



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας - Ε.Μ.Μ.Α.

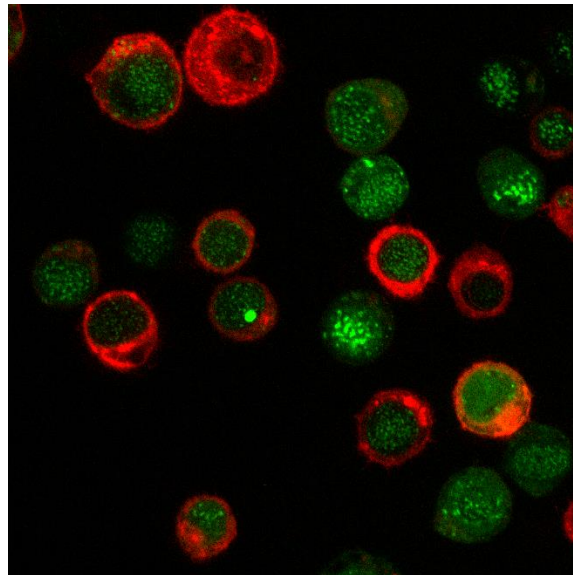


Σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών

«Δημόκριτος»

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Διερεύνηση του υποκυτταρικού εντοπισμού ιικών πρωτεϊνών και dsRNA
που παράγονται κατόπιν μόλυνσης
με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς**



Ονοματεπώνυμο Φοιτητή (ΑΜ)

Ιζαμπέλα Πρίφτι (62117042)

Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα

Δρ. Άννα Κολλιοπούλου

ΑΙΓΑΛΕΩ, 2021



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

School of Health and Care Sciences

Department of Biomedical Sciences



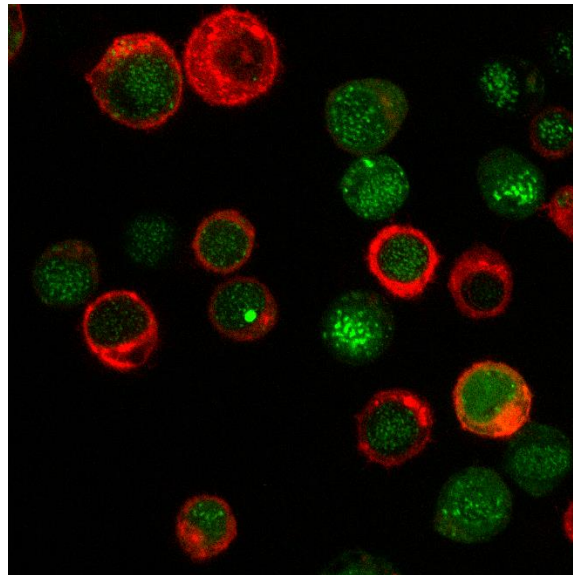
Laboratory of Molecular Microbiology & Immunology - L.M.M.I

In collaboration with National Centre for Scientific Research

“Demokritos”

GRADUATE THESIS

**Study on the subcellular localization of viral proteins and dsRNA
produced after infection with recombinant baculoviruses**



Name of Student (CN)

Izabela Prifti (62117042)

Name of the Supervisor

Dr. Anna Kolliopoulou

AIGALEO, 2021

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

<p>Άννα Κολλιοπούλου</p>	<p>Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών.</p>
<p>Απόστολος Μπελούκας</p>	<p>Επίκουρος Καθηγητής και Διευθυντής του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών.</p>
<p>Όλγα Παππά</p>	<p>Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών.</p>

The graduate thesis was successfully examined by the following examination committee:

Anna Kolliopoulou	Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences
Apostolos Beloukas	Assistant Professor and Director of the Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology, Department of Biomedical Sciences.
Olga Pappa	Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences.

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Πρίφτι Ιζαμπέλα του Πελλούμπ, με αριθμό μητρώου 62117042 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη της Ακαδημαϊκής Υποτρόφου, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Δρ. Άννας Κολλιοπούλου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Άννα Κολλιοπούλου για την εισήγηση του θέματος της διπλωματικής εργασίας, για τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες που έλαβα κατά την διάρκεια της φοίτησης μου και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη παρούσα ερευνητική εργασία σε συνεργασία μαζί της στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

Ευχαριστώ θερμά τον Διευθυντή Ερευνών Δρ. Luc Swevers του εργαστηρίου Μοριακής Γενετικής Εντόμων και Βιοτεχνολογίας, που με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα και συνέβαλε καθοριστικά στην εκπόνηση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη, και το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου και συγκεκριμένα την κα. Στεφάνου Δήμητρα, την κα. Χριστοπούλου Βασιλική-Μαρία, την Δρ. Κυθραιώτη Γεωργία, τον Δρ. Κοντογιαννάτο Δημήτριο και την Ερευνήτρια Α', Δρ. Λαμπροπούλου Βασιλική για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ευχαριστώ επίσης και τον Δρ. Αθανασόπουλο Αλέξανδρο για την βοήθεια και καθοδήγηση στη χρήση του συνεστιακού σαρωτικού μικροσκοπίου laser.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα αξιότιμα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής τον Δρ. Μπελούκα Απόστολο και την Δρ. Παππά Όλγα, που μου έκαναν την τιμή να συμμετέχουν στην κρίση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ακόμη οφείλω στους ανθρώπους που βρίσκονται κοντά μου και με στηρίζουν καθημερινά και ιδιαίτερα στην οικογένεια μου για την δύναμη και την αγάπη που μου προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια.

Συντομογραφίες

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

APS: ammonium persulfate, υπερθειϊκό αμμώνιο

ATP: adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη

BEVS: baculovirus expression vector system, σύστημα φορέα έκφρασης μπακουλοϊού

BmNPV: *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus, πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *B. mori*

BSA: bovine serum albumine, αλβουμίνη ορού βοός

BV: budded virus, εκβλαστημένος ιός

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

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

ddH₂O: double distilled H₂O, διπλά απεσταγμένο H₂O

DNA: deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

dNTPs: deoxynucleoside triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια

dsLuc: φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης

dsRNA: double-stranded RNA,

DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη

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

EtBr: ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο

FBS: fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός

FHV: Flock House Virus, ιός Flock House

GFP: green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

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

HP: hairpin, φουρκέτα

HRP: horseradish peroxidase, υπεροξειδάση χρένου (ραπανακιού)

ie1: immediate early gene 1, άμεσο πρώιμο γονίδιο

kb: kilobase, χιλιάδα βάσεων

kbp: kilobase pair, χιλιάδα ζευγών βάσεων

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

LEF-5: Late expression factor-5, όψιμος

MCS: multiple cloning site, θέση πολλαπλής κλωνοποίησης

miRNA: microRNA, μικρό μη-κωδικοποιό RNA

mRNA: messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

nt: nucleotides, νουκλεοτίδια ORF: open reading frame, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης

OB: Occlusion bodies, έγκλειστα σωμάτια

ODV: occlusion-derived virion, έγκλειστοι ιοί

OpMNPV: *Orgyia pseudotsugata* multicapsid polyhedrosis virus, πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *O. pseudotsugata*

PBS: phosphate buffer saline, φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα

PCI: phenol/chloroform/ isoamyl alcohol, φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη

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

pfu: plaque forming unit, μονάδα σχηματισμού πλάκας

piRNA: PIWI-interacting RNA, PIWI-αλληλεπιδρών RNA

pre-miRNA: precursor miRNA, πρόδρομο miRNA

pri-miRNA: primary miRNA, πρωτογενές miRNA

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

RNA: ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ

RNAi: RNA interference, RNA παρεμβολή

RNase: ribonuclease, ριβονουκλεάση

rpm: rounds per minute, στροφές ανά λεπτό

Sf21: κυτταρική σειρά από το λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda*

siRNA: short interfering RNA, μικρό παρεμβαλλόμενο RNA

T4 PNK: T4 polynucleotide kinase, T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση

TAE: tris/acetate/EDTA, tris/οξικό οξύ/EDTA

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

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

UV: ultra-violet, υπεριώδης

VLF-1: very late factor-1, πολύ όψιμος παράγοντας-1

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

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Εισαγωγή	10
1.1 Ο μηχανισμός της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi)	10
1.1.1 Αλληλεπίδραση του μονοπατιού siRNA και του ιικού γονιδιώματος	12
1.1.2 Ιικοί καταστολείς του siRNA μονοπατιού	13
1.2 Ο ιός Flock House (Flock House Virus, FHV)	13
1.2.1 Η πρωτεΐνη B2 ως καταστολέας του RNAi	14
1.3 Οι μπακουλοϊοί (Baculoviruses)	16
1.3.1 Γενικά	16
1.3.2 Ο κύκλος αναπαραγωγής των Μπακουλοϊών: επιδράσεις στα κύτταρα και τα έντομα	18
1.3.3 Μολύνσεις κυτταρικών σειρών λεπιδοπτέρων εντόμων με τον μπακουλοϊό AcMNPV	21
1.3.4 Δομικές πρωτεΐνες έγκλειστων και εκβλαστανόντων ιικών σωματίων.....	22
1.3.4.1 GP64 (Ac128).....	22
1.3.4.2 ODV-E25 (Ac94).....	23
1.3.4.3 VLF-1 (Ac77).....	24
1.3.4.4 VP39 (Ac89).....	25
1.3.4.5 IE1 (Ac147).....	25
1.3.4.6 LEF-5 (Ac99)	26
1.3.4.7 Ac93.....	27
1.4 Το σύστημα BEVS.....	27
Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Υλικά & Μέθοδοι	30
2.1 ΥΛΙΚΑ	30
2.1.1 Βιολογικό Υλικό	30
2.1.1.1 Κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων	30
2.1.1.3 Bacmid	31
2.1.2 Διαλύματα και Θρεπτικά Υλικά	31
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	35

2.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	35
2.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	35
2.2.3 Απομόνωση και καθαρισμός τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης (Gel extraction).....	37
2.2.4 Φωτομετρική εκτίμηση της ποιότητας, συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων	38
2.2.5 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με χρήση διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης.....	39
2.2.6 Κλωνοποίηση DNA.....	40
2.2.6.1 Γενική διαδικασία κλωνοποίησης	40
2.2.6.1.1 Δημιουργία φορέα γραμμικής μορφής (linearization) - Αποφωσφορυλίωση	41
2.2.6.1.2 Φωσφορυλίωση ενθέματος μέσω χρήσης φωσφορυλιωμένων εκκινητών	41
2.2.6.1.3 Αντίδραση σύνδεσης (Ligation).....	42
2.2.6.1.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	42
2.2.6.1.5 Επιλογή αποικιών και υγρή καλλιέργεια	43
2.2.6.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini Prep)	43
2.2.6.1.7 Πολλαπλασιασμός του κλώνου και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi prep)	44
2.2.6.1.8 Αλληλούχιση πλασμιδιακού DNA	46
2.2.6.2 Κλωνοποιήσεις ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης τον πλασμιδιακό φορέα pEA	46
2.2.7 Υπολογισμός κυτταρικού πληθυσμού.....	47
2.2.8 Υπολογισμός ιικού τίτλου και μέσης λοιμογόνου δόσης (TCID50)	48
2.2.9 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων.....	49
2.2.10 Συλλογή και απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων	50
2.2.11 Συμπύκνωση υπερκειμένου κυτταροκαλλιέργειών	51
2.2.12 Αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση Western.....	52
2.2.13 Ανίχνευση dsRNA με ανοσοαποτύπωμα κηλίδας (Dot Blot)	56
2.2.14 Προετοιμασία δειγμάτων για συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Αποτελέσματα.....	59
3.1 Κλωνοποιήσεις	59
3.1.1 Κατασκευή του φορέα pEA-gr64-RFP-Myc.His	59
3.1.2 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP	64
3.2 Τίτλοδοτηση ανασυνδυασμένων ιών	69

3.3 Μελέτη της έκφρασης ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών που παράγονται κατόπιν μόλυνσης με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων	70
3.3.1 Έλεγχος έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	70
3.3.2 Έλεγχος των επιπέδων του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP.....	78
3.3.2.1 Έλεγχος σε πρωτεϊνικό επίπεδο.....	78
3.3.2.2 Έλεγχος σε επίπεδο γονιδιώματος.....	80
3.3.2.3 Ανίχνευση ολικού dsRNA στο διαλυτό και μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα	83
3.3.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συζήτηση	88
4.1 Γενικά	88
4.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών και μορίων dsRNA.....	89
4.3 Μελέτη της ιικής μόλυνσης σε επίπεδο πρωτεΐνης, γονιδιώματος και παραγόμενου dsRNA ...	92
4.4 Μελλοντικές προοπτικές	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Συμπεράσματα.....	95
Περίληψη	97
Abstract.....	98
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	99
Παράρτημα.....	109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Εισαγωγή

1.1 Ο μηχανισμός της RNA παρεμβολής (RNA interference, RNAi)

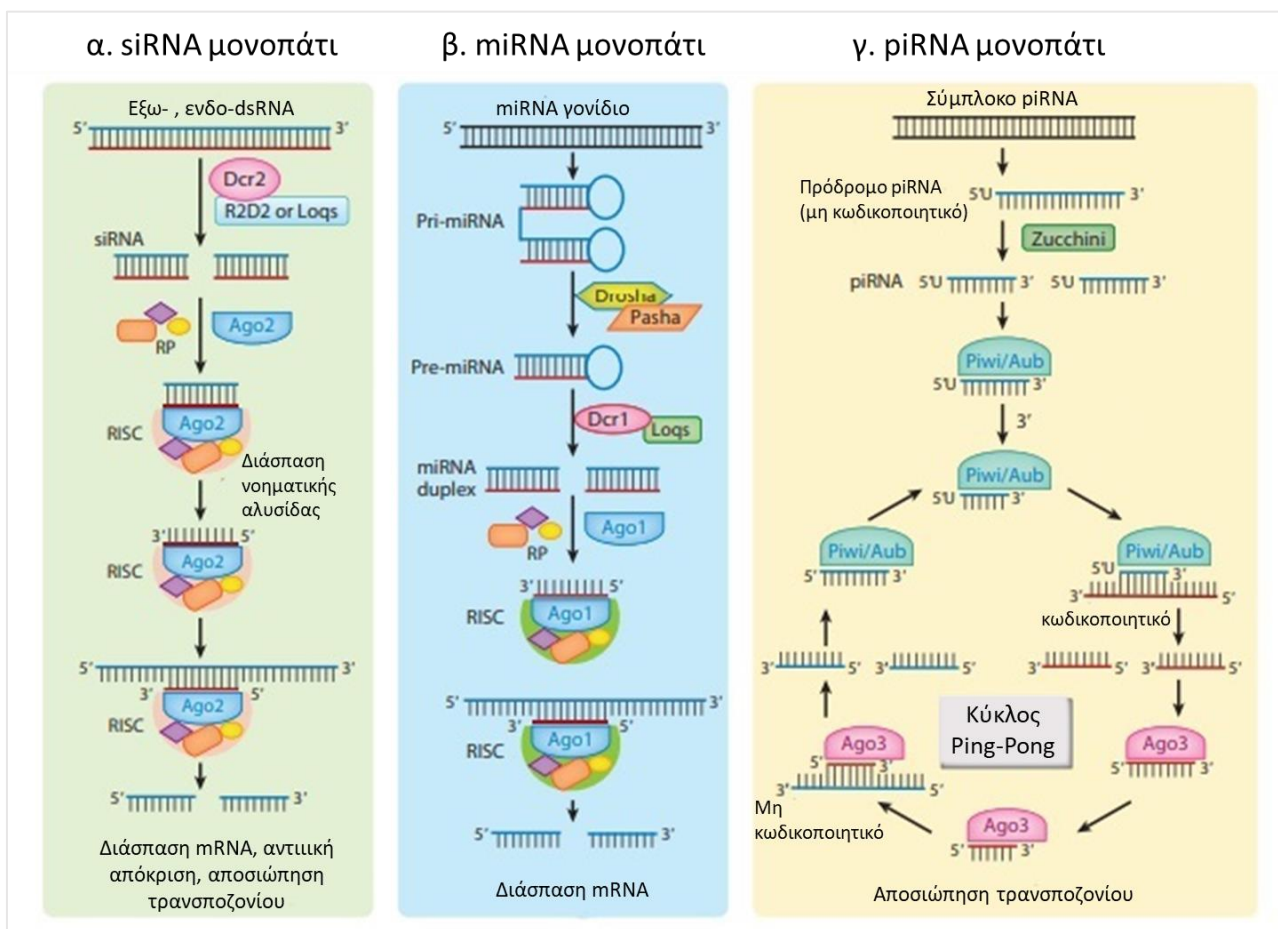
Η RNA παρεμβολή (RNA interference, RNAi) πρόκειται για έναν μετα-μεταγραφικό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και αναφέρεται σε μια κατηγορία εξαιρετικά διατηρημένων κυτταρικών μονοπατιών στα οποία οι πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute (Ago) δεσμεύουν μικρά RNA για να προκαλέσουν την αποικοδόμηση των μακρύτερων RNAs (RNA-στόχοι) μέσω της συμπληρωματικότητας μεταξύ των αλληλουχιών των μικρών RNA και των RNA-στόχων (1).

Στα έντομα καθώς και σε άλλα ζώα είναι γνωστό ότι τρεις διαφορετικές κατηγορίες μικρών μορίων RNAs πυροδοτούν τρία αντίστοιχα μονοπάτια RNAi (2). Το siRNA μονοπάτι (short interfering RNA), το miRNA μονοπάτι (microRNA) και το piRNA μονοπάτι (PIWI-interacting RNA) (**Εικόνα 1**).

Τα siRNA είναι δίκλινα μόρια RNA (double-stranded RNAs, dsRNAs), τυπικά 19-21 νουκλεοτίδια σε μήκος, τα οποία προέρχονται από μακριά μόρια dsRNA που υποβάλλονται σε επεξεργασία και έχουν είτε εξωγενή είτε ενδογενή προέλευση (**Εικόνα 1α**). Τα εξωγενή dsRNA περιλαμβάνουν ιικά RNA και πειραματικά εισαγόμενα dsRNA, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των ενδογενών dsRNA προέρχεται από επαναλαμβανόμενα ή μεταθετά στοιχεία (π.χ. RNA τρανσποζόνια), δομημένους γενετικούς τόπους (structured loci) και αλληλεπικαλυπτόμενα μετάγραφα (3-6). Κατά συνέπεια, τα siRNAs μπορούν να χωριστούν σε εξωγενή και ενδογενή siRNA (7), ενώ το μονοπάτι siRNA περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια (βλ § 1.1.1).

Τα miRNA κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα ως πρωτογενή μετάγραφα miRNA (pri-miRNA) τα οποία μεταγράφονται από την πολυμεράση RNA II και αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μη κωδικοποιητικών RNA (8). Η λειτουργική μορφή των miRNA έχει μήκος 21-24 νουκλεοτίδια (nt) (7) (**Εικόνα 1β**). Τα pri-miRNA έχουν δευτεροταγή δομή σε σχήμα φουρκέτας, διασπώνται από μία άλλη πρωτεΐνη, την Drosha, σε φουρκέτες μήκους περίπου 60 nt, γνωστές ως πρόδρομα miRNA (pre-miRNA) (9), τα οποία στην συνέχεια εξάγονται στο

κυτταρόπλασμα και υφίστανται επεξεργασία από μια ριβονουκλεάση τύπου III Dicer (Dcr1) για να σχηματιστεί ένα μόριο miRNA που αυτοϋβριδίζει (miRNA duplex) (10, 11). Στη συνέχεια, ένα σκέλος του δίκλωνου miRNA φορτώνεται στην Argonaute-1 (Ago1) πάνω στο σύμπλοκο αποσιώπησης και ακολουθεί η διάσπαση του mRNA (12).



Εικόνα 1. Τα μονοπάτια της RNA παρεμβολής (RNAi) στα έντομα. [Προσαρμογή από (13)]

Τα piRNA αποτελούν μια τρίτη τάξη ρυθμιστικών μορίων RNA τα οποία προκύπτουν από μακριά, μονόκλιωνα RNA χωρίς να απαιτείται η δράση της Dicer σε αντίθεση με τα siRNA και τα miRNA. Τα piRNA έχουν μήκος περίπου 23-36 nt. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον δύο μηχανισμοί για τη βιογένεση των piRNA σε κύτταρα-τροφούς (nurse cells) του εντόμου *Drosophila melanogaster*, οι οποίοι περιλαμβάνουν το μονοπάτι *de novo* και τον κύκλο Ping-Pong (14). Στο *de novo* μονοπάτι της φρουτόμυγας *D. melanogaster*, τα piRNA προκύπτουν

από τη μεταγραφή συστάδων piRNA (piRNA clusters) τα οποία εξάγονται στο κυτταρόπλασμα και κατακερματίζονται από την ενδονουκλεάση Zucchini (Zuc) σε πρόδρομα piRNA (15) και προσδένονται στις πρωτεΐνες Piwi ή Aubergine (Aub) (16). Το σύμπλεγμα Piwi/Aub προκαλεί αποκοπή των μεταγράφων των συμπληρωματικών τους τρανσποζονίων, και πυροδοτεί την έναρξη του κύκλου Ping-Pong από τον οποίο θα προκύψουν νέα κωδικοποιητικά (sense) piRNA. Μια διαφορετική πρωτεΐνη της οικογένειας Piwi, η Argonaute3 (Ago3), χρησιμοποιεί τα νέα κωδικοποιητικά piRNA προκειμένου αυτά να εντοπίσουν και να αποκόψουν συμπληρωματικά τρανσποζόνια, δημιουργώντας νέα δευτερογενή Aub-piRNAs τα οποία θα φορτωθούν στο σύμπλοκο Piwi/Aub και θα διασπάσουν επιπλέον συμπληρωματικά τρανσποζόνια (16) (**Εικόνα 1γ**).

1.1.1 Αλληλεπίδραση του μονοπατιού siRNA και του ιικού γονιδιώματος

Το RNAi κατευθυνόμενο από siRNAs είναι ένας ισχυρός αντιικός μηχανισμός κατά των RNA και DNA ιών, σε μια ευρεία ποικιλία ευκαρυωτικών οργανισμών, μεταξύ των οποίων ανήκουν και τα έντομα. Το μονοπάτι ξεκινά με την αναγνώριση του dsRNA εξωγενούς (ή ενδογενούς) προέλευσης στο κυτταρόπλασμα από το ένζυμο τύπου RNase-III, Dicer-2 (Dcr2) (17). Το dsRNA στη συνέχεια διασπάται από τη Dcr2 σε πολλαπλά μόρια siRNA μήκους 21 νουκλεοτιδίων (nt) που περιέχουν 19 bp του μη μεταγραφόμενου ενδιάμεσου τμήματος (Non-transcribed Spacer, NTS) ενώ διαθέτουν 3' μονόκλινα προεξέχοντα άκρα μήκους 2-3 nt (18). Η μία αλυσίδα (κλώνος) του δίκλωνου siRNA, γνωστή ως RNA «οδηγός», ενσωματώνεται στο RNA-επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC), ενώ ο «μη οδηγός» κλώνος απομακρύνεται (18, 19). Η Argonaute-2 (Ago2) είναι το καταλυτικό κέντρο του RISC. Η Ago2 δεσμεύει σταθερά τον «οδηγό» κλώνο μέσα στο σύμπλοκο πρωτεϊνών μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των 3' και 5' άκρων του «οδηγού» κλώνου και των περιοχών PAZ και MID της Ago2, αντίστοιχα (20). Τα siRNA που συνδέονται με την Ago2 καθοδηγούν το RISC σε συμπληρωματικά RNA στο κυτταρόπλασμα. Μετά την αναγνώριση του στόχου, η Ago2 καταλύει τη διάσπαση των RNA-στόχων μεταξύ του μη μεταγραφόμενου ενδιάμεσου τμήματος 10 και 11 όπως υπολογίζεται από το 5' άκρο του οδηγού siRNA (21). Τα μόρια mRNA που διασπώνται από την Ago2 αποικοδομούνται ταχέως μέσω της εξωριβονουκλεάσης XRN1

και του εξωσώματος (22). Η αντιική φύση του μονοπατιού siRNA αποδεικνύεται από μελέτες στις οποίες απαλοιφή του γονιδίου της Dcr2 ή της Ago2 οδήγησαν στην ενισχυμένη αντιγραφή του ιού και την αυξημένη θνησιμότητα των ξενιστών (23, 24).

1.1.2 Ιικοί καταστολείς του siRNA μονοπατιού

Τόσο οι RNA όσο και οι DNA ιοί κωδικοποιούν ιικούς καταστολείς του RNAi (viral suppressors of RNAi, VSRs) για να αντιμετωπίσουν την αρνητική επίδραση της οδού siRNA στην αναπαραγωγή του ιού. Οι VSRs, που προέρχονται από διαφορετικές οικογένειες ιών, δε φέρουν ομοιότητα ως προς την αλληλουχία ή τη δομή τους, υποδεικνύοντας την ανεξάρτητη εξέλιξη διαφορετικών μηχανισμών για την αντιμετώπιση του μονοπατιού siRNA.

Οι VSRs ενεργούν μέσω τεσσάρων βασικών μηχανισμών: (1) δεσμεύονται σε μακριά dsRNA (long-dsRNA) για να αποτρέψουν τον κατακερματισμό από τη Dcr2, (2) δεσμεύονται στα siRNA για να εμποδίσουν την ενσωμάτωση των siRNAs στο RISC, (γ) παρεμβάλλονται στη λειτουργία της Dcr2 ή της Ago2, και (δ) συμμετέχουν στην υποβάθμιση των siRNA. Ορισμένοι VSR συνδυάζουν πολλαπλούς τρόπους δράσης. Παραδείγματα από πολύ καλά μελετημένους καταστολείς του RNAi σε RNA ιούς περιλαμβάνουν τον CrPV (Cricket paralysis virus) 1A και τον DCV (*Drosophila C virus*) 1A των ιών που μολύνουν τη *D. melanogaster* (23). Ο CrPV 1A εμποδίζει το σύμπλοκο Ago2-RISC να στοχεύει το RNA, ενώ ο DCV 1A συνδέεται με το dsRNA, εμποδίζοντας τον κατακερματισμό του από τη Dcr2. Ένας ακόμη ισχυρός ιικός καταστολέας του siRNA μονοπατιού είναι η πρωτεΐνη B2 του ιού Flock House (βλ. §1.2.1). Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες VP1 του ιού Nora και οι πρωτεΐνες VP1 που μοιάζουν με εκείνες του ιού Nora λειτουργούν ως VSRs αλληλεπιδρώντας με την Ago2 και εμποδίζοντας τη διάσπαση των στοχευμένων αλληλουχιών (25). Όσον αφορά τους DNA ιούς, ένα παράδειγμα αποτελεί ο αναστολέας της απόπτωσης, P35, που προέρχεται από τον μπακουλοϊό *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) ο οποίος δρα έναντι της αντιικής απόκρισης (26).

1.2 Ο ιός Flock House (Flock House Virus, FHV)

Ο ιός Flock House (Flock House Virus, FHV) είναι ένας εισοσσαεδρικός ιός χωρίς φάκελο και ανήκει στην οικογένεια των *Nodaviridae*, τα μέλη της οποίας διαθέτουν διμερή (bipartite)

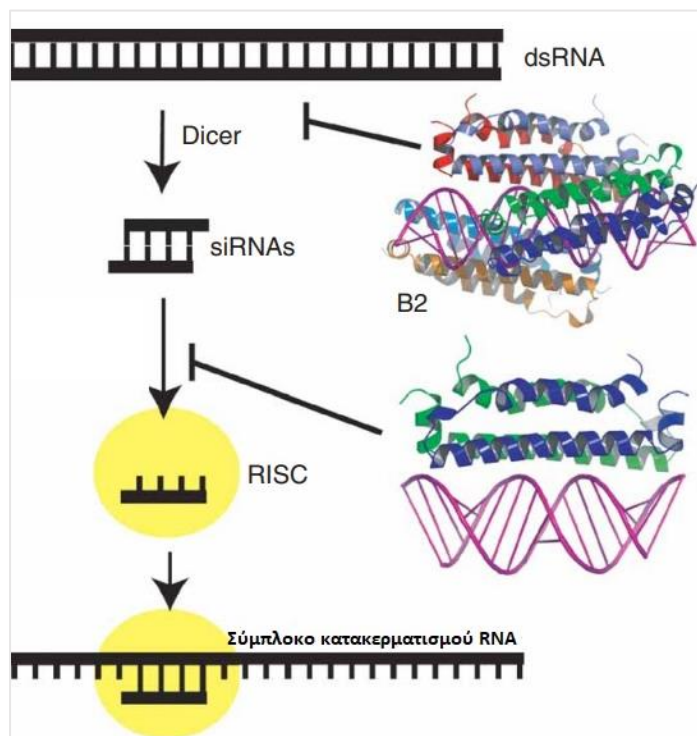
RNA γονιδιώματα θετικής πολικότητας. Το διμερές γονιδίωμα ιού FHV αποτελείται από το RNA1 (3.1 kb) και RNA2 (1.4 kb), τα οποία είναι πακεταρισμένα μέσα σε ένα μόνο ιικό σωματίο (27, 28). Το RNA1 περιέχει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για τη σύνθεση της πρωτεΐνης A (112 kD), όπου δρα ως μια RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA polymerase) για την ενίσχυση και των δύο γονιδιωματικών κλώνων, καθώς και ένα υπογονιδιακό RNA (RNA3) 387 νουκλεοτιδίων (29, 30). Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, το RNA3 δημιουργείται από το RNA1 που παράγει την πρωτεΐνη B2 η οποία δρα ως καταστολέας του RNAi (31, 32).

Ο FHV έχει μελετηθεί συστηματικά ως σύστημα πρότυπης μόλυνσης μικρών RNA θετικής (+) πολικότητας αναφορικά με τη δομή και τη συναρμολόγηση του ιού, για την είσοδο ιών χωρίς φάκελο στα κύτταρα, για την αντιγραφή γονιδιώματος RNA, για το πακετάρισμα δύο τμημάτων γονιδιώματος, καθώς και για την αντιική έμφυτη ανοσοαπόκριση σε ασπόνδυλους ξενιστές (33, 34). Σε κύτταρα του εντόμου *D. melanogaster*, η αντιγραφή του FHV συμβαίνει σε "σφαιρίδια" ή μεμβρανώδη κυστίδια διαμέτρου 50 nm που σχηματίζονται από εγκοπλώματα των εξωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών (35). Εντός των σφαιριδίων αυτών, τα μόρια με δομή dsRNA προστατεύονται από την αναγνώρισή τους από το μηχανισμό RNAi, ενώ επιπλέον προστασία στο σημείο της αντιγραφής καθώς και στο κυτταρόπλασμα παρέχεται από την πρωτεΐνη B2 (36, 37).

1.2.1 Η πρωτεΐνη B2 ως καταστολέας του RNAi

Η αποσιώπηση του RNA είναι μια συντηρημένη ρυθμιστική οδός για το RNA, η οποία λειτουργεί ως αντιικός αμυντικός μηχανισμός στα έντομα, δηλαδή στον φυσικό ξενιστή του FHV (38). Μετά τη μόλυνση, το γονιδίωμα του FHV και τα ενδιάμεσα αντίγραφα του μπορούν να υποστούν επεξεργασία από το ένζυμο τύπου RNase III, Dicer2, σε μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα οποία έχουν μήκος 19-21 ζεύγη βάσεων (bp) και διαθέτουν 5'-φωσφορικά και 3' μονόκλινα προεξέχοντα άκρα μήκους 2-3 nt. Τα siRNA που προέρχονται από τον FHV χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για να καθοδηγήσουν το σύμπλοκο RISC, με τελικό στόχο τον κατακερματισμό του ιικού γονιδιώματος.

Ως μηχανισμό αντεπίθεσης, ο FHV κωδικοποιεί την πρωτεΐνη B2, μια ισχυρή κατασταλτική πρωτεΐνη της αποσιώπησης μέσω RNA (38). Η B2 είναι μια πρωτεΐνη 106 αμινοξικών κατάλοιπων που συντίθεται σε υψηλά επίπεδα νωρίς κατά τον κύκλο αντιγραφής του ιού (31). Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η B2 συνδέεται ισχυρά ($K_d \sim 1$ nM) με μεγάλα και μικρά μόρια dsRNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους. Η σύνδεση με τα RNA, δεν είναι επιλεκτική για τα siRNAs, καθώς μεταβολές του μήκους και των άκρων (5'-φωσφορικά και 3' μονόκλιωνα προεξέχοντα άκρα μήκους 2-3 nt) δεν διέκοψαν τη σύνδεση της B2 με τα dsRNA, επομένως δρα ανεξάρτητα από το μήκος τους. (31, 39). Η B2 δεσμεύει το dsRNA ως διμερές που σχηματίζεται με αντιπαράλληλη σύνδεση δύο μονομερών. Κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις άλφα έλικες, δύο από τις οποίες σχηματίζουν ένα μοτίβο «έλικα-στροφή-έλικα», ενώ η τρίτη, η πιο κοντή έλικα είναι κάθετη στις άλλες δύο. Μαζί, οι δύο υπομονάδες σχηματίζουν μια δέσμη τεσσάρων ελίκων που αναγνωρίζει την ξεχωριστή γεωμετρία του dsRNA τύπου A. Συγκεκριμένα, η B2 αναγνωρίζει δύο διαδοχικές δευτερεύουσες αυλακώσεις και την ενδιάμεση μεγάλη αύλακα στη μία πλευρά του dsRNA.



Εικόνα 2. Μηχανισμός καταστολής της RNA παρεμβολής μέσω της πρωτεΐνης B2 του ιού Flock House. [Προσαρμογή από (31)].

Η αλληλεπίδραση της B2 στη μία όψη του δίκλωνου RNA υποδηλώνει ότι πολλαπλά αντίγραφα μπορεί να συνδέονται με μεγαλύτερα dsRNA. Για παράδειγμα, τρία διμερή B2 μπορούν να διαμορφωθούν πάνω σε ένα RNA μήκους 24 bp (31) και αυτό έχει φανεί από πειράματα στοιχειομετρίας δέσμησης, υπερφυγοκέντρωσης και διασταύρωσης που δείχνουν ότι πολλά διμερή B2 συνδέονται με dsRNA συνολικού μήκους 35 bp. Υποστηρικτικά στοιχεία για αυτή την πρόταση προέρχονται επίσης και από την παρατήρηση ότι η B2 αναστέλλει *in vitro* τον κατακερματισμό των μεγάλου μήκους dsRNAs από τη Dicer (31).

Συνοπτικά, δομικά και βιοχημικά δεδομένα οδήγησαν στην πρόταση ενός μηχανισμού σύμφωνα με τον οποίο η B2 αναστέλλει το μηχανισμό του RNAi σε δύο διακριτά βήματα. Πρώτον, με αποτελεσματική επικάλυψη των dsRNA από πολλά μόρια B2 με στόχο την εμπόδιση του κατακερματισμού από τη Dicer και την αναστολή του σχηματισμού των siRNA. Δεύτερον, εξαιτίας της ικανότητάς της να συνδέεται ισχυρά με τα siRNAs, η B2 εμποδίζει την ενσωμάτωση των siRNAs στο RISC με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διάσπασης των RNA-στόχων (**Εικόνα 2**) (31).

1.3 Οι μπακουλοϊοί (Baculoviruses)

1.3.1 Γενικά

Οι μπακουλοϊοί είναι μια διευρυμένη οικογένεια ιών (*Baculoviridae*) που διαθέτουν ένα μόριο κυκλικού υπερελικωμένου δίκλωνου DNA (dsDNA), μεγέθους 80-180 kb (40), και κωδικοποιούν από 90 έως 180 γονίδια (40-42). Το γονιδίωμα πακετάρεται σε νουκλεοκαψίδια ραβδοειδούς σχήματος μήκους 230–385 nm και διαμέτρου 40–60 nm (43). Στους πιο καλά χαρακτηρισμένους μπακουλοϊούς τα ιικά σωματίδια εμφανίζονται με δυο φαινότυπους, ως έγκλειστα ιικά σωματίδια (Occlusion-Derived Virions, ODV) και ως εκβλαστώνοντα ιικά σωματίδια (Budded Virions, BV). Αν και αυτοί οι δύο τύποι ιικών σωματίων είναι παρόμοιοι ως προς τη δομή του νουκλεοκαψιδίου, διαφέρουν τόσο ως προς την προέλευση και τη σύνθεση των ιικών φακέλων, όσο και ως προς τον ρόλο τους στον κύκλο ζωής του ιού.

Ανάλογα με το μέγεθος των έγκλειστων σωματίων (Occlusion bodies, OB) οι μπακουλοϊοί διαφοροποιούνται σε δυο γένη, τους πυρηνικούς πολυεδρικούς ιούς

(nucleopolyhedroviruses, NPVs) και τους κοκκώδεις ιούς (Granuloviruses, GVs). Οι NPVs περιέχουν πολλά ιικά σωματίδια τα οποία αποτελούνται από κρυσταλλική μήτρα αποτελούμενη από την ιική πρωτεΐνη πολυεδρίνη και ονομάζονται πολυέδρα, ενώ οι GVs έχουν μικρότερα έγκλειστα σωματίδια και συνήθως περιέχουν ένα μοναδικό ιικό σωματίδιο (44). Τα πολυέδρα έχουν διάμετρο περίπου 0,6-2 μM, ενώ οι κόκκοι είναι οβάλ σχήματος και διαμέτρου περίπου 0,2-0,4 μM (43). Το ιικό σωματίδιο περιβάλλεται από έναν φάκελο που περιέχει τουλάχιστον μία κύρια πρωτεΐνη (40). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μπακουλοϊών είναι η διάκρισή τους ανάλογα με την οργάνωση των νουκλεοκαψιδίων εντός των πολυέδρων σε μονά ή πολλαπλά νουκλεοκαψίδια εντός ενός ιικού φακέλου. Για παράδειγμα, σε ορισμένους NPVs, που ονομάζονται πολλαπλοί πυρηνικοί πολυεδρικοί ιοί (Multiple Nucleopolyhedroviruses, MNPVs), μπορεί να περιέχονται από 1 έως 15 νουκλεοκαψίδια ανά ιικό φάκελο. Αντίθετα, τα στελέχη που έχουν ένα (μόνο) νουκλεοκαψίδιο ανά φάκελο (Single Nucleopolyhedroviruses, SNPVs) σπάνια παρουσιάζουν περισσότερα από ένα νουκλεοκαψίδια ανά φάκελο (43).

Οι ιοί του δεύτερου φαινοτύπου (BV) δημιουργούνται όταν τα νουκλεοκαψίδια βγαίνουν μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων. Τα BV συνήθως περιέχουν ένα μόνο νουκλεοκαψίδιο (40).

Οι μπακουλοϊοί έχουν απομονωθεί μόνο από έντομα, και κυρίως από τις τάξεις των Λεπιδόπτερων, Υμενόπτερων και Δίπτερων (40). Με βάση φυλογενετικές αναλύσεις, η οικογένεια *Baculoviridae* χωρίζεται σε τέσσερα γένη (45). Οι ιοί που μολύνουν Λεπιδόπτερα χωρίζονται στα γένη *Alphabaculovirus* και *Betabaculovirus*, τα οποία περιλαμβάνουν τους NPVs και GVs, αντίστοιχα. Οι ιοί που μολύνουν τα Υμενόπτερα και τα Δίπτερα ανήκουν στα γένη *Gammabaculovirus* και *Deltabaculovirus*, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, με βάση τις φυλογενετικές αναλύσεις, οι μπακουλοϊοί εντός του γένους *Alphabaculovirus* υποδιαιρούνται σε NPV της ομάδας I και II. Οι ομάδες I και II χρησιμοποιούν τις πρωτεΐνες GP64 και F, αντίστοιχα, ως πρωτεΐνες σύντηξης φακέλου των εκβλαστανόντων ιών (BVs), οι οποίες είναι απαραίτητες για την προσκόλληση στο κύτταρο, τη σύντηξη της μεμβράνης κατά την είσοδο του ιού μέσω ενδοκύτωσης και την αποτελεσματική εκκίνηση απογόνων BV από μολυσμένα κύτταρα. Η γλυκοπρωτεΐνη GP64 υπάρχει μόνο στην ομάδα I, ενώ η F-πρωτεΐνη κατανέμεται στις ομάδες I και II των ιών του γένους *Alphabaculovirus*, του γένους *Betabaculovirus* και του

γένους *Deltabaculovirus*. Αντίθετα, οι ιοί του γένους *Gammabaculovirus* δεν κωδικοποιούν ούτε την GP64 ούτε την F-πρωτεΐνη (40, 46-48).

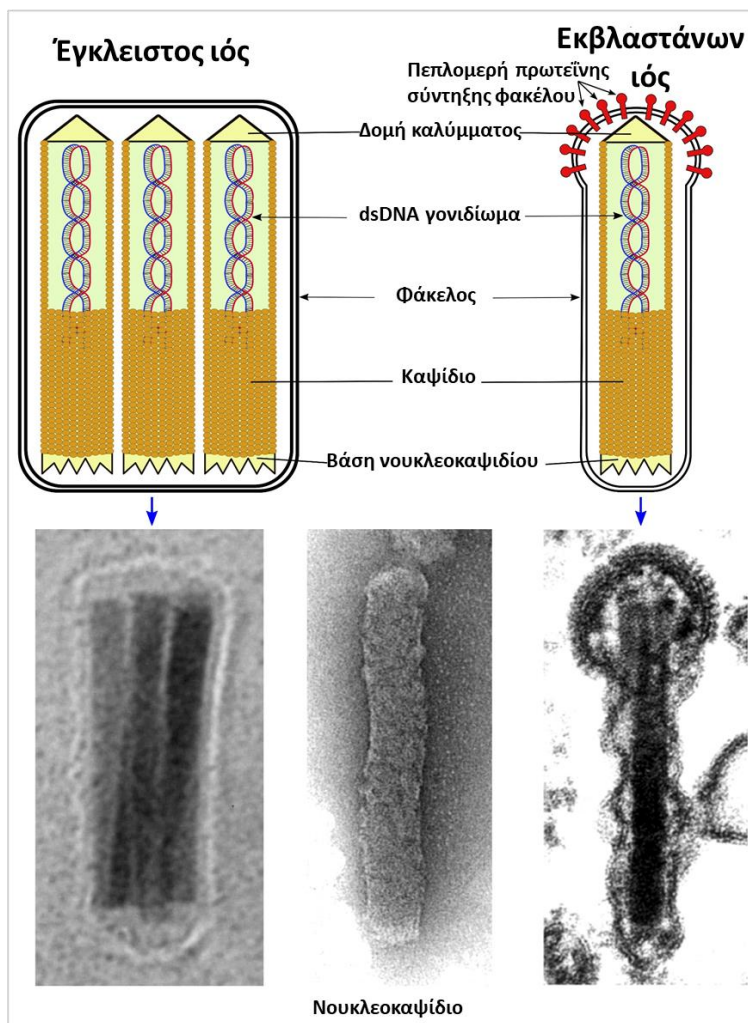
1.3.2 Ο κύκλος αναπαραγωγής των Μπακουλοϊών: επιδράσεις στα κύτταρα και τα έντομα

Οι μπακουλοϊοί, όπως ο πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός *Autographa californica* (AcMNPV), έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να ξεκινούν τη μόλυνση στο μεσέντερο του εντόμου και στη συνέχεια να τη διαδίδουν σε άλλους ιστούς σε ολόκληρο το έντομο. Αυτό οδήγησε στην εξέλιξη δύο τύπων ιικών σωματίων με σημαντικές διαφορές στη δομή του ιικού φακέλου τους. Το σταθερό περιβαλλοντικά, αλλά διαλυτό υπό αλκαλικές συνθήκες, έγκλειστο ιικό σωματίο διαθέτει ένα πολύπλοκο φάκελο, ο οποίος επιτρέπει την επιβίωση του ιού στο σκληρό αλκαλικό περιβάλλον του μεσεντέρου, όπου περιέχεται μια ποικιλία πεπτικών ενζύμων. Αυτά τα έγκλειστα ιικά σωματίδια μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου. Αντίθετα, μετά τη διέλευση από το επιθήλιο του μεσεντέρου, το περιβάλλον που συναντάται εντός του εντόμου έχει σχεδόν ουδέτερο pH και έτσι παράγεται ο δεύτερος τύπος ιικών σωματίων, τα εκβλαστώντα ιικά σωματίδια, που έχουν διαφορετική δομή φακέλου ώστε να διευκολύνεται η διασυστηματική μόλυνση (**Εικόνα 3**).

Η πρωτογενής λοίμωξη των λεπιδόπτερων εντόμων ξεκινά όταν οι ευαίσθητες προνύμφες καταναλώσουν τροφή μολυσμένη με OB που περιέχουν μολυσματικά ODV (**Εικόνα 4**). Τα OB διαλύονται υπό την επίδραση των αλκαλικών πεπτικών υγρών εντός του αυλού στο μεσέντερο, απελευθερώνοντας πολλά ODV που προσροφώνται από τις μικρολάχνες των κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων. Οι φάκελοι των ODV συντήκονται απευθείας με τις πλασματικές μεμβράνες των κυλινδρικών επιθηλιακών κυττάρων, επιτρέποντας έτσι τη διείσδυση του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα. Έπειτα, τα νουκλεοκαψίδια μεταναστεύουν στον πυρήνα μέσω της ακτίνης (42, 49, 50), όπου συμβαίνει η αποσυναρμολόγηση (uncoating) του νουκλεοκαψιδίου απελευθερώνοντας το ιικό DNA, το οποίο στη συνέχεια αντιγράφεται και μεταφράζεται στο ιογενές στρώμα του πυρήνα (πρώιμη φάση).

Σε μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου, τα νεοσυντιθέμενα νουκλεοκαψίδια εγκαταλείπουν τον πυρήνα και εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ στη

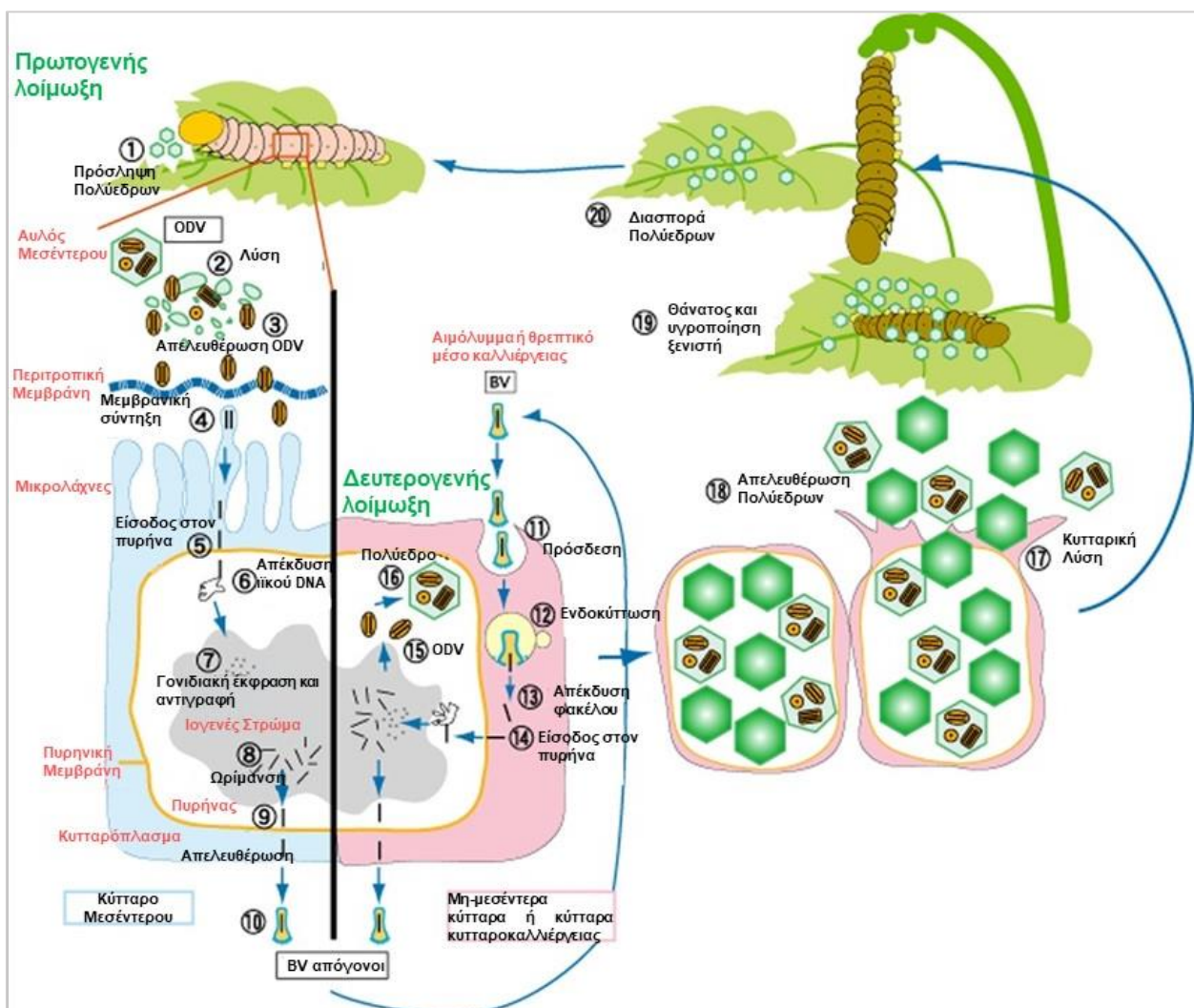
συνέχεια απελευθερώνονται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που έχει τροποποιηθεί από πρωτεΐνες σύντηξης φακέλου, οι οποίες κωδικοποιούνται από τον μπακουλοϊό για να σχηματίσουν εγκαψιδιωμένους BV (51).



Εικόνα 3. Μολυσματικές μορφές μπακουλοϊών. Οι μπακουλοϊοί εντοπίζονται είτε μέσα σε έγκλειστα ιικά σωματίδια (ODVs), είτε ως εκβλαστώντα ιικά σωματίδια (BVs). Τα ODVs περιβάλλονται από την πρωτεϊνική μήτρα της πολυεδρίνης και σχηματίζουν τα έγκλειστα σωματίδια (OBs). Τα εκβλαστώντα ιικά σωματίδια περικλείονται από έναν μεμβρανικό φάκελο που προέρχεται από εκβλάστηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. [Προσαρμογή από (52)].

Στη δευτερογενή μόλυνση (όψιμη φάση) τα ιικά σωματίδια BV εκβλαστώνουν από τη βασική επιφάνεια των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων του μεσέντερου στο αιμόκοιλο (hemocoel), δηλαδή το ανοικτό κυκλοφορικό σύστημα του εντόμου, και μεταδίδουν τη

μόλυνση διασυστηματικά από κύτταρο σε κύτταρο και από ιστό σε ιστό εντός του μολυσμένου εντόμου (**Εικόνα 4**). Για τους ιούς όπως ο AcMNPV, οι περισσότεροι ιστοί μέσα στο αιμόκοιλο (τραχεία, επιθήλιο, αιμοκύτταρα, επιδερμίδα, μύες, λίπος κ.λπ.) μολύνονται και παράγουν επιπλέον BV, εξαπλώνοντας περαιτέρω τη μόλυνση μέσω του εντόμου. Τα BV παράγονται σε σημαντικές ποσότητες ήδη από τις 12-18 h σε κυτταροκαλλιέργειες (53). Σε αντίθεση με τα ODV, τα BV εισέρχονται στα κύτταρα μέσω της προσροφητικής ενδοκύττωσης κατά την οποία οι πρωτεΐνες σύντηξης φακέλου GP64 και F παίζουν καθοριστικούς ρόλους (54-56).



Εικόνα 4. Κύκλος αναπαραγωγής ενός μπακουλοϊού NPV που μολύνει Λεπιδόπτερα. [Προσαρμογή από (57)].

Αργότερα κατά τη μόλυνση (πολύ όψιμη φάση), πολλά νουκλεοκαψίδια διατηρούνται μέσα στον πυρήνα και εγκαψιδιώνονται για να σχηματίσουν τα ODVs (58), τα οποία στη συνέχεια ενσωματώνονται σε ιικά σωμάτια που περιβάλλονται από την πρωτεϊνική μήτρα της πολυεδρίνης, τα OBs. Τα OBs που περιέχουν τα πολύεδρα ODV παραμένουν στον πυρήνα και απελευθερώνονται στο περιβάλλον μετά το θάνατο μολυσμένων προνυμφών μέσω της υγροποίησης τους (liquefaction). Πρόκειται για μια διαδικασία που διαμεσολαβείται από τουλάχιστον δύο ένζυμα (μια χιτινάση και μια πρωτεάση καθεψίνης), τα οποία καταλύουν τη διάσπαση του εξωσκελετού των εντόμων και την απελευθέρωση των OBs στο περιβάλλον (59), ολοκληρώνοντας με αυτό τον τρόπο τον κύκλο μόλυνσης στη φύση. Αν και τόσο τα BV όσο και τα ODV παράγονται σε κυτταροκαλλιέργειες, η μόλυνση ξεκινά από τα ιικά σωμάτια BV καθώς τα έγκλειστα ιικά σωμάτια ODV είναι ελάχιστα μολυσματικά σε αυτή την περίπτωση (60). Τα πρώιμα γονίδια μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση του ξενιστή πριν από την αντιγραφή του DNA του ιού (61, 62), ενώ τα όψιμα και πολύ όψιμα γονίδια μεταγράφονται από μια RNA πολυμεράση που κωδικοποιείται από τον ιό, μετά την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA (62, 63).

1.3.3 Μολύνσεις κυτταρικών σειρών λεπιδοπτέρων εντόμων με τον μπακουλοϊό AcMNPV

Ο πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός *A. californica* (AcMNPV) περιγράφηκε αρχικά στις αρχές της δεκαετίας του 1970 (64) και η έρευνα για τη γενετική του ξεκίνησε αργότερα εκείνη τη δεκαετία. Ανήκει στο γένος *Alphabaculovirus* με δίκλωνο κυκλικό DNA γονιδίωμα μήκους 133,9 bp και έχει συνολικό περιεχόμενο A + T 59%. Το γονιδίωμα περιέχει περίπου 150 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) (65). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι μπακουλοϊοί έχουν αξιοποιηθεί ως εργαλεία έρευνας για την παροδική διαγονιδιακή έκφραση, με τον AcMNPV να κατέχει πρωταρχικό ρόλο. Οι κυτταρικές σειρές Sf21 και ο υποκλώνος Sf9, που προέρχονται από μη ώριμες ωοθήκες νυμφών του Λεπιδοπτέρου *Spodoptera frugiperda*, καθώς και η κυτταρική σειρά High Five (Hi5), που προέρχεται από αυγά του λεπιδοπτέρου εντόμου *Trichoplusia ni*, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή εκβλαστανόντων ιικών (BV)

φορέων AcMNPV, καθώς και για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο (66-68).

1.3.4 Δομικές πρωτεΐνες έγκλειστων και εκβλαστανόντων ιικών σωματίων

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θα μελετηθούν ορισμένες κύριες πρωτεΐνες του ιού AcMNPV όπως η GP64, ODV-E25, VLF-1, VP39, IE1, LEF-5 και η Ac93, σχετικά με τις οποίες παρατίθενται αναλυτικές πληροφορίες ακολούθως.

1.3.4.1 GP64 (Ac128)

Μια από τις πιο καλά μελετημένες δομικές πρωτεΐνες των μπακουλοϊών, και ειδικότερα των εκβλαστανόντων ιικών σωματίων BVs, είναι η πρωτεΐνη σύντηξης του ιικού φακέλου της ομάδας I, GP64 (κλάση III). Η GP64 είναι μία ακετυλιωμένη γλυκοπρωτεΐνη λιπαρών οξέων (69) καθώς και πρωτεΐνη σύντηξης φακέλου σε χαμηλό pH (70, 71), μεγέθους 60.4 kDa. Η παρουσία του γονιδίου *gp64* είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των μπακουλοϊών του γένους *Alphabaculovirus* ομάδας I. Ορθόλογα γονίδια *gp64* εντός της οικογένειας των *Baculoviridae* δείχνουν ένα ασυνήθιστα υψηλό επίπεδο συντήρησης της αμινοξικής αλληλουχίας αμινοξέων τα οποία και βρίσκονται μόνο σε μια υποομάδα (ομάδα I) των *Alphabaculoviruses*. Οι πρωτεΐνες σύντηξης κλάσης III είναι μια συσχετιζόμενη από δομικής άποψης ομάδα ιικών πρωτεϊνών σύντηξης, που περιλαμβάνει μέλη τα οποία προέρχονται από μη συγγενικές οικογένειες ιών, όπως οι πρωτεΐνες gB των ερπητοϊών, οι πρωτεΐνες GP75 ορισμένων ορθομουξοϊών και οι πρωτεΐνες G των ραβδοϊών (72-74). Οι πρωτεΐνες σύντηξης κατηγορίας III εντοπίζονται ως τριμερή στη μεμβράνη και διαθέτουν δομικά χαρακτηριστικά που διακρίνονται από άλλες κατηγορίες ιικών πρωτεϊνών σύντηξης. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει πως η απαλοιφή του *gp64* από το γονιδίωμα του ιού AcMNPV έχει ως αποτέλεσμα την αναπαραγωγή των ιών σε ένα μόνο κύτταρο, αλλά και την αδυναμία τους να εκβλαστώνουν και να μολύνουν τα γειτονικά κύτταρα (75, 76).

Αρχικά θεωρήθηκε ότι όλοι οι ιοί της ομάδας I χρησιμοποιούν την GP64 για την είσοδο των εκβλαστανόντων ιικών σωματίων BV στα κύτταρα, ενώ όλοι οι άλλοι μπακουλοϊοί που δεν έχουν ομόλογο γονίδιο *gp64*, χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη F (ομόλογο γονίδιο *Ac23*) εκτός

από τους NPV ιούς των Υμενοπτέρων που στερούνται και των δύο γονιδίων. Ωστόσο, στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι ο κοκκοϊός *Diatraea saccharalis* (the sugarcane borer), DisaGV, κωδικοποιεί και τα δύο ομόλογα γονίδια ως πρωτεΐνη σύντηξης F και GP64 (77).

Ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό της GP64, πειράματα σε κυτταρικές σειρές μεταξοσκώληκα BmN που είχαν μολυνθεί με τον πολλαπλό πυρηνικό πολυεδρικό ιό του *Bombyx mori* (BmNPV) έδειξαν εντόπιση τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στην κυτταρική μεμβράνη (78).

1.3.4.2 ODV-E25 (Ac94)

Το *Ac94* είναι ένα από τα βασικά γονίδια που υπάρχει στα γονιδιώματα όλων των μπακουλοϊών (79). Η πρωτεΐνη ODV-E25 που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο ταυτοποιήθηκε αρχικά στον OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* multicapsid polyhedrosis virus). Σύμφωνα με μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με την τεχνική του ανοσοχρυσού (immunogold staining) χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι του επιτόπου *Ac94*, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον ιικό φάκελο των ODV (79, 80). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τόσο με τα BV όσο και τα ODV ιικά σωματίδια του AcMNPV (79, 81), ενώ εκφράζεται έντονα σε κύτταρα του μεσέντερου (82). Ακόμη, φαίνεται ότι το υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης του AcMNPV (N-ODV-E25), το οποίο αποτελείται από 24 αμινοξικά κατάλοιπα, έχει ρόλο σήματος πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS) (83). Αυτό χρησιμεύει ως ετικέτα που επισημαίνει την πρωτεΐνη προκειμένου να μεταφερθεί στον πυρήνα. Η σύνδεση της ODV-E25 με το NLS μπορεί να σχετίζεται με την πυρηνική είσοδο και έξοδο των BV ικών σωματίων.

Πειραματικές μελέτες που εξέτασαν τον υποκυτταρικό εντοπισμό ομόλογων γονιδίων της ODV-E25 αναφέρονται σε κυτταροπλασματικό εντοπισμό όταν πρόκειται για κυτταρικές σειρές μολυσμένες με τον πολλαπλό πυρηνικό πολυεδρικό ιό του *Spodoptera litura* (*SpltMNPV*) (84) και σε πυρηνικό εντοπισμό της, γύρω από το ιογενές στρώμα, όταν οι κυτταρικές σειρές ήταν μολυσμένες με τον πολλαπλό πυρηνικό πολυεδρικό ιό του *Orgyia pseudotsugata* (*OpMNPV*) (80). Ανάλογα ευρήματα περιγράφονται και σε μελέτη που χρησιμοποίησε τον πολλαπλό πυρηνικό πολυεδρικό ιό του *Bombyx mori* (BmMNPV), όπου

φάνηκε ότι η ODV-E25 συγκεντρώνεται περιφερικά των δομών που σχετίζονται με την πρωτεΐνη IE1 στον πυρήνα, κοντά στο ιογενές στρώμα (85). Επιπλέον, απαλοιφή του *Ac94* είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 100 φορές των μολυσματικών εκβλαστανόντων ιικών σωματίων BV, ενώ τα έγκλειστα ιικά σωματίδια ODV δεν ήταν εμφανή και δεν περιβάλλονταν από την πρωτεΐνη πολυεδρίνη (86).

1.3.4.3 VLF-1 (Ac77)

Η VLF-1 (very late factor-1) είναι μέλος της οικογένειας των λάμδα ιντεγκρασών (lambda integrase, Int) και εντοπίστηκε αρχικά επειδή επηρεάζει την υπερέκφραση των όψιμων γονιδίων (87), πιθανώς λόγω της σύνδεσής της με τις ρυθμιστικές περιοχές τους (88). Οι ιντεγκράσες είναι μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών που επιτρέπουν τον ανασυνδυασμό συγκεκριμένων μονάδων DNA, και εμπλέκονται στην ενσωμάτωση και την εκτομή των ιικών γονιδιωμάτων, καθώς και στο διαχωρισμό των πρόσφατων χρωμοσωμικών αντιγράφων (decatenation).

Δυο γονίδια που εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα κατά την όψιμη φάση, είναι το γονίδιο της *πολυεδρίνης* και το *p10*. Η πολυεδρίνη είναι η πρωτεΐνη των έγκλειστων σωματίων OB, ενώ ο ρόλος της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το *p10* δεν είναι σαφής, αν και φαίνεται να σχηματίζει ινδικές δομές που μπορεί να εμπλέκονται στη συναρμολόγηση του περιβλήματος του πολυέδρου κατά την ωρίμανση των πολυέδρων (89), και πιθανώς μπορεί να επηρεάζεται από τη λύση των μολυσμένων πυρήνων (90). Επειδή αυτά τα γονίδια φαίνεται να εμπλέκονται στη μορφογένεση των πολυέδρων, δηλαδή ένα βήμα που λαμβάνει χώρα κατά την πολύ όψιμη φάση του κύκλου ζωής του μπακουλοϊού, και ειδικότερα μετά τη συναρμολόγηση των ιοσωμάτων που προορίζονται για εγκλεισμό, είναι πιθανό να μεταγράφονται από DNA που δεν πακετάρεται ως ιικό γονιδίωμα. Κατά συνέπεια, παραμένει προσβάσιμο στο σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης της πολύ όψιμης φάσης. Τα δύο αυτά γονίδια περιέχουν μια αλληλουχία πλούσια σε αδερίνη/θυμίνη (A/T) καθοδικά μιας αλληλουχίας υποκινητή όψιμης φάσης, ο οποίος εμπλέκεται στην έκφρασή τους σε υψηλά επίπεδα (91). Αυτή η αλληλουχία ονομάστηκε «εκρηκτική αλληλουχία» επειδή προκαλεί μια έκρηξη μεταγραφής στην πολύ όψιμη φάση της μόλυνσης. Η VLF-1, που εμπλέκεται στην

υπερέκφραση πολύ όψιμων γονιδίων (87), βρέθηκε ακόμη να αλληλεπιδρά με την «εκρηκτική αλληλουχία» σε δοκιμασίες μετατόπισης πηκτής (gel shift assays) και η παρουσία αυτής της αλληλουχίας διεγείρει τα επίπεδα έκφρασης της VLF-1 (92).

Η VLF-1 υπάρχει τόσο στα BV όσο και στα ODV (93), και εντοπίζεται στα άκρα των νουκλεοκαψιδίων, υποδηλώνοντας ότι είναι μια δομική πρωτεΐνη (93, 94) η οποία απαιτείται για την παραγωγή των νουκλεοκαψιδίων.

1.3.4.4 VP39 (Ac89)

Το γονίδιο *Ac89* κωδικοποιεί την κύρια δομική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου VP39, μεγέθους 39kDa. Ομόλογα γονίδια της VP39, ανευρίσκονται σε όλα τα γονιδιώματα των μπακουλοϊών. Οι πρώτες παρατηρήσεις έγιναν στους ιούς OpMNPV (95) και AcMNPV (96). Ως δομική πρωτεΐνη, η VP39 φέρεται να αλληλεπιδρά με πολλές ιογενείς και κυτταρικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των FP25 (97), 38K (98), IE-2 (99), Kinesin-1 (100), και της ακτίνης (101). Ειδικότερα, η αλληλεπίδραση της VP39 με την Kinesin-1 έχει παρατηρηθεί σε μια συντηρημένη περιοχή, ενώ έχει προταθεί ότι αυτή η αλληλεπίδραση εμπλέκεται στη μεταφορά νουκλεοκαψιδίων που προορίζονται να γίνουν BV στην κυτταρική μεμβράνη μετά τη συναρμολόγησή τους στους πυρήνες (100).

1.3.4.5 IE1 (Ac147)

Με στόχο την ενεργοποίηση του κύκλου αναπαραγωγής του μπακουλοϊού, πολλοί μπακουλοϊοί χρησιμοποιούν τον μεταγραφικό ενεργοποιητή IE1, ή αλλιώς άμεσο πρώιμο γονίδιο-1 (immediate early gene-1), για την ενεργοποίηση των πρώιμων γονιδίων τους. Ο IE1 αρχικά ταυτοποιήθηκε λόγω της ικανότητάς του να επάγει την *trans*-ενεργοποίηση των πρώιμων εκκινητών του ιού AcMNPV (85). Η ικανότητα του IE1 να επάγει την *trans*-ενεργοποίηση της μεταγραφής ενισχύεται πολύ όταν το ενεργοποιημένο γονίδιο συνδέεται με αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές *hr* (homologous regions) (102). Ο IE1 μπορεί επίσης να συμμετέχει στη μειορύθμιση (downregulation) ορισμένων γονιδίων (103). Μεταγράφεται κατά την πρώιμη φάση της λοίμωξης και η μεταγραφή του συνεχίζει έως και την όψιμη φάση (104). Μέρος του πληθυσμού του IE1 ονομάζεται IE0 και μεταφράζεται από

ένα μεγαλύτερο συρραμμένο mRNA, το οποίο είναι το μόνο κύριο συρραμμένο μετάγραφο που περιγράφεται για τους μπακουλοϊούς, και στον AcMNPV απαντάται με 54 επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του IE1 (105). Στον ιό AcMNPV, είτε το IE1 είτε το IE0 μπορούν να υποστηρίξουν την ιική αναπαραγωγή.

Το IE1 του AcMNPV περιέχει δυο ξεχωριστές πρωτεϊνικές επικράτειες (περιοχές). Η μία βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και αντιστοιχεί στην όξινη περιοχή ενεργοποίησης, ενώ η άλλη βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο που αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσδεσης του DNA (106, 107). Περιέχει ακόμη μία περιοχή διμερισμού DD (Dimerization Domain), η οποία σχετίζεται με μια προβλεπόμενη αλληλουχία έλικας-βρόχου-έλικας κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο (108, 109). Επιπρόσθετα, μια θετικά φορτισμένη περιοχή δίπλα στην περιοχή διμερισμού εμπλέκεται στην εισαγωγή ικών πρωτεϊνών στον πυρήνα και εξαρτάται από το διμερισμό του IE1 (110).

Ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης IE1, μελέτες έχουν δείξει ότι εντοπίζεται με τη μορφή μικρών εστιών (foci) στο εσωτερικό του πυρήνα σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό BmNPV (111), και ειδικότερα σε συγκεκριμένα σημεία στο ιογενές στρώμα (85, 111). Ωστόσο σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης που δεν περιλάμβαναν μόλυνση με τον ιό BmNPV, η πρωτεΐνη IE1 εμφάνισε έναν διάχυτο εντοπισμό σε όλο το πυρηνόπλασμα (85, 111).

1.3.4.6 LEF-5 (Ac99)

Ομόλογα του Ac99 έχουν εντοπιστεί σε όλους τους μπακουλοϊούς και είναι επίσης παρόντα στους ιούς *nudi* (nudiviruses) (112). Ο παράγοντας LEF-5 (Late expression factor-5) αρχικά ταυτοποιήθηκε στα πλαίσια της παροδικής έκφρασης των όψιμων γονιδίων (113). Αποδείχθηκε ακόμη, ότι η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με τον εαυτό της και ότι περιέχει μια περιοχή παρόμοια με αυτή του παράγοντα επιμήκυνσης IIS της RNA πολυμεράσης II (RNA polymerase II elongation factor IIS, TFIIIS) (114). Ωστόσο, μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι η LEF-5 λειτουργεί ως παράγοντας έναρξης και όχι ως παράγοντας επιμήκυνσης (115). Απαλοιφή του γονιδίου είναι πιθανώς θανατηφόρα, καθώς σε σχετική μελέτη δεν ήταν εφικτό να απομονωθούν μεταλλάγματα με απώλεια αυτού του γονιδίου στον ιό BmNPV (Bm83) (116).

1.3.4.7 Ac93

Το *Ac93* γονίδιο φαίνεται ότι υπάρχει στα γονιδιώματα όλων των μπακουλοϊών και παράγει πρωτεΐνη μεγέθους 18.4 kDa (117), η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάβαση των νουκλεοκαψιδίων που προκύπτουν από την πυρηνική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, καθώς και για τη μολυσματική παραγωγή BV.

Για τη διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του *Ac93* στον κύκλο ζωής του μπακουλοϊού, κατασκευάστηκε ένα ανασυνδυασμένο bacmid του γονιδιώματος του AcMNPV στερούμενο του γονιδίου *Ac93*. Το *Ac93* knockout γονιδίωμα είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού ενδοπυρηνικών μικροκυστιδίων (intranuclear microvesicles) καθώς και την έλλειψη εξόδου νουκλεοκαψιδίων από τον πυρήνα. Έτσι, φαίνεται πως το *Ac93* επηρεάζει τόσο τη μορφογένεση του περιβλήματος των ODV όσο και την έξοδο των νουκλεοκαψιδίων από τους πυρήνες (117). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν την αλληλεπίδραση της *Ac93* τόσο με την πρωτεΐνη Vps4 (Vacuolar protein sorting-associated protein 4) όσο και με τα συστατικά του ενδοσωμικού συμπλόκου διαλογής που απαιτείται για τη μεταφορά, ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport-III), τα οποία φαίνεται να είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική είσοδο και έξοδο του ιού AcMNPV (118, 119).

Ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης, τα ευρήματα της ίδιας μελέτης έδειξαν ότι το *Ac93* εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, με ιδιαίτερη έμφαση πλησίον της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της περιπυρηνικής ζώνης (117).

1.4 Το σύστημα BEVS

Το σύστημα φορέα έκφρασης μπακουλοϊού (baculovirus expression vector system, BEVS) έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για περισσότερα από 40 χρόνια (120). Ως ένα ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, επιτρέπει εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως είναι η γλυκοζυλίωση και η φωσφορυλίωση, ενώ ακόμη υποστηρίζει το σχηματισμό πρωτεϊνικών υπομονάδων σε ένα σύμπλεγμα πολλαπλών υπομονάδων (121, 122). Πρόσφατες εφαρμογές του BEVS περιλαμβάνουν την έκφραση μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων με σκοπό τη δομική ανάλυση

(123), την παραγωγή φορέων γονιδιακής θεραπείας και εμβολίων (124, 125), και τη μεταγωγή κυττάρων θηλαστικών (126, 127).

Ο κύκλος ζωής του μπακουλοϊού, όπως προαναφέρθηκε, είναι πολύπλοκος και μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις: την πρώιμη, την όψιμη και την πολύ όψιμη φάση. Γονίδια της πολύ όψιμης φάσης, συμπεριλαμβανομένου του *p10* και της πολυεδρίνης (*polh*), τα οποία παρουσιάζουν υψηλή έκφραση 18-72 ώρες μετά την έναρξη της λοίμωξης, χρησιμοποιούνται εκτενώς για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο BEVS. Τα δύο γονίδια παράγουν πρωτεΐνες που απαιτούνται μόνο για την οριζόντια μετάδοση και όχι για τη διασυστηματική μόλυνση εντός της προνύμφης ή για την εξάπλωση της μόλυνσης σε κυτταροκαλλιέργεια εντόμων. Επομένως, οι περιοχές κωδικοποίησης των γονιδίων *p10* ή *polh* μπορούν να αντικατασταθούν από ανασυνδυασμένα γονίδια, διατηρώντας τους πολύ ισχυρούς υποκινητές προκειμένου να κατευθύνουν την ετερόλογη έκφραση ξένων γονιδίων (128).

Η δημιουργία ανασυνδυασμένων μπακουλοϊών για πρωτεϊνική έκφραση γίνεται όλο και πιο απλή, ιδιαίτερα με το εμπορικό διαθέσιμο σύστημα Bac-to-Bac™, το οποίο χρησιμοποιεί μετασηματισμένα βακτήρια που διατηρούν τα γονιδιώματα του μπακουλοϊού ως μεγάλα πλασμίδια (“bacmids”) στα οποία μπορούν να εισαχθούν ξένα γονίδια από ενδιαμέσους φορείς rFastBac με στοχευμένη αντιμετάθεση (129). Το σύστημα Bac-to-Bac™ BEVS χρησιμοποιεί το πρωτότυπο είδος μπακουλοϊού, τον ιό AcMNPV, σε συνδυασμό με κυτταρικές σειρές Λεπιδόπτερον που προέρχονται από τα έντομα *S. frugiperda* (Sf9, Sf21) ή *T. ni* (Hi5) (130). Συνολικά, το σύστημα φορέα έκφρασης μπακουλοϊού χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα BEVS προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως ταχύτητα κατασκευής, παραγωγική ικανότητα, ευελιξία στον σχεδιασμό των προϊόντων, βιοασφάλεια και δυνατότητα επέκτασης (131).

Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Στα πλαίσια ερευνητικής μελέτης για την παραγωγή ιόμορφων σωματίων (virus-like particles, VLP) προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως φορείς dsRNA με σκοπό να προκαλέσουν αποσιώπηση γονιδίων σε στοχευμένα επιβλαβή έντομα μέσω του συστήματος φορέα έκφρασης μπακουλοϊού, η παρούσα Διπλωματική Εργασία επικεντρώνεται στη διερεύνηση του υποκυτταρικού εντοπισμού ικών πρωτεϊνών και dsRNA που παράγονται κατόπιν μόλυνσης με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς.

Η αυξημένη παραγωγή dsRNA θα είναι εφικτή μέσω ανασυνδυασμένου μπακουλοϊού και συγκεκριμένα του πολλαπλού πυρηνικού πολυεδρικού ιού του *Autographa californica* (AcMNPV). Ο ιός αυτός εκφράζει το γονίδιο της πρωτεΐνης δέσμευσης dsRNA, B2, του ιού Flock House συζευγμένο με το γονίδιο GFP που παράγει βιοφθορισμό, με σκοπό την καταστολή του κατακερματισμού των dsRNA μέσω RNA παρεμβολής, καθώς και μια φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, dsLuc.

Ο βιοφθορισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης B2-GFP θα συγκριθεί με την υποκυτταρική κατανομή των ικών πρωτεϊνών που είτε αποτελούν δομικά στοιχεία των εκβλαστανόντων (BVs) ή των έγκλειστων ικών σωματίων (ODVs), είτε εμπλέκονται στη μεταφορά των ικών σωματίων στην πορεία της μόλυνσης, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του προτύπου συσσώρευσης του dsRNA. Παράλληλα, θα μελετηθεί η ική μόλυνση σε επίπεδο πρωτεΐνης, γονιδιώματος και παραγόμενου dsRNA.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φιλοδοξείται να προκύψουν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης B2 αφενός με το παραγόμενο dsRNA, αφετέρου δε με τις ικές πρωτεΐνες σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Υλικά & Μέθοδοι

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Βιολογικό Υλικό

2.1.1.1 Κυτταρικές σειρές λεπιδοπτέρων εντόμων

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των *in vitro* πειραμάτων αντιστοιχούν στις εξής:

α) BTI-Tn-5B1-4 ή αλλιώς High Five™ (Hi5), που προέρχεται από αυγά λεπιδοπτέρων εντόμων *Trichoplusia ni* (132, 133), και

β) IPLB-SF21 (Sf21), που προέρχεται από μη ώριμες ωοθήκες νυμφών Λεπιδοπτέρων *Spodoptera frugiperda* (66).

Τα κύτταρα Hi5 και Sf21 διατηρούνται σε ειδικό θάλαμο επώασης στους 28 °C μέσα σε φλάσκες των 25 cm², οι οποίες περιέχουν θρεπτικό υλικό IPL-41 στο οποίο έχει προστεθεί 10% εμβρυϊκού ορού μόσχου (FBS, Fetal Bovine Serum, Biosera, USA). Το IPL-41 αποτελεί μίγμα αμινοξέων, ανόργανων αλάτων, βιταμινών, σακχάρων και άλλων θρεπτικών συστατικών (134). Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται μία φορά την εβδομάδα. Ύστερα από διαμόλυση των κυττάρων, για την αποφυγή μόλυνσεων στο θρεπτικό υλικό προστίθεται το αντιβιοτικό γενταμυκίνη σε συγκέντρωση 50 µg/mL.

2.1.1.2 Πλασμίδια

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

α) pEA, ο οποίος είναι κατάλληλος για την ενισχυμένη έκφραση γονιδίων σε κυτταρικές σειρές εντόμων (135).

β) pBluescript SK+ (Stratagene, USA), ο οποίος επιλέγεται για ορισμένα ενδιάμεσα στάδια κλωνοποίησης.

γ) pFastBac™ Dual, ο οποίος διαθέτει δύο υποκινητές σε έναν μόνο φορέα για την ταυτόχρονη έκφραση δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα εντόμων όταν χρησιμοποιείται το σύστημα έκφρασης Bac-to-Bac® Baculovirus. Οι δύο ισχυροί υποκινητές που διαθέτει ο φορέας είναι ο υποκινητής της πολυεδρίνης και ο υποκινητής p10, που επιτρέπουν την έκφραση σε υψηλά επίπεδα.

2.1.1.3 Bacmid

Για τα πειράματα που αφορούν στις αλληλεπιδράσεις των RNAi παραγόντων του μεταξοσκώληκα με τον ανασυνδυασμένο φθορίζοντα μπακουλοϊό AcMNPV-B2-GFP/dsLuc χρησιμοποιήθηκε το AcMNPV Bacmid μέσω του συστήματος έκφρασης μπακουλοϊών Bac-to-Bac® (Invitrogen, USA).

2.1.2 Διαλύματα και Θρεπτικά Υλικά

Διαλύματα Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Ρυθμιστικό Διάλυμα Phusion High-Fidelity Πολυμεράσης 5x (εταιρεία!): 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM σπερμιδίνη

Ρυθμιστικό Διάλυμα Taq Πολυμεράσης 10x (Enzyquest): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5 στους 25 °C), 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100

Διαλύματα Καθαρισμού νουκλεϊκών οξέων

Διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI, phenol/chloroform/isoamyl alcohol): φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1

Διαλύματα Φωσφορυλίωσης/Αποφωσφορυλίωσης

Ρυθμιστικό Διάλυμα T4 Πολυνουκλεοτιδικής Κινάσης 10x (Takara Bio Inc): 500 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT

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

Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης

Πηκτή Αγαρόζης: 60 gr αγαρόζη, 160 mL TAE 1x, 80 μL βρωμιούχο αιθίδιο (σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml)

Ρυθμιστικό Διάλυμα TAE 10x: 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 40 mM CH₃COOH

Διαλύματα Αντιδράσεων Πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Ρυθμιστικό Διάλυμα H 10x (Takara Bio Inc): 500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM Διθειοθρεϊτόλη, 1000 mM NaCl

Ρυθμιστικό Διάλυμα T 10x (Takara Bio Inc): 30 mM Tris-acetate (pH 7.9), 100 mM Mg-acetate, 5 mM Διθειοθρεϊτόλη, 660 mM K-acetate

Ρυθμιστικό Διάλυμα K 10x (Takara Bio Inc): 200 mM Tris-HCl (pH 8.5), 100mM MgCl₂, 10 mM Διθειοθρεϊτόλη, 1,000 mM NaCl

Ρυθμιστικό Διάλυμα M 10x (Takara Bio Inc): 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM Διθειοθρεϊτόλη, 500 mM NaCl

Διάλυμα BSA (Takara Bio Inc): αλβουμίνη ορού βοός (σε συγκέντρωση, 100 μg/mL), 0.9% NaCl, 0.05% NaN₃

Διαλύματα Αντιδράσεων Σύνδεσης

Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης 10x (EnzyQuest): 500 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT (dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη)

Διαλύματα Απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μικρή και μεσαία κλίμακα

Διάλυμα I: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0, 10 mM EDTA)

Διάλυμα I (G.E.T.): 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA

Διάλυμα II: 1% SDS, 0.2 N NaOH

Διάλυμα III: 3 M KAc (pH 4.8) και 11.5% CH₃COOH

Διαλύματα Αποδιατακτικής SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωσης Western

Πηκτή διαχωρισμού (Separating gel): 30% ακρυλαμίδης/δισ-ακρυλαμίδης, ddH₂O, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 10% SDS, 10% υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS, NH₄S₂O₈), τετραμεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) (*AppliChem GmbH*)

Πηκτή επιστοίβωσης (Stacking gel): 30% ακρυλαμίδης/δισ-ακρυλαμίδης, ddH₂O, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, 10% APS, TEMED

PBS 1x: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄ και 18 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)

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

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

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

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

Διάλυμα δέσμησης (Blocking buffer): 10% γάλα σε σκόνη (Regilait, non-fat milk) σε PBS-T

Διαλύματα χημειοφωταύγειας ECL (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific™)

Διαλύματα Παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων

Θρεπτικό υλικό IPL-41 + 10% FBS: Σε 800 mL ddH₂O προστίθενται 25.63 g σκόνης IPL-41 (*Genaaxon Bioscience, Germany*), 0.35 g NaHCO₃, 20 mL φωσφορικής τρυπτόζης, 1 mL 0.24 mM ZnSO₄·7H₂O και 1 mL 16 mM AlK(SO₄)₂·12H₂O, και το pH προσαρμόζεται στο 5.9 με 10 N KOH. Ακολούθως, προστίθεται ddH₂O έως τελικού όγκου 900 mL και 100 mL αδρανοποιημένου FBS. Το pH προσαρμόζεται στο 6.3 με 1 N KOH και η ωσμωμοριακότητα στα 360-380 mOsm, ενώ κατόπιν φιλτραρίσματος (0.22 μm, Millipore, USA) το μέσο αποθηκεύεται στους 4 °C υπό συνθήκες σκότους.

Θρεπτικό υλικό IPL-41 Basal + L-Γλουταμίνη, 0.35 g/L NaHCO₃ (PAN™ - Biotech, Germany)

Θρεπτικά Υλικά Καλλιέργειας Βακτηρίων

Θρεπτικό υλικό LB (Luria-Bertani): Σε 1 Lt ddH₂O προστίθενται 10 gr τρυπτόνης, 5 gr εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) και 5 gr NaCl (pH 7.0)

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

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια ενζυμική μέθοδος κατά την οποία πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός (ενίσχυση) συγκεκριμένων τμημάτων ενός αρχικού γενετικού υλικού (μήτρα DNA) *in vitro* με σκοπό την περαιτέρω αξιοποίηση της συγκεκριμένης αλληλουχίας με διάφορες μεθόδους/τεχνικές όπως είναι η ηλεκτροφόρηση και η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς. Η αντίδραση εκτελείται μέσω μια σειράς 25-40 επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων μέσα σε θερμικό κυκλοποιητή (MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler, Biorad). Κάθε θερμικός κύκλος περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: 1°) αποδιάταξη του γενετικού υλικού με θέρμανση στους 94-98 °C, 2°) υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία του DNA με μείωση της αρχικής θερμοκρασίας στους 45-65 °C και 3°) επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA με αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C. Ανάλογα με την αλληλουχία που ενισχύεται κατά την αντίδραση, η εφαρμοζόμενη θερμοκρασία και διάρκεια κάθε σταδίου ποικίλλει, ενώ ο πολλαπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας γίνεται με εκθετική πρόοδο. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κλασική αντίδραση PCR είναι η αρχική μήτρα του DNA (που περιλαμβάνει την αλληλουχία-στόχο), μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, μίγμα ελεύθερων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide Triphosphates, dNTPs) που θα χρησιμοποιήσει η πολυμεράση, δύο ειδικά σχεδιασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και ιόντα Mg^{2+} .

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, με βάση την κίνηση προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου που διαθέτει αντίθετο φορτίο. Κατά τη διέλευση των μορίων από το ηλεκτρικό πεδίο, γίνεται ο διαχωρισμός τους ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα και με το μέγεθος τους. Επομένως, μόρια με διαφορετικά φορτία και μάζες, κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Στην πηκτή αγαρόζης τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Καθώς τα δείγματα DNA μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης, σχηματίζονται χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA. Οι χαρακτηριστικές αυτές ζώνες δεν είναι ορατές δια γυμνού οφθαλμού κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, δύνανται όμως να οπτικοποιηθούν με προσθήκη στο πήκτωμα μιας χρωστικής που προσδένεται στο DNA (βρωμιούχο αιθίδιο, EtBr), η οποία φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (Ultraviolet, UV).

Πειραματική Πορεία:

- 1) Για την παρασκευή διαλύματος αγαρόζης 1% w/v, ζυγίζεται σκόνη αγαρόζης x gr και διαλύεται σε x*100 mL 1X TAE (900 mL dH₂O + 100 mL TAE 10X) σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 250 mL. Συνιστάται ήπια ανάδευση.
- 2) Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαυγάσει (5-10').
- 3) Η κωνική φιάλη τοποθετείται κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να κρυώσει ελαφρώς.
- 4) Προσθήκη 80 μL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/mL. Προσεκτική ανακίνηση της φιάλης ώστε να διαλυθεί πλήρως το EtBr στην αγαρόζη.
- 5) Το διάλυμα αγαρόζης αδειάζεται στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, αφού προηγουμένως έχει τοποθετηθεί μέσα σε αυτό το κατάλληλο χτενάκι για τη φόρτωση του δείγματος. Τυχόν φυσαλίδες απομακρύνονται και το πήκτωμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου στερεοποιηθεί (περίπου 30').
- 6) Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η πηκτή και καλύπτεται κατά 0.5 cm με TAE 1X.
- 7) Σε κάθε δείγμα προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα Loading Buffer 10X.
- 8) Τα δείγματα φορτώνονται στα βοθρία (πηγαδάκια) με χρήση μικροπιπέτας (10-25 μL/βοθρίο).
- 9) Φορτώνεται το δείγμα πρότυπου μοριακού μεγέθους (DNA Ladder) σε ένα βοθρίο με την χρήση μικροπιπέτας.

- 10) Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με το τροφοδοτικό με σωστή εφαρμογή των ηλεκτροδίων στους αντίστοιχους πόλους ώστε τα δείγματα να κινούνται από την κάθοδο (-) προς την άνοδο (+).
- 11) Η τάση ρυθμίζεται στα 100 V για 30-40'.
- Σημείωση: Μετά την έναρξη λειτουργίας του τροφοδοτικού παρατηρούνται φυσαλίδες στο πλαϊνό μέρος της συσκευής για επιβεβαίωση λειτουργίας της συσκευής.*
- 12) Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, γίνεται παρατήρηση του αποτελέσματος υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και φωτογράφιση των δειγμάτων.

2.2.3 Απομόνωση και καθαρισμός τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης (Gel extraction)

Η απομόνωση των επιθυμητών ζωνών DNA από την πηκτή αγαρόζης γίνεται με τη χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Takara Bio).

Πειραματική πορεία:

- 1) Η πηκτή παρατηρείται υπό ακτινοβολία UV μέσω φορητής συσκευής.
- 2) Ακολουθεί αποκοπή της επιθυμητής ζώνης με αποστειρωμένο μαχαιράκι και τοποθέτηση σε σωληνάριο Eppendorf.
- 3) Υπολογίζεται το ακριβές βάρος της ζώνης που απομονώθηκε σε ζυγό ακρίβειας.
- 4) Για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης <2% γίνεται προσθήκη 200 μ L από το Buffer NT1.
- 5) Το δείγμα επωάζεται για 5-10 λεπτά στους 50 °C. Ακολουθεί, χειροκίνητη ανάδευση κάθε 2-3' έως ότου γίνει διαυγές.
- 6) Το φυγοκεντρικό μικροσωληνάριο με φίλτρο (στήλη) τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής (2 mL) και το δείγμα φορτώνεται έως τα 700 μ L.
- 7) Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 rpm. Το υγρό απορρίπτεται από το σωληνάριο συλλογής και η στήλη τοποθετείται πίσω στο σωληνάριο συλλογής. Το υπόλοιπο δείγμα φορτώνεται εάν είναι απαραίτητο και γίνεται επανάληψη του σταδίου φυγοκέντρωσης.
- 8) Προστίθενται 700 μ L από το Buffer NT3 στη στήλη.

- 9) Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 rpm. Το υγρό απορρίπτεται από το σωληνάριο συλλογής και η στήλη τοποθετείται πίσω στο σωληνάριο συλλογής.
- 10) Γίνεται επανάληψη του προηγούμενου βήματος πλύσης με στόχο την ελαχιστοποίηση μεταφοράς χαστροπικών αλάτων και την επίτευξη χαμηλού λόγου A^{260}/A^{230} .
- 11) Το άδειο σωληνάριο φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000 rpm ώστε να αφαιρεθεί το Buffer NT3 εντελώς, η παρουσία του οποίου μπορεί να αναστείλει ενζυμικές αντιδράσεις.
- 12) Ακολουθεί η έκλουση του DNA με την τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου 1.5 mL. Προστίθενται 15-30 μ L Buffer NE ή ddH₂O και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18–25 °C) για 1 λεπτό. Φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11.000 rpm. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται μία ακόμη φορά προκειμένου να παραληφθεί κατά το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα DNA.
- 13) Τέλος, η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προσδιορίζονται μέσω φωτομέτρησης ή/και ηλεκτροφόρησης.

2.2.4 Φωτομετρική εκτίμηση της ποιότητας, συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Μια μέθοδος για την εκτίμηση της ποιότητας, συγκέντρωσης και της καθαρότητας των εκχυλισμάτων των DNA/RNA που απομονώνονται και προσδιορίζονται ποσοτικά είναι η φασματοσκοπία υπεριώδους (UV). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν σε μήκος κύματος $\lambda_{\max}=260$ nm (απορρόφηση A_{260}) και των πρωτεϊνών σε $\lambda_{\max}=280$ nm (απορρόφηση A_{280}). Ο λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του DNA και του RNA. Μια αναλογία ίση με περίπου 1.8 είναι γενικά αποδεκτή ως ένδειξη καθαρότητας του DNA. Αντίστοιχα, μια αναλογία ίση με περίπου 2.0 είναι γενικά αποδεκτή ως ένδειξη καθαρότητας του RNA. Εάν η αναλογία είναι πολύ χαμηλότερη σε κάθε περίπτωση, μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία πρωτεΐνης, φαινόλης ή άλλων ρύπων που απορροφούν κοντά στα 280 nm. Ένας δεύτερος λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{230} χρησιμοποιείται ως δευτερεύον μέτρο καθαρότητας νουκλεϊκού οξέος και είναι ευαίσθητος δείκτης ρύπων που απορροφούν στα 230 nm τα οποία μπορεί να είναι

χαοτροπικά άλατα όπως θειοκυανική γουανιδίνη (GTC) και υδροχλωρική γουανιδίνη (GuHCl), EDTA, μη ιοντικά απορρυπαντικά όπως το Triton X-100 και Tween 20, πρωτεΐνες και φαινόλη. Οι τιμές A_{260}/A_{230} για ένα «καθαρό» νουκλεϊκό οξύ είναι συχνά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές A_{260}/A_{280} , και είναι συνήθως στην περιοχή 1.8-2.2. Εάν η αναλογία είναι αισθητά χαμηλότερη, αυτό μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη ρύπων. Οι φωτομετρήσεις στα πειράματα της παρούσας εργασίας έγιναν με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop (NanoDrop™ ND 1000, Thermo Fischer Scientific, USA).

2.2.5 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με χρήση διαλύματος

φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης

- 1) Στο δείγμα νουκλεϊκού οξέος προστίθεται αποστειρωμένο ddH₂O μέχρι όγκου 400 μL.
- 2) Προστίθεται ίσος όγκος (400 μL) διαλύματος PCI.
- 3) Γίνεται έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα (Vortex) και στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται για 1' στις 13.000 rpm.
- 4) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf (~400 μL).
- 5) Προστίθενται 400 μL διαλύματος φαινόλης.
- 6) Ακολουθεί έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 1' στις 13.000 rpm.
- 7) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf (~400 μL).
- 8) Προστίθενται 400 μL χλωροφορμίου.
- 9) Γίνεται εντονη ανάδευση στον αναδευτήρα και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 1' στις 13.000 rpm.
- 10) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο erpendorf (~400 μL).
- 11) Προστίθεται 1 mL 100% διαλύματος παγωμένης αιθανόλης (EtOH) και 40 μL οξικού νατρίου 3M (CH₃COONa).
- 12) Το δείγμα φυλάσσεται για 16h στους -20°C.
- 13) Φυγοκεντρείται για 15' στις 13.000 rpm και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- 14) Προστίθεται 500 μL 70% διαλύματος παγωμένης EtOH.
- 15) Φυγοκεντρείται για 15' στις στροφές και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

- 16) Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 5'.
- 17) Στο ίζημα προστίθενται 20 μL ddH₂O για την επαναδιάλυσή του.
- 18) Ακολουθεί φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA.

2.2.6 Κλωνοποίηση DNA

2.2.6.1 Γενική διαδικασία κλωνοποίησης

Η κλωνοποίηση μορίων DNA επιτρέπει την παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA και την περαιτέρω μελέτη ή την τροποποίησή της κατάλληλα. Η τεχνική στηρίζεται στην ενσωμάτωση της επιθυμητής αλληλουχίας σε ένα κυκλικό μόριο DNA που αποκαλείται φορέας και έχει την δυνατότητα να αντιγράφεται αυτόνομα σε ένα κύτταρο ξενιστή απ' όπου μπορεί στην συνέχεια να απομονωθεί.

Οι φορείς που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία είναι τροποποιημένα πλασμίδια, τα οποία περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό καθώς και αλληλουχίες που λειτουργούν ως θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών, η αλληλουχία που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και το πλασμίδιο-φορέας υδρολύονται σε συγκεκριμένες θέσεις επί του DNA, με σκοπό να δημιουργηθεί η γραμμική μορφή του φορέα και έτσι να παραχθούν θραύσματα DNA με προεξέχοντα, κολλώδη άκρα, ή εναλλακτικά, με τυφλά άκρα. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτή αгарόζης ώστε να επαληθευτεί η πλήρης πέψη του φορέα, και στη συνέχεια ο γραμμικός φορέας υποβάλλεται σε καθαρισμό με διάλυμα PCI. Έπειτα, η αλληλουχία του DNA ύστερα από την προσθήκη του ενζύμου λιγάση, ενσωματώνεται στον πλασμιδιακό φορέα και ακολούθως εισάγεται μέσω μετασχηματισμού στο βακτήριο-ξενιστή. Τα βακτήρια καλλιεργούνται και οι βακτηριακοί κλώνοι που περιέχουν τον φορέα συνεχίζουν να αναπτύσσονται με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Τα βακτηριακά στελέχη που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται, με ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό των αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας DNA που έχει ενσωματωθεί σε αυτά.

2.2.6.1.1 Δημιουργία φορέα γραμμικής μορφής (linearization) - Αποφωσφορυλίωση

Με χρήση της κατάλληλης περιοριστικής ενδονουκλεάσης, ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας υφίσταται πέψη στις αντίστοιχες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου, ούτως ώστε να παραληφθεί στη γραμμική του μορφή. Για μια τυπική αντίδραση, σε σωλήνα erpendorf 1.5 mL προστίθεται το πλασμιδιακό DNA (~15 µg), την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση (10-15 U/µL, 1U ανά µg DNA), το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, και ο υπόλοιπος όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με ddH₂O. Ακολούθως το μίγμα επωάζεται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 2h.

Για την αποφυγή της επανακυκλοποίησης του φορέα ακολουθεί αντίδραση αποφωσφορυλίωσης, σύμφωνα με την οποία πραγματοποιείται υδρόλυση των φωσφορικών ομάδων στα 5' άκρα του γραμμικού μορίου DNA. Με αυτόν τον τρόπο βελτιστοποιείται και η απόδοση της κλωνοποίησης. Για τις ανάγκες της αντίδρασης, στο σωλήνα erpendorf προστίθεται 1 µL αλκαλικής φωσφατάσης εντέρου μόσχου CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Thermo Fischer Scientific, USA (1 u/µL), και το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 10'. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85 °C για 15' και καθαρισμός (βλ. §2.2.3), ενώ τέλος γίνεται φωτομετρικός ή/και ηλεκτροφορητικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA.

2.2.6.1.2 Φωσφορυλίωση ενθέματος μέσω χρήσης φωσφορυλιωμένων εκκινητών

Με την φωσφορυλίωση των εκκινητών της PCR πριν την ενίσχυση του ενθέματος καθίσταται δυνατή η σύνδεση των άκρων της επιθυμητής αλληλουχίας με αυτά του αποφωσφορυλιωμένου γραμμικού πλασμιδιακού φορέα που θα χρησιμοποιηθεί για την κλωνοποίηση. Για μια τυπική αντίδραση, σε σωλήνα erpendorf 1.5 mL προστίθεται το DNA των εκκινητών (~15 µg), την κινάση T4 PNK (10U/µL, 1U ανά µg DNA), το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, και ο υπόλοιπος όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με ddH₂O. Ακολούθως το μίγμα επωάζεται στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για 1h. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου στους 75 °C για 10' και καθαρισμός (βλ. §2.2.3). Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί φωσφορυλίωση του προϊόντος της PCR.

2.2.6.1.3 Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)

Για να ενωθεί το ένθεμα με τον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσής τους (ligation) με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Μέσω της DNA λιγάσης, παρουσία ATP, μπορεί να επανασηματισθεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός του σκελετού κάθε αλυσίδας μεταξύ συμβατών 5'-φωσφορικών και 3'-υδροξυλικών DNA άκρων, τόσο στην περίπτωση που τα 2 άκρα είναι κολλώδη και συμπληρωματικά (sticky, cohesive), όσο και όταν αυτά είναι τυφλά (blunt). Για μια τυπική αντίδραση, σε σωλήνα erppendorf 1,5 mL προστίθεται το πλασμιδιακό DNA (~15 μg), το DNA του ενθέματος, η T4 DNA λιγάση (2.5 U/μL, 1U ανά μg DNA), το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, ATP (10 mM), και ο υπόλοιπος όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με ddH₂O. Ακολουθως το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (για τυφλά άκρα) ή στους 16°C (για συμπληρωματικά άκρα) για 1-16h.

2.2.6.1.4 Μετασηματισμός βακτηρίων με τη μέθοδο του θερμικού σοκ

Μετασηματισμός (transformation) είναι η διεργασία με την οποία ένας οργανισμός-ξενιστής μπορεί να προσλάβει γενετικό υλικό DNA από το περιβάλλον του. Με τη διαδικασία του μετασηματισμού διασφαλίζεται ότι το κάθε μετασηματισμένο κύτταρο προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο DNA. Έτσι, και οι απόγονοι του μετασηματισμένου κυττάρου θα είναι φορείς ενός μόνο συγκεκριμένου μορίου DNA. Επομένως, ο μετασηματισμός οδηγεί σε απομόνωση και επιλεκτική ενίσχυση ενός μορίου DNA έναντι άλλων. Με σκοπό το μετασηματισμό των «επιδεκτικών» βακτηρίων του στελέχους DH5a™ που ανήκει στο είδος *E. coli* με το επιθυμητό πλασμίδιο ακολουθείται η εξής πειραματική πορεία:

Πειραματική πορεία:

- 1) Το μίγμα της αντίδρασης σύνδεσης για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου προστίθεται σε 100 μL επεξεργασμένων βακτηρίων DH5a™ μέσα σε σωλήνα τύπου erppendorf (1.5 mL), και μαζί αφήνονται να επωαστούν για 30' στον πάγο.
- 2) Στην συνέχεια ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 2,5'.
- 3) Ακολουθως, τα βακτήρια τοποθετούνται πίσω στον πάγο για 5'.

- 4) Προστίθεται 1 mL θρεπτικού υλικού LB και το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 1h.
- 5) Γίνεται φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 3000 rpm για 5'.
- 6) Τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο και παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (εδώ, αμπικιλίνη 100 µg/mL) στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα το επιθυμητό πλασμίδιο. Η επίστρωση γίνεται με την βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου.

Σημείωση: Στην περίπτωση μετασχηματισμού των DH10B βακτηριακών στελεχών πριν την επίστρωση των βακτηρίων, τα τρυβλία [παρουσία καναμυκίνης (50 µg/mL), τετρακυκλίνης (10 µg/mL) και γενταμυκίνης (7 µg/mL)] εμποτίζονται από διάλυμα που περιέχει IPTG 1M και X-Gal 40 mg αραιωμένα σε LB.

- 7) Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C για 16h.
Σημείωση: Στην περίπτωση μετασχηματισμού των DH10B βακτηριακών στελεχών, η επώαση διαρκεί έως και για 48h.

2.2.6.1.5 Επιλογή αποικιών και υγρή καλλιέργεια

- 1) Σε σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 15 mL προστίθενται 3 mL θρεπτικού υλικού LB σε συνδυασμό με το κατάλληλο αντιβιοτικό (στο παρόν πείραμα, αμπικιλίνη 100 µg/mL).

Σημείωση: Στην περίπτωση των DH10B βακτηριακών στελεχών, προστίθεται καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 µg/mL.

- 2) Με τη χρήση αποστειρωμένου ρύγχους, επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες από τις στερεές καλλιέργειες, οι οποίες εμβολιάζονται στους σωλήνες.
- 3) Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C, υπό συνεχή ανάδευση στις 200 rpm για 16h.

2.2.6.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini Prep)

Οι υγρές καλλιέργειες συλλέγονται και ακολούθως πραγματοποιείται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep) με τη μέθοδο της Αλκαλικής Λύσης.

Πειραματική Πορεία:

- 1) Μέρος της καλλιέργειας μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf (1,5 mL) και φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 5'.
- 2) Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αφαιρείται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 µL παγωμένου Διαλύματος I (βλ. § 2.1.2), στο οποίο έχει γίνει προσθήκη RNάσης A (100 µg/mL, AppliChem GmbH, Germany), με σύντομη μηχανική ανάδευση.
- 3) Έπειτα, προστίθενται 250 µL Διαλύματος II, ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα και το μίγμα αφήνεται στον πάγκο για 3-5' έως ότου γίνει διαυγές.
- 4) Στη συνέχεια, προστίθενται 350 µL Διαλύματος III και ακολουθεί σύντομη μηχανική ανάδευση.
- 5) Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15'.
- 6) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και σε αυτόν προστίθενται 700 µL ισοπροπανόλης. Η ανάμιξη γίνεται με αναστροφή του σωλήνα.
- 7) Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15'.
- 8) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί προσθήκη 500 µL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% στο ίζημα.
- 9) Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13,000 rpm για 15'.
- 10) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5'.
- 11) Τέλος, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε 50 µL ddH₂O.

2.2.6.1.7 Πολλαπλασιασμός του κλώνου και απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi prep)

Μετά την ταυτοποίηση του επιθυμητού κλώνου μέσω πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός αυτού εμβολιάζοντας το υπόλοιπο ήμισυ της καλλιέργειας (1.5 mL) σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (π.χ. αμπικιλίνη 100 µg/mL).

Πειραματική Πορεία:

- 1) Η υγρή καλλιέργεια εμβολιάζεται σε 20 mL LB μέσα σε σωλήνα τύπου falcon χωρητικότητας 50 mL, και τοποθετείται σε κλίβανο επώασης στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 220 rpm για 16h.
- 2) Η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 7,500 rpm για 5'.
- 3) Μετά τη φυγοκέντρωση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 400 µL Διαλύματος I (G.E.T.).
- 4) Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 2 mL και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- 5) Στο μίγμα προστίθενται 800 µL φρέσκου Διαλύματος II και ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή. Το δείγμα αφήνεται στους 4 °C για 10'.
- 6) Στη συνέχεια, προστίθενται 650 mL Διαλύματος III, και ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα. Το δείγμα αφήνεται στους 4 °C για 10'.
- 7) Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 20'.
- 8) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο τύπου σωλήνα erpendorf (2 mL) και σε αυτό προστίθενται 15 µL RNάσης A (10 mg/mL, AppliChem GmbH, Germany). Το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 20'.
- 9) Ακολούθως, το δείγμα διαμοιράζεται ισομερώς σε 2 σωλήνες τύπου erpendorf (2 mL).
- 10) Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 700 µL διαλύματος PCI και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5'.
- 11) Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, και σε αυτούς προστίθενται 700 µL διαλύματος PCI και φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5'.
- 12) Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται σε αυτά 700 µL χλωροφορμίου και φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 5'.
- 13) Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται σε αυτά 800 µL αιθανόλης 100% και ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή.
- 14) Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C για 5-10' και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις 12,000 rpm για 20'.

- 15) Τα υπερκείμενα απορρίπτονται, και στο κάθε ίζημα προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12,000 rpm για 5'.
- 16) Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και τα ιζήματα αφήνονται να στεγνώσουν.
- 17) Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 80 μL ddH₂O και το περιεχόμενο των δύο σωλήνων ενοποιείται σε έναν.
- 18) Στα δείγματα προστίθενται 20 μL NaCl 4 M και 100 μL 13% PEG-8000, και ακολούθως διατηρούνται στους 4 °C για 2-16h.
- 19) Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12,000 rpm για 15-20'.
- 20) Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και στα ιζήματα (που δεν είναι ορατά) προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 5'.
- 21) Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 80-100 μL ddH₂O συνολικά.

2.2.6.1.8 Αλληλούχιση πλασμιδιακού DNA

Για την επιβεβαίωση της ταυτότητας της αλληλουχίας του κλωνοποιημένου ενθέματος, αλλά και την εντόπιση τυχόν σημειακών λαθών στην αμινοξική αλληλουχία του κλωνοποιημένου γονιδίου τα οποία θα αλλοιώσουν την ταυτότητα της αλληλουχίας, πραγματοποιείται DNA αλληλούχιση (sequencing) του πλασμιδίου που απομονώθηκε. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται σε εργαστήρια ιδιωτικής εταιρείας (Eurofins Scientific, Luxembourg). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των αλληλουχιών πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος BioEdit (USA) και του SnapGene (GSL Biotech LLC, USA).

2.2.6.2 Κλωνοποιήσεις ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης τον πλασμιδιακό φορέα pEA

Ο πλασμιδιακός φορέας pEA χρησιμοποιείται, σε συστήματα Λεπιδοπτέρων με σκοπό την ενισχυμένη έκφραση του επιθυμητού ενθέματος. Ο pEA θεωρείται ένας από τους καταλληλότερους φορείς για αυτήν τη διαδικασία καθώς ενισχύει κατά 100 φορές την συστατική έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου (136). Ο φορέας αυτός περιλαμβάνει τον υποκινητή της κυτταροπλασματικής ακτίνης A3 του *Bombyx mori*, την περιοχή hr3

(αλληλουχία ενίσχυσης της ομόλογης περιοχής 3 του μπακουλοϊού BmNPV (136)), μία θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (multiple cloning site, MCS) καθώς και τη μη-μεταφραζόμενη 3' περιοχή του γονιδίου της ακτίνης του *Bombyx mori* που διαθέτει σήματα πολυαδενυλίωσης (137).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) του επιθυμητού γονιδίου κλωνοποιείται μεταξύ της θέσης του ενισχυτή της ακτίνης A3 και της poly-[A]⁺ περιοχής της ακτίνης. Στο 5' ή το 3' άκρο του γονιδίου δύναται να προστεθεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντιστοιχεί σε έναν ή περισσότερους επιτόπους (Myc, His ή Flag) έτσι ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευση της έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου μέσω ανοσοαποτύπωσης Western με χρήση κατάλληλου αντισώματος (137).

Προκειμένου η κλωνοποίηση να γίνει εντός πλαισίου ανάγνωσης συμπεριλαμβανομένου του αμινοτελικού ή καρβοξυτελικού επίτοπου, οι εκκινητές ευθείας κατεύθυνσης (F, forward) που χρησιμοποιούνται για την κλωνοποίηση εξυπηρετείται να είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να περιέχουν μία θέση κλωνοποίησης *Bgl*III. Για την περίπτωση ενός καρβοξυτελικά σημασμένου φορέα pEA, το ίδιο ισχύει και για τους εκκινητές αντίστροφης κατεύθυνσης (R, reverse). Επιπλέον, οι εκκινητές ευθείας κατεύθυνσης περιέχουν την αλληλουχία Kozak (138) και το κωδικόνιο έναρξης ATG.

2.2.7 Υπολογισμός κυτταρικού πληθυσμού

Για τον υπολογισμό του κυτταρικού πληθυσμού στα δείγματα χρησιμοποιείται χρωστική Trypan Blue η οποία βάφει μόνο τα νεκρά κύτταρα μπλε καθώς δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά καταμετρούνται σε αιματοκυτόμετρο (Bright-Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA) στο οπτικό μικροσκόπιο.

Πειραματική πορεία:

- 1) Σε σωληνάριο 1.5 ml τύπου Eppendorf αναμινύονται 30 μ L από την κυτταροκαλλιέργεια με 120 μ L από διάλυμα της χρωστικής Trypan Blue σε PBS 1x (αραίωση 1:5), και ακολουθεί καλή μηχανική ανάδευση.
- 2) Μέρος του αραιωμένου κυτταρικού διαλύματος φορτώνεται στο αιματοκυτόμετρο.

- 3) Ακολουθεί παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο και γίνεται καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε πέντε από τα οριοθετημένα τετράγωνα εμβαδού 1 mm².
- 4) Τελικά, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:
Συνολικός αριθμός κυττάρων = [(αριθμός καταμετρημένων κυττάρων)/5] x (παράγοντας αραιώσης) x 10⁴

2.2.8 Υπολογισμός ιικού τίτλου και μέσης λοιμογόνου δόσης (TCID₅₀)

Ο προσδιορισμός του ιικού τίτλου του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-B2-GFP/dsLuc έγινε με τη μέθοδο Reed-Müench (139). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, αρχικά, κύτταρα (εδώ Hi5) μολύνονται με τον προς τιτλοδότηση ιό και, μετά από 7 ημέρες, το υπερκείμενο της καλλιέργειας συλλέγεται κατόπιν φυγοκέντρωσης. Για τις ανάγκες της τιτλοδότησης, ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού υπερκειμένου.

Στη συνέχεια, κύτταρα Hi5 επιστρώνονται σε μικροπλάκες των 96 βοθρίων (10⁴ κύτταρα ανά βοθρίο) που περιέχει 90 μL θρεπτικού μέσου. Έπειτα, σε κάθε βοθρίο προστίθενται 10 μL υπερκειμένου μολυσμένου με τον ιό. Εφαρμόζονται 8 διαδοχικές αραιώσεις (10⁻¹ έως 10⁻⁸), ενώ σε κάθε αραιώση αντιστοιχούν 10 βοθρία. Ακολουθεί επώαση της μικροπλάκας έως και για 3 ημέρες. Η έκταση της ιικής μόλυνσης προσδιορίζεται έπειτα από συστηματική παρακολούθηση και καταγραφή των βοθρίων που περιέχουν μολυσμένα κύτταρα, μέσω έκφρασης της πρωτεΐνης GFP.

Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, γίνονται οι εξής υποθέσεις: α) θεωρείται ότι όλα τα βοθρία που έχουν μολυνθεί με συγκεκριμένη αραιώση ιού θα είχαν μολυνθεί και στις χαμηλότερες αραιώσεις, και β) θεωρείται ότι όλα τα κύτταρα που βρέθηκαν υγιή σε βοθρία με συγκεκριμένη αραιώση θα είχαν επίσης παραμείνει υγιή και σε όλες τις μεγαλύτερες αραιώσεις. Για τον υπολογισμό της μέσης λοιμογόνου δόσης του ιού για την κυτταροκαλλιέργεια (tissue culture infectious dose, TCID₅₀), αρχικά προσδιορίζονται οι δύο αραιώσεις μεταξύ των οποίων έχει μολυνθεί το 50% των κυττάρων. Έτσι, ως «Α» ορίζεται το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων στη μεγαλύτερη αραιώση που παρατηρούνται μολυσμένα κύτταρα >50%, ενώ ως «Β» το ποσοστό μολυσμένων κυττάρων στην ακριβώς επόμενη αραιώση. Ο υπολογισμός της TCID₅₀ γίνεται ως εξής: $\log TCID_{50} = -(\text{ο βαθμός}$

αραίωσης που αντιστοιχεί στο «Α») - PD, και $TCID50 = 10 \log TCID50$. Έπειτα υπολογίζεται ο ιικός τίτλος (virus titer) = $1/TCID50$. Τέλος, γίνεται μετατροπή σε μονάδες σχηματισμού πλάκας (plaque forming units, pfu) ανά mL: $pfu/mL = 0,69 \times TCID50$.

2.2.9 Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων

Η παροδική διαμόλυνση (transient transfection) κυτταρικών σειρών μπορεί να γίνει με ποικιλία μεθόδων διαμόλυνσης που περιλαμβάνουν φυσικές, χημικές και βιολογικές τεχνικές. Οι παροδικές τεχνικές περιλαμβάνουν την εισαγωγή του DNA στα κύτταρα, αλλά σε αυτή τη μέθοδο, το DNA δεν ενσωματώνεται στα κυτταρικά χρωμοσώματα. Αυτή η τεχνική διευκολύνει τις υψηλές αποδόσεις διαμόλυνσης και τα μετάγραφα των γονιδίων μπορούν να αναλυθούν μετά από μια περίοδο 1-4 ημερών. Μερικές από τις κοινώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαμόλυνσης περιλαμβάνουν την κατακρήμνιση με φωσφορικό ασβέστιο, τη διαμόλυνση με μεσολάβηση λιποσώματος (λιποδιαμόλυνση), την ηλεκτροδιάτρηση και την ιογενή διαμόλυνση. Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικές κυτταρικές σειρές μπορεί να εμφανίσουν διαφορετική επιδεκτικότητα στις μεθόδους παροδικής διαμόλυνσης.

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο διαμόλυνσης Escort™ IV (Sigma-Aldrich GmbH, Germany), το οποίο είναι μια μοναδική σύνθεση ενός αποκλειστικού πολυκατιονικού λιπιδίου και ενός ουδέτερου λιπιδίου. Η διαδικασία βασίζεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ του πλασμιδιακού DNA και του λιπιδικού αντιδραστηρίου, το οποίο προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια και προσλαμβάνεται από το κύτταρο, πιθανώς με ενδοκύτωση, απελευθερώνοντας το DNA στο κυτταρόπλασμα.

Πειραματική πορεία:

- 1) Σε μικροπλάκα καλλιέργειας των 24 βοθρίων επιστρώνονται $2,5 \times 10^5$ κύτταρα Λεπιδοπτέρων ανά βοθρίο σε τελικό όγκο 500 μ L θρεπτικού υλικού και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30- 45'.
- 2) Διαμόλυνση:

- Σε σωλήνα τύπου errendorf αναμιγνύονται 2-4 μL Escort™ IV με 90 μL απλού IPL-41 για το κάθε μικροβοθρίο, και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30'.
- Προετοιμάζεται από ένας σωλήνας τύπου errendorf για κάθε μικροβοθρίο, όπου προστίθενται 1.0-2.5 μg νουκλεϊκών οξέων σε 90 μL απλού IPL-41, και αφήνονται στους 4 °C. Γίνεται ανάμιξη των δυο σωληναρίων και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30' ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα του μίγματος διαμόλυνσης.
- Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τα κύτταρα και προσθήκη 300 μL απλού IPL-41 στο τοίχωμα του βοθρίου. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά, ώστε να ξεπλυθούν τα κύτταρα από τυχόν υπολείμματα ορού.
- Το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται και αντίστοιχα προστίθενται 180 μL μίγματος διαμόλυνσης ανά βοθρίο.
- Γίνεται απαλή περιστροφή των μικροπλακών ώστε να κατανεμηθούν τα σύμπλοκα ομοιόμορφα στα βοθρία.
- Ακολουθεί επώαση των κυττάρων 5-18 ώρες στους 28 °C.
- Το μίγμα διαμόλυνσης έπειτα αντικαθίσταται από 500 μL θρεπτικού υλικού ILP-41 που περιέχει ορό FBS 10% ανά βοθρίο. Επιπλέον, προς αποφυγή κυτταρικών μολύνσεων λόγω της διαδικασίας της διαμόλυνσης, στο θρεπτικό υλικό προστίθεται το αντιβιοτικό γενταμικίνη (Gibco, USA) σε τελική συγκέντρωση 50 μg/mL. Τελικά, τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν συνήθως για 24 - 72 ακόμη ώρες στους 28 °C.

2.2.10 Συλλογή και απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων

Για τις ανάγκες των πειραμάτων μελέτης της πρωτεϊνικής έκφρασης, τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί συλλέγονται και λύονται ως εξής:

- 1) Δύο με τρεις ημέρες μετά από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνα τύπου errendorf.
- 2) Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 5'.
- 3) Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάριο τύπου errendorf (βλ. §2.2.10), ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε PBS 1x.

- 4) Ακολουθεί ένας κύκλος ψύξης (στους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30') και γρήγορης απόψυξης (σε θερμοκρασία δωματίου) ώστε να διευκολυνθεί η κυτταρική λύση.
- 5) Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 10' όπου γίνεται διαχωρισμός του υπερκειμένου (διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα) από το ίζημα (μη διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα).
- 6) Ακολούθως, τα δείγματα ελέγχονται μέσω SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης Western (βλ. §2.2.11), ανοσοαποτύπωμα κηλίδας (βλ. §2.2.12) ή PCR.

2.2.11 Συμπύκνωση υπερκειμένου κυτταροκαλλιιεργειών

Με σκοπό τον έλεγχο του υπερκειμένου από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών για την τυχόν ανίχνευση σε αυτά της εκάστοτε μελετούμενης πρωτεΐνης, η οποία αναμένεται εφόσον υπάρχει να είναι σε χαμηλή συγκέντρωση, μετά τη συλλογή τους τα δείγματα συμπυκνώνονται μέσω του μηχανήματος miVac Modular Concentrator Series (Genevac Inc). Το miVac είναι μια φυγόκεντρος συμπύκνωσης η οποία χρησιμοποιεί το σύστημα αντλίας κενού και επιτρέπει την απομάκρυνση νερού ή οργανικών διαλυτών από το δείγμα. Καθώς μειώνεται η ατμοσφαιρική πίεση, μειώνεται επίσης το σημείο βρασμού ενός διαλύτη. Όταν η πίεση είναι αρκετά χαμηλή, ο διαλύτης βράζει, επιτρέποντας την αφαίρεση των διαλυτών σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, ανάλογα με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται και το επίπεδο κενού που εφαρμόζεται. Για να αποφευχθεί ο βρασμός του δείγματος που εξατμίζεται ή η ανεξέλεγκτη εξαγωγή του υλικού, τα δείγματα περιστρέφονται σε φυγόκεντρο. Η παραγόμενη δύναμη g είναι αρκετή για να διατηρήσει κάθε δείγμα στο δικό του σωλήνα. Τα δείγματα τα οποία βρίσκονται σε σωληνάκια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL, τοποθετούνται σε έναν ρότορα μέσα στον θάλαμο κενού. Ο ρότορας περιστρέφεται, η αντλία κενού ενεργοποιείται και, εάν απαιτείται, η συγκέντρωση θερμότητας σε ταχύτητα παρέχεται από ηλεκτρικούς θερμαντήρες στο τοίχωμα της φυγοκέντρου. Οι ατμοί διαλύτη που βράζουν από τα δείγματα αντλούνται στη συνέχεια από την αντλία κενού. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας εργασίας ήταν συμπύκνωση στους 50°C για 3 έως 6 ώρες. Ακολούθως, τα δείγματα ελέγχονται μέσω SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωσης Western (βλ. §2.2.11).

2.2.12 Αποδιατακτική SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση Western

Οι πρωτεΐνες εμφανίζουν ποικιλομορφία ως προς το μέγεθος, το φορτίο, το σχήμα, τον υδρόφοβο χαρακτήρα και τη συγγένειά τους για άλλα μόρια. Αυτές οι ιδιότητες μπορούν να αξιοποιηθούν για να διαχωριστούν η μία από την άλλη και να μελετηθούν περαιτέρω. Μια συχνή τακτική είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης παρουσία του απορρυπαντικού δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS), μια τεχνική που ονομάζεται SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis). Σε αυτήν την τεχνική, το SDS χρησιμεύει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες σχηματίζουν σύμπλοκο με τα ηλεκτραρνητικά μόρια του SDS σε αναλογία ένα μόριο SDS ανά δυο αμινοξέα. Το ηλεκτραρνητικό φορτίο των μορίων SDS που προσδένονται στις πρωτεΐνες υπερκαλύπτει το φυσιολογικό φορτίο της πρωτεΐνης, και έτσι μεταναστεύουν με τη μορφή ενός ηλεκτρικά φορτισμένου συμπλόκου SDS-πρωτεΐνης διαμέσου της πορώδους πηκτής πολυακρυλαμίδης, με ταχύτητα που αντανακλά μόνο το μοριακό βάρος τους. Για τη διάσπαση των δισουλφυδρυλικών δεσμών -S-S- που υπάρχουν μέσα ή μεταξύ των πρωτεϊνών συνήθως προστίθεται και ένας αναγωγικός παράγοντας όπως η μερκαπτοαιθανόλη. Οι πρωτεΐνες με μικρό μοριακό βάρος κινούνται ταχύτατα δια μέσου της πηκτής, ενώ αυτές με μεγάλο μοριακό βάρος παραμένουν στην κορυφή της πηκτής.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται με την τεχνική ανοσοπροσδιορισμού που ονομάζεται ανοσοαποτύπωμα Western (Western Blotting), η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων μιας πρωτεΐνης σε κύτταρα ή σε κάποιο βιολογικό δείγμα γενικότερα. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν μεταφέρονται σε μεμβράνη πολυμερούς (στυπώνονται) με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος και στη συνέχεια σημαίνονται με επισημασμένα αντισώματα.

Πειραματική πορεία:

1) Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμίδης.

- Ειδικές γυάλινες πλάκες ορισμένου πάχους τοποθετούνται με προσοχή στην κατάλληλη συσκευή, ώστε να δημιουργηθεί στεγανό εκμαγείο που θα δεχθεί το υγρό μίγμα της πηκτής.

- Σε ξεχωριστούς σωλήνες τύπου falcon 50 mL παρασκευάζονται τα μίγματα των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβασης, σύμφωνα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα εξεταστούν. Το APS και το TEMED προστίθενται λίγο πριν την τοποθέτηση στο ήδη έτοιμο εκμαγείο.

Πηκτή διαχωρισμού				
	10%	12%	15%	18%
Συστατικό	Ποσότητα (mL)			
30% ακρυλαμίδη	3.3	4	5	6
ddH₂O	4.1	3.4	2.4	1.4
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5	2.5	2.5	2.5
10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.1
10% APS	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συγκεντρώσεις ουσιών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού.

- Το μίγμα (**Πίνακας 1**) προστίθεται στο καλούπι και η επιφάνειά του καλύπτεται με 100% EtOH για την αποφυγή ξήρανσής του λόγω του αέρα.
- Το μίγμα επώαζεται για 30' στους 37°C.
- Απορρίπτεται η EtOH.

Πηκτή επιστοίβασης	
Συστατικό	Ποσότητα (mL)
30% ακρυλαμίδη	0.67
ddH₂O	2.2
0,5 M Tris-HCL (pH 6.8)	1
10% SDS	0.04
10% APS	0.04
TEMED	0.004

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Συγκεντρώσεις ουσιών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης.

- Μέσα στο εκμαγείο, προστίθεται το μίγμα για την πηκτή επιστοίβασης (**Πίνακας 2**) επάνω στην πηκτή διαχωρισμού που έχει ήδη πήξει.
- Ακολούθως, τοποθετείται το κατάλληλο χτενάκι για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης.
- Το μίγμα επωάζεται για 30' στους 37 °C.

2) Προετοιμασία δειγμάτων για φόρτωση και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

- Στα κυτταρικά εκχυλίσματα (διαλυτό και μη διαλυτό κλάσμα) που απομονώθηκαν (βλ. §2.2.9) καθώς και τα συμπυκνωμένα υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών (βλ. §2.2.10), αντίστοιχα, προστίθεται αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Cracking Buffer) σε αναλογία 20 μL δείγμα : 10 μL αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα.
- Τα δείγματα των κυτταρικών εκχυλισμάτων σφραγίζονται και θερμαίνονται στους 100° C για 5-15' με σκοπό τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.
- Έπειτα, τα δείγματα εισάγονται στις ειδικές θέσεις φόρτωσης της πηκτής επιστοίβασης μέσα σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, ενώ σε μία θέση ακόμα φορτώνεται ο δείκτης πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (PiNK ή BlueStar prestained protein ladder, Nippon Genetics Europe GmbH, Germany).
- Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση (συνθήκες: 120 V, 350 mA) για περίπου 1.5h, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer 1x).

3) Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

- Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Nitrocellulose Blotting Membrane, Amersham™ Protran™ 0.45 μm NC, GE Healthcare Life science) εντός ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer 1x) στα 100 V για 2h. Στη συσκευή μεταφοράς τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά: ένα ειδικό σφουγγάρι μεγάλου πάχους, ένα χαρτί Whatman 3MM, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα ακόμη χαρτί Whatman 3MM, και ένα ακόμη ειδικό σφουγγάρι μεγάλου πάχους. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βρίσκεται προς τη πλευρά του θετικού πόλου (κόκκινος πόλος) και η πηκτή προς τη πλευρά του αρνητικού πόλου (μαύρος πόλος).

4) Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών στη μεμβράνη

- Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα δέσμησης που περιέχει πρωτεΐνη γάλακτος 10% σε PBS-T 1x (blocking buffer) για 45' υπό συνεχή ανακίνηση με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος.
- Απορρίπτεται το διάλυμα και στη μεμβράνη προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα που ανιχνεύει τον επίτοπο της μελετούμενης πρωτεΐνης (στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα anti-Myc 1:1000 και anti-vp39 1:1000) για 16h σε ψυχρό περιβάλλον (4 °C), υπό συνεχή ανακίνηση.
- Ακολουθούν 3 σύντομες πλύσεις των 5' σε 1x PBS-T.
- Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 1h με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP [εδώ, anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase (HRP), Chemicon, 1:1000].
- Ακολουθούν 2 πλύσεις των 10' και 2 πλύσεις των 20' σε 1x PBS-T.

5) Εμφάνιση πρωτεϊνών

- Η μεμβράνη επωάζεται για 1' με το μίγμα (1:1), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα για την παραγωγή χημειοφωταύγειας από τη συζευγμένη HRP ECL (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific™).
- Η χημειοφωταύγεια ανιχνεύεται και μετριέται από το σύστημα απεικόνισης LAS-4000 (Fujifilm, Japan).
- Η επεξεργασία των φωτογραφιών πραγματοποιείται με το πρόγραμμα AIDA Image Analysis.

6) Αφαίρεση προσδεμένων αντισωμάτων από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Στην περίπτωση μελέτης της μεμβράνης με διαφορετικό αντίσωμα για την ανίχνευση μίας διαφορετικής πρωτεΐνης (re-probing), ακολουθείται η διαδικασία της αφαίρεσης των προσδεμένων αντισωμάτων από την υπάρχουσα μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping). Η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα απομάκρυνσης αντισωμάτων (Stripping

Buffer) για 30', στους 50 °C υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολουθούν δύο ξεπλύματα των 10' με PBS-T 1x σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία όπως ήδη περιγράφηκε (βλ. §2.2.11: 4 και 5).

2.2.13 Ανίχνευση dsRNA με ανοσοαποτύπωμα κηλίδας (Dot Blot)

Το ανοσοαποτύπωμα κηλίδας για την ανίχνευση RNA είναι μια τεχνική παρόμοια με την ανοσοαποτύπωση Northern. Ωστόσο, τα δείγματα RNA δεν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση. Αντ' αυτού, εντοπίζονται μέσω κυκλικών προτύπων απευθείας επάνω σε θετικά φορτισμένη από νάιλον μεμβράνη (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Οι νάιλον μεμβράνες είναι μικροπορώδεις, θετικά φορτισμένες, από καθαρό νάιλον, συνδεδεμένες με ένα υποστήριγμα πολυεστέρα. Είναι κατιονικής φύσης και διατηρούν το θετικό τους φορτίο σε μεγάλο εύρος pH. Αυτές οι μεμβράνες έχουν συνεπώς υψηλή ικανότητα δέσμησης DNA και RNA βρίσκοντας εφαρμογή σε στυπώματα Southern, Northern και Dot-Blot (140, 141). Εδώ, ο προσδιορισμός του συνολικά παραγόμενου dsRNA από τα κύτταρα πραγματοποιείται επίσης σε κυτταρικά εκχυλίσματα (διαλυτό και μη διαλυτό κλάσμα, §2.2.9) καθώς και σε συμπυκνωμένα υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών (βλ. §2.2.10).

Πειραματική πορεία:

- 1) Αρχικά, 5-10 µL από κάθε δείγμα φορτώνονται στη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματιστεί κηλίδα.
- 2) Η φορτωμένη μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει για 5-10 λεπτά.
- 3) Ακολουθεί διασταυρούμενη σύνδεση των νουκλειικών οξέων στη μεμβράνη με υπεριώδη ακτινοβολία (UV-cross linking) για 2.5'.
- 4) Η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα δέσμησης (blocking buffer) για 45' υπό συνεχή ανακίνηση με σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος.
- 5) Το διάλυμα απορρίπτεται και στη μεμβράνη προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα που ανιχνεύει δίκλωνο RNA (dsRNA) (εδώ χρησιμοποιήθηκε το J2, 1:1000, JenaBioscience) για 16h σε ψυχρό περιβάλλον (4 °C), υπό συνεχή ανακίνηση.

- 6) Ακολουθούν 3 σύντομες πλύσεις των 5' σε 1x PBS-Tween.
- 7) Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 1h με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (εδώ, anti-mouse IgG HRP, Chemicon, 1:1000).
- 8) Ακολουθούν 2 πλύσεις των 10' και 2 πλύσεις των 20' σε 1x PBS-T.
- 9) Η εμφάνιση της μεμβράνης γίνεται όπως ήδη περιγράφηκε (βλ. §2.2.11: 5).

2.2.14 Προετοιμασία δειγμάτων για συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης

Προκειμένου να μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης των υπό εξέταση ανασυνδυασμένων φθορίζουσών πρωτεϊνών σε υποκυτταρικό επίπεδο, τόσο παρουσία όσο και απουσία μόλυνσης με ανασυνδυασμένο μπακουλοϊό, έγινε η απαραίτητη προετοιμασία των δειγμάτων κυτταροκαλλιιεργειών για την επακόλουθη μικροσκοπική παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης. Ειδικότερα, οι μελετούμενες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες είναι συντηγμένες με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη RFP (red fluorescent protein) και οι ανασυνδυασμένοι μπακουλοϊοί εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (green fluorescent protein). Επιπλέον, έγινε χρώση των κυτταρικών πυρήνων με DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride, Sigma-Aldrich GmbH, Germany).

Πειραματική πορεία:

- 1) 200,000 κύτταρα απευθείας από την καλλιέργεια μεταφέρονται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες επιστρωμένες με πολυλυσίνη (poly-L-lysine coated glass slides, Sigma-Aldrich) και αφήνονται για 2h σε θερμοκρασία δωματίου ούτως ώστε να προσκολληθούν.
- 2) Στη συνέχεια γίνεται στερέωση των κυττάρων με 3.7% v/v διάλυμα φορμαλδεΐδης (σε 1x αποστειρωμένο PBS) για 5-10' σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Οι πλάκες ξεπλένονται 3 φορές με 1x αποστειρωμένο PBS.
- 4) Ακολούθως, οι μεμβράνες των κυττάρων καθίστανται διαπερατές μετά από επώαση των κυττάρων για 5-10' σε διάλυμα 0.1% v/v Triton X-100 (σε 1x αποστειρωμένο PBS).
- 5) Οι πλάκες ξεπλένονται 3 φορές με 1x αποστειρωμένο PBS.

- 6) Στη συνέχεια πραγματοποιείται πυρηνική χρώση στα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες σκότους για 5' με διάλυμα DAPI σε συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε 1x PBS.
- 7) Οι πλάκες ξεπλένονται 3 φορές με 1x αποστειρωμένο PBS.
- 8) Στις πλάκες τοποθετείται μια σταγόνα από το διάλυμα Mowiol (polyvinyl alcohol, Sigma-Aldrich GmbH, Germany) ή απο το αντιδραστήριο SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant (Invitrogen™), και τοποθετούνται καλυπτρίδες (Deckgläser, 22x22mm Cover Glass).
- 9) Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν και οι καλυπτρίδες σφραγίζονται με βερνίκι.
- 10) Οι αντικειμενοφόροι πλάκες είτε παρατηρούνται άμεσα, είτε φυλάσσονται σε ψυχρό (4 °C) και σκοτεινό περιβάλλον.
- 11) Η παρατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται αρχικά με μικροσκοπία φθορισμού σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Axiovert, Zeiss, Germany), και έπειτα με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με Laser (Leica SP8 Multiphoton Confocal System), σε συνδυασμό με το λογισμικό Leica TCS SP8 MP το οποίο δίνει τη δυνατότητα λήψης σειριακών τομών.

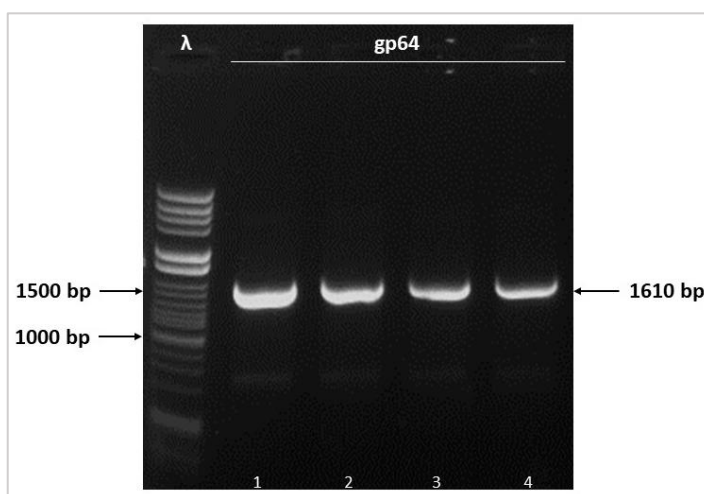
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Αποτελέσματα

3.1 Κλωνοποιήσεις

3.1.1 Κατασκευή του φορέα pEA-gr64-RFP-Myc.His

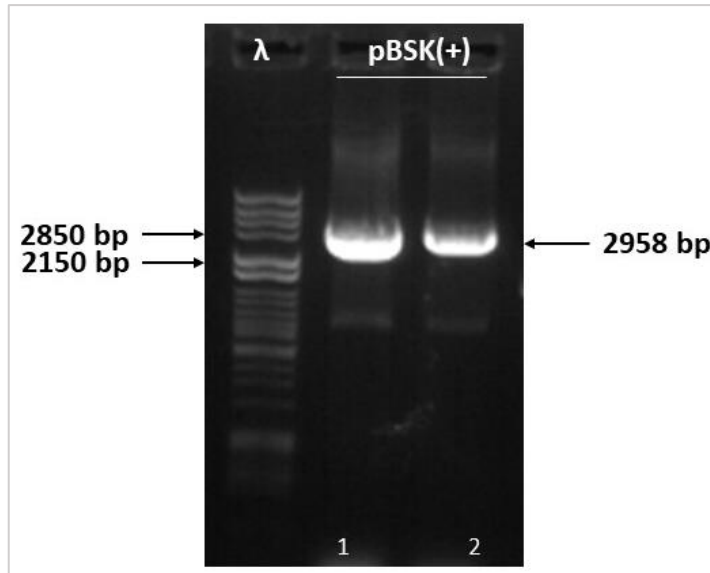
Το ORF του γονιδίου *gr64* (μήκους 1590 bp) του μπακουλοϊού AcMNPV κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pEA-RFP-Myc.His, χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο φορέα κλωνοποίησης τον pBluescript SK⁺.

Το γονίδιο αρχικά απομονώθηκε από κύτταρα Hi5 που είχαν μολυνθεί με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς (Hi5 G+L, Hi5 G/L0) με τη μέθοδο της PCR (**Εικόνα 5**). Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Phusion High-Fidelity DNA Πολυμεράση (Thermo Fisher Scientific, USA), καθώς και οι φωσφορυλιωμένοι εκκινητές GP64-F και GP64-R (**Πίνακας Π1, Π2**) οι οποίοι ήταν ειδικά σχεδιασμένοι ώστε να προσθέτουν στα άκρα του προϊόντος θέσεις αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *Bg*III, προκειμένου η αλληλουχία που ενισχύθηκε μέσω PCR να μπορεί να υποκλωνοποιηθεί τελικά στον πλασμιδιακό φορέα pEA-Myc.His.



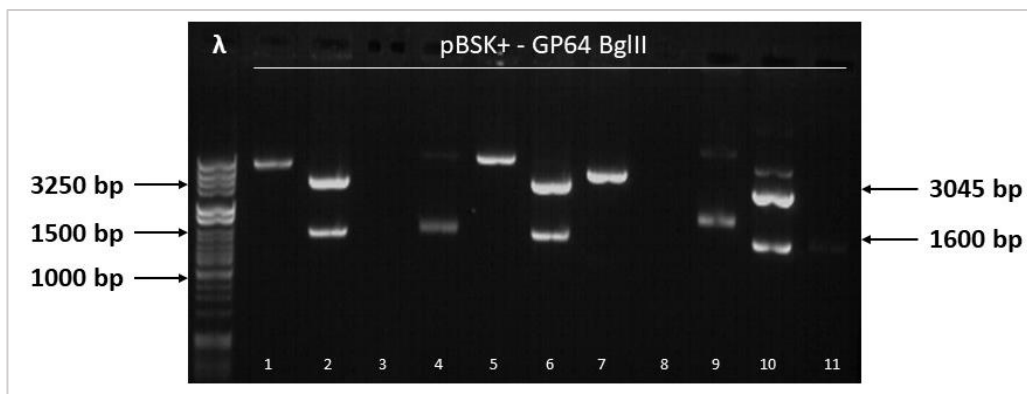
Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *gr64*. Στις διαδρομές 1-4 απεικονίζεται το φωσφορυλιωμένο προϊόν της PCR που αντιστοιχεί στο γονίδιο *gr64* που στα άκρα του φέρει θέσεις αναγνώρισης από το ένζυμο *Bg*III (*Bg*III-*gr64*-*Bg*III), μεγέθους 1610 bp, το οποίο απομονώθηκε από κύτταρα Hi5 μολυσμένα με μπακουλοϊούς.

Για την κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR στον ενδιάμεσο φορέα pBluescript SK(+), αρχικά έγινε πέψη του πλασμιδίου με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRV* (Takara Bio Inc) (**Εικόνα 6**), το οποίο αφήνει «τυφλά» άκρα.

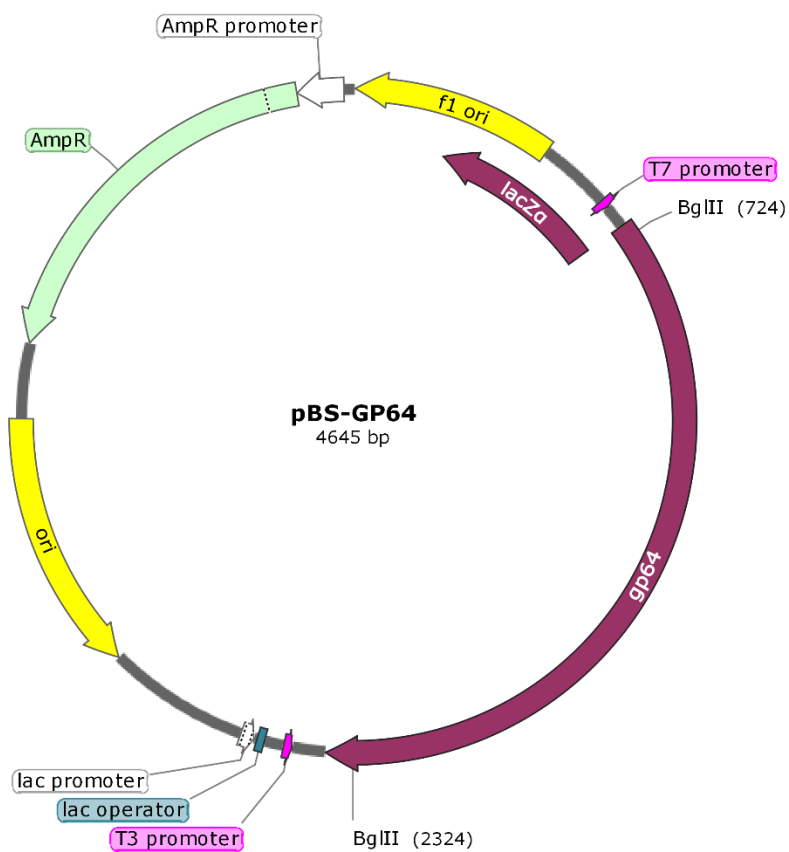


Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη του pBluescript SK(+) με το περιοριστικό ένζυμο *EcoRV*. Οι διαδρομές 1 και 2 περιέχουν τις αναμενόμενες ζώνες ύστερα από την πέψη με το *EcoRV*, μεγέθους 2958 bp.

Αφού το γραμμικό πλασμίδιο απομονώθηκε από την πηκτή, αποφωσφορυλιώθηκε και καθαρίστηκε, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης με το προϊόν της PCR *Bgl/II*-gr64-*Bgl/II* και βακτηριακός μετασχηματισμός. Μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, επαληθεύτηκε η ενσωμάτωση του ενθέματος μέσα στον φορέα, μέσω πέψης του pBluescript SK(+) – [*Bgl/II*-gr64-*Bgl/II*] με το περιοριστικό ένζυμο *Bgl/II* (**Εικόνα 7**), καθώς και μέσω αλληλούχισης, σύμφωνα με τον πλασμιδιακό χάρτη (**Εικόνα 8**).

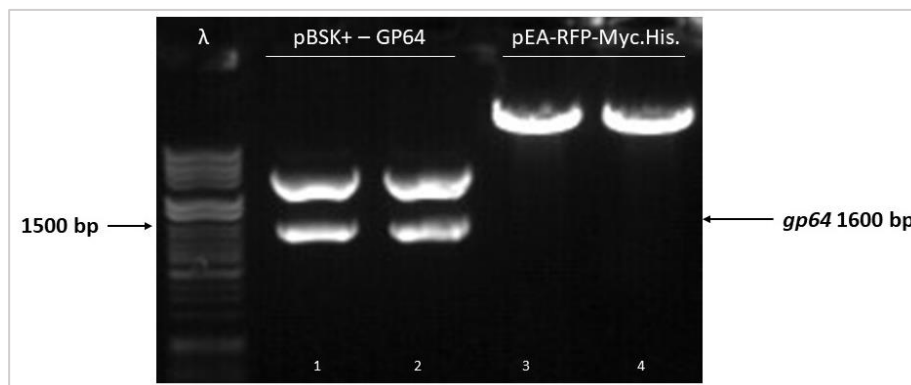


Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη του *pBluescript SK(+)* – [*Bgl*II-*gp64*-*Bgl*II] με το περιοριστικό ένζυμο *Bgl*II. Οι κλώνοι 2, 6 και 10 περιέχουν τις αναμενόμενες ζώνες ύστερα από την πέψη με το *Bgl*II, μεγέθους 3054 bp και 1600 bp.



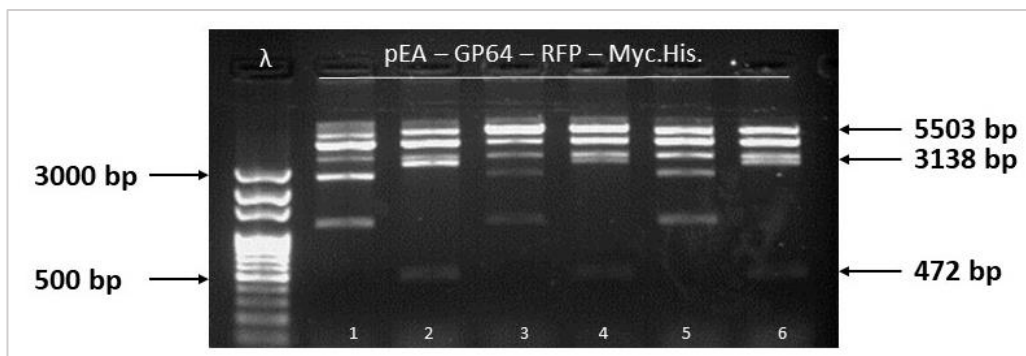
Εικόνα 8. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα *pBSK(+)* – [*Bgl*II-*gp64*-*Bgl*II].

Στη συνέχεια, για την υποκλωνοποίηση του ORF του *gp64* στον πλασμιδιακό φορέα pEA-RFP-Myc.His αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του άδειου φορέα με το ένζυμο *Bam*HI προκειμένου να δημιουργηθεί η γραμμική μορφή του φορέα με μέγεθος 6784 bp. Παράλληλα, έγινε πέψη του αλληλουχημένου κλώνου pBSK(+) – [*Bgl*II-*gp64*-*Bgl*II] με το ένζυμο *Bgl*II προκειμένου να ελευθερωθεί το ένθεμα [*Bgl*II-*gp64*-*Bgl*II] μεγέθους 1610 bp που διαθέτετε πλέον κολλώδη άκρα (**Εικόνα 9**).

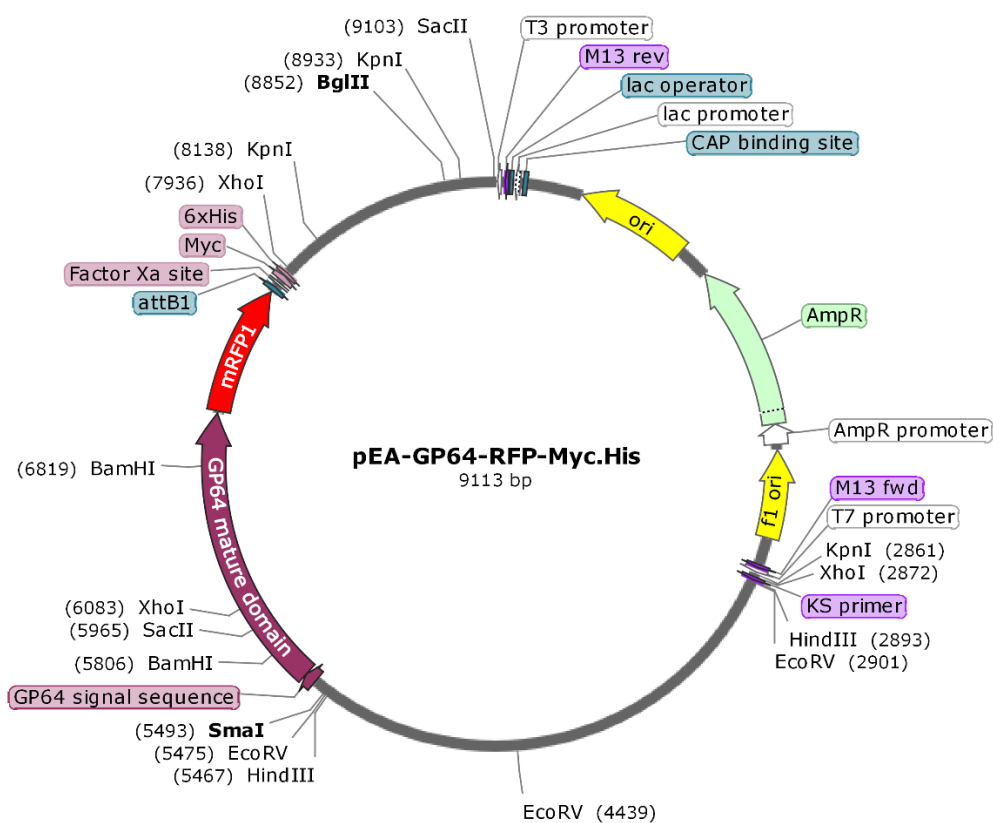


Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη των φορέων pEA-RFP-Myc.His και pBluescript SK(+) – [*Bgl*II-*gp64*-*Bgl*II] με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Bgl*II, αντίστοιχα. Οι διαδρομές 1 και 2 περιέχουν τα θραύσματα του φορέα pBSK(+) – GP64 ύστερα από την πέψη με *Bgl*II, μεγέθους 3045 bp και 1600 bp. Αντίστοιχα, οι διαδρομές 3 και 4 περιέχουν τα θραύσματα του φορέα pEA-RFP-Myc.His ύστερα από την πέψη με *Bam*HI μεγέθους 6784 bp.

Καθώς τα άκρα που προκύπτουν κατόπιν πέψης με τα ένζυμα *Bam*HI και *Bgl*II είναι συμβατά μεταξύ τους, μετά τον καθαρισμό των ζωνών που απομονώθηκαν από την πηκτή το θραύσμα [*Bgl*II-*gp64*-*Bgl*II] υποκλωνοποιήθηκε μέσω αντίδρασης σύνδεσης στο φορέα pEA-RFP-Myc.His. Από τα βακτήρια που μετασηματίστηκαν απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA, και ακολούθως για τον έλεγχο ενσωμάτωσης του ORF του *gp64* στο φορέα, καθώς και τον έλεγχο του προσανατολισμού του ενθέματος, πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Sma*I και *Sac*II (**Εικόνα 10**) σύμφωνα με τον πλασμιδιακό χάρτη (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη ελέγχου των κλώνων pEA-grp64-RFP-Myc.His. Οι κλώνοι 2, 4 και 6 περιέχουν το ORF του grp64 στον επιθυμητό προσανατολισμό, καθώς από την πέψη με τα *SmaI* και *SacII* προκύπτουν οι αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 5503 bp, 3138 bp και 472bp.

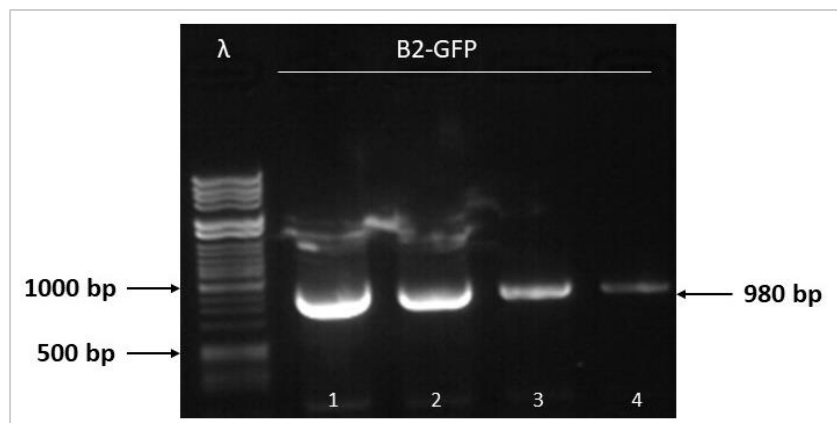


Εικόνα 11. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pEA – grp64 – RFP – Myc.His.

3.1.2 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP

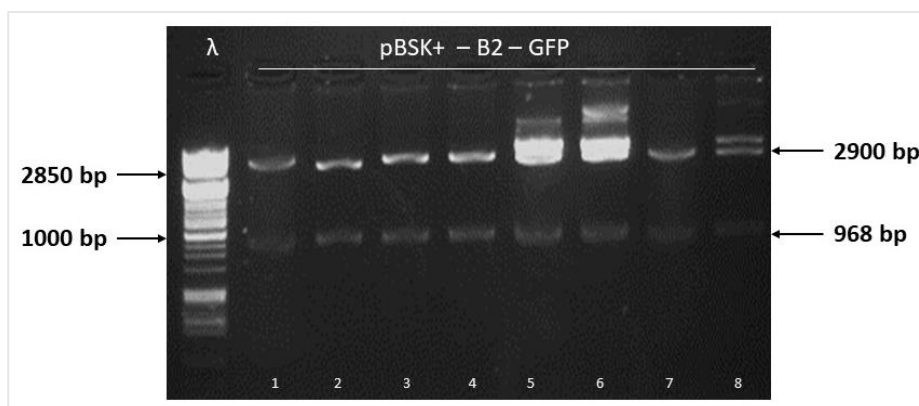
Με σκοπό να κατασκευαστεί ο ανασυνδυασμένος ιός AcMNPV-dsLuc/B2-GFP που παράγει βιοφθορισμό, έγινε ενσωμάτωση της φουρκέτας dsLuc έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης και των συντηγμένων γονιδίων B2-GFP στο γονιδίωμα του ιού AcMNPV με χρήση του συστήματος Bac-to-Bac® (Invitrogen, USA). Στον ιό αυτό η αλληλουχία της φουρκέτας dsLuc εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πολυεδρίνης, ενώ το γονίδιο *B2-GFP* υπό τον έλεγχο του υποκινητή *p10*. Για τη κατασκευή του ιού, αρχικά δημιουργήθηκε ο φορέας pFastBac-Dual – dsLuc/B2-GFP που περιέχει την συντηγμένη με GFP πρωτεΐνη δέσμησης dsRNA και siRNA, B2, του ιού Flock House καθώς και μια φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, dsLuc (142). Ακολούθως, βακτήρια DH10Bac™, τα οποία περιλαμβάνουν το AcMNPV bacmid σε συνδυασμό με το βοηθητικό πλασμίδιο pMON7124, μετασηματίστηκαν με το φορέα pFastBac-Dual-dsLuc/B2-GFP.

Στα πλαίσια αυτά, το ORF του γονιδίου *B2-GFP* (μήκους 1050 bp) κλωνοποιήθηκε στο φορέα pFastBac-Dual – dsLuc υπό τον υποκινητή *p10*, χρησιμοποιώντας ως ενδιάμεσο φορέα κλωνοποίησης τον pBluescript SK⁺. Για την αντίδραση PCR (**Εικόνα 12**) με σκοπό την απομόνωση του *B2-GFP* από το φορέα pFastBac-Dual-dsLuc/B2-GFP-Myc.His χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Phusion High-Fidelity DNA Πολυμεράση (Thermo Fisher Scientific, USA), καθώς και οι φωσφορυλιωμένοι εκκινητές B2-F και GFP-R (**Πίνακας Π1, Π2**) οι οποίοι ήταν ειδικά σχεδιασμένοι ώστε να προσθέτουν στα άκρα θέσεις αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο *Sma*I και *Kpn*I αντίστοιχα, προκειμένου η αλληλουχία που ενισχύθηκε μέσω PCR να μπορεί να κλωνοποιηθεί τελικά στον πλασμιδιακό φορέα pFastBac-Dual – DsLuc.

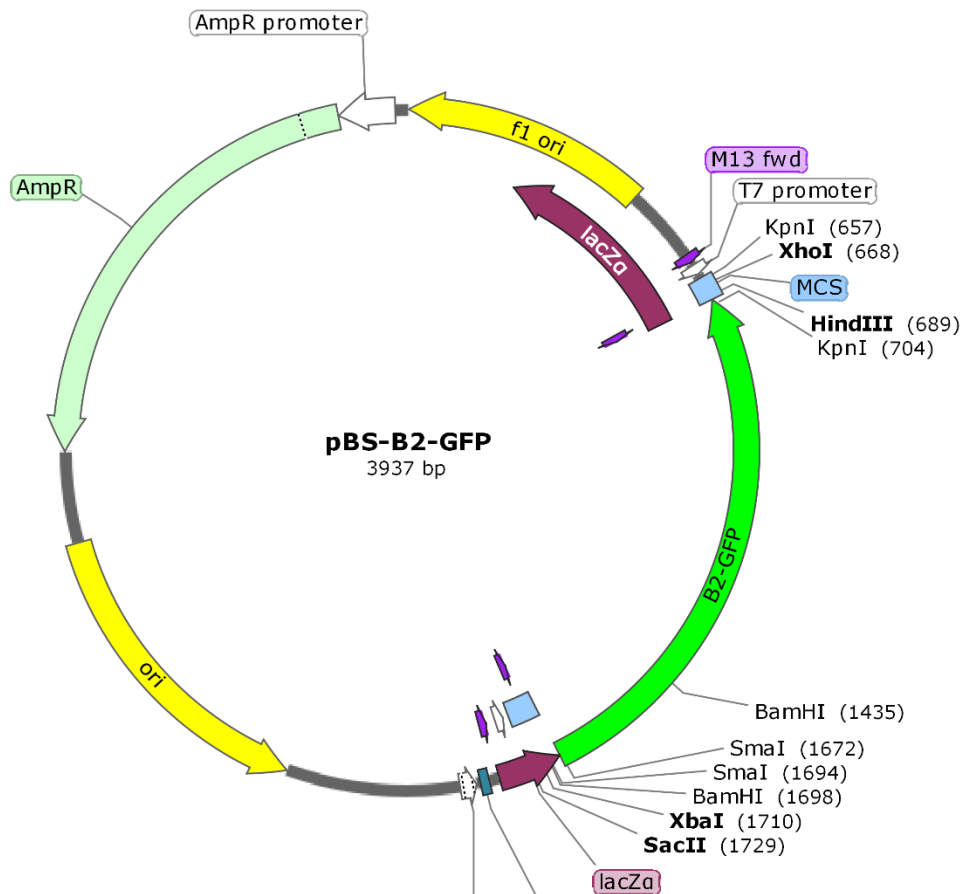


Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *B2-GFP*. Στις διαδρομές 1,2,3 και 4 απεικονίζεται το φωσφορυλιωμένο προϊόν της PCR που αντιστοιχεί στο γονίδιο *B2-GFP* που στα άκρα του φέρει θέσεις αναγνώρισης από τα ένζυμα *SmaI* και *KpnI* [*SmaI-B2-GFP-KpnI*], μεγέθους 980 bp το οποίο απομονώθηκε από το φορέα pFastBac-Dual-dsLuc/B2-GFP-Myc.His .

Έπειτα, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης του αποφωσφορυλιωμένου γραμμικού πλασμιδίου pBluescript SK(+) που είχε υποστεί πέψη με *EcoRV* (Takara Bio Inc) (**Εικόνα 6**) με το καθαρισμένο προϊόν της PCR *SmaI-B2-GFP-KpnI* και βακτηριακός μετασχηματισμός. Μετά την απομόνωση πλασμιδιακού DNA, επαληθεύτηκε η ενσωμάτωση του ενθέματος μέσα στον φορέα, μέσω πέψης του pBluescript SK(+) – [*SmaI-B2-GFP-KpnI*] με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *KpnI* (**Εικόνα 13**), καθώς και μέσω αλληλούχισης, σύμφωνα με τον πλασμιδιακό χάρτη (**Εικόνα 14**).

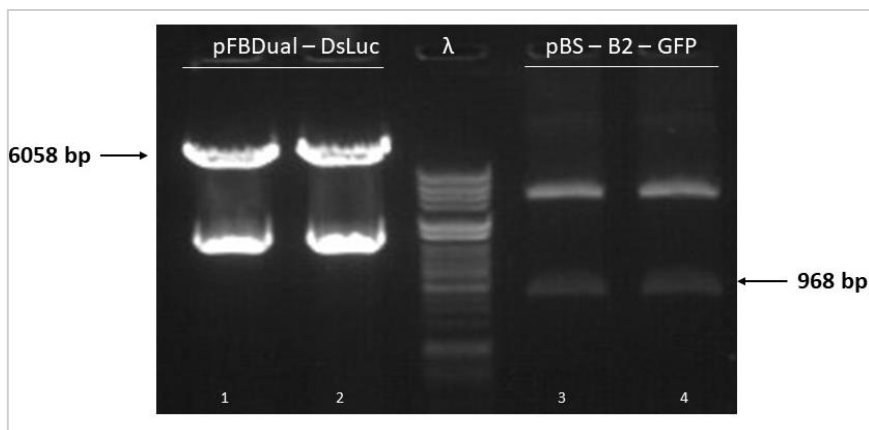


Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη του pBluescript SK(+) – [*SmaI-B2-GFP-KpnI*] με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *KpnI*. Οι κλώνοι 1-8 περιέχουν τις αναμενόμενες ζώνες ύστερα από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *KpnI*, μεγέθους 2900 bp και 968 bp.



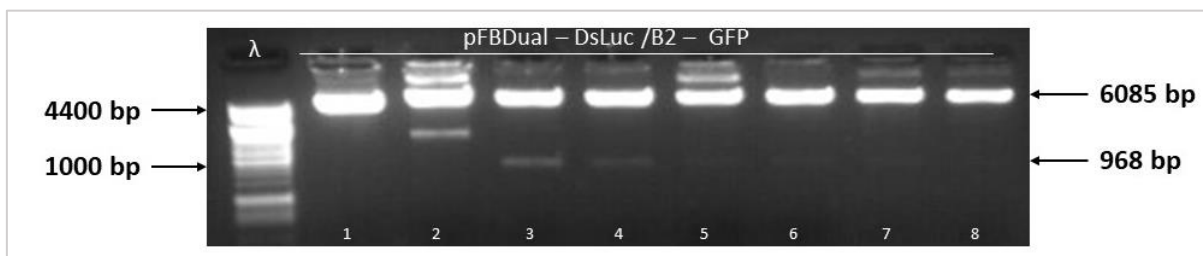
Εικόνα 14. Πλασμιαδικός χάρτης του φορέα pBSK(+) – [*SmaI*-B2-GFP-*KpnI*].

Στη συνέχεια, για την υποκλωνοποίηση του ORF του B2-GFP στον πλασμιαδικό φορέα pFastBac-Dual – dsLuc αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *KpnI* προκειμένου να δημιουργηθεί η γραμμική μορφή του φορέα με μέγεθος 6058 bp. Παράλληλα, έγινε πέψη του αλληλουχημένου κλώνου pBSK(+) – [*SmaI*-B2-GFP-*KpnI*] με τα ίδια ένζυμα προκειμένου να ελευθερωθεί το ένθεμα [*SmaI*-B2-GFP-*KpnI*] μεγέθους 968 bp που διέθετε πλέον κολλώδη άκρα (Εικόνα 15).

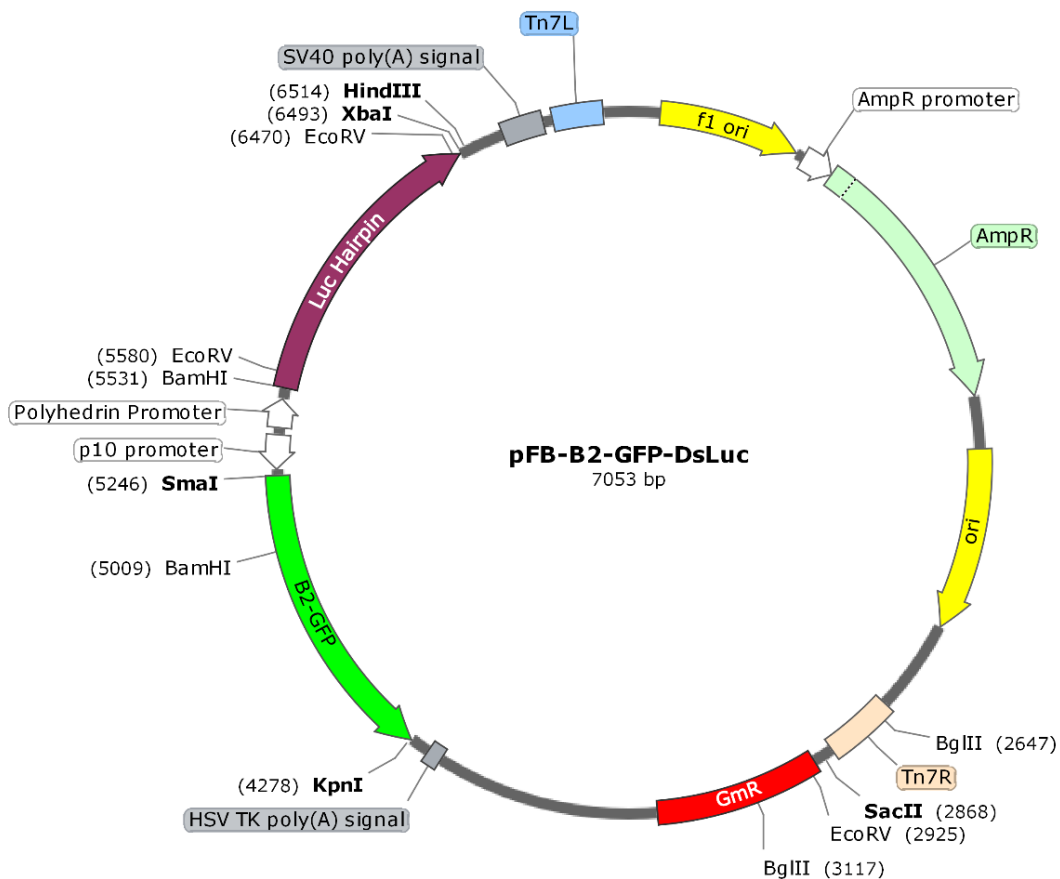


Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη των φορέων *pFastBac-Dual - dsLuc* και *pBluescript SK(+)* – [*SmaI*-*B2*-*GFP*-*KpnI*] με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *KpnI*. Οι διαδρομές 1 και 2 περιέχουν τα θραύσματα του φορέα *pFastBac-Dual - dsLuc* ύστερα από την πέψη με *SmaI* και *KpnI*, μεγέθους 6058 bp. Αντίστοιχα, οι διαδρομές 3 και 4 περιέχουν τα θραύσματα του φορέα *pBluescript SK(+)* – [*SmaI*-*B2*-*GFP*-*KpnI*] ύστερα από την πέψη με *SmaI* και *KpnI* μεγέθους 2900 bp, 968 bp, 47 bp και 22 bp (τα δύο τελευταία δεν φαίνονται στην εικόνα).

Καθώς τα άκρα που προκύπτουν κατόπιν πέψης είναι συμβατά μεταξύ τους, μετά τον καθαρισμό των ζωνών που απομονώθηκαν από την πηκτή το θραύσμα [*SmaI*-*B2*-*GFP*-*KpnI*] υποκλωνοποιήθηκε μέσω αντίδρασης σύνδεσης στο φορέα *pFastBac-Dual - dsLuc*. Από τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA, και ακολούθως για τον έλεγχο ενσωμάτωσης του ORF της *B2-GFP* στο φορέα, καθώς και τον έλεγχο του προσανατολισμού του ενθέματος, πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *KpnI* (**Εικόνα 16**) σύμφωνα με τον πλασμιδιακό χάρτη (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των θραυσμάτων που προέκυψαν από την πέψη ελέγχου των κλώνων *pFastBac-Dual - dsLuc/ B2 - GFP*. Οι κλώνοι 3 και 4 περιέχουν το ORF του *B2-GFP* στον επιθυμητό προσανατολισμό, καθώς από την πέψη με τα *SmaI* και *KpnI* προκύπτουν οι αναμενόμενες ζώνες μεγέθους 6085 bp και 968 bp.

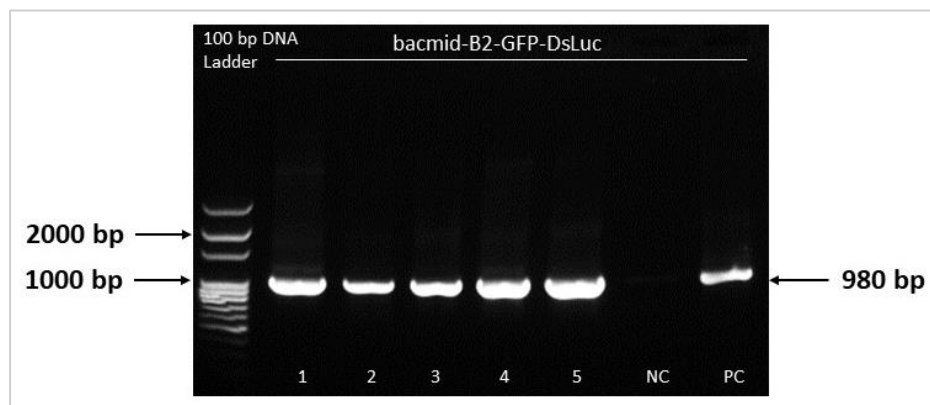


Εικόνα 17. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pFastBac-Dual – dsLuc/ B2 – GFP.

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της τρανσποζάσης που εκφράζεται από το βοηθητικό πλασμίδιο pMON7124, του στοιχείου mini-Tn7 του pFastBac-Dual και της αλληλουχίας-στόχου mini-attTn7 του bacmid μετασηματίστηκαν τα βακτήρια DH10BacTM με το φορέα pFastBac-Dual – dsLuc/ B2 – GFP. Ακολούθως, έγινε μετάθεση των dsLuc/B2-GFP στο bacmid, ούτως ώστε να δημιουργηθεί το AcMNPV-dsLuc/B2-GFP bacmid. Η επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων DH10BacTM που περιείχαν τον κατάλληλο κλώνο έγινε με τη μέθοδο επιλογής μπλε/άσπρων αποικιών.

Για τον έλεγχο της επιτυχούς κλωνοποίησης των dsLuc/B2-GFP στον AcMNPV ιό, αρχικά το bacmid που κατασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR (Εικόνα 18). Για τις ανάγκες της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA Πολυμεράση (Enzyquest) και οι

φωσφορυλιωμένοι εκκινητές B2-F και GFP-R (Πίνακας Π1, Π2) προκειμένου να ενισχυθεί η αλληλουχία *B2-GFP*.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *B2-GFP*. Στις διαδρομές 1 έως 5 απεικονίζεται το φωσφορυλιωμένο προϊόν της PCR που αντιστοιχεί στο γονίδιο *B2-GFP* μεγέθους 980 bp. Στην διαδρομή 6 και 7 απεικονίζονται ο αρνητικός και θετικός μάρτυρας αντίστοιχα.

3.2 Τιτλοδότηση ανασυνδυασμένων ιών

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, υπολογίστηκε η μέση λοιμογόνος δόση (TCID₅₀), ο ιικός τίτλος (virus titer) και οι μονάδες σχηματισμού πλάκας (plaque forming units, pfu) για 3 ιούς, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε (§2.2.7).

1. Ιός AcMNPV-dsLuc/B2-GFP

Ιικός τίτλος = 176×10^8 TCID₅₀/mL

Pfu/mL = 121×10^8

2. AcMNPV-dsLuc/GFP

Ιικός τίτλος = 100×10^8 TCID₅₀/mL

Pfu/mL = 69×10^8

3. Ιός AcMNPV-GFP

Ιικός τίτλος = 395×10^8 TCID₅₀/mL

Pfu/mL = 274×10^8

3.3 Μελέτη της έκφρασης ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών που παράγονται κατόπιν μόλυνσης με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπακουλοϊού σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, παρουσία ή απουσία ιικής μόλυνσης με μπακουλοϊό που παράγει τη φουρκέτα dsLuc, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Hi5 και/ή Sf21 με φορείς έκφρασης για ανασυνδυασμένες ιικές πρωτεΐνες και ακολούθως τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο μπακουλοϊό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP.

Ειδικότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με 450 ng από τον εκάστοτε ανασυνδυασμένο φορέα (pEA-N-ODV-RFP-Myc.His, pEA-ODV-RFP-Myc.His, pEA.IE1-RFP-Myc.His, pEA-GP64-RFP-Myc.His, pEA-Ac93-RFP-Myc.His, pEA-LEF-5-RFP-Myc.His, pEA-VLF-1-RFP-Myc.His) ή με αντίστοιχη ποσότητα DNA από το φορέα ελέγχου pEA-RFP-Myc.His. Η μόλυνση με τον AcMNPV-dsLuc/B2-GFP έγινε την επόμενη ημέρα της διαμόλυνσης, ενώ η συλλογή/παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε 1 έως 2 ημέρες μετά την ιική μόλυνση. Ακολούθως, τα κύτταρα μελετήθηκαν σε επίπεδο έκφρασης των ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με την υποκυτταρική κατανομή αυτών, ενώ ακόμη ελέγχθηκαν τα επίπεδα του ανασυνδυασμένου ιού σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο, και παραγόμενου dsRNA.

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς pEA-N-ODV-RFP-Myc.His, pEA-ODV-RFP-Myc.His, pEA.IE1-RFP-Myc.His, pEA-Ac93-RFP-Myc.His, pEA-LEF-5-RFP-Myc.His, pEA-VLF-1-RFP-Myc.His και pEA-RFP-Myc.His ήταν ευγενική χορηγία του Δρ. Luc Swevers, των οποίων οι πλασμιδιακοί χάρτες παρατίθενται στο παράρτημα (Εικόνες 34-38).

3.3.1 Έλεγχος έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

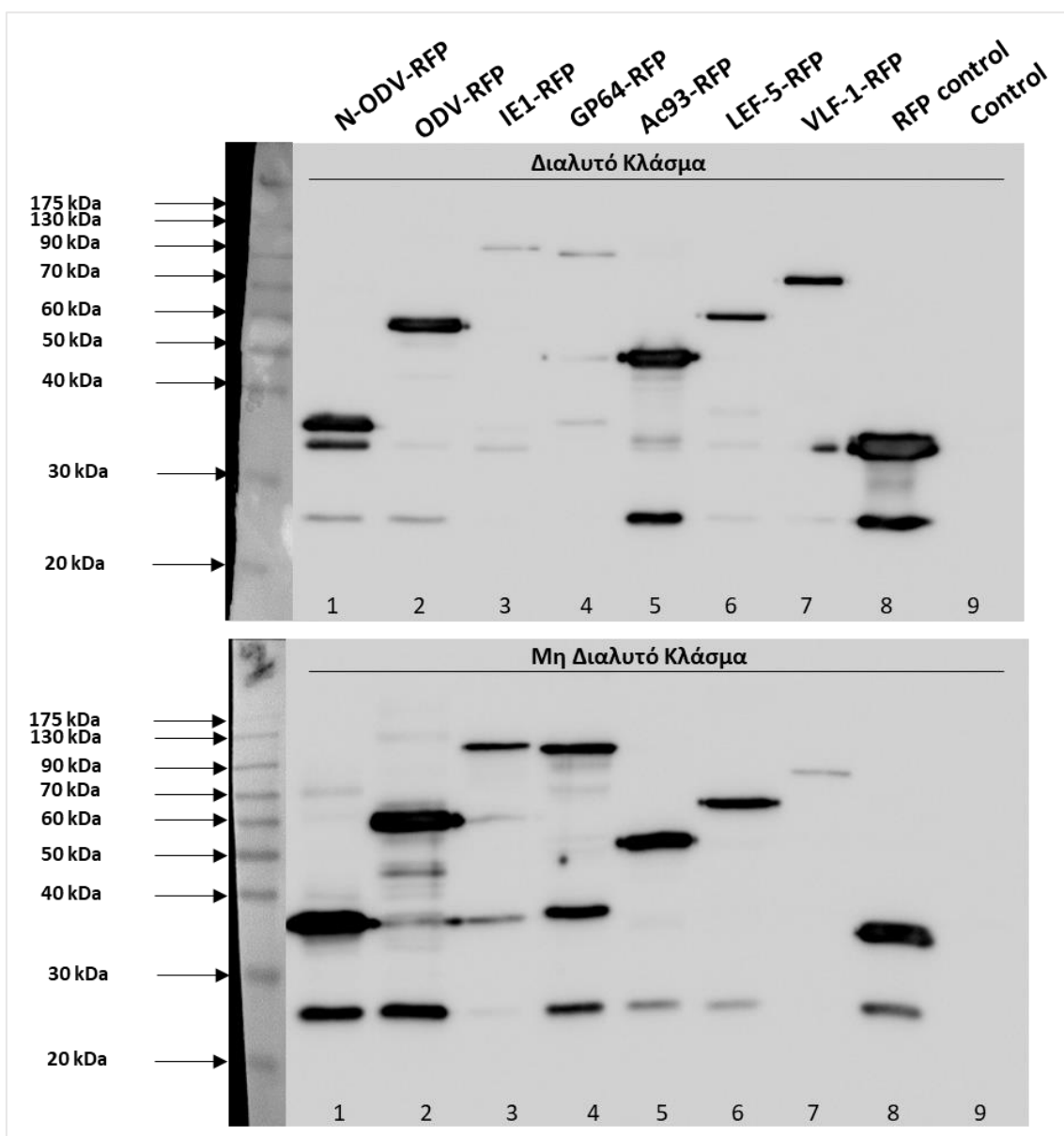
Προκειμένου να επικυρωθεί η ακρίβεια και το επίπεδο έκφρασης των σημασμένων με τον καρβοξυτελικό επίτοπο Myc.His ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, μετά την παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών Hi5 και Sf21 με τους ειδικά σχεδιασμένους φορείς για αυτές τις πρωτεΐνες, τα επιπέδα έκφρασής τους αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος Western.

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν μέσω του επιτόπου Myc χρησιμοποιώντας το πρωτογενές αντίσωμα anti-Myc (1:1000) και το δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse IgG HRP (1:1000). Επιπρόσθετα, με το ανοσοαποτύπωμα Western έγινε και εκτίμηση της υποκυτταρικής κατανομής των πρωτεϊνών ανάλογα με την παρουσία της πρωτεΐνης στο διαλυτό ή/και το μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα. Στο διαλυτό κυτταρικό κλάσμα ανευρίσκεται το κυτοσόλιο, ενώ στο μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα περιέχεται ο πυρήνας, ο κυτταροσκελετός και η κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ μπορεί να περιλαμβάνονται και ολόκληρα κύτταρα που δεν λύθηκαν. Τα μοριακά βάρη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών υπολογίστηκαν ως εξής: N-ODV-RFP-Myc.His 32.5 kDa, ODV-RFP-Myc.His 55 kDa, IE1-RFP-Myc.His 96.5 kDa, GP64-RFP-Myc.His 90.15 kDa, Ac93-RFP-Myc.His 47.9 kDa, LEF-5-RFP-Myc.His 60.5 kDa, VLF1-RFP-Myc.His 73.9 kDa και RFP-Myc.His 29.5 kDa. Στα μοριακά βάρη έχει συμπεριληφθεί ο επίτοπος Myc.His περίπου 2kDa.

Αρχικά κύτταρα Hi5 και Sf21 διαμολύνθηκαν απλώς με τους ανασυνδυασμένους φορείς που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του μπακουλοϊού. Σε αυτά τα πειράματα δείχθηκε η επιτυχής έκφραση όλων των πρωτεϊνών (**Εικόνες 19 και 20**). Ειδικότερα, οι N-ODV-RFP-Myc.His, ODV-RFP-Myc.His, Ac93-RFP-Myc.His, LEF-5-RFP-Myc.His και RFP-Myc.His παρουσίασαν ισχυρή έκφραση τόσο στο διαλυτό όσο και στο μη διαλυτό κλάσμα, ενώ η GP64-RFP-Myc.His και η IE1-RFP-Myc.His παρουσίασαν ισχυρότερη έκφραση στο μη διαλυτό κλάσμα. Η VLF1-RFP-Myc.His έδειξε ισχυρότερη στο διαλυτό κλάσμα στις κυτταρικές σειρές Hi5 και παρόμοια έκφραση και στα δύο κλάσματα στις κυτταρικές σειρές Sf21. Επίσης, ασθενή έκκριση στο υπερκείμενο εμφάνισε η Ac93-RFP-Myc.His, στις κυτταρικές σειρές Hi5.

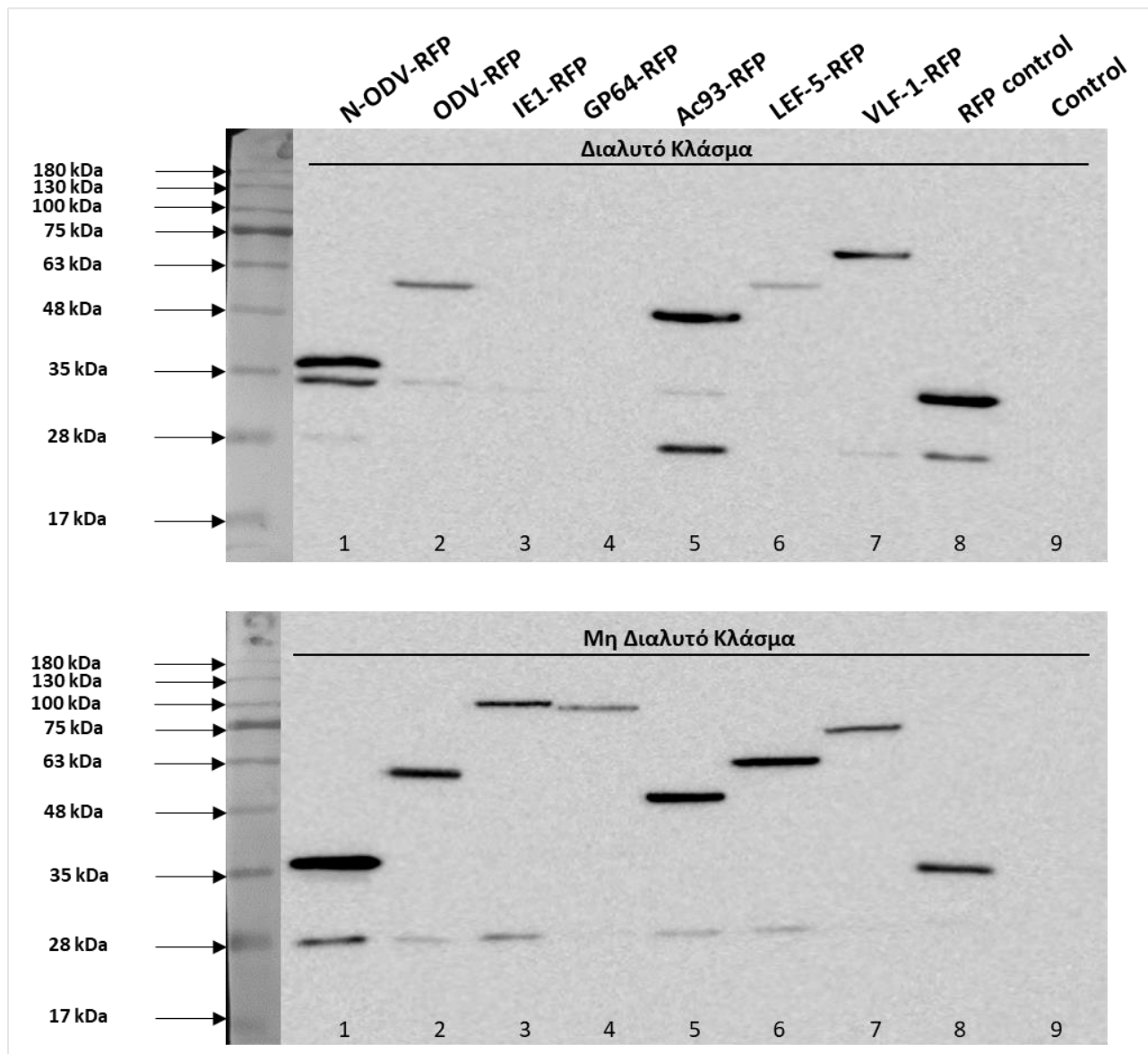
Ακολούθως, κύτταρα Hi5 και Sf21 διαμολύνθηκαν με τους προαναφεθέντες ανασυνδυασμένους φορείς και έπειτα μολύνθηκαν με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Σε αυτή την περίπτωση δείχθηκε επίσης επιτυχής έκφραση των πρωτεϊνών N-ODV-RFP-Myc.His, ODV-RFP-Myc.His, IE1-RFP-Myc.His, GP64-RFP-Myc.His, RFP-Myc.His (**Εικόνες 21 έως 25**). Ειδικότερα, οι N-ODV-RFP-Myc.His, ODV-RFP-Myc.His, και RFP-Myc.His παρουσίασαν ισχυρή έκφραση τόσο στο διαλυτό όσο και στο μη διαλυτό κλάσμα, ενώ η GP64-RFP-Myc.His παρουσίασε κατά κύριο λόγο ισχυρή έκφραση στο μη διαλυτό κλάσμα. Η IE1-RFP-Myc.His παρουσίασε ασθενή έκφραση στο διαλυτό κλάσμα στις κυτταρικές σειρές Hi5 και στο μη διαλυτό κλάσμα στις

κυτταρικές σειρές Sf21. Οι πρωτεΐνες Ac93-RFP-Myc.His, LEF-5-RFP-Myc.His και VLF1-RFP-Myc.His σε μολυσμένες κυτταρικές σειρές Hi5 παρουσίασαν έκφραση και στα δύο κλάσματα, με ισχυρότερη έκφραση στο διαλυτό κλάσμα. Επιπλέον, στο υπερκείμενο των κυτταροκαλλιεργειών έκφραση σημειώθηκε για τον ανασυνδυασμένο φορέα N-ODV-RFP-Myc.His και το φορέα ελέγχου RFP-Myc.His.

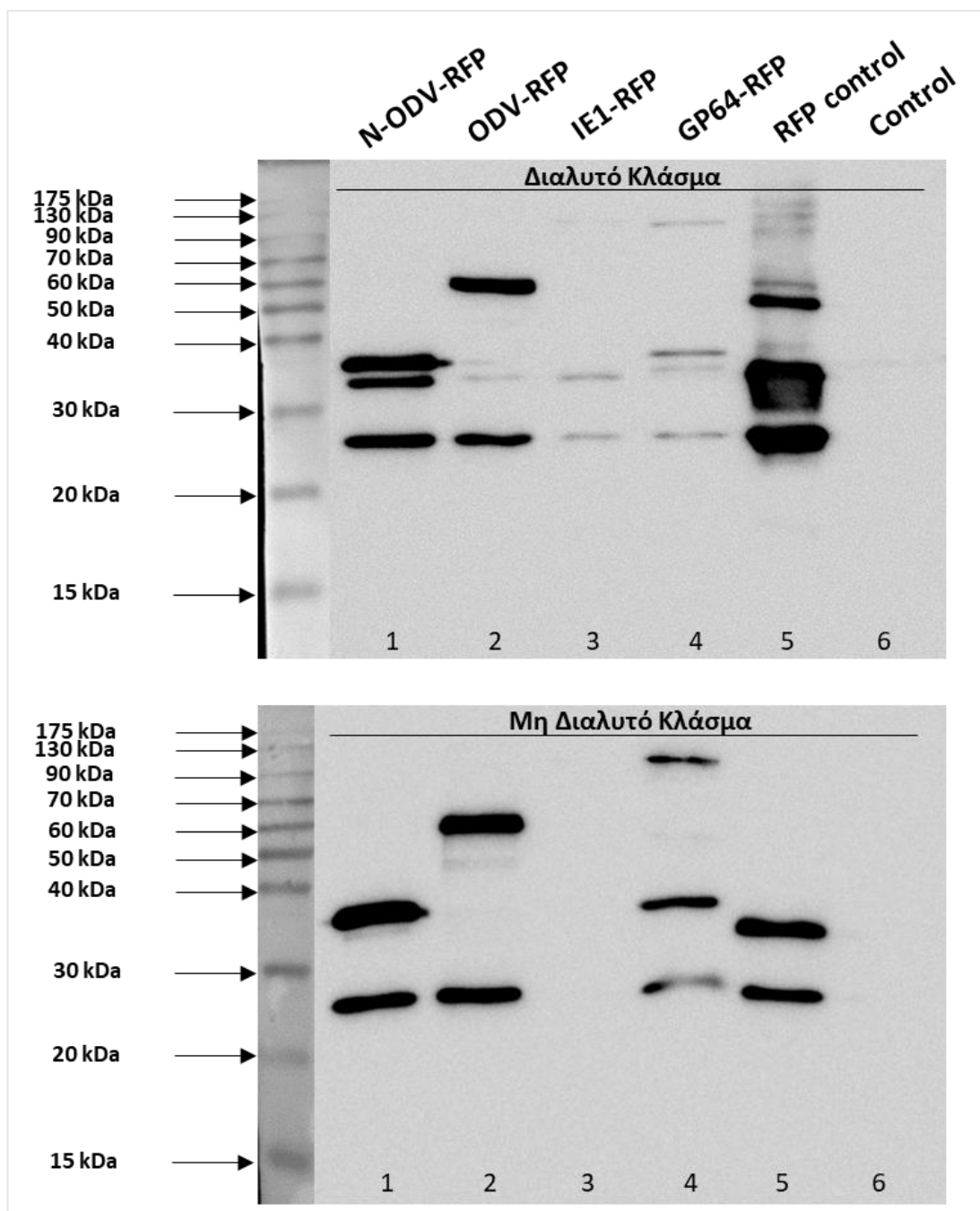


Εικόνα 19. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαλυτού και μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, από δείγματα κυτταροκαλλιεργειών Hi5 απουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυτάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4), pEA-Ac93-Myc.His (5), pEA-LEF-5-

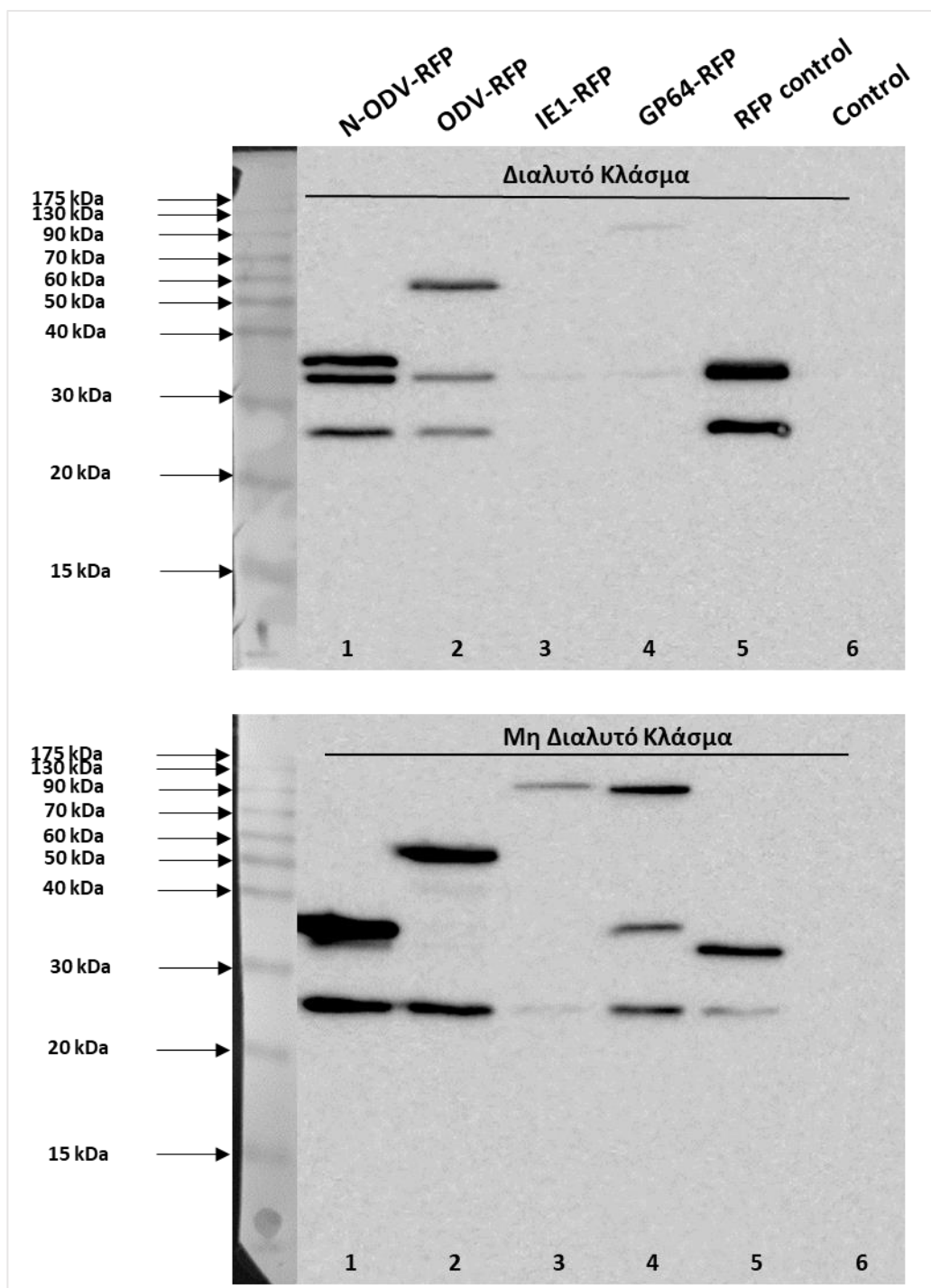
Myc.His (6), pEA-VLF1-Myc.His (7) και RFP-Myc.His (8). Οι διαδρομές 9 αντιστοιχούν στα κύτταρα μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση.



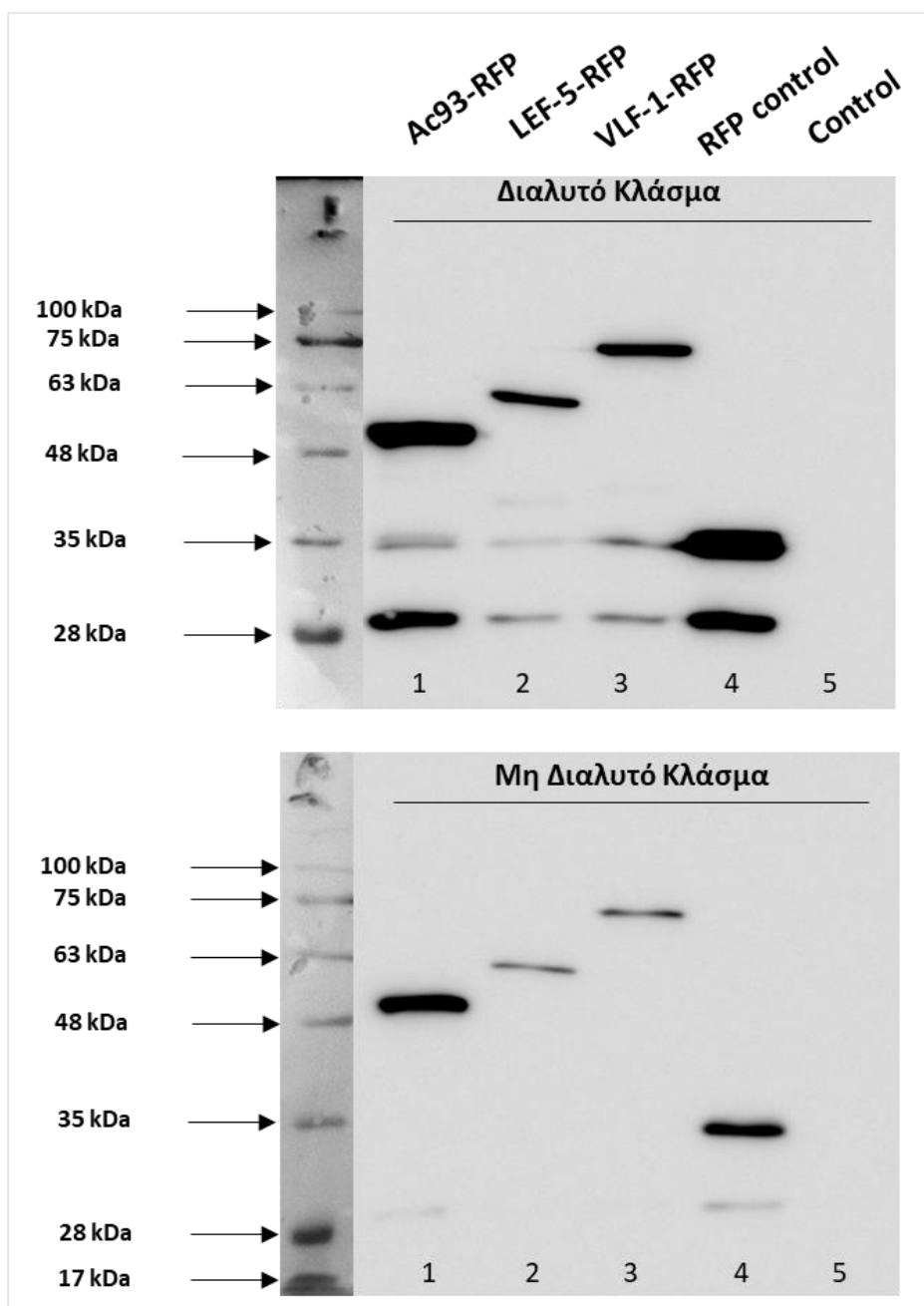
Εικόνα 20. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαλυτού και μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Sf21 απουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4), pEA-Ac93-Myc.His (5), pEA-LEF-5-Myc.His (6), pEA-VLF1-Myc.His (7) και RFP-Myc.His (8). Οι διαδρομές 9 αντιστοιχούν στα κύτταρα μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση.



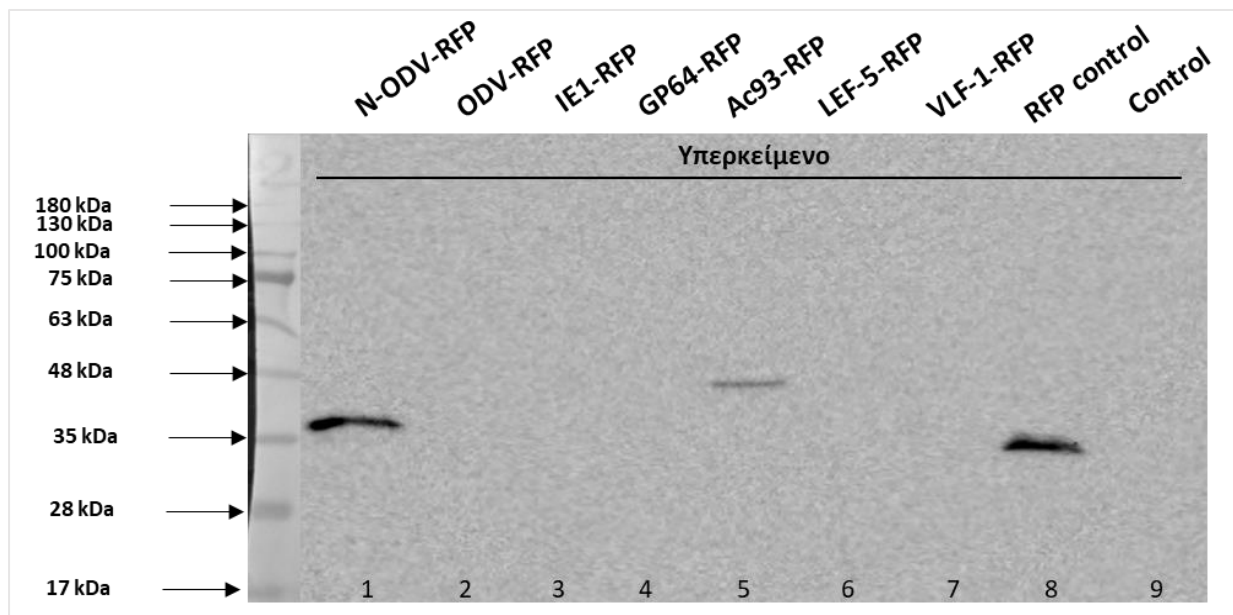
Εικόνα 21. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαλυτού και μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Hi5 παρουσία του ιού *AcMNPV-dsLuc/B2-GFP*. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4) και RFP-Myc.His (5). Η διαδρομή 6 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.



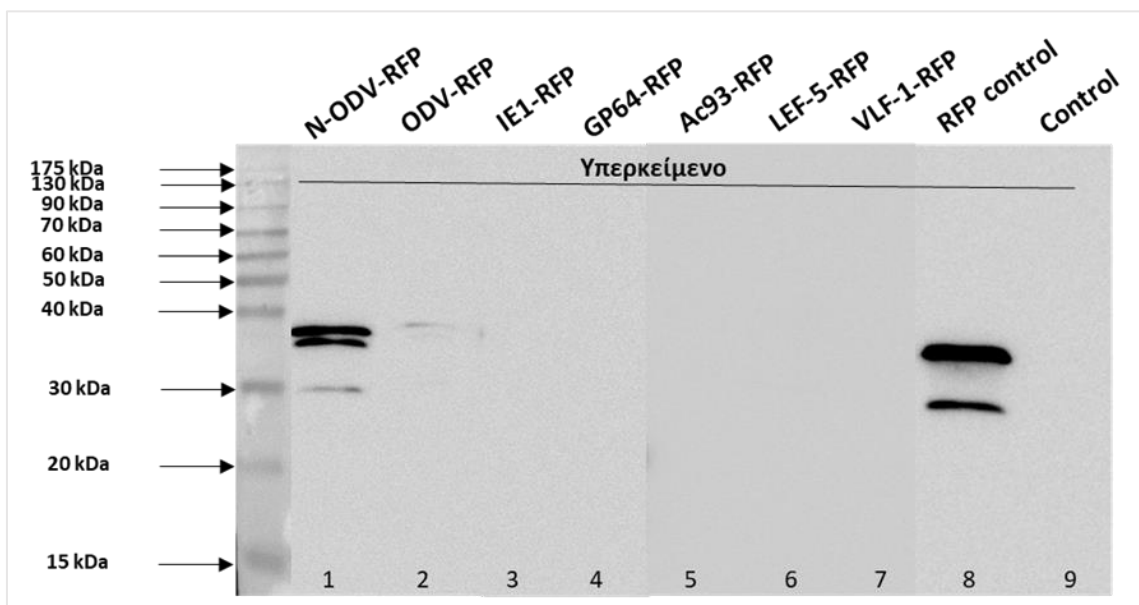
Εικόνα 22. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαλυτού και μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, από δείγματα κυτταροκαλλιεργειών Sf21 παρουσία του ιού *AcMNPV-dsLuc/B2-GFP*. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4) και RFP-Myc.His (5). Η διαδρομή 6 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.



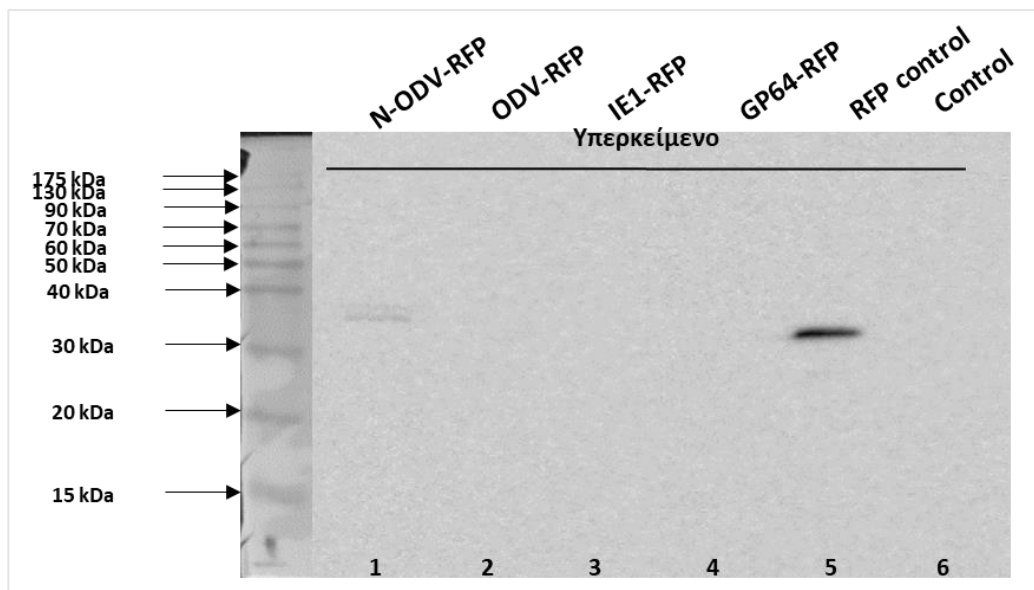
Εικόνα 23. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαλυτού και μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Hi5 παρουσία του ιού *AcMNPV-dsLuc/B2-GFP*. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς rEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Ac93-RFP-Myc.His (1), LEF-5-RFP-Myc.His (2), VLF-1-RFP-Myc.His (3), RFP-Myc.His (4). Η διαδρομή 5 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.



Εικόνα 24. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα υπερκειμένου, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Hi5 απουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς rEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ODV-RFP-Myc.His (1), N-ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4), RFP-Myc.His (5), Ac93-RFP-Myc.His (6), LEF-5-RFP-Myc.His (7), VLF-1-RFP-Myc.His (8). Η διαδρομή 9 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.



Εικόνα 25. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα υπερκειμένου, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Hi5 παρουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς rEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ODV-RFP-Myc.His (1), N-ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4), RFP-Myc.His (5), Ac93-RFP-Myc.His (6), LEF-5-RFP-Myc.His (7), VLF-1-RFP-Myc.His (8). Η διαδρομή 9 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.

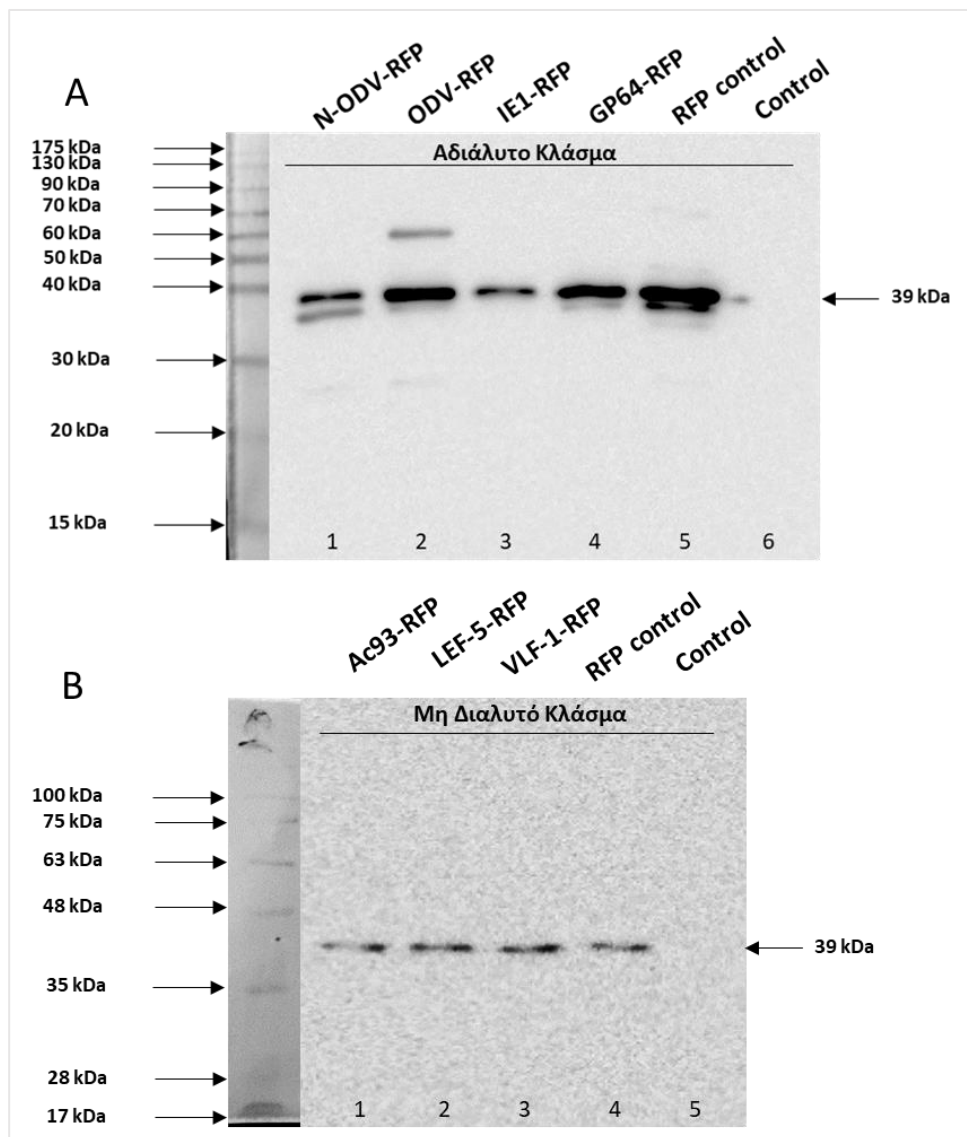


Εικόνα 26. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα υπερκειμένου, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Sf21 παρουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ODV-RFP-Myc.His (1), N-ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4 και RFP-Myc.His (5). Η διαδρομή 6 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.

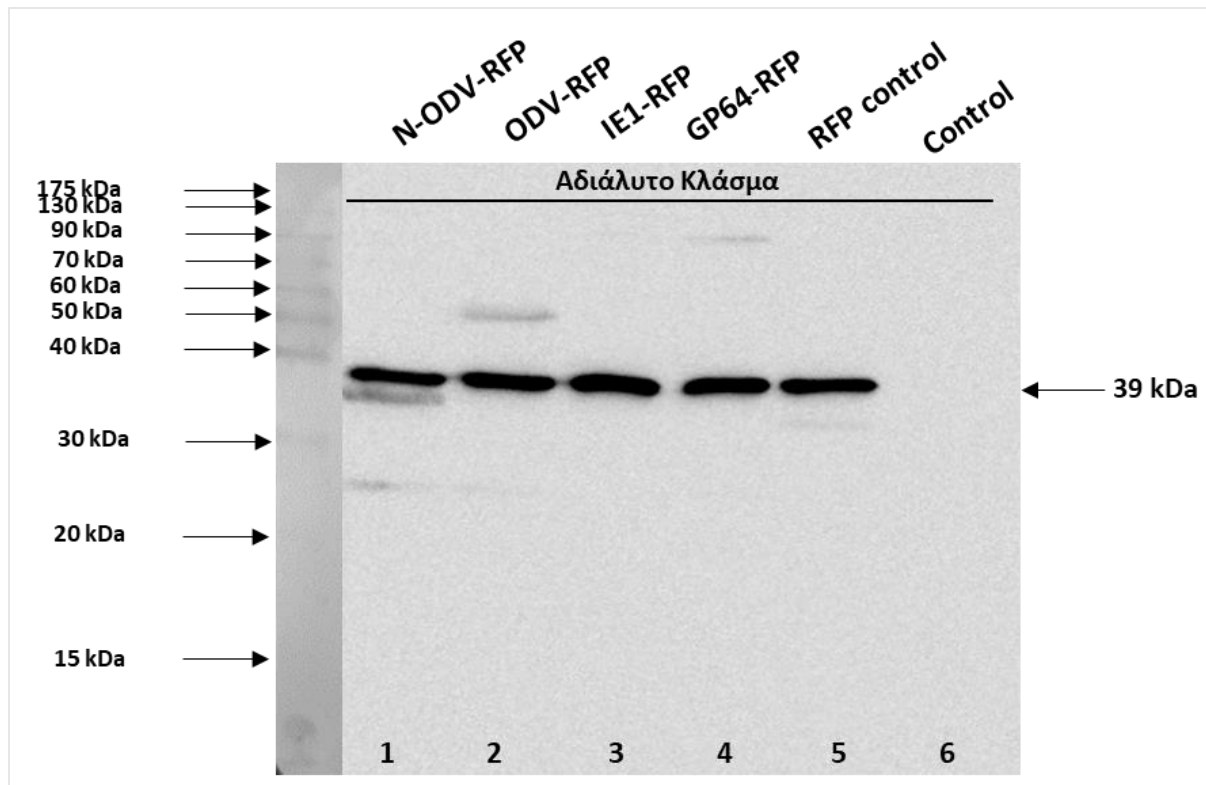
3.3.2 Έλεγχος των επιπέδων του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP

3.3.2.1 Έλεγχος σε πρωτεϊνικό επίπεδο

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η έκφραση του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, έγινε ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της πρωτεΐνης vp39 του ιού, μεγέθους 39 kDa, μέσω ανοσοαποτυπώματος Western, στα δείγματα των κυττάρων που περιγράφονται στην παράγραφο 3.3.1 (**Εικόνες 21 έως 23**), η οποία αποτελεί κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού (96). Τα δείγματα που μολύνθηκαν με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP παρουσιάζουν υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης vp39 στο μη διαλυτό κλάσμα (**Εικόνες 27 και 28**).



Εικόνα 27. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western της πρωτεΐνης VP39 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος, από δείγματα κυτταροκαλλιεργειών Hi5 παρουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Στην εικόνα A οι διαδρομές αντιστοιχούν στις: N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4) και RFP-Myc.His (5), ενώ διαδρομή 6 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση. Στην εικόνα B οι διαδρομές αντιστοιχούν στις: Ac93-RFP-Myc.His (1), LEF-5-RFP-Myc.His (2), VLF-1-RFP-Myc.His (3) και RFP-Myc.His (4), ενώ η διαδρομή 5 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.

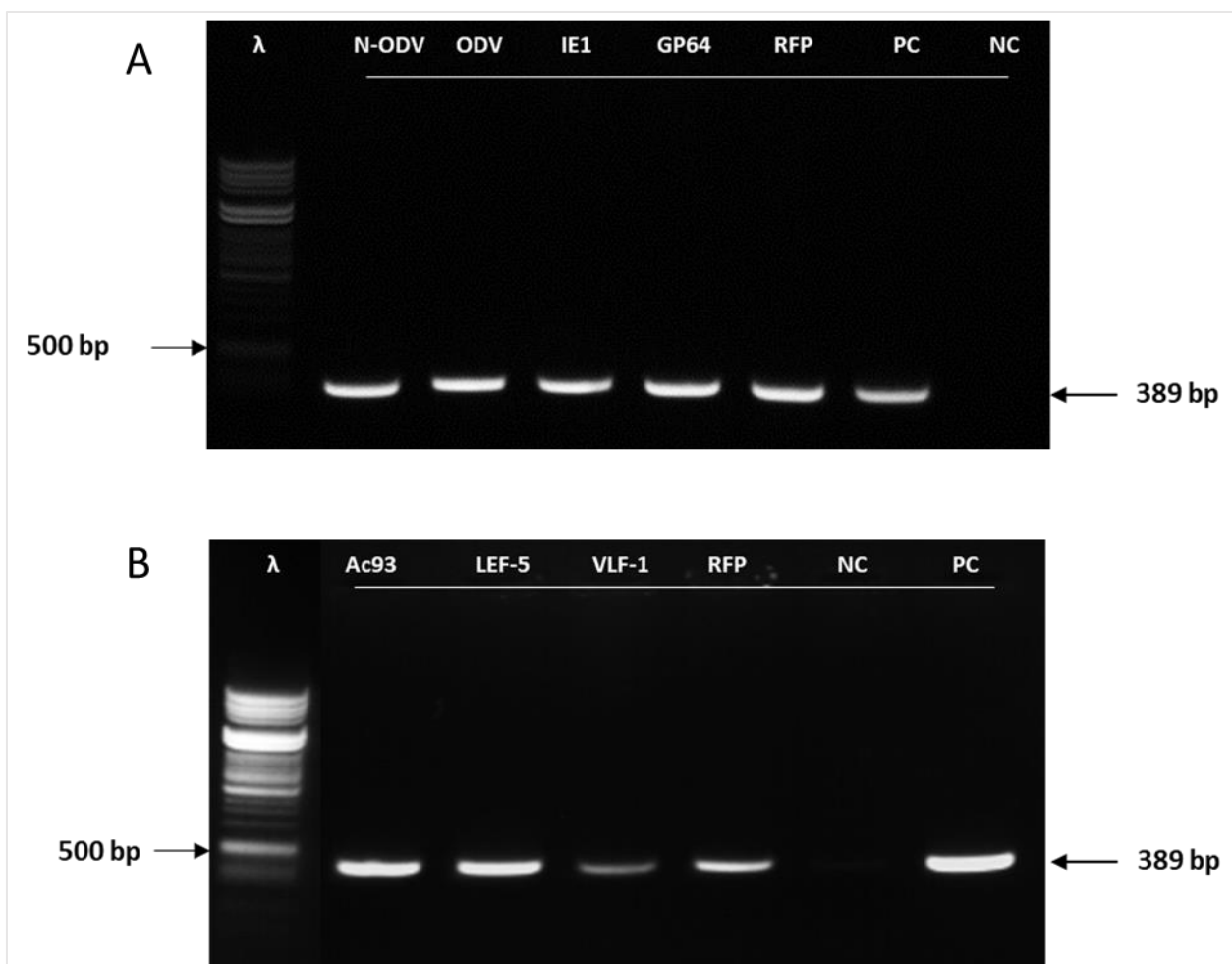


Εικόνα 28. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος Western της πρωτεΐνης VP39 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μη διαλυτού κυτταρικού κλάσματος από δείγματα κυτταροκαλλιεργειών Sf21 παρουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς rEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4) και RFP-Myc.His (5). Η διαδρομή 6 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση.

3.3.2.2 Έλεγχος σε επίπεδο γονιδιώματος

Ο έλεγχος των επιπέδων του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP πραγματοποιήθηκε και σε επίπεδο γονιδιώματος. Ειδικότερα ελέγχθηκε μέσω PCR η παρουσία του ιικού γονιδίου *he65* καθώς και η παρουσία της δομής μίσχου της φουρκέτας dsLuc.

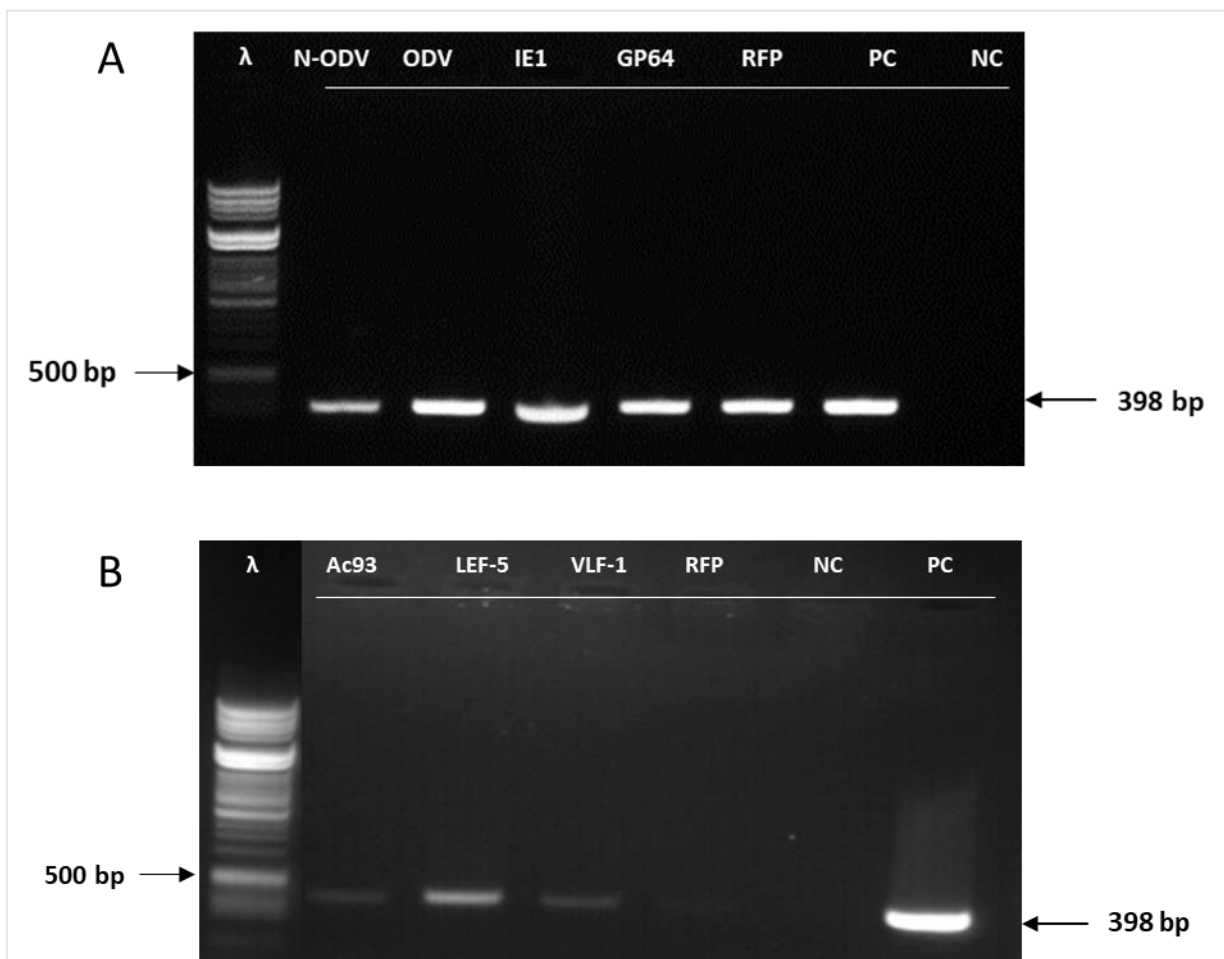
Με σκοπό την ενίσχυση του *he65* από δείγματα κυτταρικών σειρών Hi5 μολυσμένων με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR όπου χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Taq* DNA Πολυμεράση (Enzyquest) και οι εκκινητές Ac-*he65* – F και Ac-*he65* – R (Πίνακας Π1, Π2).



Εικόνα 29. Έλεγχος της παρουσίας του ιικού γονιδίου *he65* σε επίπεδο DNA, στις μολυσμένες κυτταρικές σειρές Hi5. Οι διαδρομές απεικονίζουν το προϊόν της PCR μεγέθους 389 bp από δείγματα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τους φορείς pEA-N-ODV-RFP-Myc.His, pEA-ODV-RFP-Myc.His, pEA-IE1-RFP-Myc.His, pEA-GP64-RFP-Myc.His, pEA-Ac93-RFP-Myc.His, pEA-LEF-5-RFP-Myc.His, pEA-VLF-1-RFP-Myc.His και pEA-RFP-Myc.His. Οι τελευταίες διαδρομές αντιστοιχούν στο θετικό μάρτυρα (Positive control, PC, δηλαδή σε μολυσμένα κύτταρα Hi5 G/L) και στον αρνητικό μάρτυρα (Negative Control, NC, δηλαδή σε ddH₂O).

Όπως παρατηρείται τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι πανομοιότυπα μεταξύ των δειγμάτων (**Εικόνα 29**). Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα που είχε διαμολυνθεί με τον φορέα pEA-VLF-1-RFP-Myc.His (**Εικόνα 29B**), όπου παρατηρήθηκε μικρότερη ένταση στη ζώνη, άρα και λιγότερη ποσότητα γονιδίου στο δείγμα. Συνεπώς, η παρουσία της πρωτεΐνης VLF-1 ενδέχεται να επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγή του ιού.

Στην συνέχεια, με σκοπό την ενίσχυση της δομής μίσχου της φουρκέτας dsLuc από τα ίδια δείγματα μολυσμένων κυττάρων Hi5 πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Taq* DNA Πολυμεράση (Enzyquest) και οι εκκινητές Ds-Stem-F και Ds-Stem-R (Πίνακας Π1, Π2).



Εικόνα 30. Έλεγχος της παρουσίας της δομής μίσχου της φουρκέτας dsLuc του ιού σε επίπεδο DNA, στις μολυσμένες κυτταρικές σειρές Hi5. Οι διαδρομές απεικονίζουν το προϊόν της PCR μεγέθους 398 bp από δείγματα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τους φορείς *pEA-N-ODV-RFP-Myc.His*, *pEA-ODV-RFP-Myc.His*, *pEA-IE1-RFP-Myc.His*, *pEA-GP64-RFP-Myc.His*, *pEA-Ac93-RFP-Myc.His*, *pEA-LEF-5-RFP-Myc.His*, *pEA-VLF-1-RFP-Myc.His* και *pEA-RFP-Myc.His*. Οι τελευταίες διαδρομές αντιστοιχούν στο θετικό μάρτυρα (Positive control, PC, δηλαδή μολυσμένα κύτταρα Hi5 G/L) και στον αρνητικό μάρτυρα (Negative Control, NC, δηλαδή ddH₂O).

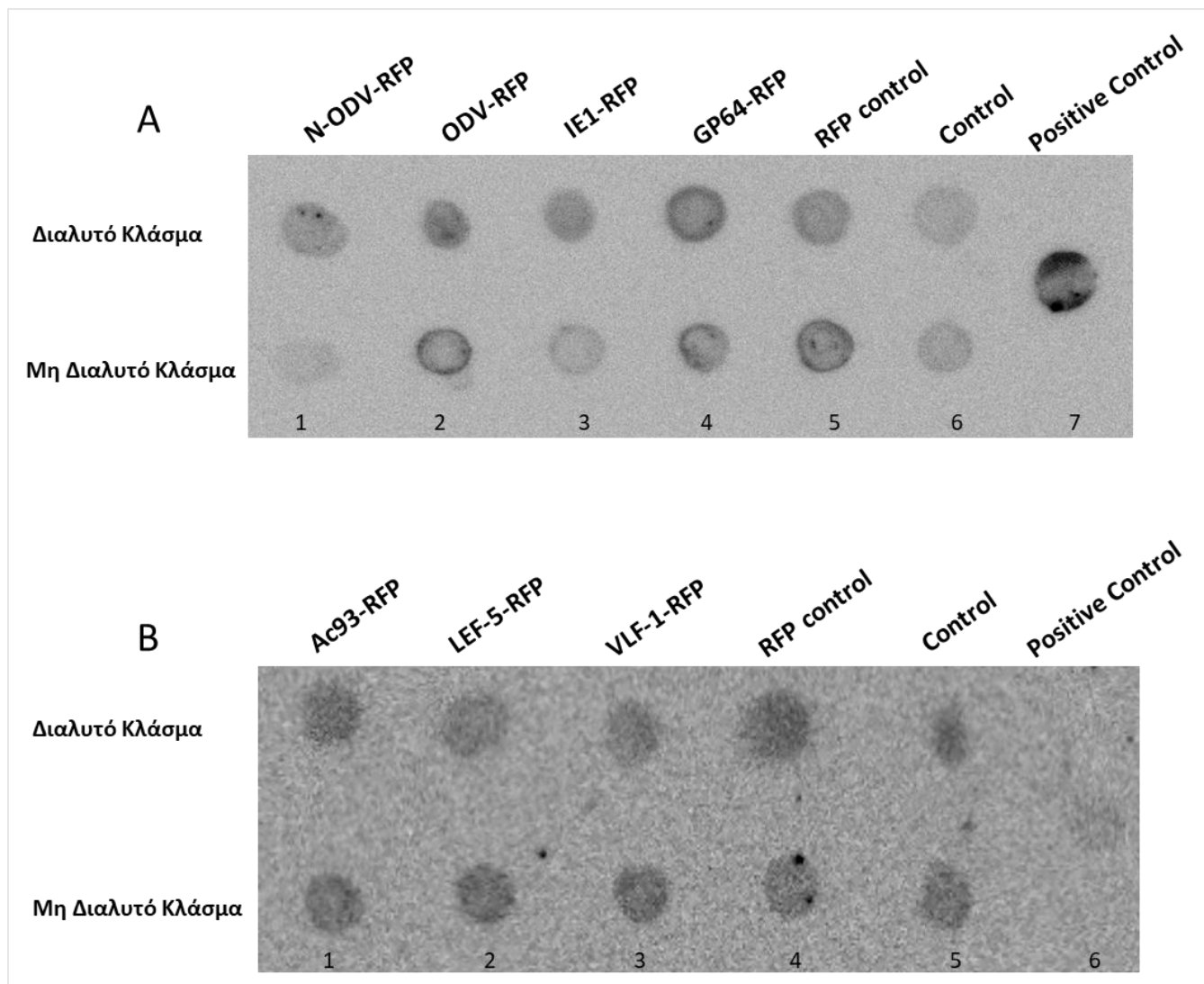
Παρατηρούμε ότι τα δείγματα που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς *pEA-ODV-RFP-Myc.His*, *pEA-IE1-RFP-Myc.His*, *pEA-GP64-RFP-Myc.His* και *pEA-RFP-Myc.His*, εμφάνισαν πανομοιότυπα επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 30A). Αντίθετα, το δείγμα που είχε διαμολυνθεί με

το φορέα pEA-N-ODV-RFP-Myc.His εμφάνισε χαμηλότερη έκφραση (**Εικόνα 30A**), γεγονός το οποίο μπορεί επίσης να σχετίζεται με τη χαμηλότερη ική έκφραση λόγω της παρουσίας της πρωτεΐνης N-ODV.

Τα δείγματα που διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-Ac93-RFP-Myc.His, pEA-LEF-5-RFP-Myc.His, pEA-VLF-1-RFP-Myc.His και pEA-RFP-Myc.His (**Εικόνα 30B**), εμφάνισαν αρκετά χαμηλότερη έκφραση συγκριτικά με τα δείγματα της εικόνας 30A, γεγονός το οποίο πιθανώς να οφείλεται στη χρονική περίοδο που έγινε η συλλογή των δειγμάτων, η οποία ήταν συντομότερη.

3.2.2.3 Ανίχνευση ολικού dsRNA στο διαλυτό και μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δράση της πρωτεΐνη-καταστολέα του RNAi B2, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του ολικού dsRNA στα κύτταρα που ήταν μολυσμένα με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP με τη μέθοδο ανοσοαποτυπώματος κηλίδας (Dot Blot). Τα επίπεδα συγκρίθηκαν με μη διαμολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα-μάρτυρες. Τα μόρια dsRNA ανιχνεύτηκαν σε διαλυτό και μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα από δείγματα κυτταροκαλλιεργειών Hi5. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (§2.2.9). Όπως παρατηρήθηκε (**Εικόνα 31**) στα μολυσμένα κύτταρα επιβεβαιώθηκε η αυξημένη παρουσία του ολικού dsRNA σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα-μάρτυρες που επίσης δεν είχαν διαμολυνθεί με τους εκάστοτε φορείς έκφρασης ικών πρωτεϊνών. Στο διαλυτό κλάσμα εμφάνισαν διακριτή αύξηση όλα τα δείγματα, ενώ στο μη διαλυτό αυξημένη παραγωγή dsRNA παρατηρήθηκε στα δείγματα που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ODV-RFP-Myc.His, GP64-RFP-Myc.His και RFP-Myc.His.



Εικόνα 31. Ανάλυση ανοσοαποτυπώματος κηλίδας του ολικού dsRNA σε διαλυτά και μη διαλυτά κυτταρικά κλάσματα, από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών Hi5 παρουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Οι διαδρομές αντιστοιχούν σε εκχυλίσματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Στην εικόνα A οι κηλίδες στις κάθετες στήλες αντιστοιχούν στις: N-ODV-RFP-Myc.His (1), ODV-RFP-Myc.His (2), IE1-RFP-Myc.His (3), GP64-RFP-Myc.His (4) και RFP-Myc.His (5). Η στήλη 6 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες (control) χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση, ενώ η στήλη 7 σε θετικά κύτταρα-μάρτυρες (positive control). Στην εικόνα B οι κηλίδες στις κάθετες στήλες αντιστοιχούν στις: Ac93-RFP-Myc.His (1), LEF-5-RFP-Myc.His (2), VLF-1-RFP-Myc.His (3) και RFP-Myc.His (4). Η στήλη 5 αντιστοιχεί σε κύτταρα-μάρτυρες (control) χωρίς διαμόλυνση και μόλυνση, ενώ η στήλη 6 σε θετικά κύτταρα-μάρτυρες (positive control).

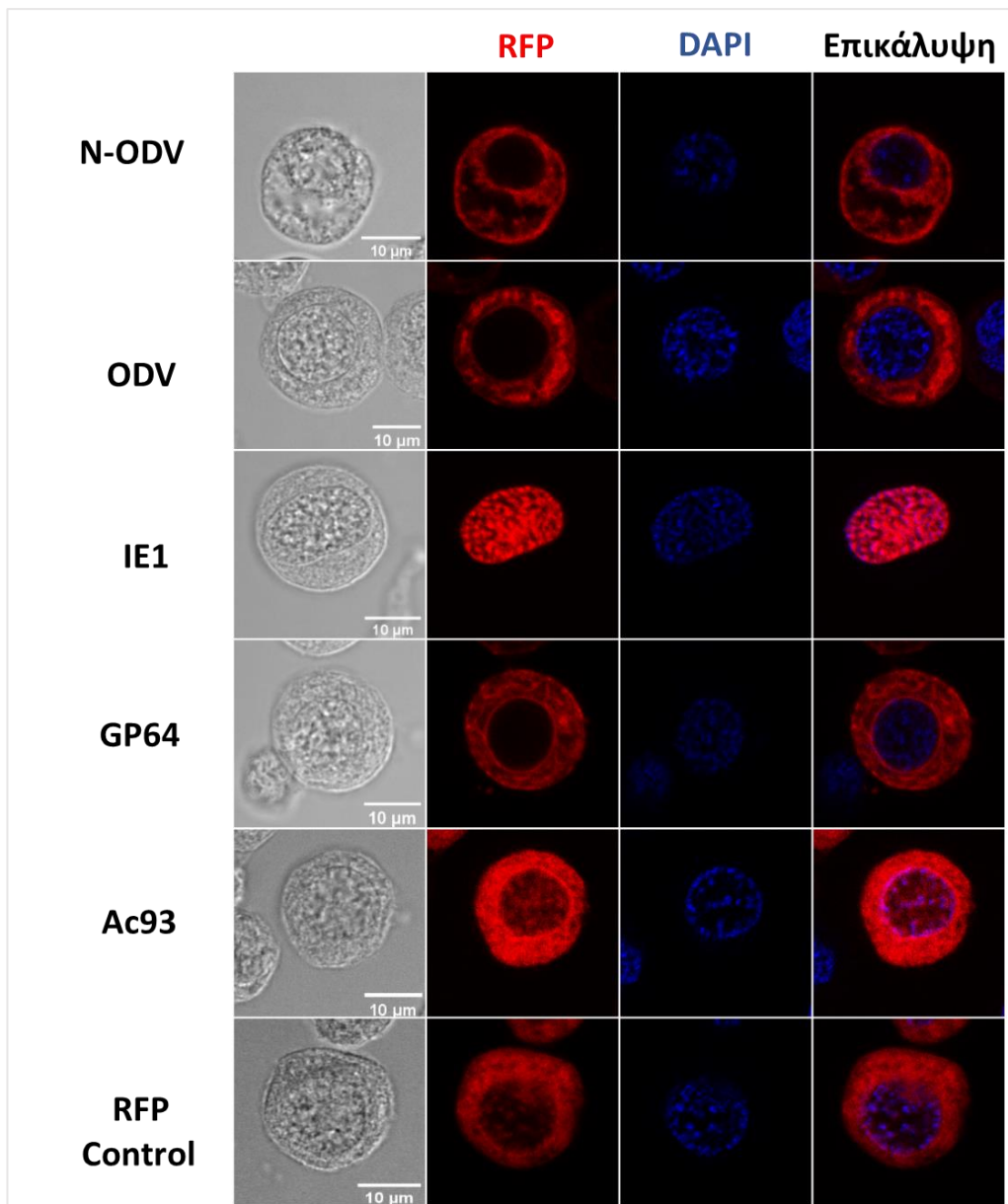
3.3.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Με σκοπό την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών αναφορικά με τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών του μπακουλοϊού σε υποκυτταρικό επίπεδο, ούτως ώστε διερευνηθεί η λειτουργία τους στο κυτταρικό περιβάλλον λεπιδοπτέρων εντόμων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών σε κύτταρα Hi5 που είχαν προηγουμένως διαμολυνθεί με φορείς έκφρασης για ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του μπακουλοϊού AcMNPV. Ειδικότερα, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His, ODV-RFP-Myc.His, IE1-RFP-Myc.His, GP64-RFP-Myc.His, Ac93-RFP-Myc.His, LEF-5-RFP-Myc.His, VLF-1-RFP-Myc.His και RFP-Myc.His. Η μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών σε μολυσμένα ή μη κύτταρα Hi5 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με Laser.

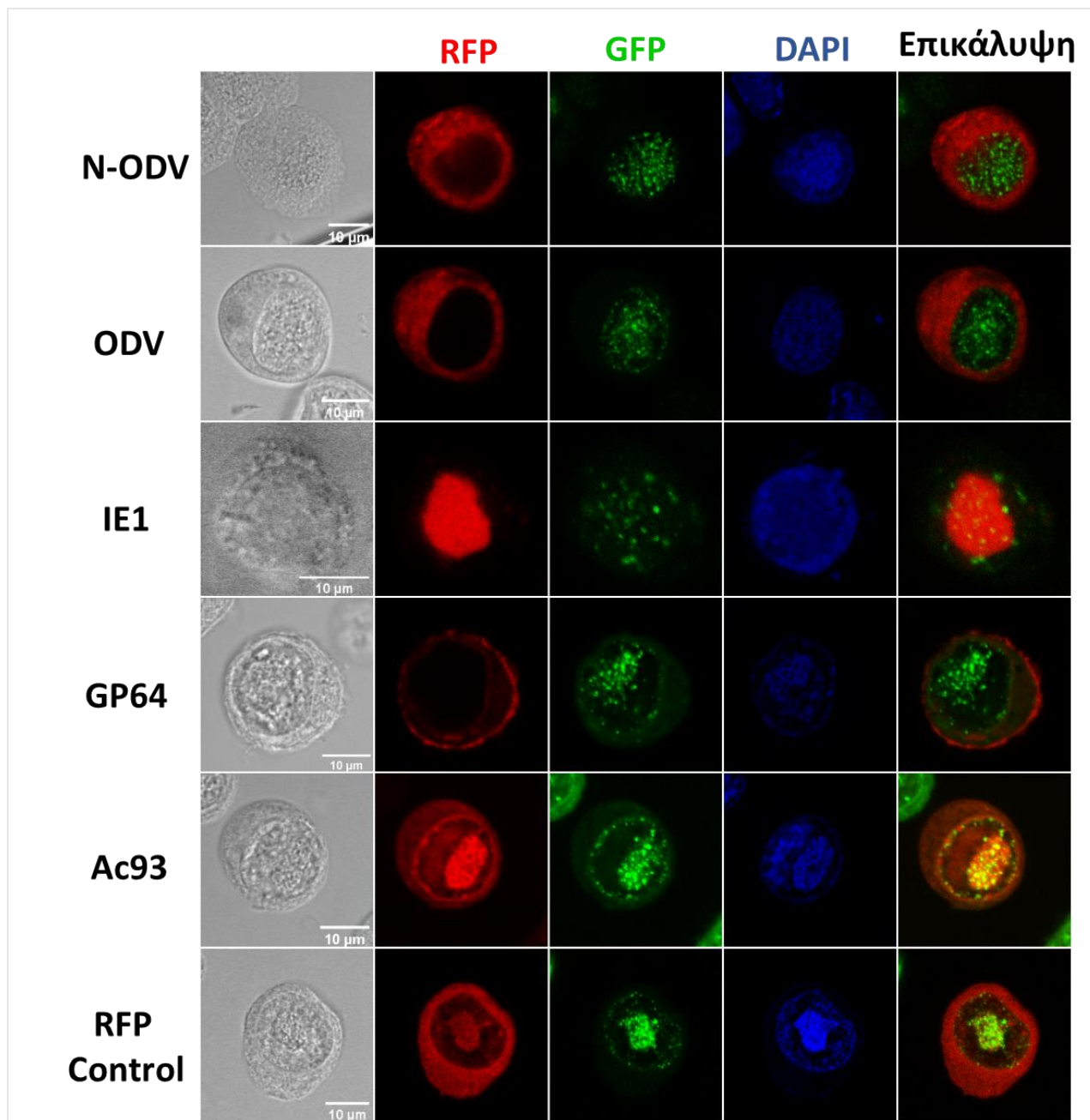
Κυτταρικές σειρές Hi5 διαμολύνθηκαν με φορείς pEA που εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His, ODV-RFP-Myc.His, IE1-RFP-Myc.His, GP64-RFP-Myc.His, pEA-Ac93-Myc.His, pEA-LEF-5-Myc.His, pEA-VLF1-Myc.His και RFP-Myc.His. Για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες N-ODV-RFP-Myc.His, ODV-RFP-Myc.His και GP64-RFP-Myc.His επιβεβαιώθηκε ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός (κόκκινος φθορισμός) **(Εικόνα 32)**. Αντίθετα, για τις Ac93-RFP-Myc.His και RFP-Myc.His (control) επιβεβαιώθηκε ο διττός εντοπισμός (πυρηνικός και κυτταροπλασματικός) **(Εικόνα 32)**. Τέλος, αναφορικά με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη IE1-RFP-Myc.His παρατηρήθηκε διάχυτος πυρηνικός εντοπισμός **(Εικόνα 32)**.

Στη συνέχεια, κυτταρικές σειρές Hi5 μολύνθηκαν με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP και τα κύτταρα συλλέχθηκαν περίπου 48h μετά τη μόλυνση. Οι πρωτεΐνες παρουσίασαν πανομοιότυπο υποκυτταρικό εντοπισμό **(Εικόνα 33)** με μόνη διαφορά την IE1-RFP-Myc.His στην οποία παρατηρήθηκε διάχυτος πυρηνικός εντοπισμός σε όλο τον πυρήνα σε αντίθεση με τον εστιασμένο εντοπισμό κατά την μόλυνση με τον ιό **(Εικόνα 33)**. Από την άλλη πλευρά, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη B2-GFP είχε κυρίαρχη εντόπιση στον πυρήνα των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες στις οποίες παρατηρήθηκε συνεντοπισμός με τη B2-GFP ήταν η IE1-RFP-Myc.His στον πυρήνα, η Ac93-RFP-Myc.His κυρίως στον πυρήνα και περιπυρηνικά, και η RFP-Myc.His στον πυρήνα **(Εικόνα 33)**. Αναφορικά με τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες LEF-5-RFP-Myc.His

και VLF-1-RFP-Myc.His δεν παρατηρήθηκε ομοιογενής υποκυτταρικός εντοπισμός μεταξύ των κυττάρων (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται) με αποτέλεσμα την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης.



Εικόνα 32. Υποκυτταρικός εντοπισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών N-ODV, ODV, GP64 και Ac93. Κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-N-ODV-RFP-Myc.His, pEA-ODV-RFP-Myc.His, pEA-IE1-RFP-Myc.His, pEA-GP64-RFP-Myc.His, pEA-Ac93-RFP-Myc.His και pEA-RFP-Myc.His σε συνδυασμό με το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα κύτταρα σε λευκό φως. Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η έκφραση της εκάστοτε συντηγμένης RFP πρωτεΐνης. Στην τρίτη στήλη παρουσιάζεται η χρώση των πυρήνων με DAPI (μπλε χρώση). Στην τέταρτη στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη των δύο έγχρωμων καναλιών. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 10 μm.



Εικόνα 33. Υποκυτταρικός εντοπισμός των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών N-ODV, ODV, GP64 και Ac93 παρουσία του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης pEA-N-ODV-RFP-Myc.His, pEA-ODV-RFP-Myc.His, pEA-IE1-RFP-Myc.His, pEA-GP64-RFP-Myc.His, pEA-Ac93-RFP-Myc.His και pEA-RFP-Myc.His, και κατόπιν μολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται τα κύτταρα σε λευκό φως. Στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η έκφραση της εκάστοτε συντηγμένης RFP πρωτεΐνης. Στην τρίτη στήλη παρουσιάζεται η έκφραση της συντηγμένης B2 με GFP πρωτεΐνης. Στην τέταρτη στήλη παρουσιάζεται η χρώση των πυρήνων με DAPI (μπλε χρώση). Στην πέμπτη στήλη παρουσιάζεται η επικάλυψη της δεύτερης και τρίτης στήλης. Η παρατήρηση έγινε με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης laser και οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 10 μm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συζήτηση

4.1 Γενικά

Οι ανασυνδυασμένοι μπακουλοϊοί χρησιμοποιούνται ευρέως για να εκφράσουν ετερόλογα γονίδια τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες, όσο και σε προνύμφες εντόμων, ενώ το σύστημα φορέα έκφρασης μπακουλοϊού (baculovirus expression vector system, BEVS) φέρει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα όπως ήδη αναπτύχθηκε εκτενώς στην Εισαγωγή. Σε εργαστηριακό επίπεδο καθώς και για βιομηχανικούς σκοπούς, ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος μπακουλοϊός είναι ο πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *Autographa californica* (AcMNPV), ένας ιός με δίκλωνο γονιδίωμα DNA μεγέθους περίπου 134 kb (65). Το μεγάλο μέγεθος του γονιδιώματός του δίνει στον μπακουλοϊό άφθονη ικανότητα να φιλοξενήσει μεγάλες ποσότητες ξένου DNA, συμπεριλαμβανομένων πολλαπλών γονιδίων, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα έναντι άλλων φορέων έκφρασης όπως ο ιός της δαμαλίτιδας και ο αδενοϊός (143).

Στα πλαίσια της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, για τη μελέτη της παραγωγής dsRNA (με τη μορφή μιας RNA φουρκέτας) χρησιμοποιώντας το σύστημα έκφρασης μπακουλοϊού, υλοποιήθηκε η κατασκευή του ανασυνδυασμένου μπακουλοϊού AcMNPV ώστε να εκφράζει το γονίδιο της πρωτεΐνης δέσμησης dsRNA, B2, του ιού Flock House συζευγμένο με το γονίδιο GFP και τη φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, dsLuc. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε σε υποκυτταρικό επίπεδο σύγκριση του παραγόμενου μέσω της πρωτεΐνης B2-GFP βιοφθορισμού με την κατανομή των ικών πρωτεϊνών που είτε αποτελούν δομικά στοιχεία των εκβλαστανόντων ικών σωματίων BVs (Budded Virions) ή των έγκλειστων ικών σωματίων ODVs (Occluded Derived Virions), είτε εμπλέκονται στη μεταφορά των ικών σωματίων στην πορεία της μόλυνσης με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του προτύπου αύξησης του dsRNA.

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπακουλοϊού σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, παρουσία ή απουσία ικής μόλυνσης με τον ανασυνδυασμένο

μπακουλοϊό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP που παράγει τη φουρκέτα dsLuc, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Hi5 και/ή Sf21. Τα κύτταρα μελετήθηκαν σε επίπεδο έκφρασης των ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με την υποκυτταρική κατανομή αυτών, ενώ ακόμη ελέγχθηκαν τα επίπεδα του ανασυνδυασμένου ιού σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο.

4.2 Υποκυτταρικός εντοπισμός ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών και μορίων dsRNA

Αναφορικά με τη μελέτη παρατήρησης του βιοφθορισμού της πρωτεΐνης ODV-25 σε συνδυασμό με τη B2-GFP του ανασυνδυασμένου ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, δοκιμάστηκαν δύο κατασκευές, οι οποίες έδωσαν πολύ παρόμοια αποτελέσματα. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε είτε η πρωτεΐνη πλήρους μήκους (ODV-E25), είτε το υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (N-ODV-E25) αποτελούμενο από 24 αμινοξικά κατάλοιπα, σε κυτταρικές σειρές Hi5. Όπως δείχθηκε, για καμία από τις δύο μορφές της πρωτεΐνης ODV-25 δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός με την B2-GFP (**Εικόνα 33**). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές παρουσίασαν όμοιο κυτταροπλασματικό εντοπισμό τόσο σε μολυσμένα κύτταρα όσο και σε κύτταρα χωρίς μόλυνση (**Εικόνες 32 και 33**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε μολυσμένα κύτταρα η πρωτεΐνη ODV-E25 σχετίζεται τόσο με τα BV όσο και με τα ODV ιικά σωματίδια του AcMNPV (79, 81), υποδηλώνοντας την παρουσία της και στον πυρήνα. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκε πυρηνικός εντοπισμός τόσο για την N-ODV-E25-RFP όσο και για την ODV-E25-RFP. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να σχετίζεται με το χρονική στιγμή έναρξης έκφρασης του πλασμιδίου, η οποία ενδεχομένως συνέβη πριν από τη μόλυνση με τον ιό. Παρόμοιος υποκυτταρικός εντοπισμός έχει αναφερθεί για ομόλογα της πρωτεΐνης ODV-E25, στην περίπτωση όπου για τις μολύνσεις των κυτταρικών σειρών είχε χρησιμοποιηθεί ο πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *Spodoptera litura* (SplMNPV) (84). Ωστόσο, αντίθετα ευρήματα προέκυψαν από πειραματικές μελέτες που χρησιμοποίησαν τον πολλαπλό πυρηνικό πολυεδρικό ιό του *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) (80) και τον πολλαπλό πυρηνικό πολυεδρικό ιό του *Bombyx mori* (BmMNPV) (85), στις οποίες περιγράφεται ο πυρηνικός εντοπισμός περιφερικά του ιογενούς στρώματος. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που

αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος Western, παρατηρήθηκε και για τις δύο πρωτεΐνες η έκφρασή τους τόσο στο διαλυτό όσο και στο μη διαλυτό κλάσμα περίπου στα 32.5 kDa για την N-ODV-E25-RFP και στα 55 kDa για την ODV-E25-RFP, συμπεριλαμβανομένου του επιτόπου Mys.His. Όμοια έκφραση παρατηρήθηκε τόσο σε μολυσμένα κύτταρα όσο και σε μη μολυσμένα, καθώς επίσης και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών, Hi5 και Sf21 (**Εικόνες 19-22**). Στο υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας των μολυσμένων κυττάρων, επιβεβαιώθηκε η έκκριση της πρωτεΐνης N-ODV-E25 στο θρεπτικό μέσο (**Εικόνα 25**). Ενδιαφέρον εύρημα επίσης αποτελεί η διπλή ζώνη που εμφάνισε η N-ODV-E25-RFP στο διαλυτό κλάσμα σε αντίθεση με την ODV-E25-RFP. Η διπλή ζώνη της πρωτεΐνης ODV-E25 έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες, χωρίς όμως αυτό να σχετίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης (80, 84). Επομένως, κάποια άλλη τροποποίηση συμβαίνει στην πρωτεΐνη ODV-E25 του μπακουλοϊού, η οποία πιθανώς να σχετίζεται με το υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, N-ODV-E25.

Ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό της IE1-RFP, παρατηρήθηκε πυρηνικός συνεντοπισμός μεταξύ του βιοφθορισμού της και του βιοφθορισμού της B2-GFP. Ο πυρηνικός αυτός συνεντοπισμός ήταν αναμενόμενος, καθώς όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες, η IE1 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα ως πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τη μεταγραφή των μπακουλοϊών και, ειδικότερα σε μολυσμένα κύτταρα, η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο ιογενές στρώμα (85, 111) (**Εικόνα 33**). Σε μη μολυσμένες κυτταρικές σειρές Hi5 παρατηρήθηκε διάχυτος πυρηνικός εντοπισμός σε όλο το πυρηνόπλασμα, παρατήρηση που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (85, 111) (**Εικόνα 32**). Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος Western, παρατηρήθηκε κύρια έκφραση στο μη διαλυτό κλάσμα, και στις δύο κυτταρικές σειρές περίπου στα 96.5 kDa (**Εικόνες 19-22**), με ενισχυμένη έκφραση στα κύτταρα που δεν ήταν μολυσμένα με τον μπακουλοϊό. Εξαίρεση αποτελεί η έλλειψη έκφρασης της IE1 στο μη διαλυτό κλάσμα στα μολυσμένα Hi5 κύτταρα (**Εικόνα 21**), το οποίο πιθανώς να οφείλεται σε τεχνικό λάθος καθώς σε επαναλήψεις του ίδιου πειράματος ήταν εμφανής η έκφρασή της στο μη διαλυτό κλάσμα.

Η πρωτεΐνη GP64-RFP, όπως ήταν αναμενόμενο καθώς αποτελεί δομική πρωτεΐνη σύντηξης φακέλου των εκβλαστανόντων ιικών σωματίων BV, παρουσίασε κυτταροπλασματική

εντόπιση με αυξημένο βιοφθορισμό στη μεμβράνη των κυττάρων και περιπυρηνικά, κατά τη 2^η ημέρα μετά τη μόλυνση **(Εικόνας 33)**. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν πειράματα σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό BmMNPV (78). Σε μη μολυσμένα κύτταρα παρουσίασε εξίσου κυτταροπλασματική εντόπιση **(Εικόνα 32)**. Η συσχέτισή της ως μεμβρανική πρωτεΐνη επιβεβαιώθηκε και μέσω ανοσοαποτυπώματος Western, όπου η πρωτεΐνη έδειξε ισχυρή έκφραση στο μη διαλυτό κλάσμα, και στις δύο κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν **(Εικόνες 19-22)**. Εκτός από τη ζώνη στα 90.15 kDa που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη σύντηξης GP64-RFP-Myc.His, παρατηρήθηκε επίσης ζώνη περίπου στα 35 kDa, για την οποία πιθανώς να ευθύνεται ο τρόπος αποικοδόμησης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Στο υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας των μολυσμένων κυττάρων **(Εικόνα 25)**, δεν επιβεβαιώθηκε η έκκριση της πρωτεΐνης στο θρεπτικό μέσο, όπως έχει δείξει και προηγούμενη μελέτη που χρησιμοποίησε τον ιό BmMNPV, όπου δεν παρατηρήθηκε έκκριση της GP64 εκτός των κυττάρων (78).

Αναφορικά με την πρωτεΐνη Ac93, παρατηρήθηκε συνεντοπισμός μεταξύ της πρωτεΐνης Ac93-RFP και της B2-GFP με κύρια έμφαση στον πυρήνα **(Εικόνα 33)**. Σε μολυσμένα κύτταρα η Ac93-RFP παρουσίασε τόσο κυτταροπλασματική όσο και πυρηνική εντόπιση, με ιδιαίτερη έμφαση στη ζώνη γύρω από τον πυρήνα και στο ιογενές στρώμα **(Εικόνα 33)**, γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με το ρόλο της τόσο στη μορφογένεση του περιβλήματος των ODV όσο και την έξοδο των νουκλεοκαψιδίων από τους πυρήνες (117). Δακτύλιος γύρω από τον πυρήνα παρατηρήθηκε και από την B2-GFP. Σε μη μολυσμένα κύτταρα, η Ac93-RFP είχε κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό και μερικό πυρηνικό εντοπισμό **(Εικόνα 32)**. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος Western, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε τόσο στο διαλυτό όσο και στο μη διαλυτό κλάσμα **(Εικόνες 20 και 23)**, ενώ παρατηρήθηκε ασθενή έκφρασή της στο υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας Hi5 απουσίας ιού **(Εικόνα 24)**.

Σε κύτταρα χωρίς μόλυνση από τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, η μη συντηγμένη πρωτεΐνη RFP (μάρτυρας) είχε κυρίως κυτταροπλασματικό εντοπισμό **(Εικόνα 32)**. Στα μολυσμένα κύτταρα παρόλα αυτά, 48 ώρες μετά τη μόλυνση με τον ιό παρατηρήθηκε πέραν του κυτταροπλασματικού εντοπισμού, έντονος εστιασμένος πυρηνικός εντοπισμός, πιθανώς

στο ιογενές στρώμα (**Εικόνα 33**). Στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε και στα δύο κλάσματα, με ενισχυμένη έκφραση στο διαλυτό κλάσμα. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και στις δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο σε μολυσμένα όσο και σε μη μολυσμένα κύτταρα (**Εικόνες 19-23**). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε έντονη έκκρισή της στο θρεπτικό μέσο (**Εικόνες 24-26**).

Σε όλες τις περιπτώσεις, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη B2-GFP είχε κυρίαρχη εντόπιση στον πυρήνα των κυττάρων, κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη του μη συνεντοπισμού των παραγόμενων μορίων dsLuc με την πρωτεΐνη Dicer-2 η οποία εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (144), άρα και την προσδοκία για αυξημένη παραγωγή τους.

Επιπλέον, σε προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τις πρωτεΐνες LEF-5-RFP-Myc.His και VLF-1-RFP-Myc.His, δεν παρατηρήθηκε ομοιογενής υποκυτταρικός εντοπισμός μεταξύ των κυττάρων Hi5 (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται εδώ), με αποτέλεσμα την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των αιτιών αυτής της ανομοιογένειας. Παρόλα αυτά, στη μελέτη της έκφρασής τους μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, οι πρωτεΐνες έδειξαν ικανοποιητική έκφραση στο διαλυτό κλάσμα σε μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα Hi5 (**Εικόνες 19,20 και 23**).

4.3 Μελέτη της ιικής μόλυνσης σε επίπεδο πρωτεΐνης, γονιδιώματος και παραγόμενου dsRNA

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ανασυνδυασμένου μπακουλοϊού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, αυτά ήταν πανομοιότυπα σε όλα τα δείγματα. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της πρωτεΐνης νρ39 του ιού, μεγέθους 39 kDa, μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, η οποία αποτελεί κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού (96), έδειξε την έκφραση της πρωτεΐνης στο μη διαλυτό κλάσμα σε όλα τα δείγματα που είχαν μολυνθεί με τον ιό (**Εικόνες 27 και 28**). Σε επίπεδο γονιδιώματος, τα δείγματα παρουσίασαν πανομοιότυπα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου πρώιμης φάσης *he65* και της δομής μίσχου της φουρκέτας *dsLuc* του ιού AcMNPV-dsLuc/B2-GFP στο μη διαλυτό κλάσμα (**Εικόνα 29**). Όπως παρατηρήθηκε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *he65* ήταν πανομοιότυπα μεταξύ των δειγμάτων, με εξαίρεση το δείγμα που είχε διαμολυνθεί με τον φορέα pEA-VLF-1-RFP-Myc.His (**Εικόνα 29B**), όπου

παρατηρήθηκε μικρότερη ένταση στην ζώνη, άρα και λιγότερη ποσότητα γονιδίου στο δείγμα. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στο ότι η παρουσία της πρωτεΐνης VLF-1 πιθανώς να επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγή του ιού.

Ως προς τη δομή μίσχου της φουρκέτας *dsLuc*, τα δείγματα που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς *pEA-ODV-RFP-Myc.His*, *pEA-IE1-RFP-Myc.His*, *pEA-GP64-RFP-Myc.His* και *pEA-RFP-Myc.His*, εμφάνισαν πανομοιότυπα επίπεδα έκφρασης (**Εικόνα 30A**). Αντίθετα, το δείγμα που είχε διαμολυνθεί με το φορέα *pEA-N-ODV-RFP-Myc.His* εμφάνισε χαμηλότερη έκφραση (**Εικόνα 30A**), γεγονός που μπορεί επίσης να σχετίζεται με την χαμηλότερη ιική έκφραση λόγω της παρουσίας της πρωτεΐνης N-ODV. Ακόμη, τα δείγματα που διαμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης *pEA-Ac93-RFP-Myc.His*, *pEA-LEF-5-RFP-Myc.His*, *pEA-VLF-1-RFP-Myc.His* και *pEA-RFP-Myc.His* (**Εικόνα 30B**), εμφάνισαν αρκετά χαμηλότερη έκφραση συγκριτικά με τα δείγματα της εικόνας 30A, παρατήρηση που ίσως οφείλεται στη χρονική περίοδο που έγινε η συλλογή των δειγμάτων, η οποία ήταν συντομότερη.

Η ανίχνευση του ολικού dsRNA με τη μέθοδο του στυπώματος κηλίδας (Dot Blot) στα μολυσμένα δείγματα Hi5 με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, έδειξε την αυξημένη παρουσία του ολικού dsRNA σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα-μάρτυρες που επίσης δεν είχαν διαμολυνθεί με τους εκάστοτε φορείς έκφρασης ιικών πρωτεϊνών (**Εικόνα 31**). Η αύξηση αυτή επιβεβαιώνει την εύρυθμη λειτουργία της κατασταλτικής πρωτεΐνης B2 του ιού Flock House, και την πιθανή έκφραση της φουρκέτας dsLuc σε μεγάλες ποσότητες. Πειραματική μελέτη που έλεγξε τη δράση και την έκφραση της B2 στον μπακουλοϊό AcMNPV έδειξε ότι όταν η B2 παράχθηκε από μπακουλοϊούς σε Δίπτερα και σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων κατόπιν θερμικής καταπόνησης, οδήγησε σε καταστολή του κατακερματισμού των εξωγενών μορίων dsRNA (145).

4.4 Μελλοντικές προοπτικές

Στην παρούσα εργασία υλοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμασίες με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του μοτίβου αύξησης του παραγόμενου dsRNA κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με τον ανασυνδυασμένο μπακουλοϊό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP σε κυτταρικές σειρές Hi5 και/ή Sf21. Μελλοντικές προοπτικές της παρούσας μελέτης, συμπεριλαμβάνουν τη

διερεύνηση των λόγων για τους οποίους οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες LEF-5-RFP-Myc.His και VLF-1-RFP-Myc.His δεν εμφάνισαν ομοιογενή υποκυτταρικό εντοπισμό μεταξύ των κυττάρων, μέσω επανάληψης και βελτιστοποίησης ορισμένων παραμέτρων των πειραματικών διαδικασιών. Ωστόσο, η εκ νέου κλωνοποίησή τους δεν κρίνεται απαραίτητη, καθώς ο έλεγχός τους σε επίπεδο πρωτεώματος έδειξε την έκφραση των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Επιπρόσθετα, κρίνεται αναγκαία η σύγκριση μολυσμένων κύτταρων με τον AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, με κύτταρα που θα μολυνθούν με τον μπακουλοϊό-μάρτυρα AcMNPV-dsLuc/GFP, προκειμένου να διερευνηθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός των ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών παρουσία και απουσία της πρωτεΐνης B2, καθώς επίσης και να μελετηθούν σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Επιπλέον, τα πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού με μικροσκοπική παρατήρηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης θα πρέπει να πραγματοποιηθούν για τους φορείς των ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών, αντίστοιχα, και στην περίπτωση των κυττάρων Sf21.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Συμπεράσματα

Ολοκληρώνοντας την παρούσα Διπλωματική Εργασία, μπορούν να εξαχθούν συνοπτικά τα εξής συμπεράσματα:

Κατά τον υποκυτταρικό εντοπισμό των ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών N-ODV-E25-RFP, ODV-E25-RFP, IE1-RFP, GP64-RFP και Ac93-RFP σε κύτταρα μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο μπακουλοϊό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, ύστερα και από ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, τα δεδομένα που προέκυψαν έδειξαν τον πανομοιότυπο υποκυτταρικό εντοπισμό των ιικών πρωτεϊνών σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος ή κάποιος διαφορετικός μπακουλοϊός. Επιπλέον, η παρουσία της πρωτεΐνης B2 φαίνεται να μη μεταβάλλει το βασικό μοτίβο του εντοπισμού των ιικών πρωτεϊνών κατά τη μόλυνση, ωστόσο αυτή η παρατήρηση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη B2-GFP έδειξε να έχει ισχυρή εντόπιση στον πυρήνα, γεγονός που αποτελεί ένδειξη του μη συνεντοπισμού των μορίων dsRNA με την πρωτεΐνη κατακερματισμού Dicer-2, άρα και την αυξημένη παραγωγή τους. Ο συνεντοπισμός της B2 με τις ανασυνδυασμένες ιικές πρωτεΐνες στο ιογενές στρώμα επιβεβαιώνει τον τόπο δράσης της B2 σε περιοχές με υψηλή συγκέντρωση δίκλωνων μορίων RNA. Επιπλέον, η αυξημένη ανίχνευση dsRNA σε κύτταρα που είχαν μολυνθεί με τον ανασυνδυασμένο μπακουλοϊό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, σε σχέση με μη μολυσμένα κύτταρα, επιβεβαιώνει την επιτυχημένη δράση της πρωτεΐνης B2 στην καταστολή της RNA αποσιώπησης και την πιθανή έκφραση της φουρκέτας dsLuc σε μεγάλες ποσότητες.

Εξειδικευμένα dsRNA μπορεί να έχουν τοξική επίδραση όταν οι αλληλουχίες τους παρουσιάζουν ισχυρή ομολογία με τις αλληλουχίες σημαντικών κυτταρικών γονιδίων, όπως είναι αυτά των επιβλαβών λεπιδοπτέρων εντόμων. Η ασφαλής μεταφορά των μορίων dsRNA σε μεγάλες ποσότητες, για την ενίσχυση της ικανότητάς τους να προκαλούν γονιδιακή αποσιώπηση σε σημαντικούς ομόλογους RNA-στόχους (RNA-εξαρτώμενη γονιδιακή αποσιώπηση) κρίνεται αναγκαία. Η παραγωγή των dsRNA σε υψηλά επίπεδα μέσω των

συστημάτων έκφρασης μπακουλοϊών, δεν είχε ερευνηθεί μέχρι σήμερα. Η χρήση της κατασταλτικής πρωτεΐνης B2 στο σύστημα έκφρασης μπακουλοϊού είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, που από τα πρώτα ευρήματα φαίνεται να αυξάνει την παραγωγή των dsRNA. Περαιτέρω μελέτες για τη σταθερότητα και τα επίπεδα έκφρασης, καθώς και την αλληλεπίδρασή της με τις εκάστοτε χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές κρίνεται αναγκαία.

Συνεπώς, τα ευρήματα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας σχετικά με την καταστολή της RNA αποσιώπησης, μέσω της B2 πρωτεΐνης σε συστήματα έκφρασης μπακουλοϊών, με σκοπό την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων dsRNA, καθώς επίσης και την αλληλεπίδρασή της με τις ιικές πρωτεΐνες σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, θα μπορούσαν να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες στον περαιτέρω χειρισμό σημαντικών ενδογενών γονιδίων των Λεπιδοπτέρων και να συνεισφέρουν στη διαχείριση και τον έλεγχο πληθυσμών επιβλαβών εντόμων που προκαλούν μεγάλες γεωργικές και οικονομικές ζημιές.

Περίληψη

Η διαχείριση επιβλαβών εντόμων μέσω της RNA παρεμβολής (RNAi) συνιστά μια μεθοδολογία με πολλές προοπτικές, που θεωρείται ακίνδυνη για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η παράδοση εξειδικευμένων μορίων dsRNA σε έντομα-στόχους, εγκαψιδιωμένων μέσα σε ιόμορφα σωμάτια (VLPs). Η RNA παρεμβολή, κατευθυνόμενη από μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), αποτελεί ισχυρό αντιικό μηχανισμό κατά RNA και DNA ιών σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ειδικότερα, ο μηχανισμός αυτός ξεκινά με την αναγνώριση του dsRNA ικής προέλευσης στο κυτταρόπλασμα από το ένζυμο τύπου RNase-III Dicer-2 (Dcr2), μετατρέποντάς το σε siRNAs. Προκειμένου λοιπόν να καταστεί εφικτή η παραγωγή των dsRNA σε υψηλά επίπεδα, χρησιμοποιήθηκε ο ανασυνδυασμένος πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός AcMNPV, ο οποίος εκφράζει μια φθορίζουσα ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη του ιού Flock House που δρα ως παρεμποδιστής του RNAi (B2-GFP) και μια RNA φουρκέτα που στοχεύει στο γονίδιο της λουσιφεράσης (dsLuc). Η στρατηγική αποσκοπεί στην πρόσδεση πολλών μορίων B2 στα μόρια dsLuc που θα εκφράζονται, με στόχο την αποφυγή του κατακερματισμού τους από τη Dicer-2. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της υποκυτταρικής κατανομής της B2, άρα και της φουρκέτας dsLuc, παρουσία φθορίζουσών ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (ODV, IE1, GP64, Ac93) για την καλύτερη αξιολόγηση της αύξησης των dsRNA. Συγχρόνως, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο για την έκφραση του ιού. Επιπλέον, εκτιμήθηκαν τα επίπεδα παραγωγής των μορίων dsRNA σε μολυσμένα κύτταρα συγκριτικά με μη μολυσμένα. Ύστερα από σύγκριση με την υπάρχουσα αρθρογραφία, δείχθηκε ο πανομοιότυπος υποκυτταρικός εντοπισμός των ιικών πρωτεϊνών, ενώ η παρουσία της πρωτεΐνης B2 φαίνεται να μην μεταβάλλει το βασικό μοτίβο του εντοπισμού των ιικών πρωτεϊνών κατά τη μόλυνση. Τέλος, η εντόπιση της πρωτεΐνης B2-GFP κυρίως στον πυρήνα και η αύξηση των ολικών μορίων dsRNA στα μολυσμένα κύτταρα με τον ιό AcMNPV-dsLuc/B2-GFP, δείχνουν την πιθανή αύξηση των επιθυμητών dsRNA.

Abstract

The management of harmful insects through RNA interference (RNAi) is a methodology with many perspectives, which is considered as safe for the environment and humans. An interesting approach is the delivery of specific dsRNA molecules, encapsulated in virus-like particles (VLPs), to target insects. RNA interference, directed by small interfering RNAs (siRNAs), is a dynamic antiviral mechanism against RNA and DNA viruses in many eukaryotic organisms. In particular, this mechanism initially recognizes dsRNA molecules of viral origin in the cytoplasm by the enzyme RNase-III Dicer-2 (Dcr2), converting them into siRNAs. In order to enable the production of dsRNAs at high levels, a recombinant nucleopolyhedrovirus AcMNPV was used. This virus expresses a fluorescent recombinant Flock House virus protein that acts as an RNAi inhibitor (B2-GFP) as well as a RNA hairpin targeting the luciferase gene (dsLuc). This strategy aims to bind many B2 molecules on the expressed dsLuc molecules, in order to avoid their fragmentation by Dicer-2. The present study was focused on the study of the subcellular distribution of B2, and therefore of the dsLuc hairpin, under the presence of fluorescent recombinant viral proteins (ODV, IE1, GP64, Ac93) in order to better evaluate dsRNA accumulation. Moreover, the viral levels were evaluated by genomic and protein analyses. In addition, a comparison of dsRNA expression levels was performed between infected and uninfected cells. When compared with the existing literature, the subcellular localization of viral proteins was shown to be identical, while the presence of B2 protein did not seem to affect the basic pattern of viral protein localization during infection. Finally, the mainly nuclear localization of B2-GFP protein as well as the increase of total dsRNA molecules in cells infected with AcMNPV-dsLuc/B2-GFP virus, indicate the possible increase of the desired dsRNA.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(7):447-59.
2. Zhou R, Hotta I, Denli AM, Hong P, Perrimon N, Hannon GJ. Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. *Molecular cell*. 2008;32(4):592-9.
3. Biryukova I, Ye T. Endogenous siRNAs and piRNAs derived from transposable elements and genes in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):278.
4. Cooper AM, Silver K, Zhang J, Park Y, Zhu KY. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest management science*. 2019;75(1):18-28.
5. Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, et al. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*. 2008;453(7196):798-802.
6. Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, et al. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*. 2008;320(5879):1077-81.
7. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
8. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004;23(20):4051-60.
9. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
10. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117(1):69-81.
11. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
12. Förstemann K, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell*. 2007;130(2):287-97.
13. Zhu KY, Palli SR. Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annu Rev Entomol*. 2020;65:293-311.
14. Wang W, Han BW, Tipping C, Ge DT, Zhang Z, Weng Z, et al. Slicing and Binding by Ago3 or Aub Trigger Piwi-Bound piRNA Production by Distinct Mechanisms. *Molecular cell*. 2015;59(5):819-30.
15. Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*. 2012;491(7423):284-7.
16. Olivieri D, Senti KA, Subramanian S, Sachidanandam R, Brennecke J. The cochaperone shutdown defines a group of biogenesis factors essential for all piRNA populations in *Drosophila*. *Molecular cell*. 2012;47(6):954-69.
17. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-6.

18. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*. 2001;15(2):188-200.
19. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005;123(4):621-9.
20. Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(1):22-32.
21. Rand TA, Ginalski K, Grishin NV, Wang X. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(40):14385-9.
22. Orban TI, Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA (New York, NY)*. 2005;11(4):459-69.
23. van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, Antoniewski C, et al. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & development*. 2006;20(21):2985-95.
24. Santos D, Wynant N, Van den Brande S, Verdonck TW, Mingels L, Peeters P, et al. Insights into RNAi-based antiviral immunity in *Lepidoptera*: acute and persistent infections in *Bombyx mori* and *Trichoplusia ni* cell lines. *Sci Rep*. 2018;8(1):2423.
25. van Mierlo JT, Overheul GJ, Obadia B, van Cleef KW, Webster CL, Saleh MC, et al. Novel *Drosophila* viruses encode host-specific suppressors of RNAi. *PLoS pathogens*. 2014;10(7):e1004256.
26. Mehrabadi M, Hussain M, Matindoost L, Asgari S. The Baculovirus Antiapoptotic p35 Protein Functions as an Inhibitor of the Host RNA Interference Antiviral Response. *J Virol*. 2015;89(16):8182-92.
27. Scotti PD, Dearing S, Mossop DW. Flock House virus: a nodavirus isolated from *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Arch Virol*. 1983;75(3):181-9.
28. Krishna NK, Schneemann A. Formation of an RNA heterodimer upon heating of nodavirus particles. *J Virol*. 1999;73(2):1699-703.
29. Friesen PD, Rueckert RR. Synthesis of Black Beetle Virus Proteins in Cultured *Drosophila* Cells: Differential Expression of RNAs 1 and 2. *J Virol*. 1981;37(3):876-86.
30. Friesen PD, Rueckert RR. Black beetle virus: messenger for protein B is a subgenomic viral RNA. *J Virol*. 1982;42(3):986-95.
31. Chao JA, Lee JH, Chapados BR, Debler EW, Schneemann A, Williamson JR. Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(11):952-7.
32. Qi N, Zhang L, Qiu Y, Wang Z, Si J, Liu Y, et al. Targeting of dicer-2 and RNA by a viral RNA silencing suppressor in *Drosophila* cells. *J Virol*. 2012;86(10):5763-73.
33. Odegard A, Banerjee M, Johnson JE. Flock house virus: a model system for understanding non-enveloped virus entry and membrane penetration. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;343:1-22.
34. Venter PA, Schneemann A. Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(17):2675-87.

35. Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS biology*. 2007;5(9):e220.
36. Aliyari R, Wu Q, Li HW, Wang XH, Li F, Green LD, et al. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*. *Cell host & microbe*. 2008;4(4):387-97.
37. Short JR, Speir JA, Gopal R, Pankratz LM, Lanman J, Schneemann A. Role of Mitochondrial Membrane Spherules in Flock House Virus Replication. *J Virol*. 2016;90(7):3676-83.
38. Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*. 2002;296(5571):1319-21.
39. Lu R, Maduro M, Li F, Li HW, Broitman-Maduro G, Li WX, et al. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2005;436(7053):1040-3.
40. King A. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2012.
41. Miele SA, Garavaglia MJ, Belaich MN, Ghiringhelli PD. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. *Int J Evol Biol*. 2011;2011:379424.
42. Volkman LE. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. *Adv Virus Res*. 1997;48:313-48.
43. Ackermann H-W, Smirnov WA. A morphological investigation of 23 baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1983;41(3):269-80.
44. Miller LK. *The Baculoviruses*. Boston, MA: Springer US; 1997.
45. Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol*. 2006;151(7):1257-66.
46. Zanotto PM, Kessing BD, Maruniak JE. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J Invertebr Pathol*. 1993;62(2):147-64.
47. Garcia-Maruniak A, Maruniak JE, Zanotto PMA, Doumbouya AE, Liu J-C, Merritt TM, et al. Sequence Analysis of the Genome of the *Neodiprion sertifer* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*. 2004;78(13):7036-51.
48. Lauzon HAM, Garcia-Maruniak A, de AZPM, Clemente JC, Herniou EA, Lucarotti CJ, et al. Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 6):1477-89.
49. Volkman LE. Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. *Curr Drug Targets*. 2007;8(10):1075-83.
50. Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol*. 2010;190(2):187-95.
51. Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol*. 1990;35:127-55.

52. Harrison RL, Herniou, E.A., Jehle, J.A., Theilmann, D.A., Burand, J.P., Becnel, J.J., Krell, P.J., M. van Oers, M., Mowery, J.D., Bauchan, G.R. aIRC. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Baculoviridae*. Journal of General Virology. 2019;99(9):1185-6.
53. Milks ML, Washburn JO, Willis LG, Volkman LE, Theilmann DA. Deletion of pe38 attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in *Heliothis virescens*. Virology. 2003;310(2):224-34.
54. Katou Y, Ikeda M, Kobayashi M. Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions. Virology. 2006;347(2):455-65.
55. Katou Y, Yamada H, Ikeda M, Kobayashi M. A single amino acid substitution modulates low-pH-triggered membrane fusion of GP64 protein in *Autographa californica* and *Bombyx mori* nucleopolyhedroviruses. Virology. 2010;404(2):204-14.
56. Long G, Pan X, Kormelink R, Vlak JM. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. J Virol. 2006;80(17):8830-3.
57. Ikeda M, Hamajima R, Kobayashi M. Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. Entomological Science. 2015;18(1):1-20.
58. Braunagel SC, Summers MD. Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. Curr Drug Targets. 2007;8(10):1084-95.
59. Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, et al. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. Virology. 1997;238(2):243-53.
60. Lynn DE. Comparative susceptibilities of insect cell lines to infection by the occlusion-body derived phenotype of baculoviruses. J Invertebr Pathol. 2003;83(3):215-22.
61. Hoopes RR, Jr., Rohrmann GF. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(10):4513-7.
62. Glocker B, Hoopes RR, Jr., Hodges L, Rohrmann GF. In vitro transcription from baculovirus late gene promoters: accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. J Virol. 1993;67(7):3771-6.
63. Gula MA, Buller PL, Weaver RF. alpha-Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells. J Virol. 1981;38(3):916-21.
64. Vail PV. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. Journal of Invertebrate Pathology. 1971;17(3):383-8.
65. Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology. 1994;202(2):586-605.
66. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). In Vitro. 1977;13(4):213-7.
67. Aucoin MG, Mena JA, Kamen AA. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. Current gene therapy. 2010;10(3):174-86.

68. Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML, Wood HA. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnology progress*. 1992;8(5):391-6.
69. Roberts TE, Faulkner P. Fatty acid acylation of the 67K envelope glycoprotein of a baculovirus: *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1989;172(1):377-81.
70. Blissard GW, Wenz JR. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol*. 1992;66(11):6829-35.
71. Dong S, Wang M, Qiu Z, Deng F, Vlaskovic JM, Hu Z, et al. *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Efficiently Infects Sf9 Cells and Transduces Mammalian Cells via Direct Fusion with the Plasma Membrane at Low pH. *Journal of Virology*. 2010;84(10):5351-9.
72. Backovic M, Jardetzky TS. Class III viral membrane fusion proteins. *Current opinion in structural biology*. 2009;19(2):189-96.
73. Garry CE, Garry RF. Proteomics computational analyses suggest that baculovirus GP64 superfamily proteins are class III penetrenes. *Virology Journal*. 2008;5(1):28.
74. Garry CE, Garry RF. Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (gamma penetrene). *Virol J*. 2009;6:145.
75. Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol*. 1996;70(7):4607-16.
76. Oomens AG, Blissard GW. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 1999;254(2):297-314.
77. Ardisson-Araújo DMP, Pereira BT, Melo FL, Ribeiro BM, Báo SN, de A. Zanotto PM, et al. A betabaculovirus encoding a gp64 homolog. *BMC Genomics*. 2016;17(1):94.
78. Rahman MM, Gopinathan KP. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-based surface display system for recombinant proteins. *Journal of General Virology*. 2003;84(8):2023-31.
79. Hou D, Zhang L, Deng F, Fang W, Wang R, Liu X, et al. Comparative proteomics reveal fundamental structural and functional differences between the two progeny phenotypes of a baculovirus. *J Virol*. 2013;87(2):829-39.
80. Russell RL, Rohrmann GF. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Virology*. 1993;195(2):532-40.
81. Wang R, Deng F, Hou D, Zhao Y, Guo L, Wang H, et al. Proteomics of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus budded virions. *J Virol*. 2010;84(14):7233-42.
82. Shrestha A, Bao K, Chen YR, Chen W, Wang P, Fei Z, et al. Global Analysis of Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Gene Expression in the Midgut of the Lepidopteran Host *Trichoplusia ni*. *J Virol*. 2018;92(23).
83. Hong T, Summers MD, Braunagel SC. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(8):4050-5.

84. Li Z, Pan L, Yu H, Li S, Zhang G, Pang Y. Identification and characterization of odv-e25 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus genes*. 2006;32(1):13-9.
85. Kawasaki Y, Matsumoto S, Nagamine T. Analysis of baculovirus IE1 in living cells: dynamics and spatial relationships to viral structural proteins. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 12):3575-83.
86. Chen L, Hu X, Xiang X, Yu S, Yang R, Wu X. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus odv-e25 (Ac94) is required for budded virus infectivity and occlusion-derived virus formation. *Arch Virol*. 2012;157(4):617-25.
87. McLachlin JR, Miller LK. Identification and characterization of vlf-1, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *J Virol*. 1994;68(12):7746-56.
88. Yang S, Miller LK. Activation of Baculovirus Very Late Promoters by Interaction with Very Late Factor 1. *Journal of Virology*. 1999;73(4):3404-9.
89. Russell RL, Pearson MN, Rohrmann GF. Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins. *J Gen Virol*. 1991;72 (Pt 2):275-83.
90. Van Oers MM, Vlak JM. The baculovirus 10-kDa protein. *J Invertebr Pathol*. 1997;70(1):1-17.
91. Ooi BG, Rankin C, Miller LK. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mol Biol*. 1989;210(4):721-36.
92. Yang S, Miller LK. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J Virol*. 1999;73(4):3404-9.
93. Yang S, Miller LK. Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 (vlf-1) gene. *Virology*. 1998;245(1):99-109.
94. Vanarsdall AL, Okano K, Rohrmann GF. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. *J Virol*. 2006;80(4):1724-33.
95. Pearson MN, Russell RL, Rohrmann GF, Beaudreau GS. p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology*. 1988;167(2):407-13.
96. Thiem SM, Miller LK. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of virology*. 1989;63(5):2008-18.
97. Braunagel SC, Burks JK, Rosas-Acosta G, Harrison RL, Ma H, Summers MD. Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J Virol*. 1999;73(10):8559-70.
98. Wu W, Liang H, Kan J, Liu C, Yuan M, Liang C, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus 38K is a novel nucleocapsid protein that interacts with VP1054, VP39, VP80, and itself. *J Virol*. 2008;82(24):12356-64.
99. Wu Y, Wu Y, Wu Y, Tang H, Wu H, Zhang G, et al. Screening of candidate proteins interacting with IE-2 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Molecular biology reports*. 2013;40(10):5797-804.

100. Danquah JO, Botchway S, Jeshtadi A, King LA. Direct interaction of baculovirus capsid proteins VP39 and EXON0 with kinesin-1 in insect cells determined by fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy. *J Virol.* 2012;86(2):844-53.
101. Lanier LM, Volkman LE. Actin binding and nucleation by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Virology.* 1998;243(1):167-77.
102. Guarino LA, Summers MD. Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Enhances Delayed-Early Gene Expression. *J Virol.* 1986;60(1):215-23.
103. Leisy DJ, Rasmussen C, Owusu EO, Rohrmann GF. A mechanism for negative gene regulation in *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol.* 1997;71(7):5088-94.
104. Kovacs GR, Guarino LA, Graham BL, Summers MD. Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology.* 1991;185(2):633-43.
105. Chisholm GE, Henner DJ. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J Virol.* 1988;62(9):3193-200.
106. Kovacs GR, Choi J, Guarino LA, Summers MD. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *Journal of Virology.* 1992;66(12):7429-37.
107. Slack JM, Blissard GW. Identification of two independent transcriptional activation domains in the *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus IE1 protein. *J Virol.* 1997;71(12):9579-87.
108. Rodems SM, Friesen PD. Transcriptional enhancer activity of hr5 requires dual-palindrome half sites that mediate binding of a dimeric form of the baculovirus transregulator IE1. *J Virol.* 1995;69(9):5368-75.
109. Olson VA, Wetter JA, Friesen PD. Oligomerization mediated by a helix-loop-helix-like domain of baculovirus IE1 is required for early promoter transactivation. *J Virol.* 2001;75(13):6042-51.
110. Olson VA, Wetter JA, Friesen PD. Baculovirus transregulator IE1 requires a dimeric nuclear localization element for nuclear import and promoter activation. *J Virol.* 2002;76(18):9505-15.
111. Nagamine T, Kawasaki Y, Iizuka T, Matsumoto S. Focal distribution of baculovirus IE1 triggered by its binding to the hr DNA elements. *J Virol.* 2005;79(1):39-46.
112. Wang Y, Kleespies RG, Huger AM, Jehle JA. The genome of *Gryllus bimaculatus* nudivirus indicates an ancient diversification of baculovirus-related nonoccluded nudiviruses of insects. *J Virol.* 2007;81(10):5395-406.
113. Passarelli AL, Miller LK. Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology.* 1993;197(2):704-14.
114. Harwood SH, Li L, Ho PS, Preston ÅK, Rohrmann GF. AcMNPV Late Expression Factor-5 Interacts with Itself and Contains a Zinc Ribbon Domain That Is Required for Maximal Late Transcription Activity and Is Homologous to Elongation Factor TFIIS. *Virology.* 1998;250(1):118-34.

115. Guarino LA, Dong W, Jin J. In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5. *Journal of virology*. 2002;76(24):12663-75.
116. Gomi S, Zhou CE, Yih W, Majima K, Maeda S. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology*. 1997;230(1):35-47.
117. Yuan M, Huang Z, Wei D, Hu Z, Yang K, Pang Y. Identification of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus ac93 as a Core Gene and Its Requirement for Intranuclear Microvesicle Formation and Nuclear Egress of Nucleocapsids. *Journal of Virology*. 2011;85(22):11664-74.
118. Yue Q, Yu Q, Yang Q, Xu Y, Guo Y, Blissard GW, et al. Distinct Roles of Cellular ESCRT-I and ESCRT-III Proteins in Efficient Entry and Egress of Budded Virions of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*. 2018;92(1):e01636-17.
119. Liu T, Li Y, Qiao B, Jiang Y, Ji N, Li Z. Disrupting the association of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac93 with cellular ESCRT-III/Vps4 hinders nuclear egress of nucleocapsids and intranuclear microvesicles formation. *Virology*. 2020;541:85-100.
120. Jarvis DL. Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods in enzymology*. 2009;463:191-222.
121. Weissmann F, Petzold G, VanderLinden R, Huis In 't Veld PJ, Brown NG, Lampert F, et al. biGBac enables rapid gene assembly for the expression of large multisubunit protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(19):E2564-9.
122. Harrison RL, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res*. 2006;68:159-91.
123. Gupta K, Tölzer C, Sari-Ak D, Fitzgerald DJ, Schaffitzel C, Berger I. MultiBac: Baculovirus-Mediated Multigene DNA Cargo Delivery in Insect and Mammalian Cells. *Viruses*. 2019;11(3).
124. Tsai CH, Wei SC, Lo HR, Chao YC. Baculovirus as Versatile Vectors for Protein Display and Biotechnological Applications. *Current issues in molecular biology*. 2020;34:231-56.
125. Wu Y, Jiang L, Geng H, Yang T, Han Z, He X, et al. A Recombinant Baculovirus Efficiently Generates Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in Cultured Insect Cells and Larvae. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2018;10:38-47.
126. Lavdas AA, Efroze R, Douris V, Gaitanou M, Papastefanaki F, Swevers L, et al. Soluble forms of the cell adhesion molecule L1 produced by insect and baculovirus-transduced mammalian cells enhance Schwann cell motility. *Journal of neurochemistry*. 2010;115(5):1137-49.
127. Makkonen KE, Airenne K, Ylä-Herttulala S. Baculovirus-mediated gene delivery and RNAi applications. *Viruses*. 2015;7(4):2099-125.
128. Grose C, Putman Z, Esposito D. A review of alternative promoters for optimal recombinant protein expression in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expression and Purification*. 2021;186:105924.
129. Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*. 1993;67(8):4566-79.

130. Granados RR, Li G, Blissard GW. Insect cell culture and biotechnology. *Virologica Sinica*. 2007;22(2):83-93.
131. Felberbaum RS. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology journal*. 2015;10(5):702-14.
132. Granados RR, Derksen AC, Dwyer KG. Replication of the *Trichoplusia ni* granulosis and nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. *Virology*. 1986;152(2):472-6.
133. Granados RR, Guoxun L, Derksen ACG, McKenna KA. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1994;64(3):A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus, *Journal of Invertebrate Pathology*.
134. Schneider I. Differentiation of Larval *Drosophila* Eye-Antennal Discs in Vitro. *J Exp Zool*. 1964;156:91-103.
135. Lu M, Iatrou K. Characterization of a domain of the genome of BmNPV containing a functional gene for a small capsid protein and harboring deletions eliminating three open reading frames that are present in AcNPV. *Gene*. 1997;185(1):69-75.
136. Lu M, Farrell PJ, Johnson R, Iatrou K. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30724-8.
137. Douris V, Swevers L, Labropoulou V, Andronopoulou E, Georgoussi Z, Iatrou K. Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. *Adv Virus Res*. 2006;68:113-56.
138. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. 1987;196(4):947-50.
139. Reed LJ, Muench H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493-7.
140. Mamiatis T, Fritsch EF, Sambrook J, Engel J. *Molecular cloning—A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42 \$. *Acta Biotechnologica*. 1985;5(1):104-.
141. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975;98(3):503-17.
142. Swevers L, Liu J, Huvenne H, Smagghe G. Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkworm tissues and the Bm5 cell line: the RNA-binding proteins R2D2 and Translin. *PLoS One*. 2011;6(5):e20250.
143. van Oers MM. Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res*. 2006;68:193-253.
144. Kolliopoulou A, Swevers L. Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkworm Bm5 cells. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2013;43(8):654-63.
145. Hodgson JJ, Wenger LW, Clem RJ, Passarelli AL. Inhibition of dicer activity in lepidopteran and dipteran cells by baculovirus-mediated expression of Flock House virus B2. *Scientific Reports*. 2019;9(1):14494.

Παράρτημα

Αλληλουχίες

LOCUS GP64 1687 bp DNA
29-MAR-2021
DEFINITION (1687 bp)
BASE COUNT 497 a 404 c 425 g 361 t 0 others
ORIGIN

```

1  GTCGACGGTA TCGATAAGCT TGATATAGAT CTCAACATGC TACTAGTAAA TCAGTCACAC
61 CAAGGCTTCA ATAAGGAACA CACAAGCAAG ATGGTAAGCG CTATTGTTTT ATATGTGCTT
121 TTGGCGGCCG CGGCGCATTG TGCCTTTGCG GCGGAGCACT GCAACGCGCA AATGAAGACG
181 GGTCCGTACA AGATTAAAAA CTTGGACATT ACCCCGCCCA AGGAAACGCT GCAAAAAGGAC
241 GTGGAAATCA CCATCGTGGA GACGGACTAC AACGAAAACG TGATTATCGG CTACAAGGGG
301 TACTACCAGG CGTATGCGTA CAACGGCGGC TCGCTGGATC CCAACACACG CGTCGAAGAA
361 ACCATGAAAA CGCTGAATGT GGGCAAAGAG GATTTGCTCA TGTGGAGCAT CAGGCAGCAG
421 TGCGAGGTGG GCGAAGAGCT GATCGACCGT TGGGGCAGTG ACAGCGACGA CTGTTTTTCG
481 GACAACGAGG GCCGCGGCCA GTGGGTCAAA GGCAAAGAGT TGGTGAAGCG GCAGAATAAC
541 AATCACTTTG CGCACCACAC GTGCAACAAA TCGTGGCGAT GCGGCATTTT CACTTCGAAA
601 ATGTACAGCA GGCTCGAGTG CCAGGACGAC ACGGACGAGT GCCAGGTATA CATTTTGGAC
661 GCTGAGGGCA ACCCCATCAA CGTGACCGTG GACACTGTGC TTCATCGAGA CGGCGTGAGT
721 ATGATTCTCA AACAAAAGTC TACGTTTACC ACGCGCCAAA TAAAAGCTGC GTGTCTGCTC
781 ATTAAAGATG ACAAAAATAA CCCCAGATCG GTGACACGCG AACACTGTTT GATTGACAAT
841 GATATATATG ATCTTTCTAA AAACACGTGG AACTGCAAGT TTAACAGATG CATTAAACGC
901 AAAGTCGAGC ACCGAGTCAA GAAGCGGCCG CCCACTTGGC GCCACAACGT TAGAGCCAAG
961 TACACAGAGG GAGACACTGC CACCAAAGGC GACCTGATGC ATATTCAAGA GGAGCTGATG
1021 TACGAAAACG ATTTGCTGAA AATGAACATT GAGCTGATGC ATGCGCACAT CAACAAGCTA
1081 AACAATATGC TGCACGACCT GATAGTCTCC GTGGCCAAGG TGGACGAGCG TTTGATTGGC
1141 AATCTCATGA ACAACTCTGT TTCTTCAACA TTTTGTGTCG ACGACACGTT TTTGCTGATG
1201 CCGTGCACCA ATCCGCCGGC ACACACCAGT AATTGCTACA ACAACAGCAT CTACAAAGAA
1261 GGGCGTTGGG TGGCCAACAC GGACTCGTCG CAATGCATAG ATTTTAGCAA CTACAAGGAA
1321 CTAGCAATTG ACGACGACGT CGAGTTTTGG ATCCCGACCA TCGGCAACAC GACCTATCAC
1381 GACAGTTGGA AAGATGCCAG CGGCTGGTCG TTTATTGCCC AACAAAAAAG CAACCTCATA
1441 ACCACCATGG AGAACACCAA GTTTGGCGGC GTCGGCACCA GTCTGAGCGA CATCACTTCC
1501 ATGGCTGAAG GCGAATTGGC CGCTAAATTG ACTTCGTTCA TGTTTGGTCA TGTAGTTAAC
1561 TTTGTAATTA TATTAATTGT GATTTTATTT TTGTACTGTA TGATTAGAAA CCGTAATAGA
1621 CAATATAGAT CTATATCGAA TTCCTGCAGC CCGGGGATC CACTAGTTCT AGAGCGGCCG
1681 CCACCGC

```

LOCUS B2-GFP 1051 bp DNA

29-MAR-2021

DEFINITION (1051 bp)

BASE COUNT 260 a 330 c 303 g 158 t 0 others

ORIGIN

```

1  GTCGACGGTA TCGATAAGCT TGATCA CCCG GGCAACATGC CAAGCAAAC T CGCGCTAATC
61  CAGGAAC TTC CCGACCGCAT TCAAACGGCG GTGGAAGCAG CAATGGGAAT GAGCTGCCAG
121 AACGCGCCAA ACAACGTGCG CAGGGACCTC GACAACCTGC ACGCTTGCC T AAACAAGGCA
181 AAGCTGACgG TAAGCCGAAT GGTAACATCA CTGcTGGAGA AACCCAGCGT GGTGGCATA C
241 CTAGAGGGAA AGGCCGGAGG TGGATCCGGT GGAGGTATGG TGAGCAAGGG CGAGGAGCTG
301 TTCACCGGGG TGGTGCCCAT CCTGGTCGAG CTGGACGGCG ACGTAAACGG CCACAAGTTC
361 AGCGTGTCCG GCGAGGGCGA GGGCGATGCC ACCTACGGCA AGCTGACCCT GAAGTTCATC
421 TGCATCACCG GCAAGCTGCC CGTGCCCTGG CCCACCCTCG TGACCACTTT CGGCTACGGC
481 CTGCAGTGCT TCGCCCGCTA CCCCACCAC ATGAAGCAGC ACGACTTCTT CAAGTCCGCC
541 ATGCCCGAAG GCTACGTCCA GGAGCGCACC ATCTTCTTCA AGGACGACGG CAACTACAAG
601 ACCCGCGCCG AGGTGAAGTT CGAGGGCGAC ACCCTGGTGA ACCGCATCGA GCTGAAGGGC
661 ATCGACTTCA AGGAGGACGG CAACATCCTG GGGCACAAGC TGGAGTACAA CTACAACAGC
721 CACAACGTCT ATATCATGGC CGACAAGCAG AAGAACGGCA TCAAGGTGAA CTTCAAGATC
781 CGCCACAACA TCGAGGACGG CAGCGTG CAG C TCGCCGACC ACTACCAGCA GAACACCCCC
841 ATCGGCGACG GCCCCGTGCT GCTGCCCGAC AACCCTACC TGAGCTACCA GTCCGCCCTG
901 AGCAAAGACC CCAACGAGAA GCGCGATCAC ATGGTCTCG TGGAGTTCGT GACCGCCGCC
961 GGGATCACTC TCGGCATGGA CGAGCTGTAC AAGTGA GGTA CCTATCGAAT TCCTGCAGCC
1021 CGGGGGATCC ACTAGTTCTA GAGCGGCCGC C

```

//

EKKINHTEΣ

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
GP64-F	ATAGATCTCAACATGCTACTAGTAAATCAGTCAC
GP64-R (BglII)	TTAGAAACCGTAATAGACAATATAGATCTAT
B2-F (SmaI)	CACCCGGGCAACATGCCAAGC
GFP-R (KpnI)	AGGTACCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGC
Ac-he65 F	ATCGCATGCACGTTTCTAAA
Ac-he65 R	GCGAGTATCAACAAGAATGG
Ds-Stem F	AATTCAGCGGGGGCCACCTG
Ds-Stem R	GAAGTCGGGGAAGCGGTTGC

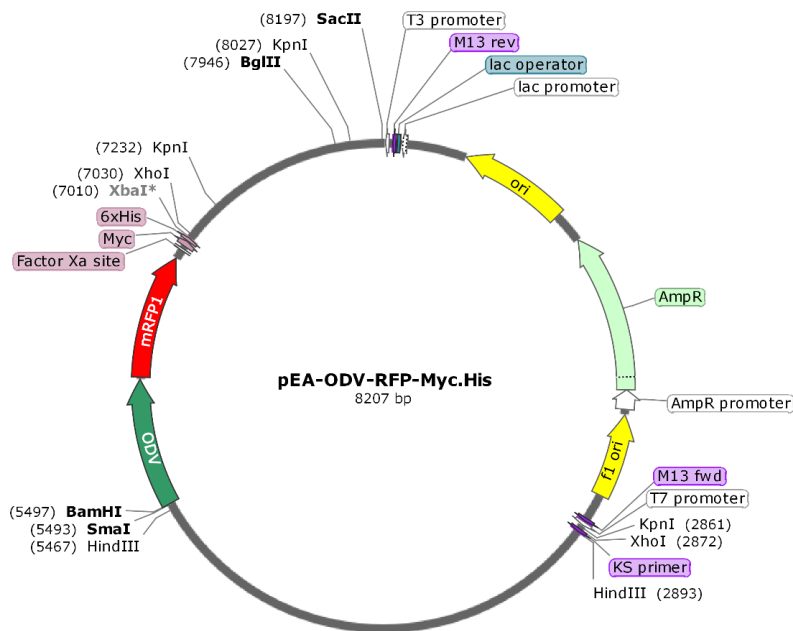
Πίνακας Π1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ PCR

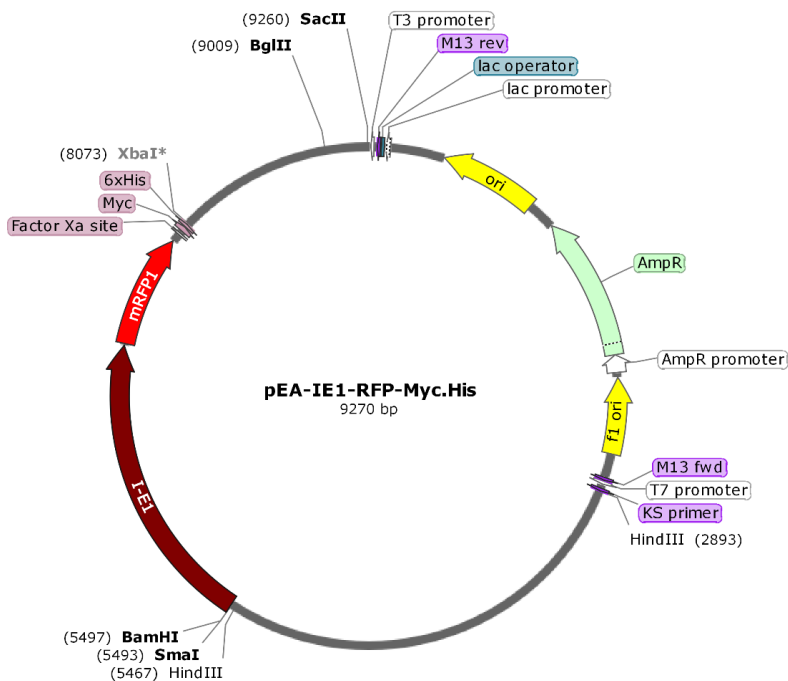
Γονίδιο/ Διαγονίδιο	Πολυμεράση	Εκκινητής F	Εκκινητής R	Αποδιάταξη	Υβριδοποίηση	Επιμήκυνση	Κύκλοι	Παράγραφος
gp64	Phusion High-Fidelity DNA Πολυμεράση	GP64-F	GP64-R (BglIII)	98°C (10'')	56°C (20'')	72°C (45'')	10	3.1.1
				98°C (10'')	61°C (20'')	72°C (45'')	30	
B2-GFP	Phusion High-Fidelity DNA Πολυμεράση	B2-F (SmaI)	GFP-R (KpnI)	98°C (10'')	50°C (20'')	72°C (30'')	5	3.1.2
				98°C (10'')	72°C (50'')		30	
B2-GFP	Ταq DNA Πολυμεράση	B2-F (SmaI)	GFP-R (KpnI)	94°C (45'')	60°C (30'')	72°C (1')	30	3.1.2
he65	Ταq DNA Πολυμεράση	Ac-he65 F	Ac-he65 R	94°C (45'')	55°C (30'')	72°C (30'')	35	3.3.2.2
Stem-dsLuc	Ταq DNA Πολυμεράση	Ds-Stem F	Ds-Stem R	94°C (45'')	55°C (30'')	72°C (30'')	35	3.3.2.2

Πίνακας Π2. Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR που εφαρμόστηκαν στα πλαίσια της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας.

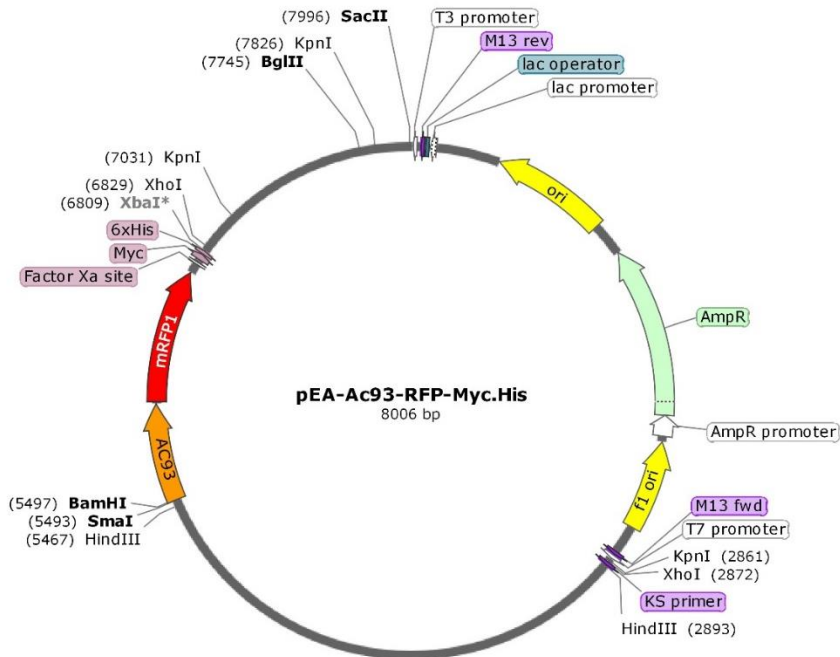
Πλασμιδιακοί χάρτες των ανασυνδυασμένων φορέων pEA



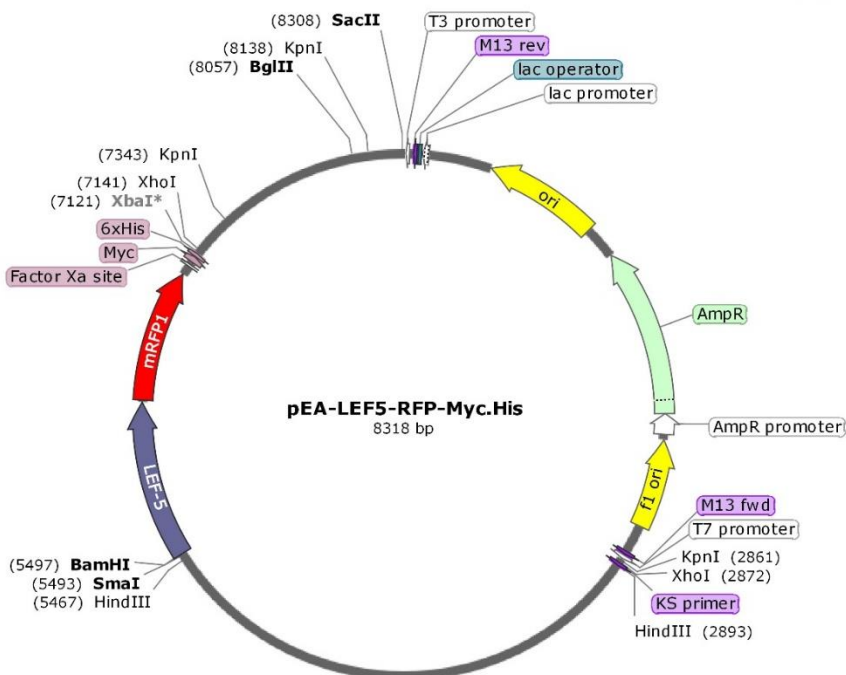
Εικόνα 34. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pEA – ODV – RFP – Myc.His.



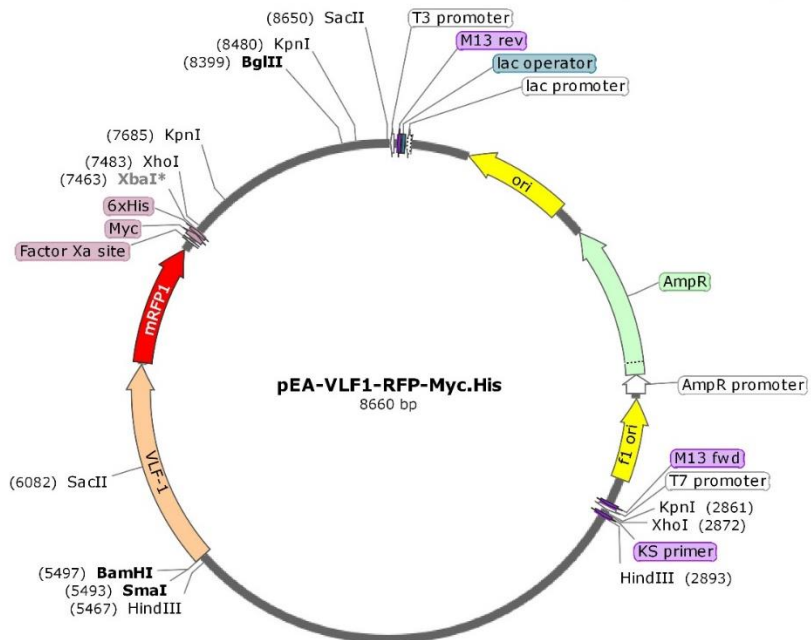
Εικόνα 35. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pEA – IE1 – RFP – Myc.His.



Εικόνα 36. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pEA –Ac93 – RFP – Myc.His.



Εικόνα 37. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pEA –LEF-5 – RFP – Myc.His.



Εικόνα 38. Πλασμιδιακός χάρτης του φορέα pEA –VLF1 – RFP – Myc.His.

