



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ *Tephritidae*
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ RNAi ΣΤΟ ΜΕΣΟ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΧΡΙΣΤΟΥ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩ**



ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΑ *Tephritidae*
ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ RNAi ΣΤΟ ΜΕΣΟ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΧΡΙΣΤΟΥ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΚΑΝΗ ΕΥΔΟΞΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2010

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

**Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής
Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

**Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας
Φυτών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Κακάνη Ευδοξία

Διδάσκουσα Π.Δ. 407

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	8
1.1 Η ανακάλυψη της RNA παρεμβολής.....	9
1.2 Η αποκάλυψη του μηχανισμού του RNAi.....	11
1.2.1 Ο ρόλος της Dicer.....	12
1.2.2 Η ενεργοποίηση και η κατάλυση από τα συστατικά του RISC συμπλόκου.....	12
1.3 Εφαρμογές της τεχνολογίας RNAi.....	13
1.3.1 Εφαρμογές της τεχνολογίας RNAi στο <i>C. elegans</i>	14
1.3.2 Εφαρμογές της τεχνολογίας RNAi σε έντομα.....	15
1.3.2.1 Εισαγωγή dsRNA μέσω ένεσης.....	15
1.3.2.1a <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3.2.1b <i>Tribolium castaneum</i>	16
1.3.2.1c <i>Bombyx mori</i>	17
1.3.2.1d <i>Harmonia axyridis</i>	17
1.3.2.1e <i>Apis mellifera</i>	17
1.3.2.2 Εισαγωγή dsRNA μέσω διατροφής.....	18
1.3.2.2a <i>Glossina morsitans morsitans</i>	19
1.3.2.2b <i>Epiphyas postvittana</i>	20
1.4 <i>Athalia rosae</i> και γονίδιο <i>white</i>	20
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	22
2. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ.....	23
2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	24
2.2 Ηλεκτροφόρηση.....	27
2.3 Ανάκτηση μορίων του DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	29
2.4 <i>in vitro</i> RNA μεταγραφή (<i>in vitro</i> RNA transcription).....	30
2.5 Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.....	32
2.6 Δημιουργία του δίκλωνου RNA.....	33
2.7 Βιολογικό Υλικό.....	34
2.7.1 Καλλιέργεια των εντόμων <i>Ceratitis capitata</i> και <i>Bactrocera oleae</i>	34
2.7.2 Ενήλικα άτομα.....	34
2.7.3 Συλλογή αυγών.....	34
2.7.4 Προνυμφικό στάδιο.....	34
2.7.5 Νυμφικό στάδιο.....	35
2.8 Εφαρμογή RNAi.....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1. 1 ^η εφαρμογή.....	38
3.2. 2 ^η εφαρμογή.....	40
3.3. 3 ^η εφαρμογή.....	41
3.4. 4 ^η εφαρμογή.....	43
3.5. 5 ^η εφαρμογή.....	46
3.6. 6 ^η εφαρμογή.....	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

Ευχαριστίες

Με το τέλος της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα, πρώτα, να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για τη μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη που αποτελεί μέλος της τριμελούς επιτροπής μου.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Διδάσκουσα Π.Δ. 407 κ. Κακάνη Ευδοξία για τη συνεχή καθοδήγηση της τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και στη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου κ.Τσουμάνη Κωνσταντίνα και τον κ. Ζυγουρίδη Νίκο για τη φιλία τους και την βοήθεια τους.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η μοριακή βιολογία και η γενετική διακρίνονται για την ανάπτυξη μιας ποικιλίας νέων τεχνολογιών με ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένου της τεχνολογίας του RNAi. Η παρεμβολή RNA ή αλλιώς ο μηχανισμός του RNAi, είναι το φαινόμενο που προκαλεί τη μετα-μεταγραφική αποσιώπηση ενός γονιδίου μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του RNAi αποδείχθηκε ένα σημαντικό εργαλείο και χρησιμοποιείται τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μελέτες σε αρκετούς ερευνητικούς τομείς και πλήθος οργανισμών. Ένας από τους τομείς στους οποίους εμπλέκεται το RNAi είναι και ο τομέας της μοριακής γενετικής των εντόμων όπου χρησιμοποιείται για τη μελέτη, τον προσδιορισμό και την έκφραση γονιδίων, και κυρίως των εντόμων με μεγάλη βιολογική και οικονομική σημασία. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν η μύγα της Μεσογείου και ο δάκος της ελιάς αφού προσβάλλουν πλήθος καλλιεργούμενων φρούτων και ελαιόδεντρων με δυσάρεστες συνέπειες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εφαρμογή και η ανάπτυξη του RNAi μηχανισμού στη μεσογειακή μύγα και το δάκο. Η μεθοδολογία περιλάμβανε τη σύνθεση white dsRNA για την αποσιώπηση του γονιδίου που ευθύνεται για το χρώμα των ματιών και τη χορήγηση του μέσω της διατροφής για διαφορετικές συνθήκες, μελετώντας ταυτόχρονα το ποσοστό αποτελεσματικότητας της μεθόδου. Όλες οι εφαρμογές του RNAi μηχανισμού πραγματοποιήθηκαν κατά το προνυμφικό στάδιο των εντόμων, ενώ τα αποτελέσματα διαφάνηκαν από το χρωματικό φαινότυπο των ματιών των ενήλικων ατόμων. Καμία από αυτές δεν ήταν επιτυχής ως προς τη γονιδιακή αποσιώπηση, ενώ σε μερικές φάνηκε να επηρεάζεται κατά κάποιο τρόπο και η επιβίωση των εντόμων.

Αν και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ήταν αποθαρρυντικά, μια επιτυχημένη μελλοντική εφαρμογή του RNAi μηχανισμού μέσω διατροφής στα έντομα αυτά θα μπορούσε να αποτελέσει ορόσημο για το μέλλον τόσο για τη χρήση του RNAi όσο και για την ανάπτυξη πλήθος εφαρμογών, όπως για παράδειγμα τη δημιουργία εξειδικευμένων εντομοκτόνων. Επιπλέον, η ανάπτυξη της RNAi τεχνολογίας στο δάκο της ελιάς, ένα έντομο για το οποίο λίγα είναι γνωστά στο γενετικό και μοριακό επίπεδο, θα βοηθήσει στον εμπλουτισμό των διαθέσιμων μοριακών πληροφοριών, καθώς αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατά τη δεκαετία του 1990, οι βιολόγοι και οι ερευνητές που μελετούσαν τα φυτά, τους μύκητες, τους σκώληκες, τις μύγες αλλά και τα τρυπανοσώματα παρατήρησαν κάποια απροσδόκητα αποτελέσματα, που οφείλονταν στην αποσιώπηση της έκφρασης γονιδίων από μόρια RNA, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό με τον όρο *παρεμβολή RNA (RNAi, RNA interference)*. Μέχρι και σήμερα ανακαλύπτονται νέες διαδικασίες και εφαρμογές στις οποίες λαμβάνει μέρος το RNAi διαδραματίζοντας ένα σημαντικό ρόλο. Όλες τους όμως διέπνεται από ένα κοινό χαρακτηριστικό στοιχείο: δύο τύποι μικρών μορίων RNA, microRNA (miRNA) και small interfering RNA (siRNA), δεσμεύονται σε συγκεκριμένα RNA και σπάνια σε DNA, αποσιωπώντας την έκφραση γονιδίων με διάφορους μηχανισμούς, όπως μέσω αποικοδόμησης του mRNA, μεθυλίωσης του DNA, τροποποίησης των ιστονών και καταστολή της μετάφρασης.

Η αξία του RNAi εκτείνεται πέραν της βιολογικής του σημασίας αφού έφερε την επανάσταση σε ό,τι αφορά τον πειραματικό χειρισμό της έκφρασης των γονιδίων, αποτελώντας ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας τους και της ρύθμισης τους. Θεωρείται μια απλή και γρήγορη μέθοδος, αφού το μόνο που απαιτείται είναι η γνώση της αλληλουχίας ενός τμήματος του γονιδίου που θέλουμε να αδρανοποιήσουμε, για τη σύνθεση ενός αντίστοιχου μορίου RNA, και μια μέθοδο εισαγωγής αυτού του RNA στα κύτταρα του οργανισμού, αντικαθιστώντας έτσι άλλες επίπονες και αργές μεθόδους που διεξάγονταν μέχρι και την ανακάλυψη του (Hannon, ed 2003).

1.1 Η ανακάλυψη της RNA παρεμβολής

Η ανακάλυψη του RNAi προηγήθηκε από τις παρατηρήσεις της μεταγραφικής αναστολής από την έκφραση του αντισημείνου RNA σε διαγονιδιακά φυτά (Ecker et al., 1986) και αμεσότερα από τα απροσδόκητα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά από επιστήμονες των Ηνωμένων Πολιτειών και της Ολλανδίας στις αρχές του 1990 (Naroli et al., 1990).

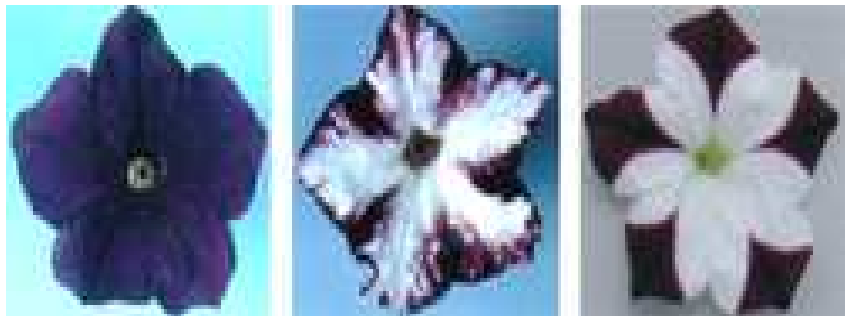
Συγκεκριμένα, το 1986 ερευνητές με σκοπό τη δημιουργία εμπορικά επιθυμητών τροποποιήσεων στους οργανισμούς έκαναν μία προσπάθεια για αλλαγή των χρωμάτων των λουλουδιών στην

πετούνια, στην οποία εισήγαγαν υπό τον έλεγχο ενός πολύ ισχυρού υποκινητή ένα επιπλέον αντίγραφο του

γονιδίου της πετούνιας που κωδικοποιεί τη συνθετάση της χαλκόνης, ένα βασικό ένζυμο που ευθύνεται για τη

χρώση των λουλουδιών δίνοντας τους το φυσιολογικό μωβ χρώμα. Η αυξημένη παραγωγή του γονιδίου αναμενόταν να δώσει λουλούδια με εντονότερο χρώμα (βαθύ μωβ), αλλά αντί αυτού παρήγαγε λιγότερο χρωματισμένα, πλήρως ή μερικώς άσπρα λουλούδια, δείχνοντας ότι η δραστηριότητα της συνθετάσης της χαλκόνης ήταν μειωμένη (Van der Krol et al., 1990). Στην πραγματικότητα και όλος παραδόξως, ορισμένα από τα διαγονιδιακά φυτά που προέκυψαν είχαν λευκά άνθη, χωρίς καθόλου χρωστική, παρόλο που διέθεταν τόσο τα ενδογενή όσο και τα διαγονιδιακά αντίγραφα του γονιδίου της συνθετάσης της χαλκόνης. Το φαινόμενο αυτό κλήθηκε *συγκатаστολή* (Hannon et al., 2003), επειδή το διαγονίδιο προκαλούσε αποσιώπηση όχι μόνο της δικής του έκφρασης αλλά και της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου της συνθετάσης της χαλκόνης, το οποίο είχε την ίδια αλληλουχία. Σύμφωνα λοιπόν με αυτά τα δεδομένα το μόνο που χρειαζόταν για την εκδήλωση του φαινομένου της συγκатаστολής ήταν η ομολογία μεταξύ των αγγελιαφόρων RNA, δηλαδή του ενδογενούς με αυτό του διαγονιδίου.

Παρόλο που το φαινόμενο της συγκатаστολής αποτέλεσε χαρακτηριστικό του φυτικού βασιλείου, σύντομα οι ερευνητές αποκάλυψαν μια ασυνήθιστη περίπτωση αποσιώπησης γονιδίων στο *C. elegans* και υπέθεσαν ότι υπάρχει μια νέα βιολογική διαδικασία που ίσως να διεξαγόταν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Το 1995, ο Su Guo και ο Kenneth



EIKONA 1.1: παρουσιάζονται διάφοροι χρωματικοί φαινότυποι των λουλουδιών της πετούνιας μετά από εισαγωγή ενός γονιδίου, της συνθετάσης της χαλκόνης υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή.

Kemphuess εισήγησαν με ένεση αντισημαίνοντα RNA στις γονάδες ενήλικων ερμαφρόδιτων ατόμων *C. elegans* αγρίου τύπου και παρατήρησαν μείωση της πρωτεΐνης που παρουσίαζε συμπληρωματικό mRNA προς το αντισημαίνον RNA (Guo et al., 1995). Ο μοριακός μηχανισμός που προκαλούσε την καταστολή του ενδογενούς γονιδίου δεν είχε μελετηθεί συστηματικά μέχρι τότε όμως υποστήριζαν ότι το αντισημαίνον RNA υβριδοποιείται με το mRNA-στόχο και είτε παρεμποδίζει τη μετάφραση του είτε με κάποιον τρόπο το αποσταθεροποιεί.

Δημιουργήθηκαν έτσι νέα ερωτήματα που απασχολούσαν τους επιστήμονες, όπου στην προσπάθεια τους να κατανοήσουν πώς γίνεται τόσο το σημαίνον όσο και το αντισημαίνον RNA να επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων στον σκώληκα προκαλώντας καταστολή βρέθηκαν μπροστά σε ένα αναπάντεχο φαινόμενο, πραγματοποιώντας έτσι μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της σύγχρονης βιολογίας. Συγκεκριμένα, οι Andrew Z.Fire και Graig C.Mello διαπίστωσαν ότι για το φαινόμενο αυτό δεν ευθυνόταν μόνο το σημαίνον ούτε μόνο το αντισημαίνον RNA αλλά ότι και τα δύο είναι απαραίτητα για την εκδήλωση του φαινομένου, το οποίο και δημοσίευσαν στη μελέτη τους σχετικά με το μηχανισμό του RNA interference το 1998 στο *Nature* (Fire et al., 1998) . Στο άρθρο τους οι Z.Fire και C.Mello παρουσίασαν τα πειράματα έλεγχου που πραγματοποίησαν όσον αφορά τη φαινοτυπική επίδραση που είχε η εισαγωγή dsRNA με ένεση στον *C. elegans* και πρότειναν πως την αποσιώπηση την επιφέρει το δίκλωνο RNA (dsRNA), που δεν αποτελεί παρά ένα ενδιάμεσο της μεταγραφής *in vitro* που προέρχεται από τους δύο RNA κλώνους που υβριδοποιούνται μεταξύ τους και αποτελούν τα κύρια προϊόντα της μεταγραφής. Μάλιστα, παρατήρησαν ότι το αποτέλεσμα αυτό προέκυπτε μόνο από αλληλουχίες που προέρχονταν από ώριμα RNA, ενώ αλληλουχίες που προέρχονταν από ιντρόνια ή από τον υποκινητή δεν είχαν καμία επίδραση στο φαινότυπο των ατόμων. Η ανακάλυψη του Fire και του Mello ήταν ιδιαίτερα ξεχωριστή επειδή αντιπροσώπευσε τον πρώτο προσδιορισμό του αιτιολογικού παράγοντα για το φαινόμενο, για αυτό και τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel στη Φυσιολογία και την Ιατρική το 2006 για την εργασία τους (Daneholt, Bertil. "Advanced Information: RNA interference).

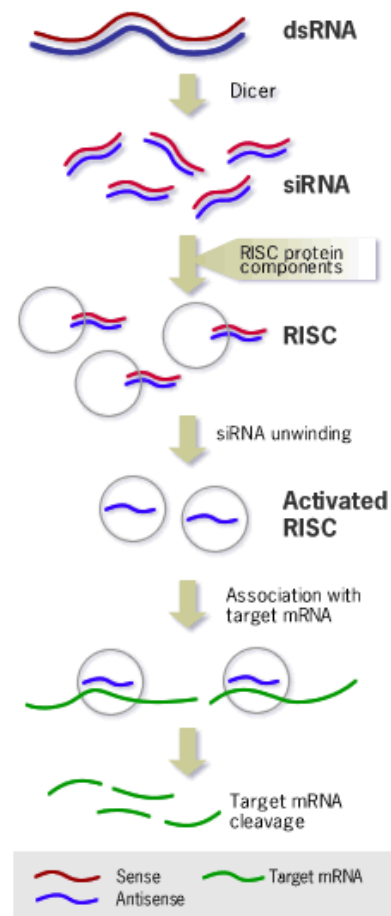
Από τη στιγμή εκείνη η παρουσία του RNAi μηχανισμού διαπιστώθηκε και σε πολλούς άλλους οργανισμούς όπως στην *Drosophila* (Misquitta and Paterson, 1999), το τρυπανόσωμα (Ngo et al., 1998), διάφορα φυτά (Waterhouse et al., 1998), την πλανάρια (Sánchez-Alvarado and Newmark, 1999), την ύδρα (Lohmann et al., 1999) και το zebrafish (Wargelius et al., 1999). Με μια πληθώρα πειραμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών αλλά και γενικότερα διαφόρων ευκαρυωτικών οργανισμών η παρουσία του φαινομένου και σε ανώτερους οργανισμούς αποτέλεσε βεβαιότητα (Elbashir et al.,2001).

1.2 Η αποκάλυψη του μηχανισμού του RNAi

Η βιοχημεία του RNAi διασαφηνίστηκε με τη βοήθεια ενός *in vitro* συστήματος που βασιζόταν σε εκχυλίσματα εμβρύων *Drosophila*. Φάνηκε τότε ότι το dsRNA κατεργάζεται σε dsRNA κλάσματα μήκους 21-23 νουκλεοτιδίων, κάτι που ερχόταν σε συμφωνία με τα δεδομένα που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στη συνέχεια και σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, οι Z.Fire και C.Mello μπόρεσαν να μελετήσουν την όλη διαδικασία και σε *in vivo* συνθήκες, δείχνοντας και σε αυτήν την περίπτωση τα ίδια αποτελέσματα. Σύμφωνα με αυτά, η αντισημιαίνον αλληλουχία που προέκυπτε οδηγούσε στην αποικοδόμηση του mRNA μέσω σύνδεσης και η οποία βασιζόταν στη συμπληρωματικότητα των βάσεων (Fire et al.,1998; Meister, G. & Tuschl, T. 2004).

Πιο συγκεκριμένα, ο μοριακός μηχανισμός του RNAi υποδεικνύει ότι τα dsRNAs (περίπου >200 νουκλεοτιδίων) εισέρχονται σε ένα κυτταρικό μονοπάτι προκαλώντας την RNA παρεμβολή, μέσω της ενεργοποίησης μιας νουκλεάσης με ενεργότητα παρόμοια με αυτήν της ριβονουκλεάσης III, την Dicer. Αυτή δεσμεύεται στο dsRNA και το πέπτει δίνοντας

μικρά δίκλινα παρεμβολόμενα RNA (siRNAs) σε τμήματα μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων με μικρές μονόκλωνες προεξέχοντες περιοχές σε κάθε άκρο (βήμα έναρξης). Κατόπιν, τα siRNAs ξεδιπλώνονται και από δίκλινα προκύπτουν μονόκλινα siRNAs - η μία αλυσίδα κλώνος που μένει είναι ένα αντισημιαίνον RNA καθώς είναι συμπληρωματικό με το κατάλληλο mRNA - και τα οποία συγκεντρώνονται σε ένα σύμπλοκο που περιέχει RNA νουκλεάση, γνωστό ως επαγόμενο από RNA σύμπλοκο αποσιώπησης (RISC). Αυτά παραμένουν ενωμένα και αποτελούν το στοιχείο που καθοδηγεί τη νουκλεάση RISC με μεγάλη εξειδίκευση στα ομόλογα mRNA-στόχους, τα οποία κόβονται και αποικοδομούνται, οδηγώντας έτσι σε μια μείωση των επιπέδων τους πριν την έναρξη της μετάφρασης (αποτελεσματικό βήμα) (Agrawal et al.,2003)



EIKONA 1.2: Παρουσίαση των σταδίων του RNAi μηχανισμού.

1.2.1 Ο ρόλος της Dicer

Η Dicer είναι μια ενδοριβονουκλεάση, συγκεκριμένα ανήκει στην οικογένεια των RNase III, και είναι εξειδικευμένη στην επεξεργασία του dsRNA ή του pre-microRNA (miRNA), προσβάλλοντας τα και αποκόπτοντας από τα άκρα τους μικρότερα τμήματα δίκλωνου RNA (*siRNAs*, short interfering RNA ή *miRNAs*) μήκους ~21-22 νουκλεοτιδίων που έχουν συνήθως 3' προεξέχοντα άκρα 2 bp (Bernstein et al. 2001; Ketting et al. 2001; Knight and Bass 2001).

Η Dicer καταλύει το πρώτο βήμα της RNA παρεμβολής και λαμβάνει μέρος στη συναρμολόγηση του επαγόμενου από RNA συμπλόκου αποσιώπησης (RISC), του οποίου η καταλυτική περιοχή είναι μια ενδοριβονουκλεάση γνωστή και ως argonaute πρωτεΐνη υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του (Jaronczyk et al., 2005).

Η Dicer είναι εξελικτικά συντηρημένη σε σκώληκες, μύγες φρούτων, φυτά, μύκητες και θηλαστικά. Σύμφωνα με μελέτες που προηγήθηκαν βρέθηκαν στην *Drosophila* δύο συγγενικά γονίδια, στο *Arabidopsis* τέσσερα (Henderson et al., 2006) ενώ στον *C. elegans* μόνο ένα (Grishok et al. 2001; Hutvagner et al. 2001; Knight and Bass 2001; Meister, G. & Tuschl, T. 2004). Η αναζήτηση στην αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος αποκάλυψε ένα αντίτυπο του γονιδίου *Dicer*, πιστοποιώντας ότι θα μπορούσε να συμβαίνει RNAi και στα κύτταρα των θηλαστικών, αφού η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από την ανθρώπινη έκδοσή του γονιδίου αυτού έχει ακριβώς την ίδια ενεργότητα RNAάσης δίκλωνου RNA όπως και η Dicer της δροσόφιλας (Paddison et al., 2002).

1.2.2 Η ενεργοποίηση και η κατάλυση από τα συστατικά του RISC συμπλόκου

Τα συστατικά που αποτελούν το RISC σύμπλοκο, είναι μικρές πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια Argonaute και το οποίο διαπιστώθηκε από κλωνοποιήσεις των γονιδίων Argonaute σε φυτά, στον *C. elegans* και σε μύκητες. Μεταλλαγές των γονιδίων αυτών προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην εκδήλωση του RNAi, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι αυτές οι πρωτεΐνες ελέγχουν σημαντικά στάδια του μηχανισμού. Συγκεκριμένα, με βιοχημικές μελέτες και με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ αποκαλύφθηκε ότι στο RISC δρα μια νουκλεάση που ονομάζεται Slicer, η οποία ανήκει στην οικογένεια Argonaute πρωτεϊνών και είναι υπεύθυνη να κόβει το mRNA ακριβώς απέναντι από το κέντρο του siRNA (Song et al., 2004).

Δεδομένου ότι τα μικρά τμήματα RNA που παράγονται από την Dicer είναι δίκλινα θα μπορούσε κάθε ένας από τους κλώνους που τα αποτελούν να θεωρηθεί ως ένα λειτουργικό siRNA. Εντούτοις, μόνο ένας από τους δύο κλώνους, που είναι και γνωστός ως αντισημείον RNA κατευθύνει την αποσιώπηση γονιδίων. Ο άλλος κλώνος - σημείον RNA-

εκφυλίζεται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του RISC (Gregory et al., 2005). Οι διάφορες κατηγορίες των μικρών πρωτεϊνών που αποτελούν τα συστατικά του RISC συμπλόκου βρίσκονται σε όλους τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι εξελικτικά συντηρημένες, γεγονός που εξηγείται από το μεγάλο πλήθος των μελών της οικογένειας (5 στη *Drosophila*, 21 στον *C. elegans*, 7 στον άνθρωπο και 10 στο φυτό *Arabidopsis*) (Song et al., 2004).

Η στοχευμένη δράση του RNAi έκανε τους ερευνητές να σκεφτούν από την πρώτη στιγμή ότι αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πειραματικό εργαλείο για την καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων καθώς και για την επακόλουθη μελέτη του φαινοτυπικού αποτελέσματος. Επίσης, σύντομα φάνηκε πως η δράση αυτή είναι τόσο αποτελεσματική έτσι ώστε κάθε γονίδιο σε έναν οργανισμό να μπορεί να μελετηθεί από λειτουργικής πλευράς όπως φαίνεται και παρακάτω.

1.3 Εφαρμογές της τεχνολογίας RNAi

Το φαινόμενο της αποσιώπησης ενός γονιδίου μέσω της τεχνολογίας RNAi, όπως αναφέρθηκε, ανακαλύφθηκε αρχικά στο νηματοιδή σκώληκα *C. elegans* από τους Fire και Mello το 1998 (Fire et al., 1998). Σύντομα όμως η τεχνολογία RNAi αποδείχθηκε ένα σημαντικό εργαλείο σε αρκετούς ερευνητικούς τομείς, όπως στη λειτουργική γονιδιωματική για τον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων μέσω της knockdown ρύθμισής τους ή στην ιατρική για τη θεραπεία ασθενειών. Σήμερα, η χρήση της τεχνολογίας του RNAi χρησιμοποιείται τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* μελέτες σε ένα πλήθος οργανισμών, από ασπόνδυλους έως ανώτερα θηλαστικά, όπως φυτά, παρασιτικούς σκώληκες, παράσιτα και έντομα.

Η στοχευμένη αδρανοποίηση της γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση του RNAi είναι μια απλή διαδικασία, όπου το μόνο που χρειάζεται είναι ένα τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση του dsRNA. Η εισαγωγή του εξωγενούς dsRNA στο κύτταρο πραγματοποιείται κυρίως με μικροένεση ή εμφύσηση του οργανισμού σε διάλυμα dsRNA. Πρόσφατα οι προσπάθειες εφαρμογής στράφηκαν προς τη χορήγηση του RNAi μέσω της τροφής διότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι λιγότερο απαιτητική και πιο εύκολη στο χειρισμό της καθώς και πιο οικονομική και λιγότερο χρονοβόρα. Επιπλέον αποτελεί την πιο εφικτή και άμεση προσέγγιση για την εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi σε επίπεδο πληθυσμού. Επιδίωξη των διαφόρων ερευνητών και μελετητών είναι η ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων σε ποικίλους οργανισμούς με υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας.

1.3.1 Εφαρμογές της τεχνολογίας RNAi στο *C. elegans*

Η πρώτη εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi, πραγματοποιήθηκε το 1995 από τους Su Guo and Ken Kemphues με τη χρήση αντισημαίνοντος RNA για την παρεμπόδιση ενός γονιδίου (*par-1*) στο *Caenorhabditis elegans* με απώτερο σκοπό τη μελέτη της λειτουργίας του. Στη συνέχεια όμως, και μετά την ανακάλυψη από τους Fire και Mello (1998) ότι για την RNA παρεμβολή είναι υπεύθυνο το δίκλωνο RNA, αντί του αντισημαίνοντος RNA, δοκιμάστηκαν διάφορες εφαρμογές για επιβεβαίωση της γονιδιακής αποσιώπησης με dsRNA σε ενήλικους σκώληκες. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η εισαγωγή δίκλωνων μορίων RNA μπορεί να προκαλέσει ισχυρή μετα-μεταγραφική αδρανοποίηση ενδογενών γονιδίων που φέρουν ομόλογη αλληλουχία με αυτά (Fire et al., 1998).

Αρχικά, το dsRNA αποδείχτηκε ότι μπορεί να εισαχθεί στον οργανισμό με ένεση των γονάδων του σκώληκα (Fire et al., 1998), ενώ σε επόμενα πειράματα που διεξήχθησαν έδειξαν ότι το dsRNA θα μπορούσε να ενεθεί οπουδήποτε στο σκώληκα δίνοντας ακόμη μεταλλαγμένους φαινότυπους στο ενήλικο. Μια άλλη εναλλακτική περίπτωση ένεσης αποτέλεσε η ένεση πλασμιδιακού DNA υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή του *C. elegans*, και το οποίο μπορεί να εκφραστεί σε dsRNA οδηγώντας έτσι στη γονιδιακή αποσιώπηση και στη μείωση συγκεκριμένου ενδογενούς mRNA. Επιπλέον, επιτυχημένες προσπάθειες αποσιώπησης γονιδίων με ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού αποδείχτηκαν η εμφάνιση των νηματωδών του *C. elegans* σε διάλυμα dsRNA (Tabara et al., 1998) ή ταΐζοντας τους με βακτήρια *E. coli* ειδικά κατασκευασμένα να παράγουν dsRNA (Timmons and Fire, 1998), οδηγώντας έτσι στην υιοθέτηση τους ως εναλλακτικές της ένεσης μεθόδους (Ohkumo et al., 2008).

Συγκρίνοντας τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή του RNAi μηχανισμού έχουν δημοσιευτεί κάποια βασικά συμπεράσματα που αφορούν την ανάπτυξη του RNAi μέσω ένεση, εμφάνισης ή διατροφής όπως φαίνονται πιο κάτω:

RNAi με ένεση: το συντιθέμενο dsRNA ενίεται συνήθως σε νέα ενήλικα άτομα. Μπορεί να εφαρμοστεί και σε πιο νεαρά άτομα όμως είναι δυσκολότερη. Θεωρείται η καλύτερη μέθοδος μεταφοράς του RNAi μηχανισμού από τους προγόνους στους απογόνους, επειδή μπορεί να δώσει τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα όσο αφορά την αποσιώπηση γονιδίων. Ένα άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μικρή ποσότητα dsRNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων (5-10μg dsRNA για περισσότερα από ένα πειράματα)

RNAi με εμφάνιση: οι σκώληκες οποιουδήποτε σταδίου ανάπτυξης μπορούν να ενυδατωθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις dsRNA και να δώσουν εκμηδενιστικούς φαινότυπους είτε για αυτούς είτε για τους απογόνους τους. Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου

αποτελεί το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό ατόμων ταυτόχρονα ενώ απαιτεί μεγαλύτερες ποσότητες dsRNA από ότι η έγχυση με ένεση (5-10μg dsRNA ανά πείραμα).

RNAi μέσω διατροφής: οι σκώληκες ταΐζονται με βακτήρια που παράγουν dsRNA και το αποτέλεσμα διαφαίνεται και μέσα από τους απογόνους. Αυτή η μέθοδος είναι πιο πολύ διαδεδομένη εργαστηριακά και η πιο ανέξοδη, όμως δίνει λιγότερο εμφανή αποτελέσματα από τις δύο προηγούμενες. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν άτομα οποιουδήποτε σταδίου ανάπτυξης (Ahringer et al., 1992).

Αν και η εφαρμογή του RNAi ανακαλύφθηκε στο νηματώδη *C. elegans*, η χρήση του dsRNA για την αποσιώπηση γονιδίων έχει γίνει γρήγορα ένα ευρέως χρησιμοποιημένο εργαλείο για τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων και σε άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών (Tijsterman et al., 2002; Maine et al., 2000).

1.3.2 Εφαρμογές της τεχνολογίας RNAi σε έντομα

Τα τελευταία χρόνια ο τομέας της μοριακής γενετικής εντόμων έχει ωφεληθεί πολύ από την ανάπτυξη μιας ποικιλίας νέων τεχνολογιών, καθώς και από τις πλήρεις ακολουθίες γονιδιωμάτων που είναι διαθέσιμες για ένα μεγάλο αριθμό εντόμων, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων μεγάλης ιατρικής και γεωργικής σπουδαιότητας.

Στην εντομολογία, το RNAi χρησιμοποιείται ήδη για τη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης του RNAi και για τον προσδιορισμό και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης (gene cascades) κυρίως στη *Drosophila melanogaster* (Roignant et al., 2003; Bischoff et al., 2006; Miller et al., 2008; Dzitoyeva et al., 2001), *Tribolium castaneum* (Tomoyasu and Denell, 2004; Fujita et al., 2006; Konopova and Jindra, 2008; Parthasarathy and Palli, 2009) και *Bombyx mori* (Quan et al., 2002; Ohnishi et al., 2006).

1.3.2.1 Εισαγωγή dsRNA μέσω ένεσης

1.3.2.1a *Drosophila melanogaster*

Η πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή του RNAi μηχανισμού σε *Drosophila* πραγματοποιήθηκε μετά από ένεση dsRNA στην κοιλιακή χώρα ενήλικων μυγών, και κατά την οποία μελετήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν γονίδια που εκφράζονται στο κεντρικό νευρικό

σύστημα (ΚΝΣ). Συγκεκριμένα, η μελέτη αποσκοπούσε την γονιδιακή αποσιώπηση δύο γονιδίων, του διαγονιδίου *lacZ* (που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης) και του γονιδίου *GM06434* (το οποίο είναι ομόλογο με το γονίδιο *nrf*-nose resistant to fluoxetine- στο *C. elegans*). Το διαγονίδιο *lacZ* χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό δύο διαγονιδιακών σειρών εντόμων, όπου στην μια σειρά εκφραζόταν στην κοιλιακή περιοχή ενώ στην άλλη σειρά στο ΚΝΣ.

Η μεθοδολογία συμπεριλάμβανε διατήρηση των εντόμων στους 25°C, και σχετικής υγρασίας 50-60%, με σύστημα 12ώρου φωτοπεριόδου. Η τροφή που τους χορηγήθηκε περιλάμβανε μαγιά σε σκόνη, σιρόπι καλαμποκιού και άγαρ. Τα έντομα που διαλέχθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν 4-8 ημερών (ενήλικα άτομα), τα οποία αρχικά αναισθητοποιήθηκαν με CO₂, και στη συνέχεια ενέθηκαν με διάλυμα dsRNA συγκέντρωσης 0.15-1.6 μg μl⁻¹ (0.8 μg μl⁻¹ στα περισσότερα πειράματα).

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι επιτεύχθηκε ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού και στις δύο σειρές των διαγονιδιακών εντόμων με απώλεια λειτουργίας της β-γαλακτοσιδάσης. Συγκεκριμένα, υψηλές συγκεντρώσεις dsRNA (0.8-1.6 μg μl⁻¹) εμφάνισαν αποτελέσματα μετά από 24 ώρες ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0.5 μg μl⁻¹) μετά από 48 ώρες. Αποσιώπηση γονιδιακής έκφρασης επιτεύχθηκε και στο ενδογενές γονίδιο *GM06434* στις περιοχές που εκφράζεται (στο ΚΝΣ και στην περιφέρεια του εντόμου). Γενικά, από τη μελέτη αυτή αποδείχτηκε ότι ο RNAi μηχανισμός μπορεί να ενεργοποιηθεί με ένεση του dsRNA, με υψηλά ποσοστά επιτυχίας ακόμη και σε ενήλικα άτομα (Dzitoyeva et al., 2001).

1.3.2.1b *Tribolium castaneum*

Ένα άλλο παράδειγμα εφαρμογής μέσω ένεσης του RNAi μηχανισμού για προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων αναφέρεται στο *Tribolium castaneum*, το οποίο ανήκει στα κολεόπτερα και είναι το γνωστό κόκκινο σκαθάρι αλευριού. Σε αυτό ανιχνεύθηκαν *CTLP* (Chymotrypsin-like peptidases) γονίδια δίνοντας έτσι αφορμή για την ταυτοποίησή τους και τον προσδιορισμό της λειτουργίας τους. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν 14 *TcCTLP* γονίδια από τα οποία ορισμένα εκφράζονταν σε εμβρυϊκά στάδια, άλλα σε προνυμφικά στάδια και μερικά σε νυμφικά στάδια. Όλα τα γονίδια εκφράζονταν στο μεσέντερο για πέψη ενώ δύο από αυτά, *TcCTLP-6C* και *TcCTLP-5C*, ταυτοποιήθηκαν και στο έκδυμα των σκαθαριών υποθέτοντας ότι ίσως να συμμετέχουν και αυτά κατά τη διάρκεια της έκδυσης (προηγούμενες αναφορές λεπιδόπτερων). Για επιβεβαίωση της υπόθεσης χρησιμοποιήσαν RNAi πειράματα με ένεση dsRNA που στόχευαν *TcCTLP* γονίδια, εκ των οποίων τα δύο ήταν συμπληρωματικά με τα *TcCTLP-6C* και *TcCTLP-5C*, και από τα οποία συμπέραναν ότι η αποσιώπηση των δύο αυτών γονιδίων προκαλούσε σημαντικές ανωμαλίες κατά την διάρκεια της έκδυσης (Broehan et al., 2009).

1.3.2.1c *Bombyx mori*

Το *Bombyx mori* ήταν και αυτό ένα από τα έντομα στα οποία διεξήχθησαν διάφορες πειραματικές εφαρμογές για την ανάπτυξη του RNAi μηχανισμού και τη χρησιμοποίηση των βασικών του ιδιοτήτων για προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων και μηχανισμών. Συγκεκριμένα, ο μεταξοσκώληκας *B. mori* ήταν η πρώτη περίπτωση λειτουργικής ανάλυσης των Ubx γονιδίων (Hox genes Ultrabithorax) σε λεπιδόπτερα. Η εφαρμογή του RNAi μηχανισμού επιτεύχθηκε με έγχυση του Bm-Ubx dsRNA με ένεση σε έμβρυα *B. mori*, θέλοντας να διερευνηθούν εάν όντως τα γονίδια αυτά κατέστειλαν το σχηματισμό των κοιλιακών εξαρτημάτων όπως και σε άλλα έντομα. Η γονιδιακή αποσιώπηση του *Bm-Ubx* γονιδίου που προκλήθηκε στις προνύμφες επέτρεψε το σχηματισμό θωρακικών εξαρτημάτων (ποδιών), συμπεραίνοντας ότι το γονίδιο αυτό δρα ως καταστολέας με τον ίδιο μηχανισμό, όπως συνέβαινε σε άλλα έντομα (Masumoto et al., 2009).

1.3.2.1d *Harmonia axyridis*

Η μέθοδος της έγχυσης με ένεση dsRNA χρησιμοποιήθηκε επίσης στην περίπτωση του σκαθαριού *H. axyridi* για τη μελέτη και διευκρίνιση των μοριακών μηχανισμών στους οποίους ευθύνεται η ποικιλομορφία των χρωμάτων στα φτερά και για τον προσδιορισμό των γονιδίων που λαμβάνουν μέρος σε αυτήν την αναπτυξιακή διαδικασία.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila melanogaster* χρησιμοποιήθηκε ως φορέας μετασχηματισμού των γαμετικών σειρών το piggyBac, ένα μικρό μεταθετό στοιχείο με αναστρέψιμες επαναλήψεις. Σε αυτόν περιλαμβανόταν ένα γονίδιο μάρτυρας το *EGFP* γονίδιο που κωδικοποιεί μια πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της αποδοτικότητας του μετασχηματισμού. Σε αυτό το σημείο εφάρμοσαν την RNAi μέθοδο με μικροέγχυση *EGFP* dsRNA σε συγκιτιακά βλαστοδέρματα μετασχηματισμένων *H. axyridis* εμβρύων που εξέφραζαν την EGFP με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση της λειτουργίας των γονιδίων κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης. Σύμφωνα με τον EGFP φθορισμό στις εκκολαπτόμενες προνύμφες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση EGFP έκφρασης συμπεραίνοντας ότι το RNAi μπορεί να εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία στα εμβρυϊκά *H. Axyridis* (Kawayama et al., 2006).

1.3.2.1e *Apis mellifera*

Ο μηχανισμός του RNAi μέσω ένεσης εφαρμόστηκε και σε ενήλικα άτομα μελισσών *Apis mellifera* για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων που λαμβάνουν μέρος στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Ένα από τα γονίδια που εξετάστηκαν ήταν το *Relish* που κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα και παίζει καθοριστικό ρόλο στη σηματοδότηση του IMD μονοπατιού. Η έκφραση αυτού του γονιδίου μπορεί να μειωθεί (μέχρι και 70%) με το RNAi και ταυτόχρονα να επηρεάσει την έκφραση αντιμικροβιακών γονιδίων που βρίσκονται καθοδικά στο IMD μονοπατιού. Στην πραγματικότητα, η έκφραση αυτών των γονιδίων δεν επηρεάστηκε άμεσα από την RNA παρεμβολή αλλά έμμεσα, γιατί το dsRNA που είχε ενεθεί παρουσίαζε ομολογία μόνο με το *Relish* γονίδιο, αποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων και πώς επηρεάζονται το ένα από το άλλο. Ο RNAi μηχανισμός εφαρμόστηκε με μικροένεση *Relish* dsRNA των μελισσών και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις είτε μη νοηματικού dsRNA (τμήμα αλληλουχίας που φέρει πρόωρο κωδικόνιο λήξης αλλάζοντας το αναγνωστικό πεδίο, δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη), είτε *Relish* dsRNA (Schlüns et al., 2007).

1.3.2.2 Εισαγωγή dsRNA μέσω διατροφής

Τα περισσότερα πειράματα εφαρμογής της τεχνολογίας RNAi έχουν πραγματοποιηθεί μέσω μικροένεσης των dsRNAs στον οργανισμό, ο οποίος όπως αναφέρθηκε δεν μπορεί να εφαρμοστεί στο πεδίο. Μερικές εναλλακτικές λύσεις της μικροένεσης έχουν χρησιμοποιηθεί συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης των εμβρύων σε διάλυμα dsRNA, μέσω τροφής με βακτήρια που εκφράζουν dsRNA και με τη χρήση ανασυνδιασμένων ιών που φέρουν αλληλουχίες dsRNA. Εντούτοις, η χορήγηση του dsRNA με την τροφή για την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού μπορεί να θεωρηθεί προτιμότερη από τις ήδη προαναφερθείσες περιπτώσεις λόγω του εύκολου χειρισμού της, του ότι είναι πιο οικονομική αλλά και λιγότερο χρονοβόρα. Για τους λόγους αυτούς, οι προσπάθειες και το ενδιαφέρον των ερευνητών έχουν στραφεί στην ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού μέσω της τροφής, οδηγώντας σε μία “έκρηξη” δημοσιεύσεων.

Αρχικά, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου ήταν αποθαρρυντική στα έντομα λόγω των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στις προνύμφες *Spodoptera litura* μετά από σίτιση dsRNA για αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιούσε την αμινοπεπτιδάση N. Επίσης αποτυχημένη ήταν και η προσπάθεια σίτισης με ανασυνδιασμένες ζήμες που παρήγαγαν dsRNA σε *Drosophila*.

Εντούτοις, οι πιο πρόσφατες μελέτες έχουν παρουσιάσει επιτυχία σε μερικά είδη εντόμων συμπεριλαμβανομένων των ημίπτερων, των κολεόπτερων και των λεπιδόπτερων. Συγκεκριμένα, οι μελέτες των Nunes και Simões (2009), οι οποίοι αποσιώπησαν τη βιτελογενίνη στη μέλισσα *Apis mellifera* μέσω της τροφής ή των Walshe et al. (2009) που πέτυχαν την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού επίσης μέσω της τροφής στη μύγα τσε τσε,

Glossina morsitans morsitans αποτελούν καλό οιοινό για την επιτυχημένη εφαρμογή της μεθόδου.

1.3.2.2a *Glossina morsitans morsitans*

Η *Glossina morsitans morsitans* ανήκει στα δίπτερα: Glossina, γνωστή ως μύγα τσε τσε και μεταδίδει Αφρικανικά τρυπανοσώματα διαφόρων ειδών, προκαλώντας διάφορες ανθρώπινες ασθένειες.

Στη συγκεκριμένη έρευνα, μελετήθηκε η προώθηση του φαινομένου RNAi μέσω σίτισης των μυγών τσε τσε με dsRNA. Αυτό έγινε, γιατί η μεταφορά dsRNA με ένεση στις μύγες ήταν λιγότερο ιδανική λόγω έρευνας των άνοσων αποκρίσεων και λόγω σχετικά υψηλών ποσοστών θνησιμότητας που περιπλέκουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, οι μύγες που επέζησαν μπορεί να οφειλόταν στη μη επιτυχημένη αποσιώπηση γονιδίων. Το θέμα που απασχόλησε ήταν η συγκριτική ανάλυση σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο δύο ανοσο-εξαρτώμενων γονιδίων, το *TsetseEP*, το οποίο εκφράζεται στο μεσέντερο και το *2A192* που εκφράζεται σε άλλα όργανα εκτός του εντέρου.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι ότι με εισαγωγή του dsRNA προκλήθηκε σίγηση του *TsetseEP* γονιδίου, σε αντίθεση με το *2A192* που συνέχισε να εκφράζεται (Lehane et al., 2008). Η ερμηνεία που δόθηκε ήταν στο γεγονός ότι το dsRNA που χορηγήθηκε με τροφή (αίμα) ήταν περισσότερο δραστικό στο μεσέντερο προκαλώντας αποσιώπηση γονιδίων, παρά σε άλλα όργανα του εντόμου που δεν παρουσίαζαν το φαινόμενο, είτε λόγω του επιθηλιακού φραγμού του εντέρου είτε λόγω μικρής ποσότητας του dsRNA, εμποδίζοντας το έτσι να μεταφερθεί σε άλλους ιστούς. Ένα πλεονέκτημα όμως του εντερικού επιθηλίου ως φραγμός είναι ότι περιορίζει τη διάδοση του dsRNA σε παρακείμενες περιοχές με αποτέλεσμα να αποτρέπει την στόχευση ομόλογων ή συγγενικών γονιδίων με το γονίδιο-στόχο σε αντίθεση με το dsRNA που ενίεται.

Επίσης, στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται ότι η μεταφορά του dsRNA μέσω σίτισης με αίμα είναι πιο αποτελεσματική παρά με μια τεχνητή τροφή, η οποία μπορεί να προκαλέσει οποιεσδήποτε επιπλοκές στο έντομο εκτός από το επιθυμητό αποτέλεσμα. Αυτό αποδείχθηκε και από μια δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα *I. scapularis* και *Rhodnius prolixus*, τα οποία ταΐστηκαν με τεχνητή τροφή (Soares et al., 2005; Araujo et al., 2006). Ανάλογα με τα διάφορα είδη των εντόμων παρουσιάζονται και διαφορετικές συνθήκες στο περιβάλλον του μεσεντέρου με επακόλουθο το εντερικό επιθήλιο να επιδρά με διάφορους τρόπους στη μεταφορά του dsRNA μετά τη σίτιση. Για παράδειγμα, η έκφραση του γονιδίου της αμινοπεπτιδάσης N στο έντερο της προνύμφης *S. litura* πιο εύκολα αποκρίνεται στο μηχανισμό του RNAi μετά από ένεση του dsRNA, παρά μέσω διατροφής (Rajagopal et al., 2002).

1.3.2.2b *Epiphyas postvittana*

Το *E. postvittana* ανήκει στα Lepidoptera: Tortricidae και προσβάλλει κυρίως τα μήλα. Όσο αφορά την περίπτωση του συγκεκριμένου εντόμου, ο μηχανισμός του RNAi χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την εξέταση γονιδίων που εκφράζονται σε διαφορετικές χωρικές και χρονικές θέσεις του εντόμου. Αυτό επιτεύχθηκε με εισαγωγή του dsRNA μέσω διατροφής σε προνύμφες *E. postvittana* για την αποσιώπηση γονιδίων που εκφράζονται στο έντερο. Τα δύο γονίδια που απασχόλησαν στη συγκεκριμένη μελέτη είναι το *ErosCXE1* που κωδικοποιεί την καρβοξυλ-εστεράση 1 στο έντερο του *E. postvittana* και το άλλο είναι το *ErosPBP1* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 1 των φερομονών, στις αντένες. Το *ErosCXE1* εκφράζεται στο ανήλικο άτομο κατά τα πρώτα στάδια ζωής ενώ τα επίπεδα του *ErosPBP1* είναι μη ανιχνεύσιμα. Ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάζονται όταν το άτομο ενηλικιωθεί. Στα στάδια της νύμφης και τα δύο γονίδια είτε δεν εκφράζονται ή εκφράζονται πολύ λίγο.

Η μεθοδολογία περιλάμβανε νηστεία των *E. postvittana* προνυμφών για 48ώρες και έπειτα σίτισή τους με dsRNA αραιωμένο σε σουκρόζη. Κάθε έντομο έλαβε 1μg dsRNA. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι τα χαμηλότερα επίπεδα των μεταγράφων του *ErosCXE1* γονιδίου εμφανίστηκαν μετά από 7 ημέρες με dsRNA διατροφή σε σύγκριση με αυτά των εντόμων control τα οποία είχαν ταιστεί με διάλυμα σουκρόζης για το ίδιο χρονικό διάστημα. Αντιθέτως, τα επίπεδα των μεταγράφων του *ErosPBP1* παρουσίασαν επίσης μείωση στο ενήλικο άτομο, αφού όμως είχε προηγηθεί τάισμα σε προνυμφικό στάδιο με *ErosPBP1* dsRNA (Turner et al., 2006).

1.4 *Athalia rosae* και γονίδιο *white*

Μια εντελώς διαφορετική μελέτη ήταν αυτή που εξέταζε τη λειτουργία του *Ar white* γονιδίου των ματιών στο υμενόπτερο *Athalia rosae*. Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν η καθιέρωση του RNAi μηχανισμού, εξετάζοντας την ανάπτυξη ενός πρόσθετου ορατού δείκτη μετασχηματισμού του εντόμου. Με έρευνα που έγινε στη *Drosophila melanogaster* το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μεμβρανικό μεταφορέα που ανήκει στην υπεροικογένεια μεταφορέων ABC (ATP-binding cassette) (O'Hare et al., 1983; 1984) και ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά πρόδρομων χρωστικών ουσιών των ματιών στα κύτταρα σε συνεργασία με άλλους μεταφορείς. Συγκεκριμένα το ετεροδιμερές που σχηματίζεται με το προϊόν του γονιδίου *scarlet* λειτουργεί σαν μεταφορέας τρυπτοφάνης, ενώ το ετεροδιμερές που σχηματίζεται από το προϊόν του γονιδίου *brown* λειτουργεί σαν μεταφορέας γουανίνης. Μια ατέλεια στο γονίδιο *white* προκαλεί τον ανεπαρκή σχηματισμό

και των δύο μεταφορέων οδηγώντας σε ένα εκμηδενιστικό άσπρο (άχρωμο) φαινότυπο ματιών. Επομένως, οι επιδράσεις του RNAi στην έκφραση του γονιδίου των ματιών μπορεί να ελεγχθεί εύκολα ανάλογα με το φαινότυπο από τις αλλαγές στο χρώμα ματιών. Τα συντιθέμενα dsRNA αφού εγχύθηκαν με ένεση σε αυγά αγρίου τύπου θηλυκών ατόμων στόχευσαν τα *Ar white* μετάγραφα προκαλώντας μια μείωση στα επίπεδα των αρχικών μεταγράφων, οδηγώντας έτσι σε ένα φαινότυπο με τα εμβρυϊκά μάτια να είναι άσπρα χρωματισμένα.

Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν κατά τρόπο ανάλογο της δόσης, είτε σε εμβρυϊκό στάδιο είτε στο στάδιο της νύμφης, όχι όμως σε προνυμφικό στάδιο ή σε ενήλικα άτομα (η μελέτη αποτέλεσε την πρώτη αναφορά της έκφρασης του γονιδίου κατά την εμβρυογένεση) (Sumitani et al., 2005). Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου των ματιών στο *A. rosae* συγκρίθηκε μετέπειτα, με πρότυπα έκφρασης ομόλογων γονιδίων σε άλλους οργανισμούς, όπως για παράδειγμα με το μεταξοσκώληκα *B. Mori*, στον οποίο η έκφραση ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και σε νυμφικά στάδια (Abraham et al., 2000). Οι προνύμφες των symphytan υμενόπτερων και των λεπιδόπτερων εμφανίζουν δομικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ τους (Gilbert, 1994). Ενώ στα δίπτερα, επειδή στερούνται την ύπαρξη ματιών κατά τα προνυμφικά στάδια, το πρότυπο έκφρασης παρουσιάζεται σε νυμφικά στάδια και κατά την ενηλικίωση.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Η παρεμβολή RNA (RNAi) είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο μικροί τύποι μορίων RNA, miRNA και siRNA, δεσμεύονται σε συγκεκριμένα RNA, αποσιωπώντας την έκφραση γονιδίων. Η αξία του RNAi εκτείνεται πέραν της βιολογικής του σημασίας, αφού αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο πειραματικό υλικό στη γονιδιακή αποσιώπηση, αποτελώντας μια χρήσιμη προσέγγιση για τη μελέτη γονιδίων, μονοπατιών σηματοδότησης και κατ' επέκταση τη μελέτη σε επίπεδο οργανισμού. Για το λόγο αυτό, θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον αν η χρήση του επεκτεινόταν σε διάφορους οργανισμούς και κυρίως σε αυτούς που σχετίζονται με τον άνθρωπο με ποικίλους τρόπους (όπως για παράδειγμα στη γεωργία, υγεία ή και σε ερευνητικούς τομείς). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και η μύγα της Μεσογείου ή ο δάκος της ελιάς, τα οποία θεωρούνται έντομα μεγάλης βιολογικής και οικονομικής σημασίας αφού προσβάλλουν πλήθος καλλιεργούμενων φρούτων και ελαιόδεντρων, αντίστοιχα, προκαλώντας έτσι τεράστιες καταστροφές.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εφαρμογή του μηχανισμού RNAi στη μεσογειακή μύγα και το δάκο με την ελπίδα να επιφέρει τα ίδια ενθαρρυντικά αποτελέσματα όπως και σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πλήθος οργανισμών και εντόμων. Η χορήγηση του dsRNA δοκιμάστηκε διαμέσου της τροφής, ώστε να μελετηθεί η αποτελεσματικότητάς της ή όχι, εφόσον θεωρείτε η προτιμότερη από όλες τις μεθόδους, λόγω του εύκολου χειρισμού της, λόγω του ότι είναι πιο οικονομική αλλά και λιγότερο χρονοβόρα. Το γονίδιο που επιλέχθηκε ήταν το white, το οποίο εκφράζεται στα μάτια και η αποσιώπηση του προκαλεί λευκό χρωματισμό, ώστε να είναι άμεση η παρατήρηση της επιτυχημένης αποσιώπησης. Η μέθοδος δοκιμάστηκε για διαφορετική χρονική διάρκεια χορήγησης, με διαφορετικές συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό των καλύτερων συνθηκών που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τη σίγηση.

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην ανάπτυξη και εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi στη μύγα της Μεσογείου και το δάκο, στα οποία μέχρι πρότινος δεν έχει αναφερθεί κάποια δημοσίευση ιδιαίτερης σημασίας και η οποία μπορεί να αποτελέσει ορόσημο για το μέλλον αφενός για τη χρήση του RNAi στα συγκεκριμένα έντομα και αφετέρου για την ανάπτυξη πλήθος εφαρμογών. Τέτοιες εφαρμογές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν αποσιώπηση σημαντικών γονιδίων για προσδιορισμό της λειτουργίας τους, βοηθώντας έτσι στον εμπλουτισμό των διαθέσιμων μοριακών πληροφοριών ή και χρήση του μηχανισμού ως μέθοδος καταπολέμησης των πληθυσμών των εντόμων με δημιουργία εξειδικευμένων εντομοκτόνων και φιλικότερων προς το περιβάλλον.

ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική, η οποία σταδιακά αποκτά συνεχώς διευρυνόμενες κλινικές και διαγνωστικές εφαρμογές στη Μοριακή Βιολογία και Γενετική. Είναι μια ευαίσθητη μέθοδος που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μεγάλου αριθμού αντιγράφων γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από ένα μόνο μόριο DNA. Επινοήθηκε και εφαρμόστηκε αρχικά από τον Kary Mullis το 1983, ο οποίος και τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993.

Υλικά

1. **DNA:** Η ποσότητα του γενετικού μας υλικού εξαρτάται από την αντιπροσώπευση των υπό μελέτη αλληλουχιών. Στη περίπτωση γονιδιωματικού DNA και μελέτης μοναδικής αλληλουχίας (single copy), τότε η αντίδρασή θα περιέχει 5-40ng. Αντίθετα, όταν η υπό μελέτη αλληλουχία είναι κλωνοποιημένη σε πλασμιδιακό φορέα, η ποσότητα κυμαίνεται από 1pg έως 1ng διότι η αλληλουχία υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα.
2. **Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer):** Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των κατάλληλων συνθηκών (ιοντική ισχύ, pH) ώστε να επιτευχθεί τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης. Η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση πρέπει να είναι 1X.
3. **MgCl₂ :** Το ιόντα Mg²⁺ είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία της πολυμεράσης γιατί σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs τα οποία θα αποτελέσουν το υπόστρωμα της πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του MgCl₂ μπορεί να κυμανθεί από 0.5mM έως 4mM. Όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση άλατος περιέχει η αντίδραση τόσο μειώνεται η ειδικότητα της πολυμεράσης.
4. **5´ τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs):** Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια αποτελούν τις βάσεις A,T,G,C που θα χρησιμοποιηθούν από την πολυμεράση για την επέκταση των εκκινητών. Η επιθυμητή ποσότητά τους είναι 0,5 mM ανά αντίδραση από το καθένα.
5. **Ειδική DNA πολυμεράση (Taq):** Η θερμοσταθερή πολυμεράση του βακτηρίου *Thermus aquaticus* είναι υπεύθυνη για την προσθήκη των νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες με ταχύτητα 1000bp ανά λεπτό (Watson, 2007). Μια ενζυμική μονάδα (1Unit) είναι αρκετή για μια αντίδραση.

6. **Εκκινητές (Primers):** Οι εκκινητές αποτελούν ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία αποτελούν τα εκκινητικά μόρια για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να είναι μεταξύ 0,4- 0,6μM. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία είναι :

dsRNA_F-WhCc

5'- GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCTGTAATGGGCAGTTCTGG-3'

dsRNA_R-WhCc

5'- GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGCGATAGCTTTTTCAACACC-3'

(Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν ειδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από την T7 RNA πολυμεράση ώστε να μπορέσει συνδεθεί και να ξεκινήσει τον πολυμερισμό κατά την in vitro RNA μεταγραφή).

Μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια μοριακή τεχνική που έχει ως στόχο την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας από ένα μόριο-στόχο DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους με εναλλαγές στη θερμοκρασία που έχουν ως στόχο:

- Την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA-στόχου σχηματίζοντας δυο μονόκλωνες αλυσίδες ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία, 94-95 °C.
- Την υβριδοποίηση των εκκινητών (primers) με τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περίπου 5 °C κάτω από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών (T_a= T_m-5). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace T_m= 4*(αριθμός βάσεων G+C) +2*(αριθμός βάσεων A+T).
- Τον πολυμερισμό- επιμήκυνση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων σε θερμοκρασία 72-74 °C. Για τον πολυμερισμό χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση.

Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους (συνήθως 30 κύκλοι), έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική και ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης περίπου 10⁹ μόρια DNA.

Το πρόγραμμα αντίδρασης PCR είναι:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	94 °C	4min	1
Αποδιάταξη	94 °C	30sec	30
Υβριδισμός	50 °C	30sec	
Πολυμερισμός	72 °C	45sec	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	5min	1
Διατήρηση	4 °C	-	-

Στην αντίδραση PCR προστίθενται:

DNA	επιθυμητή ποσότητα
Buffer	1X
MgCl ₂	1,5mM
dNTPs	0,8mM (total)
Εκκινητής F	0.5μM
Εκκινητής R	0,5μM
Taq DNA πολυμεράση	1 unit
ddH ₂ O	έως τον τελικό όγκο

1. Προσθέτουμε σε αποστειρωμένα σωληνάκια PCR την επιθυμητή ποσότητα του DNA και των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης
2. Τοποθετούμε τα σωληνάκια PCR σε θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα

- ❖ Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αποστειρωμένες συνθήκες
- ❖ Το ρυθμιστικό διάλυμα και το MgCl₂ χρειάζονται καλή ανάδευση πριν χρησιμοποιηθούν.

Η απόδοση μιας PCR αντίδρασης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η συγκέντρωση των Mg^{2+} , ο αριθμός των κύκλων και η χρονική τους διάρκεια, η πολυμεράση που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου και τέλος ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών.

2.2 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA (Sambrook et al., 1989). Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο μόρια νουκλεϊκών οξέων τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες σύμφωνα με την κινητικότητα μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα τα φορτισμένα μόρια μέσα σε υδάτινα διαλύματα και κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν σε ουδέτερο pH.

Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά pK και το μοριακό βάρος των φορτισμένων σωματιδίων, και συγκεκριμένα η μετακίνηση του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Όσο πιο μικρό το μέγεθος του DNA τόσο πιο γρήγορα μετακινείται προς το θετικό πόλο. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση.

Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όσο πιο πυκνή η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη τόσο πιο υψηλή η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος.

Το DNA γίνεται ορατό όταν εκτεθεί σε UV ακτινοβολία με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο συνδέεται ισχυρά με το DNA παρεμβαίνοντας ανάμεσα στις δίκλωνες βάσεις σε ποσότητα ίση με τη συγκέντρωσή του. Άρα με βάση την ένταση του φθορισμού των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου μπορεί να ποσοτικοποιηθεί το γενετικό υλικό.

Επίσης, το μέγεθος του DNA μπορεί να υπολογιστεί έχοντας ως «χάρακα» ένα μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder) και αντιστοιχώντας το ύψος της υπό μελέτης ζώνης με την ζώνη του μάρτυρα που βρίσκεται στο ίδιο ύψος.

Υλικά

1. **Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X 1L:** περιέχει 54g Tris-base, 27,5g Boric acid, 20ml EDTA 0,5M(pH 8.0)
2. **Αγαρόζη:** Η συγκέντρωση της αγαρόζης επηρεάζει την κινητικότητα των τμημάτων DNA στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο $\mu = \log \mu_0 - K\tau$ όπου μ_0 είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και K ο συντελεστής επιβάρυνσης.
3. **Μάρτυρας (Ladder):** Για τον προσδιορισμό των ζωνών του DNA στο πήκτωμα ηλεκτροφορούμε και το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA.
4. **Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10X:** περιέχει 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικκόλη σε νερό. Η φικκόλη αυξάνει την πυκνότητα του DNA, ώστε να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ οι χρωστικές επιτρέπουν την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.
5. **Βρωμιούχο αιθίδιο:** Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική το μόριο του οποίου περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Η UV ακτινοβολία μεταβιβάζεται είτε από το DNA στα 260nm είτε από την ίδια χρωστική στα 302nm και 366nm και εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα τα μόρια του DNA να φθορίσουν όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Μέθοδος

Για την παρασκευή 40ml πηκτώματος αγαρόζης 1% με 0,5X TBE:

1. Ζυγίζουμε 0,4gr αγαρόζης
2. Προσθέτουμε 40ml TBE 0,5X στην κωνική φιάλη που περιέχει την αγαρόζη.
3. Θερμαίνουμε την κωνική φιάλη με συνεχή παρακολούθηση μέχρι να παρατηρήσουμε ότι διαλύθηκε όλη η αγαρόζη.
4. Όταν διαλυθεί η αγαρόζη παγώνουμε τη φιάλη με τρεχούμενο νερό.
5. Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο και ανακινούμε.
6. Προσθέτουμε το διάλυμα αγαρόζης στις ειδικές βάσεις ηλεκτροφορητικής συσκευής αφού πρώτα έχουμε τοποθετήσει τα ειδικά χτενάκια (το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα, «πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης»).

7. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, ετοιμάζουμε τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Αφαιρούμε το ειδικό χτενάκι και τοποθετούμε το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθέτουμε διάλυμα TBE 0,5X (ίδια συγκέντρωση με αυτό που περιέχει το πήκτωμα) ώστε να καλυφθούν τα πηγαδάκια.
3. Προσθέτουμε στα δείγματά μας διάλυμα φόρτωσης και αναδεύουμε.
4. Μεταφέρουμε τα δείγματά μας στα πηγαδάκια ενώ σε ένα πηγαδάκι προσθέτουμε και το μάρτυρα.
5. Ξεκινούμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζοντας την τάση στα 100V περίπου.

Στο τέλος παρατηρούμε σε υπεριώδη ακτινοβολία UV τις ζώνες μας και υπολογίζουμε το μέγεθος και την ποσότητά του προϊόντος μας.

2.3 Ανάκτηση μορίων του DNA από πήκτωμα αγαρόζης

(Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit της Promega).

Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η απομόνωση του DNA των υπό μελέτη ζωνών από το πήκτωμα ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε διάφορες αντιδράσεις όπως *in vitro* transcription για τη δημιουργία δίκλωνου RNA.

Υλικά

1. **Διάλυμα Πρόσδεσης στη Μεμβράνη** (Membrane binding solution): για κάθε 10mg διαλύματος έχουμε 10μl MBS.
2. **Διάλυμα πλύσης Μεμβράνης** (Membrane wash solution)
3. **Υδατικό διάλυμα ελεύθερο Νουκλεασών** (Nuclease-free water)
4. **Δείγμα του πηκτώματος**

Μέθοδος

1. Εντοπίζουμε την επιθυμητή μας ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης και το κόβουμε προσεχτικά τοποθετώντας το σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5ml.

2. Υπολογίζουμε το βάρος της ζώνης μας αφαιρώντας το βάρος ενός άδειου eppendorf.
3. Προσθέτουμε 10μl Membrane Binding Solution ανά 10mg gel. Αναδεύουμε και επωάζουμε στους 50-65°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα. Ελέγχουμε ανά διαστήματα και αναδεύουμε.
4. Όταν διαλυθεί πλήρως μεταφέρουμε το διάλυμα στη στήλη (SV mini column). Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα στο σωλήνα συλλογής (tube collection). Επωάζουμε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκεντρούμε σε υψηλές στροφές για ένα λεπτό. Απορρίπτουμε το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
6. Προσθέτουμε 700μl Membrane Wash Solution.
7. Φυγοκεντρούμε σε υψηλές στροφές για ένα λεπτό.
8. Απορρίπτουμε το έκλουσμα από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετούμε τη στήλη στο σωλήνα συλλογής.
9. Προσθέτουμε 500μl Membrane Wash Solution και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά.
10. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό με ανοικτό το καπάκι της φυγοκέντρου για να απομακρυνθεί η αιθανόλη.
11. Μεταφέρουμε τη στήλη προσεκτικά σε καθαρό σωληνάκι τύπου eppendorf 1,5ml.
12. Προσθέτουμε 20μl Nucleases-free water στο κέντρο της στήλης χωρίς να αγγίζει το φίλτρο.
13. Επωάζουμε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό σε υψηλές στροφές.
14. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 12 και 13.
15. Απορρίπτουμε τη στήλη και αποθηκεύουμε το DNA στους 4 °C ή στους -20 °C.

- ❖ Η αιθανόλη περιέχεται στο Membrane Wash Solution, περιέχει 95%.
- ❖ Το Nucleases free Water προθερμίνεται σε υδατόλουτρο 50-65 °C.

2.4 *in vitro* RNA μεταγραφή (*in vitro* RNA transcription)

Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η δημιουργία συμπληρωματικού RNA από μια αλληλουχία DNA με την προσθήκη νουκλεοτιδίων από μια RNA πολυμεράση. Σε αντίθεση με την αντιγραφή του DNA δεν χρησιμοποιούνται dNTPs αλλά NTPs ενώ κατά τη σύνθεση του RNA προστίθενται νουκλεοτίδια ουρακίλης αντικαθιστώντας όλες τις θέσεις της θυμίνης.

Υλικά

1. **DNA:** χρησιμοποιείται ως μήτρα από την T7 RNA πολυμεράση για τη δημιουργία RNA μεταγράφων. Η ποσότητα που πρέπει να υπάρχει σε κάθε αντίδραση κυμαίνεται γύρω στο 1ng.
2. **Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer):** Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των κατάλληλων συνθηκών (ιοντική ισχύ, pH) ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση της αντίδρασης. Η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση πρέπει να είναι 1X.
3. **5' τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια (NTPs):** Τα ριβονουκλεοτίδια αποτελούν τις βάσεις A,U,G,C που θα χρησιμοποιηθούν από την T7 πολυμεράση για την δημιουργία του μονόκλωνου RNA. Η επιθυμητή ποσότητά τους είναι 2mM ανά αντίδραση (total).
4. **Ειδική T7 RNA πολυμεράση:** Είναι απομονωμένη από το βακτηριοφάγο T7 και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του RNA με την προσθήκη των νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες. Η τελική συγκέντρωση στην αντίδραση πρέπει να είναι 30unit.
5. **Αναστολέας νουκλεασών (RI):** Παρεμποδίζει τη δράση ριβονουκλεασών που θα μπορούσαν να καταστρέψουν το νεοσυντιθέμενο RNA. Η τελική συγκέντρωση στην αντίδραση πρέπει να είναι 40unit.

Μέθοδος

Σε μια τυπική αντίδραση *in vitro* RNA μεταγραφής προστίθενται:

DNA	Επιθυμητή ποσότητα
Buffer	1X
NTPs	2mM
RNAase inhibitor	40 unit
T7 RNA πολυμεράση	30 unit
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο

1. Προσθέτουμε σε αποστειρωμένα σωληνάκια PCR την επιθυμητή ποσότητα του DNA και των υπόλοιπων συστατικών της αντίδρασης
2. Επωάζουμε στους 37 °C για 2 ώρες.

- ❖ Όλες οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε αυστηρά αποστειρωμένες συνθήκες.
- ❖ Το buffer και τα NTPs δεν τοποθετούνται στον πάγο.

2.5 Κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη

Στόχος αυτής της μεθόδου είναι η κατακρήμιση των νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη με σκοπό τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων ή την απομάκρυνση αλάτων, ολιγονουκλεοτιδίων ή άλλων προσμίξεων. Η μέθοδος είναι αρκετά εύκολη, γρήγορη και πολύ αποδοτική και χρησιμοποιούνται παράγοντες που μειώνουν τη διαλυτότητα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων όπως χαμηλή θερμοκρασία, κατιόντα και αιθανόλη.

Υλικά

1. **Διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa):** είναι ασθενές άλας του οποίου τα ιόντα Na⁺ θα συνδεθούν με το αρνητικά φορτισμένο DNA ώστε να κατακρημνιστεί, αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα πρέπει να είναι 0,3M.
2. **Αιθανόλη:** χρησιμοποιείται ώστε να απομακρύνει τα μόρια του H₂O (αφυδατικό μέσο) και το pH του διαλύματος να γίνει βασικό. Το DNA με τα Na⁺ έχουν ουδέτερο φορτίο και κατακρημνίζονται πιο εύκολα.
3. **Γλυκογόνο:** χρησιμοποιείται ως φορέας συγκατακρήμισης αφού μπορεί να παρασύρει το DNA για κατακρήμιση παγιδεύοντας το στη δομή του λόγω του ότι είναι μεγαλομόριο με πόρους.

Μέθοδος

1. Προσθέτουμε στο δείγμα μας δυόμιση όγκους αιθανόλης 100%, CH₃COONa σε τελική συγκέντρωση 0.3M και γλυκογόνο.
2. Αποθηκεύουμε το RNA στους -20 °C. Στο στάδιο αυτό μπορούν να παραμείνουν για όσο χρονικό διάστημα επιθυμούμε.

3. Φυγοκεντρούμε σε υψηλές στροφές για 20-25 λεπτά.
4. Αδειάζουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5V αιθανόλης 70%.
5. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά.
6. Αδειάζουμε υπερκείμενο και αφήνουμε το erpendorf ανοικτό σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει το ίζημα από τα υπολείμματα της αιθανόλης που έχουν απομείνει.
7. Αναδιαλύουμε με νερό, με χρήση πιπέτας.

2.6 Δημιουργία του δίκλωνου RNA

Υλικά

1. **RNA:** τα μονόκλινα μόρια RNA που δημιουργήθηκαν κατά την in vitro RNA μεταγραφή χρησιμοποιούνται για υβριδισμό μεταξύ τους και το σχηματισμό δίκλωνου RNA (dsRNA).

Μέθοδος

1. Επωάζουμε το υδατικό διάλυμα του RNA σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 30 λεπτά.
2. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες ώστε να υβριδοποιηθούν οι μονόκλωνες αλυσίδες και να γίνει δίκλωνο (dsRNA).
3. Αποθηκεύουμε στους -20 °C.
 - ❖ Για τη δημιουργία του δίκλωνου RNA χρειάζεται ελάχιστος χρόνος 3-4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

2.7 Βιολογικό Υλικό

2.7.1) Καλλιέργεια των εντόμων *Ceratitis capitata* και *Bactrocera oleae*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε τα Δίπτερα έντομα *Ceratitis capitata* και *Bactrocera oleae*, γνωστά ως Μεσογειακή μύγα και δάκος της ελιάς, αντίστοιχα. Τα στελέχη των εντόμων διατηρούνται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25°C και σχετικής υγρασίας 75%, που διαθέτει σύστημα 12ώρου φωτοπεριοδισμού.

2.7.2) Ενήλικα άτομα

Τα ενήλικα άτομα όσον αφορά τη μεσογειακή μύγα διατηρούνται σε κλουβιά από plexi glass, τα οποία στη μια τους πλευρά έχουν συνθετικό ύφασμα (οργαντίνα) που είναι εύκολα διαπερατό από τον ωαποθέτη των θηλυκών ατόμων. Η τροφή των ενηλίκων ατόμων αποτελείται από μίγμα ξηρής μαγιάς και ζάχαρης σε αναλογία όγκου 1:1, ενώ το απαραίτητο νερό το προσλαμβάνουν απομυζώντας νωπό σπογγώδες υλικό (wettex), που βρίσκεται είτε στο πάνω είτε στο πλαϊνό μέρος του κλουβιού.

Τα ενήλικα άτομα του δάκου της ελιάς διατηρούνται σε κλουβί από ξύλο. Η εναπόθεση των αυγών πραγματοποιείται σε υπόστρωμα ωοτοκίας, δηλαδή κώνο κατασκευασμένο από οργαντίνα. Η τροφή των ενηλίκων ατόμων περιέχει υδρολυμένη μαγιά, ζάχαρη, κρόκο αυγού και στρεπτομυκίνη, ενώ το απαραίτητο νερό προσλαμβάνεται απομυζώντας νωπό σπογγώδες υλικό (wettex).

2.7.3) Συλλογή αυγών

Τα θηλυκά άτομα μιμούμενα τη φύση, όπου τρυπούν το φρούτο για να αφήσουν τα αυγά τους, διαπερνούν το συνθετικό ύφασμα του κλουβιού ή του κώνου με τον ωαποθέτη τους και αφήνουν τα αυγά στην εξωτερική επιφάνεια. Κάτω από αυτό το σημείο υπάρχει ειδικό τρυβλίο petri με νερό όπου καταλήγουν τα αυγά. Τα αυγά της μεσογειακής μύγας συλλέγονται με διήθηση του νερού σε συνθετικό ύφασμα και μεταφέρονται στην επιφάνεια ειδικής τροφής για καλλιέργεια προνυμφών, που βρίσκεται μέσα σε τρυβλίο petri, το καπάκι του οποίου είναι διάτρητο ώστε να αναπνέει η προνύμφη. Στην περίπτωση του δάκου της ελιάς, τα αυγά συλλέγονται και τοποθετούνται σε διηθητικό χαρτί εμβαπτισμένο σε διάλυμα προπιονικού οξέος 0.3%.

2.7.4) Προνυμφικό στάδιο

Στα αεριζόμενα αυτά τρυβλία πραγματοποιείται τόσο η εμβρυογένεση, η οποία διαρκεί περίπου 48 ώρες, όσο και η ανάπτυξη των προνυμφών.

Η σύσταση της τροφής των προνυμφών της μεσογειακής μύγας είναι η ακόλουθη:

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

Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται σε ομογενοποιητή (Sorval), μέχρι να προκύψει ένας ομοιογενής πολτός που διατηρείται στους 4°C για περίπου 10 ημέρες.

Η σύσταση της τροφής των προνυμφών του δάκου είναι η ακόλουθη (1 kg):

Νερό βρύσης	550ml
Μαγιά μύρας	75gr
Υδρολυμένη σόγια	30gr
Σορβικό κάλιο	0.5gr
Νιπαγίνη	2gr
Ζάχαρη	20gr
Ελαιόλαδο	20ml
Tween 80	7,5 ml
HCL 2N	30ml
Κυτταρίνη (σκόνη)	275gr

Το προνυμφικό στάδιο διαρκεί 6-8 ημέρες περίπου σε θερμοκρασία 24±1°C.

2.7.5) Νυμφικό στάδιο

Όσον αφορά στη μεσογειακή μύγα, την έκτη μέρα της ανάπτυξης των προνυμφών τα καπάκια των τρυβλίων petri απομακρύνονται και οι προνύμφες με χαρακτηριστικό τρόπο εκτινάσσονται και εγκαταλείπουν το δοχείο με την τροφή για να προσγειωθούν σε ένα λεπτό

στρώμα άμμου που το περιβάλλει. Εκεί αρχίζει και ολοκληρώνεται η βομβυκίωση των προνυμφών, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της νύμφης, η οποία από ανοιχτό άσπρο χρώμα σταδιακά σκουραίνει μέχρι να αποκτήσει καφέ χρώμα. Όσον αφορά στο δάκο, οι νύμφες συλλέγονται από την τροφή και τοποθετούνται σε τρυβλία petri μέχρι να ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση τους σε ενήλικα άτομα.

Το στάδιο της νύμφης διαρκεί 9-10 ημέρες περίπου. Μόλις τα ενήλικα άτομα εκκολαφθούν, συλλέγονται και τοποθετούνται σε καθαρά κλουβιά ώστε να ανανεωθεί η καλλιέργεια.

2.8) Εφαρμογή RNAi

Η εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi δοκιμάστηκε κατά το προνυμφικό στάδιο των εντόμων με τη χορήγηση dsRNA μέσω τροφής, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες κάθε φορά. Οι υπό μελέτη προνύμφες απομακρύνονταν από την καλλιέργεια και τοποθετούνταν η κάθε μία ξεχωριστά σε τρυβλίο petri 3mm όπου υπήρχε βαμβάκι εμβαπτισμένο με τροφή και την επιθυμητή ποσότητα RNAi. Στο τρυβλίο παρέμειναν έως τη βομβυκίωση και την ενηλικίωση τους όπου και αξιολογούνταν η αποσιώπηση του γονιδίου white.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού με εισαγωγή του dsRNA στις προνύμφες της μεσογειακής μύγας και του δάκου μέσω τροφής ακολούθησε διάφορες εφαρμογές, με διαφορετικές συνθήκες οι οποίες καταγράφονται στους παρακάτω πίνακες. Κάθε εφαρμογή ολοκληρωνόταν με τη βομβυκίωση κάθε προνύμφης και το αποτέλεσμα γινόταν αντιληπτό μετά την ενηλικίωση του εντόμου από το φαινοτυπικό χρωματισμό των ματιών.

Το ίδιο πείραμα διεξαγόταν και στα δύο έντομα σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων, ενώ ταυτόχρονα υπήρχε ένα έντομο, το οποίο τρεφόταν μόνο με τροφή και αποτελούσε το κοντρόλ ή αλλιώς μάρτυρα για έλεγχο των αποτελεσμάτων. Στις εικόνες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν είτε από δάκο είτε από μύγα.

3.1) 1^η εφαρμογή

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

	1 ^η μέρα	3 ^η μέρα
1 ^ο έντομο	1μg dsRNA (5μl) + 100μl τροφής	1μg dsRNA (5μl) + 100μl τροφής
2 ^ο έντομο	2μg dsRNA (10μl) + 100μl τροφής	2μg dsRNA (10μl) + 100μl τροφής
3 ^ο έντομο	3μg dsRNA (15μl) + 100μl τροφής	3μg dsRNA (15μl) + 100μl τροφής

Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στις επόμενες στήλες παρουσιάζονται οι μέρες και οι ποσότητες (σε μg) χορήγησης του dsRNA.

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις προνύμφες ίδιου μεγέθους της μύγας της Μεσογείου και του δάκου και δοκιμάστηκαν για την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού. Η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε με χορήγηση white dsRNA μέσω της τροφής. Σε κάθε έντομο, προστέθηκε διαφορετική συγκέντρωση dsRNA που κυμαινόταν από 1μg έως 3μg, όπως φαίνεται στον πίνακα 1, σε ίδια ποσότητα τροφής για το ίδιο χρονικό διάστημα θέλοντας με τον τρόπο αυτό να συγκρίνουμε το αποτέλεσμα σε σχέση με τη συγκέντρωση του dsRNA .

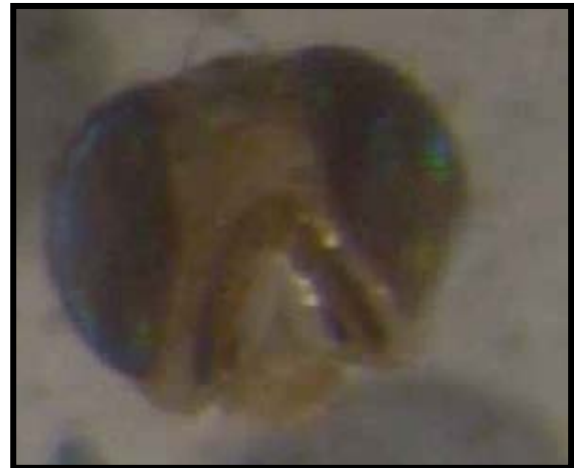
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ο φυσιολογικός (αγρίου τύπου) χρωματισμός (κόκκινο χρώμα) των ματιών και των έξι εντόμων (τριών της μύγας και τριών του δάκου), όπως φαίνεται στις Εικόνες 1-3 (φαινότυποι ματιών μύγας), συμπεραίνοντας έτσι ότι δεν πραγματοποιήθηκε οποιαδήποτε ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού.

EIKONA 3.1



Το 1^ο έντομο παρουσίασε φυσιολογικό φαινότυπο με κόκκινα μάτια, αντί του αναμενόμενου άσπρου χρώματος, μετά από εισαγωγή του white dsRNA μέσω τροφής.

EIKONA 3.2



Το 2^ο έντομο, επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινότυπο με κόκκινα μάτια μετά από χορήγηση του white dsRNA.

EIKONA 3.3



Το 2^ο έντομο, επίσης παρουσίασε φυσιολογικό φαινότυπο με κόκκινα μάτια μετά από χορήγηση του white dsRNA.

3.2) 2^η εφαρμογή

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

	1 ^η μέρα	4 ^η μέρα
1 ^ο έντομο (control)	70μl τροφής	70μl τροφής
2 ^ο έντομο	9μg dsRNA [30μl (250ng/μl)] + 70μl τροφής	12,5μg dsRNA [37,5μl (200ng/μl) + 42μl (120ng/μl)] + 70μl τροφής

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο έντομα από μύγα της Μεσογείου και δύο από δάκο σε προνυμφικό στάδιο. Το ένα εκ των δύο έπαιζε το ρόλο του μάρτυρα, το οποίο και ταΐστηκε μόνο με τροφή, ενώ στο άλλο χορηγήθηκε και white dsRNA μαζί με την τροφή, θέλοντας με τον τρόπο αυτό να συγκρίνουμε μεταξύ τους οποιεσδήποτε διαφορές θα παρουσιάζονταν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Με αφορμή τα αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος μελετήσαμε και πάλι κατά πόσο η ποσότητα του dsRNA (και συγκεκριμένα, η προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας dsRNA) μέσω της τροφής μπορεί να επηρεάσει την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού (Πίνακας 2).

Τα αποτελέσματα διαφάνηκαν από το φαινοτυπικό χρωματισμό των ματιών των εντόμων μετά την εκκόλαψη τους και τα οποία και πάλι δεν ήταν καθόλου ενθαρρυντικά. Παρουσίασαν το φυσιολογικό κόκκινο χρώμα, δηλαδή τον ίδιο φαινότυπο που είχαν και τα έντομα-μάρτυρες συμπεραίνοντας ότι ούτε αυτές οι συνθήκες ήταν ιδανικές για την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού (Εικόνα 4).

ΕΙΚΟΝΑ 3.4



Στην εικόνα παρουσιάζονται αποτελέσματα από μύγες. Αριστερά, φαίνεται το έντομο μάρτυρας ενώ δεξιά, το έντομο στο οποίο χορηγήθηκε white dsRNA μέσω της τροφής, με σκοπό την ανάπτυξη του RNAi μηχανισμού. Και τα δύο έντομα παρουσίασαν τον φυσιολογικό φαινότυπο ματιών, κόκκινου χρώματος αποδεικνύοντας ότι δεν προηγήθηκε οποιαδήποτε γονιδιακή αποσιώπηση.

3.3) 3^η εφαρμογή

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

	1 ^η μέρα	3 ^η μέρα (αλλαγή)
1 ^ο έντομο (control)	70μl τροφής	Βομβυκιώθηκε πριν γίνει αλλαγή
2 ^ο έντομο	21μg dsRNA [53μl (400ng/μl)] + 40μl τροφής	Είχε πεθάνει πριν την αλλαγή. Αντικαταστήθηκε από ένα δάκο. 5ng (20μl) dsRNA + 40μl τροφής

Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στις επόμενες στήλες παρουσιάζονται η μέρα και η ποσότητα (σε μg) χορήγησης του dsRNA.

Διαλέχθηκαν δύο προνύμφες της μεσογειακής μύγας και δύο του δάκου που βρίσκονταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Η μια χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και στην οποία προστέθηκε μόνο τροφή (70μl), ενώ η δεύτερη εξετάστηκε για την εφαρμογή του RNAi μηχανισμού με την προσθήκη dsRNA για το γονίδιο white των ματιών μέσα στην τροφή. Συγκεκριμένα, στο 2^ο έντομο προστέθηκε κατευθείαν μεγάλη ποσότητα (21μg) white dsRNA σε λιγότερη ποσότητα (40μl) τροφής σε σύγκριση με τα δύο προηγούμενα πειράματα (στο συγκεκριμένο χορηγήσαμε κατευθείαν μεγάλη συγκέντρωση dsRNA χωρίς να την αυξάνουμε σταδιακά). Η μύγα ή ο δάκος μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε εάν με την χορήγηση του dsRNA επηρεάζεται ο χρόνος που χρειάζεται για να βομβυκιωθεί η λάρβα, και γενικότερα αν επηρεάζει την επιβίωση του εντόμου ή κάποιο αναπτυξιακό στάδιο.

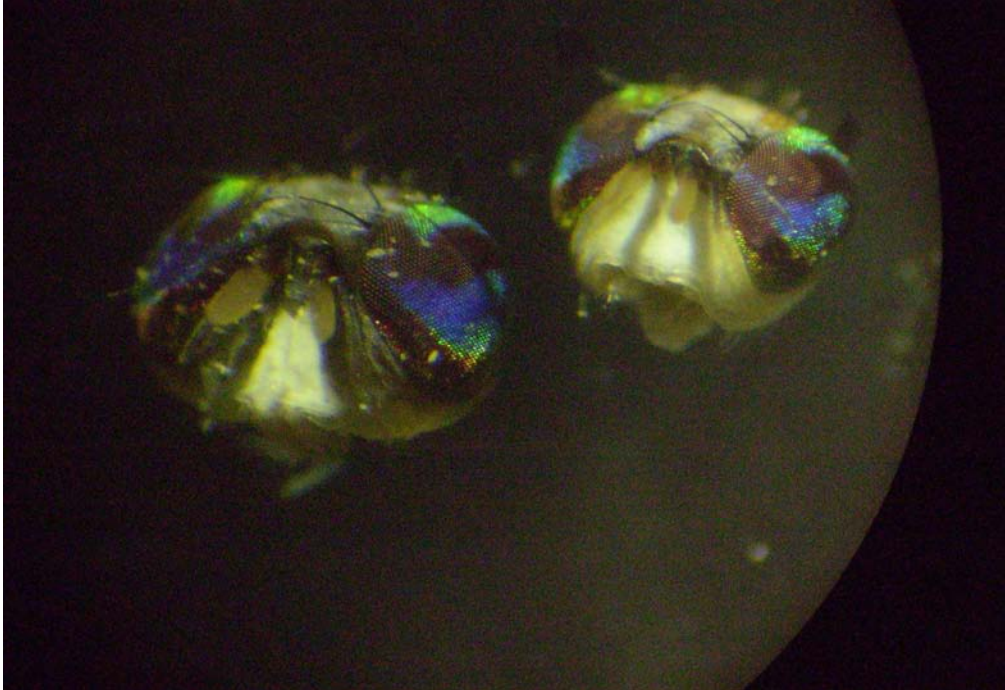
Στο πείραμα αυτό, παρατηρήσαμε κάποια απροσδόκητα αποτελέσματα όπως:

- Η προνύμφη μάρτυρας για την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού είχε βομβυκιωθεί πιο νωρίς από τον αναμενόμενο χρόνο.
- Η προνύμφη της μύγας που εξετάζονταν για την εφαρμογή του RNAi με προσθήκη white dsRNA στην τροφή είχε πεθάνει πριν την αλλαγή (πριν καν προλάβει να βομβυκιωθεί) και αντικαταστήθηκε στη συνέχεια με ένα δάκο.

Τα αποτελέσματα ήταν ίδια με τα προηγούμενα πειράματα δηλαδή μετά την ενηλικίωση τα ενήλικα άτομα έφεραν φυσιολογικά κόκκινα μάτια και όχι άσπρα μάτια που υποδεικνύουν έτσι την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού (Εικόνα 5). Επίσης, ο

πρόωρος θάνατος της μύγας πριν προλάβει να βομβυκιωθεί προκάλεσε το ερώτημα εάν όντως η εισαγωγή του dsRNA μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση του εντόμου.

ΕΙΚΟΝΑ 3.5



Αριστερά φαίνεται το έντομο μάρτυρας με το φυσιολογικό φαινότυπο ματιών (κόκκινο χρώμα), ενώ δεξιά παρουσιάζεται η μύγα με κόκκινο φαινότυπο ματιών υποδεικνύοντας ότι δεν έχει γίνει ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού μετά από χορήγηση του white dsRNA διαμέσου της τροφής.

3.4) 4^η εφαρμογή

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

	1 ^η μέρα	2 ^η μέρα	3 ^η μέρα
1 ^ο έντομο (control)	70μl τροφής	70μl τροφής	Βομβυκιώθηκε
2 ^ο έντομο (control)	70μl τροφής	70μl τροφής	Βομβυκιώθηκε
3 ^ο έντομο	10μg dsRNA [25μl(400ng/μl)] + 50μl τροφής	10μg dsRNA [33μl (300ng/μl)] + 50μl τροφής	Βομβυκιώθηκε
4 ^ο έντομο	10μg dsRNA [25μl(400ng/μl)] + 50μl τροφής	10μg dsRNA [13μl (300ng/μl)] + 19,2μl (250ng/μl)] + 50μl τροφής	10μg dsRNA [40μl (250ng/μl)] + 30μl τροφής

Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στις επόμενες στήλες παρουσιάζονται η μέρα και η ποσότητα (σε μg) χορήγησης του dsRNA.

Κατά την 4^η εφαρμογή χρησιμοποιήθηκαν από κάθε έντομο, δύο προνύμφες ως μάρτυρες και δύο προνύμφες οι οποίες ακολούθησαν τις ίδιες συνθήκες χορήγησης του dsRNA επί καθημερινής βάσης μέχρι και την βομβυκίωση τους. Η εισαγωγή του dsRNA μέσω τροφής ακολούθησε ένα σταθερό πρωτόκολλο, δηλαδή σταθερής συγκέντρωσης (10μg dsRNA), για σταθερή χρονική διάρκεια χορήγησης (καθημερινή προσθήκη dsRNA). Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 4, τα τρία έντομα (της μύγας) εκ των τεσσάρων πρόλαβαν να βομβυκιωθούν πριν την 3^η μέρα, ενώ στο τέταρτο έντομο πραγματοποιήθηκε, προσθήκη επιπλέον τροφής με dsRNA μέχρι να βομβυκιωθεί και αυτό (4^η μέρα).

Με την ενηλικίωση των εντόμων παρατηρήσαμε και πάλι ότι δεν πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της RNA παρεμβολής αφού τα έντομα δεν έφεραν λευκά μάτια, αφού παρουσίαζαν τον ίδιο φυσιολογικό φαινότυπο με τα έντομα μάρτυρες. Στις εικόνες 6 και 7 παρουσιάζονται τα έντομα μάρτυρες που επισημαίνονται με την επιγραφή control, ενώ στις εικόνες 8 και 9 παρουσιάζονται τα έντομα στα οποία πραγματοποιήθηκε χορήγηση του dsRNA.

ΕΙΚΟΝΑ 3.6

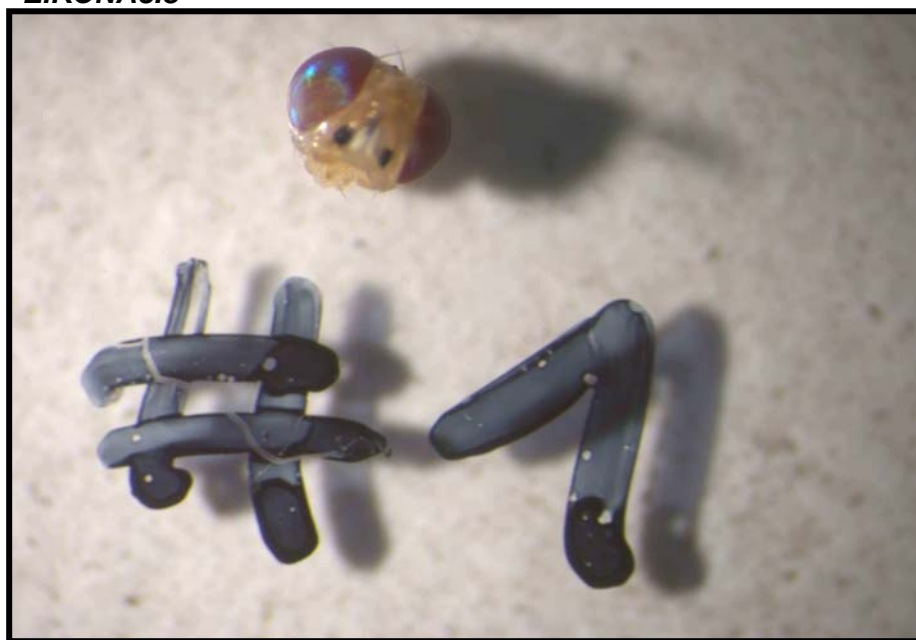


Στις εικόνες 6 και 7, παρουσιάζονται οι φαινότυποι των ματιών των εντόμων μαρτύρων (μύγες) όπως παρατηρήθηκαν από το ηλεκτρονικό στερεοσκόπιο. Και τα δύο έντομα φέρουν το αναμενόμενο κόκκινο χρώμα ματιών.

ΕΙΚΟΝΑ3.7

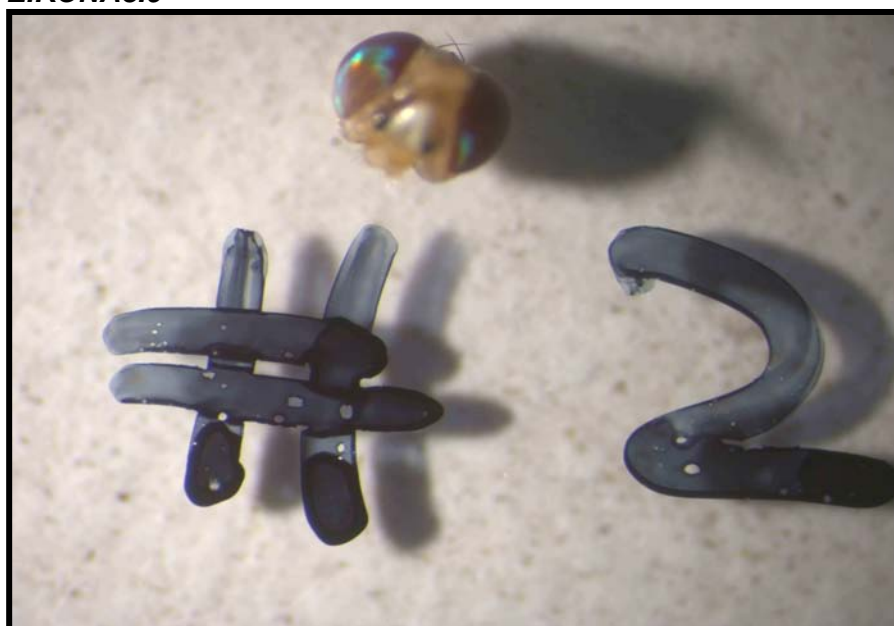


EIKONA3.8



Στις εικόνες 8 και 9, παρουσιάζονται οι φαινότυποι των ματιών των εντόμων (μύγες) στα οποία πραγματοποιήθηκε χορήγηση του white dsRNA όπως παρατηρήθηκαν από το ηλεκτρονικό στερεοσκόπιο. Και τα δύο έντομα φέρουν το μη αναμενόμενο κόκκινο χρώμα ματιών.

EIKONA3.9



3.5) 5^η εφαρμογή

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

	1 ^η μέρα	Παρατηρήσεις
1 ^ο έντομο (control)	50μl τροφής	Βομβυκιώθηκε 1 ^η μέρα
2 ^ο έντομο	15μg dsRNA [17μl (400ng/μl) + 15μl (300ng/μl) + 15μl (250ng/μl)] + 30μl τροφής	Βομβυκιώθηκε 2 ^η μέρα

Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στις επόμενες στήλες παρουσιάζονται η μέρα και η ποσότητα (σε μg) χορήγησης του dsRNA.

Στην εφαρμογή αυτή διαλέχθηκαν δύο λάρβες και από τα δύο έντομα προχωρημένου αναπτυξιακού σταδίου ώστε να βομβυκιωθούν κατευθείαν μετά από τη χορήγηση τροφής ή dsRNA. Στο συγκεκριμένο πείραμα χορηγήθηκε μεγάλη συγκέντρωση dsRNA στην τροφή για μια φορά, ένα στάδιο πριν την βομβυκίωση των ατόμων, θέλοντας να δούμε κατά πόσο η απότομη χορήγηση μεγάλης συγκέντρωσης dsRNA σε προχωρημένο στάδιο μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού.

Τα αποτελέσματα ήταν πάλι αποθαρρυντικά, αφού δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο φαινότυπο των ματιών (Εικόνα 10).

EΙΚΟΝΑ 3.10



Στα αριστερά, παρουσιάζεται το έντομο μάρτυρας (δάκος), ενώ στα δεξιά παρουσιάζεται το έντομο (δάκος) στο οποίο εφαρμόστηκε ο RNAi μηχανισμός με χορήγηση του dsRNA μέσω τροφής, χωρίς κανένα αποτέλεσμα.

3.6) 6^η εφαρμογή

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

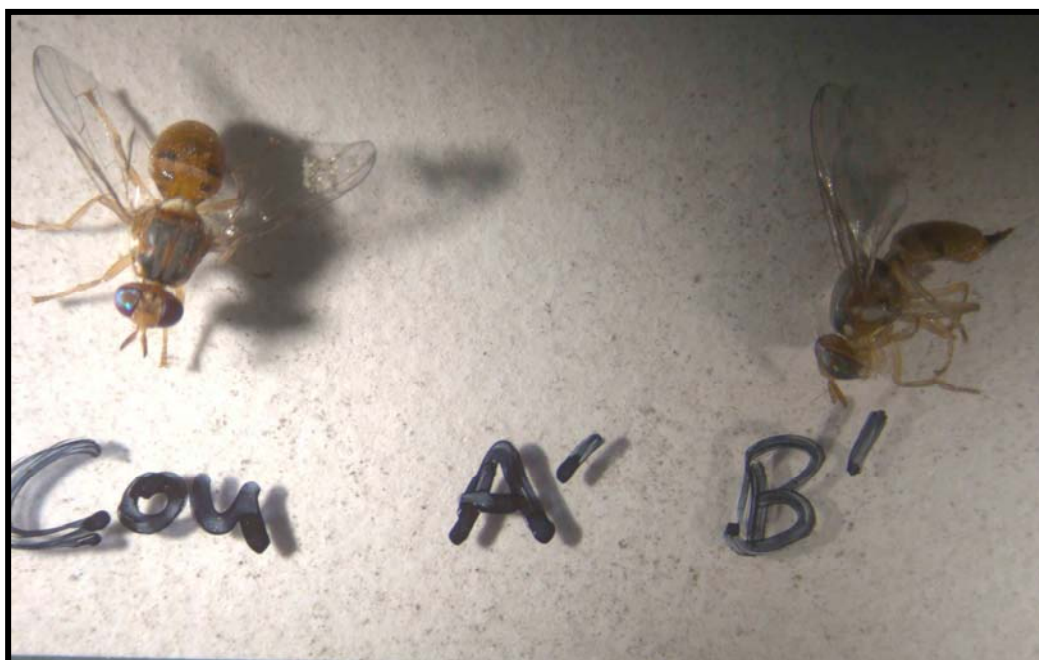
	1 ^η μέρα	2 ^η μέρα	3 ^η μέρα	4 ^η μέρα
1 ^ο έντομο (control)	50μl τροφής	50μl τροφής	Βομβυκιώθηκε	
2 ^ο έντομο (control)	50μl τροφής	50μl τροφής	Βομβυκιώθηκε	
3 ^ο έντομο	10μg dsRNA [25μl (400g/μl)] + 50μl τροφής	10μg dsRNA [25μl (400g/μl)] + 50μl τροφής	10μg dsRNA [25μl (400g/μl)] + 50μl τροφής	Βομβυκιώθηκε
4 ^ο έντομο	10μg dsRNA [25μl (400g/μl)] + 50μl τροφής	10μg dsRNA [25μl (400g/μl)] + 50μl τροφής	Βομβυκιώθηκε	

Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο αριθμός των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στις επόμενες στήλες παρουσιάζονται η μέρα και η ποσότητα (σε μg) χορήγησης του dsRNA.

Για το πείραμα αυτό ακολουθήθηκε ένα παρόμοιο πρωτόκολλο με αυτό που εφαρμόστηκε και για τη διεξαγωγή του πειράματος 4. Χρησιμοποιήθηκαν δύο προνύμφες ως μάρτυρες και δύο προνύμφες (από κάθε έντομο), οι οποίες ακολούθησαν τις ίδιες συνθήκες χορήγησης του dsRNA. Η εισαγωγή του dsRNA μέσω τροφής ακολούθησε ένα σταθερό πρωτόκολλο, δηλαδή σταθερής συγκέντρωσης (10μg dsRNA), για σταθερή χρονική διάρκεια χορήγησης (καθημερινή προσθήκη dsRNA μέχρι και την βομβυκίωση των ατόμων). Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα, τα τρία έντομα (του δάκου) εκ των τεσσάρων πρόλαβαν να βομβυκιωθούν πριν την 3^η μέρα, ενώ στο τρίτο έντομο πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον προσθήκη τροφής με dsRNA μέχρι να βομβυκιωθεί και αυτό (4^η μέρα).

Με την ενηλικίωση των εντόμων παρατηρήσαμε και πάλι ότι δεν πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της RNA παρεμβολής αφού τα έντομα δεν έφεραν λευκά μάτια, παρουσιάζοντας τον ίδιο φυσιολογικό φαινότυπο με τα έντομα μάρτυρες. Στην εικόνα 11 παρουσιάζονται τα έντομα μάρτυρες (δάκοι) που επισημαίνονται με την επιγραφή control, ενώ στην εικόνα 12 παρουσιάζονται τα έντομα (δάκοι) στα οποία πραγματοποιήθηκε χορήγηση του dsRNA.

EIKONA 3.11



Στην εικόνα 11 παρουσιάζονται τα δύο έντομα μάρτυρες, ενώ στην εικόνα 12 παρουσιάζονται τα δύο έντομα στα οποία έγινε χορήγηση του white dsRNA όμως εξακολουθούσαν να φέρουν φυσιολογικό φαινότυπο ματιών (κόκκινο χρώμα).

EIKONA 3.12



Συνοπτικά

Στα έξι πιο πάνω πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συνθήκες για την εφαρμογή του RNAi μηχανισμού. Συγκεκριμένα, οι διάφορες εφαρμογές ξεχώρισαν από τον αριθμό των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά, από το αναπτυξιακό στάδιο των εντόμων που επιλέγονταν (πρώιμο προνυμφικό στάδιο ή μεταγενέστερο), από τη συγκέντρωση του white dsRNA που χορηγήθηκε διαμέσου της τροφής και από τη χρονική διάρκεια χορήγησης του στα διάφορα έντομα (επί καθημερινής βάσης ή με ενδιάμεσα κενά). Στα πειράματα όπου παρέμενε σταθερή η χρονική διάρκεια χορήγησης άλλαζε η συγκέντρωση του dsRNA (συνήθως αυξανόταν) ή το αντίθετο.

Μετά την ενηλικίωση των εντόμων, και αφού παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό στερεοσκόπιο κανένα από αυτά δεν παρουσίασε τον αναμενόμενο φαινότυπο, δηλαδή λευκά ματιά. Όλα τα έντομα που κατάφεραν να επιβιώσουν, έφεραν το φυσιολογικό κόκκινο χρώμα ματιών, ίδιο με αυτά των εντόμων μαρτύρων, καταδεικνύοντας ότι δεν πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού και γονιδιακή αποσιώπηση του γονιδίου *white* των ματιών. Επίσης, κάποια από αυτά είχαν πεθάνει πριν προλάβουν να βομβυκιωθούν προκαλώντας διάφορα ερωτήματα όπως, εάν η χορήγηση του dsRNA επηρεάζει κάποια αναπτυξιακά στάδια ή ακόμη και την επιβίωση του εντόμου. Ένα άλλο ερώτημα που τίθεται από τα αποτελέσματα είναι κατά πόσο η μέθοδος χορήγησης του dsRNA είναι ικανή να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού και αν όντως μπορεί να είναι το ίδιο αποτελεσματική στα δύο αυτά έντομα όπως συμβαίνει σε άλλα έντομα (προηγούμενες αναφορές εντόμων σε εφαρμογές).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι πρόσφατες πρόοδοι στη μοριακή βιολογία έχουν καταδείξει ότι η αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να είναι αποτελεσματική μέσω της προσθήκης ενός δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA) που φέρει συμπληρωματική αλληλουχία με το γονίδιο-στόχο και ενεργοποιεί τον RNAi μηχανισμό (Fire et al., 1998; Nopoli et al., 1990; Hannon et al., 2002). Το φαινόμενο αυτό καλείται παρεμβολή του RNA και παρατηρήθηκε αρχικά στα φυτά και αργότερα στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans*. Μετέπειτα, σε επόμενες μελέτες που διεξήχθησαν, διαπιστώθηκε ότι το RNAi είναι παρόν σε μια ευρεία ποικιλία ευκαρυωτικών οργανισμών συμπεριλαμβανομένων και των θηλαστικών (Billy et al., 2001; Paddison et al., 2002; Elbashir et al., 2001).

Η εισαγωγή του εξωγενούς dsRNA έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαφόρων μεθόδων όπως για παράδειγμα είναι η μικροένεση, η εμφύσηση του οργανισμού σε διάλυμα dsRNA ή ακόμη και διαμέσου της τροφής. Τέτοιες μέθοδοι έχουν ήδη προαναφερθεί σε διάφορα έντομα για τη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης του RNAi και για τον προσδιορισμό και την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης. Τα περισσότερα από αυτά τα πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί μέσω μικροένεσης των dsRNAs με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας ενεργοποίησης του RNAi μηχανισμού όπως στη *Drosophila melanogaster*, στο *Tribolium castaneum* (Broehan et al., 2009), στο *Bombyx mori* (Masumoto et al., 2009), στο *Harmonia axyridis* (Kuwayama et al., 2006) και στην *Apis mellifera* (Schlüns et al., 2007). Όμως κατά την πορεία και την εξέλιξη των πειραμάτων, αποδείχθηκε ότι η ένεση θα μπορούσε να αντικατασταθεί από μια καταλληλότερη μέθοδο, δίνοντας ώθηση προς την ανάπτυξη της τεχνολογίας του RNAi μέσω τροφής. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην *Glossina morsitans morsitans* (Rajagopal et al., 2002) και το *Epiphyas postvittana* (Turner et al., 2006) αποδείχθηκε ότι μπορεί να δώσει επιτυχή αποτελέσματα.

Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε με την ανάπτυξη του RNAi μηχανισμού σε δύο έντομα μεγάλης βιολογικής και οικονομικής σημασίας στα οποία δεν έχουν γίνει προηγούμενες αναφορές, στη μύγα της Μεσογείου και στο δάκο της ελιάς. Μια άλλη πτυχή που απασχόλησε τη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η επιτυχής χορήγηση του dsRNA διαμέσου της τροφής στα έντομα και κατά πόσο μπορεί να είναι αποτελεσματική ή όχι. Πραγματοποιήθηκαν διάφορες πειραματικές εφαρμογές χορήγησης του dsRNA μέσω τροφής, με μεταβλητούς παράγοντες τη συγκέντρωση του εισαγόμενου dsRNA και τη χρονική διάρκεια χορήγησης, ενώ λαμβάνονταν και έντομα διαφορετικού αναπτυξιακού σταδίου. Τα αποτελέσματα έγιναν άμεσα αντιληπτά παρατηρώντας το χρωματικό φαινότυπο των ματιών των ενήλικων ατόμων, αναλόγως της έκφρασης ή όχι του εξεταζόμενου γονιδίου

white για τα μάτια. Δυστυχώς, κανένα από τα πειράματα μας δεν ήταν επιτυχές, αφού τα ενήλικα άτομα των εντόμων έφεραν το φυσιολογικό κόκκινο χρώμα των ματιών αντί του αναμενόμενου λευκού χρώματος.

Συγκεκριμένα, ούτε στη μύγα της Μεσογείου, άλλα ούτε και στο δάκο δεν πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού ενώ κάποια έντομα που είχαν πεθάνει πριν προλάβουν να βομβυκιωθούν δημιούργησαν το ερώτημα ότι ίσως η χορήγηση του dsRNA να επηρεάζει την επιβίωση τους ή κάποιο από τα αναπτυξιακά στάδια. Τέθηκαν έτσι διάφορες σκέψεις και προβληματισμοί για τις παραμέτρους που μπορεί να επηρέασαν στην αποτυχημένη εφαρμογή της τεχνολογίας του RNAi. Μια από αυτές αφορά την ποιότητα του dsRNA, το οποίο δημιουργήθηκε εργαστηριακά πριν από τη χορήγηση του στα έντομα. Ένα από τα ενδεχόμενα, είναι η περιοχή του γονιδίου που επιλέχθηκε για το σχεδιασμό του dsRNA να μην ήταν η καταλληλότερη. Επιπλέον, κατά το στάδιο της δημιουργίας του δίκλωνου μορίου, ίσως οι αλληλουχίες να μην υβριδοποιήθηκαν μεταξύ τους με αποτέλεσμα στα έντομα να χορηγήθηκε μονόκλωνο RNA, αντί του dsRNA. Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν το dsRNA χορηγείτε μέσω τροφής και που επηρεάζει σημαντικά στην απορρόφηση και τη μεταφορά ουσιών στα διάφορα όργανα είναι ο επιθηλιακός φραγμός (Rajagopal et al., 2002). Αν θεωρήσουμε ότι το dsRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ποιοτικά καλό, τότε ίσως εν μέρει να επηρέασε η ποσότητα που χορηγήθηκε στα έντομα. Στα πειράματα εφαρμόστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα της ποσότητας του dsRNA που εισήχθηκε, η οποία όμως μπορεί να μην ήταν αρκετή ώστε να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μεγάλο μέρος της ποσότητας χανόταν λόγω του επιθηλιακού φραγμού ή τα μόρια του dsRNA αποικοδομούνταν κατά τη μεταφορά. Επίσης, όπως γνωρίζουμε η βομβυκίωση διαρκεί περίπου για 6 έως 8 ημέρες, ενώ το dsRNA χορηγήθηκε όταν τα έντομα βρίσκονταν ακόμα σε προνυμφικό στάδιο. Ως γνωστό και επειδή το RNA είναι ένα αρκετά ευαίσθητο μόριο, το dsRNA που εισαγόταν στις προνύμφες πιθανόν να αποικοδομούνταν και να μην διατηρούνταν έως την έκφραση του γονιδίου των ματιών, με αποτέλεσμα να μην οδηγούσε στην ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού για τη γονιδιακή αποσιώπηση.

Τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν καθοριστικά εφόσον δίνουν ελάχιστες πληροφορίες. Αντιθέτως, οι πειραματικές εφαρμογές μπορούν να συνεχιστούν, μελετώντας κάθε παράγοντα που μπορεί να εμποδίζει την ενεργοποίηση της τεχνολογίας του RNAi μέσω της τροφής στα έντομα αυτά. Μια επανάληψη των εφαρμογών για ενεργοποίηση του μηχανισμού μέσω τροφής χρησιμοποιώντας dsRNA που στοχεύουν γονίδια του εντέρου αντί του γονιδίου των ματιών, θα μπορούσε να είναι αρκετά καθοριστική. Σε μια τέτοια περίπτωση, το dsRNA που χορηγείται με την τροφή δεν χρειάζεται να περάσει τον επιθηλιακό φραγμό και έτσι μπορεί να έρθει σε άμεση επαφή με το γονίδιο-στόχο του εντέρου. Όπως αναφέρεται και στην εισαγωγή, η ενεργοποίηση της τεχνολογίας του RNAi

με μικροένεση παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας από οποιοσδήποτε άλλες μεθόδους. Επομένως, για να επιβεβαιωθεί ότι η αποτυχία της ενεργοποίησης του RNAi μηχανισμού στην παρούσα μελέτη ήταν αποτέλεσμα της κακής ποιότητας του dsRNA ή της ποσότητας του, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού με έγχυση του συγκεκριμένου dsRNA μέσω ένεσης και να συγκριθούν τα αποτελέσματα και των δύο μελετών. Με την ένεση δεν παρουσιάζεται οποιοσδήποτε περιορισμός κατά τη μεταφορά του dsRNA, με αποτέλεσμα η αποτυχημένη εφαρμογή του dsRNA με ένεση να αποτελεί ένδειξη της κακής ποιότητας του μορίου ή της ποσότητάς του, δικαιολογώντας έτσι τα μη θετικά αποτελέσματα της μελέτης μας. Επιπλέον, θα μπορούσαν να δοκιμαστούν εφαρμογές με διαφορετικά dsRNA ως προς την αλληλουχία που φέρουν, επιλέγοντας διαφορετικά τμήματα της ακολουθίας του γονιδίου για τη σύνθεση του.

Με βάση των προαναφερθέντων, η ανάπτυξη του RNAi μηχανισμού στη μύγα της Μεσογείου και στο δάκο της ελιάς με τη χορήγηση του dsRNA διαμέσου της τροφής παραμένει ακόμη ως ένας μελλοντικός στόχος, επίτευξη του οποίου μπορεί να οδηγήσει στην επίλυση κυρίως γεωργικών και οικονομικών προβλημάτων. Μεταγενέστερα, η τεχνολογία του RNAi για γονιδιακή αποσιώπηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να αδρανοποιεί γονίδια που επηρεάζουν την επιβίωση του εντόμου και να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός εντομοκτόνου βασισμένου στον RNAi μηχανισμό. Μπορεί έτσι 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 και το δάκο, καθώς αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων, θα βοηθήσει στον εμπλουτισμό των διαθέσιμων μοριακών πληροφοριών όπως για παράδειγμα τη μελέτη μονοπατιών σηματοδότησης που έχουν βασικούς ρυθμιστικούς ρόλους σε αναπτυξιακά στάδια ή κατά την επιβίωση ή ακόμη την ταυτοποίηση μη καλά αναγνωρισμένων γονιδίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- Abraham E.G., Sezutsu H., Kanda T., Sugasaki T., Shimada T., Tamura T.,(2000). *Identification and characterization of a silkworm ABC transporter gene homologous to Drosophila white*. Mol. Genet. Genomics 264,11–19.
- Agrawal Neema, Dasaradhi P. V. N., Mohmmed Asif, Malhotra Pawan, Bhatnagar Raj K., and Mukherjee Sunil K. (2203). *RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 657-685, Vol. 67, No. 4
- Ahringer Julie (1992). *Reverse Genetics Worm book (the online book of C.elegans biology)* The Gurdon Institute, University of Cambridge, Cambridge, CB21QN,UK
- Araujo R.N., Santos A., Pinto F.S., Gontijo N.F., Lehane M.J. and Pereira M.H. (2006) *RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug Rhodnius prolixus (Hemiptera : Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection*. Insect Biochem Mol Biol 36: 683–693.
- Bernstein E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. 2001. *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature 409: 363-366
- Billy E., Brondani V., Zhang H., Muller U. and Filipowicz W. (2001) PNAS. USA, 98, 14428 14433
- Bischoff V., Vignal C., Duvic B., Boneca I.G., Hoffmann J.A. and Royet J., (2006). *Down regulation of the Drosophila immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2*. PLoS Pathogens 2 (2006). pp. 139–147.
- Daneholt, Bertil. "Advanced Information: RNA interference
- Dzitoyeva S., Dimitrijevic N. and Manev H. (2001). *Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult Drosophila triggers RNA interference in the central nervous system*. Molecular Psychiatry (2001) 6, 665–670.
- Ecker J.R., Davis R.W. (1986). *Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA*. PNAS USA 83 (15): 5372–5376.

- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschl T. (2001) *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* Nature, 411, 494-498
- Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C.C. (1998). *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.* Nature 391 (6669): 806–11.
- Fujita K., Shimomura K., Yamamoto K., Yamashita T. and Suzuki K., (2006). *A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle.* Biochemical and Biophysical Research Communications 345 pp. 502–507.
- Gilbert C.,(1994). *Form and function of stemmata in larvae of holometabolous insects.* Annu. Rev. Entomol. 39,323–349.
- Grishok A., Tabara H., and Mello C. (2000). *Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*.* Science. 287, 2494–2497.
- Grishok A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing.* Cell 106: 23-34.
- Gunnar Broehan, 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 Biochem Mol Biol. 40(3):274-83.
- Guo S., Kemphues K. (1995). *par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed.* Cell 81 (4): 611–20.
- Hannon G.J. (2002). *RNA interference.* Nature, 418, 244-251
- Hannon G. J., ed (2003) *RNAi: A Guide to Gene Silencing.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- Henderson Ian R., Zhang Xiaoyu, Lu Cheng , Johnson Lianna, Meyers Blake C., Green Pamela J. and Jacobsen Steven E.(2006). *Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning.* Nature Genetics 38, 721 - 725
- Hutvagner G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.* Science 293: 834-838.
- Jaronczyk Katarzyna , Carmichael Jon B., Hobman Tom C.(2005). *Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others?* Biochem. J. 387 (561–571).
- Ketting R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. 2001. *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans.* Genes & Dev. 15: 2654-2659
- Knight S.W. and Bass, B.L. 2001. *A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans.* Science 293: 2269-2271.
- Konopova B. and Jindra M. (2008). *Broad-complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive Holometabolan metamorphosis.* Development 135, pp. 559–568.
- Kuwayama H., Yaginuma T., Yamashita O. and Niimi T. † (2006) *Germ-line transformation and RNAi of the ladybird beetle, Harmonia axyridis.* Insect Molecular Biology 15(4), 507–512.
- Lehane, M.J., Gibson, W. and Lehane, S.M. (2008). *Differential expression of fat body genes in Glossina morsitans morsitans following infection with Trypanosoma brucei brucei.* Int J Parasitol 38: 93–101.
- Lohmann J.U., Endl I., Bosch T.C. (1999) *Silencing of developmental genes in hydra.* Dev. Biol. 214:211–214.
- Maine E. M. (2000). *A conserved mechanism for post-transcriptional gene silencing?* Genome Biol. 1 REVIEWS 1018.

Masumoto Mika, Yaginuma Toshinobu and Niimi Teruyuki (2009). *Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, Bombyx mori, using RNAi*. Development Genes and Evolution Volume 219, Numbers 9-10, 437-444

Megumi Sumitania, Daisuke S. Yamamotoa, Jae Min Leeb, Masatsugu Hatakeyama (2005) *Isolation of white gene orthologue of the sawfly, Athalia rosae (Hymenoptera) and its functional analysis using RNA interference*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35 231–240.

Meister G. & Tuschl T. (2004), *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature, Vol. 431, 343-349

Misquitta L., Paterson B.M.(1999) *Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation*. PNAS 1451–1456.

Napoli C., Lemieux C. and Jorgensen R. (1990). *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell 2 (4): 279–289.

Ngo H., Tschudi C., Gull K. and Ullu E. (1998) *Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei*. PNAS. 95:14687–14692.

Nunes F.M. and Simões Z.L. (2009). *A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions*. Insect Biochem Mol Biol. ;39(2):157-60.

O'Hare K., Levis R. and Rubin G.M. (1983). *Transcription of the white locus in Drosophila melanogaster*. PNAS USA 806917–6921.

O'Hare K., Murphy C., Levis R. and Rubin G.M.(1984). *DNA sequence of the white locus of Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. 180,437–455.

Ohkumo T, Masutani C, Eki T, Hanaoka F. (2008). *Use of RNAi in C. elegans*. Methods Mol Biol. 442:129-37.

- Ohnishi A., Hull J.J. and Matsumoto S. (2006). *Targeted disruption of genes in the Bombyx mori sex pheromone biosynthetic pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences (United States of America) **103** pp. 4398–4403.
- Paddison Patrick J., Caudy Amy A., Bernstein Emily, Hannon Gregory J., and Conklin Douglas S. (2002). *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes Dev. 16(8): 948–958.
- Paddison P.J., Caudy A.A. and Hannon G.J. (2002). *Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells* Proc. Natl Acad. Sci. USA, 99, 1443–1448
- Parthasarathy R. and Palli S.R.(2009). *Molecular analysis of juvenile hormone analogaction in controlling the metamorphosis of the red flour beetle, Tribolium castaneum*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 70, pp. 57–70.
- Quan G.X., Kanda T. and Tamura T. (2002). *Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene*. Insect Molecular Biology 11, pp. 217–222.
- Rajagopal R., Sivakumar S., Agrawal N., Malhotra P. and Bhatnagar R.K. (2002). *Silencing of midgut aminopeptidase N of Spodoptera litura by double-stranded RNA establishes its role as Bacillus thuringiensis toxin receptor*. J Biol Chem. 277: 46849–46851.
- Roignant J.Y., Carre C. and Mugat B. (2003). *Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila*. RNA 9: 3299–308.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *in Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 .
- Sánchez-Alvarado A. and Newmark P.A. (1999). *Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration*. PNAS. 96:5049–5054.
- Schlüns H. and Crozier R. H. (2007). *Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, Apis mellifera, shown by RNA interference*. Insect Molecular Biology 16(6), 753–759.

Sherry C. Miller, Susan J. Brown and Yoshinori Tomoyasu (2008) *Larval RNAi in Drosophila* ? Development Genes and Evolution Volume 218, Number 9, 505-510.

Soares C.A.G., Lima C.M.R., Dolan M.C., Piesman J., Beard C.B. and Zeidner N.S. (2005). *Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal Ixodes scapularis ticks.* Insect Mol Biol 14: 443–452.

Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., and Joshua-Tor L.(2004). *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity.* Science 305: 1434-1437.

Tabara Hiroaki, Grishok Alla, and Mello Craig C.(1998). *REVERSE GENETICS: RNAi in C. elegans: Soaking in the Genome Sequence.* Science Vol. 282. no. 5388, pp. 430 - 431

Tijsterman M., Ketting R. F., and Plasterk R. H. (2002). *The genetics of RNA silencing.* Annu. Rev. Genet. 36, 489–519.

Timmons Lisa and Fire Andrew (1998). *Specific interference by ingested dsRNA.* NATURE VOL 395

Tomoyasu Y. and Denell R.E. (2004). *Larval RNAi in Tribolium (Coleoptera) for analyzing adult development.* Development Genes and Evolution 214: 575-578.

Turner C. T.†, Davy M. W., MacDiarmid R. M., Plummer K. M.†, K. M. Birch K. M.† and Newcomb R. D.(2006). *RNA interference in the light brown apple moth, Epiphyas postvittana (Walker) induced by double-stranded RNA feeding.* Insect Molecular Biology 15 (3), 383–391.

Van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N., Stuitje A.R. (1990). *Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression.* Plant Cell.2(4):291-9.

Walshe D. P., Lehane S. M., Lehane M. J. and Haines L. R. (2009) *Prolonged gene knockdown in the tsetse fly Glossina by feeding double stranded RNA.* Insect Molecular Biology 18 (1), 11–19

Wargelius A., Ellingsen S. and Fjose A. (1999) *Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 263:156–161.

Waterhouse P.M., Graham M.W. and Wang M.B. (1998) *Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA*. PNAS 95:13959–13964.

Winston W. M., Molodowitch C., and Hunter C. P. (2002). *Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1*. Science 295, 2456–2459