκλειο Κρήτης.

Αναρτημένες ανακοινώσεις

2015 **Kolliopoulou A.** and Swevers L. *Argonaute-3* knock-down increases expression of siRNA-related genes and persistence of Macula-like virus in *Bombyx* cells. 66° Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ & 3° Πανελλήνιο Forum Νέων Επιστημόνων, 10-13 Δεκεμβρίου, Αθήνα.

2015 Swevers L., Wynant N., Zografidis A., **Kolliopoulou A.**, Ioannidis K., Vanden Broeck J. and Smagghe G. The interaction of persistent Flock House Virus infection with the RNAi machinery in lepidopteran insect cell lines. 66° Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ, 11-13 Δεκεμβρίου, Αθήνα.

2015 Zografidis A., Van Nieuwerburgh F., **Kolliopoulou A.**, Apostolou-Karampelis K., Head S. R., Deforce D., Smagghe G. and Swevers L. Viral small RNA analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. Viruses & Cells, 21-26 Ιουνίου, Girona, Spain.

2014 Zografidis A., **Kolliopoulou A.**, Iatrou L., Swevers L. and Labropoulou V. The impact of PDV protein expression on the insect RNAi mechanism. 9th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, 17-23 Αυγούστου, ΟΑΚ, Κολυμπάρι Κρήτης.

2014 Swevers L., **Kolliopoulou A.**, Van Nieuwerburgh F., Deforce D. and Smagghe G. Analysis of the transcriptional response during cytoplasmic polyhedrosis virus infection in silkmoth larval midgut. Xth European Congress of Entomology, 3-8 Αυγούστου, York, UK.

2014 **Kolliopoulou A.**, Swevers L., Van Nieuwerburgh F., Deforce D. and Smagghe G. Transcriptional response and small RNA analysis during cytoplasmic polyhedrosis virus infection in silkmoth larval midgut. 7th International Symposium on Molecular Insect Science, 13-16 Ιουλίου, Amsterdam, The Netherlands.

2013 Swevers L., Van Nieuwerburgh F., **Kolliopoulou A.**, Sun J. and Smagghe G. Transcriptome and small RNA analysis of larval midgut tissue persistently and acutely infected by cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) in the silkmoth *Bombyx mori.* 38th FEBS Congress, 6-11 Ιουλίου, St. Petersburg, Russia.

2012 **Kolliopoulou A.**, Iatrou K., Sun J. and Swevers L. Persistent cypovirus infection in silkmoth larvae: Interactions with the RNAi machinery. 63ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ, 9-11 Νοεμβρίου, Ηράκλειο Κρήτης.

2012 **Kolliopoulou A.**, Iatrou K. and Swevers L. Small RNA pathways in *Bombyx mori*: an *in vitro* and *in vivo* approach. Young Scientists Program & 22nd IUBMB/ 37th FEBS Congress, 1-9 Σεπτεμβρίου, Rota & Sevilla, Spain.

2012 **Kolliopoulou A.**, Iatrou K., Sun J. and Swevers L. Interactions between cypovirus infection and the RNAi machinery in silkmoth and silkmoth-derived Bm5 cells. 22nd IUBMB/ 37th FEBS Congress, 4-9 Σεπτεμβρίου, Sevilla, Spain.

2012 **Kolliopoulou A.,** Liu J., Huvenne H., Iatrou K., Smagghe G. and Swevers L. Dissection of the function of the RNAi response in the silkmoth and the silkmoth-derived Bm5 cell line. 13th International Conference on Invertebrate and Fish Cell Culture, World Congress on *In vitro* Biology, 3-7 Ιουνίου, Bellevue, Washington, USA.

2012 **Kolliopoulou A.**, Iatrou K. and Swevers L. Functional Genomics of dsRNA-Mediated Gene Silencing in Transfected Silkmoth-derived Bm5 Cells. 6th Annual Arthropod Genomics Symposium & i5k Community Workshop, 30 Μαΐου-2 Ιουνίου, Kansas, USA.

2011 Swevers L., **Kolliopoulou A.**, Liu J., Huvenne H. and Smagghe G. Small RNA pathways in the silkmoth-derived Bm5 cell line. 6th International Symposium on Molecular Insect Science, 2-5 Οκτωβρίου, Amsterdam, The Netherlands.

2007 Tsikou D., Fotelli M.N., Nikolopoulos D., **Kolliopoulou A.**, Katinakis P. and Flemetakis E. Dark CO_2 fixation in symbiotic nodules: A job for carbonic anhydrases? 59ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΒΜΒ, 7-9 Δεκεμβρίου, Αθήνα.

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ ΤΟΥ ΙΒΕ (ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»):

2015 Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. (Βιβλιογραφικό σεμινάριο)

2014 Ανάλυση της μεταγραφικής απόκρισης και των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* κατά τη διάρκεια μόλυνσής του από τον ιό BmCPV. (Ερευνητικό σεμινάριο)

2013 RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. (Βιβλιογραφικό σεμινάριο)

2012 Μελέτη των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA στο μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*): μια *in vitro* και *in vivo* προσέγγιση (Ερευνητικό σεμινάριο)

2011 Cell-specific RNA interference by peptide-inhibited-peptidase-activated siRNAs. (Βιβλιογραφικό σεμινάριο)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΙ ΣΥΛΛΟΓΟΙ:

- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ)
- Μέλος του Γεωτεχνικού Επιμελητηρίου Ελλάδος (ΓΕΩΤΕΕ)

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ:

- Μουσική: Βιολί, Πιάνο, Πτυχίο Ειδικού Αρμονίας
- Σύγχρονος χορός, Pilates, Τέννις

Author's personal copy

Insect Biochemistry and Molecular Biology 43 (2013) 654–663

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmb

Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkmoth Bm5 cells

Anna Kolliopoulou, Luc Swevers*

Insect Molecular Genetics and Biotechnology Group, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Neapoleos & Patriarchou Grigoriou, 153 10, Aghia Paraskevi Attikis, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 April 2013
Accepted 1 May 2013

Keywords:
Bombyx mori
Lepidoptera
Insect
RNA interference
dsRNA
Small RNAs

ABSTRACT

Experiments of dsRNA-mediated gene silencing in lepidopteran insects *in vivo* are characterized by high variability although lepidopteran cell cultures have shown an efficient response to RNAi in transfection experiments. In order to identify the core RNAi factors that regulate the RNAi response of Lepidoptera, we employed the silkmoth ovary-derived Bm5 cells as a test system since this cell line is known to respond potently in silencing after dsRNA transfection. Two parallel approaches were used; involving knock-down of the core RNAi genes or over-expression of the main siRNA pathway factors, in order to study possible inhibition or stimulation of the RNAi silencing response, respectively. Components from all three main small RNA pathways (BmAgo-1 for miRNA, BmAgo-2/BmDcr-2 for siRNA, and BmAgo-3 for piRNA) were found to be involved in the RNAi response that is triggered by dsRNA. Since BmAgo-3, a factor in the piRNA pathway that functions independent of Dicer in *Drosophila*, was identified as a limiting factor in the RNAi response, sense and antisense ssRNA was also tested to induce gene silencing but proved to be ineffective, suggesting a dsRNA-dependent role for BmAgo-3 in *Bombyx mori*. After efficient over-expression of the main siRNA factors, immunofluorescence staining revealed a predominant cytoplasmic localization in Bm5 cells. This is the first study in Lepidoptera to provide evidence for possible overlapping of all three known small RNA pathways in the regulation of the dsRNA-mediated silencing response using transfected *B. mori*-derived Bm5 cells as experimental system.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gene silencing initiated by double-stranded RNA (dsRNA) molecules is an experimental approach that has been well established during the past 15 years and is now termed RNA interference (RNAi). Since its discovery (Fire et al., 1998), a new field on biological research has started to develop, as RNAi is considered a promising tool of reverse genetics with valuable applications including insect pest control (Burand and Hunter, 2012; Swevers and Smagghe, 2012). However, the success of experiments involving RNAi is not always guaranteed. As for insects, much information has been collected concerning the variability of the efficiency of RNAi that depends on species-, tissue- and gene-specific factors (Belles, 2010). Especially for Lepidoptera, while efficiency after transfection of dsRNA or shRNA expression plasmids in cell culture is high (Kim et al., 2012; Swevers et al., 2011; Tanaka et al., 2009), experiments involving *in vivo* silencing present high inconsistency (Swevers and Smagghe, 2012; Terenius et al., 2011).

Among insects, the RNAi machinery has been well analyzed in *Drosophila*, where three pathways have been uncovered. A basic characteristic of the RNAi process is the generation of small RNA molecules (~20–30 nucleotides), which are classified as microRNAs (miRNAs), short-interfering RNAs (siRNAs) and PIWI-interacting RNAs (piRNAs), depending on their sequence, structure, biogenesis and mechanism of action. These small RNAs are able to act with high specificity by identifying and silencing target genes that possess complementary sequences (Obbard et al., 2009). Both miRNA and siRNA pathways are triggered by precursor molecules with dsRNA structures that constitute substrates of ribonuclease-III-type enzymes (dsRNA-specific nucleases), called Dicers (Jinek and Doudna, 2009). Fragmentation of longer dsRNA molecules caused by Dicers associated with dsRNA-binding proteins (Drosha/Pasha and Dcr-1/Loqs for miRNAs; Dcr-2/R2D2 for siRNAs) results in the production of small RNAs (Siomi and Siomi, 2009; Tomari et al., 2007). Differences in the intrinsic structure of the miRNA and siRNA duplexes are critical for the sorting to the respective Argonaute-containing RNA-induced silencing complex

* Corresponding author. Tel.: +30 210 6503681; fax: +30 210 6511767.
E-mail address: swevers@bio.demokritos.gr (L. Swevers).

0965-1748/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.05.001

Author's personal copy

(Ago-1/RISC or Ago-2/RISC, respectively) (Tomari et al., 2007). Subsequently, the transcriptome is screened by Ago-RISC in order to detect target sequences (Siomi and Siomi, 2009) and efficiently silence them by deadenylation leading to translational repression (miRNA pathway) or by direct degradation (siRNA pathway) (Jinek and Doudna, 2009). Regarding the piRNA pathway, for which Dicer enzymes are dispensable, it has been reported to act as a guard in the germline against transposons (Vagin et al., 2006). In this case, the precursor molecules have been identified as single-stranded transcripts that are processed to "primary" piRNAs in a Dicer-independent manner by an unknown mechanism. In the germline, piRNAs loaded on Argonaute proteins of the PIWI clade (i.e. PIWI, Aubergine and Argonaute-3 proteins in *Drosophila*) can function to cleave sense and antisense transcripts at complementary sites to generate "secondary" piRNAs and to amplify the RNAi response ("ping-pong" model) (Ghildiyal and Zamore, 2009; Jinek and Doudna, 2009).

Apart from the variation in their biogenesis, in *Drosophila* the miRNA and siRNA pathways also seem to differentiate in terms of their functional roles. Recently, it was shown that Ago-2, Dcr-2 and R2D2 belong to the top 3% of fastest evolving genes, in sharp contrast to the miRNA pathway genes (Obbard et al., 2006). Moreover, viral suppressors of RNAi (VSRs) have been identified that inhibit efficiently the siRNA, but not the miRNA pathway (Berry et al., 2009; Li et al., 2002; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006). *Drosophila* siRNA pathway mutants are highly susceptible to viral infections that result in high viral titers compared with wild-type as well as in the detection of viral siRNAs (Kemp and Imler, 2009). All the above add evidence to the importance of the siRNA pathway for the defense against invading nucleic acids with dsRNA structure (Ding and Voinnet, 2007). MiRNAs, on the other hand, are produced from endogenous genes and are involved in the regulation of physiological and developmental processes through translational inhibition of target mRNAs with complementary sites. Regarding the piRNA pathway, while its role in silencing of transposons in the germline is well established (Vagin et al., 2006), recent studies have also identified virus-derived small RNAs with piRNA size in insects, thus implicating a possible role of this pathway too in the defense against viral attackers (Brackney et al., 2010; Chotkowski et al., 2008; Hess et al., 2011; Scott et al., 2010; Vodovar et al., 2012; Wu et al., 2010).

In contrast to *Drosophila*, no detailed characterization of the mechanism of dsRNA-mediated gene silencing has been carried out in other insects. Nevertheless, from the literature it is clear that great differences can exist among insects regarding RNAi efficiency, at least in *in vivo* experiments. In coleopteran insects, injection of dsRNA to induce gene silencing has proven to be very efficient (Tan and Palli, 2008a, b; Zhu et al., 2011), while in Lepidoptera, such as the silkmoth *Bombyx mori*, the RNAi response is considered much less robust (Terenius et al., 2011). This raises the question regarding the limiting factors that contribute to the sensitivity/resistance of insects to RNAi. Limiting factors could act at several levels, such as dsRNA uptake and premature degradation, but of relevance might also be differences in the function of the intracellular RNAi machinery among insects. Recently, it was shown that the mRNAs of all core genes involved in the siRNA and the miRNA pathway are expressed in larval and pupal tissues of *B. mori*, with the exception of *BmR2D2* mRNA, which encodes a dsRNA-binding protein (Swevers et al., 2011). This finding raised questions, since in *Drosophila*, *r2d2* was identified as an essential gene for RNAi (cofactor of Dicer-2) as well as for the immune defense against RNA virus (Liu et al., 2003). However, despite the complete deficiency of silkworm ovary-derived Bm5 cells in *BmR2D2* expression, cell culture experiments that involved dsRNA-mediated gene silencing by transfection were very successful, possibly implying that there might exist an alternative silencing mechanism that does not require the expression of BmR2D2 (Swevers et al., 2011). This example illustrates that differences can occur in the composition of the intracellular RNAi machinery among insects, some of which may have relevance to the question of RNAi efficiency in *in vivo* gene silencing experiments.

In order to elucidate the key factors that regulate the RNAi response in *B. mori*, an adequate study system should be selected. The silkworm ovary-derived Bm5 cell line (Grace, 1967) can be efficiently transfected and transformed (Swevers et al., 2004); moreover, as already mentioned, Bm5 cells present the advantage to respond potently through the RNAi mechanism after transfection of dsRNA, and to express the majority of the mRNAs of the core genes involved in the miRNA and the siRNA pathways (Swevers et al., 2011), as well as the piRNA pathway (*BmAgo-3* and *BmSiwi*; Suppl. Fig. 1).

In the present study, first we performed an "RNAi-of-the-RNAi" assay for the core RNAi factors of *B. mori*, which revealed the involvement of four RNAi genes (*BmDcr-2*, *BmAgo-1*, *BmAgo-2* and *BmAgo-3*) belonging to all three small RNA pathways. The unexpected finding of *BmAgo-3* being involved in the RNAi response was further investigated by attempting to silence the reporter gene via employment of single-stranded sense or antisense specific RNAs. Because of the low response to ssRNA, the experiments point to a possible dsRNA-dependent function of BmAgo-3 in *B. mori*. In a reciprocal experimental approach, in which the main siRNA proteins were over-expressed, stimulating effects on dsRNA-mediated gene silencing were observed for BmDcr-2 and BmAgo-2. The three main siRNA factors, as well as the auxiliary factor BmTranslin-2, were efficiently over-expressed as recombinant proteins and were knocked-down only by gene-specific dsRNAs, confirming thus the efficiency and specificity of the RNAi assays. Finally, immunostaining of the over-expressed RNAi proteins confirmed the cytoplasmic role of all siRNA proteins in Bm5 cells.

2. Materials and methods

2.1. RNA extraction and reverse-transcription (RT-PCR)

Total RNA was extracted from silkworm (*B. mori*) tissues by use of TRI Reagent (Ambion), according to the manufacturer's instructions, and the quality/quantity of the RNA was estimated with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Then, 1 μg of RNA was used for first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis using RevertAid reverse transcriptase (Fermentas) and oligo-[dT] primer, according to standard protocol (Drevet et al., 1995).

2.2. Cloning of fragments of RNAi genes in pLitmus vector

For dsRNA synthesis, fragments of genes of the core RNAi machinery were cloned in pLitmus vector (New England Biolabs; 28i or 38i) in which the polylinker region is flanked by T7 polymerase promoter sites for RNA synthesis (Evans et al., 1995). cDNAs from silkmoth tissues served as templates for amplification of fragments representing genes of the RNAi machinery by PCR (Table 1). Gene-specific primers, spanning at least one intron, for amplification of *BmDcr-1*, *BmLoqs*, *BmAgo-1*, *BmDcr-2*, *BmR2D2*, *BmAgo-2*, *BmTranslin* and *BmTrax-B* are described in Swevers et al. (2011) (used in that work to check expression levels of the genes in various tissues). Primer pairs for amplification of *BmAgo-3* and *BmAub* were 5′-CGAAACTGCCAAGAGTCGTC-3′ (forward)/5′-TAATGGCCGCGTATCT GTCG-3′ (reverse) and 5′-AATACCCTGCAGGAGACACC-3′ (forward)/ 5′-GCTACTCATGTTACGAGCGC-3′ (reverse), respectively. An overview of the amplified fragments used for cloning in pLitmus vectors

Author's personal copy

Table 1
The fragments belonging to *Bombyx mori* RNAi genes that were cloned in pLitmus vector.

Gene	Accession number	Small RNA pathway	pLitmus vector	Insert size (bp)	Position in relation to ATG start codon
BmAgo-1	AB332314	miRNA	38i	444	1508–1951
BmAgo-2	NP_001036995	siRNA	38i	370	1150–1519
BmAgo-3	NM_001104597.2	piRNA	28i	425	1485–1909
BmAub	NM_001104596.2	piRNA	38i	383	1514–1896
BmDcr-1	Sequence not annotated[a]	miRNA	38i	266	–
BmDcr-2	NM_001193614	siRNA	38i	449	3903–4351
BmLoqs	NM_001195079	miRNA	38i	500	238–735
BmR2D2	NM_001195078	siRNA	28i	497	−4–493
BmTranslin	NM_001046817	auxiliary factor	38i	397	262–652
BmTrax-B	Sequence not annotated[a]	auxiliary factor	38i	362	–

[a] These inserts were selected after alignment of the respective *Drosophila* genes with Kaikoblast silkworm database (Swevers et al., 2011), since BmDcr-1 and BmTrax-B have not yet been annotated in GenBank.

is presented in Table 1. PCR reactions were carried out using *Taq* DNA polymerase (HyTest) using the following program: template cDNA denaturation step at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 45 s and 72 °C for 30 s. The final elongation step took place at 72 °C for 7 min. For *BmR2D2* amplification, the above mentioned program was modified by using 55 °C as annealing temperature and the application of 40 cycles. All PCR products were sequenced to verify their identity (Suppl. Data here, and in Swevers et al. (2011)).

For cloning in pLitmus 38i, the PCR products were purified and phosphorylated by T4 polynucleotide kinase (Fermentas) for 1 h at 37 °C, blunted by T4 DNA polymerase (Fermentas) and used for ligation into the *Eco*RV restriction site of the plasmid. For cloning in pLitmus 28i, the PCR products were first cloned in pGEM-T Easy vector (Promega). After digestion at the two *Eco*RI sites of the vector, the fragments with two *Eco*RI ends were excised, purified and subcloned in the respective site of pLitmus 28i vector. The pLitmus 28i vector for production of dsRNA specific for the maltose-binding protein of *Escherichia coli* (*mal*E; used as negative control in the experiments) (Zhu et al., 2011) was obtained after subcloning of a 753 bp *Bgl*II-*Sac*I fragment from the pMAL-2C vector (NEB).

2.3. Expression constructs

In order to create expression constructs for BmAgo-2 and BmR2D2, the ORFs of *BmAgo-2* and *BmR2D2* were amplified by PCR from silkmoth epidermis cDNA and pENTR11-R2D2 vector (kindly provided by Professor T. Kusakabe, Kyosho University, Fukuoka, Japan), respectively. For *BmAgo-2*, the forward primer 5′-AGTA**AGATCT***CACC*ATGGCTAGAGGAAAAAACAAAGG-3′ and the reverse primer 5′-TATA**AGATCT**GACGAAGAACATACGGCTCTGTTTC-3′ were used for amplification and cloning in pEA-MycHis lepidopteran expression vector (Douris et al., 2006). *BmR2D2* was cloned in the same vector, after amplification with the forward primer 5′-CCA-T**AGATCT***CAAC*ATGAAAACTCCCATAACAGTACTG-3′ and the reverse primer 5′-CCAT**AGATCT**CAGAGCGGCGGGCGGCGGA-3′. All the above mentioned primers contain a *Bgl*II cloning site (bold). Moreover, each forward primer contains a Kozak initiation sequence (italics; Kozak, 1987) and an ATG start codon (underlined), while each reverse primer is appropriately designed for in-frame cloning with the C-terminal MycHis tag of the pEA-MycHis vector (to generate pEA-BmAgo-2-MycHis and pEA-BmR2D2-MycHis expression vectors). Both vectors containing the ORFs of *BmAgo-2* and *BmR2D2* were verified by sequencing. The construction of pEA-BmTranslin-2-MycHis has previously been described in detail (Swevers et al., 2011), while pEA-Myc-BmDcr-2 was constructed after subcloning of the BmDcr-2 ORF from the pEA-Flag-Dcr-2 vector (Liu et al., 2012).

2.4. Synthesis of dsRNA

Each pLitmus construct (Table 1) containing an ORF fragment (266-500 bp) of the RNAi genes or *mal*E control was subjected to linearization in two separate reactions using different restriction enzymes that cut at either side of the insert. Thus, 38i-BmAgo-1, 38i-BmAub, 38i-BmDcr-1, 38i-BmDcr-2, 38i-BmLoqs, 38i-BmTranslin, 38i-BmTrax-B and 28i-BmR2D2, were linearized with *Bam*HI or *Hind*III, while 38i-BmAgo-2 was digested with *Bam*HI or *Mfe*I. Moreover, 28i-BmAgo-3 and 28i-MalE were digested with *Bgl*II or *Stu*I. Each linearized vector was used as template for single stranded RNA (ssRNA) synthesis by use of T7 RNA polymerase (Fermentas). After checking of the quality/quantity of RNA synthesis by 1% agarose gel electrophoresis and digestion of the template DNA with RNase-free DNase I (Fermentas), the synthesized ssRNAs were subjected to phenol/chloroform extraction and 70% ethanol precipitation. Finally, the ssRNAs were resuspended in annealing buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA), mixed and each complementary pair was allowed to anneal by heating at 95 °C for 2 min followed by slowly cooling down to room temperature. The final dsRNA concentration was assessed by 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining by comparing to known amounts of λ DNA marker (*Hinc*II/*Hind*III digest).

2.5. Cell culture and transient transfection experiments

The ovary-derived Bm5 cell line (Grace, 1967) was maintained at 28 °C in IPL-41 insect cell culture medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma–Aldrich) and subcultured weekly as previously reported (Douris et al., 2006). Bm5 cells were transfected according to established protocols (Johnson et al., 1992) using Escort IV (Sigma). After transfection the medium was replaced by fresh medium containing gentamycin (50 μg/ml).

2.6. RNAi luciferase functional assays

The general protocol for RNAi functional assays was carried out as reported earlier (Swevers et al., 2011) (see outline in Fig. 1). Briefly, for RNAi inhibition experiments, Bm5 cells were transfected with 3.3 μg/ml of ecdysone-responsive luminescence reporter pEcRE.bA.luc (Soin et al., 2008), 0.17 μg/ml of ecdysone-responsive fluorescence reporter pEcRE.bA.gfp (Swevers et al., 2004), as well as with 1.3 μg/ml of RNAi gene-specific dsRNA. DsMalE, which is specific for maltose binding protein mRNA of *E. coli* (Zhu et al., 2011), was used as non-specific control dsRNA. Moreover, all samples, except control dsMalE- (Fig. 2a and b), were transfected with 0.33 μg/ml of luciferase specific dsRNA (dsLuc) (Swevers et al., 2011).

For antisense inhibition luciferase functional assay, the concentrations of nucleic acids used were modified as follows: 1.7 μg/ml of pEcRE.bA.luc, 0.17 μg/ml of pEcRE.bA.gfp, as well as a total of 3.3 μg/ml of ssRNA or dsRNA. DsLuc was applied at 0.17 μg/ml.

Similarly, for siRNA pathway stimulation experiments (see outline in Fig. 1), 0.9 μg/ml of pEcRE.bA.luc, 0.2 μg/ml of pEcRE.bA.gfp and 0.9 μg/ml of pEA vector (pEA-BmAgo-2-MycHis, pEA-Myc-BmDcr-2, pEA-BmR2D2-MycHis or pEA-pac, that contains the ORF of puromycin resistance gene and was used as negative control) were applied. Moreover, dsLuc was applied at increasing concentrations from 3.125 to 50 ng/ml, where total dsRNA concentration (balanced by dsMalE) was always 50 ng/ml.

Author's personal copy

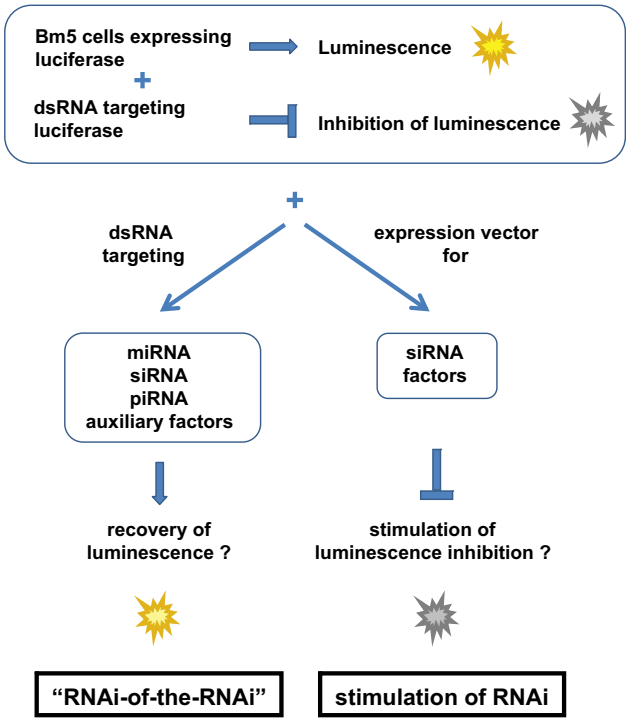


Fig. 1. Schematic overview of the RNAi inhibition ("RNAi-of-the-RNAi") and stimulation experiments. Luminescence production by Bm5 cells transfected with luciferase expression vector is suppressed by dsRNA specific for luciferase. For "RNAi of the RNAi" experiments (left), dsRNAs targeting each one of the RNAi factors were co-introduced by transfection, and luminescence was measured. Recovery of luminescence (reflecting inhibition of luciferase silencing) would reveal that the RNAi mechanism had been inhibited due to the dsRNA-mediated targeting of a core RNAi factor. For siRNA pathway stimulation experiments (right), constructs expressing each one of the main siRNA factors were co-introduced by transfection, and luminescence was measured. Decrease of luminescence levels (reflecting further increase of luciferase silencing) would reveal that the RNAi mechanism had been stimulated due to the enhanced expression of a core RNAi factor.

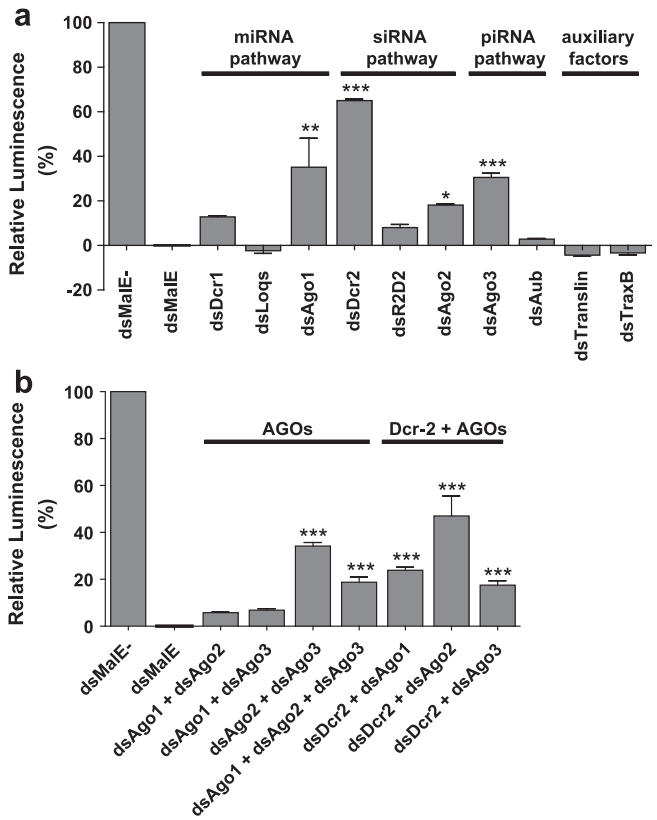


Fig. 2. "RNAi of the RNAi" luciferase functional assay targeting individually key components of the miRNA, siRNA and piRNA pathways, as well as auxiliary factors (a), and combinations of the top-four RNAi factors identified in the single gene targeting experiments (b). The graphs depict mean values of the % relative luminescence produced from three biological replications (+SE) after transfection with dsRNA. Each bar is presented as % ratio of the difference between the negative control for dsLuc (dsMalE-; set to 100%) and the positive control (dsMalE; set to 0%). Statistical analysis refers to the comparison of the average value ($n = 3$) of each treatment with the average of the positive control (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$).

For any of the three types of luciferase assay, 48 h post-transfection, the ecdysone agonist RH-5992 (Rohm and Haas Co; Swevers and Iatrou, 1999) was added to a final concentration of 500 nM to induce the ecdysone reporter element (EcRE) of luciferase and gfp reporters, and cells were harvested 24 h later. To obtain the soluble cellular extracts of transfected cells, the samples were processed as described before (Swevers et al., 2011) and placed in a 96-well plate for measurement first of fluorescence and then, after addition of Steady-Glo Luciferase substrate (Promega), of luminescence, carried out by an Infinite M200 fluoro-/luminometer (Tecan). Then, luminescence and fluorescence values obtained for control cells (i.e. untransfected) were subtracted from the respective values of the treated cells, thus yielding absolute luminescence and fluorescence values. Afterward, the normalized relative luminescence was calculated by division of the absolute luminescence by absolute fluorescence. GraphPad Prism 4 software was employed for the One Way ANOVA analysis for the samples of RNAi and antisense inhibition assays (with Tukey's Multiple Comparison Test as post-hoc test), and for the Two Way ANOVA analysis for the siRNA pathway stimulation assay (with Bonferroni's Multiple Comparison Test as post-hoc test).

2.7. Protein extracts preparation and immunoblottings

For protein expression studies, 2 μg/ml of pEA-BmAgo-2-MycHis, pEA-Myc-BmDicer-2, pEA-BmR2D2-MycHis or pEA-BmTranslin-2-MycHis expression vectors together with 0.55 μg/ml of pBmIE1 helper plasmid encoding the *ie-1* gene for *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) (Lu et al., 1997) were used in transfection. For the dose-dependence experiments increasing concentrations of specific dsRNA from 0.55 to 1.65 μg/ml were additionally transfected, where total dsRNA concentration (balanced by dsMalE) was maintained at 1.65 μg/ml, while in the experiments that checked for dsRNA specificity 1.3 μg/ml of dsRNA was applied (same as in RNAi inhibition assay described in § 2.6). For the above experiments, 2.5 to 3 × 10^5 cells were seeded on 24-well plates, transfected and harvested 48 h post-transfection. Cells expressing BmAgo-2, BmDcr-2, BmR2D2 or BmTranslin-2 were centrifuged at 3,000 g for 5 min and cell pellets were resuspended in 100 μl of phosphate-buffered saline (PBS) and frozen at −70 °C for 30 min. For the separation of the soluble protein fraction from the insoluble pellet, samples were subsequently centrifuged at 12,000 g for 10 min. Total protein extracts or soluble/insoluble fractions were diluted in 100 μl of cracking buffer (0.125 M Tris–HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS, 4M urea) (Georgomanolis et al., 2009) and boiled at 95 °C (5 min for soluble, 15 min for insoluble fractions and 10 min for total protein extracts). After addition of 6× SDS/PAGE loading buffer to 25 μl of each sample, all protein fractions were electrophoresed on 10% polyacrylamide gels and subjected to Western blot analysis as described (Georgomanolis et al., 2009). Proteins were transferred to Hybond ECL membranes (Amersham) and the membrane was blocked with 10% non-fat milk. Western blot analysis was carried out using mouse anti-Myc (Cell Signaling;

Author's personal copy

at 1:1000) as primary antibody and HRP-conjugated anti-mouse antibody (Chemicon; at 1:2000). For loading control, alpha tubulin was detected with rat anti-alpha Tubulin HRP-conjugated antibody (AbD Serotec; at 1:800). ECL chemiluminescent substrate (Amersham) was used for chemiluminescence detection.

2.8. Immunofluorescence assay

Bm5 cells were stained using immunofluorescence protocols described previously (Labropoulou et al., 2008). Briefly, transfection of pEA and pBmIE1 vectors took place as described in § 2.7. Then, 48 h after transfection cells were washed with basal IPL-41 (Invitrogen) and incubated for 2 h at room temperature on poly-L-lysine coated slides (Thermo Scientific). Phosphate buffered saline (PBS) was used to wash the samples following each step of immunostaining process. Cell membranes were stained with 5 μg/ml of wheat germ agglutinin (WGA) Texas Red-X conjugate (Molecular Probes) at 28 °C for 10 min. After fixation in 3.7% v/v formaldehyde-PBS solution for 10 min and cellular membrane permeabilization in 0.1% v/v Triton X 100-PBS, blocking was carried out with 3% w/v BSA-PBS for 1 h. Subsequently, the cells were incubated first with anti-Myc (Cell Signaling) for 16 h at 4 °C and then with anti-mouse FITC antibody (Sigma–Aldrich) for 1 h at room temperature in darkness, both diluted at 1:200 in 1% w/v BSA-PBS. Nuclei were stained with DAPI for 5 min (Sigma–Aldrich; at 0.5 μg/ml in PBS), and finally samples were mounted in Mowiol 4-88 (Sigma). Samples were examined under a BIORAD MRC 1024 laser scanning confocal microscope equipped with a Laser Sharp Version 3.2 Bio-Rad software. All images were analyzed with ImageJ software (Abramoff et al., 2004).

3. Results

3.1. Involvement of all three main small RNA pathways in the dsRNA-mediated silencing mechanism of Bm5 cells

To gain insight into the identity of the main factors that constitute the RNAi machinery in *B. mori*, genes from all three known small RNA pathways were screened using the "RNAi of the RNAi" approach (Dorner et al., 2006; Hoa et al., 2003; Saleh et al., 2006). In this approach, dsRNAs are employed that specifically target each one of the RNAi genes under investigation, in combination with the silencing of the transfected luciferase reporter (carried out by co-transfected dsLuc; Fig. 1). The targets included the basic genes from the miRNA, siRNA and piRNA pathways, such as Dicer and Argonaute proteins, as well as dsRNA-binding proteins and other auxiliary factors (Table 1). Thus, it was hypothesized that after knocking-down a key gene of the *Bombyx* RNAi machinery, the silencing of luciferase gene would also be inhibited and this effect could be assessed by changes in the luminescence produced.

It was observed that blocking of several key genes that belong to all three main small RNA pathways was able to significantly inhibit the silencing process. The major inhibition of the dsRNA-mediated gene silencing was caused after inhibition of *BmDicer-2* from the siRNA pathway (65.1%, Fig. 2a, Table 2a). Lower but statistically significant rates of inhibition of the RNAi mechanism were observed for three Argonaute proteins belonging to miRNA, siRNA and piRNA pathways (*BmAgo-1*, *BmAgo-2* and *BmAgo-3*, respectively, with rates varying from 18.1 to 35.2%; Fig. 2a, Table 2a). In contrast to the other Argonautes, *BmAub* (homologue of *Drosophila* Aubergine; also known as *BmSiwi* (Kawaoka et al., 2009), piRNA pathway) was the only Argonaute gene for which inhibition of expression did not cause inhibition of gene silencing. Targeting of *BmR2D2* did not cause any inhibitory effect to the dsRNA-mediated silencing, an observation that was expected since it has been found that *BmR2D2* is not expressed in Bm5 cells (Swevers et al., 2011).

Table 2
Normalized % relative luminescence of "RNAi of the RNAi" luciferase functional assays of Bm5 cells presented in Fig. 2. Mean values (±SE) of the % relative luminescence (normalized against fluorescence) produced from three biological replications after transfection with dsRNA are shown. Each value is presented as % ratio of the difference between the % relative luminescence of the negative control for dsLuc (dsMalE-; set to 100%) and the positive control (dsMalE; set to 0%).

	dsRNA	Normalized RL (%)
a		
miRNA	Dcr-1	12.83 ± 0.48
	Loqs	−2.33 ± 1.21
	Ago-1	35.16 ± 12.96
siRNA	Dcr-2	65.06 ± 0.73
	R2D2	8.03 ± 1.46
	Ago-2	18.14 ± 0.49
piRNA	Ago-3	30.54 ± 1.88
	Aub	2.84 ± 0.35
Auxiliary factors	Translin	−4.39 ± 0.48
	Trax-B	−3.37 ± 0.86
b		
AGOs	Ago-1 + Ago-2	5.81 ± 0.20
	Ago-1 + Ago-3	6.89 ± 0.54
	Ago-2 + Ago-3	34.20 ± 1.54
	Ago-1 + Ago-2 + Ago-3	18.82 ± 2.23
Dcr2+ AGOS	Dcr-2 + Ago-1	23.90 ± 1.34
	Dcr-2 + Ago-2	47.00 ± 8.57
	Dcr-2 + Ago-3	17.57 ± 1.77

Subsequently, to see whether inhibition of key genes in different small RNA pathways could lead to synergistic effects, Bm5 cells were also transfected with various combinations of the four RNAi-specific dsRNAs that were previously found to have caused significant inhibition of the silencing process (i.e. *BmDcr-2*, *BmAgo-1*, *BmAgo-2* or *BmAgo-3*). Interestingly, the highest inhibitory effect of combined RNAi machinery silencing was observed when *BmDcr-2* and *BmAgo-2* (corresponding to the siRNA pathway) were concomitantly targeted (47%, Fig. 2b, Table 2b).

Results showed that transfection with dsRNAs specific for these key four genes in pairs or triads, caused generally lower inhibiting effect on the luciferase silencing compared to the inhibition caused when applied alone (Fig. 2b, Table 2b). This may be explained by the fact that the amount of the transfected dsRNA became limiting for individual genes when combinations of genes were assayed (2–3 fold less than the amount in single targeting experiments). It is noted that such inhibition of RNAi efficiency after administration of multiple dsRNAs was also observed in gene silencing experiments employing other insects, such as the cockroach (Mané-Padrós et al., 2008).

3.2. Efficiency and specificity of dsRNA-mediated knock-down of RNAi factors in Bm5 cells

A major issue regarding the RNAi-of-the-RNAi experiments described above relates to the efficiency and specificity of the knock-down of the targeted RNAi factors. In most studies, RNAi efficiency is usually determined by quantification of target mRNA levels by quantitative real-time RT-PCR after treatment, while specificity is assessed by employment of an unrelated dsRNA, for instance dsGFP (as an example of this approach: Wynant et al. (2012)). While this approach is feasible in experiments were dsRNA is taken up efficiently by tissues, it is not a good choice in transfection experiments that are characterized by limitations in transfection efficiency (approximately 30% in Bm5 cells; unpublished results). Even if complete knock-down would be observed in all transfected cells, this would represent only a rather small

Author's personal copy

number of cells in the population and therefore knock-down in extracts of the whole population would be difficult to verify. To assess the efficiency and specificity of the knock-down in our experiments, another strategy was therefore used that is based on the inhibition of transfected expression constructs by co-transfected dsRNA.

Expression vectors for four key RNAi factors together with dsRNAs targeting all RNAi-related genes under study were introduced by transfection into Bm5 cells. In particular, BmDcr-2, BmR2D2, BmAgo-2 and BmTranslin-2 were expressed as C-terminal myc-his- or N-terminal myc-tagged recombinant proteins. First, to prove functionality of gene-specific dsRNAs, gradually increasing quantities of specific dsRNA, targeting the RNAi factor in the expression vector, were applied, which resulted in efficient knock-down of protein accumulation in a dose-dependent way (Suppl. Fig. 2). Second, to demonstrate that each dsRNA used was able to silence only the protein for which it had been specifically designed, Bm5 cells expressing the above mentioned RNAi factors were co-transfected separately with each one of the dsRNAs that target the other RNAi-related factors. Western analysis proved that knock-down was only achieved for the dsRNA specific for the over-expressed RNAi factor while all other dsRNAs did not influence protein expression (Fig. 3). For instance, dsAgo1 and dsAgo3 could not silence over-expressed BmAgo-2, while dsDcr1 did not affect the expression of BmDcr-2. This observation is important as it excludes the possibility that relevant genes (Argonautes, Dicers) might have been cross-silenced by dsRNAs of the same family in the RNAi-of the-RNAi experiments.

3.3. Single-stranded RNA does not cause an efficient intracellular RNAi response in Bm5 cells

It is well established that in the model insect *Drosophila*, the piRNA pathway functions independently of Dicer activity and that the primary response is initiated by ssRNA transcripts. In the germline, the initial trigger is then amplified by the "ping-pong" mechanism, in which different Argonaute proteins of the PIWI class associate with piRNAs of sense (Ago-3) or antisense (Aubergine, Piwi) polarity to generate piRNAs of the opposite polarity (Jinek and Doudna, 2009; Vodovar et al., 2012).

The finding that BmAgo-3 may play a role in the RNAi response of Bm5 cells could implicate that silencing can be accomplished not only by dsRNA but also by single-stranded sense and antisense RNA molecules (sRNAs and asRNAs). It is noted that Bm5 cells contain dsRNA-unwinding activity (Skeiky and Iatrou, 1991) that could expose single-stranded regions of transfected dsRNA for possible (Dicer-independent) processing and loading into BmAgo-3-containing RISCs. For this reason, the possibility of knock-down effect of antisense and sense RNA (asLuc and sLuc), that targeted exactly the same region as dsLuc, was investigated. The amounts of the ssRNA used were 20-fold higher than dsLuc, to compensate for its greater propensity to intracellular degradation than dsRNA.

As shown in Fig. 4, no significant effect on luciferase reporter activity was observed after application of high concentrations of asLuc or sLuc (3.3 μg/ml). On the other hand, dsLuc was active even at very low concentrations (0.17 μg/ml). These results show that the RNAi response in Bm5 cells cannot be triggered by single-stranded asRNA or sRNA, at least using as high concentrations as the ones applied in our experimental set-up. Thus, the involvement of BmAgo-3 in the silencing response seems to be triggered by dsRNA and not by single-stranded RNA.

3.4. Mild stimulation of dsRNA-mediated gene silencing after over-expression of BmDcr-2 or BmAgo-2

The "RNAi-of-the-RNAi" experiments indicated that factors of the siRNA pathway (BmDcr-2, BmAgo-2) are important for RNAi efficiency (Fig. 2a and b). Previously, it has also been reported that Bm5 cells are deficient regarding *BmR2D2* expression, an essential factor in the siRNA pathway in *Drosophila* (Swevers et al., 2011). It is therefore of interest to investigate whether the efficiency of the cells' RNAi mechanism could be stimulated after over-expression of BmDcr-2, BmAgo-2 or BmR2D2. Thus, Bm5 cells were co-transfected with expression vectors of the siRNA factors together with the reporter plasmids as well as with dsLuc from limiting to gradually increasing concentrations (Fig. 1).

Interestingly, it was noted that at very low concentrations of dsLuc (3.125–6.250 ng/ml), increased expression of BmDcr-2 and BmAgo-2 was capable of enhancing the activity of dsLuc to silence reporter gene expression to lower levels compared to the control (Fig. 5; by 14.6 or 16.9% for BmDcr-2, and by 25.3 or 15.4% for BmAgo-2). On the other hand, expression of BmR2D2 presented no statistically significant effect on the RNAi response in Bm5 cells.

3.5. Subcellular localization of the main siRNA pathway proteins by immunostaining of Bm5 cells

In order to obtain more information regarding the main siRNA factors' subcellular localization, and thus correlate it with their function in the cellular environment, immunostaining of Bm5 cells

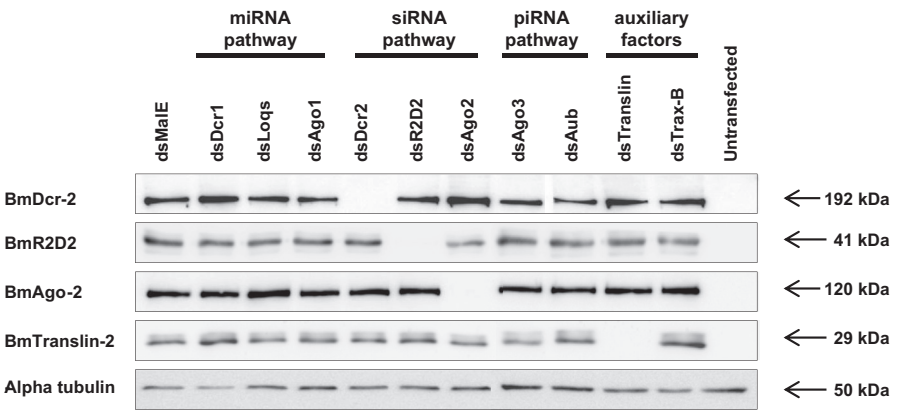


Fig. 3. Efficient expression and dsRNA-mediated gene-specific knock-down of four myc-tagged RNAi factors (BmDcr-2, BmR2D2, BmAgo-2 and BmTranslin-2) in transfected Bm5 cells, as analyzed by Western blot. Indicated are the identities of the dsRNAs that were co-transfected with the expression vector. Alpha-tubulin served as a loading control (a representative western blot of alpha-tubulin is shown in the lower panel). Molecular weights are indicated at right.

Author's personal copy

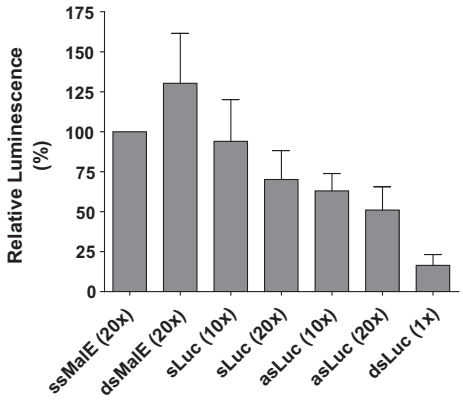


Fig. 4. Single-stranded RNA luciferase functional assay. The graph depicts mean values of the % relative luminescence produced from three biological replications (+SE) after transfection with ssRNA or dsRNA. Each bar is presented as % ratio of the negative control (ssMalE; set to 100%).

transfected with expression constructs for myc-tagged BmDcr-2, BmR2D2 and BmAgo-2 was performed. Confocal microscopy revealed that BmDcr-2 is localized in the cytoplasm with a preference for the cellular membrane (Fig. 6). The cytoplasmic localization of BmDcr-2 can be justified according to its suggested role of processing long dsRNAs in the siRNA pathway. A similar pattern of cytoplasmic localization has been observed for Flag-tagged BmDcr-2 when over-expressed in another lepidopteran cell line, *Trichoplusia ni* Hi5 cells (Liu et al., 2012). In contrast to S2 and Hi5 cells where Dcr-2 has been reported to be expressed also in the nucleus (Cernilogar et al., 2011; Liu et al., 2012), BmDcr-2 detection in the nuclei of Bm5 cells was exceptionally rare (data not shown).

BmR2D2 staining revealed that it is also localized mostly on the cellular membrane when over-expressed in Bm5 cells (Fig. 6). As might be expected for Dcr-2/R2D2 complex formation (which is documented in *Drosophila* S2 cells; Liu et al. (2003)), it therefore colocalizes with BmDcr-2. On the other hand, BmR2D2 subcellular localization is different from the one reported for *Tribolium* R2D2 in Hi5 cells where a spot-like pattern is observed (Swevers et al., 2011). Since the homology between *Tribolium* and *Bombyx* is very low, differences in staining pattern may reflect differences in their functional properties such as the absence of recruitment of *Tribolium* R2D2 by lepidopteran Dcr-2 (discussed in Swevers et al. (2011)).

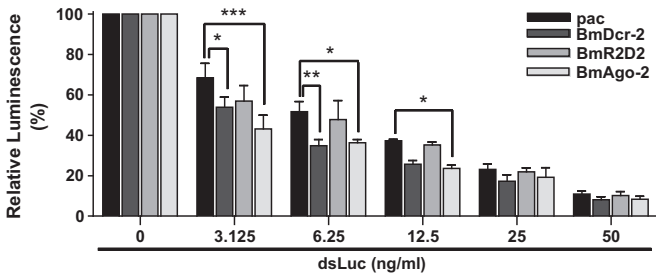


Fig. 5. Luciferase RNAi functional assay after co-expression of the main siRNA factors. Expression vectors for BmDcr-2, BmR2D2 and BmAgo-2 were tested. The pac expression vector was used as negative control. Additionally, the cells were transfected with gradually increasing concentrations of Luc-specific dsRNA (dsLuc). The graph depicts mean values of the % relative luminescence produced from three biological replications (+SE) after transfection with dsRNA. Each bar is presented as % ratio of the negative control (dsLuc = 0 ng/ml; set to 100%). Statistical analysis results refer to the comparison of the average value ($n = 3$) of each over-expressed protein treatment with the average of the control pac (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$).

As for BmAgo-2, immunofluorescence shows that it is localized mostly in the cell periphery and the cytoplasm (Fig. 6). In our experiments BmAgo-2 never appeared in the nucleus, although its homologue in *Drosophila* has also been found to be associated with chromatin in the nucleus during the heat-shock stress response acting probably as transcriptional regulator (Cernilogar et al., 2011).

4. Discussion

In this study we have investigated the core RNAi machinery components of the silkmoth *B. mori* that are involved in the silencing response triggered by artificially introduced dsRNA stimuli into the intracellular environment (i.e. by transfection). Our interest in this mechanism is motivated by the search for limiting factors that could explain the high inconsistency in RNAi response that is observed in *in vivo* silencing experiments in lepidopteran insects (Terenius et al., 2011). Based on the data established for *Drosophila*, an RNAi screen of homologues of RNAi-related factors in *B. mori* was performed to identify the genes that encode the core RNAi machinery of the silkmoth.

A major finding was that all three main small RNA pathways were shown to be involved in the dsRNA-mediated gene silencing in Bm5 cells, since knocking-down of *BmAgo-1* (miRNA pathway), *BmAgo-2*/*Bm-Dcr-2* (siRNA pathway) and *BmAgo-3* (piRNA pathway) caused considerable abrogation of RNAi-mediated silencing of luciferase activity (Fig. 2a, Table 2a). With the exception of *Ago-1*, this finding is highly consistent with a similar study on a hemocyte cell line of *Anopheles gambiae*, where *Ago-2*, *Ago-3* and *Dcr-2* genes were found to be indispensable for RNAi (Hoa et al., 2003). Moreover, the up-regulation of *Ago-2* and *Dcr-2* expression upon a dsRNA trigger as an *in vivo* response in the lepidopteran *Manduca sexta* was reported recently (Garbutt and Reynolds, 2012). Nevertheless, it should be noted that according to statistical analysis that revealed the important RNAi components in Bm5 cells, luciferase activity recovery never reached levels higher than 65% of maximum luminescence (Fig. 2a and b; Table 2a and b). It has been commented before that there might exist technical limitations that prevent the complete silencing of a gene whose expression is necessary for gene down-regulation in the first place (Ulvila et al., 2006).

Several observations establish that RNAi-mediated knock-down is an efficient and specific process in Bm5 cells. First, concentrations of co-transfected dsRNA of 0.55 μg/ml completely suppressed the expression of BmDicer-2 and BmAgo-2 from expression vectors, while 2–3 fold higher concentrations limited BmR2D2 and BmTranslin-2 protein production to <10% (Suppl. Fig. 2). Another experiment revealed suppression of a luciferase reporter by approximately 50% using only 6.25 ng/ml of dsLuc in the transfection mixture (Fig. 5). Regarding specificity, it was observed in transient expression experiments that, for four genes, the specific dsRNA caused complete knock-down of expression, while no obvious effect was observed for the remaining 9 non-specific dsRNAs that target other RNAi-related factors (Fig. 3). This strengthens our observation that members of all three RNAi pathways can be involved in the silencing mechanism; for instance, and of relevance to the discussion below, the inhibition of silencing by dsAgo3 cannot be explained by cross-silencing of the siRNA factors BmDcr-2 and BmAgo-2.

Following the model established for *Drosophila*, the involvement of *Dcr-2* and *Ago-2* in the silencing assay was expected, since these two genes encode the RNAi core factors that activate silencing in response to exogenous dsRNA (siRNA pathway; Siomi and Siomi (2009)). Evidence showing significant, but less potent, involvement of BmAgo-1 can be interpreted as partial overlapping of siRNA

Author's personal copy

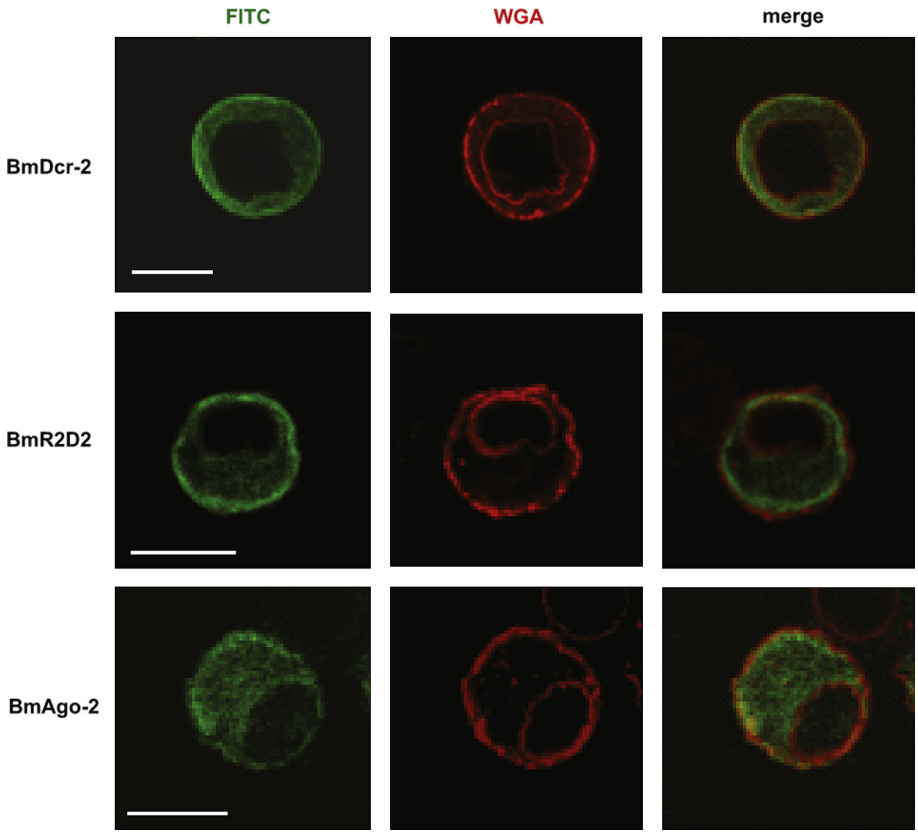


Fig. 6. Subcellular localization of siRNA pathway proteins analyzed with confocal microscopy. Bm5 cells were transfected with expression vectors for myc-tagged BmDcr-2, BmR2D2 or BmAgo-2, and processed for immunostaining 48 h after transfection. The cell membrane was stained with WGA-Texas Red-X (red fluorescence), and primary anti-myc and secondary anti-mouse-FITC antibodies (green fluorescence) were used to detect the myc-tagged BmDcr-2, BmR2D2 and BmAgo-2 proteins. Scale bars; 100 μm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and miRNA pathways at RISC level, as is also observed in *Drosophila* (Tomari et al., 2007).

The lack of evidence for a dsRNA-binding protein involvement (BmLoqs, BmR2D2) in the RNAi response after the screening of all major RNAi components was unexpected, since the presence of a dsRNA-binding protein is required for both miRNA and siRNA pathways (Liu et al., 2003; Tomari et al., 2007). While *BmR2D2* is not expressed in Bm5 cells (Swevers et al., 2011), one can speculate that knock-down of *BmLoqs* by dsRNA may not be efficient enough to cause phenotypic effects. Although the dsRNA preparations were proven to be highly specific and efficient (Fig. 3, Suppl. Fig. 2), it is possible that BmLoqs protein is much more stable than Dicers or Argonautes or that the latter are present in the cells in more limiting amounts.

On the other hand, this finding could also be explained by two alternative mechanisms that may well act in parallel: (a) another unknown dsRNA-binding protein can carry out the function of BmR2D2 or BmLoqs in Bm5 cells, or, (b) an alternative small RNA silencing pathway exists, that acts in parallel with the siRNA pathway and that requires no dsRNA-binding protein. The first hypothesis is consistent with the observation that ectopic expression of BmR2D2 does not stimulate the silencing process triggered by dsRNA (Fig. 5). Over-expression of BmDicer-2 or BmAgo-2 also results in limited effects on RNAi efficiency, observed only at low concentrations of dsLuc, indicating that BmDcr-2 and BmAgo-2 proteins are close to their optimal levels of expression for efficient RNAi. To gain further insight in the RNAi machinery in Bm5 cells, further biochemical analysis is required, based on the isolation and characterization of RISC complexes from *Bombyx* cells as has been carried out for *Drosophila* embryo extracts and S2 cells (Sontheimer, 2005; Tomari et al., 2004). The second hypothesis may fit with the finding that knocking-down *BmAgo-3*, an Argonaute protein of the Dicer-independent piRNA pathway, caused significant recovery of the luciferase activity (30.5%; Fig. 2, Table 2a).

The identification of *BmAgo*-3 in the silencing response was unexpected because it belongs to the Piwi-class of Argonaute proteins that were originally identified for their involvement in transposon silencing of the germline. The primary triggers for the piRNA pathway are thought to be single-stranded transcripts that are transcribed from transposable elements or piRNA loci in the genome (Siomi et al., 2011). In the present study, BmAgo-3 seems to be involved in dsRNA-mediated gene silencing in the absence of single-stranded RNA (Fig. 2a and b). Because of the inability of high doses of single-stranded RNA to provoke efficient silencing of luciferase in Bm5 cells (Fig. 4), it is suggested that BmAgo-3 may function independently from the established piRNA pathway in Bm5 cells that is triggered by single-stranded transcripts. Instead, its function seems to be triggered by dsRNA, similarly to the siRNA pathway. This speculation is reinforced by the absence of any significant effect of Aub-specific dsRNA (Fig. 2a) on the RNAi response, ruling out the participation of the ping-pong mechanism in the observed silencing process. Interestingly, it has been reported that in BmN4 cells, a *Bombyx* embryonic cell line where *BmAgo-3* and *BmAub* are endogenously expressed, both primary and secondary piRNA biogenesis pathways are functional (Kawaoka et al., 2009). Future studies that involve cloning and deep sequencing of Bm5 cells' small RNAs could reveal the relative contribution of siRNA and piRNA pathway components in gene silencing in BmN4 and Bm5 cells.

Lately, it has also been suggested that RNAi efficiency may vary depending on the relative timing between the administration of the

Author's personal copy

dsRNA trigger and the initiation of the target gene mRNA production, and pretreatment with specific-dsRNA was recommended to increase the silencing effect (Terenius et al., 2011). Thus, in order to enhance the sensitivity, a special feature of our study system was the employment of ecdysone responsive reporters. The reporter activity was triggered by ecdysone agonist (tebufenozide) only 48 h after the transfection with dsRNA, thus ensuring that during this time window dsRNAs had already been processed to small RNAs and had silenced their targets (RNAi factors). This procedure was expected to increase the sensitivity for knock-down of components of the RNAi machinery. Although the involvement of BmDcr-2 in the RNAi response was confirmed employing the non-inducible (constitutive) pActin-Luc vector as reporter (Suppl. Fig. 3), it is clear that the use of a constitutive reporter results in decreased sensitivity since no involvement of BmAgo-1 and BmAgo-2 was uncovered in this set of experiments.

Concluding, to our knowledge this is the first attempt to determine the factors that constitute the core RNAi machinery in *B. mori*. After an RNAi screening, we identified *Ago-1*, *Ago-2*, *Ago-3* and *Dcr-2* genes of the silkmoth as candidate components of the RNAi response in Bm5 cells. BmR2D2, a dsRNA-binding protein in the siRNA pathway that acts as co-factor of Dcr-2 in *Drosophila*, was found to be dispensable for effective dsRNA-mediated gene silencing in Bm5 cells. It must be stressed, however, that all experiments were carried out by transfection which is not a natural process to introduce nucleic acids. Bm5 cells do not respond to soaking of dsRNA in the culture medium but seem to be competent to take up dsRNA without triggering an RNAi response (Swevers and Smagghe, 2012). Because of its close localization at the plasma membrane (Fig. 6), we cannot exclude a role for BmR2D2 in dsRNA-mediated gene silencing in processes where dsRNA is taken up by endocytosis. Additionally, our data suggest the involvement of BmAgo-3 in the dsRNA-mediated silencing of Bm5 cells, which may occur independently of its involvement in the piRNA pathway. This involvement can also be further investigated by investigating possible stimulation of the RNAi response after BmAgo-3 overexpression.

Acknowledgments

The authors thank Dr. K. Iatrou (NCSR "Demokritos", Aghia Paraskevi, Greece) for supporting the implementation of this project, as well as for useful discussions and critical comments, Dr. Th. Theodosiou and Dr. M. Sagnou (NCSR "Demokritos", Aghia Paraskevi, Greece) for assistance with confocal microscopy, and Dr. T. Kusakabe (Kyushu University, Fukuoka, Japan) for providing a BmR2D2 ORF clone. Anna Kolliopoulou is a recipient of a PhD fellowship from NCSR "Demokritos".

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.05.001.

References

Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. Biophotonics Int. 11, 36–42.
Belles, X., 2010. Beyond Drosophila: RNAi in vivo and functional genomics in insects. Annu. Rev. Entomol. 55, 111–128.
Berry, B., Deddouche, S., Kirschner, D., Imler, J.L., Antoniewski, C., 2009. Viral suppressors of RNA silencing hinder exogenous and endogenous small RNA pathways in Drosophila. PLoS One 4, e5866.
Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., Ebel, G.D., 2010. C6/36 Aedes albopictus cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e856.
Burand, J.P., Hunter, W.B., 2012. RNAi: future in insect management. J. Invertebr. Pathol. 112 (Suppl 1), S68–S74.
Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., Lo Sardo, F., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., Siomi, M.C., Carninci, P., Gilmour, D.S., Corona, D.F., Orlando, V., 2011. Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in Drosophila. Nature 480, 391–395.
Chotkowski, H.L., Ciota, A.T., Jia, Y., Puig-Basagoiti, F., Kramer, L.D., Shi, P.Y., Glaser, R.L., 2008. West Nile virus infection of Drosophila melanogaster induces a protective RNAi response. Virology 377, 197–206.
Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell 130, 413–426.
Dorner, S., Lum, L., Kim, M., Paro, R., Beachy, P.A., Green, R., 2006. A genomewide screen for components of the RNAi pathway in Drosophila cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 103, 11880–11885.
Douris, V., Swevers, L., Labropoulou, V., Andronopoulou, E., Georgoussi, Z., Iatrou, K., 2006. Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. Adv. Virus. Res. 68, 113–156.
Drevet, J.R., Swevers, L., Iatrou, K., 1995. Developmental regulation of a silkworm gene encoding multiple GATA-type transcription factors by alternative splicing. J. Mol. Biol. 246, 43–53.
Evans, P.D., Cook, S.N., Riggs, P.D., Noren, C.J., 1995. LITMUS: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional in vitro transcription. Biotechniques 19, 130–135.
Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391, 806–811.
Garbutt, J.S., Reynolds, S.E., 2012. Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 621–628.
Georgomanolis, T., Iatrou, K., Swevers, L., 2009. BmCAP, a silkmoth gene encoding multiple protein isoforms characterized by SoHo and SH3 domains: expression analysis during ovarian follicular development. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 892–902.
Ghildiyal, M., Zamore, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nat. Rev. Genet. 10, 94–108.
Grace, T.D.C., 1967. Establishment of a Line of Cells from the Silkworm Bombyx mori, p. 216.
Hess, A.M., Prasad, A.N., Ptitsyn, A., Ebel, G.D., Olson, K.E., Barbacioru, C., Monighetti, C., Campbell, C.L., 2011. Small RNA profiling of dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. BMC Microbiol. 11, 45.
Hoa, N.T., Keene, K.M., Olson, K.E., Zheng, L., 2003. Characterization of RNA interference in an Anopheles gambiae cell line. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 949–957.
Jinek, M., Doudna, J.A., 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature 457, 405–412.
Johnson, R., Meidinger, R.G., Iatrou, K., 1992. A cellular promoter-based expression cassette for generating recombinant baculoviruses directing rapid expression of passenger genes in infected insects. Virology 190, 815–823.
Kawaoka, S., Hayashi, N., Suzuki, Y., Abe, H., Sugano, S., Tomari, Y., Shimada, T., Katsuma, S., 2009. The Bombyx ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. RNA 15, 1258–1264.
Kemp, C., Imler, J.L., 2009. Antiviral immunity in drosophila. Curr. Opin. Immunol. 21, 3–9.
Kim, N.Y., Baek, J.Y., Choi, H.S., Chung, I.S., Shin, S., Lee, J.I., Choi, J.Y., Yang, J.M., 2012. Short-hairpin RNA-mediated gene expression interference in Trichoplusia ni cells. J. Microbiol. Biotechnol. 22, 190–198.
Kozak, M., 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J. Mol. Biol. 196, 947–950.
Labropoulou, V., Douris, V., Stefanou, D., Magrioti, C., Swevers, L., Iatrou, K., 2008. Endoparasitoid wasp bracovirus-mediated inhibition of hemolin function and lepidopteran host immunosuppression. Cell. Microbiol. 10, 2118–2128.
Li, H., Li, W.X., Ding, S.W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. Science 296, 1319–1321.
Liu, J., Swevers, L., Iatrou, K., Huvenne, H., Smagghe, G., 2012. Bombyx mori DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. J. Insect. Physiol. 58, 1166–1176.
Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., Wang, X., 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. Science 301, 1921–1925.
Lu, M., Farrell, P.J., Johnson, R., Iatrou, K., 1997. A baculovirus (Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. J. Biol. Chem. 272, 30724–30728.
Mané-Padrós, D., Cruz, J., Vilaplana, L., Pascual, N., Belles, X., Martin, D., 2008. The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect Blattella germanica. Dev. Biol. 315, 147–160.
Obbard, D.J., Gordon, K.H., Buck, A.H., Jiggins, F.M., 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 99–115.
Obbard, D.J., Jiggins, F.M., Halligan, D.L., Little, T.J., 2006. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes. Curr. Biol. 16, 580–585.
Saleh, M.C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P.H., Andino, R., 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. Nat. Cell. Biol. 8, 793–802.

Author's personal copy

Scott, J.C., Brackney, D.E., Campbell, C.L., Bondu-Hawkins, V., Hjelle, B., Ebel, G.D., Olson, K.E., Blair, C.D., 2010. Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. PLoS Negl Trop. Dis. 4, e848.

Siomi, H., Siomi, M.C., 2009. On the road to reading the RNA-interference code. Nature 457, 396–404.

Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., Aravin, A.A., 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 12, 246–258.

Skeiky, Y.A., Iatrou, K., 1991. Developmental regulation of covalent modification of double-stranded RNA during silkmoth oogenesis. J. Mol. Biol. 218, 517–527.

Soin, T., Swevers, L., Mosallanejad, H., Efrose, R., Labropoulou, V., Iatrou, K., Smagghe, G., 2008. Juvenile hormone analogs do not affect directly the activity of the ecdysteroid receptor complex in insect culture cell lines. J. Insect. Physiol. 54, 429–438.

Sontheimer, E.J., 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6, 127–138.

Swevers, L., Iatrou, K., 1999. The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkmoth oogenesis at mid-vitellogenesis. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 955–963.

Swevers, L., Kravariti, L., Ciolfi, S., Xenou-Kokoletsi, M., Ragoussis, N., Smagghe, G., Nakagawa, Y., Mazomenos, B., Iatrou, K., 2004. A cell-based high-throughput screening system for detecting ecdysteroid agonists and antagonists in plant extracts and libraries of synthetic compounds. FASEB J. 18, 134–136.

Swevers, L., Liu, J., Huvenne, H., Smagghe, G., 2011. Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkmoth tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and Translin. PLoS One 6, e20250.

Swevers, L., Smagghe, G., 2012. Use of RNAi for control of insect crop pests. In: Smagghe, G., Diaz, I. (Eds.), Arthropod-plant Interactions: Novel Insights and Approaches for IPM. Springer, ©2012, Dordrecht, pp. 177–197.

Tan, A., Palli, S.R., 2008a. Ecdysone [corrected] receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, Tribolium castaneum. Mol. Cell. Endocrinol. 291, 42–49.

Tan, A., Palli, S.R., 2008b. Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, Tribolium castaneum. Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 430–439.

Tanaka, H., Fujita, K., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Imanishi, S., Yamakawa, M., 2009. shRNA expression plasmids generated by a novel method efficiently induce gene-specific knockdown in a silkworm cell line. Mol. Biotechnol. 41, 173–179.

Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalier, F., Collinge, D.P., Crava, C.M., de Maagd, R.A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felfoldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A.S., Gatehouse, H.S., Gatehouse, L.N., Giebultowicz, J.M., Gomez, I., Grimmelikhuijzen, C.J., Groot, A.T., Hauser, F., Heckel, D.G., Hegedus, D.D., Hrycaj, S., Huang, L., Hull, J.J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M.R., Kotwica, J., Li, C., Li, J., Liu, J., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P.J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam, M.V., Saenko, S., Simpson, R.M., Soberon, M., Strand, M.R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C.W., Whyard, S., Zhang, W., Nagaraju, J., Ffrench-Constant, R.H., Herrero, S., Gordon, K., Swevers, L., Smagghe, G., 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. J. Insect. Physiol. 57, 231–245.

Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D.S., Bennett, R., Cook, H.A., Koppetsch, B.S., Theurkauf, W.E., Zamore, P.D., 2004. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. Cell 116, 831–841.

Tomari, Y., Du, T., Zamore, P.D., 2007. Sorting of Drosophila small silencing RNAs. Cell 130, 299–308.

Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R.A., Kocks, C., Ramet, M., 2006. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in Drosophila S2 cells. J. Biol. Chem. 281, 14370–14375.

Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D., 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. Science 313, 320–324.

van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in Drosophila melanogaster. Genes Dev. 20, 2985–2995.

Vodovar, N., Bronkhorst, A.W., van Cleef, K.W., Miesen, P., Blanc, H., van Rij, R.P., Saleh, M.C., 2012. Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. PLoS One 7, e30861.

Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., Ding, S.W., 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult Drosophila. Science 312, 452–454.

Wu, Q., Luo, Y., Lu, R., Lau, N., Lai, E.C., Li, W.X., Ding, S.W., 2010. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 107, 1606–1611.

Wynant, N., Verlinden, H., Breugelmans, B., Simonet, G., Vanden Broeck, J., 2012. Tissue-dependence and sensitivity of the systemic RNA interference response in the desert locust, Schistocerca gregaria. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 911–917.

Zhu, F., Xu, J., Palli, R., Ferguson, J., Palli, S.R., 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata. Pest Manag. Sci. 67, 175–182.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in Insect Science

Recent progress in RNAi research in Lepidoptera: intracellular machinery, antiviral immune response and prospects for insect pest control

Anna Kolliopoulou and Luc Swevers

An overview of recent RNAi research in Lepidoptera is presented here, with silkworm cell lines being recently proven to represent good models for analysis of the basic RNAi machinery. In animals, involvement of the miRNA and piRNA pathway in antiviral defense and transposon control, respectively, was analyzed. Both miRNA and piRNA pathways are also shown to be involved in the regulation of several physiological and developmental processes, such as sex determination. Furthermore, recent studies have focused on the search for factors that could explain the relative refractoriness of lepidopterans to systemic RNAi, while silkworm cell lines have been engineered for efficient extracellular dsRNA uptake, with biotechnological applications. Considerable optimization needs to be done for RNAi to succeed as a method for pest control, especially regarding efficient delivery of dsRNA.

Addresses
Insect Molecular Genetics and Biotechnology, National Centre for Scientific Research ''Demokritos'', Terma P. Grigoriou, Aghia Paraskevi, 153 42 Athens, Greece

Corresponding author: Swevers, Luc (swevers@bio.demokritos.gr)

Current Opinion in Insect Science 2014, **6**:28–34

This review comes from a themed issue on **Pests and resistance**

Edited by **Guy Smagghe** and **Luc Swevers**

For a complete overview see the Issue and the Editorial

Available online 7th October 2014

http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.019

2214-5745/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The technique of RNAi has revolutionized our approach to biology because a simple method became available that allowed analysis of gene function through administration of dsRNA. Because of this reason, RNAi research has attracted a lot of attention, from basic research to elucidate the workings of the RNAi machinery up to practical applications such as insect pest control. Also Lepidoptera, mainly the silkworm *Bombyx mori* and derived cell lines, have contributed to basic research regarding RNAi, while RNAi-based techniques are being developed to control lepidopteran pests. Here we present a short overview of RNAi research in lepidopteran insects during the last two–three years.

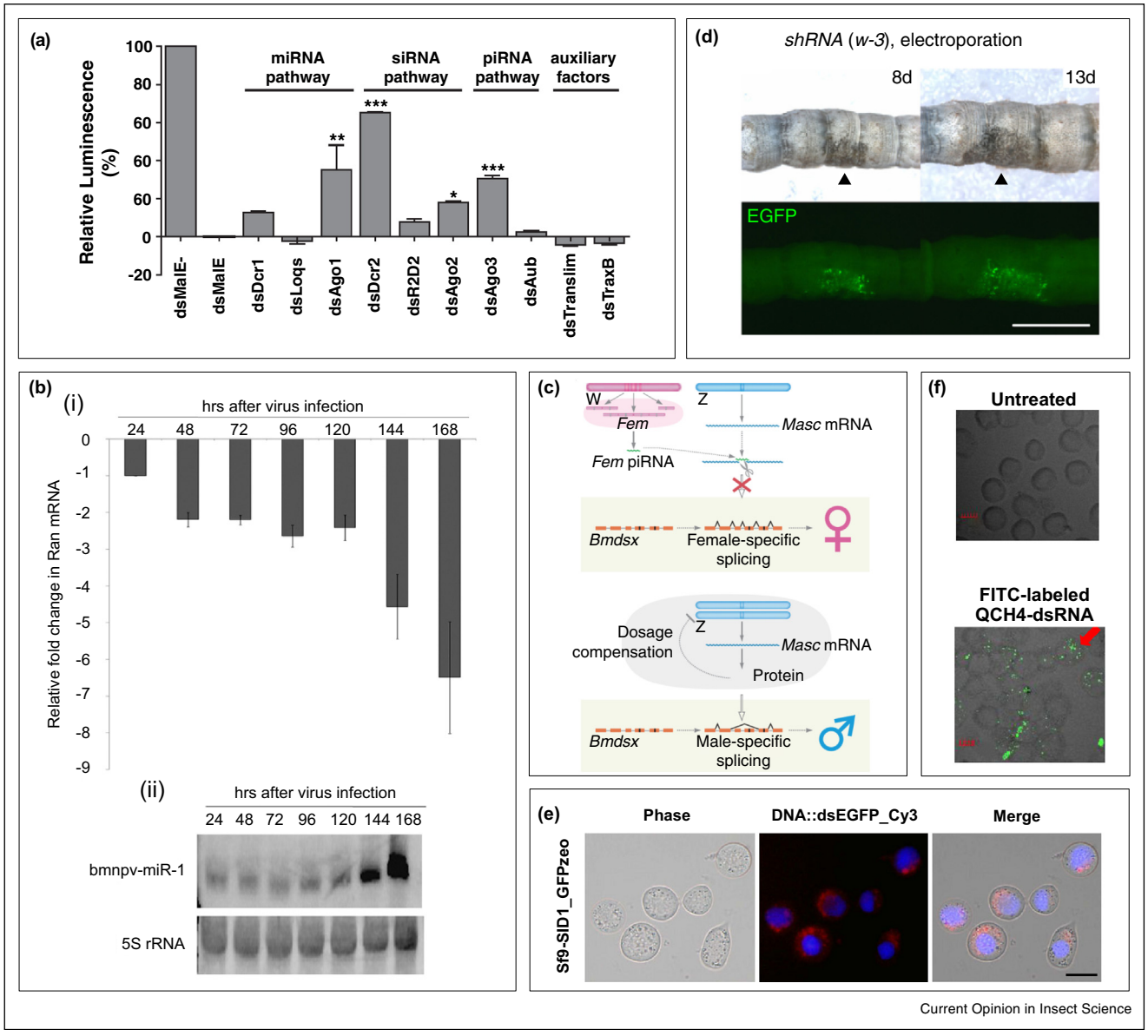
The intracellular RNAi machinery in Lepidoptera

Small RNAs exert key regulatory roles of gene expression at both transcriptional and post-transcriptional level in insects [1,2••]. Small RNAs fall mainly in three categories: the microRNAs (miRNAs; 21–24 nt), the short-interfering RNAs (siRNAs; 20–25 nt) and the PIWI-interacting RNAs (piRNAs; 24–30 nt). Moreover, recent studies in *B. mori* identified several novel small non-coding RNA (ncRNA) classes, such as tRNA-derived, rRNA-derived, snoRNA-derived and snRNA-derived small RNAs [1,2••,3].

Attempts to gain insight into the way that small RNA pathways function in Lepidoptera have lately revealed the diversity of pathways regulated by the three types of small RNAs and their functional redundancy. After an RNAi screening of core RNAi effectors, genes from all three main RNAi pathways (*BmAgo-1* — miRNA; *BmAgo-2* and *BmDcr-2* — siRNA; *BmAgo-3* — piRNA) were shown to be involved in the silencing procedure triggered by an exogenous dsRNA gene in Bm5 cells (Figure 1a; [4••]). Furthermore, sequencing of small RNAs (18–50 nt) co-immunoprecipitating with BmAgo-2 (overexpressed in baculovirus-infected BmN cells), identified not only transposable element (TE)-derived siRNAs, but also a variety of distinct ncRNA classes [2••]. Silkworm TE-derived small RNAs were shown to correspond not only to piRNAs, whose role is well documented in regulating transposon expression, but also to miRNAs and siRNAs, which still are not well characterized regarding their role in TE control [1]. Taken together, the latest findings discussed above support the idea of a possible overlap in function of the three main RNAi pathways in *B. mori* [4••].

Unlike mammalian cell lines, silkworm ovary-derived cells (BmN4, Bm5) endogenously express two major PIWI subfamily proteins, Siwi (Aubergine) and Argonaute 3 (BmAgo-3). This fact has resulted in the recognition of mainly BmN4 cells as a valuable model to study the piRNA pathway. In BmN4 cells both primary and secondary steps for piRNA biogenesis were shown to be active and similar to *Drosophila* germ-line cells; Siwi usually binds antisense piRNAs with a strong 1 U bias at 5′ end, while BmAgo3 is more often bound to sense piRNAs enriched for 10A [5]. Moreover, BmN4 cells have

Figure 1



Highlights of recent progress in RNAi research in Lepidoptera. **(a)** Overlap of function of three small RNA pathways in silkworm-derived Bm5 cells. 'RNAi of the RNAi' luciferase functional assay targeting key components of the miRNA, siRNA and piRNA pathways, as well as auxiliary factors. Targeting key components of the three small RNA pathways causes reduction in dsLuc-mediated gene silencing of the luciferase reporter. Adapted, with permission from Elsevier, from [4••]. **(b)** Baculovirus-derived miRNAs regulate the (miRNA-based) antiviral host response. Expression of Exportin-5 cofactor Ran decreases (i — RT-qPCR) while bmnpv-miR-1 level increases (ii — Northern blot) during BmNPV infection in *B. mori* larvae. Adapted, with permission from American Society for Microbiology, from [11••]. **(c)** PiRNAs as primary sex determination factor in *Bombyx mori*. *Fem* piRNA precursor located on female-specific W chromosome produces *Fem*-piRNAs, which in females can silence *Masc* mRNA derived from Z chromosome and give female-specifc *Bmdsx* isoforms. In the absence of W chromosome in male embryos, Masc protein regulates both dosage compensation and masculinization by the production of male-specific splice variants of *Bmdsx*. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd.: [33••]. **(d)** Electroporation of shRNA vectors in somatic tissues of silkworm larvae. Shown is the area of transformation (GFP expression) and the area of phenotype (translucent skin) induced by silencing of *w-3*. Adapted, with permission from Company of Biologists Ltd., from [49•]. **(e)** Engineering lepidopteran cell lines for uptake of dsRNA from the extracellular medium. Ectopic expression of SID-1 from *C. elegans* promotes dsRNA delivery in Sf9 cells' cytoplasm. The cells were incubated with Cy3-labeled dsEGFP (red) and the nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Adapted, with permission from Springer, from [57]. **(f)** Efficient uptake of dsRNA from chitosan-based nanoparticles. Differential interference contrast image of Sf9 cells incubated with FITC-labeled QCH4-dsRNA complex for 24 hours. Red arrow indicates accumulation of FITC-labeled complexes in the cell. Adapted, with permission from Elsevier, from [65].

been used recently to elucidate basic aspects of the piRNA pathway and to identify new regulatory factors such as HSP90 [6,7] and TUDOR domain-containing proteins that interact with PIWI proteins through dimethylarginine motifs [8,9].

RNAi as an antiviral defense mechanism in Lepidoptera

While in *Drosophila* and mosquitoes studies of infection of RNA viruses have resulted in the identification of virus-derived siRNAs that control viral replication through programming of the RISC complex to cleave viral RNA targets [10], most studies in Lepidoptera involve infection with a DNA virus, such as baculovirus, and its interaction with the miRNA pathway.

Baculovirus-encoded miRNAs may regulate the small RNA-mediated antiviral defense of a host, such as *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV)-derived miR-1 that targets the exportin-5 cofactor Ran which is essential for pre-miRNAs transport from the nucleus to the cytoplasm (Figure 1b; [11••]). In parallel, the host-expressed bmo-miR-8 regulates the viral load, presumably by targeting BmNPV immediate-early gene *ie1* mRNA as well as several other important viral genes [11••]. Thus, by expression of bmnpv-miR-1, maturation of host-encoded miRNAs involved in viral defense, such as miR-8, is blocked and higher titers of baculovirus are obtained during infection [11••]. Another function of baculoviral miRNAs is to negatively autoregulate gene expression of essential viral genes (such as bmnpv-miR-3 and *Autographa californica* multicapsid NPV (AcMNPV)-miR-1 targeting the DNA binding protein P6.9 and ODV-E25 mRNAs, respectively, [12,13]) thus masking the infection to escape the immune response. Similarly, virus-derived small RNAs with an siRNA signature mapping to specific hot spots on key structural and replication genes have been detected in *Helicoverpa armigera* single NPV (HaSNPV)-infected *H. armigera* larvae that limit over-replication of the virus and prevent premature death of host cells in order to obtain higher viral progeny [14]. Baculoviral infection has also been reported to cause a global alteration of the microRNA profile in lepidopteran cells, such as *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells upon infection with AcMNPV [15] as well as *H. armigera* larvae following HaSNPV infection [16].

Recent studies also clearly document microRNAome alterations in lepidopteran insects undergoing an infection other than baculoviral [17]. One example is *B. mori* larvae infection by *B. mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV), a reovirus with segmented dsRNA genome, which causes differential expression of 35 miRNAs in libraries derived from RNA collected three–four days post-infection [17]. In addition, *Helicoverpa (Heliothis) zea* nudivirus-1 (HzNV-1) large DNA genome was found to contain the *pag1* gene that expresses a non-coding RNA, which is further processed in at least two miRNAs targeting *hhi1* early gene of the virus and thus plays a crucial role for the establishment of latent infection in *S. frugiperda* Sf21 cells [18].

RNAi as a regulatory mechanism of physiological and developmental processes in Lepidoptera

Apart from their role in defense discussed above, several studies involving identification of microRNAs naturally expressed in Lepidoptera species have lately been published [19–24], demonstrating that miRNAs are strongly involved in many other regulatory processes [25]. For instance, the silkworm miRNAs bmo-miR-1a-3p, miR-281 and bmo-miR-9A repress the expression of the vitelline membrane protein *BmVMP23*, the ecdysone receptor isoform B gene *BmEcR* and the *Bm-ase* gene respectively, through specific binding to their 3′ UTRs [26–28]. In the cotton bollworm *H. armigera*, the *EcR* gene was recently found to be positively regulated by miR-14 [16], while trypsin-like serine protease targeting by har-miR-2002b may result in increased larval weight loss and mortality as well as in reduced fecundity [29]. Surprisingly, miRNAs derived from mulberry, the natural food of the silkworm, were detected in hemolymph and silk gland of the silkworm which suggests a possible cross-kingdom molecular signaling that may coordinate silkworm development [30•].

Recently, another class of small RNAs, the piRNAs, has come up as a critical regulatory factor in several biological processes [31]. In *B. mori*, antisense piRNAs of maternal origin were found to play a crucial role in the control of transposable elements during embryonic development, since they trigger the amplification of specific secondary sense and antisense piRNAs (ping-pong mechanism) and thus inhibit the expression of transposon mRNAs [32]. PiRNAs are not only involved in transposon control but can play crucial roles in developmental processes such as sex determination. A single piRNA precursor gene named *Fem* leading to the production of 29 nt-long piRNAs was indeed recently shown to represent the primary sex-determining factor of *B. mori* [33••,34]. *Fem* piRNAs that are produced by the female-restricted W chromosome, target and cleave mRNAs of *Masculinizer*, which is located on the Z chromosome and encodes a zinc-finger protein that promotes male-specific splicing of *doublesex*, a downstream gene of the sex determination cascade (Figure 1c; [33••,34]).

Systemic RNAi in Lepidoptera: few successes and searches for limiting factors

Systemic RNAi is defined here as the mechanism of gene silencing after injection of dsRNA in the body [35]. In Lepidoptera, gene silencing through injection of dsRNA is reported to have great variability in success [36,37]. In a few cases, successful RNAi experiments *in vivo* have led to important insights in lepidopteran physiology and development (Table 1).

Table 1

Overview of recent successful systemic RNAi experiments in Lepidoptera.

Species	Targeted gene(s)	Targeted tissue	Effect	Reference
Bombyx mori	Homeodomain transcription factors	Epidermis, wing disk	Larva-to-pupa transformation	[68]
Choristoneura fumiferana	Chitin deacetylase	Whole body larvae	Molting	[69]
Helicoverpa armigera	Cytochrome P450 enzyme system	Midgut	Increased larval susceptibility to fenvalerate insecticide	[70]
Helicoverpa armigera	HMG-CoA reductase	Whole body pupae	Inhibition of oviposition	[71]
Sesamia nonagrioides	Juvenile hormone esterase related gene	Whole body larvae and pupae	Regulation of molting and metamorphosis	[60]
Spodoptera exigua	9 genes, including tubulin, chitinase, ARF1, carboxypeptidase, ATPase, helicase	Whole body larvae	Toxicity, mortality	[72]
Spodoptera littoralis	*period* clock gene	Vas deferens *ex vivo*	V-ATPase and pH regulation	[73]

Knockdown is achieved through injection of siRNA [72] or dsRNA (other studies) in the body cavity.

However, the general consensus is that systemic RNAi is not an efficient process in lepidopterans which should stimulate research to define the factors that are limiting for RNAi *in vivo*. Lepidopteran genomes possess homologs of the dsRNA transporter SID-1 (see below), yet insect genomes do not contain RNA-dependent RNA polymerase genes that function as an amplification system in systemic RNAi in worm and plants [38]. An overview of the RNAi-related genes in the monarch butterfly and the silkmoth [39] suggests that systemic RNAi in lepidopterans is feasible, but clearly not sufficient knowledge of the RNAi process *in vivo* has been acquired to explain the relative refractoriness to RNAi in lepidopterans.

DsRNA-degrading and siRNA-degrading enzymes have been proposed to have an impact on the efficiency of RNAi. In a comparative study between insects with high and low RNAi efficiency, the cockroach *Blattella germanica* and the lepidopteran *Manduca sexta*, respectively, it was observed that dsRNA was much more stable in the hemolymph of the cockroach [40•]. Insects and crustaceans also possess a unique group of dsRNA-degrading enzymes ('dsRNases') that are predominantly expressed in gut tissue and are involved in the degradation of nucleic acids in the gut content [41]. In *B. mori*, more widespread expression of dsRNAse in other tissues was observed and *in vitro* assays established that dsRNase could interfere with RNAi efficiency [42].

An obvious barrier to successful systemic RNAi would be the differential uptake of dsRNA by different tissues. Although this property can be studied through the use of fluorescently labeled dsRNA, it may be difficult to interpret data since cells may be able to take up dsRNA efficiently by endocytosis without triggering RNAi [43].

Recent studies have also shed some light in earlier observations showing that non-specific dsRNA can trigger immune response effects in insects, including Lepidoptera [44]. Injection of non-specific dsRNA has been observed to result in the upregulation of RNAi machinery genes such as *dicer-2*, *argonaute-2* and *dsRNase* in *M. sexta* and *B. mori* [45•,46]. In *B. mori*, also a more direct link with the innate immune response was established. Injection of dsRNA could trigger down-regulation of the *Toll9-1* gene, encoding a Toll receptor, in the midgut, where it is predominantly expressed [46]. Interestingly, Toll9-1 has structural features that are similar to the mammalian Toll-like receptor 3, which functions as a pathogen recognition receptor for dsRNA. When Toll9-1 is expressed in Bm5 cells, it causes a shift in the transcriptional response to pathogen-associated molecular patterns such as lipopolysaccharide and dsRNA [47••]. In Toll9-1 expressing cells, the transcriptional response of *dicer-2* to dsRNA is greatly enhanced while the induction of antimicrobial peptide genes is reduced [47••].

As the technique for generation of transgenic silkmoths is available, effective RNAi can be triggered in silkmoth tissues through expression of RNA hairpins [48]. However, this is a time-consuming process that is not yet feasible for other lepidopteran species. Recently, an electroporation-based technique was developed for efficient introduction of short hairpin RNA (shRNA)-expressing vectors or siRNAs into somatic tissues of *Bombyx* and *Papilio xuthus* (Figure 1d; [49•]).

Soaking-mediated RNAi in Lepidopteran cell lines

Incubation with dsRNA in the extracellular medium ('dsRNA soaking') generally does not induce a robust RNAi response in lepidopteran cell lines, in contrast to *Drosophila* S2 cells which have been used for RNAi-based screening of a multitude of physiological processes [50]. Attempts to improve RNAi efficiency in lepidopteran cells have been done employing a major dsRNA-related factor in *Caenorhabditis elegans*, the SID-1 protein [51]. *Sid-1* (systemic RNA interference-deficient 1) gene codes for a multispan transmembrane protein, that facilitates

passive cellular uptake of dsRNA [51]. Efficient soaking RNAi experiments have recently been reported in BmN4 cell lines stably expressing SID-1, where SID-1 expression levels and dsRNA concentration in the extracellular medium constitute critical factors affecting the silencing outcome [52•,53]. Thus, lepidopteran SID-1 stable cell lines may be used as a platform for studying the function of a gene of interest as well as for production of proteins with modified glycosylation patterns using baculovirus/insect cell expression systems (Figure 1e; [54–57]).

Control of lepidopteran pests by RNAi?

RNAi has been proposed and tested as a new strategy to control insect pests, by application of dsRNA molecules that target essential genes in insect tissues to trigger toxic effects. Although proof-of-principle of this strategy was obtained for pests of different insect orders, it is equally realized that only for a few cases of coleopteran insects efficiency levels are sufficiently high for having practical applications. The problems for insect pest control through feeding of dsRNA have been the subject of several excellent reviews (for instance; [58,59]). Here we focus on some recent attempts of RNAi-based technology to control lepidopteran pests.

The primary obstacle for dsRNA in the lepidopteran gut to reach the epithelium is the high alkaline milieu as well as the presence of dsRNA-degrading enzymes. DsRNA that is incubated with gut content is degraded within minutes while greater stability is achieved for hemolymph [42]. To achieve higher efficiency of RNAi, dsRNA could be protected from degradation through incorporation in particles or production in bacteria.

Bacteria that produce dsRNA have been used to achieve gene silencing effects and in some cases toxicity effects in lepidopteran pests after feeding [60–64]. More recently, chitosan-based delivery systems for dsRNA have been developed; while these have been used for oral feeding of dsRNA to shrimp in aquaculture (Figure 1f; [65]), their potential to induce RNAi in insects remains largely unexplored. As proof-of-principle, chitosan formulations with chemically modified siRNAs targeting acetylcholine esterase genes *AChE1* and *AChE2* were shown to have insecticidal effects in *Plutella xylostella* [66•].

Several reports were also published in which transgenic tobacco plants expressing hairpins could induce gene silencing and phenotypic effects in feeding lepidopteran pests [61,62,67]. Although growth on transgenic plants resulted in increased mortality in two studies [61,62], further optimization is necessary for control in field situations.

Conclusions

RNAi research in Lepidoptera is characterized by its diversity, from basic research on the RNAi machinery to applications in pest control. It is expected that basic research will reveal unique features of the RNAi pathway in Lepidoptera. Lepidoptera also can serve as a model to investigate the mechanism of systemic RNAi in insects, such as its link with the antiviral immune response. Greater insight in the relative refractoriness of RNAi in Lepidoptera is needed in order for RNAi to succeed as a viable approach for control of lepidopteran pests.

Acknowledgements

The authors acknowledge support by the General Secretariat for Research and Technology, Hellenic Republic Ministry of National Education and Religious Affairs, in Greece. Anna Kolliopoulou is a recipient of a PhD fellowship from NCSR 'Demokritos'.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- • of special interest
- •• of outstanding interest

1. Cai Y, Zhou Q, Yu C, Wang X, Hu S, Yu J, Yu X: **Transposable-element associated small RNAs in *Bombyx mori* genome**. *PLoS ONE* 2012, **7**:e36599.

2. •• Nie Z, Zhou F, Li D, Lv Z, Chen J, Liu Y, Shu J, Sheng Q, Yu W, Zhang W *et al.*: **RIP-seq of BmAgo2-associated small RNAs reveal various types of small non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori***. *BMC Genomics* 2013, **14**:661.
The classical siRNA pathway protein BmAgo2 was found to bind several types of small non-coding RNAs in silkmoth cells infected with BmNPV. This study gives new perspectives on the complexity of the regulatory network of the various small RNAs in the silkmoth.

3. Li D, Wang Y, Zhang K, Jiao Z, Zhu X, Skogerboe G, Guo X, Chinnusamy V, Bi L, Huang Y *et al.*: **Experimental RNomics and genomic comparative analysis reveal a large group of species-specific small non-message RNAs in the silkworm *Bombyx mori***. *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:3792-3805.

4. •• Kolliopoulou A, Swevers L: **Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkmoth Bm5 cells**. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:654-663.
This study shows for the first time in Lepidoptera a possible overlap of all three core RNAi pathways during the dsRNA-mediated silencing process in silkmoth Bm5 cells.

5. Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y, Abe H, Sugano S, Tomari Y, Shimada T, Katsuma S: **The *Bombyx* ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes**. *RNA* 2009, **15**:1258-1264.

6. Izumi N, Kawaoka S, Yasuhara S, Suzuki Y, Sugano S, Katsuma S, Tomari Y: **Hsp90 facilitates accurate loading of precursor piRNAs into PIWI proteins**. *RNA* 2013, **19**:896-901.

7. Xiol J, Cora E, Koglgruber R, Chuma S, Subramanian S, Hosokawa M, Reuter M, Yang Z, Berninger P, Palencia A *et al.*: **A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing**. *Mol Cell* 2012, **47**:970-979.

8. Honda S, Kirino Y, Maragkakis M, Alexiou P, Ohtaki A, Murali R, Mourelatos Z: **Mitochondrial protein BmPAPI modulates the length of mature piRNAs**. *RNA* 2013, **19**:1405-1418.

9. Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, Hayashi E, Ichisaka T, Kajita S, Asano Y, Kunieda T, Sachidanandam R, Chuma S *et al.*: **Tudor domain containing 12 (TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:16492-16497.

10. Bronkhorst AW, van Rij RP: **The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects**. *Curr Opin Virol* 2014, **7C**:19-28.

11. •• Singh CP, Singh J, Nagaraju J: **A baculovirus-encoded MicroRNA (miRNA) suppresses its host miRNA biogenesis by**

regulating the exportin-5 cofactor Ran. *J Virol* 2012, **86**: 7867-7879.
This article describes for the first time the action of baculovirus-derived miRNAs to down-regulate expression of the miRNA-transport cofactor Ran and the decrease of the host cell-derived miRNA response against baculovirus infection.

12. Singh CP, Singh J, Nagaraju J: **bmnpv-miR-3 facilitates BmNPV infection by modulating the expression of viral P6.9 and other late genes in *Bombyx mori***. *Insect Biochem Mol Biol* 2014, **49**: 59-69.

13. Zhu M, Wang J, Deng R, Xiong P, Liang H, Wang X: **A microRNA encoded by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus regulates expression of viral gene ODV-E25**. *J Virol* 2013, **87**:13029-13034.

14. Jayachandran B, Hussain M, Asgari S: **RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus**. *J Virol* 2012, **86**:13729-13734.

15. Mehrabadi M, Hussain M, Asgari S: **MicroRNAome of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) and its alteration following baculovirus infection**. *J Gen Virol* 2013, **94**:1385-1397.

16. Jayachandran B, Hussain M, Asgari S: **Regulation of *Helicoverpa armigera* ecdysone receptor by miR-14 and its potential link to baculovirus infection**. *J Invertebr Pathol* 2013, **114**:151-157.

17. Wu P, Han S, Chen T, Qin G, Li L, Guo X: **Involvement of microRNAs in infection of silkworm with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV)**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e68209.

18. Wu YL, Wu CP, Liu CY, Hsu PW, Wu EC, Chao YC: **A non-coding RNA of insect HzNV-1 virus establishes latent viral infection through microRNA**. *Sci Rep* 2011, **1**:60.

19. Ge X, Zhang Y, Jiang J, Zhong Y, Yang X, Li Z, Huang Y, Tan A: **Identification of microRNAs in *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* based on deep sequencing and homology analysis**. *Int J Biol Sci* 2013, **9**:1-15.

20. He PA, Nie Z, Chen J, Lv Z, Sheng Q, Zhou S, Gao X, Kong L, Wu X, Jin Y *et al.*: **Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori***. *BMC Genomics* 2008, **9**:248.

21. Jagadeeswaran G, Zheng Y, Sumathipala N, Jiang H, Arrese EL, Soulages JL, Zhang W, Sunkar R: **Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development**. *BMC Genomics* 2010, **11**:52.

22. Liang P, Feng B, Zhou X, Gao X: **Identification and developmental profiling of microRNAs in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e78787.

23. Liu S, Li D, Li Q, Zhao P, Xiang Z, Xia Q: **MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing**. *BMC Genomics* 2010, **11**:148.

24. Zhang X, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Ren R, Sunkar R, Jiang H: **Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta***. *Insect Biochem Mol Biol* 2012, **42**:381-395.

25. Lucas K, Raikhel AS: **Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions**. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:24-38.

26. Chen A, Xia D, Qiu Z, Gao P, Tang S, Shen X, Zhu F, Zhao Q: **Expression of a vitelline membrane protein, BmVMP23, is repressed by bmo-miR-1a-3p in silkworm, *Bombyx mori***. *FEBS Lett* 2013, **587**:970-975.

27. Jiang J, Ge X, Li Z, Wang Y, Song Q, Stanley DW, Tan A, Huang Y: **MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori***. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:692-700.

28. Song F, Huang YC, Wang X, Tang S, Shen X: **Bmo-miR-9A down regulates the expression of Bm-ase gene in vitro**. *Bioorg Khim* 2013, **39**:194-199.

29. Jayachandran B, Hussain M, Asgari S: **An insect trypsin-like serine protease as a target of microRNA: utilization of microRNA mimics and inhibitors by oral feeding**. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:398-406.

30. • He N, Zhang C, Qi X, Zhao S, Tao Y, Yang G, Lee TH, Wang X, Cai Q, Li D *et al.*: **Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis***. *Nat Commun* 2013, **4**:2445.
This paper reports the presence of five predicted mulberry microRNAs in the hemolymph and the silk gland of the silkworm, thus suggesting possible interactions between plant and herbivore that involve the RNAi mechanism.

31. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H: **Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell**. *Int J Mol Sci* 2013, **14**:16010-16039.

32. Kawaoka S, Arai Y, Kadota K, Suzuki Y, Hara K, Sugano S, Shimizu K, Tomari Y, Shimada T, Katsuma S: **Zygotic amplification of secondary piRNAs during silkworm embryogenesis**. *RNA* 2011, **17**:1401-1407.

33. •• Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H, Arai Y, Ishihara G, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T *et al.*: **A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm**. *Nature* 2014, **509**:633-636.
This study highlights the importance of the piRNA pathway in certain regulatory mechanisms. Here, piRNAs that derive from the female-specific W chromosome are identified as the primary sex determination factor in *Bombyx*.

34. Kawaoka S, Kadota K, Arai Y, Suzuki Y, Fujii T, Abe H, Yasukochi Y, Mita K, Sugano S, Shimizu K *et al.*: **The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs**. *RNA* 2011, **17**:2144-2151.

35. Swevers L, Vanden Broeck J, Smagghe G: **The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis**. *Front Physiol* 2013, **4**:319.

36. Swevers L, Liu J, Huvenne H, Smagghe G: **Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkmoth tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and translin**. *PLoS ONE* 2011, **6**:e20250.

37. Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL, Barthel A *et al.*: **RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design**. *J Insect Physiol* 2011, **57**:231-245.

38. Zhuang JJ, Hunter CP: **RNA interference in *Caenorhabditis elegans*: uptake, mechanism, and regulation**. *Parasitology* 2012, **139**:560-573.

39. Zhan S, Merlin C, Boore JL, Reppert SM: **The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration**. *Cell* 2011, **147**:1171-1185.

40. • Garbutt JS, Belles X, Richards EH, Reynolds SE: **Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica***. *J Insect Physiol* 2013, **59**:171-178.
Differences in the stability of dsRNA in hemolymph between the lepidopteran *Manduca sexta* and the cockroach *Blatella germanica* are observed and are proposed to be a factor for differences in RNAi efficiency between both species.

41. Wynant N, Santos D, Verdonck R, Spit J, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J: **Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria***. *Insect Biochem Mol Biol* 2014, **46**:1-8.

42. Liu J, Swevers L, Iatrou K, Huvenne H, Smagghe G: ***Bombyx mori* DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays**. *J Insect Physiol* 2012, **58**:1166-1176.

43. Swevers L, Smagghe G: **Use of RNAi for control of insect crop pests**. In *Arthropod–Plant Interactions: Novel Insights and Approaches for IPM.* Edited by Smagghe G, Diaz I. Dordrecht: Springer, ©2012; 2012:177-197.

44. Hirai M, Terenius O, Li W, Faye I: **Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi***. *Insect Mol Biol* 2004, **13**:399-405.

45. • Garbutt JS, Reynolds SE: **Induction of RNA interference genes by double-stranded RNA; implications for susceptibility to RNA interference**. *Insect Biochem Mol Biol* 2012, **42**:621-628.

In this article, the transcriptional response of *dicer-2* and *argonaute-2* to (non-specific) dsRNA was first demonstrated in the lepidopteran *Manduca sexta*.

46. Liu J, Smagghe G, Swevers L: **Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori***. *J Insect Physiol* 2013, **59**:646-654.

47. •• Liu J, Kolliopoulou A, Smagghe G, Swevers L: **Modulation of the transcriptional response of innate immune and RNAi genes upon exposure to dsRNA and LPS in silkmoth-derived Bm5 cells overexpressing BmToll9-1 receptor**. *J Insect Physiol* 2014.

This study shows for the first time an interaction between RNAi and classical innate immune pathways in Lepidoptera. Expression of BmToll9-1 receptor in Bm5 cells causes an enhancement in the transcriptional response of *dicer-2* to dsRNA while the transcriptional response of antimicrobial genes to LPS was inhibited. Since the BmToll9-1 receptor is expressed at high levels in the gut, it implicates a functional role for this receptor to regulate the interactions with gut bacteria and the response to invading dsRNA virus.

48. Subbaiah EV, Royer C, Kanginakudru S, Satyavathi VV, Babu AS, Sivaprasad V, Chavancy G, Darocha M, Jalabert A, Mauchamp B *et al.*: **Engineering silkworms for resistance to baculovirus through multigene RNA interference**. *Genetics* 2013, **193**:63-75.

49. • Ando T, Fujiwara H: **Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects**. *Development* 2013, **140**:454-458.

This study presents a novel low cost method to obtain efficient transformation of somatic tissues of larvae and is also used to efficiently introduce shRNA-expressing vectors or siRNAs to somatic insect tissues. This method represents a valuable alternative to obtain robust systemic RNAi effects in Lepidoptera.

50. Perrimon N, Mathey-Prevot B: **Applications of high-throughput RNA interference screens to problems in cell and developmental biology**. *Genetics* 2007, **175**:7-16.

51. Feinberg EH, Hunter CP: **Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1**. *Science* 2003, **301**:1545-1547.

52. • Kobayashi I, Tsukioka H, Komoto N, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Kusakabe T, Tomita S: **SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells**. *Insect Biochem Mol Biol* 2012, **42**:148-154.

In this study the *Sid-1* gene from *C. elegans* was expressed in silkworm cells to confer to them the ability to internalize dsRNA from the extracellular medium and cause gene-specific silencing.

53. Mon H, Kobayashi I, Ohkubo S, Tomita S, Lee J, Sezutsu H, Tamura T, Kusakabe T: **Effective RNA interference in cultured silkworm cells mediated by overexpression of *Caenorhabditis elegans* SID-1**. *RNA Biol* 2012, **9**:40-46.

54. Mon H, Li Z, Kobayashi I, Tomita S, Lee J, Sezutsu H, Tamura T, Kusakabe T: **Soaking RNAi in *Bombyx mori* BmN4-SID1 cells arrests cell cycle progression**. *J Insect Sci* 2013, **13**:155.

55. Nagata Y, Lee JM, Mon H, Imanishi S, Hong SM, Komatsu S, Oshima Y, Kusakabe T: **RNAi suppression of beta-N-acetylglucosaminidase (BmFDL) for complex-type N-linked glycan synthesis in cultured silkworm cells**. *Biotechnol Lett* 2013, **35**:1009-1016.

56. Xu J, Mon H, Kusakabe T, Li Z, Zhu L, Iiyama K, Masuda A, Mitsudome T, Lee JM: **Establishment of a soaking RNA interference and *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)-hypersensitive cell line using Bme21 cell**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**:10435-10444.

57. Xu J, Nagata Y, Mon H, Li Z, Zhu L, Iiyama K, Kusakabe T, Lee JM: **Soaking RNAi-mediated modification of Sf9 cells for baculovirus expression system by ectopic expression of *Caenorhabditis elegans* SID-1**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**:5921-5931.

58. Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE: **Towards the elements of successful insect RNAi**. *J Insect Physiol* 2013, **59**:1212-1221.

59. Zhang H, Li HC, Miao XX: **Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control**. *Insect Sci* 2013, **20**:15-30.

60. Kontogiannatos D, Swevers L, Maenaka K, Park EY, Iatrou K, Kourti A: **Functional characterization of a juvenile hormone esterase related gene in the moth *Sesamia nonagrioides* through RNA interference**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e73834.

61. Xiong Y, Zeng H, Zhang Y, Xu D, Qiu D: **Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development**. *Int J Biol Sci* 2013, **9**:370-381.

62. Zhu JQ, Liu S, Ma Y, Zhang JQ, Qi HS, Wei ZJ, Yao Q, Zhang WQ, Li S: **Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR**. *PLoS ONE* 2012, **7**:e38572.

63. Yang J, Hang Z-j: **Efficiency of different methods for dsRNA delivery in cotton bollworm**. *J Integr Agric* 2014, **13**:115-123.

64. Yang J, Hang Z-j: **Optimisation of RNA interference-mediated gene silencing in *Helicoverpa armigera***. *Austr Entomol* 2014, **53**:83-88.

65. Theerawanitchpan G, Saengkrit N, Sajomsang W, Gonil P, Ruktanonchai U, Saesoo S, Flegel TW, Saksmerprome V: **Chitosan and its quaternized derivative as effective long dsRNA carriers targeting shrimp virus in *Spodoptera frugiperda* 9 cells**. *J Biotechnol* 2012, **160**:97-104.

66. • Gong L, Chen Y, Hu Z, Hu M: **Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e62990.

Efficient delivery methods are essential for the development of RNAi as a method for insect pest control. Chitosan-based nanoparticles have been used to deliver dsRNA to shrimp in aquaculture but their capacity to deliver toxic dsRNA to insect pests remains largely unexplored. This article describes successful delivery and toxic effects of chitosan-based particles loaded with chemically synthesized siRNA in the lepidopteran pest *Plutella xylostella*.

67. Kumar P, Pandit SS, Steppuhn A, Baldwin IT: **Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**:1245-1252.

68. Deng H, Zhang J, Li Y, Zheng S, Liu L, Huang L, Xu WH, Palli SR, Feng Q: **Homeodomain POU and Abd-A proteins regulate the transcription of pupal genes during metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:12598-12603.

69. Quan G, Ladd T, Duan J, Wen F, Doucet D, Cusson M, Krell PJ: **Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference**. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:683-691.

70. Tang T, Zhao C, Feng X, Liu X, Qiu L: **Knockdown of several components of cytochrome P450 enzyme systems by RNA interference enhances the susceptibility of *Helicoverpa armigera* to fenvalerate**. *Pest Manage Sci* 2012, **68**:1501-1511.

71. Wang Z, Dong Y, Desneux N, Niu C: **RNAi silencing of the HaHMG-CoA reductase gene inhibits oviposition in the *Helicoverpa armigera* cotton bollworm**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e67732.

72. Li H, Jiang W, Zhang Z, Xing Y, Li F: **Transcriptome analysis and screening for potential target genes for RNAi-mediated pest control of the beet armyworm**. *PLOS ONE* 2013, **8**:e65931.

73. Kotwica-Rolinska J, Gvakharia BO, Kedzierska U, Giebultowicz JM, Bebas P: **Effects of period RNAi on V-ATPase expression and rhythmic pH changes in the vas deferens of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:522-532.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Transcriptome Analysis of *Bombyx mori* Larval Midgut during Persistent and Pathogenic Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Infection

Anna Kolliopoulou[1], Filip Van Nieuwerburgh[2], Dimitrios J. Stravopodis[3], Dieter Deforce[2], Luc Swevers[1]*, Guy Smagghe[4]*

1 Insect Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Aghia Paraskevi, Athens, Greece, **2** Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium, **3** Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens, Greece, **4** Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

* swevers@bio.demokritos.gr (LS); guy.smagghe@ugent.be (GS)

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Kolliopoulou A, Van Nieuwerburgh F, Stravopodis DJ, Deforce D, Swevers L, Smagghe G (2015) Transcriptome Analysis of *Bombyx mori* Larval Midgut during Persistent and Pathogenic Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Infection. PLoS ONE 10(3): e0121447. doi:10.1371/journal.pone.0121447

Academic Editor: Alexander W. E. Franz, University of Missouri, UNITED STATES

Received: June 11, 2014

Accepted: February 12, 2015

Published: March 27, 2015

Copyright: © 2015 Kolliopoulou et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All sequence files from the mRNA and small RNA libraries are available from the European Nucleotide Archive database (accession number PRJEB7502). All other relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors acknowledge support by the Research Council of Ghent University (BOF—UGent, Belgium) (www.ugent.be, Belgium), the Fund for Scientific Research—Flanders (FWO—Vlaanderen, Belgium) (www.fwo.be), and the General Secretariat for Research and Technology, Hellenic Republic

Abstract

Many insects can be persistently infected with viruses but do not show any obvious adverse effects with respect to physiology, development or reproduction. Here, *Bombyx mori* strain Daizo, persistently infected with cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV), was used to study the host's transcriptional response after pathogenic infection with the same virus in midgut tissue of larvae persistently and pathogenically infected as 2nd and 4th instars. Next generation sequencing revealed that from 13,769 expressed genes, 167 were upregulated and 141 downregulated in both larval instars following pathogenic infection. Several genes that could possibly be involved in *B. mori* immune response against BmCPV or that may be induced by the virus in order to increase infectivity were identified, whereas classification of differentially expressed transcripts (confirmed by qRT-PCR) resulted in gene categories related to physical barriers, immune responses, proteolytic / metabolic enzymes, heat-shock proteins, hormonal signaling and uncharacterized proteins. Comparison of our data with the available literature (pathogenic infection of persistently vs. non-persistently infected larvae) unveiled various similarities of response in both cases, which suggests that pre-existing persistent infection does not affect in a major way the transcriptome response against pathogenic infection. To investigate the possible host's RNAi response against BmCPV challenge, the differential expression of RNAi-related genes and the accumulation of viral small RNAs (vsRNAs) were studied. During pathogenic infection, siRNA-like traces like the 2-fold up-regulation of the core RNAi genes *Ago-2* and *Dcr-2* as well as a peak of 20 nt small RNAs were observed. Interestingly, vsRNAs of the same size were detected at lower rates in persistently infected larvae. Collectively, our data provide an initial assessment of the relative significance of persistent infection of silkworm larvae on the host response following

Ministry of National Education and Religious Affairs, in Greece (www.gsrt.gr). Anna Kolliopoulou is a recipient of a PhD fellowship from NCSR "Demokritos". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The author GS of the submitting paper is editor for PLOS ONE and this does not alter the author's adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

pathogenic infection with CPV, while they also highlight the relative importance of RNAi as an antiviral mechanism.

Introduction

Interest in viruses originates mainly from their role as pathogens that can cause significant disease in hosts. Regarding pathogenic infections in insects, virus research focuses on the protection of beneficial insects such as the honeybee, *Apis mellifera*, and the silkworm, *Bombyx mori*, against virus infection [1, 2] as well as on the improvement of the use of viruses to control agricultural pests [3]. In addition, many research activities focus on the transmission by mosquitoes of arbovirus infections that cause disease in humans and livestock [4, 5].

With the advent of next generation sequencing technologies, however, it has been realized that many insect species can be persistently infected with viruses that do not cause an obvious adverse symptom or abnormal phenotype [6, 7]. In contrast to acute infections, which are limited in time, resulting either in clearance of the virus or death of the host, persistent infections can be maintained in the hosts for very long periods and transmitted to the offspring [8]. With time, mutualistic relationships can even be developed between host and virus and, in some cases, it has been documented that viral genes and mechanisms are adopted by the host for its own benefit, for instance in the immune response [9]. Of great interest are also arbovirus infections in mosquito vectors, which can be considered as persistent infections where both mosquito vector and virus need to survive for a sufficient time to allow transmission to the vertebrate link in the infection cycle [10]. Also honeybee populations can be persistently infected with multiple viruses without affecting the health of the colony [11]. However, bee viruses are often mentioned as one of the multifactorial causes of the decline of honeybee colonies [12] and it can therefore be hypothesized that persistent infections could turn pathogenic in conditions of increased stress. Because of their prevalence, persistent infections deserve more attention with respect to alterations in the physiology of the host, such as the immune response, and to conditions that could turn apparently harmless persistent infections into disease.

B. mori cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV), a reovirus characterized by a segmented dsRNA genome, is a major pathogen of the silkworm [13]. In contrast to baculovirus infections, which can spread efficiently throughout the body and are very virulent to the host, CPV infections are mostly or exclusively limited to the midgut tissue, cause less damage and therefore have a propensity to become persistent [14]. During our research with BmCPV, it was noticed that our laboratory strain of silkworm, Daizo, was persistently infected with BmCPV. Despite the infection, however, animals appeared healthy, showed normal growth and metamorphosis, and produced batches of fertilized eggs of typical size. Because of this observation, we considered the persistently infected silkworm strain as an interesting experimental model to investigate the (alteration of the) transcriptional response after feeding of a high dose of BmCPV polyhedra that caused clear pathogenic effects. Several studies concerning the transcriptional responses to BmCPV infection can be found in literature; however, these responses were recorded in larvae for which no persistent infection was reported [15–18]. Another study was focused on the miRNAs' differential expression during BmCPV infection [19].

In our study, deep sequencing (Illumina) technology was applied to obtain an initial assessment of the transcriptional response in silkworm larvae that were persistently or pathogenically infected with BmCPV. Instead of having different biological replicates at a single developmental stage, it was decided in this explorative study to compare the transcriptional responses

between persistently and pathogenically infected animals at two different developmental stages (2nd and 4th larval instars) and to focus on genes that become differentially expressed irrespective of the developmental stage. The identification of differentially expressed genes was subsequently validated by qRT-PCR experiments on samples obtained from 2nd instar larvae. Despite the limitation of the deep sequencing analysis (data from four unique samples, corresponding to persistent or pathogenic infection in the 2nd or 4th instar), it is believed that valuable preliminary data were obtained that will stimulate further research. It is noted that a similar format of experimental design was applied to the study of differentially expressed microRNAs (miRNAs) after BmCPV infection [19].

Our study establishes a considerable overlap in the transcriptional response to BmCPV during a pathogenic infection of persistently infected silkworm larvae with the transcriptional response documented in the above mentioned studies where no persistent infection was reported. In addition, we focused on the involvement of the RNA interference (RNAi) machinery during BmCPV infection, which has not received much attention in previous BmCPV-related studies. Although RNAi has been considered as the most important antiviral response in *Drosophila* and mosquitoes [20–22], in insects of other groups, such as the honeybee or the silkworm, its involvement in antiviral defense remains largely unknown. Attention is therefore paid to the transcriptional response of RNAi machinery genes during a pathogenic BmCPV infection as well as to the detection of virus-derived small RNAs (vsRNAs).

Materials and Methods

Silkworm rearing and infection with BmCPV

The larvae of *B. mori*, Daizo strain, were reared on artificial diet (Yakuruto, Tokyo, Japan) at 25°C under a photoperiod of 12 h light and 12 h dark. For pathogenic infection with BmCPV, aliquots of artificial diet were treated with 50 μl of a concentrated solution of polyhedra of BmCPV (3.25×10^7 polyhedra/ml) and fed to 2nd instar (N = 30) or 4th instar larvae (N = 30), 1–2 days after molt. Successful pathogenic infection was indicated by retardation of growth and confirmed by detection of polyhedra by means of optical microscopy as well as by gene-specific RT-PCR for *polyhedrin* (see Results and Discussion section). Midgut and body wall tissue was collected from pathogenically infected larvae at 10–20 days after feeding of BmCPV polyhedra. The same tissues were also collected from control (persistently infected) larvae at a similar stage.

RNA extraction and reverse-transcription PCR (RT-PCR)

Tissues were homogenized in TRI Reagent (Sigma, Saint Louis, MO) and total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol. The quantity of extracted RNA was assessed with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) and/or by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels. RNA for specific detection of BmCPV *polyhedrin* was first mixed with DMSO at 1:1 ratio and heated at 50°C for 45 minutes for denaturation of dsRNA BmCPV genome. One microgram of total RNA was used as template for first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis as performed by a Revert Aid reverse transcriptase (Thermo Scientific). Random hexamers (Thermo Scientific) were utilized as primers for cDNA templates of quantitative RT-PCR, whereas BmCPV segment 10-specific primer 5'-AGGATCATGGCAGACGTAGC-3' was used to synthesize cDNA templates for *polyhedrin*-specific RT-PCR. Viral *polyhedrin* was detected using the same RT primer as forward primer and 5'-TAGGCGTTCGGCGAAATGT-3' as reverse primer, under the following cycling conditions: 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and 72°C for 45 s (40 cycles).

Deep sequencing of RNA samples from midguts of pathogenically and persistently infected larvae

The four RNA samples that were prepared for deep sequencing analysis were derived from midgut tissue of persistently ("control") and pathogenically infected 2nd instar larvae (2c and 2inf), as well as of persistently ("control") and pathogenically infected 4th instar larvae (4c and 4inf). RNA quantifications were performed using Qubit fluorometry (Life technologies, Carlsbad, CA).

For each sample, an Illumina mRNA sequencing library was made from 100 ng of total RNA using the TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA), whereas approximately 500 ng of total RNA was used to create a small RNA library using the TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina). The 4 mRNA and the 4 small RNA libraries were each equimolarly pooled and sequenced in one lane of an Illumina HiSeq 2000 flowcell, generating 1 x 50 bp reads. After sequencing, the data was demultiplexed using the sample specific nucleotide barcodes. On average, 30 x 10^6 mRNAs were generated. The mRNA and small RNA differential expression analysis was performed using CLC bio (Qiagen, Venlo, The Netherlands). All reads were trimmed for Illumina adapter sequences.

The mRNA reads were mapped to the *Bombyx* annotated genome (Kaikobase: http://sgp.dna.affrc.go.jp/pubdata/genomicsequences.html) [23]. For the 2inf, 2c, 4inf and 4c mRNA samples, the percentage of mapped reads was 24%, 37%, 29% and 36%, respectively. The lower percentages of reads that were mapped in the infected samples likely reflect the predominance of transcripts that could be mapped to the viral genome, which illustrates the severity of the infection in those samples. The number of mRNA reads that mapped to a transcript was divided by the transcript length and normalized per sample by the number of mapped reads to calculate the RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) expression values for each gene, thus making possible the direct comparison of differential expression among samples [24, 25]. Because of the lack of biological repeats, we did not use T statistics to identify significant differentially expressed genes. Instead, we filtered the RNA-seq data according to the following criteria: (i) total gene reads count resulting from all 4 libraries should be more than 10, and (ii) selected transcripts should present at least a 2-fold RPKM change ($|\log2Ratio| \geq 1$) between pathogenically and persistently infected in both library pairs (2inf/2c, 4inf/4c) towards the same direction, i.e. up- or down-regulation [26, 27]. These criteria therefore ensure, first, that all relevant genes including those with low, but significant, expression level are evaluated, and, second, that a significant change in expression occurs that is independent of the developmental stage of the infected larvae.

Regarding small RNAs, after trimming, more than 95% of the original number of reads was used for small RNA tag counting. Approximately 15% of the tags had a count lower than 5 and these were discarded. The remaining tags were counted and annotated using the *Bombyx* miRNA miRBASE 19 database. The small RNAs that did not map against the *Bombyx* miRNA miRBASE 19 database were subsequently mapped against the BmCPV genome to find vsRNAs originating from the virus. Small RNA length distribution graphs were produced in R [28] by use of the viRome package (http://www.ark-genomics.org/bioinformatics/virome). The sequences from the mRNA and small RNA libraries of all 4 samples were submitted to the European Nucleotide Archive (Accession Number PRJEB7502).

Gene Ontology (GO) analysis

A list of sequences that were identified as differentially expressed between persistently and pathogenically infected larvae (see Results and Discussion section) were analyzed for GO annotation [http://www.geneontology.org [29]]. Sequences were identified based on the annotated

gene set at Kaikobase and genes resulting from the homology searches were used as input in DAVID [http://david.abcc.ncifcrf.gov [30]].

Real-time quantitative RT-PCR

Real-time qRT-PCR was performed in a Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with MxPro QPCR Software (Agilent Technologies) using KAPA SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA), gene-specific primers at a final concentration of 0.55 μM each and 12.5 ng of midgut cDNA template. Relative transcript levels were normalized to the expression level of the cellular *actin* gene. PCR cycling started with initial activation of KAPA SYBR FAST Master Mix polymerase at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 5 s, 59 or 60°C for 30 s and 72°C for 5 s. Forward and reverse primers to detect specific transcripts (S1 Table) were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems/Life Technologies). Relative expression levels of target gene (X) were calculated in relation to the transcription levels of the *actin* reference gene (R), as $2^{-\Delta Ct}$, where $\Delta C_t = C_t^X - C_t^R$.

Results and Discussion

Persistent (non-pathogenic) infection of silkworm with BmCPV

To verify infection of silkworm larvae with BmCPV, we performed RT-PCR with gene-specific primers for the viral *polyhedrin* gene. The samples tested corresponded to RNA collected from body wall, midgut, midgut content and feces. For pathogenic infections (2inf and 4inf samples), *polyhedrin* product was detected at high levels in all samples analyzed (midgut tissue, midgut content, feces and body wall; Fig. 1). However, rather high amounts of *polyhedrin* RNA could also be detected in the midgut content of the control (not pathogenically infected) 2nd instar larvae (2c sample) and low levels were also present in the midgut tissue (both 2nd and 4th instar stages; Fig. 1). In addition, cDNA samples derived from the eggs of the same strain as the larvae (Daizo) were also positive for *polyhedrin* RNA, in contrast to the eggs of the P50 strain, which gave no PCR product (Fig. 1). PCR products obtained from control midguts (4th instar) and

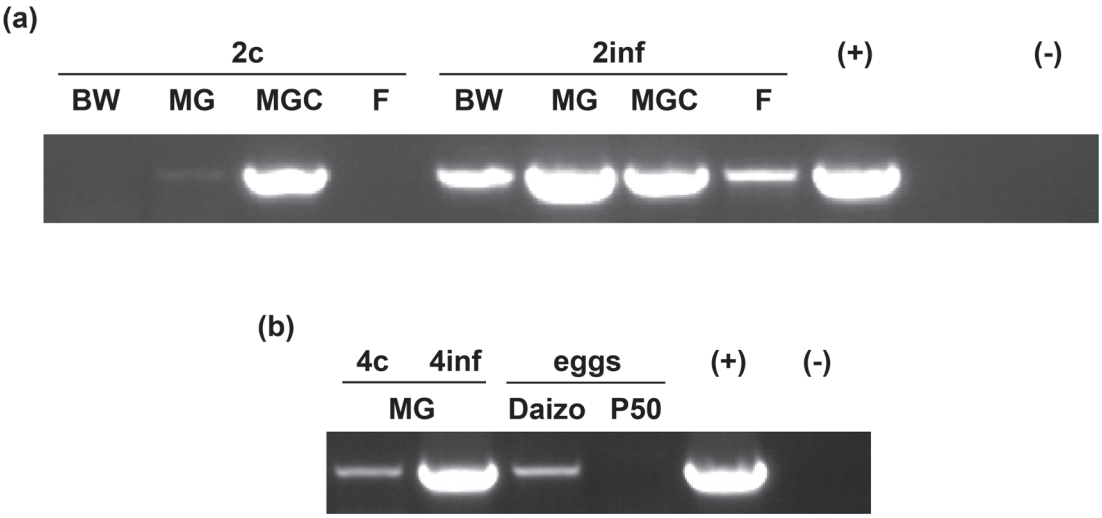


Fig 1. Detection of BmCPV *polyhedrin* by RT-PCR in persistently and pathogenically infected silkworm tissues and eggs. *Polyhedrin* RT-PCR was performed using samples derived from larvae persistently and pathogenically infected (a) at the 2nd or (b) the 4th instar (2c, 2inf, 4c and 4inf samples), as well as from Daizo and P50 silkworm strain-derived eggs. *Polyhedrin* PCR product with a size of 689 nucleotides was obtained after 40 cycles of PCR. Abbreviations: BW: body wall, MG: midgut, MGC: midgut content, F: feces, (+): positive control (BmCPV polyhedra), (-): negative control (water sample).

doi:10.1371/journal.pone.0121447.g001

Daizo eggs were validated by sequencing to correspond to BmCPV *polyhedrin*. The detection of *polyhedrin* RNA in midgut tissue and eggs of animals of the Daizo strain in our colony is indicative of a persistent state of infection by BmCPV.

Thus, larvae of the Daizo strain that were pathogenically infected in our study with BmCPV were already persistently infected with the same virus at low levels. This persistent state of infection was not visibly correlated with pathogenic effects, as larvae apparently grew, molted and metamorphosed normally. It should also be mentioned that polyhedra were never detected in any control animal under normal rearing following microscope observation. Furthermore, RT-PCR experiments revealed the presence of *polyhedrin* RNA mainly in the midgut content of control larvae and only traces in the midgut tissue itself (Fig. 1), which suggests that in persistently infected larvae, the infection of the midgut tissue (epithelium and associated muscle and connective tissue) is efficiently cleared, thus preventing the occurrence of pathogenic defects. This contrasts to the situation in pathogenically infected larvae, where high amounts of *polyhedrin* RNA were detected in the midgut tissue (Fig. 1), being indicative of high levels of viral replication/production (see further below). Finally, virus-derived small RNAs (vsRNAs) were detected in both persistently and pathogenically infected larvae (Fig. 2; see also Detection and preliminary analysis *of vsRNAs* paragraph); however, the detection levels in the control larvae were minimal, further corroborating the low levels of viral RNA in persistently infected tissues.

Oral infection of silkworm larvae with BmCPV polyhedra

Persistently infected larvae of Daizo strain were pathogenically infected through the oral route with 5.5 x 10^4 polyhedra per larva. At the time of infection, the larvae were at the beginning of the 2nd or the 4th instar developmental stage. The infection was verified macroscopically by observation of the infected larvae (S1 Fig.), as well as microscopically by detection of viral polyhedra in the larval midgut tissue (S2 Fig.). As shown for a representative group of persistently and pathogenically infected larvae in S1 Fig., the sizes of the pathogenically infected larvae varied notably among several individuals. This phenomenon was observed in both 2nd and 4th instar infected larvae. However, polyhedra could be detected in larvae of all sizes, indicating that the impact of the infection on body size did not correlate with the presence of infection.

According to the literature, BmCPV targets epithelial midgut cells and is not expected to expand all over the larval body. Nevertheless, following observation of several larval organs under the microscope, we have detected polyhedra also in the interior of the body wall, as well as in the hemolymph (S2 Fig.).

Transcriptome analysis of larval midgut samples

RNA-seq was used to analyze midgut samples from silkworm larvae infected in the 2nd and 4th instar stage, in order to detect differentially expressed transcripts during persistent and pathogenic BmCPV infection. Deep sequencing was carried out on samples from two different developmental stages to identify transcripts that are differentially expressed irrespective of the developmental stage, instead of having biological replicates at the same stage of development. Transcriptome analysis resulted in the identification of 13,769 expressed genes over all 4 RNA samples (S1 Dataset). Filtering of RNA-seq data according to the criteria outlined in *Materials and Methods* section resulted in 167 up-regulated and 141 down-regulated transcripts in both instars (Fig. 3; S2 and S3 Datasets).

According to GO analysis of the 308 differentially expressed transcripts, 201 were found to have a GO annotation and were initially categorized in the three main GO functional groups,

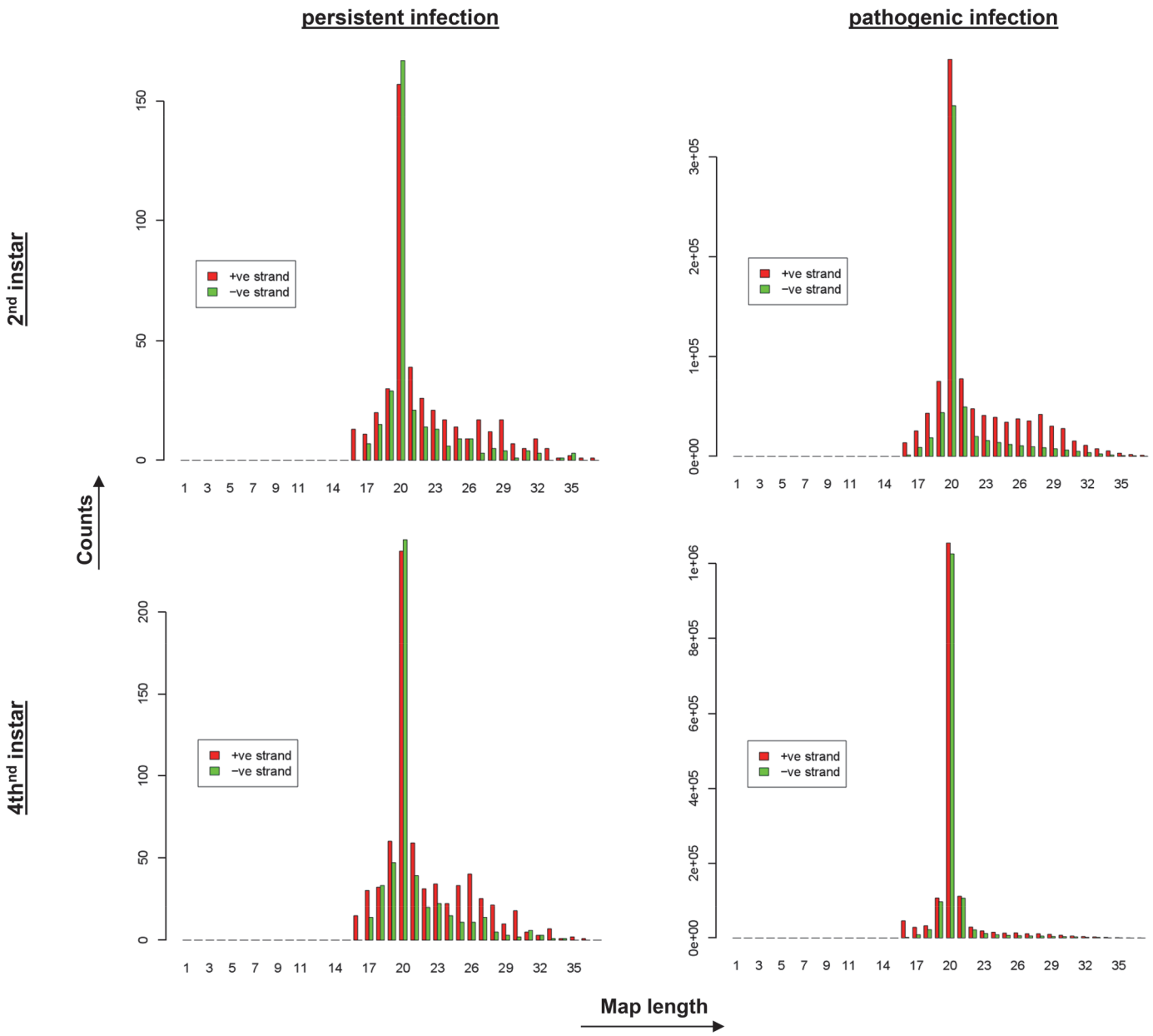


Fig 2. Size distribution of viral small RNA (vsRNA) reads in persistently and pathogenically BmCPV-infected midgut tissue. Graphs represent read counts that match to the positive or negative strand of BmCPV in persistently and pathogenically infected midguts of 2nd and 4th instar larvae. Numbers of reads (counts) are plotted against the length of the vsRNAs. A clear peak of 20 nt is observed in all samples. Please note also the differences in read counts between persistently (150–200 scale) and pathogenically infected samples (3 x 10^5–1 x 10^6 scale).

doi:10.1371/journal.pone.0121447.g002

i.e. biological process, molecular function and cellular component. Genes belonging to each group were further classified at level 2 for each functional group (Fig. 4).

Gene transcripts found to have at least one"biological process" annotation (426), were further classified in 17 subgroups, with the most important of them belonging to metabolic process (21.1%), cellular process (18.3%), single-organism process (15%), response to stimulus (10.6%) and multicellular organismal process (10.1%) (Fig. 4; S3 Fig.). Of note is that the category "immune system process" was poorly represented. Gene transcripts with annotations of molecular function (265) were further classified in 10 categories, among which catalytic activity

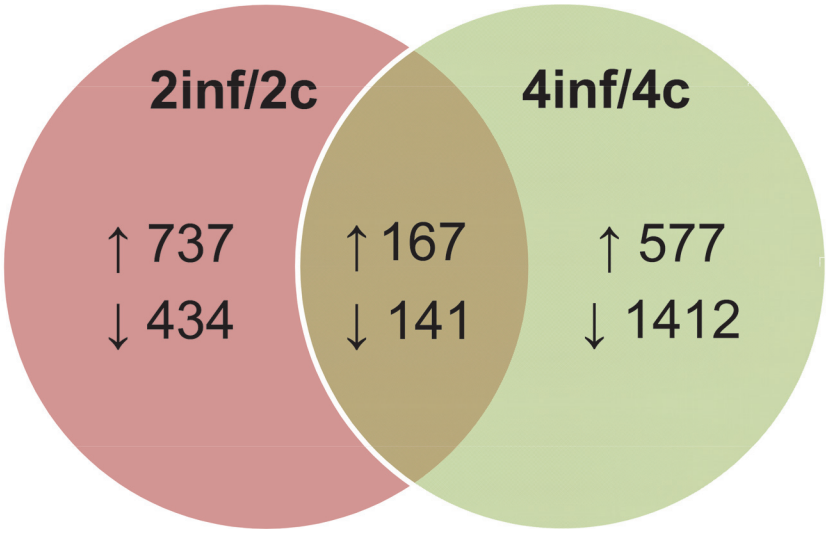


Fig 3. Differentially expressed genes following pathogenic infection in midgut, as determined by deep sequencing analysis. Numbers of up-regulated and down-regulated genes are indicated, after comparison of RPKMs of identified genes between 2inf and 2c libraries (2nd instar), and between 4inf and 4c libraries (4th instar). The numbers of genes that were up-regulated or down-regulated in both developmental stages are indicated in the section of the two diagrams.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.g003

(36.6%) and binding (36.2%) represented the most numerous groups. It should be noted that different polymerase (including RNA-directed DNA polymerase), nucleic acid binding and nuclease activities had high rankings (Fig. 4; S3 Fig.). Finally, 117 gene sequences were annotated as cellular components and were further categorized in 8 groups. Membrane (38.5%), cell (25.6%), extracellular region (14.5%) and organelle (12%) were the four main groups (Fig. 4; S3 Fig.).

Differentially expressed genes and their possible connection to a BmCPV-specific antiviral response

Several genes possibly implicated in silkworm's response against BmCPV infection were found by deep sequencing to be highly differentially expressed between persistently and pathogenically infected samples (S2 and S3 Datasets). Some of the most interesting genes were further validated by qRT-PCR (Fig. 5; S4 Fig.). These genes fall in several categories, i.e. physical barriers, immune responses, proteolytic enzymes, heat-shock proteins (Table 1), metabolic enzymes, hormonal signaling and uncharacterized, as outlined in detail in Table 2. Together, they constitute a complex response to BmCPV infection in the silkworm larvae.

In the literature, several reports exist with respect to the transcriptome response to BmCPV infection using larvae without persistent virus infections [15–18]. Table 3 presents a list of all differentially expressed genes obtained from previously published studies and from our study. This list contains only genes of which the differential expression was confirmed by qRT-PCR. In accordance with all four studies, down-regulation of expression of several digestive enzymes was noted; an induction of a small set of immune response genes, of which *insulin-binding protein 2* (*ibp2*) gene was identified as significantly induced in three independent studies ([16, 18]; our study); an induction of the apoptosis pathway or repression of apoptosis inhibitors in four studies ([15–17]; our study) was shown, as well as a role for remodeling of the midgut epithelium during infection (Table 3). For the latter process, it has been speculated that the induction of the cuticle protein-like gene *CPH43*, as observed in our study, plays a role. In two studies,

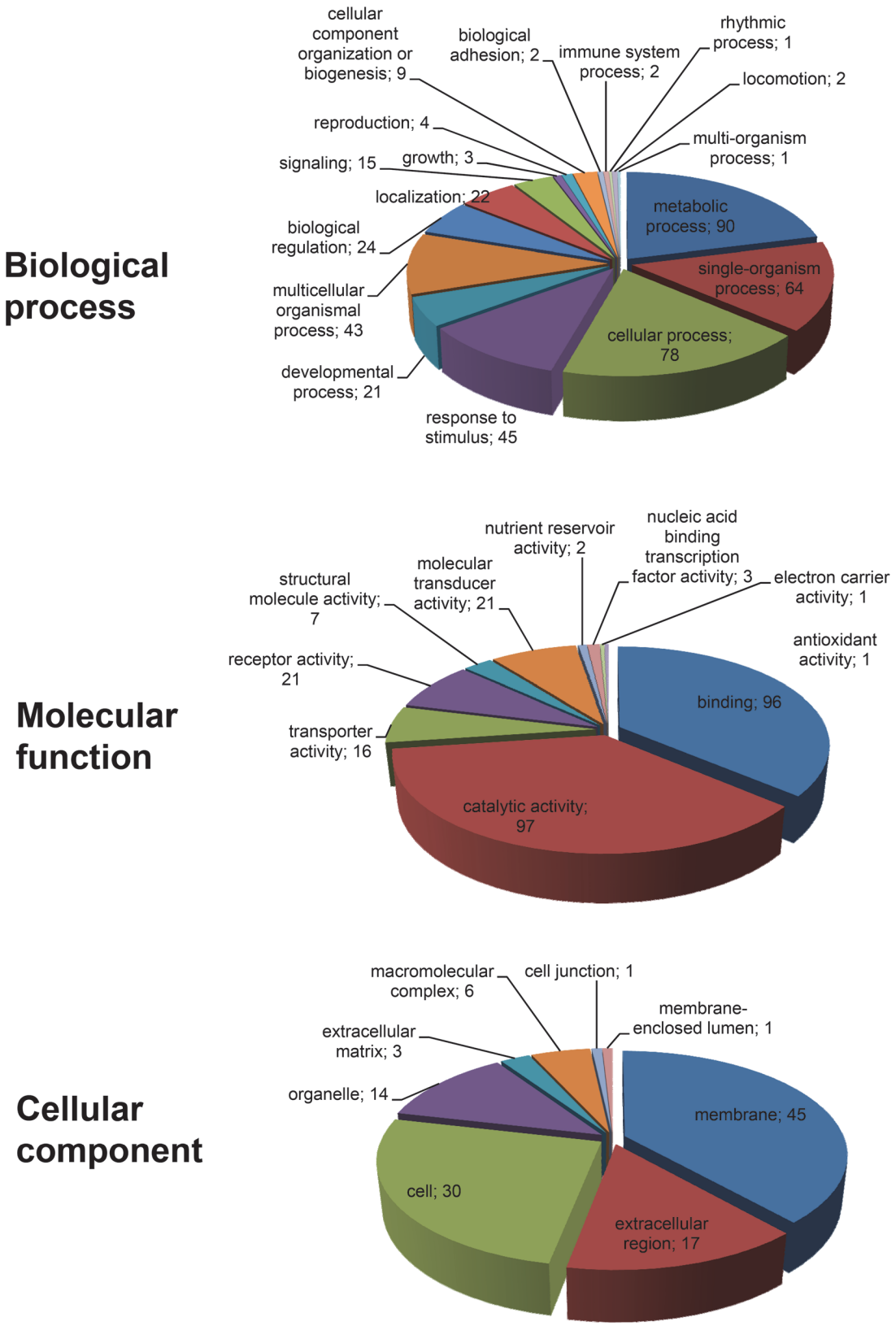


Fig 4. Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes in pathogenically infected larvae. Genes that were differentially expressed during pathogenic infection at both 2nd and 4th instar developmental stages were analyzed using GO tools and categorized according to biological process, molecular function and cellular component classes. The numbers of genes that could be assigned to the different categories are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.g004

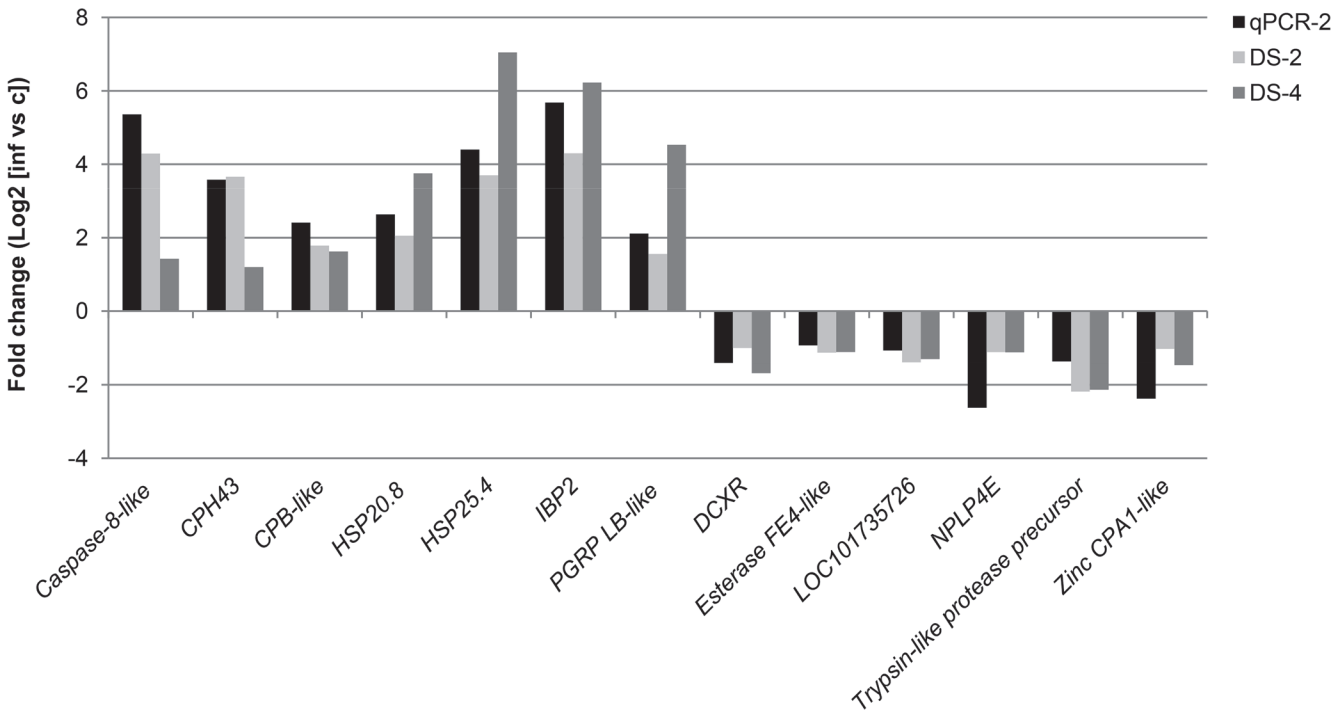


Fig 5. Expression levels of selected genes from pathogenically infected midguts as analyzed by deep sequencing and validated by qRT-PCR. Indicated is the fold change in expression of selected genes between persistent and pathogenic infection as obtained by qRT-PCR on 2nd instar samples (qPCR-2) or by deep sequencing on both 2nd and 4th instar samples (DS-2 and DS-4, respectively). Selected genes belong to the group with highest difference in expression between persistent and pathogenic infection. Please note that fold changes are expressed as log2 values (a 2-fold up- or down-regulation corresponds to a log2 value of 1 or -1, respectively). See Table 2 for further explanation on gene identity and function.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.g005

Table 1. Relative RPKMs of genes coding for heat-shock proteins (HSPs).

Name	Gene ID	2inf vs 2c RPKM	4inf vs 4c RPKM
HSP19.9	BGIBMGA004540	**8.18**	**20.38**
HSP20.8	BGIBMGA004605	**4.14**	**13.48**
HSP70	BGIBMGA006313	**2.11**	**1.97**
	BGIBMGA004614	**2.37**	**2.19**
HSP70, HSC70	BGIBMGA002381	0.96	0.98
sHSP 19.1	BGIBMGA004606	0.88	**2.10**
sHSP 19.5	BGIBMGA013545	**0.58**	**8.33**
sHSP 20.2	BGIBMGA005784	**4.52**	na
sHSP 20.4	BGIBMGA004541	**2.71**	na
sHSP 21.4	BGIBMGA000944	1.02	1.02
sHSP 22.6	BGIBMGA004103	1.03	1.15
sHSP 23.8	BGIBMGA004515	**2.78**	**1.88**
sHSP 24.2	BGIBMGA005780	**3.01**	0.75
sHSP 26.6	BGIBMGA005755	**2.09**	**2.18**
sHSP 27.4	BGIBMGA005823	**1.97**	**5.26**
sHSP 42.3	BGIBMGA004101	0.99	**0.44**

Ratios of RPKM values from pathogenically versus persistently infected midgut tissue of 2nd and 4th instar larvae obtained by deep sequencing analysis (2c, 2inf, 4c and 4inf samples) are presented for heat-shock protein genes. Genes presenting higher than 1.5-fold up- or down-regulation are marked with bold letters. Abbreviation: na: not applicable.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.t001

Table 2. Selected highly differentially expressed genes following pathogenic infection of midgut tissue.

Category/ Name	Known/ Possible function
Physical barrier	
CPH43	putative cuticle gene; involved in larval molting [31]
Immune responses	
IBP2	highly homologous to IGFBP7 in vertebrates (tumor-suppressive function leading to apoptosis); involved in immune and endocrine responses [32–37]
	insulin signaling pathway is reported to be involved in the defense against pathogens in *C. elegans* [38]
	vertebrate insulin activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the mosquito gut; has an antiviral role in *Drosophila* cells and insect gut epithelium [39]
PGRP LB-like	behaves as an amidase; hydrolyzes Gram$^-$ bacteria peptidoglycan and is activated by them; indirectly acts as negative regulator of the IMD pathway, thus balancing homeostasis and immune response activation [40, 41]
Proteolytic enzymes	
Caspase-8-like	death receptor-associated initiator caspase-8 is expected to be activated upon reovirus infection in the case of reovirus-induced apoptosis [42–45]
CPB	up-regulated in the midgut of *Anopheles gambiae* mosquitoes infected with *Plasmodium falciparum* parasite, significantly reduced growth and development of rodent parasite *P. berghei* in mosquitos fed on infected mice immunized against CPB [46]
Trypsin-like protease precursor	alkaline protease; active in the silkworm midgut alkaline environment; participates in the hydrolysis of incoming food and probably also of viral polyhedra, thus mediating release of occluded viruses and infection of midgut columnar epithelial cells [47]
	trypsin-like protease is down-regulated in BmDNV-Z and BmNPV-infected silkworm strains susceptible to the respective viruses, up-regulated in BmNPV-infected silkworm strain [47, 48]
	facilitates DENV-2 virus infection in *Aedes aegypti* [49]
Zinc carboxypeptidase A1-like (CPA1)	Metallocarboxypeptidase ACI, a zinc carboxypeptidase A1 (CPA1) inhibitor, is expressed by *Ascaris* (human intestinal parasite) to enhance its survival during infection [50]
Heat-shock proteins	
HSPs; HSCs	molecular chaperones in various cellular processes; danger signals thus activating host immune response [51, 52]
	HSPs and HSCs are necessary for efficient BmNPV proliferation in *Bombyx* cells as well as for PCV2 virus expansion in porcine cells [53–55]
	sHSPs are induced in BmCPV-infected larval midguts [18]
	Hsp25 has antiviral role in reovirus-infected murine cells [56]; *HSC70* is up-regulated in BmCPV-infected silkworms (72hpi) [18]; Hsc70t and HSP105 are induced by reovirus infection in murine cells [57]
Metabolic enzymes	
DCXR	converts L-xylulose in xylitol (carbohydrate metabolism); reduces the highly reactive α-dicarbonyl compounds (DCs) with endogenous/ xenobiotic origin (detoxifying enzyme) [58]
	DHS-21 (DCXR ortholog) is essential for normal life-span and reproduction of *C. elegans* [59]
Esterase FE4-like	esterases hydrolyze and inactivate insecticides (insecticide resistance), but also metabolize pathogen-secreted toxic compounds (host response) [60]; as counter-mechanism, pathogens may synthesize inhibitors against such esterase function to cause down-regulation of esterase genes
Hormonal signaling	
NPLP4E	neuropeptides: signaling molecules playing key roles in insects due to their involvement in developmental, reproductive, metabolic and behavioral processes; expressed in several tissues (brain, epidermis, ovary, prothoracic gland); possibly involved in molting regulation [61]
	NPLP4E maybe carries out additional functions in the midgut (here was first detected to be expressed) [31, 62]
Uncharacterized	
LOC101735726	possible role in the physiological process of DNA replication and maintenance (S5 Fig.) which may be hindered due to BmCPV presence in the midgut

The list represents genes with high differential expression levels during pathogenic infection detected by deep sequencing analysis that were also validated by qRT-PCR. The selected genes are categorized according to their function. Relevant studies representing similar responses to infection are also listed.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.t002

Table 3. Classification of genes that are induced or repressed following pathogenic BmCPV infection: comparison among different relevant studies.

Genes	SH (p50) [17]	MA (p50) [18]	DS (4008) [15]	DS (4008) [16]	DS (p50) [16]	DS (Daizo) our study
digestive enzymes (proteases, lipases, nucleases)						
Acidic lipase			↓			
Alkaline nuclease	↑					
Chymotrypsin-like			↓		↓	
Hemocyte protease-2		↑				
Insect intestinal lipase-6					↓	
Lipase-1		↑	↓		↓	
Pancreatic lipase-like					↑	
Serine protease	↓					
Trypsin-like	↓					↓
Zinc carboxypeptidase A1						↓
detoxification/metabolism						
Antennal esterase CXE14			↓			
Aquaporin				↑		
Cytochrome P450		↑				
Dicarbonyl/L-xylulose reductase						↓
Esterase FE4						↓
Farnesyl diphosphate synthase				↑		
Fatty acid binding protein			↓			
Similar to carboxylesterase		↓				
Sugar transporter			↓			
Putative galactose UDP 4-epimerase			↑			
stress response						
eIF-4E-1						↑
HSP 20.8						↑
HSP 23.7		↑				
HSP25.4						↑
signaling						
Calreticulin			↑			
Coiled-coil & C2 domain-containing 2A					↑	
Ecdysteroid-22 kinase				↑		
Farnesoic acid O-methyltransferase			↑			
FK506-binding protein precursor			↑			
GTP:AMP phosphotransferase		↓				
GTP-binding protein RAB2				↑		
Inorganic phosphate transporter 1			↓			
Juvenile hormone diol kinase		↑			↑	
Neuropeptide-like 4E (NPLP4E)						↓
Palmityl transferase (P260)				↓	↓	
Protein kinase C inhibitor			↑			
Troponin-C					↑	
immune response						
Antitrypsin precursor		↓				
Insulin-binding protein 2		↑			↑	↑
Peptidoglycan recognition protein LB-like						↑
Serpin-5		↑				

(*Continued*)

Table 3. (*Continued*)

Genes	SH (p50) [17]	MA (p50) [18]	DS (4008) [15]	DS (4008) [16]	DS (p50) [16]	DS (Daizo) our study
Serpin-28				↑		
Thioredoxin-like				↑		
Tumor necrosis factor 13 (TNFSF13)				↑		
RNAi						
Argonaute-2						↑
Dicer-2						↑
apoptosis						
Carboxypeptidase B						↑
Caspase-8						↑
Inhibitor-of-apoptosis	↓					
Programmed cell death protein 5			↑			
Putative apoptosis inhibitor 5				↓		
30K protein 26					↓	
ubiquitin-proteasome						
Goliath E3 ubiquitin ligase				↑		
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1-like				↑		
midgut remodeling—cuticle						
CPH43						↑
Urbain precursor				↑		
37 kDa protease precursor				↑		
iron metabolism						
Ferritin	↑					
Transferrin				↑	↑	
ribosomal proteins						
L11	↑					
P0		↑				
unknown						
LOC101735726						↓
Protein KGM_04122					↓	
Protein KGM16290					↓	
Similar to CG10527					↑	
Similar to CG8927				↑		
Unknown secreted protein			↑			
30 kDa protein					↑	

Only genes confirmed by qRT-PCR (more than 2-fold difference in response) are shown. Induced and repressed genes are marked with up and down arrows respectively. Empty cells indicate that the particular gene was not tested by qRT-PCR for differential expression in the particular study. Abbreviations: SH: subtractive hybridization, MA: microarray, DS: deep sequencing. P50, 4008 and Daizo refer to silkworm strains.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.t003

induction of the stress response, represented by small heat-shock protein genes (Table 1), was observed ([18]; our study). The two studies by Gao et al. [15, 16] also emphasized the possible role of the calcium-signaling pathway to induce apoptosis in infected cells, but the calcium signaling pathway genes were not among the most differentially genes that were analyzed by qRT-PCR in the other studies.

The differences in transcriptional response among the four studies can be explained by the use of different silkworm strains, stage of infection and time of collection of infected samples. Gao et al. [16] compared the transcriptional response to BmCPV between a relatively resistant

(p50) and a susceptible (4008) silkworm strain and found important differences in the response to virus infection. Of interest, it was observed that *ibp2* gene was induced at high levels only in the resistant strain. Therefore it was considered as a gene involved in resistance against BmCPV. The observation of induction of *ibp2* during pathogenic infection in our study suggests the existence of an active antiviral resistance mechanism during persistent infection with BmCPV.

Transcriptional response of RNAi-related genes to infection with BmCPV in *B. mori*

As outlined in the introduction, a second goal in our study was to assess the RNAi response during a persistent and pathogenic infection with BmCPV since this response did not receive much attention in previous studies. Therefore, the transcriptional response of RNAi-related genes in the host tissues was examined, while the production of vsRNAs was also investigated.

It is well known that in *Drosophila* and mosquitoes, the siRNA pathway (and piRNA pathway in mosquitoes) can play an active role in the defense against exogenous invading single-stranded and double-stranded RNAs [63]. Due to the fact that the BmCPV genome consists of 10 segments of dsRNA, it was speculated that it could act as a target for the RNAi mechanism during the establishment of pathogenic BmCPV infection in *Bombyx* larvae. Therefore, it would be interesting to investigate whether pathogenic infection could up-regulate the expression of RNAi-related genes as an antiviral response mechanism during pathogenic infection.

Following application of the BLASTP algorithm in the NCBI database on the *B. mori* genome, as well as use of the BLAST tool in the www.silkdb.org database, homologs (annotated or not) of several RNAi-related genes originally implicated in the RNAi process in other organisms were identified in the silkworm's genome (for a discussion of different categories of RNAi-related genes, see [64]). Deep sequencing data were then analyzed to pinpoint alterations of the expression of RNAi-related genes following a pathogenic infection with BmCPV. The expression of several core RNAi genes and additional RNAi-related factors (Table 4) was further confirmed by qRT-PCR in 2nd instar midgut cDNA samples (Fig. 6; S6 Fig.).

Three genes of the Argonaute family (i.e. *Ago1*, *Ago2* and *Ago3* that represent the miRNA, siRNA and piRNA pathway, respectively), as well as *Dcr2* from the siRNA pathway, are considered as core RNAi genes in *B. mori*, since inhibition of their expression by use of the "RNAi-of-the RNAi" method caused a significant impediment of the silencing potency in the silkworm-derived Bm5 cells [65]. In addition, several other core RNAi genes, such as *Aubergine* (*SIWI;* piRNA pathway) and *Loquacious* (dsRNA binding protein; miRNA pathway), were also analyzed in the deep sequencing database and by qRT-PCR (Table 4; Fig. 6; S6 Fig.).

Regarding the siRNA pathway, the genes *Ago2* and *Dcr2*, which are well known to be responsible for the defense against exogenous dsRNAs in *Drosophila*, showed a ~2-fold up-regulation in expression during the pathogenic infection (Table 4; Fig. 6; S6 Fig.). The piRNA pathway gene *Aubergine* was found to be 1.5-fold up-regulated in the 4th instar animals after feeding with polyhedra; however, this result was not confirmed for the 2nd instar stage. Also for *Loquacious* (miRNA pathway), no important differential expression between the two types of infection was observed (Table 4; Fig. 6; S6 Fig.).

Apart from the core RNAi components, additional RNAi-related genes were selected [64]. Tudor staphylococcus / micrococcal nuclease (Tudor-SN) and eukaryotic initiation factor-4E1 (eIF-4E1) were recently shown to constitute core factors for the formation of stress granules (SGs) in silkworm BmN4 cells, while they possibly also interact with Ago1 and Ago2 proteins of the miRNA and the siRNA pathway, respectively [66]. Tudor-SN expression was not notably altered after a pathogenic infection with BmCPV (Table 5; Fig. 6; S6 Fig.). Interestingly,

Table 4. Relative RPKMs of genes coding for core RNAi factors.

Core RNAi factors	2inf vs 2c RPKM	4inf vs 4c RPKM
miRNA pathway		
Pasha (part 1)	0.86	1.19
Pasha (part 2)	0.81	1.18
Dicer-1-like (part 1)	0.97	0.96
Dicer-1-like (part 2)	1.03	0.91
Loquacious	0.94	1.28
Argonaute 1	1.12	1.20
siRNA pathway		
Dicer 2 (part 1)	**2.20**	**2.08**
Dicer 2 (part 2)	**2.01**	**1.97**
R2D2	1.20	1.06
Argonaute 2	**1.98**	1.48
piRNA pathway		
Argonaute 3	1.10	0.89
Piwi/ Aubergine	1.20	**1.54**

Ratios of RPKM values from pathogenically versus persistently infected midgut tissue of 2nd and 4th instar larvae obtained by deep sequencing analysis (2c, 2inf, 4c and 4inf samples) are presented for selected genes belonging to the miRNA, siRNA and piRNA pathways. Genes presenting higher than 1.5-fold up- or down-regulation are marked with bold letters.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.t004

however, the expression level of *eIF-4E1* was up-regulated during the pathogenic infection (from 2- to 8-fold, depending on the technique used and the sample; Table 5; Fig. 6; S6 Fig.). The increase of the relative mRNA level could be due to the general stress state caused by the infection, or due to a special role of *eIF-4E1* in the midgut response.

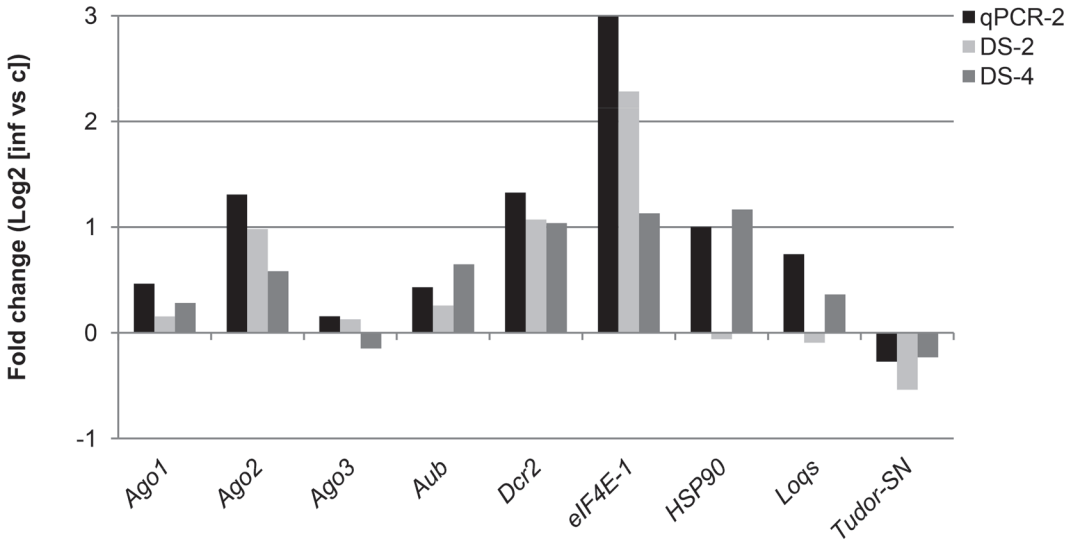


Fig 6. Expression levels of RNAi-related genes from pathogenically infected midguts as analyzed by deep sequencing and validated by qRT-PCR. Indicated is the fold change in expression of selected genes between persistent and pathogenic infection as obtained by qRT-PCR on 2nd instar samples (qPCR-2) or by deep sequencing on both 2nd and 4th instar samples (DS-2 and DS-4, respectively). Please note that fold changes are expressed as log2 values (a 2-fold up- or down-regulation corresponds to a log2 value of 1 or -1, respectively). See Table 5 and [64] for further explanation on gene identity and function.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.g006

Table 5. Relative RPKMs of RNAi-related genes.

RNAi factors	Closest homolog in B. mori	GenBank Accession Number	Gene ID	2inf vs 2c RPKM	4inf vs 4c RPKM
Intracellular auxiliary factors					
Arginine methyltransferase PRMT5 (dPRMT5, also called capsuleen or dart5)	protein arginine N-methyltransferase 5-like isoform X1 or X2 (predicted)	XP_004928553.1/ XP_004928554.1	BGIBMGA007842	1.11	1.46
Armitage	probable RNA helicase armi-like (predicted)*	XP_004933936.1	BGIBMGA005056	1.13	0.95
ATP-dependent RNA helicase Belle	ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform X1 or X2 (predicted)	XP_004924684.1/ XP_004924685.1	BGIBMGA007594	1.05	1.26
Clp1 homolog (kinase)	protein CLP1 homolog (predicted)	XP_004923397.1	BGIBMGA004784	1.03	1.20
Drosophila homolog of p68 RNA helicase	DEAD box polypeptide 5 isoform 1 or 2	NP_001037582.1/ NP_001166829.1	BGIBMGA011746	1.31	1.42
	DEAD box polypeptide 5 isoform 1 or 2	NP_001037582.1/ NP_001166829.1	BGIBMGA011754	1.12	1.15
	DEAD box polypeptide 5 isoform 1 or 2	NP_001037582.1/ NP_001166829.1	BGIBMGA011965	1.05	1.22
	DEAD box polypeptide 5 isoform 1 or 2	NP_001037582.1/ NP_001166829.1	BGIBMGA012013	0.88	0.87
Elp-1	elongator complex protein 1	NP_001182006.1	BGIBMGA001538	0.94	0.97
Eukaryotic initiation factor 4E-1	eukaryotic initiation factor 4E-1	NP_001091832.1	BGIBMGA012675	**4.89**	**2.16**
Gawky CG31992-PA (similar)	trinucleotide repeat-containing gene 6B protein-like (predicted)/ protein Gawky-like (predicted)	XP_004922030.1/ XP_004922029.1	BGIBMGA005589	1.12	0.90
Gemin 3 homolog	probable ATP-dependent RNA helicase DDX20-like (predicted)	XP_004931522.1	BGIBMGA011804	0.77	1.41
HEN1	small RNA 2'-O-methyltransferase-like (predicted)	XP_004928786.1	BGIBMGA007679	1.21	0.79
Homeless (spindle-E)	probable ATP-dependent RNA helicase spindle-E-like (predicted)	XP_004924494.1	BGIBMGA004949	0.92	1.43
Maelstrom	protein maelstrom homolog (predicted)	XP_004928380.1	BGIBMGA008424	1.08	1.32
Putative translin-associated factor X	translin-associated protein X-like (predicted)	XP_004927402.1	BGIBMGA004644	nd	nd
Staufen	maternal effect protein staufen-like (predicted)	XP_004932448.1	BGIBMGA002695	1.12	0.88
Translin	translin	ABD36365.1	BGIBMGA009726	1.07	1.38
Tudor-SN	tudor staphylococcus/micrococcal nuclease	NP_001182009.1	BGIBMGA013328	0.69	0.85
Vasa intronic gene (VIG)	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein-like	NP_001266293.1	BGIBMGA006704	1.07	0.86
DsRNA uptake					
CG4966 (orthologous to the Hermansky- Pudlak Syndrome 4, HPS4)	uncharacterized protein LOC101743016 (predicted)*	XP_004923697.1	BGIBMGA009850	1.16	**0.51**
Eater	neurogenic locus notch homolog protein 1-like (predicted) *	XP_004931260.1	BGIBMGA002383	1.33	0.79
FBX011 ortholog	F-box only protein 11-like isoform X1 or X2 (predicted)	XP_004924574.1/ XP_004924575.1	BGIBMGA005003	1.09	1.12
Scavenger receptor SR-C-like protein	scavenger receptor type C precursor	NP_001128387.1	BGIBMGA004577	**2.15**	**0.33**

(*Continued*)

Table 5. (*Continued*)

RNAi factors	Closest homolog in B. mori	GenBank Accession Number	Gene ID	2inf vs 2c RPKM	4inf vs 4c RPKM
Sid-1-like protein 1	sid-1-related gene 1 precursor/ low quality protein: SID1 transmembrane family member 1 (predicted)	NP_001106735.1 / XP_004930735.1	BGIBMGA011251	1.14	0.95
	sid-1-related gene 1 precursor	NP_001106735.1	BGIBMGA011160	0.92	0.87
	sid-1-related gene 1 precursor	NP_001106735.1	BGIBMGA011161	0.71	1.15
	low quality protein: SID1 transmembrane family member 1 (predicted)	XP_004930735.1	BGIBMGA011250	0.99	1.08
Sid-1-like protein 2	sid-1-like protein 2	BAF95807.1	BGIBMGA011251	1.14	0.95
Sid-1-like protein 3	sid-1-related gene 3 precursor	NP_001106736.1	BGIBMGA005847	0.93	0.84
Antiviral RNAi					
Ars2	low quality protein: serrate RNA effector molecule homolog (predicted)	XP_004930189.1	BGIBMGA003480	0.94	1.08
CG4572	venom serine carboxypeptidase-like (predicted)	XP_004929002.1	BGIBMGA013085	1.01	**1.85**
Egghead	glycosyltransferase precursor	NP_001243979.1	BGIBMGA001169	1.34	1.52
NinaC	myosin-IIIa-like (predicted)	XP_004930229.1	BGIBMGA003454	1.46	0.67
Nucleases					
dsRNase	alkaline nuclease precursor	NP_001091744.1	BGIBMGA001173	**0.55**	0.85
Exosome	PM-Scl autoantigen-like protein	NP_001108472.1	BGIBMGA000626	1.34	0.77
Nibbler	probable exonuclease mut-7 homolog (predicted)	XP_004931095.1	BGIBMGA002947	0.84	0.94
Poly(A) polymerase (Pla1 homolog *Schizosaccharomyces*)	poly(A) polymerase gamma-like isoform X1 (predicted)	XP_004923145.1	BGIBMGA000084	1.29	1.02
Sdn1-like (small RNA-degrading nuclease 1)	putative RNA exonuclease NEF-sp-like (predicted)	XP_004931480.1	BGIBMGA011782	0.84	1.31
Other factors					
Exportin-5	exportin-5-like (predicted)	XP_004928015.1	BGIBMGA001123	0.92	1.02
HSP90	HSP90, partial	AEB39782.1	BGIBMGA004612	0.96	**2.24**

Ratios of RPKM values from pathogenically versus persistently infected midgut tissue of 2nd and 4th instar larvae obtained by deep sequencing analysis (2c, 2inf, 4c and 4inf samples) are presented for selected genes with a role in the RNAi mechanism. Listed are intracellular auxiliary factors, dsRNA uptake genes, antiviral RNAi genes, nucleases and unclassified factors [64]. Genes presenting higher than 1.5-fold up- or down-regulation are marked with bold letters. Abbreviation: nd: not detected.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.t005

Heat shock protein 90 (HSP90) is an important factor that lately has emerged as a key piRNA pathway regulator. HSP90 was shown to take part in the piRNA pathway in BmN4 cells, more specifically in the recruitment of precursor piRNA molecules by the PIWI proteins [67, 68]. Although deep sequencing analysis showed a >2-fold up-regulation of *HSP90* in the 4th instar library of pathogenically infected midgut tissue, this was not confirmed in the respective 2nd instar sample (Table 5; Fig. 6; S6 Fig.). These data indicate that the role of HSP90 is relatively minor in this type of infection, in sharp contrast to other HSPs as shown in Tables 1–3.

Regarding genes involved in dsRNA uptake, *CG4572* and *HPS4* only showed clear differential expression between pathogenic and persistent infection in the 4th instar animals. Also for the moderately expressed *scavenger receptor-C* (*SR-C*), no clear differential expression was observed (Table 5).

Alteration in immune gene expression after infection with BmCPV

Genes belonging to innate immunity pathways were identified and analyzed regarding their possible differential expression upon infection (Table 6). Although differences were observed, these could often not be considered as biologically important because of low expression levels (RPKMs). However, a few exceptions were noted, such as the 2-fold down-regulation of *Toll6* and of one *Attacin1* homologue, as well as the 2-fold up-regulation of *beta-1,3-glucan recognition protein 2* gene in pathogenically infected larvae. The expression of *cecropins* (A, B and E) also tended to be up-regulated during the pathogenic infection. On the other hand, *Toll9-1*, which was previously found to be down-regulated by exogenous dsRNA application [69], was not differentially expressed in any of the two pathogenically infected midgut samples.

Detection and preliminary analysis of viral small RNAs (vsRNAs)

Deep sequencing was also used for the analysis of the small RNAs in samples of persistently and pathogenically infected larvae. Filtering of the small RNAs for reads that map to the BmCPV genome resulted in a total of 4,487,417 reads for all 4 samples. When the number of reads of the vsRNAs was plotted against their length, a clear peak of 20 nt vsRNAs equally distributed between both genomic dsRNA strands appeared in all 4 samples. As expected, vsRNA reads were highly abundant in pathogenically infected midguts, while for persistently infected samples their abundance was notably low. The peak of 20 nt corresponds to 749,372 and 2,079,497 reads for the 2inf and 4inf samples, respectively, while for the control samples 2c and 4c the small RNA counts were 324 and 481, respectively (Fig. 2).

These data clearly indicate that the RNAi machinery is responding to BmCPV infection and that the abundance of produced vsRNAs is correlated with the severity of the infection. Further analysis of the vsRNA data such as the mapping of the vsRNAs to viral dsRNA genome segments to detect hot-spots of small RNA production and to identify differences in vsRNAs between persistently and pathogenically infected animals is currently being carried out (manuscript in preparation). The observation that the vsRNAs mapped equally to sense and antisense strands of the dsRNA genome (Fig. 2) strongly indicates that the dsRNA genome segments, rather than structured dsRNA regions of viral (sense) mRNAs, are the source for production of vsRNAs by Dicer enzymes. Further studies are required to establish the functionality of the vsRNAs and to investigate whether differences in activity exist between vsRNAs produced in persistently versus pathogenically infected animals as well as between different regions of the viral dsRNA genome (cold-spots versus hot-spots).

Conclusions

In this work, the discovery of persistent BmCPV infection of our silkworm laboratory colony provided an opportunity to compare the transcriptional response to pathogenic infection with that occurring in non-persistently infected larvae, as described in the literature. Our conclusions can be summarized as follows:

1. The transcriptional response against pathogenic BmCPV infection is complex and suggests the involvement of several mechanisms, including RNAi.
2. Pre-existing persistent infection does not profoundly affect the antiviral response against pathogenic infection with the same virus, as documented by our analysis in comparison to previously reported studies.
3. Detection of vsRNAs by deep sequencing indicates the activation of the RNAi response to both persistent and pathogenic infection of BmCPV.

Table 6. Relative RPKMs of innate immune genes.

Description	Gene ID	2inf RPKM	2c RPKM	4inf RPKM	4c RPKM	inf Means	c Means	2inf vs 2c RPKM	4inf vs 4c RPKM
Toll pathway									
MYD88	BGIBMGA002869	9.68	8.97	7.46	8.64	8.57	8.80	1.08	0.86
RelA	BGIBMGA010496	1.49	1.35	0.89	1.04	1.19	1.20	1.10	0.85
RelB	BGIBMGA010497	1.83	1.38	1.24	1.21	1.54	1.30	1.32	1.03
Toll3-1	BGIBMGA014370	2.53	2.75	2.84	2.65	2.68	2.70	0.92	1.07
Toll3-2	BGIBMGA014373	23.77	25.15	25.60	36.49	24.68	30.82	0.95	0.70
Toll3-2	BGIBMGA014372	0.17	0.24	0.05	0.19	0.11	0.22	0.70	**0.24**
Toll3-3	BGIBMGA010304	0.04	0.05	0.02	0.04	0.03	0.05	0.75	**0.44**
Toll6	BGIBMGA011084	0.68	1.27	0.06	0.11	0.37	0.69	**0.54**	**0.53**
Toll7-1/7-2	BGIBMGA011037	1.56	1.12	0.37	0.20	0.97	0.66	1.40	**1.90**
Toll7-2	BGIBMGA011034	3.53	3.75	2.09	2.46	2.81	3.10	0.94	0.85
Toll7-3	BGIBMGA011038	0.64	0.32	0.00	0.02	0.32	0.17	**1.98**	0.00
Toll8	BGIBMGA011085	1.25	0.77	1.31	1.18	1.28	0.97	1.63	1.12
Toll9-1	BGIBMGA011216	17.21	16.50	20.90	30.49	19.05	23.49	1.04	0.69
Toll9-2	BGIBMGA008840	0.53	0.55	0.44	1.25	0.48	0.90	0.96	**0.35**
Toll10-2	BGIBMGA011025	1.85	2.28	0.50	0.28	1.17	1.28	0.81	**1.75**
Toll10-3	BGIBMGA011082	6.02	6.30	2.76	1.38	4.39	3.84	0.96	**2.00**
Toll12	BGIBMGA006244	0.81	0.96	0.29	0.10	0.55	0.53	0.84	**2.96**
Tube	BGIBMGA002494	11.09	10.93	8.48	9.71	9.78	10.32	1.01	0.87
Imd pathway									
Ikkβ	BGIBMGA008389	21.76	22.15	15.64	18.38	18.70	20.26	0.98	0.85
Imd	BGIBMGA003655	2.42	2.30	1.75	2.20	2.08	2.25	1.05	0.79
Relish1	BGIBMGA002465	6.44	5.83	4.27	4.10	5.36	4.97	1.10	1.04
Relish1	BGIBMGA002464	1.16	1.31	3.01	3.74	2.08	2.53	0.88	0.80
Tak1	BGIBMGA008980	7.20	6.79	4.51	5.21	5.86	6.00	1.06	0.87
PPO pathway									
Prophenoloxidase activating enzyme	BGIBMGA013746	0.25	0.12	0.17	0.39	0.21	0.26	**2.11**	**0.44**
Serine protease inhibitor	BGIBMGA009047	11.71	11.48	32.27	27.01	21.99	19.25	1.02	1.19
Serine protease inhibitor 6	BGIBMGA007729	1.57	1.52	1.03	0.48	1.30	1.00	1.03	**2.16**
Pattern recognition receptor									
C-type lectin 10	BGIBMGA006768	1.40	2.27	0.25	0.12	0.83	1.19	**0.62**	**2.14**
C-type lectin 21	BGIBMGA002288	0.23	0.29	0.23	0.11	0.23	0.20	0.79	**2.14**
Beta-1,3-glucan recognition protein 2	BGIBMGA011609	3.28	1.72	1.26	0.46	2.27	1.09	**1.91**	**2.74**
Peptidoglycan recognition protein (PGRP-L2)	BGIBMGA000584	2.92	2.67	1.81	2.58	2.36	2.63	1.09	0.70
Peptidoglycan recognition protein S6	BGIBMGA012866	0.52	0.29	0.38	0.29	0.45	0.29	**1.83**	1.32
Antimicrobial peptide									
Attacin1	BGIBMGA002739	0.72	0.19	0.27	0.00	0.50	0.10	**3.77**	na
Attacin1	BGIBMGA002747	0.86	2.29	0.14	0.31	0.50	1.30	**0.38**	**0.44**

(*Continued*)

Table 6. (*Continued*)

Description	Gene ID	2inf RPKM	2c RPKM	4inf RPKM	4c RPKM	inf Means	c Means	2inf vs 2c RPKM	4inf vs 4c RPKM
CecropinA, CecropinB	BGIBMGA000024	0.22	0.22	0.11	0.00	0.16	0.11	1.00	na
	BGIBMGA000036	1.18	0.78	0.00	0.00	0.59	0.39	**1.51**	na
	BGIBMGA000037	6.12	3.54	0.00	0.00	3.06	1.77	**1.73**	na
	BGIBMGA000021	23.38	8.49	0.00	0.00	11.69	4.24	**2.75**	na
	BGIBMGA000038	2.15	0.78	0.00	0.00	1.07	0.39	**2.76**	na
	BGIBMGA000023	0.00	0.52	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	na
CecropinA, CecropinE	BGIBMGA006280	3.16	1.90	2.45	0.22	2.80	1.06	**1.67**	**11.18**
Defensin	BGIBMGA014360	0.00	0.16	0.08	0.11	0.04	0.14	**0.00**	**0.66**
Gloverin	BGIBMGA013866	0.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.16	**0.00**	na
	BGIBMGA013864	5.89	5.69	5.98	7.29	5.94	6.49	1.04	0.82
	BGIBMGA013863	0.17	0.37	0.21	0.19	0.19	0.28	**0.46**	1.10
Gloverin 2	BGIBMGA005658	1.52	1.53	12.97	8.28	7.25	4.91	0.99	**1.57**
Gloverin 3	BGIBMGA013803	0.06	0.08	0.17	0.13	0.11	0.10	0.75	1.32
Gloverin 4	BGIBMGA013865	0.16	0.14	0.05	0.11	0.10	0.13	1.13	**0.44**
Hemolin	BGIBMGA008736	0.11	0.44	0.22	0.31	0.16	0.37	**0.26**	0.69
Lebocin 1/2/3/4	BGIBMGA006775	0.22	1.15	1.24	0.79	0.73	0.97	**0.19**	**1.58**
Lysozyme	BGIBMGA007458	0.63	0.66	0.17	0.43	0.40	0.55	0.95	**0.39**
Moricin	BGIBMGA011495	0.67	0.44	0.11	0.33	0.39	0.39	**1.51**	**0.33**
JAK/STAT pathway									
STAT	BGIBMGA001739	4.04	3.35	4.10	4.36	4.07	3.86	1.21	0.94

Ratios of RPKM values from pathogenically versus persistently infected midgut tissue of 2nd and 4th instar larvae obtained by deep sequencing analysis (2c, 2inf, 4c and 4inf samples) are presented for selected genes involved in innate immunity pathways. Listed are genes belonging to Toll, Imd, PPO and JAK/STAT pathways, as well as genes encoding pattern recognition receptors and antimicrobial peptides. Genes presenting higher than 1.5-fold up- or down-regulation are marked with bold letters. Abbreviation: na: not applicable.

doi:10.1371/journal.pone.0121447.t006

Supporting Information

S1 Dataset. Expression data of all genes detected in the database obtained from deep sequencing of persistently and pathogenically infected midgut tissue of 2nd and 4th instar larvae (2c, 2inf, 4c and 4inf libraries). Shown are RPKMs for each gene in each individual library (after trimming), as well as their average RPKMs in persistently and pathogenically infected samples. Total (not normalized) reads for each gene are also shown. The last two columns show the differential expression in pathogenically versus persistently infected midgut tissue for 2nd and 4th instar developmental stages.
(XLSX)

S2 Dataset. Expression data of all genes that are differentially expressed following pathogenic infection in at least one of the two library pairs obtained by deep sequencing (2c/2inf and 4c/4inf pairs, corresponding to persistent/pathogenic infection at 2nd and 4th instar stages). Shown are RPKMs for each gene in each individual library (after trimming), as well as their average RPKMs in persistently and pathogenically infected samples. Total (not normalized) reads for each gene are also shown. The last two columns show the differential expression in pathogenically versus persistently infected midgut tissue for 2nd and 4th instar developmental stages.
(XLSX)

S3 Dataset. Expression data of the 308 genes that are differentially expressed following pathogenic infection in both library pairs obtained by deep sequencing (2c/2inf and 4c/4inf pairs, corresponding to persistent/pathogenic infection at 2nd and 4th instar stages). Shown are RPKMs for each gene in each individual library (after trimming), as well as their average RPKMs in persistently and pathogenically infected samples. Total (not normalized) reads for each gene are also shown. The last two columns show the differential expression in pathogenically versus persistently infected midgut tissue for 2nd and 4th instar developmental stages. Criteria for the selection of genes are described in detail in *Materials and Methods* section.
(XLSX)

S1 Fig. *Bombyx mori* larvae persistently and pathogenically infected with BmCPV. Larvae of Daizo strain were orally infected with a high dose of BmCPV polyhedra at the 2nd or the 4th instar stage, or left untreated. The images show larvae 20 days (for 2nd instar stage; 2c, 2inf) or 14 days (for 4th instar stage; 4c, 4inf) after manipulation. Untreated larvae of the Daizo strain were persistently infected with BmCPV.
(TIF)

S2 Fig. Detection of BmCPV polyhedra in pathogenically infected larvae. Cubic crystalline structures (viral polyhedra) were observed under the microscope in (a) midgut tissue, (b) body wall tissue and (c) hemolymph. Magnification factor: 40x.
(TIF)

S3 Fig. Distribution of GO terms among highly differentially expressed genes in pathogenically infected larvae. All genes from S3 Dataset (corresponding to Fig. 2) having a GO annotation were categorized using GO tools in different classes representing biological process, molecular function and cellular component. Classification is shown at several levels of GO analysis.
(PDF)

S4 Fig. Relative expression levels of selected genes from pathogenically infected midguts as determined by qRT-PCR. Expression of genes showing by deep sequencing significant levels of up-regulation during pathogenic infection was validated by qRT-PCR in midgut samples of persistently and pathogenically infected 2nd instar larvae. The graphs depict mean values of expression normalized to the housekeeping gene *actin 3*, as measured for two biological and two technical replicates (+SE). For clarity, four different graphs (a-d) of relative mRNA levels are shown, in which genes with similar mRNA levels are grouped (see different scales in the graphs). High error bars obtained for expression of genes may reflect differences between samples in exact developmental stage or progression of viral infection. Expression of genes may be more strictly developmentally regulated or be more sensitive to progression of viral infection. See Table 2 for further explanation on gene identity and function.
(TIF)

S5 Fig. The uncharacterized protein LOC101735726. Indicated are the conserved domains PIF1 and RecD as detected by the DELTA-BLAST algorithm. PIF1-like helicase domains are implicated in the regulation of telomerase activity during the cell cycle. RecD-like helicase domains are associated with functions in DNA replication, recombination and repair.
(TIF)

S6 Fig. Relative expression levels of RNAi-related genes in pathogenically infected midguts as determined by qRT-PCR. Expression of several RNAi-related genes was analyzed by qRT-PCR in midgut samples of persistently and pathogenically infected 2nd instar larvae. The graphs depict mean values of expression normalized to the housekeeping gene *actin 3*, as

measured for two biological and two technical replicates (+SE). For clarity, four different graphs (a-d) of relative mRNA levels are shown, in which genes with similar mRNA levels are grouped (see different scales in the graphs). High error bars obtained for expression of genes may reflect differences between samples in exact developmental stage or progression of viral infection. Expression of genes may be more strictly developmentally regulated or more sensitive to progression of viral infection. See Table 6 and [64] for further explanation on gene identity and function.
(TIF)

S1 Table. Sequences of primers used in qRT-PCR reactions for mRNA expression quantification. Genes are identified by their SilkDB ID (www.silkdb.org) and their GenBank Accession Number (www.ncbi.nlm.nih.gov/).
(DOCX)

Acknowledgments

Thanks are due to Dr. H. Mori (Kyoto Institute of Technology, Japan) for the generous gift of purified BmCPV polyhedra that were used in this study. We also thank Dr. A. Kohl (Institute of Infection, Immunity and Inflammation, UK) and Dr. A. Zografidis (Institute of Biosciences and Applications, NCSR "Demokritos") for useful advice regarding the analysis of the small RNAs.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AK FVN DJS DD LS GS. Performed the experiments: AK FVN. Analyzed the data: AK FVN. Contributed reagents/materials/analysis tools: FVN DD LS GS. Wrote the paper: AK FVN DJS LS GS.

References

1. Hunter W, Ellis J, Vanengelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, et al. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (Apis mellifera, Hymenoptera: Apidae). PLoS Pathog. 2010; 6(12):e1001160. Epub 2011/01/05. doi: 10.1371/journal.ppat.1001160 PMID: 21203478
2. Subbaiah EV, Royer C, Kanginakudru S, Satyavathi VV, Babu AS, Sivaprasad V, et al. Engineering silkworms for resistance to baculovirus through multigene RNA interference. Genetics. 2013; 193(1):63–75. Epub 2012/10/30. doi: 10.1534/genetics.112.144402 PMID: 23105011
3. Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu Rev Entomol. 1999; 44:257–89. Epub 2004/03/12. PMID: 15012374
4. Ciota AT, Kramer LD. Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. Viruses. 2013; 5(12):3021–47. Epub 2013/12/20. doi: 10.3390/v5123021 PMID: 24351794
5. Myles KM, Wiley MR, Morazzani EM, Adelman ZN. Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(50):19938–43. Epub 2008/12/03. doi: 10.1073/pnas.0803408105 PMID: 19047642
6. Wu Q, Luo Y, Lu R, Lau N, Lai EC, Li WX, et al. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(4):1606–11. Epub 2010/01/19. doi: 10.1073/pnas.0911353107 PMID: 20080648
7. Liu S, Vijayendran D, Bonning BC. Next generation sequencing technologies for insect virus discovery. Viruses. 2011; 3(10):1849–69. Epub 2011/11/10. doi: 10.3390/v3101849 PMID: 22069519
8. Goic B, Saleh MC. Living with the enemy: viral persistent infections from a friendly viewpoint. Curr Opin Microbiol. 2012; 15(4):531–7. Epub 2012/07/10. doi: 10.1016/j.mib.2012.06.002 PMID: 22770658
9. Villarreal LP. Viral ancestors of antiviral systems. Viruses. 2011; 3(10):1933–58. Epub 2011/11/10. doi: 10.3390/v3101933 PMID: 22069523

10. Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. Future Microbiol. 2011; 6(3):265–77. Epub 2011/04/01. doi: 10.2217/fmb.11.11 PMID: 21449839
11. Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart LA, Mouret C, Hautier L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. PLoS One. 2014; 9(7):e103073. Epub 2014/07/23. doi: 10.1371/journal.pone.0103073 PMID: 25048715
12. Niu J, Meeus I, Cappelle K, Piot N, Smagghe G. The immune response of the small interfering RNA pathway in the defense against bee viruses. Curr Opin Insect Sci. 2014; 3:1–6. PMID: 25401083
13. Mori H, Metcalf P. Cypoviruses. In: Asgari S, Johnson KN, editors. Insect Virology: Horizon Scientific Press; 2010. p. 307–23.
14. Hill CL, Booth TF, Stuart DI, Mertens PP. Lipofectin increases the specific activity of cypovirus particles for cultured insect cells. J Virol Methods. 1999; 78(1–2):177–89. Epub 1999/04/16. PMID: 10204709
15. Gao K, Deng XY, Qian HY, Qin G, Guo XJ. Digital Gene Expression analysis in the midgut of 4008 silkworm strain infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. J Invertebr Pathol. 2014; 115:8–13. Epub 2013/11/12. doi: 10.1016/j.jip.2013.10.016 PMID: 24211674
16. Gao K, Deng XY, Qian HY, Qin GX, Hou CX, Guo XJ. Cytoplasmic polyhedrosis virus-induced differential gene expression in two silkworm strains of different susceptibility. Gene. 2014; 539(2):230–7. Epub 2014/02/15. doi: 10.1016/j.gene.2014.01.073 PMID: 24525400
17. Wu P, Li M, Wang X, Zhao P, Wang X, Liu T, et al. Differentially expressed genes in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. Afr J Biotechnol. 2009; 8(16):3711–20.
18. Wu P, Wang X, Qin GX, Liu T, Jiang YF, Li MW, et al. Microarray analysis of the gene expression profile in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. Mol Biol Rep. 2011; 38(1):333–41. Epub 2010/03/30. doi: 10.1007/s11033-010-0112-4 PMID: 20349281
19. Wu P, Han S, Chen T, Qin G, Li L, Guo X. Involvement of microRNAs in infection of silkworm with bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). PLoS One. 2013; 8(7):e68209. Epub 2013/07/12. doi: 10.1371/journal.pone.0068209 PMID: 23844171
20. Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. J Mol Biol. 2013; 425(24):4921–36. Epub 2013/10/15. doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.006 PMID: 24120681
21. Bronkhorst AW, van Rij RP. The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. Curr Opin Virol. 2014; 7C:19–28. Epub 2014/04/16.
22. Nayak A, Tassetto M, Kunitomi M, Andino R. RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in invertebrates. Curr Top Microbiol Immunol. 2013; 371:183–200. Epub 2013/05/21. doi: 10.1007/978-3-642-37765-5_7 PMID: 23686236
23. Shimomura M, Minami H, Suetsugu Y, Ohyanagi H, Satoh C, Antonio B, et al. KAIKObase: an integrated silkworm genome database and data mining tool. BMC Genomics. 2009; 10:486. Epub 2009/10/22. doi: 10.1186/1471-2164-10-486 PMID: 19843344
24. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods. 2008; 5(7):621–8. Epub 2008/06/03. doi: 10.1038/nmeth.1226 PMID: 18516045
25. Zhang F, Guo Z, Zhong H, Wang S, Yang W, Liu Y. RNA-Seq-based transcriptome analysis of aflatoxigenic Aspergillus flavus in response to water activity. Toxins (Basel). 2014; 6(11):3187–207. Epub 2014/11/26. doi: 10.3390/toxins6113187 PMID: 25421810
26. Chevignon G, Cambier S, Da Silva C, Poulain J, Drezen JM, Huguet E, et al. Transcriptomic response of Manduca sexta immune tissues to parasitization by the bracovirus associated wasp Cotesia congregata. Insect Biochem Mol Biol. 2015. Epub 2015/01/15.
27. Gu J, Huang LX, Gong YJ, Zheng SC, Liu L, Huang LH, et al. De novo characterization of transcriptome and gene expression dynamics in epidermis during the larval-pupal metamorphosis of common cutworm. Insect Biochem Mol Biol. 2013; 43(9):794–808. Epub 2013/06/26. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.06.001 PMID: 23796435
28. Core Team R. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012.
29. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. Bioinformatics. 2009; 25(2):288–9. Epub 2008/11/27. doi: 10.1093/bioinformatics/btn615 PMID: 19033274
30. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009; 4(1):44–57. Epub 2009/01/10. doi: 10.1038/nprot.2008.211 PMID: 19131956

31. Liang J, Zhang L, Xiang Z, He N. Expression profile of cuticular genes of silkworm, Bombyx mori. BMC Genomics. 2010; 11:173. Epub 2010/03/17. doi: 10.1186/1471-2164-11-173 PMID: 20226095

32. Ruan W, Xu E, Xu F, Ma Y, Deng H, Huang Q, et al. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis. Cancer Biol Ther. 2007; 6(3):354–9. Epub 2007/02/22. PMID: 17312390

33. Ruan WJ, Lin J, Xu EP, Xu FY, Ma Y, Deng H, et al. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role against colorectal carcinogenesis with its expression associated with DNA hypomethylation of exon 1. J Zhejiang Univ Sci B. 2006; 7(11):929–32. Epub 2006/10/19. PMID: 17048309

34. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. Cell. 2008; 132(3):363–74. Epub 2008/02/13. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.032 PMID: 18267069

35. Chen Y, Cui T, Knosel T, Yang L, Zoller K, Petersen I. IGFBP7 is a p53 target gene inactivated in human lung cancer by DNA hypermethylation. Lung Cancer. 2011; 73(1):38–44. Epub 2010/11/26. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.10.015 PMID: 21095038

36. Chen Y, Pacyna-Gengelbach M, Ye F, Knosel T, Lund P, Deutschmann N, et al. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) has potential tumour-suppressive activity in human lung cancer. J Pathol. 2007; 211(4):431–8. Epub 2007/01/20. PMID: 17236181

37. Gao K, Deng XY, Qian HY, Wu P, Qin GX, Liu T, et al. Novel protein of IBP from silkworm, Bombyx mori, involved in cytoplasmic polyhedrosis virus infection. J Invertebr Pathol. 2012; 110(1):83–91. Epub 2012/03/10. doi: 10.1016/j.jip.2012.02.011 PMID: 22401767

38. Chen CS, Bellier A, Kao CY, Yang YL, Chen HD, Los FC, et al. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in Caenorhabditis elegans. PLoS One. 2010; 5(3):e9494. Epub 2010/03/09. doi: 10.1371/journal.pone.0009494 PMID: 20209166

39. Xu J, Hopkins K, Sabin L, Yasunaga A, Subramanian H, Lamborn I, et al. ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(37):15025–30. Epub 2013/08/28. doi: 10.1073/pnas.1303193110 PMID: 23980175

40. Girardin SE, Philpott DJ. PGRP-LB minds the fort. Immunity. 2006; 24(4):363–6. Epub 2006/04/19. PMID: 16618594

41. Zaidman-Remy A, Herve M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, et al. The Drosophila amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. Immunity. 2006; 24(4):463–73. Epub 2006/04/19. PMID: 16618604

42. Tyler KL, Clarke P, DeBiasi RL, Kominsky D, Poggioli GJ. Reoviruses and the host cell. Trends Microbiol. 2001; 9(11):560–4. Epub 2002/02/05. PMID: 11825717

43. Kominsky DJ, Bickel RJ, Tyler KL. Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels. J Virol. 2002; 76 (22):11414–24. Epub 2002/10/22. PMID: 12388702

44. Kominsky DJ, Bickel RJ, Tyler KL. Reovirus-induced apoptosis requires both death receptor- and mitochondrial-mediated caspase-dependent pathways of cell death. Cell Death Differ. 2002; 9(9):926–33. Epub 2002/08/16. PMID: 12181743

45. Stewart ME, Roy P. Role of cellular caspases, nuclear factor-kappa B and interferon regulatory factors in Bluetongue virus infection and cell fate. Virol J. 2010; 7:362. Epub 2010/12/08. doi: 10.1186/1743-422X-7-362 PMID: 21134281

46. Lavazec C, Boudin C, Lacroix R, Bonnet S, Diop A, Thiberge S, et al. Carboxypeptidases B of Anopheles gambiae as targets for a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine. Infect Immun. 2007; 75(4):1635–42. Epub 2007/02/07. PMID: 17283100

47. Ponnuvel KM, Nithya K, Sirigineedi S, Awasthi AK, Yamakawa M. In vitro antiviral activity of an alkaline trypsin from the digestive juice of Bombyx mori larvae against nucleopolyhedrovirus. Arch Insect Biochem Physiol. 2012; 81(2):90–104. Epub 2012/08/18. doi: 10.1002/arch.21046 PMID: 22898997

48. Bao YY, Li MW, Zhao YP, Ge JQ, Wang CS, Huang YP, et al. Differentially expressed genes in resistant and susceptible Bombyx mori strains infected with a densonucleosis virus. Insect Biochem Mol Biol. 2008; 38(9):853–61. Epub 2008/08/06. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.06.004 PMID: 18678256

49. Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennett K, Black Wt, Barillas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in Aedes aegypti. Am J Trop Med Hyg. 2005; 72(5):631–7. Epub 2005/05/14. PMID: 15891140

50. Sanglas L, Aviles FX, Huber R, Gomis-Ruth FX, Arolas JL. Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of Ascaris parasite. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(6):1743–7. Epub 2009/01/31. doi: 10.1073/pnas.0812623106 PMID: 19179285

51. Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. The Open Inflammation Journal. 2011; 4(Suppl1-M6):49–60.

52. Li ZW, Li X, Yu QY, Xiang ZH, Kishino H, Zhang Z. The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, Bombyx mori, and comparative analysis with other insect sHSP genes. BMC Evol Biol. 2009; 9:215. Epub 2009/09/01. doi: 10.1186/1471-2148-9-215 PMID: 19715580

53. Iwanaga M, Shibano Y, Ohsawa T, Fujita T, Katsuma S, Kawasaki H. Involvement of HSC70-4 and other inducible HSPs in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection. Virus Res. 2013. Epub 2013/11/12.

54. Sagisaka A, Fujita K, Nakamura Y, Ishibashi J, Noda H, Imanishi S, et al. Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. Virus Res. 2010; 147(2):166–75. Epub 2009/11/04. doi: 10.1016/j.virusres.2009.10.015 PMID: 19883703

55. Liu J, Bai J, Zhang L, Jiang Z, Wang X, Li Y, et al. Hsp70 positively regulates porcine circovirus type 2 replication in vitro. Virology. 2013; 447(1–2):52–62. Epub 2013/11/12. doi: 10.1016/j.virol.2013.09.021 PMID: 24210126

56. Li L, Sevinsky JR, Rowland MD, Bundy JL, Stephenson JL, Sherry B. Proteomic analysis reveals virus-specific Hsp25 modulation in cardiac myocytes. J Proteome Res. 2010; 9(5):2460–71. Epub 2010/03/04. doi: 10.1021/pr901151k PMID: 20196617

57. Smith JA, Schmechel SC, Raghavan A, Abelson M, Reilly C, Katze MG, et al. Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. J Virol. 2006; 80(4):2019–33. Epub 2006/01/28. PMID: 16439558

58. Lee SK, Son le T, Choi HJ, Ahnn J. Dicarbonyl/l-xylulose reductase (DCXR): The multifunctional pentosuria enzyme. Int J Biochem Cell Biol. 2013; 45(11):2563–7. Epub 2013/08/31. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.010 PMID: 23988570

59. Son le T, Ko KM, Cho JH, Singaravelu G, Chatterjee I, Choi TW, et al. DHS-21, a dicarbonyl/L-xylulose reductase (DCXR) ortholog, regulates longevity and reproduction in Caenorhabditis elegans. FEBS Lett. 2011; 585(9):1310–6. Epub 2011/04/12. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.062 PMID: 21477590

60. Field LM, Devonshire AL. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid Myzus persicae (Sulzer) are part of a gene family. Biochem J. 1998;330 (Pt 1:):169–73. Epub 1998/04/16.

61. Altstein M, Nassel DR. Neuropeptide signaling in insects. Adv Exp Med Biol. 2010; 692:155–65. Epub 2010/12/31. PMID: 21189678

62. Gan L, Liu X, Xiang Z, He N. Microarray-based gene expression profiles of silkworm brains. BMC Neurosci. 2011; 12:8. Epub 2011/01/21. doi: 10.1186/1471-2202-12-8 PMID: 21247463

63. Vodovar N, Saleh MC. Of insects and viruses: The role of small RNAs in insect defence. In: Jockusch EL, editor. Small RNAs Their Diversity, Roles and Practical uses: Academic Press; 2012. p. 1–36.

64. Swevers L, Huvenne H, Menschaert G, Kontogiannatos D, Kourti A, Pauchet Y, et al. Colorado potato beetle (Coleoptera) gut transcriptome analysis: expression of RNA interference-related genes. Insect Mol Biol. 2013; 22(6):668–84. doi: 10.1111/imb.12054 PMID: 24580832

65. Kolliopoulou A, Swevers L. Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkmoth Bm5 cells. Insect Biochem Mol Biol. 2013; 43(8):654–63. Epub 2013/05/15. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.05.001 PMID: 23669468

66. Zhu L, Tatsuke T, Mon H, Li Z, Xu J, Lee JM, et al. Characterization of Tudor-sn-containing granules in the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem Mol Biol. 2013; 43(8):664–74. Epub 2013/05/07. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.04.004 PMID: 23643815

67. Izumi N, Kawaoka S, Yasuhara S, Suzuki Y, Sugano S, Katsuma S, et al. Hsp90 facilitates accurate loading of precursor piRNAs into PIWI proteins. RNA. 2013; 19(7):896–901. Epub 2013/05/18. doi: 10.1261/rna.037200.112 PMID: 23681506

68. Xiol J, Cora E, Koglgruber R, Chuma S, Subramanian S, Hosokawa M, et al. A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. Mol Cell. 2012; 47(6):970–9. Epub 2012/08/21. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.019 PMID: 22902560

69. Liu J, Smagghe G, Swevers L. Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of Bombyx mori. J Insect Physiol. 2013; 59(6):646–54. Epub 2013/04/23. doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.03.013 PMID: 23602829