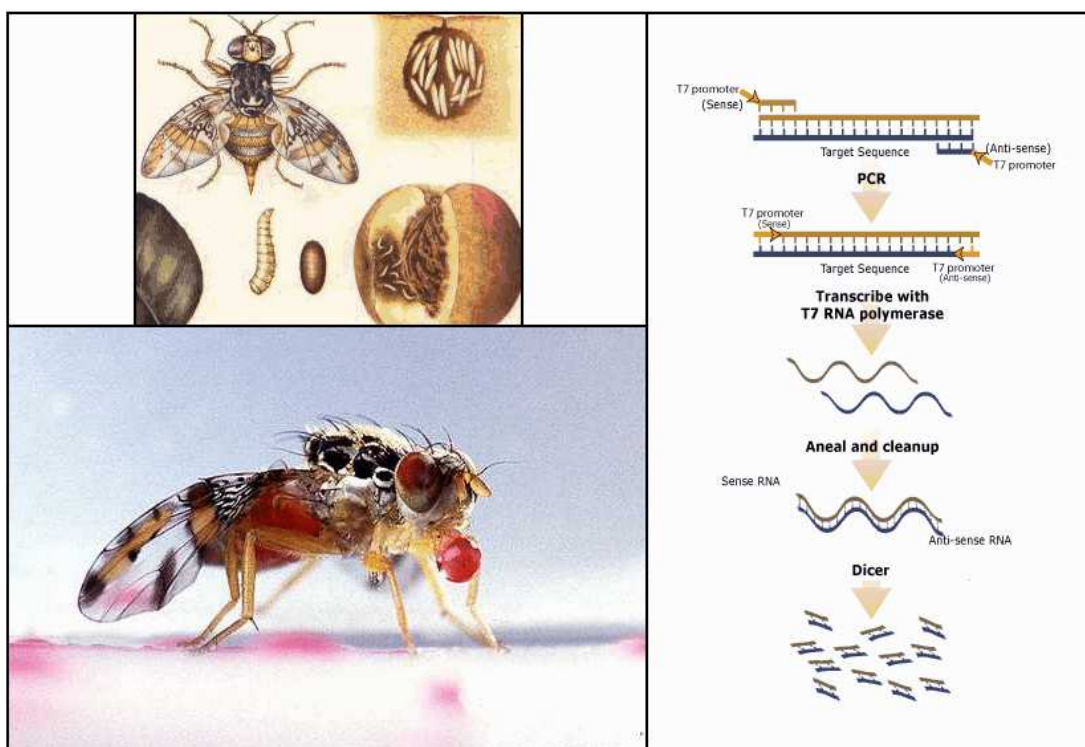


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΜΥΓΑ  
ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
RNAi ΣΤΟ ΜΕΣΟ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΝΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΑΚΑΝΗ ΕΥΔΟΞΙΑ [Διδάσκουσα Π.Δ.407]

ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ [Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας]

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ [Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών]

## ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΚΑΚΑΝΗ ΕΥΔΟΞΙΑ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρεμβολή RNA (RNAi) αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις της μοριακής βιολογίας των τελευταίων χρόνων. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα δίκλιωνα μόρια RNA ρυθμίζουν τη λειτουργία των γονιδίων διαλευκάνθηκε πρώτα σε οργανισμούς μοντέλα, όπως ο *C. elegans*. Ωστόσο, η δυνατότητα εφαρμογής του RNAi σε οργανισμούς που δεν αποτελούν μοντέλα το κατέστησαν σύντομα εξαιρετικό εργαλείο για τη μελέτη και αποσιώπηση γονιδίων. Σήμερα η τεχνολογία RNAi εφαρμόζεται κατά κόρον σε διαδικασίες αντίστροφης γενετικής ανάλυσης για τη μελέτη γονιδίων. Επιπλέον, οι εφαρμογές του RNAi αρχίζουν και επεκτείνονται σε θέματα που αφορούν γονιδιακή θεραπεία αλλά και καταπολέμηση παρασιτικών εντόμων με αποσιώπηση σημαντικών γονιδίων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αποσιώπηση γονιδίων της μεσογειακής μύγας με χρήση της τεχνολογίας RNAi στο μέσο διατροφής. Επιλέχθηκε το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου που είναι εξαιρετικά σημαντικό στις χολινεργικές συνάψεις και κατά συνέπεια στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων. Τμήμα του cDNA του γονιδίου (εξόνια 3 έως 5) ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και στη συνέχεια το προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των δύο συμπληρωματικών κλώνων του RNA. Τα δίκλιωνα μόρια RNA (dsRNAs) χορηγήθηκαν τόσο σε ενήλικα άτομα της *Ceratitis capitata* όσο και σε προνύμφες του εντόμου μέσω της πεπτικής οδού (τροφή). Η επιτυχία της αποσιώπησης αξιολογήθηκε όσον αφορά στα ενήλικα άτομα με τη μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ τις προνύμφες με την παρατήρηση της μεταβολής στο ρυθμό ανάπτυξής τους.

Τα αποτελέσματα της εργασίας παρουσίασαν μικρή επαναληψιμότητα. Ωστόσο, αν και τα αποτελέσματα σε μερικές περιπτώσεις ήταν αντικρουόμενα, αποτελούν μία πρώιμη ένδειξη του ότι μπορεί να επιτευχθεί η αποσιώπηση γονιδίων στη μεσογειακή μύγα με χρήση dsRNA στο μέσο διατροφής. Για την επίτευξη του σκοπού μπορούν να χρησιμοποιηθούν βελτιώσεις της μεθόδου, όπως χρήση λιποσωμάτων για τη μεταφορά του dsRNA και η χρήση τροποποιημένων μορίων dsRNA. Οι βελτιώσεις αυτές στοχεύουν στο να αυξήσουν τον χρόνο ημιζωής των δίκλωνων μορίων RNA ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά τους στον ιστό-στόχο χωρίς σημαντικές απώλειες. Η τελειοποίηση της μεθόδου αποσιώπησης γονιδίων με την τεχνολογία RNAi στο μέσο διατροφής των εντόμων είναι πολύ σημαντική καθώς τα μόρια dsRNA μπορούν να αποτελέσουν μια νέα γενιά εντομοκτόνων. Τα εντομοκτόνα που θα στηρίζονται στην τεχνολογία RNAi μπορούν να συγκεντρώσουν το πλεονέκτημα της εξειδίκευσης αλλά και της μηδενικής τοξικότητας προς άλλους οργανισμούς, με αποτέλεσμα να είναι ιδανικά για την καταπολέμηση των παρασιτικών εντόμων σε επίπεδο πληθυσμού με μηδενικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

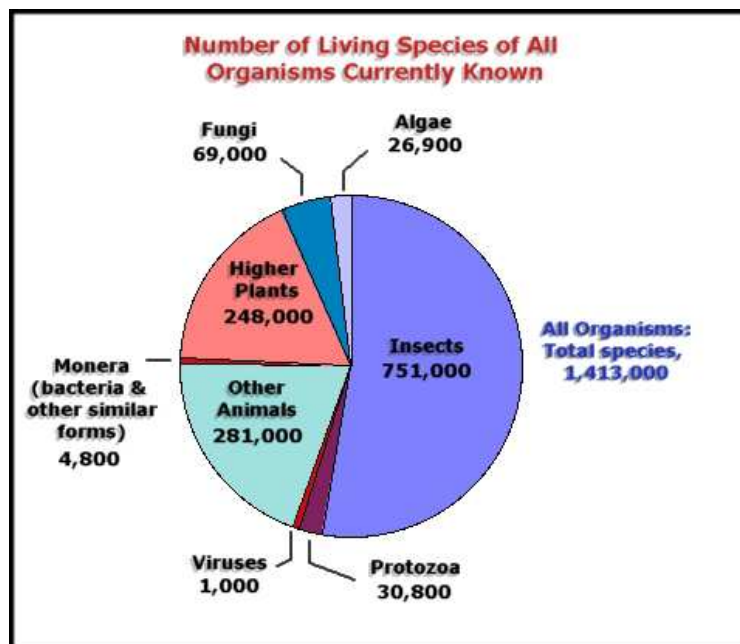
## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή	
Έντομα.....	5
1.1 <i>Ceratitis capitata</i> .....	6
1.2 Προέλευση – Εξάπλωση του εντόμου.....	8
1.3 Βιολογικός κύκλος της μεσογειακής μύγας.....	8
1.4 Οικονομικό ενδιαφέρον.....	9
1.5 Γενικοί τρόποι αντιμετώπισης.....	10
1.5.1 Παραδοσιακές μέθοδοι αντιμετώπισης.....	11
1.5.2 Απελευθέρωση στείρων ατόμων.....	11
1.5.3 Χημικά εντομοκτόνα – Οργανοφωσφορικά.....	11
1.6 Η χολινεργική μεταβίβαση.....	12
1.7 Η παρεμβολή RNA.....	13
1.8 Δυνατότητα εφαρμογής της τεχνολογίας RNAi ως εντομοκτόνο.....	14
Σκοπός.....	16
2.Υλικά και Μέθοδοι	
2.1 <i>Ceratitis capitata</i> .....	18
2.2 Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	19
2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	22
2.4 Απομόνωση ζώνης (τμήματος DNA) από πήκτωμα αγαρόζης .....	23
2.5 Δημιουργία dsRNA – <i>In vitro</i> transcription.....	24
2.6 Χειρισμός εντόμων - Ομάδες πειραμάτων.....	26
2.7 Απομόνωση πρωτεϊνών – Ομογενοποίηση .....	26
2.8 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών - μέθοδος Bradford.....	27
2.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της AChE – Μέθοδος Ellman.....	27
2.10 Πρόγραμμα αποτύπωσης δεδομένων – Στατιστικά.....	28
3.Αποτελέσματα.....	29
4.Συζήτηση.....	37
Βιβλιογραφία.....	41

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Έντομα:

Τα έντομα αποτελούν την πιο πολυπληθή ομάδα ζωντανών οργανισμών στον πλανήτη, περιλαμβάνοντας εκατοντάδες χιλιάδες αναγνωρισμένων ειδών τα οποία αντιπροσωπεύουν ποσοστό μεγαλύτερο του 50% όλων των γνωστών ζώντων οργανισμών (Εικόνα 1). Ανήκουν στην τάξη των αρθροπόδων, με κύριο χαρακτηριστικό το τριμερές σώμα (κεφάλι, θώρακας και κοιλιά). Διαθέτουν εξωσκελετό (χιτίνης), τρία ζεύγη αρθρωτών ποδιών προσαρμοσμένων στο θώρακα και δύο κεραίες. Τα διάφορα είδη των εντόμων είναι προσαρμοσμένα σε πολλούς τύπους περιβάλλοντος με αποτέλεσμα να έρχονται πολύ συχνά σε επαφή με την ανθρώπινη δραστηριότητα.



Εικόνα 1 - Διάγραμμα όλων των γνωστών ζώντων ειδών του πλανήτη. Τα έντομα αποτελούν τους πιο πολυπληθείς οργανισμούς του πλανήτη.

Ορισμένα έντομα είναι εξαιρετικά ωφέλιμα στο περιβάλλον αλλά και τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, πλήθος ειδών (πεταλούδες) συμμετέχουν στη μεταφορά γύρης από το ένα φυτό στο άλλο, βοηθώντας έτσι την εκτέλεση του βιολογικού τους κύκλου. Επιπλέον, έντομα όπως η μέλισσα ή ο μεταξοσκώληκας παρέχουν στον άνθρωπο προϊόντα τροφίμων (μέλι) και ένδυσης (μετάξι).

Ωστόσο το ενδιαφέρον του ανθρώπου επικεντρώνεται σε έντομα υγειονομικού ενδιαφέροντος (π.χ. *A.gambiae* που μεταφέρει το πλασμώδιο που προκαλεί την ελονοσία) καθώς και έντομα-παράσιτα των καλλιεργειών, τα οποία προσπαθεί να ελέγξει χρησιμοποιώντας εντομοκτόνα ή άλλες τεχνικές. Πληθώρα εντόμων τρέφονται με φρούτα ή φύλλα προκαλώντας άμεση καταστροφή στις αγροτικές καλλιέργειες και κατά συνέπεια στην οικονομία. Οι στρατηγικές ελέγχου και καταπολέμησης των παράσιτων με αγροτικό ενδιαφέρον αποτελεί κύριο θέμα της οικονομικής εντομολογίας τα τελευταία χρόνια. Οι καταστροφές που προκαλούνται από τα έντομα, τόσο σε επίπεδο δημόσιας υγείας (τρόφιμα, μεταφορά παθογόνων) όσο και σε οικονομικό επίπεδο (καλλιέργειες) καθιστούν απαραίτητη την εύρεση μεθόδων αποτελεσματικών αλλά και φιλικών προς το περιβάλλον που θα μπορούν να ελέγχουν τον πληθυσμό τους, παρουσιάζοντας παράλληλα μεγάλη εξειδίκευση και μικρή τοξικότητα.

Η οικογένεια των Tephritidae περιλαμβάνει αρκετά έντομα γνωστά για τις οικονομικές καταστροφές που προκαλούν, όπως τα είδη *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Rhagoletis* και *Ceratitis*. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στα έντομα που προσβάλλουν τις καλλιέργειες εναποθέτοντας τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους να αναπτυχθούν μέσα σε αυτά. Στα έντομα αυτά, γνωστά ως «μύγες των φρούτων», κατατάσσεται και η *Ceratitis capitata*, η οποία αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και ιδιαίτερα καταστρεπτικά γεωργικά έντομα. Το μέγεθος της οικονομικής καταστροφής που προκαλεί καθιστά απαραίτητη την εύρεση μεθόδων για την καταπολέμησή ή τον έλεγχο του πληθυσμού της.

### 1.1 *Ceratitis capitata*

Η *Ceratitis capitata*, γνωστή ως μεσογειακή μύγα, ανήκει στα δίπτερα (Diptera) στην οικογένεια των Tephritidae (Εικόνα 2). Τα ενήλικα άτομα τρέφονται με κάθε πηγή πρωτεΐνης που μπορεί να περιλαμβάνει σάπια φρούτα, ακόμη και εκκρίσεις ζώων ώστε να παράγουν αυγά και να εκτελέσουν το βιολογικό τους κύκλο. Η μορφολογία της *C. capitata* την καθιστά εύκολα αναγνωρίσιμο είδος, ακόμα και ανάμεσα στα υπόλοιπα είδη που ανήκουν στις μύγες των φρούτων.



Εικόνα 2 - Η *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) – Ενήλικο άτομο, μορφή βομβυκίωσης (πούπα), προνύμφη(λάρβα) και αυγά

Η *C. capitata* είναι ένα από τα μικρότερα σε μέγεθος είδος των δίπτερων. Τα ενήλικα άτομα δεν ξεπερνούν σε μέγεθος τα 2/3 του μεγέθους της κοινής οικιακής μύγας. Το μήκος ενός ενήλικου μπορεί να κυμαίνεται από 3,5 έως 5mm και η έκταση των φτερών φτάνει τα 10mm. Η κεφαλή έχει ανοιχτό καστανό χρώμα και οι σύνθετοι οφθαλμοί σκούρο πορφυρό χρώμα. Ο θώρακας παρουσιάζει κίτρινο χρώμα στο κατώτερο τμήμα, ενώ στο ανώτερο υπάρχουν χαρακτηριστικές μαύρες κηλίδες. Η κοιλία του εντόμου έχει δύο ανοιχτόχρωμες ζωνώσεις, ενώ τα φτερά περιέχουν μαύρες και καφέ ζώνες με μερικές μαύρες κηλίδες. Οι αλτήρες είναι λευκοί και τα ποδιά κίτρινο-κόκκινα (Εικόνα3).



Εικόνα 3 - Μορφολογικά χαρακτηριστικά των ενήλικων ατόμων *C.capitata*

Ο διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών ατόμων είναι εξαιρετικά απλός. Τα αρσενικά διαθέτουν ένα ζεύγος κεραιών στο κεφάλι οι οποίες είναι πεπλατυσμένες στην άκρη. Ωστόσο, το πιο ιδιαίτερο γνώρισμα που διαφοροποιεί τα θηλυκά άτομα είναι ο ωοαποθέτης με μήκος που μπορεί να φτάσει τα 1,2mm (Walker et al., 2006). Το ανατομικό αυτό χαρακτηριστικό επιτρέπει στο θηλυκό να σκίζει τη φλούδα των καρπών και στη συνέχεια να αποθέτει τα αυγά στο εσωτερικό τους.

Τα αυγά (Εικόνα 4) φτάνουν σε μέγεθος το 1mm και χαρακτηρίζονται από το λεπτό καμπυλωτό σχήμα τους και το φωτεινό λευκό χρώμα.



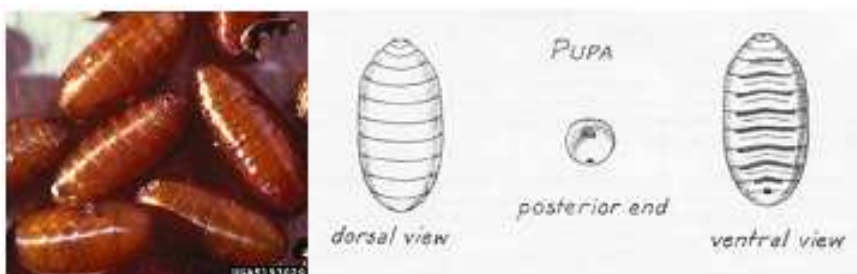
Εικόνα 4 - Τα αυγά της *Ceratitidis capitata* (Wiedemann)

Οι προνύμφες της μεσογειακής μύγας (Εικόνα 5) έχουν επίμηκες κυλινδρικό σχήμα, με υποκίτρινο χρώμα και έντονο στένεμα στην περιοχή του κεφαλιού. Το μήκος τους κυμαίνεται από 7 έως 9mm με οκτώ διακριτές κοιλιακές περιοχές.



Εικόνα 5 - Η λάρβα της *Ceratitidis capitata* (Wiedemann)

Τα βομβύκια (πούπες) που σχηματίζουν οι προνύμφες (Εικόνα 6) έχουν κοινό κυλινδρικό σχήμα, καστανοκόκκινο χρώμα και παρουσιάζουν μικρό εύρος μεγέθους από 4 έως 4,3mm.

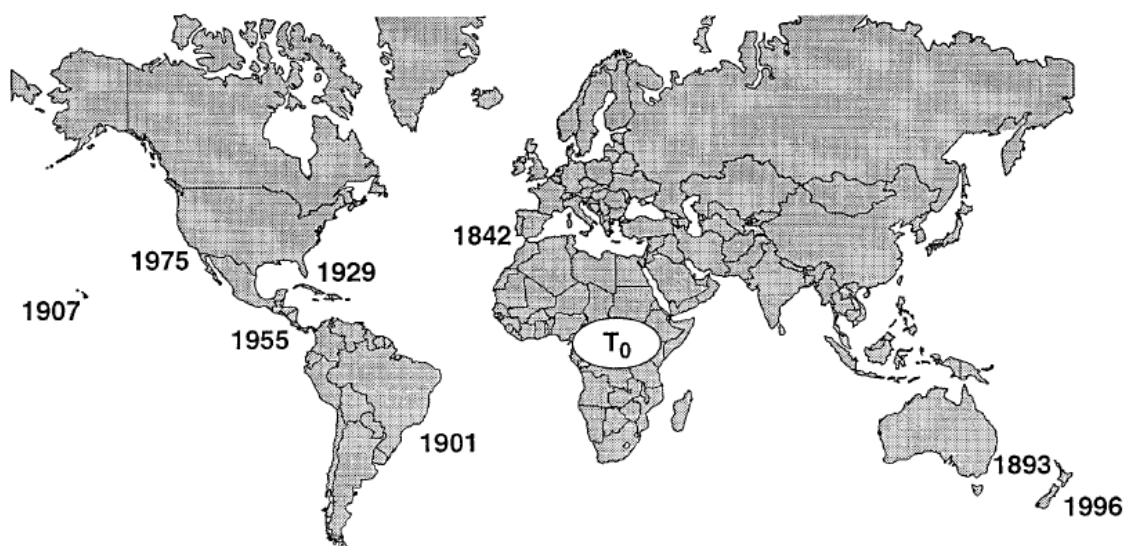


Εικόνα 6 – Βομβύκια της *Ceratitidis capitata* (Wiedemann)



## 1.2 Προέλευση - Εξάπλωση

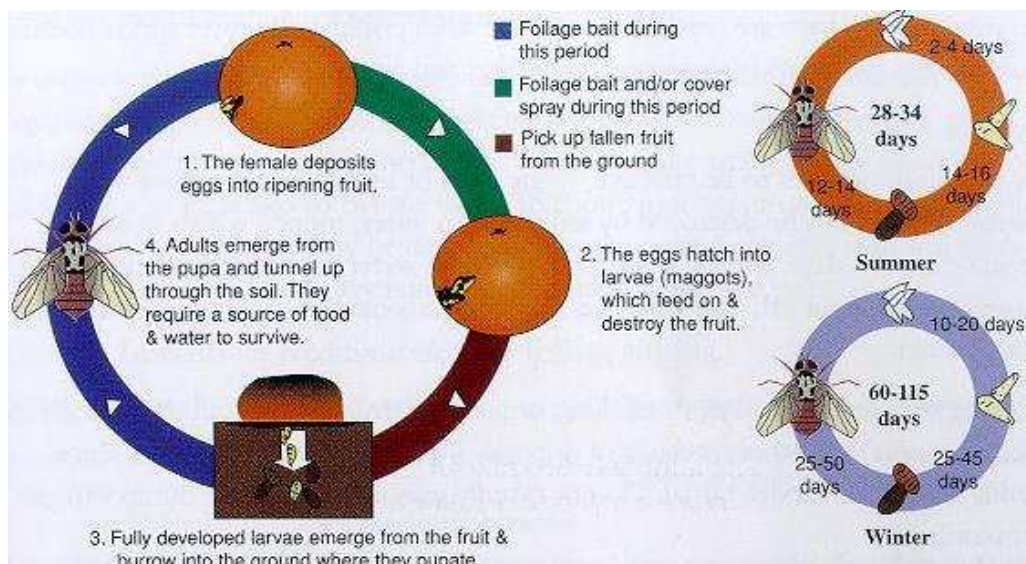
Το έντομο θεωρείται γηγενές είδος της κεντρικής Αφρικής (Fletcher et al., 1989) με πιθανή προέλευση νοτιοανατολικά της ερήμου Σαχάρα(Κένυα). Η *C. capitata* αποτελεί ένα από τα πιο πετυχημένα είδη ανάμεσα στις μύγες των φρούτων καθώς είναι ικανή να υπομείνει ψυχρά κλίματα και να χρησιμοποιήσει πλήθος φρούτων για την εκτέλεση του βιολογικού της κύκλου (Thomas et al., 2001). Επιπλέον, η μεσογειακή μύγα παρουσιάζει έντονη κινητικότητα και εξαιρετική γονιμότητα. Ως αποτέλεσμα, τα τελευταία 200 χρόνια έχει εξαπλωθεί σε πολλές τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές της γης, όπως τη λεκάνη της Μεσογείου, την κεντρική και νότια Αμερική, νότιες περιοχές των Η.Π.Α. και την Αυστραλία (Εικόνα 7) (Fletcher et al., 1989), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί με αναλύσεις αλληλουχιών ιντρονίων DNA (Davies et al., 1999). Επίσης με ανάλυση μιτοχονδριακών και μικροδορυφορικών περιοχών έχουν χαρακτηριστεί 14 είδη που εξαπλώνονται σε Αφρική, βόρεια και νότια Αμερική, Ευρώπη, Ασία και Αυστραλία (Krafsur et al., 2005).



Εικόνα 7 - Η μετακίνηση της μεσογειακής μύγας από την Αφρική στον υπόλοιπο κόσμο

## 1.3 Βιολογικός κύκλος

Η *C. capitata*, όπως και όλα σχεδόν τα σημαντικά επιβλαβή Tephritidae πλην του *Ragoletis*, είναι έντομο πολυκυκλικό, δηλαδή συμπληρώνει περισσότερους από έναν βιολογικούς κύκλους ανά έτος. Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 8. Η εποχή και κατά συνέπεια η θερμοκρασία και ο φωτισμός επηρεάζουν σημαντικά τον κύκλο του εντόμου. Υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του εντόμου με τον κύκλο να διαρκεί από 28 έως 34 μέρες. Αντίθετα χαμηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα επέκταση της διάρκειας του κύκλου σε 60 με 115 μέρες. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη του (ύπαρξη διαθέσιμων καρπών για ωοτοκία, κατάλληλη θερμοκρασία και υγρασία κ.ά.) οι γενεές μπορούν να διαδέχονται η μία την άλλη χωρίς διακοπή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Σε εργαστηριακές συνθήκες (25°C - 75% υγρασία) ο κύκλος ζωής του εντόμου δεν υπερβαίνει τις 30 μέρες (Oikonomou, 2006).



Εικόνα 8 - Ο βιολογικός κύκλος της *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) . Είναι εμφανής η επιρροή της θερμοκρασίας στη διάρκεια ενός πλήρη κύκλου.

Ο πληθυσμός του εντόμου κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όπου υπάρχει μειωμένη διαθεσιμότητα καρπών και χαμηλές θερμοκρασίες, αποτελείται κυρίως από βομβύκια στο έδαφος, κάτω από στρώματα χώματος και φύλλων και λιγότερο από ανήλικα ή ενήλικα άτομα στο καρπό, που μπορεί να επιβιώσουν ως την ερχόμενη άνοιξη εάν οι συνθήκες το επιτρέψουν.

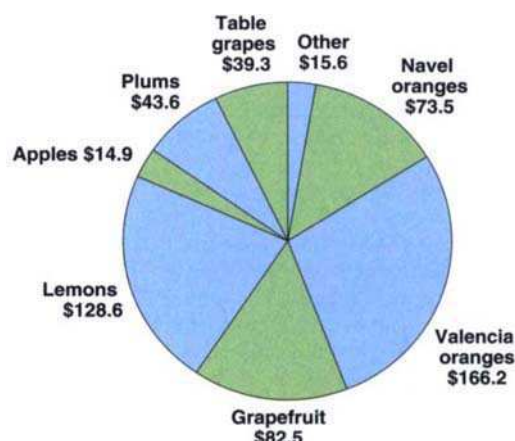
Ο βιολογικός κύκλος αρχίζει με την εναπόθεση των αυγών στο φρούτο από το θηλυκό το οποίο δημιουργεί σχισμές στην επιφάνεια του καρπού και τοποθετεί 1 με 10 αυγά τη φορά. Τα αυγά εκκολάπτονται μετά από 2 με 20 μέρες (ανάλογα με τη θερμοκρασία) και οι προνύμφες (λάρβες) αναπτύσσονται μέσα στον καρπό, καταστρέφοντας τον καθώς αυτός αποτελεί την πηγή διατροφής τους. Οι πλήρως ανεπτυγμένες προνύμφες απομακρύνονται από τον καρπό μετά από 14 με 45 μέρες. Με μικρά άλματα φτάνουν στο έδαφος όπου βομβυκιάνονται. Σε διάστημα 12 με 50 ημερών τα ενήλικα εξέρχονται από τις πούρες. Σε διάστημα 2 με 4 μερών τα ενήλικα ωριμάζουν σεξουαλικά και μετά από γονιμοποίηση τα θηλυκά είναι έτοιμα να αρχίσουν το νέο βιολογικό κύκλο. Ο χρόνος ζωής ενός ενήλικου ατόμου δεν υπερβαίνει τους 2 μήνες.

#### 1.4 Οικονομικό ενδιαφέρον

Με σκοπό τη θρέψη αλλά και την αναπαραγωγή της η *Ceratitidis capitata* χρησιμοποιεί ως ξενιστές πάνω από 200 ποικιλίες φρούτων, προκαλώντας κάθε χρόνο τεράστιες καταστροφές σε τροπικές-υποτροπικές και εύκρατες περιοχές του πλανήτη. Η καταστροφή αυτή προκαλείται τόσο από την εναπόθεση των αυγών στους καρπούς του ώστε να ολοκληρώσει το βιολογικό της κύκλο όσο και από το γεγονός ότι οι περιοχές ωοαπόθεσης αποτελούν εστίες μόλυνσης από μικροοργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες. Αποτελεί αιτία απώλειας δισεκατομμυρίων δολαρίων στις καλλιέργειες και εξαγωγές φρούτων με αποτέλεσμα να είναι επίκεντρο στην οικονομική εντομολογία σε Ευρώπη, Ηνωμένες πολιτείες και κεντρική Αμερική.

Εξαιρετικό παράδειγμα αποτελεί η εγκατάσταση της μεσογειακής μύγας στην Καλιφόρνια που είχε ως αποτέλεσμα προσβολή πλήθους καλλιεργειών (κυρίως εσπεριδοειδών), με αποτέλεσμα καταστροφή αμέτρητων καρπών και οικονομική ζημία

μεγέθους εκατομμυρίων δολαρίων (Εικόνα 9). Επιπλέον, οι στρατηγικές που ακολούθησε η πολιτεία για την καταπολέμηση του εντόμου (χρήση παγίδων και εντομοκτόνων) αύξησαν το μέγεθος της οικονομικής καταστροφής (Εικόνα 10)(Siebert et al., 1995).



Εικόνα 9 - Οικονομικές απώλειες στην Καλιφόρνια από την *Ceratitidis capitata* με την καταστροφή καρπών. Το συνολικό ποσό φτάνει τα 564,2 εκατομμύρια δολάρια.

	Production costs		Postharvest treatment costs
	Low	High	
	\$1,000		\$1,000
Apples, all	2,619	7,421	1,447
Apricots	1,566	3,993	394
Avocados	30,456	87,984	5,917
Bell peppers	1,347	1,796	3,191
Cherries, sweet	918	1,969	216
Dates	450	1,275	743
Figs	1,521	6,591	38
Grapes, wine	26,100	113,100	—
Grapes, raisin	24,390	106,690	—
Grapes, table	7,263	31,473	16,126
Grapefruit	18,806	26,865	4,351
Kiwis	639	1,385	1,979
Limes	135	585	—
Mandarins (tangerines)	2,160	8,280	2,178
Nectarines, fresh	2,142	4,641	7,101
Olives, fresh	4,023	17,433	—
Oranges	163,816	239,760	72,584
Peaches, fresh	2,421	5,246	3,068
Peaches, processed	2,484	5,352	—
Pears, fresh	198	429	841
Pears, processed	1,872	4,056	—
Persimmons	108	306	—
Plums, fresh	3,654	7,917	6,045
Prunes, (fresh wt.)	6,921	14,996	—
Tomatoes, fresh (pink & red)	2,880	6,240	7,077
Tomatoes, processed	20,738	27,650	—
<b>Total</b>	<b>349,627</b>	<b>731,883</b>	<b>135,288</b>

Note: Cost of grapes based on adjusted production but unadjusted value of 1989 grapes utilized for fresh market. Cost of peaches and pears based on adjusted data.  
Source: Siebert, Jerome and Vijay Pradhan. "The Potential Impact of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitidis capitata* (Wied.), Upon Establishment in California: An Update." Working Paper No. 547. Department of Agricultural and Resource Economics, UC Berkeley, September 1, 1991 (p. 12).

Εικόνα 10 - Κόστος αντιμετώπισης της *Ceratitidis capitata* με χρήση του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου malathion

Με δεδομένη την οικονομική καταστροφή που προκάλεσε στην πολιτεία της Καλιφόρνια και τη μετακίνηση της σε όλο και περισσότερες καλλιέργειες, η *Ceratitidis capitata* κατατάσσεται δικαίως στα έντομα μέγιστης οικονομικής σημασίας. Η δυνατότητα παρασιτισμού σε μεγάλο εύρος καλλιεργειών σε συνδυασμό με τη γονιμότητα και εξάπλωση του εντόμου καθιστούν αναγκαία την εύρεση μεθόδων για τον έλεγχο του φυσικού του πληθυσμού (Pitts et al., 2001; Thomas et al., 2001).

### 1.5 Γενικοί τρόποι αντιμετώπισης

Για τον έλεγχο και την καταπολέμηση του εντόμου έχουν εφαρμοστεί αρκετές μέθοδοι με μεγαλύτερη ή λιγότερη εξειδίκευση. Γενικά χρησιμοποιούνται παραδοσιακές και εμπειρικές μέθοδοι, αλλά τα τελευταία χρόνια βρίσκουν εφαρμογή μέθοδοι χημείας και μοριακής βιολογίας.

### 1.5.1 Παραδοσιακές μέθοδοι

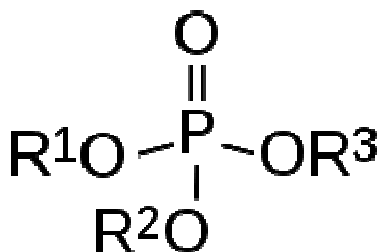
Στηρίζονται σε φυσικές μεθόδους και είναι απόλυτα φιλικές προς το περιβάλλον, παρουσιάζουν όμως μειωμένη αποτελεσματικότητα. Χρησιμοποιούνται τεχνικές όπως η κάλυψη των καρπών, απομάκρυνση των μολυσμένων καρπών, παγίδευση εντόμων σε δολώματα. Κατά κύριο λόγο όμως γίνεται συλλογή των άγουρων καρπών (πριν την προσβολή από την *C. capitata*) ή απολύμανση των εξαγωγίμων καρπών μετά τη συλλογή τους (Mansour and Franz, 1996).

### 1.5.2 Απελευθέρωση στειρών ατόμων

Η τεχνική στειρών εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT) είναι μια ειδο-ειδική και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική η οποία έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά αποτελεσματικά. Η μέθοδος SIT στηρίζεται στη μαζική παραγωγή στειρωμένων με ακτινοβολήση αρσενικών ατόμων, τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον και ανταγωνίζονται τα αγρίου τύπου (wild type) άτομα στην αναπαραγωγή. Οι συζεύξεις με τα στείρα άτομα δεν δίνουν απογόνους, με αποτέλεσμα τη μείωση των πληθυσμών του εντόμου (Hendrichs et al., 1995; Enkerlin et al., 2005). Επιπλέον, υπάρχουν και νεότερες μελέτες και πειράματα που αποτελούν παραλλαγές της SIT. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση ενισχυτικών αλληλουχιών DNA σε γενετικά τροποποιημένα άτομα *C. capitata* ώστε να εκφραστούν θνησιγόνα γονίδια στο στάδιο της πούπας, με αποτέλεσμα να έχουμε εμβρυική θνησιμότητα 100% (Schetelig et al., 2009).

### 1.5.3 Χημικά εντομοκτόνα - Οργανοφωσφορικά

Ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης της μεσογειακής μύγας είναι τα χημικά εντομοκτόνα, τα οποία εφαρμόζονται υπό μορφή ψεκασμών στις καλλιέργειες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα τα οποία όμως συσσωρεύονταν στο έδαφος και στη συνέχεια με έκπλυση κατέληγαν στα υπόγεια ύδατα. Σήμερα, τα οργανοφωσφορικά (OP) εντομοκτόνα (Εικόνα 11) αποτελούν την κύρια μέθοδο αντιμετώπισης του εντόμου. Τα OPs αναπτύχθηκαν και εισήλθαν στην αγορά για την αντικατάσταση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, καθώς αποικοδομούνται ταχύτατα μέσω υδρόλυσης από μικροοργανισμούς.



Εικόνα 11 - Γενικός χημικός τύπος των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων

Τα οργανοφωσφορικά (OPs) αποτελούν τη βασική ομάδα εντομοκτόνων από το 1940. Παρουσιάζουν έντονη νευροτοξική δράση απενεργοποιώντας μη αντιστρεπτά το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (Costa et al., 2005; Heath et al., 2004). Η λίστα των

οργανοφωσφορικών που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνει δεκάδες χημικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να παρουσιάσουν οξεία τοξικότητα στον άνθρωπο.

#### Οργανοφωσφορικά (OPs) - βασική ομάδα εντομοκτόνων (παραδείγματα)

- Acephate
- Chlorpyrifos
- Diazinon
- Fenthion
- Malathion
- Parathion
- Tetrachlorvinphos
- Trichlorfon

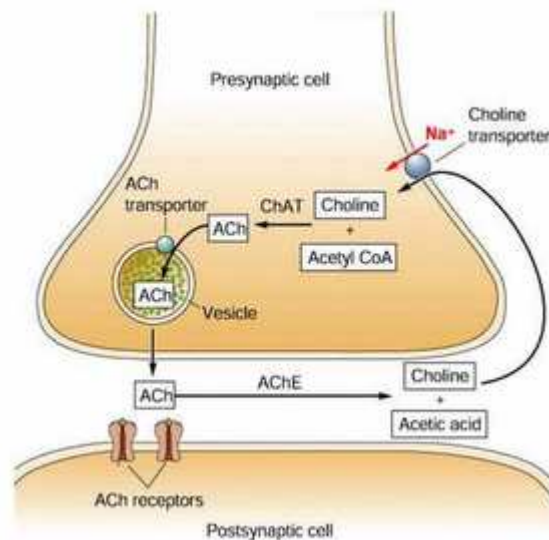
#### 1.6 Η χολινεργική μεταβίβαση

Ο βασικός στόχος των OPs εντομοκτόνων είναι η απενεργοποίηση της ακετυλοχολινεστεράσης. Η AChE είναι πολύ σημαντικό ένζυμο στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων, το οποίο ακολουθεί χολινεργική μεταβίβαση.

Το χολινεργικό σύστημα περιλαμβάνει την ακετυλοχολίνη (ACh), η οποία αποτελεί το νευροδιαβιβαστή και ρυθμίζει τη μεταβίβαση του σήματος, το βιοσυνθετικό της ένζυμο που είναι η ακετυλτρανσφεράση της χολίνης, το αποδομητικό της ένζυμο - **ακετυλχολινεστεράση** και, τέλος, τους υποδοχείς της ACh.

Η ACh συντίθεται από τη χολίνη και το ακετυλ-CoA με τη δράση του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης, και αποθηκεύεται σε κυστίδια στον προσυναπτικό νευρώνα. Όταν το δυναμικό δράσης φτάσει στην απόληξη του προσυναπτικού νευρώνα πυροδοτεί το άνοιγμα δυναμο-εξαρτώμενων καναλιών  $Ca^{+2}$ , με αποτέλεσμα ιόντα  $Ca^{+2}$  να εισρέουν στο κυτοσόλιο και να ενεργοποιούν την απελευθέρωση των κυστιδίων με εξωκύτωση στη συναπτική σχισμή. Η ACh, η οποία διαχέεται ταχύτατα κατά μήκος της συναπτικής σχισμής, συνδέεται στους μετασυναπτικούς υποδοχείς της, επιτρέποντας ιόντα  $Na^+$  και  $K^+$  να διαχυθούν στη μεμβράνη και να εκπολώσουν το κύτταρο, ώστε να συνεχιστεί η μεταβίβαση του σήματος. Η αποδόμηση της ACh πραγματοποιείται με υδρόλυση από την ακετυλοχολινεστεράση, παράγοντας οξικό οξύ και χολίνη (Pitman, 1971; Gerschenfeld, 1973). Η χολίνη επαναπροσλαμβάνεται στο προσυναπτικό κύτταρο για την εκ νέου σύνθεση της ACh (Εικόνα12).

Η δράση του ενζύμου AChE παρεμποδίζεται από τα χημικά εντομοκτόνα με ανταγωνιστική αναστολή (competitive inhibition), εμποδίζοντας τη φυσιολογική λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων και προκαλώντας τελικά το θάνατο (Kumar et al., 2009).



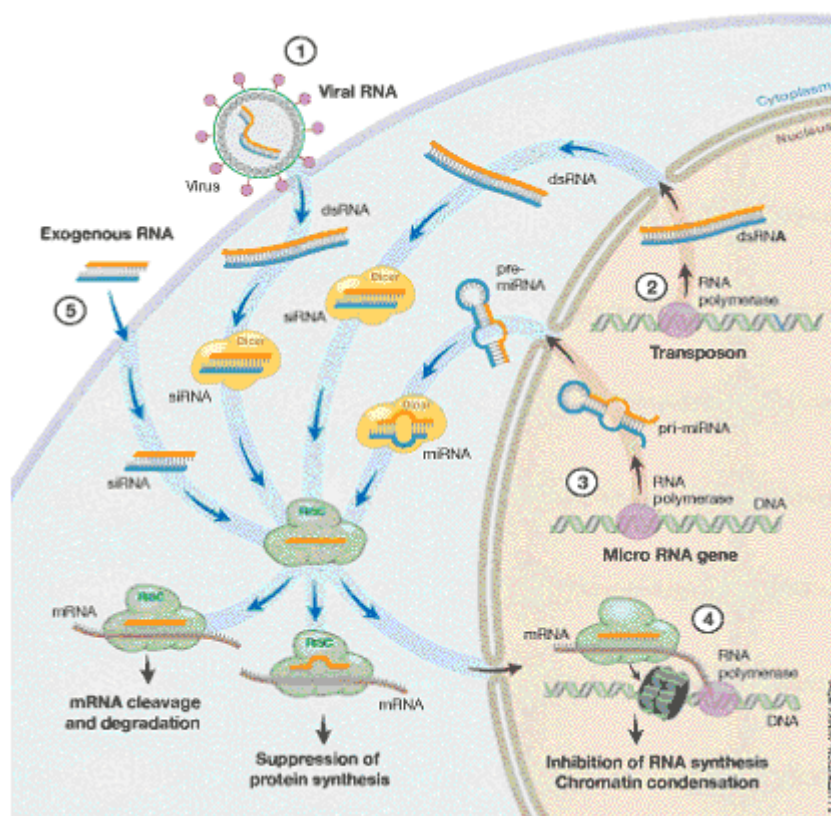
**Εικόνα 12 - Χολινεργική σύναψη. Ο ρόλος του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση**

Λόγω των κινδύνων που παρουσιάζουν τα οργανοφωσφορικά η χημική καταπολέμηση της *C.capitata* αμφισβητείται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν χαμηλό επίπεδο εξειδίκευσης με αποτέλεσμα να εξοντώνουν και σύνολο άλλων εντόμων και ταυτόχρονα δεν είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Επίσης, η μη ορθολογική χρήση των εντομοκτόνων τα τελευταία 20 χρόνια οδήγησε σε μια δραματική αύξηση της ανθεκτικότητας των εντόμων με αποτέλεσμα τα εντομοκτόνα να γίνονται αναποτελεσματικά. Είναι λοιπόν αναγκαία η εύρεση μιας εναλλακτικής μεθόδου καταπολέμησης της μεσογειακής μύγας, ενός εντομοκτόνου που παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση και είναι ακίνδυνο για το περιβάλλον. Παρόμοια χαρακτηριστικά συγκεντρώνει η μέθοδος RNAi, μέθοδος που παρουσιάζει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια.

### 1.7 Η παρεμβολή RNA

Το φαινόμενο της παρεμβολής RNA είχε εντοπιστεί από τη δεκαετία του 90, όταν βιολόγοι έπαιρναν ανεξήγητα αποτελέσματα τα οποία οφείλονταν σε μόρια RNA, αλλά χρειάστηκαν 8 χρόνια έως ότου να χαρακτηριστεί ο μηχανισμός. Το 1998 δημοσιεύτηκε στο Nature το άρθρο: “Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in *C.elegans*” το οποίο έδωσε και το βραβείο Nobel στους Andrew Z. Fire και Craig C. Mello το 2006. Η μέθοδος RNAi είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος καθώς μπορεί να εφαρμοστεί και σε οργανισμούς που δεν είναι μοντέλα, πράγμα που δεν συμβαίνει με άλλες μεθόδους (Fraser et al., 2000; Gonczy et al., 2000; Araujo et al., 2006). Το φαινόμενο στηρίζεται στην ύπαρξη ειδικών ενζύμων στα ευκαρυωτικά κύτταρα που επεξεργάζονται δίκλιωνα μόρια RNA (ενδο- ή εξωκυτταρικής προέλευσης) και προκαλούν εξειδικευμένη αποσιώπηση γονιδίων με καταστροφή των mRNA ή παρεμπόδιση της μετάφρασής τους. Ο μηχανισμός αποσιώπησης παρουσιάζεται στην Εικόνα 13. Τα δίκλιωνα μόρια RNA μπορεί να προέρχονται από ελεύθερα dsRNAs (double stranded), από ιούς ή από αλληλουχίες που βρίσκονται στον πυρήνα. Ανεξαρτήτως προέλευσης τα δίκλιωνα μόρια RNA παραλαμβάνονται από το ένζυμο Dicer και κατακεραματίζονται σε μόρια μήκους ~21-23 ζευγών βάσεων (siRNAs) με χαρακτηριστικό τα 3' προεξέχοντα άκρα μήκους 2 βάσεων. Στη συνέχεια τα τμήματα αυτά δεσμεύονται από το σύμπλοκο αποσιώπησης RISC το οποίο

αφαιρεί τον ένα κλών και κατόπιν εντοπίζει τα συμπληρωματικά μόρια mRNA, καταστρέφοντάς τα ή εμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση.



Εικόνα 13 - Η παρεμβολή RNA. Γενικός μηχανισμός, προέλευση και επεξεργασία των δίκλωνων μορίων RNA

### 1.8 Δυνατότητα εφαρμογής της τεχνολογίας RNAi ως εντομοκτόνο

Ο μηχανισμός RNAi που έχει διατηρηθεί εξελικτικά στα διάφορα είδη παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, παρέχοντας στους ερευνητές ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάπτυξη νέων μεθόδων για χειρισμό – αποσιώπηση γονιδίων. Η ανάπτυξη ενός εντομοκτόνου βασισμένου στην τεχνολογία RNAi, το οποίο θα προκαλεί την αποσιώπηση ενός γονιδίου που επηρεάζει την επιβίωση του εντόμου, μπορεί να αποτελέσει ορόσημο μιας νέας γενιάς εντομοκτόνων αφενός εξειδικευμένων προς τα έντομα στόχους και αφετέρου φιλικών προς το περιβάλλον. Η ελκυστική πτυχή της χρησιμοποίησης του μηχανισμού RNAi ως εντομοκτόνου έγκειται στο ότι είναι δυνατόν αφενός να σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να στοχεύει επιλεκτικά ένα συγκεκριμένο είδος ή μια ομάδα συγγενών ειδών με την ελάχιστη απειλή προς τους άλλους οργανισμούς και αφετέρου να αποφευχθεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Το πλεονέκτημα της επιλεκτικότητας της μεθόδου RNAi στηρίζεται στη δυνατότητα που υπάρχει για σχεδιασμό μορίων RNA ώστε να στοχεύουν σε οποιαδήποτε περιοχή του γονιδιώματος. Επομένως μπορούν να σχεδιαστούν μόρια dsRNA συμπληρωματικά προς αλληλουχίες του εντόμου που δεν είναι συντηρημένες μεταξύ των ειδών με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται η μέγιστη εξειδίκευση. Επιπλέον, όσον αφορά στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα χημικά εντομοκτόνα, στη περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας σε ένα μόριο RNA, λόγω της μεταλλαγής της αλληλουχίας-στόχου, είναι

εύκολη και δυνατή η δημιουργία ενός νέου μορίου dsRNA που στοχεύει σε άλλο σημείο του γονιδίου ή ακόμη και σε ένα διαφορετικό γονίδιο.

Για τον αποτελεσματικό έλεγχο των εντόμων και για να είναι δυνατή η αξιοποίηση των ιδιοτήτων του RNAi μηχανισμού ως μέθοδο καταπολέμησης, της εξειδίκευσης δηλαδή και της φιλικής προς το περιβάλλον συμπεριφοράς του, ο οργανισμός πρέπει να είναι σε θέση να λάβει αυτόνομα το dsRNA. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε πλήθος εντόμων όπως τα: *Anopheles gambiae*, *Bemisia tabaci*, *Harmonia axyridis*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* κλπ. για τη μελέτη γονιδίων (Kuwayama et al., 2006; Hoa et al., 2003; Ghanim et al., 2007; Enright et al., 2003; Adelman et al 2008). Εντούτοις, τα περισσότερα από αυτά τα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί μέσω μικροένεσης των dsRNAs στον οργανισμό, γεγονός που αποκλείει τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε επίπεδο πληθυσμού. Για την εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi σε επίπεδο πληθυσμού απαιτείται η άμεση και αυτόνομη λήψη του dsRNA από τον οργανισμό. Η πιο εφικτή προσέγγιση φαίνεται να είναι η προσθήκη του dsRNA στην τροφή και η χορήγησή του μέσω αυτής. Η επιτυχημένη εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi για αποσιώπηση γονιδίων με χρήση της πεπτικής οδού σε έντομα όπως τα *Plutella xylostella*, *Helicoverpa armigera*, *Epiphyas postvittana* και *Glossina morsitans morsitans* (Bautista et al., 2009; Kumar et al., 2009; Turner et al., 2006; Walshe et al., 2009) ενδυναμώνουν τις προσπάθειες και το ενδιαφέρον των ερευνητών στην εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi ως εναλλακτική μέθοδο καταπολέμησης των παρασιτικών εντόμων.



## Σκοπός

Η χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA σε ενήλικα άτομα της μεσογειακής μύγας μέσω της τροφής αποτελεί νέο πεδίο έρευνας στην εντομολογία. Πλήθος δημοσιεύσεων αναφέρουν εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi σε έντομα με τη μέθοδο της μικροένεσης. Ωστόσο, ελάχιστες είναι οι δημοσιεύσεις που αναφέρουν χορήγηση dsRNA μέσω της τροφής σε προνύμφες και ενήλικα έντομα.

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό την αποσιώπηση γονιδίων με χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA στο μέσο διατροφής της μεσογειακής μύγας. Επιλέχθηκε το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (ένζυμο-κλειδί στο νευρικό σύστημα των εντόμων), τμήμα του οποίου ενισχύθηκε με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το ενισχυμένο προϊόν αποτέλεσε τη βάση για τη δημιουργία των dsRNAs τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν στο μέσο διατροφής της *C. capitata*. Στα ενήλικα άτομα μετρήθηκε η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης και στις προνύμφες παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στο ρυθμό ανάπτυξης.

Η δυνατότητα εφαρμογής της τεχνολογίας RNAi στο μέσο διατροφής της *C. capitata* για την αποσιώπηση γονιδίων είναι πολύ σημαντική. Η επίτευξη του στόχου θα καλύψει τη σημαντικότερη προϋπόθεση, η οποία είναι η αυτόνομη λήψη των dsRNA για τη χρήση του μηχανισμού RNAi στον έλεγχο και την καταπολέμηση των παρασιτικών εντόμων σε επίπεδο πληθυσμού. Η ανάπτυξη ενός εντομοκτόνου βασισμένου στην τεχνολογία παρεμβολής RNA (RNAi), το οποίο θα προκαλεί την αποσιώπηση ενός γονιδίου που επηρεάζει την επιβίωση του εντόμου, μπορεί να αποτελέσει ορόσημο μιας νέας γενιάς εντομοκτόνων αφενός εξειδικευμένων προς τα έντομα στόχους και αφετέρου φιλικών προς το περιβάλλον. Επιπλέον, η ανάπτυξη της RNAi τεχνολογίας στη μύγα της μεσογείου, καθώς αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων, θα βοηθήσει στον εμπλουτισμό των διαθέσιμων μοριακών πληροφοριών.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 *Ceratitis capitata*

Τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα βρίσκονταν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού. Η αποικία αναπτυσσόταν στους 25°C και ο φωτισμός ελεγχόταν με χρονοδιακόπτη (12 ώρες φώς, 12 ώρες σκοτάδι). Με τις πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης ήταν δυνατή η εκτέλεση ολόκληρου του βιολογικού κύκλου της μεσογειακής μύγας, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα, ώστε να είναι διαθέσιμα σε κάθε στιγμή άτομα για την εκτέλεση των πειραμάτων (ενήλικα ή προνύμφες).

#### 2.1.1 Ενήλικα άτομα – Χειρισμός

Η ανάπτυξη και αναπαραγωγή των ενήλικων ατόμων πραγματοποιήθηκε σε πλαστικά κλουβιά, διαμορφωμένα έτσι ώστε η μία πλευρά να έχει συνθετικό ύφασμα, εύκολα διαπερατό από τον ωοαποθέτη των θηλυκών. Το θρεπτικό μέσο παρεχόταν σε μορφή διαλύματος και περιείχε μείγμα μαγιάς και ζάχαρης 1:1. Το απαραίτητο νερό προσλαμβάνονταν από τα έντομα μέσω ενός νωπού σπογγώδους υλικού (νωπό χαρτί). Τα άτομα που επιλέγονταν κάθε φορά για την εκτέλεση του πειράματος παρέμεναν σε νηστεία για 1 έως 2 μέρες σε ξεχωριστά πλαστικά κλουβιά.

Τα γονιμοποιημένα θηλυκά, ακολουθώντας το ένστικτο της φύσης τρυπούσαν το συνθετικό τοίχωμα με τον ωοαποθέτη, χρησιμοποιώντας τρόπο παρόμοιο με αυτό που θα τρυπούσαν ένα καρπό και άφηναν τα αυγά στην εξωτερική πλευρά. Τα αυγά στη συνέχεια συλλέγονταν σε ένα τριβλίο petri γεμάτο με απιονισμένο νερό. Η απομόνωση των αυγών γινόταν με διήθηση του διαλύματος μέσω ημιδιαπερατού υλικού, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονταν σε επιφάνεια με ειδική τροφή -μέσα σε αεριζόμενο τριβλίο petri- για την ανάπτυξη των προνυμφών.

#### 2.1.2 Προνύμφες (λάρβες) και βομβύκια (πούπες) – Χειρισμός

Τα αυγά παρέμεναν στα αεριζόμενα τριβλία για περίπου 48 ώρες, μέχρι την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης. Οι λάρβες που εξέρχονταν από τα αυγά τρέφονταν με το ειδικό υπόστρωμα έως ότου φτάσουν το στάδιο της νύμφης. Τα μέσα θρέψης περιελάμβανε:

• Νερό βρύσης	500ml
• Μαγιά	30gr
• Ζάχαρη	30gr
• Χαρτί υγείας	30gr
• Διάλυμα Α – 5,3% χοληστερόλη σε 25% αιθανόλη	10ml
• Διάλυμα Β – 14,5% HCl	10ml
• Διάλυμα Γ – 12,5% βενζοϊκό νάτριο σε 71,2% αιθανόλη	8,5ml

Τα παραπάνω συστατικά αναμίχθηκαν για τη δημιουργία ομοιογενούς πολτού, ο οποίος διατηρούνταν στους 4°C (για περίπου 10 ημέρες). Η θρέψη των προνυμφών συνεχιζόταν για περίπου 6 μέρες στους 24±1°C, χρονικό διάστημα το οποίο απαιτείται για τη μετάβαση στο

νυμφικό στάδιο. Την έκτη μέρα τα τριβλία που αναπτύσσονταν οι προνύμφες μεταφέρονταν ανοιχτά σε πλαστικά κουτιά που περιείχαν λεπτό στρώμα άμμου. Οι προνύμφες ενστικτωδώς εκτινάσσονταν από το τριβλίο ώστε να προσγειωθούν στο «έδαφος» - άμμο, όπου και ξεκινούσε η βομβυκίωση. Το στάδιο της πούπας διαρκεί για περίπου 10 μέρες, οπότε η συλλογή τους γινόταν σε αυτό το διάστημα και στη συνέχεια απομονώνονταν σε τριβλία έως ότου ολοκληρωθεί η μεταμόρφωσή τους σε ενήλικα άτομα για να ξεκινήσει ο νέος βιολογικός κύκλος.

## 2.2 PCR

Για την ενίσχυση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης (DNA pol) να αντιγράφει πιστά τμήματα DNA σε εργαστηριακές συνθήκες (*in vitro*) χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο (DNA μήτρα) και ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Ωστόσο, το ένζυμο δεν είναι ικανό να ξεκινήσει μόνο του την αντιγραφή, καθώς απαιτείται ένα ελεύθερο 3' άκρο για να δεσμευτεί στο μονόκλωνο DNA και να ξεκινήσει τον πολυμερισμό. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητα κάποια εκκινητικά μόρια DNA (εκκινητές-primers) καθώς και ένα σύνολο άλλων συμπαραγόντων (buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs) των οποίων ο ρόλος αναφέρεται παρακάτω.

Η διαδικασία ακολουθεί τρία διακριτά βήματα: Την αποδιάταξη, την υβριδοποίηση και την επιμήκυνση τα οποία εκτελούνται διαδοχικά από ειδικά μηχανήματα, τους θερμοκυκλοποιητές. Πορεία της αντίδρασης:

- Αποδιάταξη. Στο πρώτο στάδιο γίνεται αύξηση της θερμοκρασίας σε υψηλά επίπεδα (92-95°C) ώστε να διαχωριστούν πλήρως οι δύο αλυσίδες του DNA και να είναι δυνατή η πρόσδεση των εκκινητών.
- Υβριδοποίηση. Πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών (45-70 °C) και εξαρτάται από τον σχεδιασμό των εκκινητών (T<sub>m</sub> – T<sub>a</sub>). Σε αυτό το στάδιο οι εκκινητές προσδένονται στο DNA στόχο σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας (A-T,G-C).
- Επέκταση. Το τελευταίο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περίπου 70-76°C, γεγονός το οποίο εξαρτάται από τον τύπο της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται. Στο στάδιο αυτό η DNA pol προσθέτει νουκλεοτίδια με φορά 3'-5', ξεκινώντας από τα 3' ελεύθερα άκρα των εκκινητών

Ωστόσο, εκτός από τον κύκλο της αποδιάταξης, υβριδοποίησης, επιμήκυνσης πραγματοποιούνται και δύο επιπλέον στάδια: Το πρώτο στάδιο αφορά την αρχική αποδιάταξη πριν την εκκίνηση των κύκλων (92-95°C για περίπου 5 λεπτά) και το τελικό στάδιο επέκτασης (70-76 °C για 5-10λεπτά) μετά το τέλος των κύκλων, στο οποίο δίνεται χρόνος στη DNA pol να ολοκληρώσει την αντιγραφή σε σημεία που πιθανόν δεν πρόλαβε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το σύνολο των κύκλων που πραγματοποιούνται δεν πρέπει να ξεπερνάει τους 35-40, διότι αυξάνεται η πιθανότητα παραγωγής μη ειδικών προϊόντων λόγω εξάντλησης των dNTPs αλλά και καταστροφής του ενζύμου DNA pol από τις υψηλές θερμοκρασίες.

## Αντιδραστήρια – συμπαράγοντες PCR:

α) DNA μήτρα. Αποτελεί το μόριο DNA στο οποίο βρίσκεται η αλληλουχία που θα ενισχυθεί. Μπορεί να έχει οποιαδήποτε μορφή (κυκλικό ή γραμμικό).

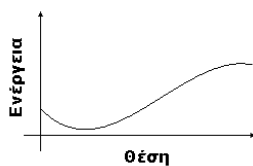
β) Taq πολυμεράση. Η χρήση οποιασδήποτε πολυμεράσης δεν είναι δυνατή στην PCR, καθώς η αντίδραση περιλαμβάνει στάδια με πολύ υψηλές θερμοκρασίες που καταστρέφουν το ένζυμο. Για αυτό το λόγο η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται κυρίως είναι η Taq (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 72°C – 1000νουκλεοτίδια/λεπτό) που απομονώθηκε από το θερμοφίλο *Thermus aquaticus* στον οποίο οφείλει και το όνομά της. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA παρέχει πλέον πολυμεράσες με ικανότητα γρηγορότερης δράσης, αλλά και πολυμεράσες με επιδιορθωτική ικανότητα.

γ) Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer). Αποτελεί το διάλυμα στο οποίο παρουσιάζει βέλτιστη δράση η πολυμεράση. Ρυθμίζει την ιοντική ισχύ, το pH και μπορεί να περιέχει ή όχι το συμπαράγοντα του χλωριούχου μαγνησίου.

δ) MgCl<sub>2</sub>. Ο ρόλος του άλατος χλωριούχου μαγνησίου είναι να παρέχει στην πολυμεράση το δισθενές ιόν μαγνησίου (Mg<sup>+2</sup>) που είναι απαραίτητο για τη μείωση των απωστικών δυνάμεων που δημιουργούνται μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων.

ε) dNTPs. Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται από τη DNA πολυμεράση για την επέκταση των αλυσίδων. Προστίθενται στο διάλυμα της αντίδρασης σε ίσες ποσότητες ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα λάθους από τη DNApol. Περίσσεια ενός νουκλεοτιδίου σημαίνει περισσότερες πιθανότητες να δεσμευτεί από την πολυμεράση, άρα και μεγαλύτερη πιθανότητα να ενσωματωθεί σε λάθος θέση.

στ) Εκκινητές. Ορίζουν το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί. Ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί από τα πιο σημαντικά στοιχεία για τη σωστή λειτουργία της PCR. Το μήκος τους κυμαίνεται από 22-26βάσεις και η περιεκτικότητά τους σε G-C πρέπει να είναι 50-60% ώστε να είναι σταθερή και ειδική η πρόσδεση στο DNA. Επιπλέον η περιεκτικότητα σε αυτές τις βάσεις πρέπει να είναι μικρή στο 5' άκρο και μεγαλύτερη στο 3' άκρο, ακολουθώντας ένα ενεργειακό γράφημα της μορφής:



Κατά το σχεδιασμό πρέπει να αποφευχθεί κάθε είδους δευτεροταγή δομή μέσα στο μόριο, αλλά και η δημιουργία διμερών. Τέλος, οι εκκινητές πρέπει να έχουν κοντινά σημεία T<sub>m</sub>, πράγμα που υπολογίζεται από τον τύπο Thein & Wallace (1986): T<sub>m</sub> = 2(A+T) + 4(G+C). Πολύ σημαντική είναι η θερμοκρασία υβριδισμού T<sub>a</sub>, η οποία συνδέεται με το T<sub>m</sub> με τη σχέση:

$$T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C}$$

Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν:

F primer:

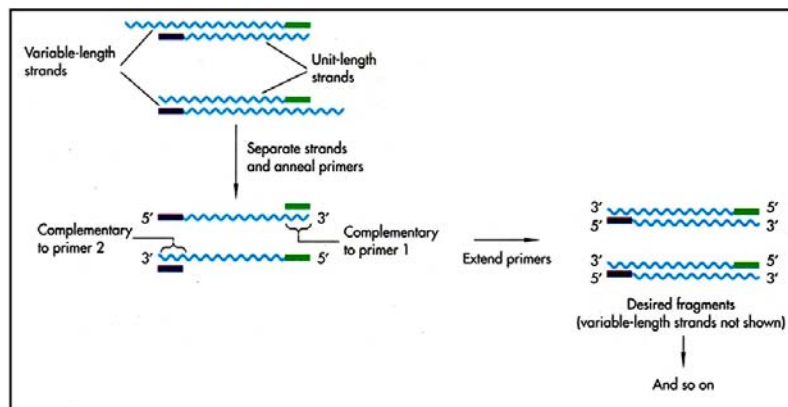
5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGACAATGAATGCGCCCTGG - 3'

R primer:

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCGATTTGCTGCTGATTTTCC - 3'

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενίσχυαν τμήμα του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (εξόνια 3 έως 5) και περιείχαν μια ειδική αλληλουχία ανοδικά της θέσης δέσμευσης (5'- GGATCC TAATACGACTCACTATAGGG-3') που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση της RNAπολυμεράσης και τη δημιουργία του dsRNA. (ανατρέξτε στην παράγραφο 2.5 Δημιουργία dsRNA – *In vitro* transcription).

Το αποτέλεσμα των επαναλαμβανόμενων κύκλων είναι η ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του DNA (Εικόνα 14)



Εικόνα 144 - Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης - PCR

Σε περίπτωση που απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος μπορεί να χρησιμοποιηθεί το προϊόν της πρώτης PCR ως DNA μήτρα για την εκτέλεση μιας δεύτερης αντίδρασης. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως Nested PCR και μπορεί να έχει τρεις τύπους: Nested PCR – χρήση νέου ζεύγους εκκινητών εσωτερικά του πρώτου, semi-Nested PCR – διατήρηση του ενός παλιού εκκινητή και χρήση ενός δεύτερου εσωτερικού και auto-Nested PCR – χρήση των ίδιων εκκινητών. Στο πείραμα για την καλύτερη απόδοση σε προϊόν χρησιμοποιήθηκε η auto-Nested PCR σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1<sup>η</sup> PCR:

- 1,75 ng πλασμιδιακό DNA
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα
- 0,5μM εκκινητές(each)
- 1,5mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2mM dNTPs (each)
- 1 unit Taq πολυμεράση

Μέρος του PCR προϊόντος αποτελεί τη μήτρα για την auto-Nested PCR.

2<sup>η</sup> PCR:

- 1/20 του όγκου του προϊόντος από την πρώτη PCR
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα
- 0,5μM εκκινητές (each)
- 1,5mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2mM dNTPs (each)
- 1 unit Taq πολυμεράση

Τα στάδια της αντίδρασης ήταν:

94°C για 4min (αρχική αποδιάταξη)	} x30
94°C για 30sec (αποδιάταξη)	
50°C για 30sec (υβριδοποίηση)	
72°C για 45sec (επέκταση)	
72°C για 5min (τελική επέκταση)	

### 2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος στηρίζεται σε δύο ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων: το αρνητικό φορτίο (φωσφορικές ομάδες) και το διαφορετικό μήκος (σε ζεύγη βάσεων-bp). Όταν το DNA ή το RNA τοποθετηθεί σε ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς το θετικό πόλο, με ταχύτητα ανεξάρτητη από το μέγεθος. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ένα μέσο που αλλάζει την κινητικότητα των μορίων στο ηλεκτρικό πεδίο, ανάλογα με το μέγεθός τους. Το μέσο αυτό είναι το πήκτωμα αγαρόζης που δημιουργεί ένα πλέγμα μέσω του οποίου κινούνται ευκολότερα τα μικρά μόρια και δυσκολότερα τα μεγαλύτερα (εγκλωβισμός στο πλέγμα). Ανάλογα με τα τμήματα που πρέπει να διαχωριστούν χρησιμοποιούνται πηκτώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,5-2%). Το διάλυμα TBE (Tris-HCl pH 7, βορικό οξύ και EDTA) ρυθμίζει το ιοντικό περιβάλλον της ηλεκτροφόρησης και πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια συγκέντρωση τόσο στο πήκτωμα όσο και στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Κατά την προετοιμασία της μεθόδου τα δείγματα αναμιγνύονται με μια χρωστική (loading dye). Η χρωστική έχει διπλό ρόλο: βοηθάει τα δείγματα να παραμείνουν στα πηγαδάκια και δείχνει την πορεία της ηλεκτροφόρησης καθώς περιέχει τις χρωστικές μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν της ξυλόλης, ενώσεις που παρουσιάζουν κινητικότητα παρόμοια με ένα τμήμα DNA 200-400 bp και 4 kbp, αντίστοιχα. Επιπλέον, μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους, ο οποίος δίνει πολλές ζώνες με γνωστό μέγεθος, γεγονός χρήσιμο για τον εντοπισμό και χαρακτηρισμό των άγνωστων ζωνών καθώς και την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Η οπτικοποίηση των δίκλωνων νουκλεϊνικών οξέων γίνεται με χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ενός μορίου εξαιρετικά καρκινογόνου που δεσμεύεται ανάμεσα στις βάσεις των δειγμάτων και παρουσιάζει έντονο φθορισμό κάτω από ακτινοβολία UV.

Τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 1%, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τμημάτων μεγέθους ~500bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα TBE 0,5X, σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως 110V.

Προετοιμασία – διαδικασία ηλεκτροφόρησης:

Διάλυμα TBE 0,5X: 54gr Tris-base, 27.5gr βορικό οξύ, 20ml EDTA 0.5M αναμιγνύονται σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 8.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H<sub>2</sub>O

- Ζυγίζονται 0,4g αγαρόζης (Agarose standard low), μεταφέρονται σε κωνική φιάλη και προσθέτονται 40ml TBE 0,5X (πήκτωμα 1%)
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων με τακτικές αναδεύσεις, μέχρι την τήξη της αγαρόζης (δημιουργία διαυγούς διαλύματος)

- Το διαυγές διάλυμα αφήνεται στον πάγκο μέχρι η θερμοκρασία να πέσει στους 45-50°C και έπειτα προσθέτονται 1,5μl βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml)
- Προετοιμάζεται το εκμαγείο ηλεκτροφορήσεως στο οποίο τοποθετούνται πλαστικά χτενάκια για τη δημιουργία των θέσεων τοποθέτησης των δειγμάτων. Το διάλυμα της τηγμένης αγαρόζης μεταφέρεται στο εκμαγείο όπου γίνεται η στερεοποίηση του (για περίπου 25λεπτά) και η δημιουργία του πήκτωματος
- Μετά την στερεοποίηση της αγαρόζης απομακρύνονται τα χτενάκια και το πήκτωμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, στην οποία τοποθετείται διάλυμα TBE 0.5X (τόσο ώστε να επικαλύπτεται το πήκτωμα)
- Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων – loading dye (1μl ανά 6μl δείγματος). Η συγκεκριμένη χρωστική εκτός των χρωστικών περιέχει ακόμη γλυκερόλη 30% ώστε τα δείγματα να αποκτήσουν μεγαλύτερη πυκνότητα και να παραμείνουν στα πηγαδάκια. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση φορτώνονται στα πηγαδάκια. Σε ξεχωριστό πηγαδάκι τοποθετείται και ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Συνδέονται τα ηλεκτρόδια στη συσκευή και η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται για 20λεπτά
- Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής UV ακτινοβολίας

#### 2.4 Απομόνωση ζώνης (τμήματος DNA) από πήκτωμα αγαρόζης

Για την απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε τομή της ζώνης που αντιστοιχούσε στο προϊόν (500bp) με χρήση νυστεριού και χρησιμοποιήθηκε το Wizard SV gel and PCR clean up system της Promega. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω:

- Απομόνωση ζωνών και ζύγιση σε eppendorfs των 1,5ml
- Προσθήκη διαλύματος membrane binding solution (~10μl/mg)
- Διαλυτοποίηση του πηκτώματος στους 50-65°C για 15min (ανάδευση ανά 5min στο vortex)
- Μεταφορά των τηγμένων πηκτωμάτων σε ξεχωριστές στήλες, επώαση για 1λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση των στηλών στις 14.000rpm για 1min – Απόχυση του διαλύματος
- Προσθήκη 700μl membrane wash solution και νέα φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 1λεπτό - Απόχυση του διαλύματος
- Προσθήκη 500μl membrane wash solution και φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 5 λεπτά - Απόχυση του διαλύματος
- Φυγοκέντρηση των eppendorfs με ανοιχτά καπάκια για 1 λεπτό (εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης) και μεταφορά των στηλών σε νέα eppendorf
- Προσθήκη 20μl απιονισμένου νερού (~65°C), επώαση 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 1 λεπτό – Διατήρηση του διαλύματος
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος
- Αποθήκευση του διαλύματος (περιέχει το DNA) στους 4 °C ή -20 °C



## 2.5 Δημιουργία dsRNA – *In vitro* transcription

Η μεταγραφή σε δοκιμαστικό σωλήνα στηρίζεται στη δυνατότητα του ενζύμου RNA πολυμεράση να χρησιμοποιεί DNA ως μήτρα και να δημιουργεί συμπληρωματικό κλώνο RNA. Έτσι, με τρόπο αντίστοιχο αυτού της PCR είναι δυνατό να παραχθούν πολλά αντίτυπα RNA από μικρή ποσότητα DNA. Το τμήμα που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα πρέπει να έχει ειδικές αλληλουχίες που να αναγνωρίζονται από την RNA pol. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR είχαν 5' προεξέχοντα άκρα με αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την T7 RNA pol. Η RNA πολυμεράση είναι ικανή να προσδεθεί στις αλληλουχίες αυτές και να ξεκινήσει τη μεταγραφή χωρίς τη χρήση κάποιου εκκινητικού μορίου. Για την *in vitro* transcription χρησιμοποιήθηκε το Ambion (Austin, TX) T7MEGAscript kit, με DNA μήτρα το ενισχυμένο γονίδιο της AChE.

Το προϊόν της αντίδρασης ήταν περίπου 500 ζεύγη βάσεων. Εισαγωγή δίκλωνων μορίων RNA που προσεγγίζουν αυτό το μέγεθος (~500ζ.β.) έχουν παρουσιάσει τη μέγιστη αποτελεσματικότητα σε πειράματα RNA παρεμβολής στη *D. melanogaster* (Agrawal et al., 2003).

Αντιδραστήρια - συμπαραγόντες:

α) DNA μήτρα. Αποτελεί το υλικό πάνω στο οποίο θα λειτουργήσει η RNA pol και δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1μg (στερεοχημική παρεμπόδιση). Είναι απαραίτητο να περιέχει τις κατάλληλες αλληλουχίες που θα αναγνωρίσει το ένζυμο ώστε να προσδεθεί και να ξεκινήσει τη μεταγραφή. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε DNA που περιείχε τις αλληλουχίες αναγνώρισης της T7 RNApol.

β) Ρυθμιστικό διάλυμα . Όπως και στη PCR το ρυθμιστικό διάλυμα προσαρμόζει την ιοντική ισχύ και το pH στο οποίο μπορεί να λειτουργήσει η RNA pol. Για την *in vitro* transcription χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ειδικό για τη λειτουργία της T7 RNA πολυμεράσης.

γ) NTPs. Για την παραγωγή RNA χρησιμοποιούνται ριβονουκλεοτίδια.

δ) RNA πολυμεράση. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η T7 RNApol, η οποία αναγνώριζε τις ειδικές αλληλουχίες που περιείχε το προϊόν της PCR. Απομονώθηκε από τον φάγο T7 στον οποίο οφείλει και το όνομά της. Ανάλογα με τις αλληλουχίες αναγνώρισης που περιέχονται στο DNA μήτρα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές RNA πολυμεράσες (πχ. T7, T3).

ε) Αναστολέας RNAσών. Ο αναστολέας προστίθεται στην αντίδραση ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή του προϊόντος από RNAάσες που πιθανόν υπάρχουν στο διάλυμα από διάφορες πηγές μόλυνσης (νερό ή επιμολύνσεις από λάθος χειρισμό).

Προετοιμασία αντίδρασης:

- Σε θερμοκρασία δωματίου και σε eppendorf των 1,5ml αναμειγνύονται το DNA μήτρα και το ρυθμιστικό διάλυμα
- Προστίθεται τα NTPs (τα οποία είχαν ξεπαγώσει σταδιακά σε τρίμματα πάγου)
- Προστίθεται ο αναστολέας και στη συνέχεια η T7 RNA πολυμεράση (τα ένζυμα διατηρούνται στους -20°C μέχρι την προσθήκη τους στο διάλυμα)

- Τα δείγματα τοποθετούνται στον κλίβανο (37°C) για 2ώρες ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση
- Μετά τη λήξη του χρόνου η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 2μl EDTA 0,5M (~1/20 του τελικού όγκου της αντίδρασης)

Ποσότητες αντιδραστηρίων:

- |   |   |               |
|---|---|---------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• 750ng DNA μήτρας</li> <li>• 30 units T7 RNA πολυμεράσης</li> <li>• 1x ρυθμιστικό διάλυμα (T7)</li> <li>• 0,5μM NTPs (each)</li> <li>• 40 units αναστολέας RNAασών</li> </ul> | } | 37°C – 2hours |
|---|---|---------------|

Το αποτέλεσμα της αντίδρασης ήταν η παραγωγή πολλών συμπληρωματικών κλώνων RNA που δεν βρίσκονται σε δίκλωνη μορφή. Για την απομόνωση του RNA σε υδατικό διάλυμα, την απομάκρυνση του ενζύμου RNA πολυμεράσης και τη δημιουργία της δίκλωνης μορφής ακολούθησε κατακρήμιση με αιθανόλη.

Η μέθοδος στηρίζεται στη μεταβολή της διαλυτότητας των νουκλεϊκών οξέων, όταν στο διάλυμα προστεθεί αιθανόλη (~70%) και συγκεκριμένη ποσότητα μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊκά οξέα και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na<sup>+</sup>, τα οποία συνδέονται σε αυτές. Με τον τρόπο αυτό μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών καταλοίπων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλλει στη θερμοκρασία όπου χρησιμοποιείται για να σχηματιστεί το ίζημα, στον τύπο και τη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρωσης

Κατακρήμιση με αιθανόλη:

- Στα δείγματα προστίθεται άλας CH<sub>3</sub>COONa σε τελική συγκέντρωση 0,3M
- Προσθέτονται 2,5 όγκοι αιθανόλης 100% και 0,5μl γλυκογόνου (20mg/ml)
- Ακολουθεί αποθήκευση στους 0°C για 4 ώρες (ελάχιστο)
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 25λεπτά στις 14000rpm
- Το υπερκείμενο αποχύνεται και προστίθεται 0,5 όγκος αιθανόλης 70% (για την απομάκρυνση του άλατος)
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10min στις 14000rpm – Απόχυση διαλύματος
- Τα δείγματα παραμένουν σκεπασμένα με χαρτί και ανοιχτά καπάκια σε θερμοκρασία δωματίου ώσπου να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη
- Τα ιζήματα αναδιαλύονται σε H<sub>2</sub>O με χρήση πιπέτας

Ακολουθεί επώαση του διαλύματος σε υδατόλουτρο 65°C για 30min. Το στάδιο αυτό διευκολύνει την αναδιάλυση του RNA και επιπλέον διαχωρίζει τους συμπληρωματικούς κλώνους που έχουν συνδεθεί μερικώς. Μετά την επώαση το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 4ώρες ώστε οι συμπληρωματικοί κλώνοι να συνδεθούν σταδιακά και

να έχουμε το RNA σε δίκλωνη μορφή. Στη συνέχεια το dsRNA αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση του.

Ο υπολογισμός της ποσότητας dsRNA στο διάλυμα έγινε με ηλεκτροφόρηση 1μl του διαλύματος. Η ποσοτικοποίηση έγινε προσεγγιστικά με παρατήρηση της ποσότητας dsRNA συγκριτικά με το μάρτυρα.

## 2.6 Χειρισμός εντόμων - Ομάδες πειραμάτων

Το πείραμα χωρίστηκε σε δύο ομάδες. Η πρώτη και κύρια ομάδα του πειράματος αφορούσε χορήγηση δίκλωνου RNA σε ενήλικα άτομα τα οποία παρέμειναν σε νηστεία 1 με 2 ημέρες πριν την έναρξη του πειράματος. Κάθε έντομο τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό κλουβί που περιείχε τροφή αναμιγμένη με την επιθυμητή ποσότητα dsRNA. Σε ορισμένα άτομα χορηγήθηκε τροφή που περιείχε το dsRNA για 1 μόνο ημέρα, ενώ σε άλλα γινόταν καθημερινή ανανέωση της τροφής (έως 3 ημέρες). Σκοπός του χειρισμού αυτού ήταν ο έλεγχος της επίδρασης dsRNA στην τροφή σε μεγάλο εύρος ποσοτήτων (800ng – 24μg) αλλά και χρονικό διάστημα (1 έως 3 ημέρες). Μετά τη λήξη του πειράματος τα έντομα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) μέχρι το θάνατό τους, ώστε να γίνει στη συνέχεια απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης.

Η δεύτερη ομάδα πειραμάτων αφορούσε την αποσιώπηση της AChE σε προνύμφες της *C. capitata*. Επιλέχθηκαν προνύμφες που βρίσκονταν σε μικρό στάδιο ανάπτυξης και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά τριβλία petri. Τα τριβλία περιείχαν μικρά κομμάτια από βαμβάκι εμποτισμένα με τροφή (50-200μl) στα οποία έγινε και προσθήκη dsRNA (1-6mg). Οι προνύμφες παρέμειναν στα τριβλία έως τη βομβυκίωση ή το θάνατό τους.

## 2.7 Απομόνωση πρωτεϊνών – Ομογενοποίηση

Για τη μελέτη του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση στα ενήλικα έγινε απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης από το κεφάλι κάθε εντόμου. Επιλέχτηκε το κεφάλι διότι το ένζυμο εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και η μεταβολή στην έκφραση θα είναι πιο εύκολο να εντοπιστεί. Τα κεφάλια συλλέχθηκαν σε erpendorfs (1,5ml), με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας, τα οποία περιείχαν 200μl διάλυμα ομογενοποίησης (SP buffer). Το διάλυμα ομογενοποίησης περιείχε 0,1M Sodium phosphate buffer pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) και απορρυπαντικό Triton X-100. Ρόλος του διαλύματος ήταν να διατηρήσει το ιοντικό περιβάλλον και το pH του διαλύματος ώστε να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο:

- Απομονώνονται τα κεφάλια των εντόμων και τοποθετούνται σε ξεχωριστά erpendorfs (1,5ml) τα οποία περιέχουν 200μl SP buffer
- Ομογενοποιούνται με πλαστικά αποστειρωμένα έμβολα
- Φυγοκεντρούνται στις 7000rpm για 5λεπτά
- Απομονώνεται το υπερκείμενο διάλυμα με χρήση πιπέτας σε νέο erpendorf
- Η συνολική πρωτεΐνη αποθηκεύεται στους  $4^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση της

Το υπερκείμενο διάλυμα που απομονώθηκε περιείχε όλες τις μικρού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες καθώς και το ένζυμο.

## 2.8 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Για την ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η διαδικασία περιλαμβάνει χρήση μίας μόνο χρωστικής, η οποία αλλάζει χρώμα όταν συνδεθεί με πρωτεΐνες σε αραιό όξινο διάλυμα. Αν και πολύ απλή μέθοδος, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και απαιτεί λίγο χρόνο για να παρουσιάσει αποτελέσματα. Η χρωστική που προσδένεται στις πρωτεΐνες είναι η Coomassie Brilliant Blue G-250 και το σύμπλοκο παρουσιάζει απορρόφηση στα 595nm.

Προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford:

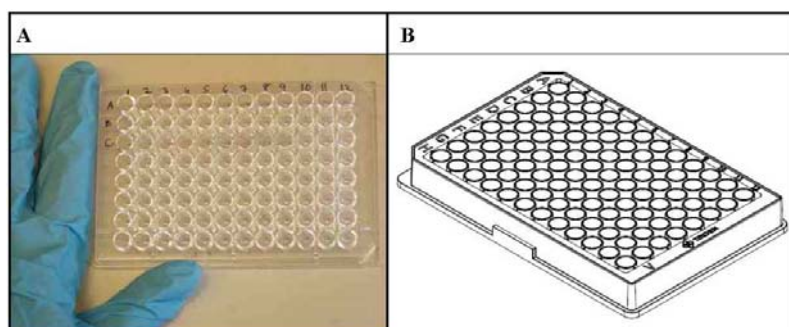
- 10μl από κάθε δείγμα πρωτεΐνης τοποθετούνται σε αντίστοιχη κυψελίδα
- Προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου Bradford και ακολουθεί επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετρούνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 595nm, μηδενίζοντας με το τυφλό (10μl νερό και 1ml αντιδραστηρίου Bradford)

Για την αντιστοίχιση των απορροφήσεων που πήραμε σε mg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με βάση τις απορροφήσεις της αλβουμίνης (BSA) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (εύρος: 0,02 – 2 mg/ml).

## 2.9 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της AChE

Η μέτρηση της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης έγινε με τη μέθοδο Ellman (1961). Η μέθοδος εντοπίζει έμμεσα τη δράση του ενζύμου μετρώντας το σύμπλοκο που σχηματίζει το παράγωγο της υδρόλυσης της ακετυλοθειοχολίνης, η θειοχολίνη με το αντιδραστήριο DTNB. Ο ρυθμός της ανάπτυξης χρώματος μετράται στα 412 nm.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε microplates (Εικόνα 14), όπου σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 1 έως 3,5mg πρωτεΐνης και 100-200μl του διαλύματος της αντίδρασης (stain solution). Το τυφλό δείγμα περιείχε μόνο το διάλυμα της χρωστικής.



Εικόνα 14 - Τα microplates στα οποία μετρήθηκε η δράση της ακετυλοχολινεστεράσης. Α) Πραγματική εικόνα χειρισμού microplate. Β) Σχηματική απεικόνιση Διαδικασία:

- Προετοιμάζεται το διάλυμα της χρωστικής (οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αναφέρονται παρακάτω)
- Τοποθετούνται τα δείγματα στα πηγαδάκια
- Προστίθεται το διάλυμα της χρωστικής με πολυπιπέτα

- Η πλακέτα τοποθετείται άμεσα στο αυτοματοποιημένο φωτόμετρο για την καταμέτρηση των απορροφήσεων

Το διάλυμα της χρωστικής stain solution περιείχε την ιωδούχο ακετυλοχολίνη (ATCh) που αποτελεί το υπόστρωμα της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) σε συγκέντρωση 0,001M, το αντιδραστήριο DTNB που δημιουργεί σύμπλοκο με τη θειοχολίνη σε συγκέντρωση 0,02M και το buffer της αντίδρασης (SP) σε συγκέντρωση 0,01M. Η προσθήκη του διαλύματος έγινε με πολυπιπέτα ώστε να υπάρχει κοινό σημείο έναρξης για όλα τα πηγαδάκια – όλες τις αντιδράσεις.

## 2.10 Πρόγραμμα αποτύπωσης δεδομένων – Στατιστικά

Για τη μέτρηση των απορροφήσεων χρησιμοποιήθηκε αυτοματοποιημένο φωτόμετρο, το οποίο κατέγραφε τις απορροφήσεις στα 405nm ανά 1λεπτό. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα καταγράφηκαν και αναλύθηκαν σε H/Y με χρήση του προγράμματος Gen5. Το πρόγραμμα επιπλέον παρείχε την δυνατότητα στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων (υπολογισμό μέσου όρου, τυπικής απόκλισης και συντελεστή μεταβλητότητας).

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3. Αποτελέσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η σίγηση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης σε άτομα της μεσογειακής μύγας, *Ceratitis capitata* μέσω της τεχνολογίας RNAi. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) ήταν μέσω της τροφής τόσο σε ενήλικα άτομα όσο και σε προνύμφες.

Η λειτουργικότητα των δίκλωνων μορίων RNA στην αποσιώπηση του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης αξιολογήθηκε σε ξεχωριστές πειραματικές ομάδες, η καθεμία από τις οποίες εξέταζε μια συγκεκριμένη παράμετρο. Στα ενήλικα άτομα έγινε έλεγχος της επίδρασης i) του χρόνου χορήγησης dsRNA και ii) της ποσότητας του δίκλωνου RNA που χορηγήθηκε. Στις προνύμφες μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων dsRNA στην ομαλή ανάπτυξη (μέγεθος) καθώς και την ικανότητα ολοκλήρωσης του βιολογικού κύκλου (βομβυκίωση).

#### 3.1 Χορήγηση dsRNA σε ενήλικα άτομα της *C. capitata*

Η αποτελεσματικότητα των dsRNA στη μείωση της έκφραση της AChE των ενήλικων ατόμων εξετάστηκε σε μία σειρά πειραμάτων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν κοινή, ωστόσο σε κάθε κεφάλαιο μελετήθηκε η διαφορετική επιρροή στη χρονική ή ποσοτική έκθεση στα δίκλιωνα μόρια RNA.

Τα άτομα που επιλέχθηκαν είχαν περίπου το ίδιο μέγεθος ώστε να αποφευχθούν σφάλματα στις μετρήσεις που αφορούν την ποσότητα του ενζύμου. Ο δείκτης που επιλέχθηκε για τον έλεγχο της αποσιώπησης ήταν η Vmax της AChE. Η μέγιστη ταχύτητα δράσης του ενζύμου είναι αντιπροσωπευτική της ποσότητάς του, καθώς η Vmax είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου. Επιπλέον, ο δείκτης Vmax επιλέχθηκε διότι υπάρχει η μέθοδος για να μετρηθεί πειραματικά (μέθοδος Ellman). Οι μετρήσεις των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 2 φορές ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα και να είναι στατιστικά σημαντικά. Επιπλέον, προηγήθηκε η μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης των ατόμων με τη μέθοδο Bradford της μέτρησης Vmax, ώστε να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

##### 3.1.1 Επίδραση της διάρκειας χορήγησης δίκλωνων μορίων RNA

Στη πρώτη σειρά πειραμάτων εξετάστηκε η μείωση της έκφρασης της AChE σε σχέση με τη χρονική διάρκεια χορήγησης των εντόμων dsRNA. Το χρονικό εύρος που χρησιμοποιήθηκε κάλυψε 1 έως 3 μέρες. Οι πίνακες 1 και 2 συγκεντρώνουν τις ποσότητες dsRNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα και τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης. Τα έντομα που παρουσιάζονται στους πίνακες 1.i) έως 1.iv) παρέμειναν σε νηστεία για 1 μέρα πριν την εκκίνηση του πειράματος, ενώ αντίθετα τα έντομα που παρουσιάζονται στους πίνακες 2.i) έως 2.v) παρέμειναν σε νηστεία για 2 μέρες πριν την εκκίνηση του πειράματος. Ο χειρισμός αυτός (νηστεία 1 ή 2 ημερών) είχε ως στόχο τη σίγουρη κατανάλωση του μέσου διατροφής που περιείχε το dsRNA από το έντομο.

Πίνακας 1.i) - Χορήγηση σταθερής ποσότητας dsRNA σε διάστημα 3 ημερών. Παρουσιάζονται τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν, οι ποσότητες των dsRNA καθώς και οι ημέρες χορήγησης. Όπου υπάρχει η ένδειξη «0» σημαίνει ότι το έντομο συνέχισε και τρεφόταν με την τροφή και το dsRNA της προηγούμενης ημέρας

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
1 <sup>ο</sup>	1	0,8μg	0	0	101
	2	0,8μg	0,8μg	0	101
	3	0,8μg	0,8μg	0,8μg	96,83
	Control	-	-	-	101
	Control	-	-	-	107

Στο πείραμα 1 έγινε σύγκριση της αποτελεσματικότητας χορήγησης 0,8μg dsRNA σε διάστημα 1 έως 3ών ημερών. Οι μετρήσεις της ενεργότητας της AChE έγιναν την τρίτη ημέρα. Σύμφωνα με το πρώτο έντομο control η μέγιστη ταχύτητα της AChE, που αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενζύμου (Vmax ανάλογη της [C]ενζύμου), δεν παρουσίασε μείωση. Αντίθετα, η σύγκριση με το δεύτερο control όσον αφορά τα δύο πρώτα έντομα κατέδειξε μικρή μείωση, ενώ το τρίτο έντομο το οποίο έλαβε για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα dsRNA παρουσίασε μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου.

Πίνακας 1.ii) - Χορήγηση διαφορετικών ποσοτήτων dsRNA σε διάστημα 3 ημερών. Παρουσιάζονται τα έντομα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι ποσότητες και η διάρκεια χορήγησης των μορίων dsRNA

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
2 <sup>ο</sup>	4	2μg	0	0	80,44
	5	6μg	0	0	60,33

Στο συγκεκριμένο πείραμα χορηγήθηκαν διαφορετικές ποσότητες dsRNA στο μέσο διατροφής την πρώτη ημέρα. Οι μετρήσεις της ενεργότητας της AChE πραγματοποιήθηκαν μετά από 3 ημέρες. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 1.ii, η μεγαλύτερη χορήγηση dsRNA οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας της AChE, αποτελώντας μία πρόωμη ένδειξη αποσιώπησης του γονιδίου. Το έντομο 3, στο οποίο χορηγήθηκαν 6μg dsRNA, παρουσίασε τιμή Vmax ~60 σε σχέση με το έντομο 2 στο οποίο χορηγήθηκαν 2μg dsRNA και η τιμή Vmax ήταν ~80.

Πίνακας 1.iii) - Χορήγηση μεγάλης ποσότητας dsRNA σε διάστημα 3 ημερών. Παρουσιάζεται η ποσότητα δίκλωνου RNA που χρησιμοποιήθηκε και η διάρκεια της χορήγησης

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
3 <sup>ο</sup>	6	8μg	0	0	52,89 ± 17,29
	Control	-	-	-	65,89 ± 3,10

Με αφορμή τη μείωση που προκάλεσε η χορήγηση διαφορετικής ποσότητας dsRNA στο προηγούμενο πείραμα, επιλέχθηκε στο έντομο 6 να χορηγηθούν 8μg δίκλωνου RNA. Το έντομο παρουσίασε σημαντική μείωση της ενεργότητας της AChE σε σχέση με το έντομο control.



Ωστόσο τα αποτελέσματα του εντόμου 6 δεν ήταν επαναλαμβανόμενα αλλά παρουσίαζαν μεγάλη απόκλιση με αποτέλεσμα η αξιοπιστία του θετικού αποτελέσματος να θεωρείται μικρή.

**Πίνακας 1.iv) - Επανάληψη της χορήγησης μεγάλων ποσοτήτων dsRNA σε διάστημα 3 ημερών. Χρησιμοποιήθηκαν 3 έντομα με τις αντίστοιχες ποσότητες dsRNA και ένα control**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
4 <sup>ο</sup>	7	2μg	0	0	43,19
	8	6μg	0	0	58,26
	9	8μg	0	0	58,22

Στο πείραμα 4 εξετάστηκε εκ νέου η χορήγηση 8μg dsRNA καθώς και η χορήγηση 2 και 6μg dsRNA. Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε την πρώτη ημέρα και τα έντομα συνέχισαν να τρέφονται για 3 ημέρες, μετά από τις οποίες έγιναν οι μετρήσεις. Οι αυξανόμενες ποσότητες dsRNA δεν παρουσίασαν και τη σχετική μείωση στη Vmax. Αντίθετα μάλιστα, το έντομο με τη μικρότερη κατανάλωση dsRNA κατέδειξε τη μεγαλύτερη μείωση της τιμής Vmax, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αξιολογηθεί η επίδραση της χορήγησης του dsRNA.

**Πίνακας 2.i) - Χορήγηση μεγάλης ποσότητας dsRNA σε διάστημα 2 ημερών. Παρουσιάζεται η ποσότητα dsRNA που χρησιμοποιήθηκε και η διάρκεια χορήγησης. Όπου υπάρχει η ένδειξη «/» σημαίνει ότι το έντομο δεν συνέχισε να τρέφεται τη συγκεκριμένη μέρα, αλλά το πείραμα διακόπηκε.**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
1 <sup>ο</sup>	1	9,2μg	7,6μg	/	53 ± 1,89
	Control	-	-	-	55,17 ± 3,54

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η χορήγηση 9,2 και 7,6μg dsRNA σε δύο διαδοχικές ημέρες. Οι μετρήσεις έγιναν μετά τη δεύτερη ημέρα. Η Vmax και κατά συνέπεια η ποσότητα της AChE βρέθηκε μειωμένη στο έντομο 1 σε σχέση με το control, ωστόσο η επανάληψη του πειράματος κατέδειξε ότι οι τιμές αλληλεπικαλύπτονταν, και το αποτέλεσμα δε μπορεί να θεωρηθεί σημαντικό.

**Πίνακας 2.ii) - Επανάληψη της χορήγησης dsRNA σε διάστημα 2 ημερών. Παρουσιάζονται οι ποσότητες και τα αποτελέσματα της χορήγησης dsRNA**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
2 <sup>ο</sup>	2	9,2μg	7,6μg	/	58,26
	Control	-	-	-	41,19

Στο πείραμα 2 επαναλήφθηκε η χορήγηση 9,2 και 7,6μg σε διάστημα 2 ημερών. Αντίθετα με το πείραμα 1, το έντομο στο οποίο χορηγήθηκε το δίκλωνο RNA δεν παρουσίασε μείωση σε σχέση με το έντομο control. Το γεγονός μάλιστα ότι η τιμή Vmax του control είναι πολύ

χαμηλότερη από το έντομο-δείγμα, μη παρουσιάζοντας τουλάχιστον παρόμοια τιμή, δηλώνει ότι κάποιο σφάλμα υπάρχει στην ποσότητα πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε.

**Πίνακας 2.iii) - Χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων dsRNA σε διάστημα 3ών ημερών. Παρουσιάζονται οι ημέρες χορήγησης, ο αριθμός των ατόμων και η ποσότητα dsRNA. Η ένδειξη «x» δηλώνει το θάνατο του εντόμου κατά τη διάρκεια του πειράματος**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
3 <sup>ο</sup>	3	10μg	0	0	34,5 ± 1,53
	4	10 μg	0	10	35,5 ± 0,58
	5	12 μg	0	x	37,17 ± 3,06

Στο 3<sup>ο</sup> πείραμα εξετάστηκε η επίδραση της χορήγησης 10μg dsRNA σε μοναδική δόση καθώς και η χορήγηση δύο δόσεων 10μg σε διαφορετικές μέρες (1<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup>). Το έντομο στο οποίο χορηγήθηκαν 12μg dsRNA βρέθηκε νεκρό την 3<sup>η</sup> μέρα του πειράματος. Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δραστηριότητας της AChE και σε αυτό το έντομο. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές και ο μέσος όρος τους παρουσιάζεται στον πίνακα 2.iii). Η ταχύτητα του ενζύμου βρέθηκε ελάχιστα μειωμένη στα έντομα 3 και 4, τα οποία έλαβαν 10 και 20 μg dsRNA, αντίστοιχα σε σχέση με το άτομο 5 στο οποίο χορηγήθηκαν 12μg dsRNA. Ωστόσο, οι αποκλίσεις και η αλληλοεπικάλυψη στις τιμές της δραστηριότητας της AChE κατά τις μετρήσεις δεν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων

**Πίνακας 2.iv) - Χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων σε διάστημα 2 ημερών. Παρουσιάζεται η ποσότητα του δίκλωνου RNA και οι μετρήσεις του πειράματος**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα μg dsRNA	2η μέρα μg dsRNA	3η μέρα μg dsRNA	Vmax
4 <sup>ο</sup>	6	12 μg	12 μg	/	24 ± 1,16
	Control	-	-	-	22,67 ± 1,00

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η χορήγηση της μεγαλύτερης ποσότητας dsRNA σε διάστημα 2 ημερών. Στο έντομο 6 έγινε χορήγηση συνολικά 24μg dsRNA, 12μg κάθε ημέρα για διάστημα 2 ημερών και την τρίτη ημέρα ,πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Παρόλο της χορήγησης αρκετά μεγάλης ποσότητας dsRNA, η δραστηριότητα της AChE του εξεταζόμενου εντόμου και του control δεν παρουσίασε διαφορά, αποτελώντας ένδειξη μη αποσιώπησης του γονιδίου.

**Πίνακας 2.v) - Χορήγηση μικρής ποσότητας δίκλωνου RNA σε καθημερινή βάση μέχρι το θάνατο του εντόμου. Το έντομο βρέθηκε νεκρό την 19<sup>η</sup> ημέρα**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	1η μέρα dsRNA	2η	3η	...	18η	19η	Vmax
5 <sup>ο</sup>	7	1 μg	1	1	1	1	1	30,61 ± 2,15
	Control	-	-	-	-	-	-	28,00 ± 2,0

Σε ένα μοναδικό πείραμα, χορηγήθηκε 1μg δίκλωνου RNA σε καθημερινή βάση στην τροφή ενός ενήλικου μέχρι αυτό να πεθάνει (19μέρες). Το πείραμα δεν παρουσίασε θετικό αποτέλεσμα καθώς η δράση της AChE δεν βρέθηκε μειωμένη σε σχέση με το control.

### 3.1.2 Επίδραση της ποσότητας dsRNA στην τροφή

Σε δεύτερο στάδιο εξετάστηκε η μείωση της AChE σε σχέση με την ποσότητα χορήγησης δίκλωνων μορίων RNA. Οι πίνακες 3 και 4 παρουσιάζουν τις χορηγούμενες ποσότητες και τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Τα άτομα που παρέμειναν σε νηστεία 1 μέρα περιέχονται στους πίνακες 3.i) έως 3.iii), ενώ αντίστοιχα τα άτομα που παρέμειναν σε νηστεία για 2 μέρες παρουσιάζονται στους πίνακες 4.i) και 4.ii).

**Πίνακας 3.i) - Χορήγηση μικρής ποσότητας dsRNA σε μία ημέρα. Παρουσιάζεται ο αριθμός των ατόμων και τα αποτελέσματα των μετρήσεων της δραστηριότητας του ενζύμου AChE**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	Ποσότητα dsRNA (μg)	Vmax
1 <sup>ο</sup>	1	2μg	86,83
	Control	-	96,83

Στο άτομο που χορηγήθηκαν 2μg dsRNA σε διάστημα μίας ημέρας παρατηρήθηκε μείωση σε σχέση με το έντομο control της τάξης του 11%. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν επαναλαμβανόμενα, εμποδίζοντας την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την αποσιώπηση της AChE.

**Πίνακας 3.ii) - Χορήγηση dsRNA σε μία ημέρα. Παρουσιάζεται η ποσότητα dsRNA και η μέτρηση της ενζυμικής ταχύτητας**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	Ποσότητα dsRNA (μg)	Vmax
2 <sup>ο</sup>	2	8μg	100,72 ± 7,34
	Control	-	86,56 ± 9,04

Στο συγκεκριμένο πείραμα χορηγήθηκε ποσότητα 8μg dsRNA στην τροφή για μία ημέρα. Στον πίνακα 1.iii) είχε χορηγηθεί η ίδια ποσότητα και το έντομο τράφηκε με αυτή για 3 ημέρες. Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκε αν η χορήγηση της ίδιας ποσότητας σε μία ημέρα θα παρουσίαζε το ίδιο αποτέλεσμα. Ωστόσο, το θετικό αποτέλεσμα δεν επαναλήφθηκε καθώς οι τιμές Vmax του εντόμου και του control αλληλεπικαλύπτονταν, αφήνοντας ερωτήματα ως προς την επίτευξη της σίγησης.

**Πίνακας 3.iii) - Χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων dsRNA σε μία ημέρα. Παρουσιάζονται τα έντομα, οι ποσότητες dsRNA και τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Το σύμβολο «x» στο εβδομο άτομο σημαίνει ότι το έντομο πέθανε πριν την ολοκλήρωση του πειράματος.**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	Ποσότητα dsRNA (μg)	Vmax
3 <sup>ο</sup>	3	8μg	58,22
	4	15μg x	X
	Control	-	40,52

Στο πείραμα 3 εξετάστηκε η ποσότητα των 8μg dsRNA αλλά και η ακόμα μεγαλύτερη ποσότητα χορηγούμενου dsRNA 15μg. Το έντομο στο οποίο χορηγήθηκαν 15μg dsRNA πέθανε πριν τη λήξη του πειράματος και δεν έγιναν μετρήσεις της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης. Δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί αν ο θάνατος του εντόμου προήλθε από τη νευροτοξική δράση του dsRNA ή από φυσικά αίτια. Όσον αφορά στο άτομο στο οποίο χορηγήθηκαν 8μg dsRNA, αυτό δεν παρουσίασε μείωση της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης που να υπερβαίνει την τιμή Vmax του εντόμου control.

**Πίνακας 4.i) - Χορήγηση μικρής ποσότητας dsRNA σε μία ημέρα σε άτομα που ήταν 2 ημέρες σε νηστεία. Παρουσιάζεται η ποσότητα του dsRNA και τα αποτελέσματα των μετρήσεων**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	Ποσότητα dsRNA (μg)	Vmax
1 <sup>ο</sup>	1	2μg	65,06 ± 1,71
	control	-	61,06 ± 2,12

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων που αφορούν την επίδραση της ποσότητας dsRNA στην τροφή χρησιμοποιήθηκαν έντομα που παρέμειναν σε νηστεία 2 ημέρες. Στο πρώτο πείραμα έγινε χορήγηση 2μg dsRNA και μετά από μία ημέρα μετρήθηκε η ενεργότητα της AChE. Το εξεταζόμενο έντομο παρουσίασε παρόμοια τιμή Vmax με το control, αποτελώντας ένδειξη μη επιτυχούς αποσιώπησης.

**Πίνακας 4.ii) - Χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων dsRNA σε διάστημα μίας ημέρας. Τα έντομα που παρουσιάζονται παρέμειναν σε νηστεία 2 ημέρες. Παρουσιάζεται η ποσότητα του dsRNA που χρησιμοποιήθηκε και οι μετρήσεις της Vmax**

Πείραμα	Έντομα (α/α)	Ποσότητα dsRNA (μg)	Vmax
2 <sup>ο</sup>	2	10μg	72,17 ± 4,16
	3	12μg	76,17 ± 7,64

Στο δεύτερο πείραμα που αφορούσε άτομα τα οποία παρέμειναν σε νηστεία 2 ημέρες χορηγήθηκαν οι ποσότητες των 10μg και 12μg dsRNA. Τα δύο έντομα στα οποία χορηγήθηκε το dsRNA παρουσίασαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η αύξηση της χορηγούμενης ποσότητας dsRNA δεν παρουσίασε μεγαλύτερη αποσιώπηση του γονιδίου της AChE αλλά αντίθετα οι τιμές της AChE ήταν περίπου σταθερές.

### 3.2 Χορήγηση dsRNA σε προνύμφες της *C. capitata*

Η χορήγηση του δίκλωνου RNA στις προνύμφες είχε ως σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της μείωσης της δραστηριότητας της AChE στην ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Ο πίνακας 5 δείχνει τις ποσότητες τροφής και dsRNA που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το αποτέλεσμα της χορήγησης.

Πίνακας 5 - Χορήγηση δίκλωνου RNA στο μέσο διατροφής των προνυμφών. Παρουσιάζονται οι προνύμφες που χρησιμοποιήθηκαν, οι ποσότητες του dsRNA και του θρεπτικού μέσου καθώς και η αξιολόγηση της ανάπτυξης κάθε προνύμφης

Πείραμα	Προνύμφες (α/α)	Ποσότητα dsRNA(μg)		Μέσο διατροφής (μl)		Ανάπτυξη
1 <sup>ο</sup>	1	1μg		200μl		Φυσιολογική
	Control	-		200μl		Φυσιολογική
2 <sup>ο</sup>	2	2μg		200μl		Φυσιολογική
	3	6μg		200μl		Φυσιολογική
	Control	-		200μl		Φυσιολογική
3 <sup>ο</sup>	4	5μg		70μl		Καθυστερεί
	Control	-		70μl		Φυσιολογική
4 <sup>ο</sup>	5	1 <sup>η</sup> μέρα: 5	2 <sup>η</sup> μέρα 5	40μl	30μl	Φυσιολογική
	6	1 <sup>η</sup> μέρα: 5	2 <sup>η</sup> μέρα 5	40μl	30μl	Φυσιολογική
	Control	-		50μl	50μl	Φυσιολογική
	Control	-		50μl	50μl	Φυσιολογική
5 <sup>ο</sup>	7	12,5μg		70μl		Φυσιολογική
	Control	-		70μl		Φυσιολογική

Σε κάθε πείραμα επιλέχθηκαν προνύμφες που είχαν παρόμοιο μέγεθος ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της ανάπτυξης στα διαφορετικά άτομα που λάμβαναν ή όχι το δίκλωνο RNA. Στα πειράματα 1 και 2 χορηγήθηκαν αυξανόμενες ποσότητες dsRNA σε 200μl τροφής. Οι προνύμφες που τρέφονταν με το dsRNA δεν παρουσίασαν καθυστέρηση στην ανάπτυξη ή τη βομβυκίωση σε σχέση με τα άτομα control. Στην προνύμφη 4, στην οποία χορηγήθηκαν 5μg dsRNA σε 70μl θρεπτικού μέσου παρατηρήθηκε καθυστέρηση στη βομβυκίωση σε σχέση με την προνύμφη control που τρεφόταν με 70μl τροφής. Στο πείραμα 4 (άτομα 5 και 6) έγινε προσπάθεια να επαναληφθεί η καθυστέρηση βομβυκίωσης σε δύο άτομα στα οποία χορηγήθηκαν 10μg dsRNA σε διάστημα δύο ημερών. Παρόλ' αυτά οι συγκεκριμένες προνύμφες δεν παρουσίασαν καμία καθυστέρηση στην ανάπτυξη και βομβυκίωση σε σχέση με τα αντίστοιχα control. Σε ένα τελευταίο πείραμα εξετάστηκε η χορήγηση μεγάλης ποσότητας dsRNA σε μία δόση (12,5μg), χωρίς όμως να παρατηρηθεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη και βομβυκίωσή της σε σχέση με την προνύμφη control.

Στο σύνολο των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν εξετάστηκε η δυνατότητα αποσιώπησης του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης με τη χρήση ειδικών μορίων dsRNA στην τροφή ενηλίκων και προνυμφών της *C. capitata*. Όσον αφορά τα ενήλικα άτομα μελετήθηκε η χορήγηση διαφορετικών ποσοτήτων dsRNA για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και μετρήθηκε η δράση της AChE. Αντίθετα, στις προνύμφες μελετήθηκε η αναστολή της φυσιολογικής ανάπτυξης και βομβυκίωσης. Τα αποτελέσματα παρουσίασαν μικρή επαναληψιμότητα ωστόσο σε ορισμένα ενήλικα άτομα κατέδειξαν ότι είναι δυνατό να προκληθεί σίγηση του γονιδίου της AChE. Αντίστοιχα, στις προνύμφες ένα μόνο άτομο παρουσίασε καθυστέρηση στη βομβυκίωση και το αποτέλεσμα δεν ήταν δυνατό να επαναληφτεί σε άλλες προνύμφες. Συνολικά, αν και στη μελέτη παρουσιάστηκαν αρκετά σφάλματα, τα αποτελέσματα μπορούν να αποτελέσουν μία πρώιμη ένδειξη της ικανότητας αποσιώπησης γονιδίων στη μεσογειακή μύγα μέσω χορήγησης dsRNA στην τροφή.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4. Συζήτηση

Η ανακάλυψη της RNA παρεμβολής αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας τα τελευταία χρόνια. Η τεχνολογία που στηρίζεται στο RNAi χρησιμοποιείται τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* διαδικασίες με πλήθος εφαρμογών που περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων μέσω της knockdown ρύθμισης καθώς και εφαρμογές στην ιατρική για τη θεραπεία ασθενειών. Ο μηχανισμός υπάρχει σε πλήθος οργανισμών, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ζώα που δεν αποτελούν «μοντέλα». Η αποσιώπηση γονιδίων με μόρια dsRNA έχει εφαρμοστεί σε πλήθος εντόμων όπως *A. aegypti*, *R. prolixus*, *B. drosalis*, *H. axyridis* και *E. postvittana* (Adelman et al., 2008; Araugio et al., 2006; Chen et al., 2008; Kuwayama et al., 2006; Turner et al., 2006). Όπως η μέθοδος της PCR σταδιακά εφαρμόστηκε και έφερε επανάσταση στη βιοτεχνολογία, έτσι και η χρήση του RNAi έχει ξεκινήσει ως εργαλείο στη βιοτεχνολογία που σταδιακά εφαρμόζεται όλο και περισσότερο. Ωστόσο, η εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi στο πεδίο της οικονομικής εντομολογίας για την αντιμετώπιση εντόμων που αποτελούν παράσιτα στις καλλιέργειες έχει μόλις ξεκινήσει να διερευνάται αφήνοντας ανοιχτά πολλά ερωτήματα για τα γονίδια-στόχους του dsRNA καθώς και την αποτελεσματικότητά του.

Στα έντομα μέγιστης οικονομικής σημασίας που παρασιτούν στις καλλιέργειες ανήκει και η *Ceratitidis capitata*. Αποτελεί ένα από τα πιο καταστροφικά είδη της ομάδας των εντόμων που προσβάλουν τους καρπούς (μύγες των φρούτων). Εκτελεί το βιολογικό της κύκλο εις βάρος της αγροτικής παραγωγής και οικονομίας καταστρέφοντας μεγάλο αριθμό καλλιεργειών (>200 φρούτα χρησιμοποιούνται ως ξενιστές) για τη θρέψη και την εναπόθεση των αυγών της. Η οικονομική καταστροφή που προκαλεί στο εμπόριο φρούτων υπολογίζεται σε εκατοντάδες δισεκατομμυρίων ευρώ κάθε χρόνο, καθιστώντας απαραίτητη την εύρεση μεθόδων για την αντιμετώπισή της. Η χημεία ήταν η πρώτη επιστήμη που έδωσε λύση στο πρόβλημα με σχεδιασμό ενώσεων-εντομοκτόνων, τα οποία αποτελούσαν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, ενζύμου κλειδί στην ομαλή λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων. Ωστόσο, η αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων οδήγησε σταδιακά στην εμφάνιση ανθεκτικών φαινοτύπων, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες εντομοκτόνου ή να σχεδιάζονται εξ αρχής νέα χημικά μόρια. Η υπερβολική χρήση με τη σειρά της προκάλεσε περιβαλλοντικά προβλήματα διότι τα χημικά συσσωρεύονταν στο περιβάλλον και με σταδιακή έκπλυση κατέληγαν στα υπόγεια ύδατα, προκαλώντας πλήθος προβλημάτων υγείας σε άνθρωπο και ζώα.

Η γνώση που έχει συσσωρευτεί μέχρι σήμερα για τη μεσογειακή μύγα επιτρέπει την ανάπτυξη μεθόδων καταπολέμησης και ελέγχου του πληθυσμού που στηρίζονται σε γονιδιακό επίπεδο. Εντομοκτόνα που στηρίζονται στην τεχνολογία RNAi μπορούν να παρουσιάσουν μεγάλη πρακτική εφαρμογή, καθώς η μέθοδος συγκεντρώνει ισχυρά πλεονεκτήματα έναντι των χημικών εντομοκτόνων. Ο εξειδικευμένος σχεδιασμός των μορίων RNA τα καθιστά απόλυτα ασφαλή και ο μικρός χρόνος ημιζωής τους αποτρέπει τη συσσώρευση στο περιβάλλον. Επιπλέον, η παρουσίαση ανθεκτικότητας σε ένα μόριο RNA (λόγω της μετάλλαξης της αλληλουχίας-στόχου) δεν αποτελεί πρόβλημα καθώς είναι εύκολος ο επανασχεδιασμός των δίκλωνων μορίων RNA ώστε αυτά να στοχεύουν την ίδια ή διαφορετική περιοχή του γονιδίου, ή ακόμα και διαφορετικό γονίδιο. Αντίθετα η παρουσία ανθεκτικότητας σε ένα χημικό εντομοκτόνο είναι μεγάλο πρόβλημα, καθώς απαιτείται σχεδιασμός νέας χημικής ουσίας, πράγμα που αυξάνει το κόστος αντιμετώπισης των παράσιτων αλλά και τον κίνδυνο περιβαλλοντικής μόλυνσης.

Σκοπός του πειράματος που εκτελέστηκε ήταν η χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA μέσω της διατροφής σε ενήλικα άτομα και προνύμφες της μεσογειακής μύγας, ώστε να πραγματοποιηθεί μείωση της έκφρασης της ακετυλοχολινεστεράσης. Η παρούσα εργασία με τη μελέτη πάνω στην αποσιώπηση του γονιδίου της AChE μέσω της τεχνολογίας RNAi ακολουθεί την κατεύθυνση δημιουργίας εντομοκτόνων φιλικότερων προς το περιβάλλον στηριζόμενων μόνο στην αλληλουχία γονιδίων. Η προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι τα γονίδια που στοχεύονται από τα dsRNAs να είναι σημαντικά για την ομαλή λειτουργία και επιβίωση των εντόμων. Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένζυμο κλειδί για το κεντρικό νευρικό των εντόμων, και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε ως γονίδιο-στόχος στη παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελούν μία πρώιμη ένδειξη ότι η καταπολέμηση της μεσογειακής μύγας με χρήση της τεχνολογίας RNAi είναι δυνατή. Ενήλικα άτομα που τους χορηγήθηκαν ποσότητες dsRNA (2-20μg) παρουσίασαν μείωση της έκφρασης της ακετυλοχολινεστεράσης, χωρίς όμως να είναι δυνατή η επανάληψη των αποτελεσμάτων. Την επαναληψιμότητα της μεθόδου φαίνεται πως επηρεάζει η μέθοδος Bradford, η οποία παρουσίασε εύρος αποτελεσμάτων στον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης, ακόμα και σε δείγματα πρωτεΐνης του ίδιου ατόμου.

Η χορήγηση μικρών ποσοτήτων dsRNA (0,8-2μg) για μεγάλο χρονικό διάστημα (3μέρες) φαίνεται πως δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη μετάφραση του mRNA της AChE. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην καταστροφή των μικρών ποσοτήτων RNA, πριν αυτά μπορέσουν να μεταφερθούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στην μεσογειακή μύγα δεν έχουν εντοπιστεί πρωτεΐνες-υποδοχείς αντίστοιχοι αυτών του *C. elegans* (SID-1/SID-2) που είναι υπεύθυνοι για τη μεταφορά των dsRNAs μέσα στο κύτταρο. Ο μηχανισμός μεταφοράς ακολουθεί τη διαδικασία της ενδοκύττωσης, όπως φαίνεται πως ισχύει για τα έντομα (Huvette et al., 2009). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η μεταφορά του δίκλωνου RNA από το πεπτικό σύστημα στο νευρικό σύστημα της *C. capitata* είναι δύσκολη με αποτέλεσμα η μεγαλύτερη ποσότητα του dsRNA να αποικοδομείται πριν φτάσει στον ιστό-στόχο. Αντίστοιχα, οι μεγάλες ποσότητες RNA κατέδειξαν κάποια θετικά αποτελέσματα, τα οποία όμως παρουσίαζαν μεγάλη τυπική απόκλιση. Αυτό σημαίνει ότι τα αποτελέσματα που βρέθηκαν καλύπτουν μεγάλο εύρος τιμών, και κατά συνέπεια να υπάρχει μεγάλη επικάλυψη με τις τιμές που βρέθηκαν για τα έντομα control κι επομένως χαμηλή αξιοπιστία θετικού αποτελέσματος. Συνολικά, φαίνεται πως μεγαλύτερες πιθανότητες για επιτυχία της μεθόδου υπάρχουν όταν χορηγούνται στα έντομα μεγάλες ποσότητες RNA σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα της χορήγησης dsRNA σε προνύμφες της *C. capitata* σύμφωνα με τα πειράματα είναι πολύ χαμηλή έως μηδενική. Μία μόνο προνύμφη από το σύνολο αυτών που εξετάστηκαν παρουσίασε καθυστέρηση στη βομβυκίωση και καμία δεν παρουσίασε μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης ή στο μέγεθος. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι επιλέχθηκαν προνύμφες που βρίσκονταν ήδη σε προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης, καθώς ήταν ευκολότερος ο χειρισμός τους, με αποτέλεσμα η αποσιώπηση της AChE να μην είναι επιτυχής ή να μην γίνεται εμφανής. Ωστόσο υπάρχουν δημοσιεύσεις όπου έχει επιτευχθεί αποσιώπηση της ακετυλοχολινεστεράσης σε προνύμφες εντόμου. Σε προνύμφες της *H. armigera* χορηγήθηκε dsRNA μέσω της τροφής και η καταστροφή των mRNA της AChE είχε ως αποτέλεσμα μείωση του μεγέθους και του ρυθμού ανάπτυξης των προνυμφών. Το γεγονός επιβεβαιώθηκε με ανάλυση RT-PCR όπου παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ποσότητας μεταγράφων του γονιδίου της AChE (Kumar et al., 2009).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μεταφορά των δίκλωνων μορίων RNA από το πεπτικό στο νευρικό σύστημα της μεσογειακής μύγας είναι δύσκολη με αποτέλεσμα η μεγαλύτερη ποσότητα



dsRNA να καταστρέφεται πριν φτάσει στον ιστό-στόχο. Γενικά, το dsRNA έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το μονόκλωνο RNA και είναι πιο σταθερό, ωστόσο είναι εύκολο να αποδομηθεί στο περιβάλλον. Επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στρατηγικές βελτίωσης της μεθόδου, όπως η χρήση λιποσωμάτων που θα προστατέψει το dsRNA από τη γρήγορη αποδόμηση στο περιβάλλον και ταυτόχρονα μπορεί να βοηθήσει στην απορρόφησή του από το πεπτικό σύστημα του εντόμου (Tseng et al., 2009). Τα λιποσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα γονιδιακής θεραπείας καρκίνου (σε ζώα μοντέλα όπως ο ποντικός) ώστε να αυξήσουν το χρόνο ημιζωής των δίκλωνων μορίων RNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μεταφορά dsRNA με τα λιποσώματα ήταν τουλάχιστον 1000 φορές πιο αποδοτική σε σχέση με τη μεταφορά «γυμνού» dsRNA. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές τροποποίησης των δίκλωνων μορίων RNA (αντικατάσταση του -OH της ριβόζης με -F, -O, -Me και -H) ώστε να βελτιωθεί η σταθερότητά τους (Singh et al., 2009). Συνολικά, η αύξηση της σταθερότητας των δίκλωνων μορίων RNA οδηγεί σε μείωση της ποσότητας dsRNA που πρέπει να χορηγηθεί ώστε να επιτευχθεί η αποσιώπηση. Αυτό μεταφράζεται σε οικονομικό όφελος, καθώς το dsRNA αποτελεί ένα ακριβό εντομοκτόνο.

Η δυνατότητα της αποσιώπησης γονιδίων με τη χορήγηση dsRNA μορίων μέσω της τροφής στη *Ceratitidis capitata* δεν είναι πλήρως μελετημένη. Τα πλεονεκτήματα που συγκεντρώνει η χρήση της τεχνολογίας RNAi ως εντομοκτόνο, η εξειδίκευση προς το στόχο και η μηδενική τοξικότητα προς άλλους οργανισμούς, τονίζουν ακόμα περισσότερο την ανάγκη μελετών που αφορούν την εφαρμογή και την αξιοποίηση των ιδιοτήτων της RNA παρεμβολής ως μέθοδο καταπολέμησης εντόμων οικονομικής σημασίας.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adelman N. Zach, Michelle A.E. Anderson, Elaine M. Morazzani, Kevin M. Myles (2008) A transgenic sensor strain for monitoring the RNAi pathway in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*
- Agrawal Neema, P. V. N. Dasaradhi, Asif Mohammed, Pawan Malhotra, Raj K. Bhatnagar, and Sunil K. Mukherjee (2003) RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, Microbiology and molecular biology, p.657–685
- Araujo R.N., A. Santos, F.S. Pinto, N.F. Gontijo, M.J. Lehane, M.H. Pereira (2006) RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection
- Arnosti D.N. (2001) Design and function of transcriptional switches in *Drosophila*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (2002): p.1257–1273
- Baum James A, Thierry Bogaert, William Clinton, Gregory R Heck, Pascale Feldmann, Oliver Ilagan, Scott Johnson, Geert Plaetinck, Tichafa Munyikwa, Michael Pleau, Ty Vaughn & James Roberts (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference
- Bautista Ma. Anita M., Tadashi Miyata, Ken Miura, Toshiharu Tanaka (2009) RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, p. 38–46
- Behura Susanta K. (2006) Insect microRNAs: Structure, function and evolution, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (2007), p.3–9
- Belles Xavier (2009) Beyond *Drosophila*: RNAi In Vivo and Functional Genomics in Insects, *Annu. Rev. Entomol.* (2010).55:p.111-128
- Bettencourt R. , O. Terenius and I. Faye (2002) Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos, *Insect Molecular Biology* (2002) 11(3): p.267–271
- Broehan Gunnar, Yasuyuki Arakane , Richard W. Beeman , Karl J. Kramer , Subbaratnam Muthukrishnan , Hans Merzendorfer (2009) Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: A role in molting revealed by RNA interference, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (2009): p.1-10
- Chen Shiu-Ling, Shu-Mei Dai, Kuang-Hui Lu, Cheng Chang (2007) Female-specific doublesex dsRNA interrupts yolk protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2008): p.155–165
- Clemens James C., Carolyn A. Worby, Nancy Simonson-Leff, Marco Muda, Tomohiko Maehama, Brian A. Hemmings, and Jack E. Dixon (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways
- Costa Lucio G., (2005) Current issues in organophosphate toxicology
- Davies Neil, Francis X. Villablanca and George K. Roderick (1999) Bioinvasions of the Medfly *Ceratitis capitata*: Source Estimation Using DNA Sequences at Multiple Intron Loci

- Enkerlin W. (2005) Impact of Fruit Fly Control Programmes Using the Sterile Insect Technique
- Enright Anton J, Bino John, Ulrike Gaul, Thomas Tuschl, Chris Sander and Debora S Marks (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*
- Fletcher B.S. (1989). Life history strategies of tephritid fruit flies. In World Crop Pests. Fruit Flies. Their biology, natural enemies and control, Volume 3B, p.195-206
- Franco Nunes Francis Morais, Zila' Luz Paulino Simões (2009) A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (2009) : p.157–160
- Ghanim Murad, Svetlana Kontsedalov, Henryk Czosnek (2007) Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (2007): p.732–738
- Gomez Eva, Orte and Xavier Belles (2009) MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects
- Gong Haiyan, Rika Umemiya, Jinlin Zhou, Min Liao, Houshuang Zhang, Honglin Jia, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan, Kozo Fujisaki (2009) Blocking the secretion of saliva by silencing the *HIYkt6* gene in the tick *Haemaphysalis longicornis*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (2009): p.372–381
- Grimm Dirk (2009) Small silencing RNAs: State-of-the-art, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009): p.672–703
- Hajeri Praveensingh B. and Sunit Kumar Singh (2009) siRNAs: their potential as therapeutic agents – Part I. Designing of siRNAs, *Drug Discovery Today* , Volume 14, Numbers 17/18, September 2009
- Heath Robert R. , Nancy D. Epsky, David Midgarden, and Byron I. Katsoyannos (2004) Efficacy of 1,4-Diaminobutane (Putrescine) in a Food-Based Synthetic Attractant for Capture of Mediterranean and Mexican Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) *Journal of Economic Entomology* 97(3): p.1126-1131.
- Hendrichs J., G. Franz and P. Rendon (1995) Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons, *Journal of Applied Entomology* Volume 119, Issue 1-5, p.371–377
- Hoa N.T., K.M. Keene, K.E. Olson, L. Zheng (2003) Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 (2003): p.949–957
- Huvenne Hanneke, Guy Smagghe (2009) Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review
- Isoe Jun, Alberto A. Rascón Jr., Susan Kunz, Roger L. Miesfeld (2009) Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes
- Κακάνη Εύη (2009) μοριακή ανάλυση γονιδιακών τόπων που εμπλέκονται στο μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα του σημαντικότερου παράσιτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Krafsur ES, Cummings MA, Endsley MA, Marquez JG and Nason JD (2005) Geographic differentiation in the house fly estimated by microsatellite and mitochondrial variation. *Journal of Heredity* Sep-Oct;96(5): p.502-12
- Kumar Maneesh, Gorakh Prasad Gupta, Manchikatla Venkat Rajam (2009) Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle
- Kuwayama H., T. Yaginuma, O. Yamashita and T. Niimi (2006) Germ-line transformation and RNAi of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*, *Insect Molecular Biology* (2006) 15(4), p.507–512
- Lipardi Concetta and Bruce M. Paters (2009) Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression
- Maori E., N. Paldi, S. Shafir, H. Kalev, E. Tsur, E. Glick and I. Sela (2009) IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion, *Insect Molecular Biology* (2009) 18 (1), p.55–60
- Masumoto Mika, Toshinobu Yaginuma and Teruyuki Niimi (2009) Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, *Bombyx mori*, using RNAi
- Mitchell Robert D., Elizabeth Ross, Christopher Osgood, Daniel E. Sonenshine, Kevin V. Donohue, Sayed M. Khalil, Deborah M. Thompson, R. Michael Roe (2007) Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (2007) : p.375–388
- Nishijima Daniel K, MD and Sage W Wiener, MD (2009) Toxicity, Organic Phosphorous Compounds and Carbamates
- Nowotny Marcin and Wei Yang (2009) Structural and functional modules in RNA interference, *Current Opinion in Structural Biology* 2009, 19: p.286–293
- O’Brochta D.A. (2005) Genetic Manipulation of Insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35 (2005) : p.647–648
- Οικονόμου Αικατερίνη (2006) Ανάλυση φυσικών πληθυσμών της μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata* – Διερεύνηση της σχέσης γενότυπου και των ξενιστών της με χρήση μικροδορυφορικών δεικτών, Διατριβή μεταπτυχιακού, Πανεπιστήμιο Πατρών
- Raphael Kathryn A., Steven Whyard, Deborah Shearman, Xin An, Marianne Frommer (2003) *Bactrocera tryoni* and closely related pest tephritids—molecular analysis and prospects for transgenic control strategies, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (2004) : p.167–176
- Revuelta L, M.D. Piulachs, X. Bellés, P. Castañera, F. Ortego, J.R. Díaz-Ruíz, P. Hernández-Crespo, F. Tenllado (2009) RNAi of ace1 and ace2 in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides

- Sant' Anna Mauricio R V, Bruce Alexander, Paul A Bates, and Rod J Dillon (2008) Gene silencing in Phlebotomine sand flies: xanthine dehydrogenase knock down by dsRNA micro-injections, *Insect Biochem Mol Biol.* 2008 June ; 38(6): p.652–660
- Schetelig Marc F, Carlos Caceres, Antigone Zacharopoulou, Gerald Franz and Ernst A. Wimmer (2009) Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)
- Schlüns H. and R. H. Crozier (2007) Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference, *Insect Molecular Biology* (2007) 16(6), p.753–759
- Schulz Joachim G., Guido David and Bassem A. Hassan (2009) A novel method for tissue-specific RNAi rescue in *Drosophila*, *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 13 e93
- Shannon Adam J, Trevor Tyson, Ilona Dix, Jacqueline Boyd and Ann M Burnell (2008) Systemic RNAi mediated gene silencing in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus*, *BMC Molecular Biology* 2008, 9:58
- Siebert Jerome B. and Todd Cooper (1995) peer-reviewed research article : If medfly infestation triggered a trade ban: Embargo on California produce would cause revenue, job loss, *California Agriculture* 49(4): p.7-12.
- Singh Sunit Kumar and Praveensingh B. Hajeri (2009) siRNAs: their potential as therapeutic agents – Part II. Methods of delivery, *Drug Discovery Today* \_ Volume 14, Numbers 17/18 \_ September 2009
- Thomas M.C., J.B. Heppner, R.E. Woodruff, H.V. Weems, G.J. Steck and T.R. Fasulo (2001) Mediterranean fruit fly: *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae) *DPI Entomology Circulars* 4, 230 and 273.
- Tian Honggang, Han Peng, Qiong Yao, Hongxin Chen, Qi Xie, Bin Tang, Wenqing Zhang (2009) Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene
- Tseng Yu-Cheng, Subho Mozumdar, Leaf Huang (2009) Lipid-based systemic delivery of siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) : p.721–731
- Turner C. T., M. W. Davy, R. M. MacDiarmid, K. M. Plummer, N. P. Birch and R. D. Newcomb (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding, *Insect Molecular Biology* (2006)15 (3), p.383–391
- Walker, K. (2006) Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) Pest and Diseases Image Library.
- Walshe D. P., S. M. Lehane, M. J. Lehane and L. R. Haines (2009) Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA, *Insect Molecular Biology* (2009)18 (1), p.11–19
- Watson James D., Amy A. Caudy, Richard M. Myers and Jan A. Witkowski (2007) *Recombinant DNA, Third edition – Genes and genomes – A short course; Chapers 4 and 9*
- Whyard Steven , Aditi D. Singh, Sylvia Wong (2009) Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides

Zhou Xuguo, Marsha M. Wheeler, Faith M. Oi, Michael E. Scharf (2008) RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2008): p.805– 815