

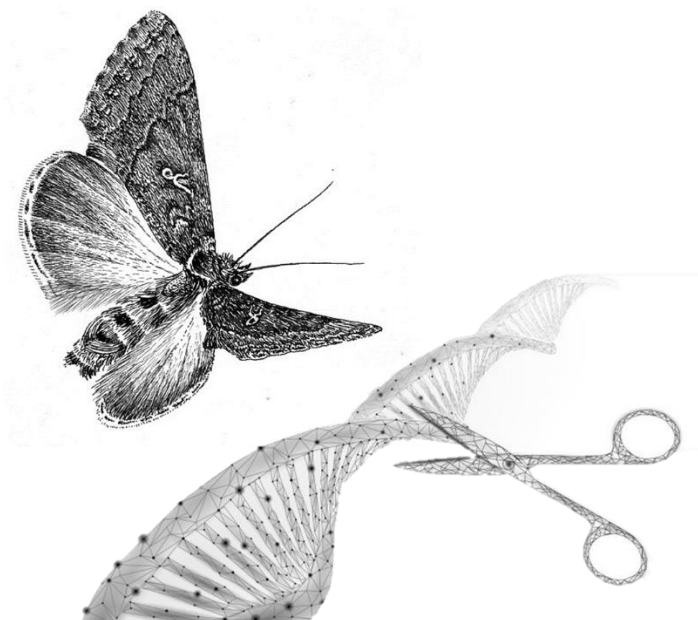


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή μελέτη της γονιδιακής αποσιώπησης
του γονιδίου *dicer-2* σε κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων**



Όνοματεπώνυμο Φοιτητή (ΑΜ)

Αλεξάντερ Γιούζεφ Μαζουρέκ (62116049)

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα

Δρ. Άννα Κολλιοπούλου

Αθήνα, 2021

Πηγές εικόνας εξώφυλλου:

- https://www.si.edu/object/lepidoptera%3Ammhntomology_9314806
- <https://www.istockphoto.com/illustrations/crispr>

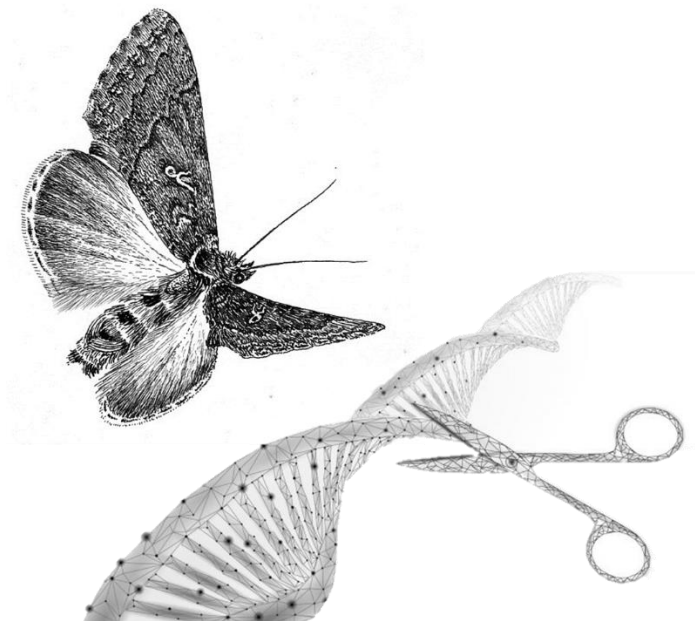


UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
Section of Medical Laboratories



DISSERTATION

**Molecular study of *dicer-2* gene silencing
in Lepidopteran cell lines**



Student Name (CM)

Aleksander Józef Mazurek (62116049)

Name of Supervisor

Anna Kolliopoulou

Athens, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Άννα Κολλιοπούλου** Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών,
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής
- Απόστολος Μπελούκας** Επίκουρος Καθηγητής και Διευθυντής του Εργαστηρίου
Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα
Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
- Χρυσάνθη Βογιατζάκη** Λέκτορας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας
Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP

- Anna Kolliopoulou** Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica
- Apostolos Beloukas** Assistant Professor and Director of the Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica
- Chrysanthi Voyiatzaki** Lecturer, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος ΑΛΕΞΑΝΤΕΡ ΓΙΟΥΖΕΦ ΜΑΖΟΥΡΕΚ του ΚΡΙΣΤΟΦ, με αριθμό μητρώου 62116049 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα 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».

Ο Δηλών



Αλεξάντερ Γιούζεφ
Μαζουρέκ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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 Τομέα των Ιατρικών Εργαστηρίων, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Δρ. Κολλιοπούλου Άννας.

Θα ήθελα εξ αρχής να ευχαριστήσω την άμεση επιβλέπουσά μου Δρ. Κολλιοπούλου Άννα, που μου ανέθεσε την παρούσα Διπλωματική Εργασία. Η παρουσία και η καθοδήγησή της μου χάρισαν πολύτιμες εμπειρίες και γνώσεις στα πλαίσια του Τομέα της Μοριακής Βιολογίας και της αποσιώπησης γονιδίων, ενώ σημειώνω ότι όλες οι εργασίες διεκπεραιώθηκαν σε ένα πολύ ευχάριστο κλίμα συνεργασίας. Πάνω απ' όλα είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πίστη στις δυνατότητες μου και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με την έρευνα. Χαίρομαι ιδιαίτερα που μπόρεσα να συνεργαστώ μαζί της, καθώς ο χαρακτήρας της, η υπομονή και η στήριξη με βοήθησαν να ξεπεράσω πολλά εμπόδια, τα οποία δεν περίμενα τόσο νωρίς να αντιμετωπίσω.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στο επιστημονικό προσωπικό του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» με επικεφαλής τον Ερευνητή Α', Δρ. Luc Swevers. Η αφοσίωση του, η ηρεμία και οι γνώσεις, που παρέχει τον καθιστούν έναν ξεχωριστό άνθρωπο και θα ήθελα στο σημείο αυτό να τονίσω πως ήταν μεγάλη χαρά και τιμή μου, που μπόρεσα να παρευρεθώ και να εργαστώ πάνω στην εργασία μου, στο Εργαστήριό του. Δεν θα ήθελα να ξεχάσω και όλους όσους με βοήθησαν και μου χάριζαν ένα χαμόγελο κάθε μέρα, καθώς εργαζόμουν εκεί και συγκεκριμένα τον Δρ. Κοντογιαννάτο Δημήτριο, την Δρ. Κυθραιώτη Γεωργία, την τεχνικό κα. Στεφάνου Δήμητρα και τον κ. Feifei Ren.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα αξιότιμα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής τον κ. Μπελούκα Απόστολο και την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της Διπλωματικής Εργασίας μου, καθώς και για τις γνώσεις που μου παρείχαν σε όλα τα χρόνια της φοίτησης.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω και την οικογένεια μου, η οποία ήταν και είναι πάντα δίπλα μου, τόσο στις ευχάριστες, όσο και στις δύσκολες στιγμές και με στηρίζει σε κάθε ένα βήμα της ζωής μου, αλλά και όλους τους φίλους μου, που την συμπληρώνουν και ιδιαίτερα τους συμφοιτητές μου Γεώργιο Μαυραειδή και Γρηγόριο Αλβανίδη, για την πολυεπίπεδη συμπαράστασή τους. Για όλα αυτά που μου δόθηκαν και έφτασα έως εδώ ευχαριστώ πρωτίστως τον Θεό.

Αλεξάντερ Γ. Μαζουρέκ

25/02/2021

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AcMNPV:** *Autographa californica* Multicapsid (Multiple) Nucleopolyhedrovirus, πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός του *A. californica*
- asRNA:** antisense RNA, αντινοσηματικό RNA
- ATP:** adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
- BSA:** bovine serum albumine, αλβουμίνη ορού βοός
- Bt:** *Bacillus thuringiensis*
- BV:** budded virus, εκβλαστημένος ιός
- Cas:** CRISPR-associated, συσχετιζόμενο με το CRISPR
- cDNA:** complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
- CHS:** chalcone synthase, συνθάση της χαλκόνης
- CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Ομαδοποιημένες Κανονικά Κατανεμημένες Βραχείες Παλίνδρομες Επαναλήψεις
- crRNA:** CRISPR RNA, RNA της περιοχής CRISPR
- ddH₂O:** double distilled H₂O, διπλά απεσταγμένο H₂O
- DMSO:** dimethylsulfoxide, διμεθυλ-σουλφοξείδιο
- DNA:** deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- dNTPs:** deoxynucleoside triphosphates, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
- dsLuc:** φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης
- dsRBP:** dsRNA-binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης σε dsRNA
- dsRNA:** double-stranded RNA, δίκλωνο RNA
- DTT:** dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη
- EDTA:** ethylene-diamino-tetracetic acid, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
- endo-siRNA:** endogenous siRNA, ενδογενές siRNA
- EtBr:** ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο
- exo-siRNA:** exogenous RNA, εξωγενές RNA
- FBS:** fetal bovine serum, ορός εμβρύου βοός
- FDA:** Food and Drug Administration, Οργανισμός Ελέγχου των Φαρμάκων και Τροφίμων
- GFP:** green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
- HBV:** hepatitis B virus, ιός της ηπατίτιδας B
- HCV:** hepatitis C virus, ιός της ηπατίτιδας C
- HDR:** homology directed repair, επιδιόρθωση εξαρτώμενη από την ομολογία
- Hi5:** High Five κύτταρα από αυγά του λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4)
- HIV:** human immunodeficiency virus, ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
- HP:** hairpin, φουρκέτα

- HPV:** human papillomavirus, ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων
- HRP:** horseradish peroxidase, υπεροξειδάση χρένου (ραπανακιού)
- INFV:** influenza virus, ιός της γρίπης
- kb:** kilobase, χιλιάδα βάσεων
- kbp:** kilobase pair, χιλιάδα ζευγών βάσεων
- kDa:** kilodalton, κιλοντάλτον (μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους πρωτεϊνών)
- MCS:** multiple cloning site, θέση πολλαπλής κλωνοποίησης
- miRNA:** microRNA, μικρό μη-κωδικοποιό RNA
- mRNA:** messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA
- NHEJ:** non-homologous end joining, μη ομόλογη σύνδεση ελεύθερων άκρων
- nt:** nucleotides, νουκλεοτίδια
- ORF:** open reading frame, ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης
- ODV:** occlusion-derived virion, έγκλειστοι ιοί
- pac:** puromycin acetyltransferase, ακετυλοτρανσφεράση της πουρομυκίνης
- PAM:** protospacer adjacent motif, παρακείμενο μοτίβο της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας
- PAMP:** pathogen-associated molecular patterns, παθογόνο-συνδεδεμένο μοριακό πρότυπο
- PBS:** phosphate buffer saline, φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα
- PCR:** polymerase chain reaction, αλυσ(ιδ)ωτή αντίδραση πολυμεράσης
- piRNA:** PIWI-interacting RNA, PIWI-αλληλεπιδρών RNA
- pre-crRNA:** precursor crRNA, πρόδρομο crRNA
- pre-miRNA:** precursor miRNA, πρόδρομο miRNA
- pre-RISC:** precursor RISC, πρόδρομο RISC
- pri-miRNA:** primary miRNA, πρωτογενές miRNA
- PRR:** pattern recognition receptor, υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων
- qRT-PCR:** quantitative Real-Time PCR, ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου
- RAMP:** repeat-associated mysterious proteins, μυστηριώδεις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
- REase:** RNAi efficiency-related nuclease, νουκλεάση σχετιζόμενη με την αποδοτικότητα του RNAi
- RFU:** relative fluorescence units, σχετικές μονάδες φθορισμού
- 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
- RRM:** RNA recognition motif, μοτίβο αναγνώρισης του RNA
- rRNA:** ribosomal RNA, ριβοσωμικό RNA
- RSV:** respiratory syncytial virus, αναπνευστικός συγκυτιακός ιός
- RT:** reverse transcription, αντίστροφη μεταγραφή
- SARS - CoV:** severe acute respiratory syndrome coronavirus, κορονοϊός σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου
- SDS:** sodium dodecyl sulphate, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
- SE:** standard error, τυπικό σφάλμα
- Sf21:** κυτταρική σειρά από το λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda*
- sgRNA:** single guide RNA, οδηγός κλώνος RNA
- siRNA:** short interfering RNA, μικρό παρεμβαλλόμενο RNA
- SpCas9:** *Streptococcus pyogenes* Cas9 endonuclease, ενδονουκλεάση Cas9 του *Streptococcus pyogenes*
- sRNA:** sense RNA, νοηματικό RNA
- SRSRs:** short regularly spaced repeats, βραχείες κανονικά κατανεμημένες επαναλήψεις
- ssDNA:** single-stranded DNA, μονόκλωνο DNA
- ssRNA:** single-stranded RNA, μονόκλωνο 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
- T_m:** melting temperature, θερμοκρασία αποδιάταξης
- tracrRNA:** trans-activating crRNA, βοηθητικό RNA ενεργοποίησης
- Tris:** tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, τρις-(υδροξυ-μέθυλο)-αμινο-μεθάνιο
- UV:** ultra-violet, υπεριώδης
- vsRNA:** virus-derived small RNA, μικρό RNA ιϊκής προέλευσης
- WNV:** West Nile Virus, ιός του Δυτικού Νείλου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΑΡΧΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ RNAi ΚΑΙ CRISPR/Cas9	3
1.1.1 Ιστορική Αναφορά	3
1.1.1.1 Η προέλευση του μηχανισμού RNAi	3
1.1.1.2 Η ανακάλυψη του μηχανισμού CRISPR/Cas9	4
1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	6
1.2.1 Μηχανισμός RNAi	6
1.2.1.1 Γενικά	6
1.2.1.2 Τα μονοπάτια του μηχανισμού RNAi	6
1.2.1.3 Το μονοπάτι siRNA	8
1.2.1.4 Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης Argonaute 2	9
1.2.1.5 Ρόλος και λειτουργία των ενζύμων της οικογένειας RNase III	10
1.2.1.6 Η ενδονουκλεάση Dicer-2 ως βασικό συστατικό της παρεμβολής RNA στα έντομα	11
1.2.1.7 Συμμετοχή του RNAi στην αντιϊκή άμυνα των εντόμων	12
1.2.1.8 Εφαρμογές και αποτελεσματικότητα της μεθόδου RNAi	14
1.2.1.8.1 Θεραπευτικές εφαρμογές	14
1.2.1.8.2 Εφαρμογές στα έντομα	15
1.2.1.9 Οφέλη και κίνδυνοι χρήσης RNAi μηχανισμού	17
1.3.1 Σύστημα CRISPR/Cas9	19
1.3.1.1 Γενικά	19
1.3.1.2 CRISPR/Cas ως επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα των προκαρυωτών	20
1.3.1.3 Κατηγοριοποίηση των συστημάτων CRISPR/Cas	22
1.3.1.4 Το σύστημα CRISPR/Cas9 του <i>Streptococcus pyogenes</i>	23
1.3.1.4.1 Η προσαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9	23
1.3.1.4.2 Η βιογένεση του crRNA	25
1.3.1.4.3 Η RNA-καθοδηγούμενη παρεμβολή	26
1.3.1.5 Μονοπάτια επιδιόρθωσης της δίκλωνης πέψης στα ευκαρυωτικά κύτταρα	28
1.3.1.6 Εφαρμογές και αποτελεσματικότητα της μεθόδου CRISPR/Cas9	29
1.3.1.6.1 Θεραπευτικές εφαρμογές	29
1.3.1.6.2 Εφαρμογές του συστήματος CRISPR/Cas9 στα έντομα	30
1.3.1.7 Προκλήσεις και περιορισμοί του CRISPR/Cas9	32
1.3 ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ	33
1.3.1 Λεπιδόπτερο <i>Trichoplusia ni</i>	33
1.3.1.1 Κύκλος ζωής	34

1.3.2	Λεπιδόπτερο <i>Spodoptera frugiperda</i>	35
1.3.2.1	Κύκλος ζωής	35
1.4	ΜΠΑΚΟΥΛΟΪΟΙ	36
1.4.1	Γενικά	36
1.4.2	Μολύνεις κυτταρικών σειρών με τον μπακουλοϊό AcMNPV	37
	ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	39
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
2.1	ΥΛΙΚΑ	45
2.1.1	Βιολογικά Υλικά	45
2.1.1.1	Κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων	45
2.1.1.2	Βακτηριακό στέλεχος	45
2.1.1.3	Πλασμίδια	46
2.1.1.4	Bacmid	46
2.1.2	Θρεπτικά μέσα και διαλύματα	46
2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.2.1	Γενικές Μέθοδοι	49
2.2.1.1	Απομόνωση DNA	49
2.2.1.2	Απομόνωση ολικού RNA	49
2.2.1.3	Αντίστροφη μεταγραφή RNA	50
2.2.1.4	Σχεδιασμός εκκινητών	51
2.2.1.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	52
2.2.1.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)	53
2.2.1.7	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αгарόζης	55
2.2.1.8	Απομόνωση τμήματος DNA από πηκτή αгарόζης (Gel extraction)	57
2.2.1.9	Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI)	58
2.2.1.10	Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων	58
2.2.2	Κλωνοποίηση	60
2.2.2.1	Εισαγωγή	60
2.2.2.2	Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)	60
2.2.2.3	Μετασχηματισμός βακτηρίων	61
2.2.2.4	Επιλογή αποικιών και υγρή καλλιέργεια	61
2.2.2.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini prep)	61
2.2.2.6	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Mid-prep)	62
2.2.2.7	Αλληλούχιση πλασμιδιακού DNA	64

2.2.2.8	Ειδικά πρωτόκολλα κλωνοποιήσεων για την αποσιώπηση/ απενεργοποίηση του γονιδίου <i>dicer-2</i> στα κύτταρα Hi5 και Sf21	64
2.2.2.8.1	Κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα pEA για την παραγωγή φουρκετών	64
2.2.2.8.1.1	Κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα pEA για την παραγωγή της φουρκέτας Tn-HpDcr2	65
2.2.2.8.1.2	Κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα pEA για την παραγωγή της φουρκέτας Sf-HpDcr2	66
2.2.2.8.2	Κλωνοποιήσεις επιλεγμένων αλληλουχιών στον πλασμιδιακό φορέα pCas9	66
2.2.3	Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες	69
2.2.3.1	Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων	69
2.2.3.2	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων	69
2.2.3.3	Δημιουργία και αποθήκευση σταθερών κυτταρικών σειρών	71
2.2.3.4	Μολύνσεις κυττάρων με τον μπακουλοϊό AcMNPV	72
2.2.3.4.1	Εισαγωγή	72
2.2.3.4.2	Συλλογή και λύση μολυσμένων κυττάρων	72
2.2.3.4.3	Στύπωμα κηλίδας (Dot Blot)	73
2.2.3.4.4	Αποδιάταξη πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης και ανοσοστύπωμα Western (Western Blot)	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		77
3.1	ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>dicer-2</i> ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ RNAi	79
3.1.1	Κατασκευή φορέων που παράγουν φουρκέτες έναντι του γονιδίου <i>dicer-2</i>	79
3.1.1.1	Κλωνοποίηση της φουρκέτας Tn-HpDcr2 στο φορέα έκφρασης pEA	79
3.1.1.2	Κλωνοποίηση της φουρκέτας Sf-HpDcr2 στο φορέα έκφρασης pEA	82
3.1.2	Δημιουργία μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 και Sf-HpLuc	85
3.1.2.1	Έλεγχος σε επίπεδο γονιδιώματος	85
3.1.2.2	Έλεγχος σε επίπεδο μεταγραφώματος	87
3.1.3	Απόκριση μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 σε ιούς που υπερπαραγάγουν την πρωτεΐνη GFP και/ή dsRNA	92
3.1.3.1	Μέτρηση φθορισμού GFP από τα μολυσμένα κύτταρα Sf21 και Sf-HpDcr2	94
3.1.3.2	Ανίχνευση ολικού dsRNA στο διαλυτό κυτταρικό κλάσμα	97
3.1.3.3	Έλεγχος των ιικών επιπέδων μέσω PCR για το γονίδιο <i>he65</i>	97
3.1.3.4	Έλεγχος των ιικών επιπέδων μέσω PCR για το διαγονίδιο dsLuc	99
3.1.3.5	Έλεγχος των ιικών επιπέδων μέσω ανάλυσης έκφρασης της πρωτεΐνης vr39	100

3.2	ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>dicer-2</i> ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ CRISPR/Cas9	101
3.2.1	Στρατηγική κλωνοποίησης των αλληλουχιών-στόχων στο φορέα pCas9	101
3.2.2	Έλεγχος αποτελεσματικότητας/λειτουργικότητας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCas9 που στοχεύουν στο γονίδιο <i>dicer-2</i> μέσω παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Hi5 και Sf21	103
3.2.2.1	Κύτταρα Hi5	103
3.2.2.2	Κύτταρα Sf21	112
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	117
4.1	Συγκριτική ανάλυση της εφαρμογής των μεθόδων RNAi και CRISPR/Cas9 σε κυτταρικές σειρές εντόμων	119
4.2	Εξέταση της αποδοτικότητας του RNAi και CRISPR/Cas9 στην γονιδιακή αποσιώπηση	124
4.3	Ανάλυση της απόκρισης των μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 σε μολύνσεις με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV	129
4.4	Μελλοντικές προοπτικές στα πλαίσια της παρούσας έρευνας	132
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	135
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	139
	ABSTRACT	143
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	147
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	169
	Προγράμματα PCR	171
	Εκκινητές	173

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΡΧΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ RNAi ΚΑΙ CRISPR/Cas9

1.1.1 Ιστορική Αναφορά

1.1.1.1 Η προέλευση του μηχανισμού RNAi

Η ιστορία της παρεμβολής RNA ή RNAi (RNA interference) έχει τις αρχές της στην έρευνα που αφορά τα φυτά, με τους Napoli και Jorgensen να είναι οι πρώτοι, που παρατήρησαν ένα τέτοιου είδους φαινόμενο το 1990 (Napoli et al., 1990). Ο στόχος της έρευνάς τους ήταν ο προσδιορισμός της περιοριστικής δράσης ενζύμου CHS (chalcone synthase) στη βιοσύνθεση της ανθοκυανίνης, η οδός της οποίας είναι υπεύθυνη για το σκούρο βιολετί χρωματισμό της πετούνιας. Όταν υπερεκφράστηκε το ένζυμο CHS, οι πετούνιες απροσδόκητα εμφάνισαν λευκό χρωματισμό. Σημειώθηκε τελικά ότι τα επίπεδα του ενδογενούς CHS και του εισαγόμενου διαγονιδίου CHS ήταν 50 φορές χαμηλότερα, σε σχέση με τις πετούνιες άγριου τύπου, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι το εισαγόμενο διαγονίδιο επηρεάζει το ενδογενές γονίδιο CHS. Το 1992 ένα παρόμοιο φαινόμενο αναφέρθηκε κατά την παρατήρηση της «εξουδετέρωσης» των ενδογενών γονιδίων *al.-1* και *al.-3*, με την εισαγωγή ομόλογων αλληλουχίων RNA στο μύκητα *Neurospora crassa* (Romano and Macino, 1992).

Η πρώτη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω RNA σε ζώα πραγματοποιήθηκε στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* από τους Guo και Kemphues το 1995, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η μικροέγχυση αντινοσηματικού RNA (asRNA, antisense RNA), που αντιστοιχεί στο γονίδιο *par-1*, προκαλεί αποτελεσματική απώλεια της λειτουργίας του φαινοτύπου *par-1*. Το αντινοσηματικό RNA θεωρήθηκε ότι υβριδίζει με το ενδογενές mRNA, με αποτέλεσμα το δίκλωνο RNA (dsRNA) να αναστέλλει τη μετάφραση του mRNA-στόχου ή να καταστρέφεται από τις κυτταρικές ριβονουκλεάσες (Guo and Kemphues, 1995).

Το 1998 οι Fire και Mello έδωσαν την απάντηση στις προαναφερθείσες παρατηρήσεις αποσιώπησης ενδογενών γονιδίων. Εργαζόμενοι πάνω στον *C. elegans*, υπέθεσαν ότι η αποσιώπηση δεν οφείλεται σε μονόκλωνο RNA (ssRNA, single-stranded RNA), αλλά σε dsRNA. Ισχυρίστηκαν επίσης, ότι το φαινόμενο υβριδισμού του ενδογενούς γονιδίου με το νοηματικό RNA (sRNA, sense RNA) στα πειράματα των Guo και Kemphues προέκυψε από την επιμόλυνση των ssRNA παρασκευασμάτων από dsRNA, λόγω της δράσης των RNA πολυμερασών των βακτηριοφάγων (Fire et al., 1998). Σε νέα δοκιμασία για το γονίδιο *unc-22*, καθάρισαν σχολαστικά τα νοηματικά και τα

αντινοσηματικά παρασκευάσματα ssRNA, και σύγκριναν τα αποτελέσματά τους με τη χρήση dsRNA. Τελικά διαπιστώθηκε ότι το dsRNA είναι από 10 έως 100 φορές πιο αποτελεσματικό από τα νοσηματικά και αντινοσηματικά ssRNA για το ίδιο mRNA-στόχο (Fire et al., 1998). Με τον τρόπο αυτόν οι Fire και Mello ερμήνευσαν τις προηγούμενες παρατηρήσεις και πραγματοποίησαν μια ανακάλυψη, για την οποία βραβεύτηκαν με βραβείο Nobel το 2006. Οι εφευρέσεις αυτές οδήγησαν τους ερευνητές του *C. elegans* στην ονομασία της μεθοδολογίας αυτής ως παρεμβολή RNA ή RNAi (RNA interference).

Η βελτιωμένη αποτελεσματικότητα του dsRNA κατέστησε δυνατή την πρόκληση RNAi σε ποικίλους οργανισμούς καθώς παρατηρήθηκε ότι ο μηχανισμός αυτός εντοπίζεται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Aigner, 2006). Η πρώτη αναφορά της παρεμβολής RNA στα Λεπιδόπτερα έγινε το 2001 στο 5^ο Διεθνές Σεμινάριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής των Λεπιδόπτερων, όπου και δημιουργήθηκε σημαντικό ενδιαφέρον για τη δυνατότητα χρήσης αντίστροφης γενετικής, με σκοπό τη διερεύνηση της λειτουργίας γονιδίων στα Λεπιδόπτερα (Bettencourt et al., 2002). Τα επόμενα χρόνια, η χρήση της μεθόδου RNAi στα Λεπιδόπτερα δεν έχει αποδειχθεί τόσο απλή, καθώς ορισμένα γονίδια εντόμων εμφανίζονται ανθεκτικά στο RNAi (Terenius et al., 2011), η μεταφορά του στα έντομα-στόχους αποδεικνύεται δύσκολη σε πραγματικές συνθήκες, ενώ η σύνθεση του RNA υποστρώματος αποτελεί μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία (Zotti and Smagghe, 2015).

1.1.1.2 Η ανακάλυψη του μηχανισμού CRISPR/Cas9

Η ιστορία του συστήματος CRISPR/Cas9 ξεκίνησε το 1987, κατά τη μελέτη από τον Y. Ishino του γονιδίου *iap*, που είναι υπεύθυνο για την ισοενζυμική μετατροπή της αλκαλικής φωσφατάσης στην *Escherichia coli*. Παρατηρήθηκε αρχικά ως επαναλαμβανόμενο μοτίβο με λιγότερα από 50 ζεύγη βάσεων (bp) στο γονιδίωμα των βακτηρίων και των αρχαίων, το οποίο έχει διαχωριστικές αλληλουχίες (Ishino et al., 1987). Καθώς όμως, την εποχή εκείνη δεν ήταν εφικτή η ανάλυση της βιολογικής λειτουργίας αυτών των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, λόγω της έλλειψης επαρκών δεδομένων αλληλούχισης DNA, ο ρόλος τους παρέμεινε αινιγματικός μέχρι τα μέσα του 2000 (Ishino et al., 2018).

Το 1993 ωστόσο, περιεγράφηκε μία παρόμοια δομή πολλαπλών αντιγράφων παλίνδρομων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών 30 βάσεων, διακοπτόμενων με διαχωριστικές αλληλουχίες 36 βάσεων στο *Haloflex mediterranei*, ένα αρχαίο με υψηλή

ανθεκτικότητα στην αλατότητα (Mojica et al., 1993). Αργότερα ανακαλύφθηκαν και παρόμοιες επαναλήψεις στο συγγενικό είδος *Haloferax volcanii*, καθώς και σε πιο μακρινά αλατόφιλα αρχαία. Το είδος των επαναλαμβανόμενων αυτών ακολουθιών ονομάστηκε αρχικά «βραχείες κανονικά κατανεμημένες επαναλήψεις (short regularly spaced repeats - SRSRs) (Mojica et al., 2000). Ο όρος CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Ομαδοποιημένες Κανονικά Κατανεμημένες Βραχείες Παλίνδρομες Επαναλήψεις) προτάθηκε το 2002 και καθιερώθηκε στην κοινότητα που ασχολείται με τις αλληλουχίες αυτές (Jansen et al., 2002).

Το 2005 αλληλουχήθηκαν 4.500 αλληλουχίες CRISPR από 67 στελέχη βακτηρίων και αρχαίων. Οι αλληλουχίσεις τους συγκρίθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), όπου και διαπιστώθηκε ότι ταιριάζουν με τις αλληλουχίες βακτηριοφάγων. Προέκυψε έτσι το συμπέρασμα ότι το CRISPR μαζί με τη διαχωριστική αλληλουχία παρέχει προστασία έναντι κάποιου φάγου που επιτίθεται στο βακτήριο (Mojica et al., 2005). Όπως αποδείχθηκε πειραματικά, η αντίσταση του βακτηρίου έναντι ενός συγκεκριμένου φάγου μειώνεται με την αφαίρεση των διαχωριστικών αλληλουχιών από το βακτηριακό γονιδίωμα. Παράλληλα, ορισμένα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την επιδιόρθωση του DNA (ειδικά σε υπερθερμόφιλα αρχαία) ταυτοποιήθηκαν ως αποκλειστικά συσχετιζόμενα με το CRISPR και ορίστηκαν ως γονίδια *cas* (CRISPR-associated) (Makarova et al., 2002; Jansen et al., 2002). Οι γονιδιωματικές αναλύσεις υπέδειξαν τελικά, ότι το CRISPR και οι πρωτεΐνες Cas (προϊόντα των γονιδίων *cas*) συνεργάζονται για αποτελέσουν ένα ανοσοποιητικό σύστημα, που είναι υπεύθυνο για την προστασία των προκαρυωτικών κυττάρων έναντι των εισβαλόντων ιών και πλασμιδίων (Makarova et al., 2006).

Μια νέα εποχή άνοιξε στον τομέα της επεξεργασίας του γονιδιώματος το 2012, όταν διαπιστώθηκε από τις Charpentier και Doudna ότι το σύστημα CRISPR/Cas (τύπος II) του βακτηρίου *Streptococcus pyogenes* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική επεξεργασία του DNA, μέσω ειδικά κατασκευασμένου RNA-οδηγού (Jinek et al., 2012). Ο τύπος II περιέχει την ενδονουκλεάση Cas9 ως τελεστή, η οποία και χρησιμοποιείται ως κύριο ένζυμο της επεξεργασίας του γονιδιώματος (Sahel et al., 2019). Το 2020 οι Doudna και Charpentier τιμήθηκαν με βραβείο Nobel Χημείας, για την ανακάλυψη των γενετικών «ψαλιδιών» του συστήματος CRISPR/Cas9.

1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

1.2.1 Μηχανισμός RNAi

1.2.1.1 Γενικά

Η παρεμβολή RNA ή RNAi αποτελεί μία εξειδικευμένη διαδικασία, που κατέχει σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι διεισδυτικών νουκλεϊκών οξέων, μεταθετών γενετικών στοιχείων και ιών, αλλά είναι και ουσιαστικός μηχανισμός της ενδογενούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Obbard et al., 2009). Θεωρείται ότι η βασική λειτουργία του μηχανισμού RNAi σχετίζεται με την προστασία έναντι των ιών, ωστόσο άλλες λειτουργίες του πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν αργότερα (Shabalina and Koonin, 2008).

Η επίτευξη της γονιδιακής αποσιώπησης διαμέσου του RNAi μηχανισμού, πραγματοποιείται με τη συμμετοχή μικρών μορίων RNA (siRNAs, miRNAs, piRNAs), τα οποία εντοπίζουν την αλληλουχία-στόχο αποσιωπώντας την ή μειώνοντας την έκφρασή της (Ha and Kim, 2014). Τα μικρά μόρια RNA ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια, για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και παράγονται από την πλειονότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων (Carthew and Sontheimer, 2009). Βασικό συστατικό των μονοπατιών RNAi αποτελούν οι πρωτεΐνες Argonaute, οι οποίες σε συνδυασμό με τα μικρά μόρια RNA δημιουργούν το RNA-επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC), που χρησιμοποιεί τη συμπληρωματική αλληλουχία του μικρού μορίου RNA για την ταυτοποίηση της αλληλουχίας-στόχου (Meister, 2013). Συνοπτικά, ο μηχανισμός RNAi διαμέσου των μονοπατιών των μικρών μορίων RNA εφαρμόζεται για την αποσιώπηση των ευκαρυωτικών κυττάρων και έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της γονιδιακής ρύθμισης.

1.2.1.2 Τα μονοπάτια του μηχανισμού RNAi

Τα μονοπάτια του μηχανισμού της γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi διαφέρουν ως προς τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν, τα είδη των μικρών μορίων RNA, τους RNA-στόχους τους, και ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες σύμφωνα με το είδος του μικρού μορίου RNA σε: α) miRNA (microRNA), β) siRNA (short interfering RNA) και γ) piRNA (PIWI-interacting RNA) (Obbard et al. 2009). Τα μικρά αυτά μόρια RNA ρυθμίζουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα την ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους, αλλά και τη γονιδιακή έκφραση, μέσω ελέγχου του κυτταρικού μεταβολισμού, με στόχο τη

διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, αλλά και την καταπολέμηση ιών και μεταθετών γενετικών στοιχείων (Jinek and Doudna, 2009).

Παρά τις ομοιότητές τους, τα μόρια αυτά παρουσιάζουν διαφορές στη βιοσύνθεση και τους μηχανισμούς δράσης τους. Τόσο τα siRNA όσο και τα miRNA παράγονται από την επεξεργασία των πρόδρομων dsRNA. Τα δίκλιωνα αυτά μόρια μπορεί να προκύψουν από την αντιγραφή RNA ιών, τη μεταγραφή μεταθετών γενετικών στοιχείων, ή και από αυτοϋβριδιζόμενα κυτταρικά μετάγραφα (Jinek and Doudna, 2009). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία μορίων dsRNA είναι μια ενδονουκλεάση τύπου RNAσης III (RNase III) και ονομάζεται Dicer (Bernstein et al., 2001). Το αποτέλεσμα της δράσης της είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων RNA μήκους ~ 21-23 νουκλεοτιδίων που ονομάζονται siRNA. Αντίθετα, τα miRNA παράγονται από την επεξεργασία πρωτογενών miRNA (pri-miRNA), που έχουν την δομή μίσχου-θηλιάς, στον πυρήνα από ένα άλλο ένζυμο της οικογένειας των RNAσών III, την Drosha, ώστε να παραχθούν τα πρόδρομα miRNA (pre-miRNA) (Lee et al., 2003). Με την εξαγωγή του pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα, η φουρκέτα υφίσταται επεξεργασία από το ένζυμο Dicer, για να δημιουργηθούν τελικά δίκλιωνα μόρια miRNA μήκους ~ 21-25 νουκλεοτιδίων. Τέλος τα piRNA έχουν μήκος ~ 24-27 νουκλεοτίδια και η βιογένεσή τους δεν περιλαμβάνει πρόδρομα μόρια dsRNA, ούτε ένζυμα όπως τα Dicer και Drosha (Klattenhoff and Theurkauf, 2008; Li and Rana, 2012). Δημιουργούνται από τη μεταγραφή συστάδων piRNA (piRNA clusters) ή μέσω διάσπασης μεταγράφων τρανσποζονίων, και φορτώνονται στις πρωτεΐνες Piwi, ώστε να συνεχίζεται η στόχευση και αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων (Brennecke et al., 2007).

Όσον αφορά τους λειτουργικούς ρόλους των μονοπατιών RNAi παρατηρείται ότι τα siRNAs εμπλέκονται στην άμυνα έναντι ιικών και παρασιτικών νουκλεϊκών οξέων (Hamilton and Baulcombe, 1999; Tabara et al., 1999), τα miRNAs εξειδικεύονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001), ενώ τα piRNAs συμμετέχουν στην προστασία των κυττάρων της βλαστικής σειράς έναντι μεταθετών γενετικών στοιχείων (Siomi et al. 2011). Σχετικά με τις πρωτεΐνες Argonaute, που συμμετέχουν στα μονοπάτια siRNA και miRNA, αυτές ανήκουν στον κλάδο AGO και είναι οι Argonaute 1 και Argonaute 2, αντίστοιχα, ενώ στο μονοπάτι piRNA περιλαμβάνονται πολλαπλές πρωτεΐνες Argonaute της υποκατηγορίας PIWI (Argonaute 3, Aubergine και Piwi) (Joshua-Tor and Hannon, 2011).

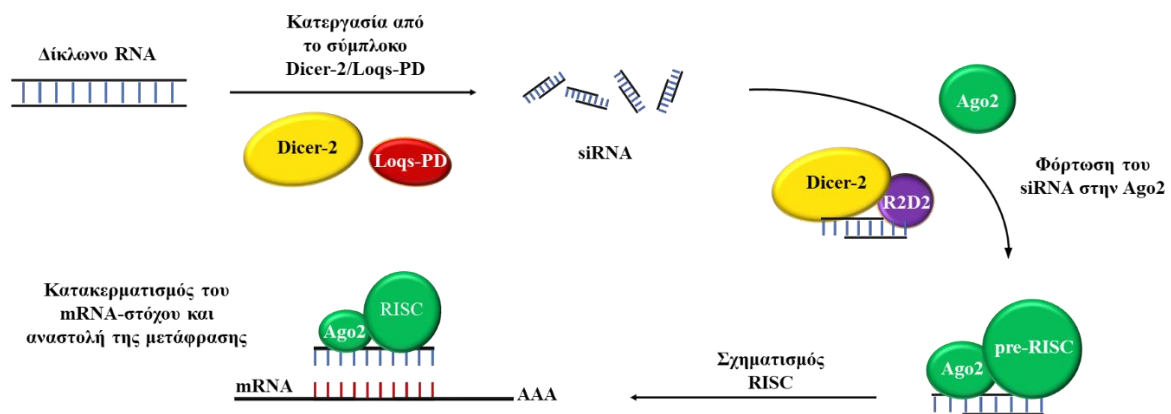
1.2.1.3 Το μονοπάτι siRNA

Όπως προαναφέρθηκε, τα siRNA προέρχονται από την επεξεργασία των dsRNA, των οποίων η προέλευση μπορεί να ποικίλλει. Ενδογενείς πηγές dsRNA μπορεί να αποτελέσουν μεταθετά στοιχεία, RNA φουρκέτες, δομημένες θέσεις και ζεύγη κωδικοποιητικού και μη κωδικοποιητικού RNA (Czech et al., 2008; Okamura et al., 2008). Ωστόσο siRNAs μπορεί επίσης να δημιουργούνται και από εξωγενείς πηγές διαμέσου μιας ιϊκής μόλυνσης, ενός διαγονιδίου ή *in vitro* συντεθειμένου RNA (Soares et al., 2014). Ανάλογα με την προέλευση των dsRNA, τα μόρια siRNA που θα δημιουργηθούν στην συνέχεια διαχωρίζονται στα endo-siRNA (ενδογενή siRNA), exo-siRNA (εξωγενή siRNA) και vsiRNA (ϊικά siRNA) (Marques et al., 2013).

Το μονοπάτι του siRNA ξεκινάει με την επεξεργασία του μορίου dsRNA, από την ενδονουκλεάση Dicer-2, σε συνεργασία με την πρωτεΐνη Loquacious-PD (Loqs-PD), μια πρωτεΐνη πρόσδεσης στο dsRNA (dsRNA Binding Protein - dsRBP) (Hartig et al., 2009; Marques et al., 2013). Υπάρχουν τέσσερις ισομορφές της πρωτεΐνης Loqs, που συμμετέχουν στην βιογένεση των μικρών μορίων RNA, αλλά μόνο η ισομορφή PD απαιτείται στο μονοπάτι του siRNA (Förstemann et al., 2005; Hartig et al., 2009). Η επεξεργασία του ενδογενούς όσο και του εξωγενούς dsRNA χρειάζεται την Loqs-PD σε συνεργασία με τη Dicer-2 (Czech et al., 2008; Okamura et al., 2008), ωστόσο η βιογένεση των vsiRNAs, που προέρχονται από τα ιϊκά dsRNA, είναι ανεξάρτητη της πρωτεΐνης Loqs-PD (Marques et al., 2013). Τα ενδογενή και εξωγενή dsRNA αφού υποστούν επεξεργασία από το σύμπλοκο Dicer-2/Loqs-PD δημιουργούν αντίστοιχα τα endo-siRNA και exo-siRNA, ενώ τα vsiRNA δημιουργούνται από την δράση της Dicer-2 μόνο. Στη συνέχεια, τα μικρά δίκλιωνα αυτά μόρια μήκους ~ 21-23 νουκλεοτιδίων, μέσω της δράσης μιας άλλης πρωτεΐνης dsRBP, της R2D2, φορτώνονται ειδικά στην πρωτεΐνη Argonaute 2 (Ago2) (Liu et al., 2003; Tomari et al., 2004, 2007) (**Εικόνα 1.1**).

Το σύμπλοκο της Ago2 ενωμένο με το δίκλινο siRNA, ονομάζεται pre-RISC, δηλαδή πρόδρομο RISC (Kim et al., 2007). Για να σχηματιστεί όμως το λειτουργικό RISC, οι δύο κλώνοι του siRNA πρέπει να αποχωριστούν μεταξύ τους, και ο ένας κλώνος να απομακρυνθεί. Η Ago2 πραγματοποιεί την αποκοπή και απομάκρυνση του κλώνου μη οδηγού, σχηματίζοντας τελικά σύμπλοκο, που περιέχει τον κλώνο οδηγό του siRNA και ονομάζεται ώριμο RISC, holo-RISC ή απλά RISC (Matranga et al., 2005; Miyoshi et al., 2005; Rand et al., 2005; Kawamata and Tomari 2010). Οι αναλύσεις αλληλουχίας και οι μετρήσεις της ισχύος διαφορετικών δίκλωνων και μονόκλωνων siRNA υποδεικνύουν ότι ο

κλώνος που συνδέεται με το RISC είναι συνήθως αυτός, του οποίου το 5' άκρο είναι λιγότερο σταθερό από θερμοδυναμικής άποψης (Khvorovna et al., 2003). Κατόπιν, ακολουθεί ο υβριδισμός του κλώνου οδηγού, που περιέχεται στο RISC, με το συμπληρωματικό mRNA στόχο. Η ικανότητα του RISC να πραγματοποιεί την κοπή του mRNA στόχου είναι δυνατή χάρις στη δράση της περιοχής PIWI της πρωτεΐνης Ago2 (Song et al., 2003). Η τελική διάσπαση του στόχου προκαλεί την αποχωρισμό του από τον κλώνο οδηγό του siRNA, απελευθερώνοντας το RISC, το οποίο με την σειρά του μπορεί να συνεχίσει την διάσπαση περαιτέρω στόχων (Carthew and Sontheimer, 2009) (**Εικόνα 1.1**). Συνεπώς το RISC μπορεί να ανακυκλώνεται αποικοδομώντας πολλούς mRNA-στόχους.



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής αποσιώπησης διαμέσου του μονοπατιού siRNA. Το δίκλωνο μόριο RNA, του οποίου η προέλευση μπορεί να ποικίλλει, υφίσταται επεξεργασία μέσω της ενδονουκλεάσης Dicer-2 και παράγει τελικά μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (siRNA) μήκους ~ 21-23 bp. Τα siRNA φορτώνονται στη συνέχεια με τη βοήθεια της R2D2, ή κάποιας άλλης dsRBP πρωτεΐνης, στην πρωτεΐνη Ago2, σχηματίζοντας το pre-RISC. Η Ago2 πραγματοποιεί την αποκοπή και απομάκρυνση του κλώνου μη οδηγού, σχηματίζοντας τελικά σύμπλοκο, το οποίο περιέχει τον κλώνο οδηγό του siRNA και ονομάζεται RISC. Τέλος, ακολουθεί ο υβριδισμός του κλώνου οδηγού, που περιέχεται στο RISC, με το mRNA-στόχο και ο κατακερματισμός του μέσω της δράσης της περιοχής PIWI, που περιλαμβάνεται στην πρωτεΐνη Ago2.

1.2.1.4 Δομή και λειτουργία την πρωτεΐνης Argonaute 2

Οι πρωτεΐνες Argonaute αποτελούν βασικά συστατικά του siRNA μονοπατιού. Απαντώνται παγκοσμίως σε φυτά, ζώα, μύκητες, πρώτιστα ακόμα και σε ορισμένα αρχαία

(Kumar et al., 2020). Στον άνθρωπο έχουν προσδιοριστεί οκτώ πρωτεΐνες Argonaute, τέσσερις από τις οποίες ανήκουν στην AGO υποκατηγορία, ενώ οι υπόλοιπες στην υποκατηγορία PIWI (Meister, 2013). Η διάσπαση του mRNA στόχου, ωστόσο πραγματοποιείται μόνο από την Argonaute 2 (Ago2). Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει τις συντηρημένες περιοχές MID, PIWI, PAZ, και το N-άκρο (Song et al., 2003; Liu et al., 2004). Η περιοχή MID αλληλεπιδρά με το πρώτο νουκλεοτίδιο του 5' άκρου του κλώνου οδηγού siRNA (Frank et al., 2010), το πρώτο νουκλεοτίδιο του οποίου είναι αζευγάρωτο (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005). Η περιοχή PIWI έπειτα, είναι υπεύθυνη για την ενδονουκλεοτιδική διάσπαση του RNA στόχου (Wang et al., 2009), η PAZ έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει την προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του siRNA κλώνου (Song et al., 2003) και, τέλος, η περιοχή N είναι υπεύθυνη για το ξετύλιγμα του δίκλωνου μορίου και την ωρίμανση του RISC (Kwak et al., 2012).

1.2.1.5 Ρόλος και λειτουργία των ενζύμων της οικογένειας RNase III

Η ενζυμική οικογένεια των ριβονουκλεασεών III (RNase III) εντοπίζεται στα περισσότερα ευβακτήρια και τους ευκαρυώτες, αλλά όχι στα αρχαία (Lamontagne et al., 2001). Η ικανότητα τους να καταλύουν τη διάσπαση του dsRNA τους προσδίδει βασικό ρόλο σε συστήματα και μηχανισμούς, όπως το RNAi και το CRISPR/Cas9 (Bernstein et al., 2001; Deltcheva et al., 2011). Προσδιορίζονται ως ειδικές ενδονουκλεάσες του dsRNA, που εξαρτώνται από την παρουσία ιόντων Mg^{2+} , και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία του ριβοσωμικού RNA (rRNA), στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και στην άμυνα έναντι ιογενών λοιμώξεων (Gan et al., 2008; Court et al., 2013). Σε αυτή την ενζυμική οικογένεια ανήκει η βακτηριακή RNase III, αλλά και τα γνωστά ευκαρυωτικά ένζυμα Dicer και Drosha (Filippon et al., 2000; Blaszczyk et al., 2004; Ji, 2008).

Η αποδιατακτική ικανότητα των ενζύμων Dicer και Drosha τα καθιστά βασικά συστατικά του RNAi μηχανισμού. Η διάσπαση του dsRNA από τα ένζυμα αυτά αποδίδει προϊόντα με χαρακτηριστικά άκρα, και συγκεκριμένα με μια μονοφωσφορική ομάδα στο 5' άκρο καθώς και μια προεξοχή δύο νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο (MacRae and Doudna, 2007). Όπως προαναφέρθηκε, η δομή αυτή είναι απαραίτητη για να ενσωματωθούν τα siRNA στην πρωτεΐνη Ago2. Τα ένζυμα Dicer και Drosha δομούνται από δύο παράλληλα διατεταγμένες περιοχές RNase III, που διαθέτουν καταλυτική δραστηριότητα, καθώς και

μια περιοχή πρόσδεσης του dsRNA (dsRNA Binding Domain - dsRBD), ενώ λειτουργούν ως μονομερή (Blaszczyk et al., 2001).

Τα ένζυμα της οικογένειας RNase III διαχωρίζονται με βάση τον αριθμό και την οργάνωση των περιοχών που υπάρχουν σε κάθε ριβονουκλεάση σε τέσσερις κύριες κατηγορίες (Lamontagne et al., 2001; Nicholson, 2003). Τα ένζυμα της κατηγορίας I είναι τα απλούστερα και εμπεριέχονται σε βακτήρια και απλούς ευκαρυώτες, αλλά και στους ιούς των οικογενειών *Iridoviridae*, *Closteroviridae*, *Phycodnaviridae* και *Ascoviridae* (Zhang et al., 2003; Kreuze et al., 2005; Zenke and Kim, 2008; Hussain et al., 2010). Αποτελούνται από μια περιοχή RNase III (RIID) και μια περιοχή dsRBD (Lee et al., 2003). Για την επίτευξη της αποικοδόμησης του dsRNA, τα ένζυμα της κατηγορίας I σχηματίζουν διμερή, καθώς περιέχουν μόνο μια περιοχή RIID. Τα ένζυμα της κατηγορίας II εμπεριέχουν τις ίδιες περιοχές με τα ένζυμα της κατηγορίας I, με την προσθήκη μιας N-τελικής περιοχής (NTD), επιτρέποντας την λειτουργικότητά τους ως μονομερή (Lee et al., 2003). Όσον αφορά την κατηγορία III, τα ένζυμα διαθέτουν επίσης N-άκρα πλούσια σε προλίνη (P-rich) ή σε αργινίνη και σερίνη (RS-rich), μία περιοχή PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), δύο περιοχές RIID και μία περιοχή dsRBD (Lee et al., 2003, Court et al., 2013). Τέλος τα ένζυμα της κατηγορίας IV αποτελούνται από δύο περιοχές RIID, μία περιοχή dsRBD, μία περιοχή PAZ, την περιοχή DUF283 και μία περιοχή ελικάσης (Abou Elela and Ji, 2019). Οι ενδονουκλεάσες Droscha και Dicer ανήκουν στην κατηγορία III και IV αντίστοιχα (Abou Elela and Ji, 2019).

1.2.1.6 Η ενδονουκλεάση Dicer-2 ως βασικό συστατικό της παρεμβολής RNA στα έντομα

Τα ένζυμα Dicer αποτελούν μέλη της ενζυμικής οικογένειας RNase III και λειτουργούν ως ενδονουκλεάσες στο μηχανισμό της παρεμβολής RNA ή αλλιώς RNAi, για τη διάσπαση μορίων dsRNA μεγάλου μήκους σε μικρότερα μόρια RNA, που είναι γνωστά ως miRNA και siRNA (Song and Rossi, 2017). Εντοπίζονται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανόμενων των φυτών, των μυκήτων και των μεταζώων (Cerutti and Casas-Mollano, 2006; Shabalina and Koonin 2008). Τα σπονδυλωτά και τα νηματώδη περιέχουν ένα γονίδιο Dicer, το οποίο παράγει το ένζυμο Dicer-1, ωστόσο τα έντομα και οι σκώληκες έχουν δύο γονίδια, παράγοντας τα ένζυμα Dicer-1 και Dicer-2.

Τα ένζυμα Dicer-1 και Dicer-2 της *Drosophila* μοιράζονται μία κοινή αρχιτεκτονική με την ανθρώπινη Dicer, η οποία αποτελείται από μια περιοχή ελικάσης στο N-άκρο, μια κεντρική περιοχή DUF283, την περιοχή PAZ, δύο περιοχές RIID και την περιοχή dsRBD του C-άκρου (Cenik et al., 2011; Welker et al., 2011; Sinha et al., 2015) (Εικόνα 1.2). Από όλες αυτές τις περιοχές, οι PAZ και RIID παίζουν βασικό ρόλο στην ακριβή επεξεργασία του dsRNA (Zhang et al., 2004). Σε ανάλυση της δομής της Dicer της *Giardia intestinalis* βρέθηκε ότι η περιοχή PAZ είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το 3' άκρο του dsRNA (Blaszczuk et al., 2001), ενώ οι δύο περιοχές RIID, αφότου πραγματοποιηθεί η σύνδεση, καταλύουν τη διάσπαση του dsRNA ή του pre-miRNA, σε siRNA ή ώριμο miRNA, αντίστοιχα (Zhang et al., 2004).

Στη *Drosophila* το ένζυμο Dicer-1 είναι απαραίτητο για το μονοπάτι miRNA, ωστόσο στο μονοπάτι siRNA, το ένζυμο Dicer-2 είναι αυτό που παίζει βασικό ρόλο στην επεξεργασία του dsRNA (Lee et al. 2004). Το προϊόν της επεξεργασίας του dsRNA από τη Dicer-2 είναι το δίκλωνο μόριο siRNA μήκους ~ 21-23 νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η Dicer-2 είναι υπεύθυνη και για τη φόρτωσή τους στην πρωτεΐνη Ago2, καθώς δεσμεύει την πρωτεΐνη R2D2 μέσω της περιοχής ελικάσης του N-άκρου για το σχηματισμό στη συνέχεια του RISC (Liu et al., 2003; Hartig and Förstemann, 2011). Σε σχέση με την Dicer-1 και την ανθρώπινη Dicer, μόνο η περιοχή ελικάσης του ενζύμου Dicer-2 δεσμεύει και υδρολύει το ATP (Cenik et al., 2011; Welker et al., 2011; Sinha et al., 2015). Θεωρείται ότι η παρουσία ATP στο ένζυμο Dicer-2 είναι κρίσιμης σημασίας για επεξεργασία του dsRNA και την παραγωγή των siRNAs (Liu et al., 2003; Jiang et al., 2005).



Εικόνα 1.2. Η δομή των περιοχών του ενζύμου Dicer-2 στο έντομο *Drosophila melanogaster* (Προσαρμογή από Song and Rossi, 2017).

1.2.1.7 Συμμετοχή του RNAi στην αντιϊκή άμυνα των εντόμων

Τα έντομα, καθώς στερούνται επίκτητης ανοσίας, στηρίζουν την ανοσολογική τους απόκριση σχεδόν εξ' ολοκλήρου στην έμφυτη ανοσία (Karlikow et al., 2014). Η έμφυτη ανοσία τους χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων αναγνώρισης PRRs (pattern recognition receptors) ικανών να αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα, τα οποία

υπάρχουν σε διάφορα παθογόνα αλλά απουσιάζουν από τον ξενιστή, όπως είναι κάποια συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και το ιικό dsRNA (Dong et al., 2006; Kingsolver et al., 2013). Τα μοριακά αυτά μοτίβα ονομάζονται PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Merkling and van Rij, 2013). Βασικός μηχανισμός της έμφυτης ανοσίας των εντόμων θεωρείται ο μηχανισμός RNAi, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αντιϊκή απόκριση (Galiana-Arnoux et al., 2006; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006; Zambon et al., 2006). Ωστόσο το μονοπάτι εκείνο του RNAi μηχανισμού που είναι υπεύθυνο για την αντιϊκή δραστηριότητα στα έντομα είναι το μονοπάτι siRNA (Wynant et al., 2014; Gammon and Mello, 2015).

Η αναγνώριση του dsRNA, για την πρόκληση ανοσοαπόκρισης αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική, καθώς σχεδόν όλοι οι ιοί παράγουν dsRNA κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού τους κύκλου (Weber et al., 2006; Bronkhorst et al., 2012). Στο μονοπάτι siRNA, το ένζυμο Dicer-2 λειτουργεί ως PRR (Kingsolver et al., 2013) και επεξεργάζεται τα ιικά dsRNA για τη δημιουργία μικρών ιικών παρεμβαλλόμενων RNAs (vsiRNAs) (Marques et al., 2013). Κατά τη διάρκεια μια ιικής μόλυνσης δεν απαιτούνται οι συμπαραγόντες Loq-PD και R2D2 προκειμένου η Dicer-2 να παράξει vsiRNA (Han et al., 2011; Marques et al., 2013). Ωστόσο, απαιτείται μόνο η R2D2 για τη φόρτωση των vsiRNA στο RISC (Marques et al., 2013), όπου το RISC προγραμματίζεται ειδικά ώστε να αναγνωρίζει και να τεμαχίζει το ιικό RNA, με στόχο την μείωση της ιικής αντιγραφής (Carthew and Sontheimer, 2009; Kawamata and Tomari, 2010; Bronkhorst and van Rij, 2014). Συνεπώς, η αντιϊκή δράση του μηχανισμού RNAi, συνοψίζεται στη διάσπαση των ενδιάμεσων ιικών dsRNA και τον τεμαχισμό των μονόκλωνων RNA από την Ago2 (Schuster et al., 2019).

Μελέτες σε Λεπιδόπτερα-ξενιστές αναφορικά με την άμυνά τους έναντι RNA και DNA ιών, αποκάλυψαν πως η πηγή του ιικού dsRNA, το οποίο επεξεργάζεται το ένζυμο Dicer-2, μπορεί να ποικίλλει (Gammon et al., 2014; Jayachandran et al., 2012). Συγκεκριμένα, το ιικό dsRNA μπορεί να προέρχεται από ιικά γονιδιώματα (ιοί dsRNA), ενδιάμεσα αντίγραφα μονόκλωνων ιών RNA, δομημένα στοιχεία του ιικού ssRNA (γονιδιώματα ή μετάγραφα) και από υβριδισμό αλληλεπικαλυπτόμενων μεταγράφων, σχηματίζοντας dsRNA. Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε επίσης βαθιά αλληλούχιση των vsiRNA που παράγονται από ιικά dsRNA, υπό την επεξεργασία της Dicer-2. Οι αλληλουχίες αυτές μπορούν να χαρτογραφηθούν στο ιικό γονιδίωμα, δίνοντας πληροφορίες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των ιικών

υποστρωμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία από τη Dicer-2 (Bronkhorst and van Rij, 2014).

Η μεγάλη σημασία του μονοπατιού siRNA στην αντιϊκή άμυνα αποδεικνύεται μέσα από πολλές πειραματικές μελέτες. Δοκιμασίες σε μύγες ελαττωματικές ως προς την έκφραση των Dicer-2, R2D2 και Ago2, έχουν αποδείξει ότι είναι πιο ευαίσθητες σε ιικές λοιμώξεις και συσσωρεύουν μεγαλύτερα επίπεδα ιικών αντιγράφων, σε σχέση με μύγες άγριου τύπου (Wang et al., 2006; van Rij et al., 2006; Deddouche et al., 2008). Ομοίως, η απενεργοποίηση των Dicer-2 και Ago2 στα κουνούπια αποδίδει υψηλότερους ιικούς τίτλους κατά τη μόλυνση με ιούς (Campbell et al., 2008; Sánchez-Vargas et al., 2009). Έχει σημειωθεί επιπλέον, πως η ανεπάρκεια μηχανισμού RNAi στα έντομα συνδέεται συχνά και με μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητάς τους (Wang et al., 2006; van Rij et al., 2006; Bronkhorst et al., 2012). Ωστόσο, είναι αξιόλογο το γεγονός πως οι μεταλλάξεις στο μονοπάτι αυτό δεν επηρεάζουν σημαντικά την αντιβακτηριακή ή αντιμυκητιακή ανοσία, επιδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την εξειδίκευσή του στην αντιϊκή απόκριση (Ding, 2010). Τέλος, τα βασικά συστατικά του μονοπατιού siRNA ανήκουν στα ταχύτερα εξελισσόμενα γονίδια στην *Drosophila*, δεδομένο που υποδεικνύει τον ρόλο τους στην αντιϊκή ανοσία (Obbard et al., 2006; Wynant et al., 2017).

1.2.1.8 Εφαρμογές και αποτελεσματικότητα της μεθόδου RNAi

1.2.1.8.1 Θεραπευτικές εφαρμογές

Δύο δεκαετίες μετά από την ανακάλυψη του, ο βιολογικός μηχανισμός RNAi, που ευθύνεται για την προστασία από μια εξωγενή εισβολή, αποτελεί πλέον ένα πολυσήμαντο εργαλείο στη γονιδιακή επεξεργασία. Η ικανότητα του να αποσιωπεί γονίδια, που σχετίζονται με ασθένειες, του προσδίδει θεραπευτικές δυνατότητες μέσω των siRNA.

Επί του παρόντος, η θεραπεία με την χρήση siRNA έχει προσφέρει μια αξιοσημείωτη ανάπτυξη στη διαχείριση των ανθρώπινων νόσων με τον οργανισμό FDA (United States Food and Drug Administration) και την Ευρωπαϊκή Επιτροπή να εγκρίνουν το 2018 την πρώτη θεραπεία που βασίζεται στο RNAi, το ONPATTRO (patisiran) (Weng et al., 2019). Η θεραπεία σχεδιάστηκε για ενήλικες ασθενείς με πολυνευροπάθεια η οποία προκαλείται από κληρονομική αμυλοείδωση μέσω τρανσθυρετίνης. Πρόσφατα εγκρίθηκε από τον FDA και το GIVLAARI™ (givosiran), δηλαδή μια siRNA θεραπεία σχεδιασμένη για την οξεία ηπατική πορφυρία (Sardh et al., 2019).

Σημαντική εφαρμογή του μηχανισμού RNAi αποτελεί επίσης η μελέτη της έκφρασης γονιδίων που συσχετίζονται με τον καρκίνο. Τα αποτελέσματα από τις κλινικές δοκιμές της Φάσης I των αντικαρκινικών RNAi έδειξαν ότι είναι εφικτή η χορήγηση του siRNA σε ανθρώπινους όγκους με περιορισμένη ανοσο-σχετιζόμενη τοξικότητα. Από τον Οκτώβριο του 2018 διερευνώνται τουλάχιστον πέντε αντικαρκινικές θεραπείες RNAi, οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια κλινικών δοκιμών (Das, Musetti and Huang, 2019). Η χρήση siRNA διερευνάται επίσης και για μελλοντικές θεραπείες έναντι της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Janakiraman et al., 2018).

Τέλος, μία σημαντική προσέγγιση του μηχανισμού RNAi αποτελεί η στόχευση ιικών γονιδίων για τον περιορισμό της έκφρασής τους. Η οδός siRNA του RNAi μπορεί να ανιχνεύσει πολλούς διαφορετικούς τύπους ιών, αλλά και να εντοπίσει αρκετές αλληλουχίες-στόχους σε ένα πολύ μικρό ιικό γονιδίωμα. Τα siRNA έχουν την ικανότητα να στοχεύουν γονίδια θανατηφόρων ιών, όπως του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), του ιού της γρίπης (INFLUENZA), του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), του ιού SARS (SARS-CoV), του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), αλλά και του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) (Qureshi et al., 2018). Περαιτέρω κλινικές δοκιμές επιχειρούνται για την αναστολή λοιμώξεων από τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), τον HBV και τον HIV (Shah et al., 2011).

1.2.1.8.2 Εφαρμογές στα έντομα

Τα επιβλαβή έντομα προκαλούν μεγάλες καταστροφές και απώλειες στις ανθρώπινες καλλιέργειες παγκοσμίως, ενώ η χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων έχει οδηγήσει σε περιβαλλοντικές μολύνσεις και αποτελεί απειλή για τους επικονιαστές (Goulson et al., 2015; Guedes et al., 2016). Επομένως, είναι απαραίτητη η εύρεση και η χρήση μηχανισμών πιο φιλικών προς το περιβάλλον για τη διαχείριση των επιβλαβών εντόμων. Μια τέτοια προσέγγιση αποτελεί η παρεμβολή RNA, που χρησιμεύει ως αντιϊκός μηχανισμός τόσο στα φυτά όσο και στα έντομα (βλ. §1.2.1.7). Για ερευνητικούς σκοπούς ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός προσφέρει μεγάλες δυνατότητες στη γενετική των εντόμων, συμπεριλαμβανόμενων και αυτών για τα οποία δεν υπάρχουν διαγονιδιακοί πόροι (Bellés, 2010). Έχουν σχεδιαστεί πλέον στρατηγικές RNAi για την καταστολή κρίσιμων γονιδίων των εντόμων, που οδηγούν σε μειωμένη άμυνα ή/και θνησιμότητα τους, αλλά και για την προστασία ωφέλιμων εντόμων, όπως είναι η μέλισσα (*Apis mellifera*) και ο

μεταξοσκώληκας (*Bombyx mori*), από εξαιρετικά παθογόνες ιογενείς λοιμώξεις (Price and Gatehouse, 2008; Xue et al., 2012).

Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα του RNAi μηχανισμού στα έντομα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και ποικίλλει ανάλογα με την τάξη του εντόμου, το είδος του γονιδίου και τον τρόπο πρόκλησης του RNAi (Terenius et al., 2011). Όσον αφορά τις διαφορετικές τάξεις εντόμων, σε πολλά είδη εντόμων που είναι ανθεκτικά στο RNAi η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης φτάνει το 60% ή και χαμηλότερα, και είναι συνήθως προσωρινή (Huvenne and Smagghe, 2010; Li et al., 2013). Ωστόσο, στα ευαίσθητα στο RNAi Κολεόπτερα μπορεί να φτάσει το 90% ή περισσότερο, και μπορεί να είναι μακράς διάρκειας ή και κληρονομήσιμη (Baum et al., 2007; Zhu et al., 2011; Bolognesi et al., 2012; Rangasamy and Siegfried, 2012). Ορισμένα έντομα ή τύποι κυττάρων μπορεί να εμφανίζουν χαμηλή απόκριση στο εξωγενώς εφαρμοζόμενο dsRNA, καθώς χρησιμοποιούν εναλλακτικούς μηχανισμούς αντίκλιξης άμυνας, όπως είναι η απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων (Merkling and van Rij, 2013).

Στην επιλογή του γονιδίου-στόχου για τη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω RNAi, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στον γονότυπο, δηλαδή στο επίπεδο αποσιώπησης του γονιδίου-στόχου, αλλά και στον φαινότυπο, δηλαδή στη λειτουργία του γονιδίου στόχου (Niu et al., 2018). Άλλοι παράγοντες, που λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή του γονιδίου-στόχου είναι τα απόλυτα και τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου σε διάφορα χρονικά διαστήματα, το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου σε διάφορους ιστούς, καθώς και η έκφραση παράλογων γονιδίων, με παρόμοιες λειτουργίες (Christiaens et al., 2018; Cooper et al., 2019).

Η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης επηρεάζεται ακόμη από τη μέθοδο μεταφοράς του dsRNA στα έντομα. Έχουν μελετηθεί πολλά συστήματα μεταφοράς του dsRNA σε διάφορα είδη εντόμων, και οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι ο εμβαπτισμός, η χορήγηση μέσω της τροφής, η μικροέγχυση, καθώς και η χρήση διαγονιδιακών φυτών (Niu et al., 2018). Η μικροέγχυση αποτελεί την συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο (Arakane et al., 2004; Suzuki et al., 2008), ενώ η κατάποση του dsRNA προκαλεί επίσης την απόκριση του μηχανισμού RNAi, είτε μέσω παροχής τροφής από το στόμα αναμεμιγμένης με dsRNA, είτε μέσω διαγονιδιακών φυτών που εκφράζουν dsRNA (Baum et al., 2007). Τέλος, ο εμβαπτισμός των οργανισμών σε διάλυμα dsRNA είναι επίσης εφαρμόσιμος σε ορισμένες περιπτώσεις (Clemens et al.,

2000; Whyard et al., 2009), αλλά χρησιμοποιείται κυρίως για δοκιμές σε κυτταροκαλλιέργειες (Yu et al., 2013).

Στα λεπιδόπτερα έντομα η απόδοση του RNAi μηχανισμού θεωρείται ωστόσο χαμηλή σε σχέση με άλλα είδη εντόμων (Terenius et al., 2011). Σημειώνεται πως απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα dsRNA για την απόκριση του RNAi στα Λεπιδόπτερα σε σχέση με τα Κολεπόπτερα (Terenius et al., 2011). Επιπλέον το dsRNA μπορεί να παραμείνει σταθερό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε πολλά είδη Κολεοπτέρων σε σύγκριση με τα περισσότερα Λεπιδόπτερα (Shukla et al., 2016; Guan et al., 2018). Πρόσφατα αποδείχθηκε η ύπαρξη ειδικής νουκλεάσης (REase) στα Λεπιδόπτερα, η οποία είναι υπεύθυνη για την πέψη του dsRNA, προτού γίνει η επεξεργασία του από την Dicer-2 (Guan et al., 2018), με αρνητικό αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα του RNAi. Επιπλέον, σε αντίθεση με διάφορα είδη Κολεοπτέρων, παρατηρείται στα Λεπιδόπτερα μειωμένη αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία του dsRNA φυτικής προέλευσης σε 21 bp siRNA (Ivashuta et al., 2015). Τέλος, παρά τη μεγάλη διακύμανση στην αποτελεσματικότητα του μηχανισμού RNAi σε διάφορα είδη Λεπιδοπτέρων όσον αφορά τον τύπο ιστού και τα γονίδια-στόχους, παρατηρείται ότι τα γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα των εντόμων είναι και τα πιο ευαίσθητα (Terenius et al., 2011).

Με σκοπό τον έλεγχο των επιβλαβών αυτών εντόμων έχουν σχεδιαστεί διάφορες προσεγγίσεις εφαρμογής της τεχνικής RNAi. Ειδικότερα, μπορεί να εφαρμοστεί στα φυτά, μέσω της κατασκευής γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών, που εκφράζουν dsRNA έναντι ενός είδους εντόμου-στόχου (Baum et al., 2007; Pitino et al., 2011), αλλά και μέσω της χρήσης βιολογικού εντομοκτόνου (Gu and Knipple, 2013). Υπάρχουν ωστόσο πολλοί περιορισμοί στην προσέγγιση της γενετικής τροποποίησης και αφορούν τη χαμηλή αποδοχή από το κοινό, την αδυναμία της γενετικής τροποποίησης πολλών καλλιεργούμενων φυτών και την έλλειψη κατανόησης πολλών μηχανισμών για τη μεγιστοποίηση της σταθερότητας και της αποδοτικότητας στην κατασκευή του dsRNA (Scott et al., 2013; Zotti et al., 2018).

1.2.1.9 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση του RNAi μηχανισμού

Ο μηχανισμός RNAi αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, καθώς βρίσκει πολλές εφαρμογές στη σύγχρονη θεραπεία, τη γονιδιακή επεξεργασία και τη διαχείριση επιβλαβών εντόμων. Ωστόσο παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα, η τεχνολογία αυτή

ενδέχεται να κρύβει αρκετούς κινδύνους, που μπορεί να επηρεάσουν τόσο το περιβάλλον, όσο και τον ίδιο τον άνθρωπο (Fletcher et al., 2020).

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα του RNAi, συνοψίζονται ως εξής:

- Οι στρατηγικές που βασίζονται στο RNAi επιτρέπουν τη μείωση της χρήσης φυτοφαρμάκων, προστατεύοντας παράλληλα τις καλλιέργειες από τα επιβλαβή έντομα. Η τοπική εφαρμογή του dsRNA ενδέχεται να μην αποτελεί περιβαλλοντικό κίνδυνο, καθώς τα dsRNAs αποικοδομούνται ταχύτατα στο έδαφος και το νερό, όπου ο χρόνος ημιζωής τους είναι κάτω από 30 και 72 ώρες, αντίστοιχα (Dubelman et al., 2014; Albright et al., 2017). Αντίθετα, ορισμένα φυτοφάρμακα μπορούν να παραμείνουν στο περιβάλλον για δεκαετίες, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα (Liu et al., 2020).
- Το RNAi αποτελεί μια πολύ εξειδικευμένη μέθοδο ως προς τον στόχο της (Cooper et al., 2019), σε σύγκριση με τα εντομοκτόνα (Liu et al., 2020). Η αγρότες πρέπει να είναι σε θέση να προστατεύουν τις καλλιέργειές τους από τα επιβλαβή έντομα, χωρίς να επηρεάζουν τα ωφέλιμα έντομα ή τα άλλα ζώα στον αγρό (Liu et al., 2020).
- Το RNAi είναι μια φυσική διαδικασία, που πραγματοποιείται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τόσο τα ζώα όσο και τα φυτά παράγουν μικρά μόρια RNA για τη ρύθμιση της έκφρασης των ενδογενών γονιδίων και των μεταθετών στοιχείων, αλλά και για την καταπολέμηση μιας ιϊκής λοίμωξης. Καθώς λοιπόν οι άνθρωποι εκτίθενται κάθε μέρα στα μικρά RNA στη διατροφή τους, η τεχνολογία που βασίζεται στο RNAi αναμένεται να μην είναι τοξική (Trivedi et al., 2010).

Αντίστοιχα, παρά τις προοπτικές της τεχνολογίας RNAi, μπορούν να παρουσιαστούν και πολλοί κίνδυνοι, που σχετίζονται από την εφαρμογή του και περιγράφονται παρακάτω ως εξής:

- Ένας από τους βασικότερους κινδύνους από τη χρήση της τεχνολογίας του RNAi είναι η πιθανότητα της πρόκλησης μη-ειδικής αποσιώπησης (off-target effect), κατά την οποία τα siRNA μπορεί να προκαλέσουν την αποσιώπηση ενός μη επιδιωκόμενου γονιδίου (Davidson and McCray, 2011). Καθώς τα siRNA έχουν μικρό μέγεθος, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα της παρουσίας μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης στο γονιδίωμα των οργανισμών-στόχων. Ενώ η παρουσία μη-ειδικής αποσιώπησης στον οργανισμό-στόχο δεν είναι ανησυχητική, είναι κρίσιμης σημασίας να αποφευχθεί σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο (Lundgren and Duan, 2013).

- Υπάρχει πιθανότητα οι στρατηγικές που βασίζονται στο RNAi να προκαλούν την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος ή και τοξικότητα σε οργανισμούς υψηλότερων τάξεων (Liu et al., 2020).
- Παρουσιάζεται επίσης κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας των εντόμων σε βάθος χρόνου στο χορηγούμενο dsRNA. Οι μεταλλαγές τόσο στο γονίδιο-στόχο, όσο και στα γονίδια του μηχανισμού RNAi που επηρεάζουν τη μεταφορά του dsRNA, την επεξεργασία του ή και το σχηματισμό συμπλόκων RISC μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι του RNAi (Liu et al., 2020).

Συνεπώς, ενώ ο μηχανισμός RNAi έχει μεγάλες προοπτικές και μπορεί να αποτελέσει εξαιρετική στρατηγική για τη γονιδιακή αποσιώπηση, η χρήση αυτής της τεχνολογίας απαιτεί προσεκτική εξέταση των πλεονεκτημάτων αλλά και κινδύνων, ώστε να μπορέσει να εφαρμοστεί με ασφάλεια τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο.

1.2.2 Σύστημα CRISPR/Cas9

1.2.2.1 Γενικά

Τα τελευταία χρόνια η μηχανική της γονιδιακής επεξεργασίας έχει ενισχυθεί εμφανέστατα με τη χρήση της τεχνικής CRISPR/Cas9, η οποία έχει την ικανότητα να τροποποιεί, να αντικαθιστά, αλλά και να εισάγει στο γονιδίωμα αλληλουχίες με αποτελεσματικότητα και ακρίβεια (Xing and Meng, 2020). Ανάμεσα στα πολλά διαθέσιμα εργαλεία επεξεργασίας του γονιδιώματος το σύστημα CRISPR/Cas9 κατέχει πολλά πλεονεκτήματα από άποψη απλότητας και εξειδίκευσης (Sahel et al., 2019) και έχει εφαρμοστεί ευρέως σε τόσο σε γενετικά τροποποιημένα ζωικά μοντέλα όσο και στη γονιδιακή θεραπεία (Heckl et al., 2014; Chen et al., 2015; Lin et al., 2019).

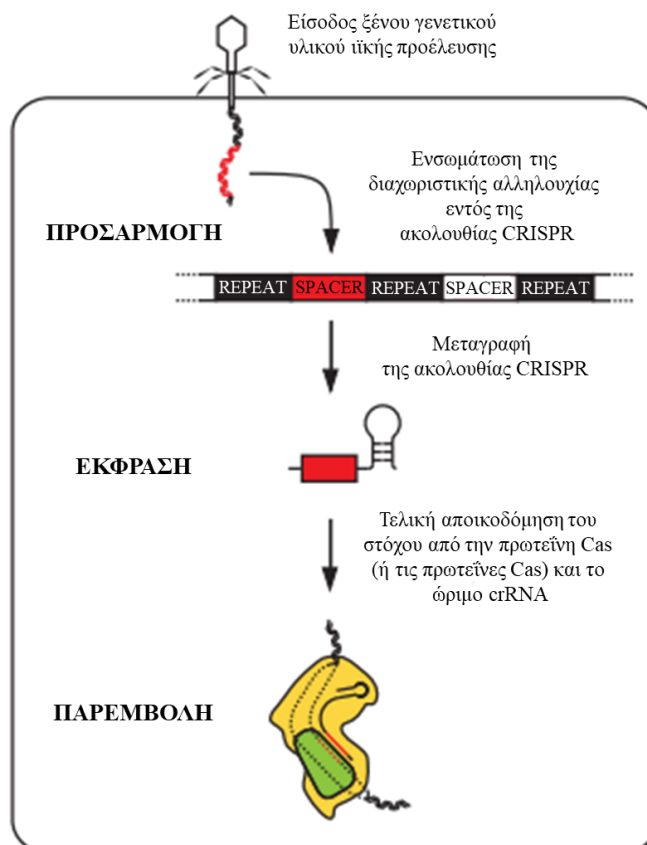
Το σύστημα CRISPR/Cas έχει μελετηθεί στους προκαρυωτικούς οργανισμούς από την δεκαετία του 90' και υπάρχει φυσιολογικά στο 90% των αρχαίων και το 50% των βακτηρίων (Sternberg και Doudna, 2015) ως ένας επίκτητος ανοσοποιητικός μηχανισμός κατά των λοιμώξεων από εξωγενές DNA, όπως είναι το γονιδίωμα φάγου ή πλασμιδίου (Barrangou et al., 2007). Γενικά, η περιοχή CRISPR αποτελείται μια αλληλουχία οδηγό (leader sequence), η οποία ακολουθείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (repeats), που διακόπτονται από διαχωριστικές αλληλουχίες (spacers) (Jansen et al., 2002; Bhaya et

al., 2011; Sorek et al., 2013). Ένα σύμπλεγμα γονιδίων Cas, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Cas, εντοπίζονται συχνά (αλλά όχι αποκλειστικά) δίπλα στην περιοχή CRISPR (Jansen et al., 2002; Brouns et al., 2008; Horvath and Barrangou, 2010). Πρόσφατα ευρήματα αποκαλύπτουν ότι οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες έχουν μήκος 18-50 νουκλεοτιδίων (nt) ενώ οι διαχωριστικές αλληλουχίες 17-84 nt (Marraffini, 2015). Το μήκος της αλληλουχίας οδηγού του CRISPR ωστόσο κυμαίνεται από ~ 100-500 bp και είναι συχνά πλούσια σε αδενίνη/θυμίνη (A/T) (Jansen et al., 2002; Watson et al., 2016). Τελικά, το σύστημα αυτό αναγνωρίστηκε ως ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο, που βρίσκεται εφαρμογή σε πολλά βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων (Mabashi-Asazuma and Jarvis, 2017).

1.2.2.2 Το CRISPR/Cas ως επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα των προκαρυωτών

Η λειτουργία του μηχανισμού CRISPR/Cas ως ενός επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος αποδείχθηκε πειραματικά στο βακτήριο *Streptococcus thermophilus* (Barrangou et al., 2007). Η εισαγωγή της αλληλουχίας φάγου στη διαχωριστική περιοχή του CRISPR του *S. thermophilus* καθιστούσε αυτό το στέλεχος ανθεκτικό στον αντίστοιχο φάγο. Ωστόσο, αυτή η βακτηριακή ανθεκτικότητα στη μόλυνση από τον φάγο εξαφανιζόταν, όταν η αντίστοιχη αλληλουχία διαγραφόταν από το γονιδίωμα του φάγου. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι το σύστημα CRISPR/Cas περιορίζει το μετασχηματισμό των πλασμιδίων που φέρουν αλληλουχίες, οι οποίες ταιριάζουν με τις διαχωριστικές περιοχές του CRISPR (Marraffini and Sontheimer, 2008). Την ίδια χρονιά έγινε ανασύσταση του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιώντας το CRISPR του *E. coli*, το οποίο ανακαλύφθηκε το 1987 και δείχθηκε ότι τα επεξεργασμένα μόρια RNA της περιοχής CRISPR, αφού μεταγραφούν λειτουργούν σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες Cas, οι οποίες παράγονται από γονίδια που βρίσκονται δίπλα στο CRISPR (Brouns et al., 2008). Έπειτα, η κλωνοποίηση και η έκφραση του συστήματος CRISPR/Cas του *S. thermophilus* από την *E. coli* εμφάνισε ετερόλογη προστασία έναντι του πλασμιδιακού μετασχηματισμού, αλλά και της μόλυνσης από φάγο (Sapranauskas et al., 2011). Συνεπώς, το σύστημα CRISPR/Cas έγινε ευρέως γνωστό ως επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα των βακτηρίων και αρχαίων που δραστηριοποιείται για την προστασία τους έναντι εισερχόμενου DNA πλασμιδίων και βακτηριοφάγων.

Όπως προαναφέρθηκε, η δραστηριότητα CRISPR απαιτεί την παρουσία ενός συνόλου γονιδίων *cas*, τα οποία βρίσκονται δίπλα στο CRISPR και κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την ανοσοαπόκριση (Brouns et al., 2008). Συνεπώς, το σύστημα CRISPR/Cas αποτελείται από δύο μέρη: τις πρωτεΐνες Cas, που εμπλέκονται στην προστασία και την πρόσληψη των νουκλεοτιδίων που εισβάλλουν, και την ακολουθία CRISPR, η οποία αποτελείται από ομαδοποιημένες, επαναλαμβανόμενες περιοχές, γνωστές ως τακτικά παρεμβαλλόμενες βραχείες παλίνδρομες επαναλήψεις (Jansen et al., 2002; Zhang et al., 2020). Καθώς το γονιδίωμα τροποποιείται κατά τη διαδικασία πρόσληψης της διαχωριστικής αλληλουχίας, οι απόγονοι κληρονομούν αυτή την πληροφορία, αποκτώντας με αυτόν τον τρόπο προστασία έναντι μιας νέας μόλυνσης (Barrangou et al., 2007; Brouns et al., 2008). Οι νέες διαχωριστικές αλληλουχίες που προστίθενται στο CRISPR καθιστούν αυτό τον μηχανισμό μια χρονολογική καταγραφή των ιών, που έχει αντιμετωπίσει το κύτταρο και οι πρόγονοί του (Rath et al., 2015).



Εικόνα 1.3. Τα τρία βασικά στάδια της ανοσολογικής απόκρισης του συστήματος CRISPR/Cas (Προσαρμογή από Rath et al., 2015).

Ως αμυντικός μηχανισμός, το CRISPR/Cas μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια (Hille and Charpentier, 2016; Wang et al., 2019) (**Εικόνα 1.3**):

- I. Την προσαρμογή, κατά την οποία τα εισερχόμενα θραύσματα νουκλεοτιδίων προσλαμβάνονται από τον οργανισμό-ξενιστή και ενσωματώνονται εντός της ακολουθίας του CRISPR.
- II. Την έκφραση, κατά την οποία η ακολουθία CRISPR μεταγράφεται σε ένα μεγάλο μήκους πρόδρομο crRNA (pre-crRNA) που διασπάται από ριβονουκλεάσες ή πρωτεΐνες Cas, ώστε να παράγει ώριμο οδηγό crRNA.
- III. Την παρεμβολή, κατά την οποία το ώριμο crRNA χρησιμοποιείται, για να καθοδηγήσει σύμπλοκα-τελεστές, τα οποία συλλαμβάνουν και αποικοδομούν τα νουκλεοτίδια που εισβάλλουν.

1.2.2.3 Κατηγοριοποίηση των συστημάτων CRISPR/Cas

Η κατηγοριοποίηση, που έχει υιοθετηθεί προς το παρόν σχετικά με τα συστήματα CRISPR/Cas βασίζεται στα συστατικά του CRISPR, όπως είναι οι ομοιότητες των γονιδίων *cas*, η παραγόμενη πρωτεΐνη Cas, η οργάνωση των γονιδίων στο σύστημα CRISPR/Cas και μεταβλητότητά τους εντός του ίδιου του CRISPR (Sahel et al., 2019). Ωστόσο, οι προσπάθειες κατηγοριοποίησης των συστημάτων CRISPR/Cas δεν έχουν ακόμη ολοκληρωθεί, καθώς ανακαλύπτονται συνεχώς νέα συστήματα, που ταξινομούνται αντίστοιχα σε ανάλογες υποκατηγορίες, ομάδες και τύπους (Koonin et al., 2017).

Έχουν οριστεί δύο κατηγορίες συστημάτων CRISPR (Makarova et al., 2015), οι οποίες εμπεριέχουν διάφορους τύπους που θα αναφερθούν στη συνέχεια. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους τύπους I και III, που απαντώνται κυρίως σε αρχαία και πιο σπάνια στα βακτήρια, αλλά και τον τύπο IV. Τα σύμπλοκα-τελεστές των τύπων I και III CRISPR/Cas έχουν μια συγκεκριμένη δομή, που περιέχει παράλογες μυστηριώδεις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (RAMPs - Repeat-Associated Mysterious Proteins), όπως η Cas7 και η Cas5, που διαθέτουν μοτίβο αναγνώρισης του RNA (RRM - RNA Recognition Motif) και επιπρόσθετες μεγάλες και μικρές υπομονάδες (van der Oost et al., 2014; Jackson et al., 2014; Jackson and Wiedenheft 2015). Αυτά τα σύμπλοκα-τελεστές περιέχουν μία υπομονάδα Cas5 και πολλές υπομονάδες Cas7. Βασικά γονίδια των τύπων I και III αποτελούν τα *Cas3* και *Cas10*, αντίστοιχα (Shmakov et al., 2017). Τέλος, ο τύπος IV αποτελεί έναν σπάνιο τύπο CRISPR/Cas που αναγνωρίστηκε πρόσφατα (Makarova et al., 2015). Τα συστήματα τύπου

IV κωδικοποιούν σύμπλοκα-τελεστές crRNA πολλαπλών υπομονάδων, που αποτελούνται από μια μερικώς υποβαθμισμένη μεγάλη υπομονάδα Csf1, την Cas5 και την Cas7, αλλά και μια μικρή υπομονάδα σε ορισμένες περιπτώσεις (Makarova et al., 2011). Το *csf1* μπορεί να θεωρείται ως το βασικό γονίδιο για αυτό το σύστημα (Makarova, et al., 2015).

Η δεύτερη κατηγορία συστημάτων CRISPR/Cas αποτελείται από σύμπλοκα-τελεστές οργανωμένα με πιο ομοιόμορφο τρόπο, τα οποία περιέχουν απλές, μεγάλες και πολυμερείς πρωτεΐνες (Sahel et al., 2019). Στο σύστημα αυτό ανήκουν οι τύποι II, V και VI. Ο τύπος II περιέχει την ενδονουκλεάση Cas9 ως τελεστή, η οποία και χρησιμοποιείται ως κύριο ένζυμο της επεξεργασίας του γονιδιώματος. Από την άλλη, ο τύπος V περιέχει την Cpf1, μια RNA-καθοδηγούμενη ενδονουκλεάση ως τελεστή, που διασπά τον στόχο χωρίς πρόσθετο tracrRNA. Όσον αφορά τον τύπο VI, αυτός βρέθηκε ότι στοχεύει τόσο σε RNA όσο και σε DNA. Ο τύπος αυτός υποδιαιρείται περαιτέρω σε δύο υποτύπους (VI-A και VI-B), οι οποίοι με την σειρά τους περιέχουν τις πρωτεΐνες-τελεστές Cas13a και Cas13b, αντίστοιχα (Shmakov et al., 2017).

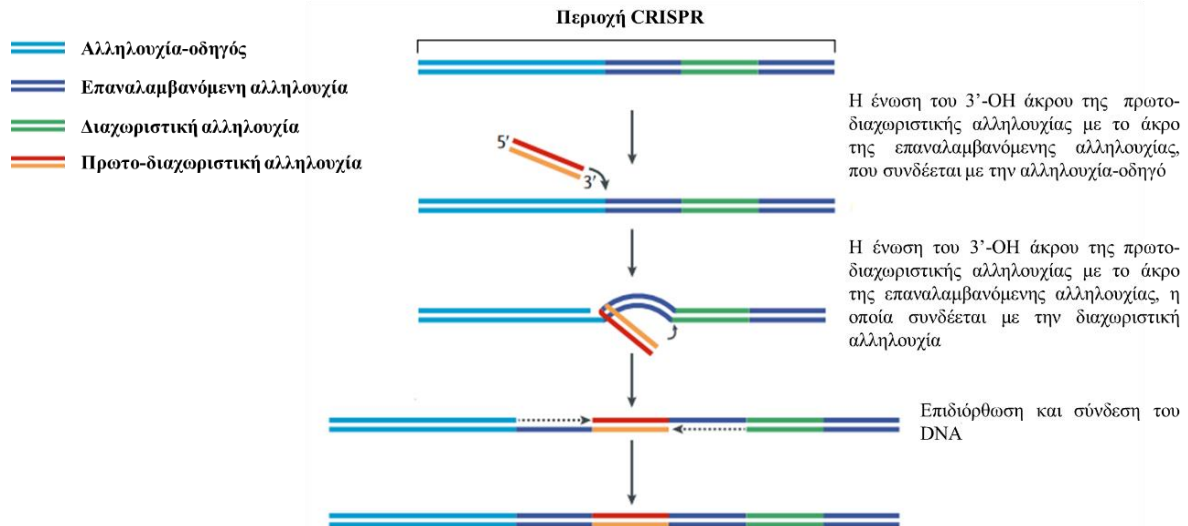
1.2.2.4 Το σύστημα CRISPR/Cas9 του *Streptococcus pyogenes*

Χάρης στον απλό δομικό σχεδιασμό των συμπλοκών-τελεστών, τα συστήματα CRISPR/Cas της δεύτερης κατηγορίας αποτελούν μια ελκυστική προσέγγιση για την ανάπτυξη μιας καινοτόμου τεχνολογίας επεξεργασίας του γονιδιώματος (Zhang et al., 2020). Ένα από τα καλύτερα μελετημένα συστήματα CRISPR/Cas αποτελεί αυτό του *Streptococcus pyogenes* (τύπος II-A), ο οποίος και περιέχει την ενδονουκλεάση SpCas9 (Mir et al., 2018), σχηματίζοντας το γνωστό μηχανισμό CRISPR/Cas9. Το σύστημα αυτό κωδικοποιεί τις ενδονουκλεάσες Cas1, Cas2, Cas9 και μια τέταρτη ενδονουκλεάση Csn2 (Shmakov et al., 2017; Mir et al., 2018). Η ενδονουκλεάση Cas9 συμμετέχει στα στάδια αμυντικού μηχανισμού βοηθώντας στην προσαρμογή και την επεξεργασία του crRNA, διασπώντας τον DNA-στόχο (Gupta et al., 2019). Αναλυτικά, η πορεία του μηχανισμού CRISPR/Cas9 του *Streptococcus pyogenes* περιγράφεται παρακάτω.

1.2.2.4.1 Η προσαρμογή του συστήματος CRISPR/Cas9

Το στάδιο της προσαρμογής του βακτηρίου, που μολύνεται από εξωγενές DNA (φάγο ή πλασμίδιο), αποτελείται από την πρόσληψη του τμήματος DNA, που ονομάζεται πρωτοδιαχωριστική αλληλουχία (protospacer) και την ενσωμάτωση της αλληλουχίας αυτής στην ακολουθία CRISPR, με τον τελικό σχηματισμό της διαχωριστικής αλληλουχίας (spacer)

(Amitai and Sorek, 2016; McGinn and Marraffini, 2019). Η επιλογή των πρωτο-διαχωριστικών αλληλουχιών εξαρτάται εν μέρει από την αναγνώριση ενός μοτίβου που βρίσκεται γειτονικά της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας, το οποίο ονομάζεται αλληλουχία PAM (Protospacer Adjacent Motif). Οι αλληλουχίες PAM έχουν μήκος μερικών νουκλεοτιδίων και η ακριβής τους αλληλουχία ποικίλλει ανάλογα τον τύπο του συστήματος CRISPR/Cas (Mojica et al., 2009). Σε συστήματα CRISPR/Cas τύπου II, η αλληλουχία PAM βρίσκεται στο 3' άκρο της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας του ξένου DNA (Deveau et al., 2008; Mojica et al., 2009; Marraffini and Sontheimer, 2010). Ωστόσο, οι πρωτο-διαχωριστικές αλληλουχίες που ενσωματώνονται στην περιοχή CRISPR δεν περιέχουν θέσεις PAM (Mojica et al. 2009). Η απουσία PAM από το γονιδίωμα του ξενιστή προστατεύει το βακτηριακό DNA από την αυτοκαταστροφή (Driehuis and Clevers, 2017). Έτσι, στον *S. pyogenes* η αλληλουχία PAM που διαβάζεται από την ενδονουκλεάση Cas9 είναι η 5'-NGG-3' (N μπορεί να είναι οποιαδήποτε αζωτούχος βάση) (Cho et al., 2013). Η επιλογή της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας γίνεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης PAM της Cas9 [φορτωμένης με ένα βοηθητικό RNA ενεργοποίησης (tracrRNA)], η οποία εντοπίζει την αλληλουχία PAM και καθοδηγεί το σύμπλοκο Cas1-Cas2, μαζί με την βοηθητική πρωτεΐνη Csn2, για την τελική απόκτηση της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας (Heler et al., 2015; Wei et al., 2015). Τελικά η ενσωμάτωση της νέας πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας στην ακολουθία CRISPR πραγματοποιείται με έναν μηχανισμό διάσπασης-σύνδεσης του DNA, που ξεκινάει από τη διάσπαση του άκρου της αλληλουχίας-οδηγού (leader sequence) με την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, στην οποία και ενώνεται το 3'-OH άκρο της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας (Nuñez et al., 2015; Wright and Doudna, 2016; Wright et al., 2017) (**Εικόνα 1.4**). Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία DNA έπειτα κάμπτεται και πραγματοποιείται η δεύτερη αντίδραση διάσπασης-σύνδεσης, κατά την οποία παρατηρείται η σύνδεση των 3' άκρων του dsDNA της πρωτο-διαχωριστικής αλληλουχίας με τα μονόκλωνα DNA (ssDNA) των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Οι ssDNA επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες συμπληρώνονται με τη δράση της DNA πολυμεράσης και συνδέονται, ώστε να ολοκληρωθεί με αυτόν τον τρόπο η ενσωμάτωση των πρωτο-διαχωριστικών αλληλουχιών (Yosef et al., 2012; Arslan et al., 2014; Nuñez et al., 2015; Ivančić-Baće et al., 2015).



Εικόνα 1.4. Η ενσωμάτωση των νέων διαχωριστικών αλληλουχιών στην ακολουθία CRISPR (Προσαρμογή από McGinn and Marraffini, 2019).

1.2.2.4.2 Η βιογένεση του crRNA

Για να ενεργοποιηθεί η ανοσία, η ακολουθία CRISPR μεταγράφεται σε ένα μακρύ πρόδρομο crRNA (pre-crRNA), το οποίο αφού υποβληθεί σε επεξεργασία, δημιουργεί ώριμο crRNA, το οποίο περιέχει τις αλληλουχίες των εισβολέων (Carte et al., 2008; Haurwitz et al., 2010). Σε αντίθεση με τα περισσότερα συστήματα των τύπων I και III, τα οποία χρησιμοποιούν μια ειδική ενδονουκλεάση Cas για τη διάσπαση του pre-crRNA (Brouns et al., 2008; Carte et al., 2008; Nam et al., 2012), τα συστήματα τύπου II χρησιμοποιούν μια ενδογενή RNAάση III και ένα εξειδικευμένο μόριο RNA, το tracrRNA (Deltcheva et al., 2011). Τα tracrRNA έχουν εντοπιστεί στα περισσότερα γονιδιώματα που κωδικοποιούν συστήματα τύπου II, και πλέον θεωρούνται αναπόσπαστο συστατικό τους (Deltcheva et al., 2011; Yosef et al., 2012). Στον *S. pyogenes*, το γονίδιο του tracrRNA βρίσκεται ανοδικά των γονιδίων *cas* (Jiang and Doudna, 2017) και περιέχει συμπληρωματική αλληλουχία, η οποία υβριδίζει με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του pre-crRNA (Jiang and Doudna, 2017; Nishimasu and Nureki, 2017) και μια περιοχή στο 3' άκρο, που αναγνωρίζεται από την Cas9 (Nishimasu and Nureki, 2017). Αυτή η αντίδραση διάσπασης του crRNA, προωθείται και σταθεροποιείται από την Cas9 και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός σταθερού σύμπλοκου ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Μετά το σχηματισμό του σύμπλοκου tracrRNA:crRNA-Cas9, αμφότερα τα RNA επεξεργάζονται από την ριβονουκλεάση III (RNase III) του ξενιστή, οδηγώντας στο σχηματισμό επεξεργασμένου tracrRNA και ενδιάμεσου crRNA (Rath et al., 2015; Jiang

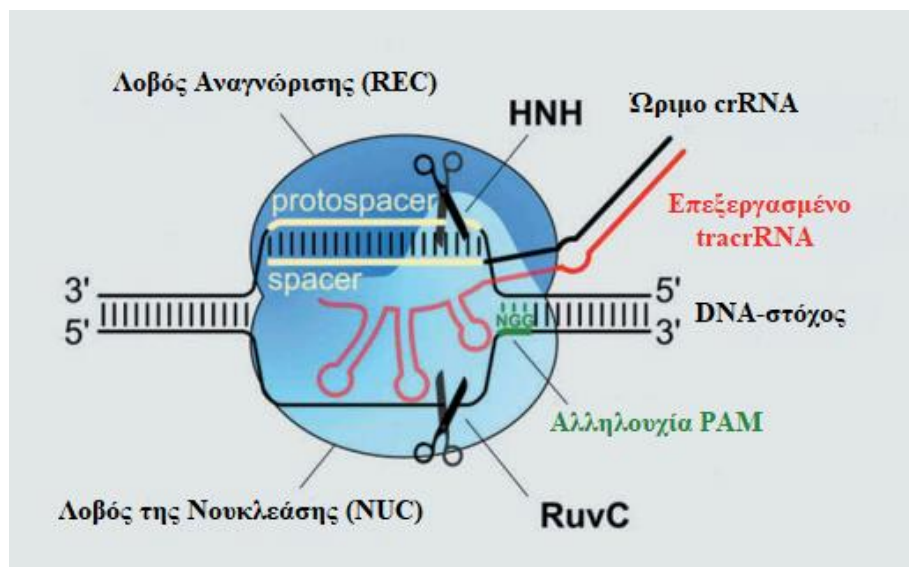
and Doudna, 2017; Thurtle-Schmidt and Lo, 2018). Αυτό αποτελεί το πρώτο στάδιο ωρίμανσης, του οποίου έπεται ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας από άγνωστους παράγοντες, που δημιουργούν το ώριμο crRNA μήκους 39-42 nt. Το crRNA αυτό αποτελείται από μια αλληλουχία 20 nt που προέρχεται από τον εισβολέα και μια κοινή επαναληπτική αλληλουχία 19-22 nt συνδεδεμένη με το tracrRNA (Deltcheva et al., 2011). Το ώριμο δίκλωνο μόριο tracrRNA:crRNA παραμένει προσδεδεμένο στην Cas9 και είναι έτοιμο για το στάδιο της παρεμβολής (Deltcheva et al., 2011; Yosef et al., 2012). Αυτό το συμβάν ωρίμανσης, που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση δύο μικρών RNA, περιεγράφηκε αρχικά στο *S. pyogenes* και στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι διατηρείται σε όλα τα συστήματα τύπου II (Chylinski et al., 2013). Το tracrRNA και το crRNA μπορούν επίσης να συντηχθούν τεχνητά σε έναν οδηγό κλώνο RNA (sgRNA), για την απλοποίηση των εφαρμογών επεξεργασίας γονιδιώματος (Jinek et al., 2012).

1.2.2.4.3 Η RNA-καθοδηγούμενη παρεμβολή

Στα συστήματα τύπου II, η ενδονουκλεάση Cas9 καθοδηγούμενη από το σύμπλοκο των δύο μορίων RNA διαμεσολαβεί τη διάσπαση του εισαγόμενου ξένου DNA (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012). Η δομή της Cas9 περιλαμβάνει τον λοβό αναγνώρισης (REC), που εμπλέκεται στην αναγνώριση του στόχου και τον λοβό της νουκλεάσης (NUC), που εμπλέκεται στη διάσπαση του στόχου. Το δίκλωνο μόριο DNA-στόχος μαζί με το sgRNA τοποθετούνται στο κεντρικό κανάλι μεταξύ των δύο λοβών. Ο λοβός REC περιέχει τις περιοχές REC1-3 και μια ελικοειδή γέφυρα πλούσια σε αργινίνη, ενώ ο λοβός NUC περιέχει τις καταλυτικές περιοχές HNH και RuvC, την περιοχή WED που αλληλοεπιδρά με τον RNA-οδηγό, και την περιοχή αλληλεπίδρασης PAM (PI -PAM interaction domain) (Anders et al., 2014; Jinek et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). Η αρχική πρόσδεση του RNA στο Cas9 προκαλεί μια αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, που επιτρέπει την ανίχνευση των αλληλουχιών PAM στο ξένο DNA (Sternberg et al., 2014; Jiang et al., 2015; Shibata et al., 2017). Συγκεκριμένα, η περιοχή HNH υφίσταται μετασχηματιστικές μεταβάσεις από μια ανενεργή σε μια ενεργή κατάσταση, η οποία και ελέγχει τη δραστηριότητα διάσπασης. Η μετάβαση αυτή στην ενεργή κατάσταση εξαρτάται από δισθενή κατιόντα και από την ύπαρξη συμπληρωματικότητας με το τμήμα PAM του στόχου (Dagdas et al., 2017).

Μετά την αναγνώριση της αλληλουχίας PAM αποχωρίζονται μεταξύ τους οι βάσεις του DNA-στόχου, γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχου από τη

συμπληρωματική διαχωριστική αλληλουχία του crRNA (Anders et al., 2014). Εάν υπάρχει επαρκής συμπληρωματικότητα, πραγματοποιείται ο υβριδισμός της διαχωριστικής αλληλουχίας με τον συμπληρωματικό κλώνο DNA και ο μη συμπληρωματικός κλώνος μετατοπίζεται, σχηματίζοντας μια δομή θηλειάς R (Jinek et al., 2012; Szczelkun et al., 2014). Αποδείχθηκε ότι η περιοχή REC3 της Cas9 είναι αυτή που αντιλαμβάνεται τη συμπληρωματικότητα της διαχωριστικής αλληλουχίας με την αλληλουχία στόχο και ελέγχει σύνδεση της περιοχής HNH με τη θέση διάσπασης (Chen et al., 2017).



Εικόνα 1.5. Η RNA-καθοδηγούμενη παρεμβολή από την ενδονουκλεάση Cas9. Η ενδονουκλεάση Cas9 καθοδηγείται από το ώριμο δίκλωνο μόριο tracrRNA:crRNA προς το dsDNA στόχο. Κατόπιν αναγνώρισης της αλληλουχίας PAM (NGG) από την Cas9, οι περιοχές HNH και RuvC καταλύουν τη δίκλωνη πέψη του στόχου. Η περιοχή HNH διασπά τον συμπληρωματικό κλώνο της διαχωριστικής αλληλουχίας, ενώ η περιοχή RuvC διασπά τον αντίθετο κλώνο (Προσαρμογή από Le Rhun et al., 2019).

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διάσπαση των δύο κλώνων του DNA στόχου από τις περιοχές HNH και RuvC της ενδονουκλεάσης Cas9 (Jinek et al., 2012). Η διάσπαση από την περιοχή RuvC, καθώς ρυθμίζεται αλλοστερικά από τη διαμορφωτική ενεργοποίηση της περιοχής HNH, εξασφαλίζει την ταυτόχρονη διάσπαση του DNA-στόχου και από τις δύο περιοχές της ενδονουκλεάσης (Sternberg et al., 2015). Συγκεκριμένα, η περιοχή ενδονουκλεάσης HNH διασπά τον κλώνο DNA, που είναι συμπληρωματικός της ακολουθίας-οδηγού (κλώνος-στόχος), ενώ η περιοχή RuvC διασπά τον απέναντι συμπληρωματικό κλώνο DNA (κλώνος μη-στόχος) (Jiang and Doudna, 2017;

Nishimasu et al., 2014) (**Εικόνα 1.5**). Η διαδικασία της δίκλωνης πέψης του DNA-στόχου αποδίδει κομμάτια DNA με τυφλά άκρα (Garneau et al., 2010). Τέλος, συμπεραίνεται ότι τόσο η αναγνώριση της αλληλουχίας PAM, όσο και ο υβριδισμός της διαχωριστικής ακολουθίας με την ακολουθία στόχο, αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για τη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης Cas9 στην πραγματοποίηση της δίκλωνης πέψης ανοδικά της αλληλουχίας PAM (Jinek et al., 2012, Gasiunas et al., 2012).

1.2.2.5 Μονοπάτια επιδιόρθωσης της δίκλωνης πέψης στα ευκαρυωτικά κύτταρα

Ο μηχανισμός του συστήματος CRISPR/Cas9 βρίσκει εφαρμογή σε πολλά βιολογικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένου και αυτού των εντόμων. Συγκεκριμένα, η τεχνητή σύντηξη των crRNA και tracrRNA σε έναν οδηγό κλώνο sgRNA ήταν αυτή, που άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη αυτού του συστήματος στη γονιδιωματική επεξεργασία (Jinek et al., 2012). Ωστόσο η μέθοδος αυτή, χρησιμοποιεί και τα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων, για την πραγματοποίηση των γενετικών αλλοιώσεων (Rath et al., 2015).

Κατά την πέψη του DNA-στόχου από την ενδονουκλεάση Cas9, ο στόχος ακολουθεί συνήθως ένα από τα δύο κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης της βλάβης, δηλαδή το μονοπάτι NHEJ (Non-Homologous End Joining) ή το μονοπάτι HDR (Homology Directed Repair). Το NHEJ αποτελεί κυρίαρχο μονοπάτι επιδιόρθωσης της δίκλωνης πέψης του DNA και είναι ενεργό σε όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Driehuis and Clevers, 2017), ενώ αντίθετα το HDR μονοπάτι λαμβάνει χώρα κυρίως στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου (Heyer et al., 2010). Το μονοπάτι NHEJ θεωρείται επιρρεπές σε λάθη, καθώς δεν χρησιμοποιεί κάποιο πρότυπο για την επιδιόρθωση του DNA (Driehuis and Clevers, 2017), οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε μεταλλαγές τύπου απαλοιφής ή προσθήκης (Taning et al., 2017). Αυτές οι μεταλλαγές οδηγούν συχνά στην αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και σε πρόωρα κωδικόνια λήξης (Perez et al., 2008). Από την άλλη, το HDR αποτελεί εναλλακτικό μονοπάτι επιδιόρθωσης της δίκλωνης πέψης του DNA και, παρόλο που πραγματοποιείται με μικρότερη συχνότητα από το NHEJ, προσφέρει ακρίβεια και πιστότητα κατά την επιδιόρθωση της βλάβης, παρουσία προτύπου επιδιόρθωσης του DNA. Το πρότυπο επιδιόρθωσης μπορεί να έχει τη μορφή είτε κατασκευών που στοχεύουν δίκλωνο DNA, είτε μονόκλωνων DNA ολιγονουκλεοτιδίων (Ran et al., 2013). Επειδή το HDR είναι ενεργό μόνο κατά την διαίρεση των κυττάρων, και η αποτελεσματικότητά του

μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τον τύπο και την κατάσταση των κυττάρων, καθώς και με τον γονιδιωματικό τόπο και το πρότυπο επιδιόρθωσης (Saleh-Gohari and Helleday, 2004).

1.2.2.6 Εφαρμογές και αποτελεσματικότητα της μεθόδου CRISPR/Cas9

1.2.2.6.1 Θεραπευτικές εφαρμογές

Τα τελευταία χρόνια το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις δυνατότητες του συστήματος CRISPR/Cas9 εμπνέει την προσδοκία ότι ο μηχανισμός αυτός είναι ικανός να προσφέρει ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές σε πολλούς διαφορετικούς τομείς. Μερικές από αυτές τις εφαρμογές, που αφορούν την επεξεργασία των γονιδίων, τη γονιδιακή αποσιώπηση και τον εντοπισμό βασικών γονιδίων, στα πλαίσια της θεραπείας ασθενειών, σταδιακά ανακλύπουν και διαφοροποιούνται. Οι θεραπευτικές προοπτικές του CRISPR/Cas9 μπορούν να αξιοποιηθούν για τη διόρθωση γενετικών διαταραχών, όπως για παράδειγμα η αιμορροφιλία, η κυστική ίνωση, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η β-θαλασσαιμία και η μυϊκή δυστροφία Duchenne (Long et al., 2014; Sürün et al., 2018; Xie et al., 2014; Yin et al., 2014; Park et al., 2016). Ο μηχανισμός αυτός όμως δεν περιορίζεται αποκλειστικά στη γονιδιακή επεξεργασία του DNA του πυρήνα, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και ως τεχνική επιδιόρθωσης γενετικών ασθενειών που συσχετίζονται με μιτοχondριακές μεταλλάξεις (Jo et al., 2015). Άλλες κλινικές δοκιμές του CRISPR/Cas9 επικεντρώνονται επίσης στο πολλαπλούν μυέλωμα, τον πνεύμονα, τον οισοφάγο, τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και του προστάτη, τον ιό HIV-1, αλλά και τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων, τη λευχαιμία, το μελάνωμα και πολλές άλλες ασθένειες (Cyranoski, 2016; Brokowski and Adli, 2019).

Ιδιαίτερη προσοχή έχει προξενήσει η εφαρμογή του CRISPR/Cas9 έναντι του καρκίνου, χάρις στην αποτελεσματική επεξεργασία του γονιδίου-στόχου και την προσαρμογή του σε διάφορες στρατηγικές μεταφοράς του. Σε αντίθεση με άλλες στρατηγικές θεραπείας, το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει τη δυνατότητα του γονιδιακού ελέγχου και του εντοπισμού του στόχου, ενώ επίσης είναι ικανό να προβλέπει την απόκριση σε μια χημειοθεραπεία (Szlachta et al., 2018). Τα πλεονεκτήματα αυτά σε συνδυασμό με την απλότητα και αξιοπιστία καθιστούν δυνατή την ανακάλυψη νέων στόχων για τα σχεδιαζόμενα φάρμακα, αλλά και βιοδεικτών και γονιδίων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας απέναντι σε αυτά (Xing and Meng, 2020).

Εκτός από τις θεραπευτικές προσεγγίσεις, η τεχνολογία του CRISPR/Cas9 έχει προσελκύσει επίσης μεγάλο ενδιαφέρον, τόσο από τις Επιστήμες Τροφίμων, όσο και από τον κλάδο της Γεωργίας, με στόχο την αύξηση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Ειδικότερα, χρησιμοποιείται για τη γενετική βελτίωση των χαρακτηριστικών των καλλιεργούμενων φυτών, προκειμένου να ενισχυθεί η ανοσία τους, η ανθεκτικότητά τους σε συνθήκες καταπόνηση, σε παράσιτα και σε εντομοκτόνα, η πρόσληψη περισσότερων θρεπτικών συστατικών και η γενικότερη αύξηση της παραγωγής τους (Zhang et al., 2020; Gupta et al., 2019).

1.2.2.6.2 Εφαρμογές του συστήματος CRISPR/Cas9 στα έντομα

Το σύστημα CRISPR/Cas9 χάρις στην υψηλή του εξειδίκευση και απλότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία γονιδίων σε πλήθος οργανισμών και κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων, όχι μόνο για βασική έρευνα, αλλά και για εφαρμοσμένη. Οι δοκιμές που σχεδιάζονται, έχουν ως στόχο τον έλεγχο των επιβλαβών εντόμων προκειμένου να προστατευθούν οι καλλιέργειες (Li and Scott, 2016), αλλά και εντόμων-φορέων για σημαντικές ανθρώπινες νόσους, όπως για παράδειγμα τα κουνούπια του γένους *Anopheles* που είναι φορείς του πλασμοδίου της ελονοσίας (Esvelt et al., 2014; Gabrieli et al., 2014). Παράλληλα γίνονται και προσπάθειες προστασίας των ωφέλιμων εντόμων, όπως ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori* και η μέλισσα *A. mellifera*, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη γεωργία και οικονομία (Taning et al., 2017). Ωστόσο παρά τη γοργά αναπτυσσόμενη τεχνολογία του CRISPR/Cas9 στο πεδίο της γονιδιωματικής επεξεργασίας στα έντομα, τα αποτελέσματα εξακολουθούν να διαφέρουν μεταξύ των διάφορων μελετών, κυρίως λόγω των υπάρχουσών διαφορών στις πειραματικές παραμέτρους ανάλογα με τη μορφή της Cas9 και του οδηγού sgRNA, τη μέθοδο μεταφοράς τους, το γονίδιο-στόχο και την πιθανότητα πρόκλησης μη-ειδικής αποσιώπησης (Taning et al., 2017).

Η πρώτη καταγεγραμμένη εφαρμογή γονιδιακής απενεργοποίησης (knock-out) στα έντομα μέσω CRISPR/Cas9 πραγματοποιήθηκε στη *Drosophila melanogaster*, όπου έγινε η διαγραφή ενός θραύσματος μήκους 4,6 kb του γονιδίου *yellow*, χρησιμοποιώντας δύο RNA οδηγούς, που στόχευαν αντίστοιχα το 5' και 3' άκρο (Gratz et al. 2013). Η *Drosophila* αποτελεί ένα από τα καλύτερα μοντέλα εντόμων, λόγω της δυνατότητας χρήσης ενός ευρέος ρεπερτορίου γενετικών εργαλείων, όσον αφορά τις διάφορες πειραματικές δοκιμασίες (Rong and Golic, 2000; Gong and Golic, 2003). Οι ερευνητές

ωστόσο εξετάζουν την εφαρμογή του CRISPR/Cas9 και σε άλλα είδη εντόμων, όπως είναι το Λεπιδόπτερο *B. mori* (Wang et al. 2013; Liu et al., 2014; Zhang et al., 2015), η μέλισσα *A. mellifera* (Hu et al., 2019) και το κουνούπι *Aedes aegypti* (Dong et al., 2015; Kistler et al., 2015).

Η λανθασμένη χρήση των παραδοσιακών χημικών φυτοφαρμάκων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη υψηλής ανθεκτικότητας σε πολλά λεπιδόπτερα έντομα όπως τα *Plutella xylostella*, *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera littoralis* και *Spodoptera litura*, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα δύσκολος ο έλεγχος τους (Sun et al., 2017). Λύση στο πρόβλημα αυτό φέρνει η τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων CRISPR/Cas9, η οποία παρέχει μια νέα, φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση, με σκοπό τον περιορισμό της καταστροφής που προξενούν επιβλαβή έντομα στις καλλιέργειες. Στα Λεπιδόπτερα η πρώτη επιτυχημένη απενεργοποίηση γονιδίου χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/Cas9 έγινε στον *B. mori* και ειδικότερα στο γονίδιο *BmBLOS2* (Wang et al., 2013). Επιπλέον βρέθηκε ότι ο υποκινητής U6 του *B. mori* μπορεί να οδηγήσει αποτελεσματικά το sgRNA, με σειρά νουκλεοτιδίων N20NGG, προκαλώντας μεταλλάξεις τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* (Zeng et al., 2016). Πολυάριθμες είναι πλέον μελέτες σχετικές με την εφαρμογή του CRISPR/Cas9 στα Λεπιδόπτερα, όπως για παράδειγμα στα έντομα *H. armigera*, *S. litura*, *Junonia coenia*, *Bicyclus anynana* και *Danaus plexippus* (Sun et al., 2017). Επιπλέον οι πεταλούδες των οικογενειών *Nymphalidae*, *Danaidae* και *Papilionidae* πλέον αποδεικνύονται ως πολύ καλά μοντέλα για τα Λεπιδόπτερα, στα οποία το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη σχηματισμού των φτερών τους, αλλά και της συμπεριφοράς τους (Sun et al., 2017).

Αντίστοιχες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλες τάξεις εντόμων, όπως για παράδειγμα στο *A. aegypti* όπου έγινε επεξεργασία πολλαπλών γονιδιακών τόπων (Dong et al., 2015), ενώ διαπιστώθηκε ότι το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να ενσωματώσει εξωγενείς γονιδιακές αλληλουχίες κουνουπιών με ακρίβεια, με το sgRNA να παίζει σημαντικό ρόλο στη διερεύνηση των γονιδιακών αλλαγών στο είδος αυτό (Kistler et al., 2015). Επιπλέον, στη μέλισσα *A. mellifera* το CRISPR/Cas9 έχει ανοίξει δρόμο στη γονιδιωματική επεξεργασία εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Hu et al., 2019; Kohno et al., 2016) και στη μελέτη της κοινωνικής της συμπεριφοράς (Kohno et al., 2016).

Όπως προκύπτει, το CRISPR/Cas9 μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά διαφορετικά είδη εντόμων, άρα αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο γονιδιακής επεξεργασίας στα έντομα, διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στην μελέτη των γονιδίων και των μεταβολικών

τους οδών (Cui et al., 2017). Ωστόσο, παρά τις πολλές αναφερόμενες επιτυχίες, εξακολουθεί να είναι μια καινούρια τεχνική στα έντομα, γι' αυτό είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη βασικές παράμετροι για την επιτυχή εφαρμογή της, αναφορικά με τη μορφή της Cas9 και του οδηγού sgRNA, τη μέθοδο μεταφοράς τους, αλλά και την επιλογή του γονιδίου-στόχου (Taning et al., 2017).

1.2.2.7 Προκλήσεις και περιορισμοί του CRISPR/Cas9

Πρόσφατες έρευνες και δοκιμασίες αναδεικνύουν το σύστημα CRISPR/Cas9, ως έναν χρήσιμο μηχανισμό στη γονιδιακή επεξεργασία φυτών και ζώων, αλλά και στη διερεύνηση πολλών γενετικών ασθενειών ανθρώπου. Ωστόσο, αρκετές είναι οι προκλήσεις και οι περιορισμοί που παρουσιάζονται και πρέπει να αντιμετωπιστούν, προκειμένου να εφαρμοστεί επιτυχώς αυτή η τεχνολογία στην πράξη. Μερικές από τις βασικές δυσκολίες της μεθόδου παρουσιάζονται ως εξής:

- Το πακετάρισμα των συστατικών του συστήματος CRISPR/Cas9 αποτελεί μια σημαντική πρόκληση, καθώς η χωρητικότητα των διάφορων φορέων είναι περιορισμένη. Σημειώνεται πως το μέγεθος του γονιδίου *SpCas9* είναι ~ 4,3 kbp, ενώ η αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη *SpCas9* έχει μέγεθος 160 kDa με υδροδυναμική διάμετρο ~ 7,5 nm. Επιπλέον το sgRNA έχει μέγεθος ~ 31 kDa και υδροδυναμική διάμετρο 5,5 nm (Mout et al., 2017).
- Η υποχρεωτική ύπαρξη της αλληλουχίας PAM δίπλα στην αλληλουχία-στόχο, αποτελεί έναν επιπλέον περιορισμό της τεχνολογίας του CRISPR/Cas9. Καθώς η ενδονουκλεάση *SpCas9* αναγνωρίζει μόνο την αλληλουχία PAM NGG, αυτό περιορίζει την αποτελεσματικότητά του CRISPR/Cas9 σε σύγκριση με τις νέες παραλλαγές CRISPR/Cas, οι οποίες μπορούν να αναγνωρίζουν μεγάλο εύρος αλληλουχιών PAM (Manghwar et al., 2019).
- Το CRISPR/Cas9 μπορεί να προκαλέσει πολλαπλές μεταλλαγές εξαιτίας μη-ειδικής επίδρασης (off-target effects) στο γονιδίωμα, καθώς τα συστατικά Cas9/sgRNA εκφράζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα, με το ενδεχόμενο να αλληλεπιδράσουν και με άλλα γονίδια (Sahel et al., 2019; Zhang et al., 2015). Σαν αποτέλεσμα μπορεί να προκληθούν απώλειες της λειτουργικότητας λειτουργικών γονιδίων, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, αλλά και άλλοι τύποι μεταλλαγών, όπως είναι η ενσωμάτωση αναντιστοιχιών DNA στην αλληλουχία PAM του sgRNA (Cong et al., 2013; Ghosh et al., 2019).

Οι προαναφερθείσες προκλήσεις αποτελούν μερικά από τα βασικά εμπόδια της επιτυχούς εφαρμογής της τεχνολογίας CRISPR/Cas9. Παρόλα αυτά, οι πρόσφατες έρευνες αναπτύσσουν και ακολουθούν νέες στρατηγικές, με στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του συστήματος αυτού στη γονιδιακή επεξεργασία.

1.3 ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ

1.3.1 Λεπιδόπτερο *Trichoplusia ni*

Το Λεπιδόπτερο *Trichoplusia ni* ανήκει στην οικογένεια *Noctuidae* και είναι ένα φυτοφάγο έντομο, με ένα μεγάλο εύρος φυτών-ξενιστών που περιλαμβάνουν πάνω από 160 είδη και 36 οικογένειες (Sutherland and Greene, 1984). Η γεωγραφική του κατανομή καλύπτει όλες τις ηπείρους, όπου καλλιεργούνται σταυρανθή φυτά, παρασιτώντας επίσης και σε άλλες καλλιέργειες, όπως τεύτλα, μπιζέλια, μαρούλι, ντομάτες, σέλινο κ.α. (Davidson and Lyon, 1987). Το *T. ni* αποτελεί ένα πολύ καλό μοντέλο λεπιδόπτερου εντόμου, για τη μελέτη της φυσιολογίας των εντόμων, της βιοχημείας τους, αλλά και μοριακής τους βιολογίας (Jones et al., 1996; Lundström et al., 2002; Simmons et al., 2013; Lam et al., 2013). Οι κυτταρικές σειρές TN-368 και High Five (Hi5) (γνωστές ως BTI-Tn-5B1-4) που δημιουργήθηκαν από το *T. ni* (Granados et al., 1994; Hink, 1970) θεωρούνται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές εντόμων για πειράματα μόλυνσεων με ιούς, αλλά και για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Chen et al., 2019). Επιπλέον το Λεπιδόπτερο *T. ni* χρησιμοποιείται και σε πολλές έρευνες για την διερεύνηση των επιπτώσεων από τη δράση μολυσματικών ουσιών στα γεωργικά οικοσυστήματα, αλλά και για την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών-ξενιστών, εντόμων και μικροοργανισμών (Pennington et al., 2017; Haney et al., 2018). Ωστόσο, ο έλεγχος του *T. ni* γίνεται ολοένα και πιο δύσκολος, λόγω της αυξανόμενης ανθεκτικότητάς του στα φυτοφάρμακα (Liu et al., 2002), καθώς επίσης εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο βιολογικό εντομοκτόνο *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Wang et al., 2007). Οι γεωργικές και οικονομικές επιπτώσεις που προκαλούνται δημιουργούν την ανάγκη της ανάπτυξης βιοτεχνολογικών εργαλείων ικανών να διαχειριστούν το έντομο αυτό.

1.3.1.1 Κύκλος ζωής

Το *T. ni* έχει κιτρινοπράσινο έως πράσινο χρώμα και ο χρόνος ανάπτυξης του από αυγό σε ενήλικο έντομο απαιτεί 18 έως 25 ημέρες, όταν τα έντομα διατηρούνται στους 32 έως 21 °C, αντίστοιχα (Toba et al. 1973). Υπό ευνοϊκές συνθήκες λοιπόν, είναι δυνατή η επιτυχή ολοκλήρωση τουλάχιστον μίας γενιάς ανά μήνα. Το έντομο, παρόλο που είναι ικανό να περνά πολύ χρόνο ως νύμφη στο κουκούλι, δεν ανέχεται παρατεταμένο κρύο. Το κατώτερο όριο ανάπτυξης σημειώνεται περίπου μεταξύ 10-12 °C, ενώ οι 40 °C είναι θανατηφόροι για ορισμένα αναπτυξιακά στάδια (Capinera, 2002).

Τα αυγά του *T. ni* έχουν κιτρινωπό λευκό ή πρασινωπό χρώμα και ένα σχήμα ημισφαιρικό, με την επίπεδη πλευρά να είναι κολλημένη στο φύλλωμα. Η εκκόλαψη πραγματοποιείται σε διάστημα 2-5 ημερών ανάλογα με τη θερμοκρασία (σε χαμηλές θερμοκρασίες απαιτείται περισσότερος χρόνος) (Jackson et al. 1969). Οι νεαρές προνύμφες αρχικά έχουν σκούρο λευκό χρώμα, αλλά αυτό γίνεται ανοιχτό πράσινο, καθώς αρχίζουν να τρέφονται με το φύλλωμα (**Εικόνα 1.6**). Παρατηρούνται επίσης τρίχες, των οποίων ο αριθμός μειώνεται γρήγορα καθώς ωριμάζουν. Οι ώριμες προνύμφες φτάνουν σε μήκος τα 3-4 cm και αναπτύσσονται για 17-21 μέρες ανάλογα με τη θερμοκρασία και τη διαθέσιμη τροφή (Shorey et al. 1962). Στη συνέχεια, οι ώριμες προνύμφες μεταμορφώνονται σε νύμφες σχηματίζοντας ένα λευκό, λεπτό, εύθραυστο κουκούλι. Η νύμφη, που περιέχεται μέσα σε αυτό είναι αρχικά πράσινη, αλλά σύντομα γίνεται καφέ ή μαύρη και έχει μήκος περίπου 2 cm. Η διάρκεια αυτού του σταδίου διαρκεί περίπου 4-6 ημέρες σε θερμοκρασίες από 32-27 °C, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να διαρκέσει περισσότερο (Capinera, 2002). Τέλος στο στάδιο του ενήλικου εντόμου (**Εικόνα 1.6**), που διαρκεί κατά μέσο όρο 10-12 ημέρες, παράγονται 300-600 αυγά από θηλυκά έντομα (Shorey 1963).



Εικόνα 1.6. Νεαρή προνύμφη (αριστερά) και ενήλικο Λεπιδόπτερο (δεξιά) *Trichoplusia ni*. Φωτογραφία του John L. Capinera, University of Florida.

1.3.2 Λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda*

Το Λεπιδόπτερο *Spodoptera frugiperda* εκπροσωπεί την οικογένεια *Noctuidae* και αποτελεί ένα από τα βασικά επιβλαβή έντομα της Βόρειας και Νότιας Αμερικής (Ashley et al., 1989). Πρόσφατα, το έντομο αυτό εξαπλώθηκε και στην Αφρική (Goergen et al. 2016), προκαλώντας μεγάλες γεωργικές και οικονομικές ζημιές. Είναι ένα πολυφάγο είδος, που παρασιτεί κυρίως σε καλλιέργειες αραβόσιτου (Batista Pereira et al., 2002), αλλά και σε καλλιέργειες φυτών όπως βαμβάκι (De Jesus et al., 2014), ρύζι, κεχρί, σόργο (Grützmacher et al., 2004), σόγια (Boiça Júnior et al., 2015) κ.ά. Οι ζημιές που προκαλεί έχουν οδηγήσει σε μεγάλες γεωργικές απώλειες χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, με παράδειγμα την Αργεντινή και Ονδούρα, όπου οι απώλειες φτάνουν το 70% και 40%, αντίστοιχα (Murúa et al., 2006; Wyckhuys and O'Neil, 2006), αλλά και σε χώρες της Αφρικής, όπως η Ζάμπια και η Κένυα με απώλειες 67% και 47% αντίστοιχα (Day et al., 2017; Kumela et al., 2019). Ο έλεγχος αυτού του επιβλαβούς εντόμου βασίστηκε κυρίως σε συνθετικά εντομοκτόνα, τα οποία με την πάροδο του χρόνου οδήγησαν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε διάφορες χημικές τάξεις (Carvalho et al., 2013; Nascimento et al., 2016; Okuma et al., 2018; Bolzan et al., 2019). Στη Βραζιλία προς το παρόν, η μόνη στρατηγική για τον έλεγχο του *S. frugiperda* περιλαμβάνει τη χρήση γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών που παράγουν τοξίνες του *B. thuringiensis* (Bt) (Bernardi et al., 2015). Με στόχο τη μείωση της χρήσης χημικών εντομοκτόνων, μελετώνται εναλλακτικές τεχνικές, ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος του εντόμου αυτού.

1.3.2.1 Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής του *S. frugiperda* διαφέρει ανάλογα με την εποχή του χρόνου. Όπως παρατηρείται, κατά το διάστημα του καλοκαιριού ο κύκλος ζωής του ολοκληρώνεται σε περίπου 30 ημέρες, την άνοιξη και το φθινόπωρο σε 60 ημέρες, ενώ φτάνει έως και 80 με 90 ημέρες κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Capinera, 2002).

Τα αυγά έχουν σχήμα θόλου, με βάση επίπεδη και κορυφή στρογγυλεμένη. Ο αριθμός αυγών ποικίλλει σημαντικά και η συνολική παραγωγή τους κατά μέσο όρο φτάνει περίπου τα 1500 ανά θηλυκό άτομο. Η διάρκεια του σταδίου του αυγού διαρκεί από 2 έως 3 ημέρες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Το στάδιο της προνύμφης που ακολουθεί, διαχωρίζεται συνήθως σε έξι φάσεις, με το μήκος τους να φτάνει τα 1,7, 3,5, 6,4, 10,0, 17,2 και 34,2 mm σε κάθε φάση, αντίστοιχα. Οι νεαρές προνύμφες παρουσιάζουν έναν πρασινωπό χρωματισμό με μαύρο κεφάλι, το οποίο γίνεται πορτοκαλί στη δεύτερη φάση. Προς το

τέλος της δεύτερης φάσης και ιδιαίτερα την τρίτη φάση, η ραχιαία επιφάνεια του σώματος παίρνει καφέ χρωματισμό και αρχίζουν να σχηματίζονται πλευρικές λευκές γραμμές. Στην τέταρτη έως την έκτη φάση το κεφάλι είναι κοκκινωπό καφέ (**Εικόνα 1.7**). Το σώμα τους έχουν εμφανίζει επίσης ένα συνήθως σκούρο χρώμα και φέρει αγκάθια. Η διάρκεια των φάσεων της προνύμφης φτάνει περίπου τις 14 ημέρες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και τις 30 ημέρες κατά τη διάρκεια δροσερού καιρού (Pitre and Hogg 1983). Ο σχηματισμός του κουκουλιού, που ακολουθεί, πραγματοποιείται συνήθως στο έδαφος, σε βάθος από 2 έως 8 cm. Το κουκούλι έχει σχήμα οβάλ και μήκος 20-30 mm. Η νύμφη έχει κοκκινωπό καφέ χρώμα, μήκος 14-18 mm και πλάτος περίπου 4,5 mm. Η διάρκεια του σταδίου αυτού είναι περίπου 8-9 ημέρες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, αλλά φτάνει τις 20 έως 30 ημέρες κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Τα ενήλικα έντομα είναι νυκτόβιοι οργανισμοί, που είναι πιο δραστήριοι κατά τη διάρκεια ζεστών και υγρών βραδιών. Η διάρκεια της ζωής ενός ενήλικου εντόμου *S. frugiperda* εκτιμάται περίπου στις 7 με 21 ημέρες (Carinera, 2002).



Εικόνα 1.7. Ωριμη προνύμφη (αριστερά) και ενήλικο αρσενικό Λεπιδόπτερο (δεξιά) *Spodoptera frugiperda*. Φωτογραφίες από τους James Castner και Lyle J. Buss, University of Florida.

1.4 ΜΠΑΚΟΥΛΟΪΟΙ

1.4.1 Γενικά

Οι μπακουλοΐοι (*Baculoviridae*) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ιών που διαθέτουν ως γονιδίωμα ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA, μήκους 80-180 kbp, το οποίο είναι πακεταρισμένο σε καψίδιο ραβδοειδούς σχήματος (Liang et al., 2013; Huang et al., 2017). Ο κύκλος ζωής τους παρουσιάζεται φαινοτυπικά με δύο μορφές και συγκεκριμένα, τους έγκλειστους ιούς ODVs (occlusion-derived viruses) και τους εκβλαστημένους ιούς BVs

(budded viruses) (Zhao et al., 2019). Αποτελούν αποκλειστικά παθογόνα εντόμων (Qin et al., 2018) και μολύνουν κυρίως έντομα, όπως τα Λεπιδόπτερα, τα Δίπτερα και τα Υμενόπτερα (Kong et al., 2018). Η οικογένεια των μπακουλοϊών υποδιαιρείται σε τέσσερα γένη με βάση τα φυλογενετικά και μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Οι μπακουλοϊοί, που μολύνουν τα λεπιδόπτερα έντομα ανήκουν στα γένη *Alphabaculovirus* και *Betabaculovirus*, ενώ αυτοί που μολύνουν τα υμενόπτερα και δίπτερα έντομα, ανήκουν στα γένη *Gammabaculovirus* και *Deltabaculovirus* (Jehle et al., 2006).

Το πρώτο γονιδίωμα μπακουλοϊού, που αλληλουχήθηκε ήταν αυτό του ιού *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) το 1994 (Ayres et al., 1994). Οι αρχικές μελέτες πάνω στον ιό AcMNPV είχαν ως στόχο την ανάπτυξη ιογενών φυτοφαρμάκων και την κατασκευή φορέων έκφρασης με βάση τον μπακουλοϊό (Wood and Granados, 1991). Πλέον, ο ιός AcMNPV θεωρείται από τους καλύτερα μελετημένους μπακουλοϊούς (Herniou et al., 2011) και έχει λάβει αναμφισβήτητη την περισσότερη προσοχή από οποιονδήποτε άλλο ιό εντόμων (Volkman, 2015). Ωστόσο, παραμένουν ακόμα μεγάλα κενά στην κατανόηση πολλών μοριακών στρατηγικών που χρησιμοποιεί τόσο ο ιός AcMNPV, αλλά και οι υπόλοιποι μπακουλοϊοί (Volkman, 2015). Όπως αναφέρεται πάντως, η μόλυνση με τον ιό AcMNPV έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τόσο την ανάπτυξη των εντόμων, όσο και τη συμπεριφορά τους. Για παράδειγμα, το γονίδιο *ptp* του AcMNPV βρέθηκε πως συνδέεται με την έντονη, ενισχυμένη κινητικότητα του *Spodoptera exigua* (Van Houte et al., 2012).

1.4.2 Μολύνσεις κυτταρικών σειρών με τον μπακουλοϊό AcMNPV

Ο πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός *A. californica* ή AcMNPV ανήκει στο γένος *Alphabaculovirus* της οικογένειας *Baculoviridae* (Herniou et al., 2011), με γονιδίωμα μήκους 133,9 kbp και περίπου 156 προβλεπόμενα γονίδια (ORFs) (Ayres et al., 1994). Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για έναν DNA ιό, ένας μεγάλος αριθμός ικών siRNA (vsiRNAs) εντοπίζεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης κυτταρικής σειράς Sf9 του *S. frugiperda* με τον ιό AcMNPV (Mehrabi et al., 2015).

Ο ιός AcMNPV έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών σε σύγκριση με τους περισσότερους μπακουλοϊούς και πλέον αποτελεί σημαντικό παράγοντα βιοελέγχου ορισμένων επιβλαβών λεπιδόπτερων εντόμων (Erlandson, 2008; Haase et al., 2015). Ωστόσο, υπολογίζεται πως από τις περίπου 400 διαθέσιμες κυτταρικές σειρές εντόμων, μόνο μερικές υποστηρίζουν την ανάπτυξη του ιού AcMNPV και αυτές προέρχονται από τους

οργανισμούς *S. frugiperda* και *T. ni* (Szewczyk et al., 2006). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά είναι η Sf9 (Vaughn et al., 1977), ωστόσο επί του παρόντος, η κυτταρική σειρά BTI-Tn5B1-4 (γνωστή και ως κύτταρα Hi5), που προέρχεται από το *T. ni*, χρησιμοποιείται επίσης σε μεγάλο βαθμό σε δοκιμασίες ανάπτυξης του ιού (Granados et al., 1994).

Ο μπακουλοϊός AcMNPV έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει το έντομο-ξενιστή σε πολλά επίπεδα, όπως είναι ο κυτταρικός κύκλος, η επαγωγή και η αναστολή της απόπτωσης, αλλά και η ανάπτυξη του, η συμπεριφορά του κ.ά. Όσον αφορά τον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων-ξενιστών, έχει αποδειχθεί πως οι μπακουλοϊοί μπορούν να τον μπλοκάρουν, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους (Kong et al., 2018). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *ie2* του AcMNPV, έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη διαίρεση των κυττάρων-ξενιστών (Prikhod'ko and Miller, 1998). Στα κύτταρα Sf21 του *S. frugiperda*, το γονίδιο *ie2* εμποδίζει την διαδικασία της μίτωσης, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παραμένουν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την αντιγραφή του DNA. Ακόμη ο ιός AcMNPV μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στα κύτταρα Sf9 (Ikeda and Kobayashi, 1999). Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η οποία προκαλείται εξαιτίας της μόλυνσης από τον ιό AcMNPV, εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου κατά την οποία μολύνεται το κύτταρο. Τα κύτταρα, τα οποία μολύνθηκαν με AcMNPV κατά τη φάση G1 ή S θα παραμείνουν στη φάση S, ενώ τα κύτταρα Sf9 που έχουν μολυνθεί με AcMNPV κατά τη φάση G2/M δεν υφίστανται φυσιολογική μίωση (Ikeda and Kobayashi, 1999).

Σε μια πρόιμη λοίμωξη, τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα μπορούν να οδηγηθούν και σε επαγωγή της απόπτωσης, η οποία αποτελεί έναν μηχανισμό αντιϊκής προστασίας, που έχει σκοπό την αναστολή της αντιγραφής και της διάδοσης του ιού στα υπόλοιπα κύτταρα (Ikeda et al., 2013). Η πρώτη αναφορά απόπτωσης κυττάρων με τη χρήση ενός μεταλλαγμένου ιού AcMNPV, που περιείχε ένα ελαττωματικό γονίδιο *p35*, αναφέρθηκε στα κύτταρα Sf9 (Clem et al., 1991). Ωστόσο, οι μπακουλοϊοί κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους απέκτησαν και γονίδια, που καταστέλλουν την απόπτωση, με αποτέλεσμα την προσαρμογή τους στο περιβάλλον, αλλά και την αναπαραγωγή τους (Kong et al., 2018). Με τον τρόπο αυτό, τα ιϊκά σωματίδια μπορούν να συνεχίσουν να αναπαράγονται στα αποπτωτικά κύτταρα.

ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα επιβλαβή έντομα της τάξης των Λεπιδοπτέρων προκαλούν μεγάλες γεωργικές και οικονομικές ζημιές παγκοσμίως. Η καταπολέμηση αυτών των επιβλαβών εντόμων με χρήση χημικών εντομοκτόνων δεν φέρει πλέον τα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα έντομα, ενώ αποτελεί ένα μεγάλο κίνδυνο τόσο για το περιβάλλον, όσο και για τον άνθρωπο. Η αξιοποίηση των σύγχρονων εργαλείων της Μοριακής Βιολογίας μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη στρατηγικών και μεθόδων πιο φιλικών προς το περιβάλλον, αλλά και να δώσει τις απαραίτητες λύσεις για τον αποτελεσματικό έλεγχο των επιβλαβών εντόμων.

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία επικεντρώνεται στη χρήση και τη μελέτη της αποτελεσματικότητας των μοριακών τεχνικών RNAi και CRISPR/Cas9, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αυξημένη παραγωγή ειδικά σχεδιασμένων δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA), προκειμένου αυτά τα dsRNA να προσλαμβάνονται από επιβλαβή έντομα με στόχο την αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων σε αυτά μέσω του μηχανισμού RNAi. Ειδικότερα, η αυξημένη παραγωγή των dsRNA θα είναι εφικτή μέσω παρεμπόδισης/απενεργοποίησης της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο Dicer-2, που αποτελεί βασικό συστατικό του μηχανισμού RNAi, καθώς επεξεργάζεται τα dsRNA σε μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA). Εδώ, στα πλαίσια της αποσιώπησης/απενεργοποίησης του γονιδίου *dicer-2* μέσω των τεχνικών RNAi και CRISPR/Cas9 χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τα Λεπιδόπτερα *Spodoptera frugiperda* (Sf21) και *Trichoplusia ni* (Hi5).

Η μελέτη αυτή εξετάζει τις παραμέτρους, που σχετίζονται με την αποδοτικότητα των μεθόδων RNAi και CRISPR/Cas9 στην αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*, τους τρόπους μεταφοράς των σχεδιασμένων αλληλουχιών για τη δημιουργία μετασηματισμένων κυτταρικών σειρών, την επίδραση της αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα σε επίπεδο γονιδιώματος και μεταγραφώματος, αλλά και την απόκριση κυτταρικών σειρών ελαττωματικών ως προς την έκφραση του γονιδίου *dicer-2* σε ιούς που υπερπαραγωγή dsRNA. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φιλοδοξούν να προσφέρουν νέα δεδομένα που προκύπτουν μέσω της πειραματικής παρατήρησης, ώστε αυτά να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικές δοκιμές, προκειμένου να ελεγχθούν επιτυχώς επιβλαβή έντομα με τη βοήθεια των μεθόδων RNAi και CRISPR/Cas9.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Βιολογικά υλικά

2.1.1.1 Κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων

Οι κυτταρικές σειρές, που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των *in vitro* πειραμάτων, στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας είναι οι παρακάτω:

- BTI-Tn-5B1-4 ή αλλιώς High Five (**Hi5**), η οποία προέρχεται από τα ωθηκικά κύτταρα του Λεπιδόπτερου *Trichoplusia ni* (Granados et al., 1986; 1994), και
- IPLB-SF21 (**Sf21**), προερχόμενη από τις μη-ώριμες ωθήκες του Λεπιδόπτερου *Spodoptera frugiperda* (Murhammer, 2007).

Τα κύτταρα των δύο κυτταρικών σειρών διατηρούνταν μέσα σε φλάσκες των 25 cm², τοποθετημένες σε θάλαμο επώασης στους 28 °C, ενώ ανακαλλιεργούνταν εβδομαδιαίως. Το θρεπτικό υλικό, στο οποίο αναπτύσσονταν τα κύτταρα ήταν το IPL-41, που αποτελεί μίγμα ανοργάνων αλάτων, αμινοξέων, βιταμινών, σακχάρων και άλλων θρεπτικών συστατικών (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.1.1.2 Βακτηριακό στέλεχος

Για την παραγωγή πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος DH5aTM του βακτηρίου *Escherichia coli*. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται ευρέως ως φορέας κλωνοποίησης φέροντας πολλαπλές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να προσφέρουν υψηλής απόδοσης μετασχηματισμούς, αυξημένη γενετική σταθερότητα και μειωμένη δραστικότητα νουκλεάσης (Taylor et al., 1993). Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις είναι: η *lacZ* Delta M15 μετάλλαξη, η οποία επιτρέπει τον μπλε-λευκό εντοπισμό των ανασυνδυασμένων κυττάρων, η μετάλλαξη *endA1*, που απενεργοποιεί την ενδοκυτταρική ενδονουκλεάση και εξασφαλίζει υψηλότερους ρυθμούς μεταφοράς του πλασμιδίου και η μετάλλαξη *recA1*, χάρις στην οποία μειώνεται ο ομόλογος ανασυνδυασμός, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πιο σταθερού ενθέματος (Monk et al., 2016).

2.1.1.3 Πλασμίδια

Οι πλασμιακοί φορείς, που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των εργαστηριακών πειραμάτων είναι οι εξής:

- pEA, ο οποίος είναι κατάλληλος για την ενισχυμένη έκφραση γονιδίων σε κυτταρικές σειρές εντόμων και
- pCas9, που κωδικοποιεί την SpCas9 ενδονουκλεάση και χρησιμοποιείται στην μέθοδο CRISPR/Cas9.

2.1.1.4 Bacmid

Τα Bacmids είναι φορείς έκφρασης μπακουλοϊού, με δυνατότητα γρήγορης αναπαραγωγής σε κυτταρικές καλλιέργειες και παραμονής τους στα έντομα. (Pijlman et al., 2001). Στα πειράματα, που πραγματοποιήθηκε η μόλυνση των κυτταρικών σειρών Hi5 και Sf21 με μπακουλοϊό, για την παραγωγή του ιού σε προγενέστερο στάδιο είχε χρησιμοποιηθεί το AcMNPV Bacmid, όπου είναι κλωνοποιημένο τόσο το ORF της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP ώστε να την εκφράζει, όσο και κατάλληλη γονιδιακή κατασκευή ώστε να παράγει φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης (dsLuc).

2.1.2 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα

- **Αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Cracking buffer):** 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% SDS και 4 M ουρία.
- **Διαλύματα αλκαλικής λύσης βακτηρίων (Mini-prep, Midi-prep):**
 - **Διάλυμα I:** 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) και 10 mM EDTA
 - **Διάλυμα I (G.E.T.):** 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) και 10 mM EDTA
 - **Διάλυμα II:** 1% SDS και 0,2 N NaOH
 - **Διάλυμα III:** 3 M KAc (pH 4.8) και 11,5% CH₃COOH
- **Διάλυμα πρωτεΐνης γάλακτος 10% (Blocking buffer):** 10% γάλα σε σκόνη (NFM, non-fat milk) σε 1x PBS-Tween 20.

- **Διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI, phenol/chloroform/isoamyl alcohol):** φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:25:1.
- **Θρεπτικό υλικό IPL-41 + 10% FBS:** Σε 800 mL ddH₂O προστίθενται 25,63 g σκόνης IPL-41 (Genaxxon 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 LB (Luria-Bertani):** Σε 1 lt ddH₂O προστίθενται 10 g τρυπτόνης, 5 g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) και 5 g NaCl (pH 7,0).
- **Πηκτή διαχωρισμού (Separating gel) 10%:** 3,3 mL 30% ακρυλαμίδης/δισ-ακρυλαμίδης, 4,1 mL ddH₂O, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 100 μL 10% SDS, 50 μL 10% APS και 10 μL TEMED.
- **Πηκτή συμπύκνωσης (Stacking gel):** 670 μL 30% ακρυλαμίδης/δισ-ακρυλαμίδης, 2,2 mL ddH₂O, 1 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 40 μL 10% SDS, 40 μL 10% APS και 4 μL TEMED.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα αποφωσφορυλίωσης 1x:** 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) και 0,1 mM EDTA.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής (RT Buffer) 5x:** 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ και 10 mM DTT.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Laemmli running buffer) 10x:** 250 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 1% SDS (pH 8,3).
- **Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) 1x:** 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,1% SDS και 20% μεθανόλη.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης Taq 10x:** Περιέχει KCl και (NH₄)₂SO₄, καθώς και 20 mM MgCl₂.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λγάσης 10x:** 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT και 5 mM ATP (pH 7,8 στους 25°C).

- **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.
- **PBS-T (PBS-Tween 20):** 0,1% Tween 20 σε 1x PBS.
- **Sample buffer 1x:** 62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% γλυκερόλη, 0.002% μπλε της βρωμοφαινόλης.
- **TAE 10x:** 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0) και 40 mM CH₃COOH.
- **Urea lysis buffer:** 7 M ουρία, 2% SDS, 135 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5) και 1 mM EDTA.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Γενικές Μέθοδοι

2.2.1.1 Απομόνωση DNA

- Σε δείγματα από κύτταρα Sf21/Hi5 που συλλέγονται προστίθενται 700 μ L Urea lysis buffer και ακολουθεί ήπια ανάμιξη με προσοχή ώστε να μην προκληθεί φθορά στο DNA.
- Προστίθενται 500 μ L από το διάλυμα PCI, ακολουθεί έντονη μηχανική ανάδευση για 30'' και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 5'.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα για μία φορά.
- Η υδάτινη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και σε αυτήν προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και NaCl 0,2 M. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm στους 4 °C για 15'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 500 μ L διαλύματος αιθανόλης 75%.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 5'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει.
- Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH₂O.

2.2.1.2 Απομόνωση ολικού RNA

- Σε δείγμα από κύτταρα Sf21/Hi5, που συλλέγονται γίνεται προσθήκη 0,5 ml NucleoZOL.
- Προστίθενται 200 μ L ddH₂O στο προϊόν λύσης. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση του δείγματος για 15'' δευτερόλεπτα και στην συνέχεια επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15'.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 15' στα 9.500 rpm, στους 4 °C.
- Μεταφέρεται το 75% του συνολικού όγκου του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.
- Προστίθενται ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 10'.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 10' στα 9.500 rpm, στους 4 °C.

- Προστίθενται 400 μL αιθανόλης 75% για erpendorf συνολικού όγκου 1,5 mL.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 3' στα 8.000 rpm, στους 4 °C. Στην συνέχεια γίνεται η αφαίρεση της αιθανόλης και επαναλαμβάνεται το βήμα της πλύσης με αιθανόλη. Δεν στεγνώνουμε το ίζημα RNA μεταξύ των σταδίων πλύσης. Η ξήρανση του ιζήματος RNA μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαλυτότητας του.
- Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH₂O.

2.2.1.3 Αντίστροφη μεταγραφή RNA

Η διαδικασία σύνθεσης μονόκλωνου DNA μέσω μεταγραφής ενός εκμαγείου RNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και επιτελείται με τη βοήθεια μιας εξειδικευμένης DNA πολυμεράσης, της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το ένζυμο αυτό συναντάται στη φύση σε RNA-ιούς ή ρετροϊούς. Τα μόρια DNA που δημιουργούνται ονομάζονται cDNA (complementary ή copy DNA).

Η χρήση της μεθόδου της αντίστροφης μεταγραφής στην παρούσα μελέτη έγινε με σκοπό τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε επιλεγμένου γονιδίου. Η ποσότητα του ολικού RNA που χρησιμοποιείται ισούται με 1 μg , ενώ η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής (MINOTECH RT):

- Ετοιμάζεται μίγμα A', αποτελούμενο από το δείγμα RNA (1 μg), oligo[dT] (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) και dNTPs (10 mM).
- Το μίγμα θερμαίνεται στους 65 °C για 5'.
- Ακολουθεί επώαση του μίγματος στον πάγο για τουλάχιστον 1'.
- Κατόπιν σύντομης φυγοκέντρωσης, στο μίγμα A' προστίθεται το μίγμα B', το οποίο αποτελείται από 5x Minotech RT Buffer, διθειοθρεϊτόλη (DTT, 0,1 M), αναστολέα RNAsών (40 U/ μL) και αντίστροφη μεταγραφάση (200 U/ μL).
- Το νέο μίγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται στους 42 °C για 1h.
- Ακολουθεί θέρμανση στους 70 °C για 15', βήμα κατά το οποίο απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση.
- Τέλος, τα συνθετιμένα cDNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα στην αντίδραση της PCR, με σκοπό την τελική ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου που μελετάται.

2.2.1.4 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-30 βάσεων σχεδιασμένα, έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικά προς ένα συγκεκριμένο τμήμα του εκμαγείου DNA, που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί μέσω της αντίδρασης PCR (Παπανικολάου et al., 2015). Η υβριδοποίηση τους με την αλληλουχία-στόχο και η επιμήκυνση τους από την DNA πολυμεράση οδηγούν στην ενισχυμένη παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων της PCR.

Τα βασικά βήματα σχεδιασμού εκκινητών, για τη χρήση τους στη συνέχεια σε περαιτέρω πειράματα εξαρτώνται από τις παρακάτω παραμέτρους:

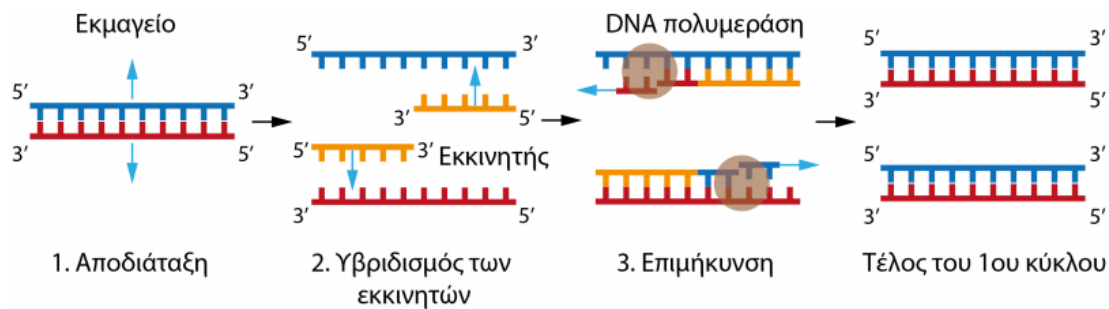
- 1. Μέγεθος εκκινητών:** αποφυγή μικρών αλληλουχιών για μη ειδικό υβριδισμό και μεγάλων για τη δημιουργία δευτερογενών δομών.
- 2. Αλληλουχία εκκινητών:** επιθυμητή η απόλυτη συμπληρωματικότητα των εκκινητών με τις αλληλουχίες στόχο και αποφυγή συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών (primer dimers).
- 3. Θερμοκρασία αποδιάταξης εκκινητών (T_m):** θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και το ποσοστό των βάσεων κυτοσίνη (C) και γουανίνη (G), που περιέχονται στην αλληλουχία.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Άνοιγμα του προγράμματος Primer3Plus και επικόλληση στο κενό της καρτέλας „Main” της αλληλουχίας του γονιδίου προς ενίσχυση.
- Άνοιγμα της καρτέλας „General Settings” και ορισμός στο κενό „Product size ranges” το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος (π.χ. 300-500 προκειμένου το τελικό προϊόν να έχει μέγεθος 300-500 bp).
- Ορισμός ελάχιστου T_m από 57- 63 °C και επιλογή του ποσοστού GC% από 40-60%.
- Τέλος, με την επιλογή „Pick primers” εμφανίζονται στην σελίδα μας εκκινητές (πρόσθιας και αντίθετης κατεύθυνσης), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτέλεση των πειραμάτων.

2.2.1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ή PCR (polymerase chain reaction) αποτελεί μία δυναμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA μέσω της δράσης μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση ξεκινά με την αρχική αποδιάταξη (denaturation) του εκμαγείου DNA μέσω θέρμανσης, ώστε να ακολουθήσει στην συνέχεια η υβριδοποίηση (annealing) των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών με τις αντίστοιχες ακολουθίες-στόχους στο εκμαγείο DNA. Τέλος πραγματοποιείται η επιμήκυνση (extension) των υβριδοποιημένων εκκινητών μέσω της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, η οποία εισάγει τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια ακολουθώντας τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Τα τρία αυτά βήματα της αποδιάταξης-υβριδοποίησης-επιμήκυνσης επαναλαμβάνονται για 25 έως 40 φορές, έχοντας ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της ποσότητας του DNA (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Στάδια της αντίδρασης PCR (Παπανικολάου et al. 2015).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR προετοιμάζεται μίγμα για ποσότητα του DNA από 1 ng έως 1 μg. Το μίγμα αποτελείται από:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης 5x ή 10x:** διατηρεί το pH και την συγκέντρωση των αλάτων για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.
- **MgCl₂ (25 mM):** βοηθάει στον σχηματισμό διαλυτών συμπλόκων με το εκμαγείο DNA, τους εκκινητές και τα dNTPs.
- **Μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων ή dNTPs (10 mM):** νουκλεοτίδια, που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νέας αλυσίδας.
- **Ένα ζεύγος εκκινητών (10 μM):** είναι ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά ως προς το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας του μορίου DNA, τα οποία ορίζουν την περιοχή της αλυσίδας του DNA, που θα πολλαπλασιαστεί.

- **Taq DNA πολυμεράση** (5 U): θερμοανθεκτικό ένζυμο απομονωμένο από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και υπεύθυνο για την αντιγραφή του DNA.
- **Αποστειρωμένο ddH₂O**

Οι γενικές συνθήκες, που χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό του προγράμματος, κατά το οποίο υποβάλλεται μια αντίδραση PCR είναι:

1^ο Στάδιο: αρχική αποδιάταξη στους 94-95 °C για 1-3' (1 κύκλος),

2^ο Στάδιο: αποδιάταξη στους 94-95 °C για 30-45", υβριδοποίηση στους 45-65 °C για 30-60" και επιμήκυνση στους 72 °C για 30-60"/kb (25-40 κύκλοι),

3^ο Στάδιο: τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5-15' (1 κύκλος) και, προαιρετικά, διατήρηση στους 4 °C.

Με το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους, ώστε να ελεγχθεί ποιοτικά η απόδοση της σχεδιασμένης αντίδρασης.

2.2.1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ή qRT-PCR (quantitative real time PCR) είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης της έκφρασης των γονιδίων με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Εκτελείται από ειδικές συσκευές (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένες από ένα σύστημα φίλτρων και κάτοπτρων, που αναλύουν τον φθορισμό που εκπέμπεται μέσω φθορίζουσών χρωστικών που ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR (Παπανικολάου et al. 2015).

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιείται το σύστημα Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, USA) με χρήση του προγράμματος MxPro™ QPCR Software (Agilent Technologies, USA). Το σύστημα αυτό αναλύει το φθορισμό που παράγεται από τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, η οποία υπάρχει στο ενζυμικό μίγμα της αντίδρασης που σχεδιάζεται, επιτρέποντας την παρακολούθηση του παραγόμενου προϊόντος, σε πραγματικό χρόνο της συνολικής αντίδρασης.

Βασικός στόχος στα περισσότερα πειράματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο αποτελεί η σχετική ποσοτικοποίηση. Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στη σύγκριση της έκφρασης ενός γονιδίου-στόχου σε σχέση με ένα γονίδιο αναφοράς και της έκφρασης του ίδιου γονιδίου στο δείγμα-στόχο σε σχέση με

τα δείγματα αναφοράς (Yuan et al., 2006). Ένα μαθηματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η μέθοδος $\Delta\Delta C_t$. Η σημαντικότερη παράμετρος της μεθόδου για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή C_t , η οποία προσδιορίζει τον κύκλο, κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το κατώφλι της ανίχνευσης (threshold). Η αναλογία της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του γονιδίου-στόχου και γονιδίου αναφοράς υπολογίζεται από τον τύπο: $R = 2^{-\Delta C_t}$, όπου το ΔC_t προκύπτει αφαιρώντας τον αριθμό C_t του γονιδίου στόχου από αυτόν του γονιδίου αναφοράς. Παρατηρείται μικρότερη τιμή της C_t σε δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου-στόχου σε σύγκριση με δείγματα που περιέχουν λιγότερα αντίγραφα. Αυτό συμβαίνει, καθώς στα δείγματα με πολλά μόρια DNA χρειάζονται λίγοι κύκλοι πολλαπλασιασμού, για να παραχθεί ικανός αριθμός αντιγράφων που θα ξεπεράσουν το κατώφλι ανίχνευσης. Τέλος, για την επιβεβαίωση σχηματισμού ενός μοναδικού προϊόντος και όχι διμερών εκκινητών ή άλλων παραπροϊόντων, είναι ανάγκη της ανάλυσης της καμπύλης τήξης των προϊόντων της qRT-PCR, αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου ή qRT-PCR προετοιμάζεται μίγμα με συγκέντρωση του cDNA (περίπου 0,33 $\mu\text{g/mL}$). Το μίγμα αποτελείται επίσης από:

- **Ειδικούς εκκινητές (5 μM):** ειδικοί για το προς μελέτη γονίδιο.
- **KAPA SYBR® FAST qPCR MasterMix (8 μL , Kapa Biosystems, USA):** περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, MgCl_2 σε τελική συγκέντρωση 2.5 mM, την Taq DNA πολυμεράση KAPA SYBR FAST, dNTPs και τη χρωστική SYBR Green I.
- **Χρωστική Rox (0.04 μL , από το φιαλίδιο υψηλής συγκέντρωσης):** κόκκινη χρωστική, που χρησιμοποιείται ως χρωστική αναφοράς.
- **Αποστειρωμένο ddH₂O**

Αφού πραγματοποιηθεί η προσθήκη του μίγματος qRT-PCR, και των ανάλογων εκκινητών, που αντιστοιχούν στα γονίδια, στις σωστές θέσεις, τα δείγματα σκεπάζονται με αλουμινόχαρτο, καθώς το μείγμα SYBR είναι φωτοευαίσθητο και μεταφέρονται τέλος στην συσκευή αντίδρασης qRT-PCR. Επισημαίνεται, πως όλες οι εργασίες προετοιμασίας της αντίδρασης πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής με σκοπό την αποφυγή επιμόλυνσής της από ξένο γενετικό υλικό.

Οι γενικές συνθήκες, κατά τις οποίες υποβάλλεται η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου είναι:

Στάδιο 1^ο: αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 3' (1 κύκλος)

Στάδιο 2^ο: αποδιάταξη στους 95 °C για 5", υβριδοποίηση στους 60 °C για 30" και επιμήκυνση στους 72 °C για 5" (40 κύκλοι),

Στάδιο 3^ο: τελική αποδιάταξη στους 95 °C για 1', υβριδοποίηση στους 55 °C για 30" και παραμονή στους 95 °C για 30" (1 κύκλος).

2.2.1.7 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Η απλούστερη μέθοδος διαχωρισμού των νουκλεϊκών οξέων με βάση το μέγεθος τους είναι η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης προερχόμενος από φύκια με ικανότητα να διαχωρίσει μόρια νουκλεϊκών οξέων σε μέγεθος δεκάδων έως και εκατοντάδων κιλοβάσεων. Η οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται με την προσθήκη μιας φθορίζουσας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), το οποίο προσδένεται σε αυτά και δίνει την δυνατότητα παρατήρησης των νουκλεϊκών οξέων ως ζωνών, έπειτα από έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV.

Κατά την ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο προκαλεί τη μεταφορά μέσω του πηκτώματος των αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων προς το θετικό πόλο. Ο ρυθμός μετακίνησης τους επηρεάζεται από το μέγεθος τους και τη συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης. Όσον αφορά το μέγεθος τους, αυτό είναι αντιστρόφως ανάλογο της απόστασης που διανύουν, καθώς τα βραχύτερα τμήματα μετακινούνται διαμέσου των πόρων της αγαρόζης με μικρότερη αντίσταση, σε σχέση με τα μεγαλύτερα τμήματα. Οι πόροι που δημιουργούνται εξαρτώνται από την τελική συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πηκτής. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση οδηγεί στην δημιουργία μικρότερων πόρων και το αντίστροφο.

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 1%. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA αναφοράς (DNA ladder) και συγκεκριμένα ο DNA ladder λ HincII/HindIII.

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

- Σε γυάλινη φλάσκα προστίθενται x g αγαρόζης και 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TAE.

- Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων, έως ότου η αγαρόζη ομογενοποιηθεί πλήρως (3-5').
- Η φλάσκα διαρκώς ανακινούμενη τοποθετείται κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να κρυώσει ελαφρώς και στη συνέχεια σε αυτήν προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/mL, η οποία αναμιγνύεται καλά με το διάλυμα.
- Στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετείται η «χτένα»-οδηγός ώστε να διαμορφωθούν οι θέσεις φόρτωσης μέσα στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.
- Το ζεστό διάλυμα αγαρόζης/EtBr αδειάζεται μέσα στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει για ~30' σε θερμοκρασία δωματίου. Η πηκτή πρέπει να έχει πάχος 3-5 mm, και τυχόν φουσκάλες αέρα πρέπει να αφαιρούνται προτού πήξει.
- Αφού στερεοποιηθεί, η πηκτή τοποθετείται μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε οι θέσεις φόρτωσης να βρίσκονται κοντά στον αρνητικό πόλο, και η «χτένα» αφαιρείται, ενώ ακολούθως προστίθεται όσο διάλυμα 1x TAE χρειάζεται ώστε να υπερκαλυφθεί η πηκτή περίπου κατά 1 mm.
- Τα δείγματα των νουκλεϊκών οξέων αναμιγνύονται με διάλυμα φόρτωσης που περιέχει χρωστική (όπως μπλε της βρωμοφαινόλης) σε τελική συγκέντρωση 1x και εισάγονται στις θέσεις φόρτωσης με τη χρήση μικροπιπέτας, ενώ σε μία από τις θέσεις φόρτωσης εισάγεται ο DNA ladder.
- Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση (συνήθως 100 V) και τα δείγματα αφήνονται να μετακινηθούν μέσα στην πηκτή έως ότου η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης έχει διατρέξει μία ικανή απόσταση μέσα στην πηκτή. Σε μία πηκτή 1% w/v, η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μετακινείται κατά προσέγγιση με ρυθμό ισοδύναμο με αυτόν ενός μορίου DNA 500 bp.
- Στη συνέχεια, η συσκευή αποσυνδέεται από το ρεύμα και η πηκτή μεταφέρεται στη UV λάμπα για την παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων.

Η παρασκευή του δείγματος DNA αναφοράς (DNA ladder) για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με την ανάμιξη των εξής:

- **Lambda DNA (15 µg):** δίκλωνο DNA προερχόμενο από βακτηριοφάγο λ
- **HincII (15U):** περιοριστική ενδονουκλεάση
- **HincIII(15U):** περιοριστική ενδονουκλεάση

- **Buffer 10x M (Takara)**
- **Αποστειρωμένο ddH₂O**

Το παρασκευασμένο μίγμα παραμένει για 16 ώρες στους 37 °C, στο οποίο έπειτα προστίθεται ποσότητα 5 μL EDTA 0,5 M και φυλάσσεται στους 4 °C.

2.2.1.8 Απομόνωση τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης (Gel extraction)

- Προκειμένου να απομονωθεί η επιθυμητή ζώνη DNA από μία πηκτή αγαρόζης, η πηκτή τοποθετείται υπό το φως μίας φορητής λάμπας UV και η ζώνη αφαιρείται από αυτήν με χρήση μίας καθαρής λεπίδας.
- Το απομονωμένο κομμάτι πηκτής αγαρόζης τοποθετείται στη συνέχεια σε σωλήνα τύπου erpendorf και ακολουθείται το πρωτόκολλο του kit απομόνωσης DNA από πηκτή της εταιρείας Macherey-Nagel. Ειδικότερα για κάθε 100 mg πηκτής αγαρόζης (<2%) προστίθενται 200 μL Buffer NT1 που θα διευκολύνει την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου της στήλης.
- Ακολουθεί η μεταφορά του δείγματος στους 50 °C για 5-10 λεπτά, ώστε να γίνει η πλήρη διάλυση της πηκτής.
- Σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf (2 mL), τοποθετείται η στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up και φορτώνεται ποσότητα του δείγματος μέχρι 700 μL. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30" στα 11.000 rpm. Απορρίπτεται το έκλουσμα από τον σωλήνα και εφόσον είναι αναγκαίο επαναλαμβάνεται η διαδικασία με την προσθήκη της περίσσειας δείγματος.
- Προστίθενται ποσότητα 700 μL Buffer NT3 στη στήλη προκειμένου να γίνει έκπλυση του προσδεμένου DNA και γίνεται φυγοκέντρηση για 30" στα 11.000 rpm. Το έκλουσμα που συγκεντρώνεται στον σωλήνα απορρίπτεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές με στόχο τον καθαρισμό του δείγματος.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1' στα 11.000 rpm για την πλήρη απομάκρυνση του Buffer NT3.
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και γίνεται σε αυτήν η προσθήκη 15-30 μL ddH₂O. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και φυγοκέντρηση του δείγματος για 1' στα 11.000 rpm. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται για μία ακόμη φορά προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η ποσότητα του καθαρισμένου DNA που παραλαμβάνεται.

- Τελικά το δείγμα DNA περιέχεται διαλυμένο στον σωλήνα και μπορεί να μετρηθεί η συγκέντρωση του σε φωτόμετρο.

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

- Στο δείγμα DNA ή RNA που πρόκειται να καθαριστεί προστίθεται ddH₂O σε σωλήνα τύπου eppendorf μέχρι τα 400 μL.
- Προστίθενται ακόμη 400 μL διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (PCI). Ακολουθεί καλή μηχανική ανάδευση για 30'' και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 60''.
- Η υδατινή φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα για μία φορά.
- Η υδατινή φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και σε αυτήν προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30'' και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 60''.
- Η υδατινή φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και σε αυτήν προστίθεται 1/10 του όγκου NH₄Ac (250 mM) και 2,5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100%. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30'' και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 60''.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C για 16h.
- Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm στους 4 °C για 15'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα πλένεται με 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 10'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 5'.
- Τελικά, το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH₂O.

2.2.1.10 Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων

Τα νουκλεϊκά οξέα προς προσδιορισμό συγκέντρωσης και καθαρότητας μετρούνται φωτομετρικά με χρήση του φασματοφωτόμετρου NanoDrop (NanoDrop™ ND 1000, Thermo Fischer Scientific, USA). Το φασματοφωτόμετρο NanoDrop είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω του οποίου υπάρχει δυνατότητα, με χρήση αντίστοιχου προγράμματος, της ανάλυσης των δεδομένων προερχόμενων από τις μετρήσεις του

φασματοφωτόμετρο. Έχει επιπλέον τη δυνατότητα μέτρησης δειγμάτων όγκου 1 μL σε υψηλές συγκεντρώσεις με υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Η διαδικασία της μέτρησης ξεκινάει μεταφέροντας με τη βοήθεια της πιπέτας 1 μL από το δείγμα των νουκλεϊκών οξέων στην ειδική θέση μέτρησης στη βάση του οργάνου. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων του φασματοφωτόμετρο πραγματοποιείται βάσει του νόμου των Beer-Lambert, με χρήση τροποποιημένης εξίσωσης: $c = (A * e / b)$ όπου:

c: η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα ($\text{ng}/\mu\text{L}$)

A: η απορρόφηση του δείγματος (AU)

e: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, ο οποίος εξαρτάται από το μήκος κύματος ($\text{ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{L}$)

b: είναι το μήκος της διαδρομής (cm)

Καθώς οι τιμές του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας διαφέρουν ανάλογα με το είδος του προς ανάλυση νουκλεϊκού οξέος, οι γενικά αποδεκτές τιμές για τα νουκλεϊκά οξέα:

- **Δίκλωνο DNA:** 50 $\text{ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{L}$
- **Μονόκλωνο DNA:** 33 $\text{ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{L}$
- **Μονόκλωνο RNA:** 40 $\text{ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{L}$

Η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop™ υπολογίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (230, 260 και 280 nm). Οι λόγοι των απορροφήσεων αυτών πρέπει να κυμαίνονται εντός ορισμένων ορίων και συγκεκριμένα:

A₂₆₀/A₂₈₀: λόγος για το DNA κοντά στο 1,8 και για το RNA κοντά στο 2,0 είναι γενικά αποδεκτός. Ένας χαμηλότερος λόγος υποδηλώνει την παρουσία πρωτεΐνης, φαινόλης ή άλλων άχρηστων στοιχείων.

A₂₆₀/A₂₃₀: λόγος για το DNA και RNA μεταξύ 1.8 και 2.2 είναι γενικά αποδεκτός. Υπολογισμός ενός χαμηλότερου λόγου υποδηλώνει την παρουσία άχρηστων στοιχείων. Οι τιμές του λόγου A₂₆₀/A₂₃₀ είναι μεγαλύτερες σε σχέση με το αντίστοιχο λόγο A₂₆₀/A₂₈₀.

2.2.2 Κλωνοποίηση

2.2.2.1 Εισαγωγή

Κλωνοποίηση ονομάζεται η διαδικασία ενσωμάτωσης τμήματος DNA, που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο, σε ένα μόριο DNA ενός φορέα, με σκοπό την κατασκευή πολλών ανασυνδυασμένων μορίων DNA και διατήρηση τους στα κύτταρα-ξενιστές. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι φορείς είναι μικρά κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA, που ονομάζονται πλασμίδια. Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της κλωνοποίησης διαδραματίζουν επίσης και τα περιοριστικά ένζυμα, που κόβουν το DNA του φορέα σε συγκεκριμένες θέσεις, αναγνωρίζοντας ειδικές αλληλουχίες, και τα ένζυμα που πραγματοποιούν την σύνδεση των τμημάτων DNA. Ο ανασυνδυασμένος φορέας, που δημιουργείται και φέρει την επιθυμητή πληροφορία, μεταφέρεται στη συνέχεια σε κύτταρο-ξενιστή (συνήθως βακτήριο), για να ακολουθήσει τελικά η αναπαραγωγή της επιθυμητής πληροφορίας σε μεγάλο αριθμό. Η αναλυτική διαδικασία και τα στάδια της κλωνοποίησης περιγράφονται στην συνέχεια.

2.2.2.2 Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)

Η ενσωμάτωση του επιθυμητού ενθέματος στον πλασμιακό φορέα πραγματοποιείται με τη διαδικασία σύνδεσης (ligation) μέσω της δράσης του ενζύμου DNA λιγάση. Οι DNA λιγάσες καταλύουν το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ 3'-υδροξυλικών και 5'-φωσφορικών DNA άκρων, και έχουν τη δυνατότητα να συνδέουν πολλαπλά τμήματα DNA, που περιέχουν συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα (Lohman et al., 2014). Η DNA λιγάση που χρησιμοποιείται στις πειραματικές διαδικασίες για την πραγματοποίηση της διαδικασίας σύνδεσης, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ATP με σκοπό την επίτευξη υψηλών αποδόσεων σύνδεσης, είναι η T4 DNA λιγάση.

Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται κατά το δυνατόν ισομοριακές ποσότητες DNA του φορέα και του ενθέματος, και επιπλέον προστίθεται ATP (1 mM), T4 DNA ligase (5 U, Thermo Fischer Scientific, USA), ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης 10x και ddH₂O (συνήθως μέχρι τελικού όγκου 10 μL). Η διάρκεια της αντίδρασης κυμαίνεται από τουλάχιστον 1 έως 16h.

2.2.2.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων του στελέχους DH5aTM του είδους *E. coli* με το επιθυμητό πλασμίδιο, εκτελείται με την εξής διαδικασία:

- Το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA (1-200 ng) που κατασκευάστηκε μέσω της αντίδρασης σύνδεσης προστίθεται σε 100 μ L βακτηρίων DH5aTM μέσα σε σωλήνα τύπου erpendorf (1,5 mL), και μαζί αφήνονται να επωαστούν για 30' στον πάγο.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ των βακτηρίων στους 42 °C για 2-3'.
- Τα βακτήρια επανατοποθετούνται στον πάγο για 1-2'.
- Στα βακτήρια προστίθεται 1 mL θρεπτικού υλικού LB και αφήνονται να επωαστούν για 1h στους 37 °C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 3.000 rpm για 5', αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού LB (100 μ L).
- Τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία Petri που περιέχουν LB/άγαρ παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (εδώ, αμικικιλίνη 100 μ g/mL) στο οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα το επιθυμητό πλασμίδιο. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε κλίβανο επώασης και τα βακτήρια αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37 °C για 16h.

2.2.2.4 Επιλογή αποικιών και υγρή καλλιέργεια

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

2.2.2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini prep)

Οι υγρές καλλιέργειες συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται σε σωλήνες τύπου erpendorf στις 13.000 rpm για 3'. Ακολούθως, πραγματοποιείται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αλκαλικής λύσης:

- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μL παγωμένου Διαλύματος I στο οποίο έχει προστεθεί RNάση A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AppliChem GmbH, Germany) με μηχανική ανάδευση.
- Προστίθενται 250 μL Διαλύματος II, ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα και το μίγμα αφήνεται στον πάγκο για 3-5' ή μέχρι να γίνει διαυγές.
- Προστίθενται 350 μL Διαλύματος III και ακολουθεί καλή ανάμιξη με μηχανική ανάδευση.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 15'.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf και σε αυτόν προστίθενται 700 μL ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή του σωλήνα.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 15'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 5'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- Τελικά, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε ddH₂O.

2.2.2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi-prep)

Αφού πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλώνου, ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός αυτού εμβολιάζοντας θρεπτικό υλικό LB παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού (αμπικιλίνη 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), με σκοπό την αναπαραγωγή του κλώνου σε μεγαλύτερη κλίμακα. Η διαδικασία παραγωγής και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα εκτελείται με τον εξής τρόπο:

- Η υγρή καλλιέργεια του κλώνου προστίθεται σε 20 mL LB μέσα σε σωλήνα τύπου falcon χωρητικότητας 50 mL, και τοποθετείται σε κλίβανο επώασης στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση στις 220 rpm για 16h.
- Η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 7,500 rpm για 8'.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 400 μL Διαλύματος I (G.E.T.).

- Το δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου eppendorf χωρητικότητας 2 mL και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5'.
- Στο μίγμα προστίθενται 800 μL φρέσκου Διαλύματος II και ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή (5-10 φορές). Το δείγμα αφήνεται στους 4 °C για 10'.
- Προστίθενται 650 mL Διαλύματος III, ακολουθεί ανάμιξη με γρήγορη αναστροφή του σωλήνα και σύντομη μηχανική ανάδευση (3"). Το δείγμα αφήνεται στους 4 °C για 10'.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 20'.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο τύπου σωλήνα eppendorf (2 mL) και σε αυτό προστίθενται 15 μL RNάσης A (10 mg/mL, AppliChem GmbH, Germany). Το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 20'.
- Ακολούθως, το δείγμα διαμοιράζεται ισομερώς σε 2 σωλήνες τύπου eppendorf (2 mL).
- Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 700 μL διαλύματος PCI και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 5'.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται 700 μL διαλύματος PCI και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 5'.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται 700 μL χλωροφορμίου και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 5'.
- Τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες, προστίθενται 800 μL αιθανόλης 100% και ακολουθεί ανάμιξη με αναστροφή.
- Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 °C για 5-10' και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 20'.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται, στο κάθε ίζημα προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70% και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 5'.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και τα ιζήματα αφήνονται να στεγνώσουν.
- Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 80 μL ddH₂O.
- Στα δείγματα προστίθενται 20 μL NaCl 4 M και 100 μL 13% PEG-8000, και ακολούθως διατηρούνται στους 4 °C για 2-16h.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 15-20'.
- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και στα ιζήματα (που δεν είναι ορατά) προστίθενται 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 12.000 rpm για 5'.

- Τα υπερκείμενα απορρίπτονται και στα ιζήματα (που πλέον είναι ορατά) προστίθενται ξανά 500 μL παγωμένου διαλύματος αιθανόλης 70%. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5'.
- Τα ιζήματα επαναδιαλύονται σε 80-100 μL ddH₂O συνολικά και το περιεχόμενο των δύο σωλήνων ενοποιείται σε έναν.

2.2.2.7 Αλληλούχιση πλασμιδιακού DNA

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε, έγινε η προετοιμασία σωλήνων τύπου erpendorf, στα οποία προστέθηκε ποσότητα πλασμιδιακού DNA με τελικό όγκο 15 μL και συγκέντρωση 50-100 ng/ μL . Τα δείγματα στην συνέχεια αποστέλλονται για αλληλούχιση στην εταιρεία Eurofins. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αναλύονται με τη βοήθεια των προγραμμάτων BioEdit και MultAlin (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/multalin.py>).

2.2.2.8 Ειδικά πρωτόκολλα κλωνοποιήσεων για την αποσιώπηση/απενεργοποίηση του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Hi5 και Sf21

2.2.2.8.1 Κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα pEA για την παραγωγή φουρκετών

Ο pEA είναι πλασμιδιακός φορέας χρησιμοποιούμενος σε συστήματα έκφρασης των Λεπιδοπτέρων, με ικανότητα ενίσχυσης επιθυμητού ενθέματος μέχρι και 100 φορές. Ο φορέας αυτός περιέχει την περιοχή *hr3* (αλληλουχία ενίσχυσης της ομόλογης περιοχής 3 του μπακουλοϊού BmNPV), τον υποκινητή της κυτταροπλασματικής ακτίνης A3 του *B. mori*, θέση MCS (Multiple Cloning Sites) και τη μη-μεταφραζόμενη 3' περιοχή του γονιδίου της ακτίνης του *B. mori* που διαθέτει σήματα πολυαδενυλίωσης (Εικόνα 2.2). Το ORF (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) του επιθυμητού γονιδίου κλωνοποιείται μεταξύ της θέσης του ενισχυτή της ακτίνης A3 και της poly-[A]⁺ περιοχής της ακτίνης (Douris et al., 2006).



Εικόνα 2.2. Κασέτα για την έκφραση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pEA (Douris et al., 2006).

Η μεταγραφή των σχεδιασμένων αλληλουχιών, που κλωνοποιούνται στον φορέα pEA, οδηγεί στην παραγωγή μονόκλωνων μορίων RNA, των οποίων η δευτεροταγής διαμόρφωση θα έχει τη μορφή RNA φουρκέτας, η οποία αναμένεται να προκαλεί μέσω του μονοπατιού siRNA την αποσιώπηση του γονιδίου-στόχου. Η στρατηγική κατασκευής του πλασμιδίου που θα παράγει την επιθυμητή RNA φουρκέτα περιλαμβάνει την κατασκευή αρχικά δύο επιμέρους φορέων για γονίδιο-στόχο. Και οι δύο φορείς περιλαμβάνουν την αλληλουχία-στόχο του γονιδίου (~400 bp), με τη διαφορά ότι ο πρώτος φορέας περιλαμβάνει ακόμη ένα μικρό τμήμα αλληλουχίας (~100 bp), το οποίο θα χρησιμεύσει στη δημιουργία της θηλειάς της φουρκέτας. Τελικά, το ένθεμα του δεύτερου φορέα υποκλωνοποιείται στον πρώτο με αντίθετο προσανατολισμό, με αποτέλεσμα κατά την διαδικασία της μεταγραφής τα παραγόμενα RNA να υβριδοποιούνται μεταξύ τους σχηματίζοντας την επιθυμητή φουρκέτα.

2.2.2.8.1.1 Κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα pEA για την παραγωγή της φουρκέτας Tn-HpDcr2

Με σκοπό την παραγωγή της φουρκέτας Tn-HpDcr2 στα κύτταρα Hi5 ακολουθήθηκαν δύο βασικά στάδια, τα οποία δίνουν τα επιθυμητά προϊόντα Tn[4+] και Tn[3+], που είναι υπεύθυνα για την κατασκευή της φουρκέτας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της αλληλουχίας *SmaI*-Tn[4+]-*BamHI* μέσω PCR από cDNA κυττάρων Hi5 και ηλεκτροφορήθηκε έπειτα σε πηκτή αγαρόζης. Το προϊόν της αντίδρασης PCR κόπηκε από τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI/BamHI*, ώστε να προκύψει το κομμάτι *SmaI*-Tn[4+]-*BamHI*. Όσον αφορά την αλληλουχία Tn[3+] αυτή ήταν κλωνοποιημένη στον φορέα pMD19-Tn[3+], ο οποίος κόπηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI/NotI*, δίνοντας το κομμάτι *BamHI*-Tn[3+]-*NotI*. Η αλληλουχία *BamHI*-Tn[3+]-*NotI* ενσωματώθηκε έπειτα στο φορέα pEA, επεξεργασμένο από τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI/NotI*, στον οποίο έγινε και η προσθήκη της αλληλουχίας *SmaI*-Tn[4+]-*BamHI* λόγω συμβατότητας των άκρων τους. Ο τελικός ανασυνδυασμένος φορέας που προέκυψε είναι ο φορέας pEA-Tn[4+/3+] ή αλλιώς pEA-TnHpDcr2.

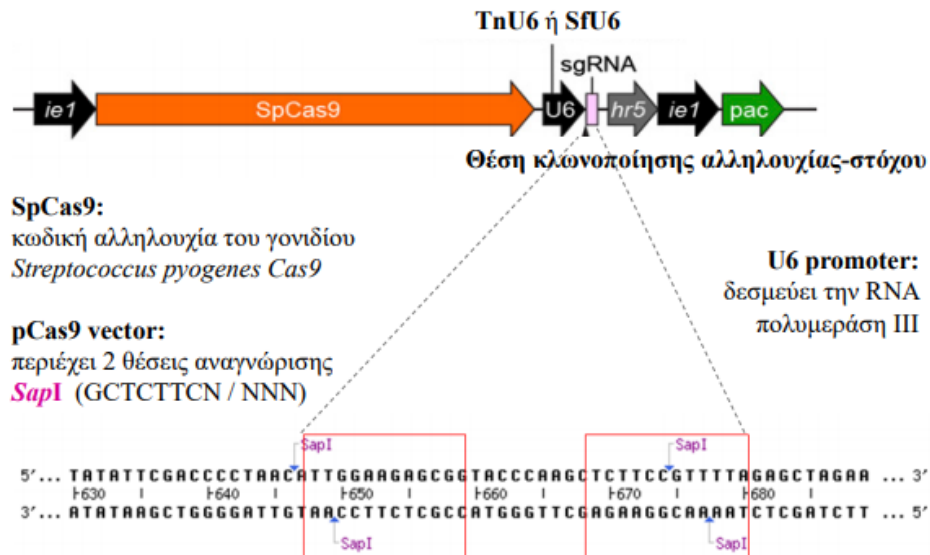
2.2.2.8.1.2 Κλωνοποιήσεις στον πλασμιδιακό φορέα pEA για την παραγωγή της φουρκέτας Sf-HpDcr2

Για την κατασκευή της φουρκέτας έναντι του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Sf21, χρησιμοποιήθηκαν δύο ενδιάμεσοι φορείς τύπου pBluescript (**pBS-Sf[5+]** και **pBS-Sf[4+]**), στους οποίους ήταν κλωνοποιημένα τα δύο τμήματα της φουρκέτας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pBS-Sf[5+] με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI/BamHI*. Παράλληλα, με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pEA και αποφωσφορυλίωσή του. Έχοντας πλέον συμπληρωματικά άκρα (*SmaI/BamHI*), το φωσφορυλιωμένο ένθεμα *SmaI-Sf[5+]-BamHI* κλωνοποιήθηκε στον φορέα *SmaI-pEA-BamHI*. Ο νέος φορέας pEA-Sf[5+], καθώς και ο pBS-Sf[4+] υδρολύθηκαν κατόπιν με τα ένζυμα *BamHI* και *NotI*. Έπειτα από την πέψη, ο ευθύγραμμος πλέον φορέας pEA-Sf[5+] με άκρα *BamHI/NotI* αποφωσφορυλιώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση σε αυτόν του ενθέματος *BamHI-Sf[4+]-NotI* ούτως ώστε τελικά να κατασκευαστεί ο ανασυνδυασμένος φορέας pEA-Sf[5+/4+] ή Sf-HpDcr2.

2.2.2.8.2 Κλωνοποιήσεις επιλεγμένων αλληλουχιών στον πλασμιδιακό φορέα pCas9

Ο πλασμιδιακός φορέας, που χρησιμοποιείται σε πειράματα CRISPR/Cas9 για γονιδιακή επεξεργασία σε κυτταρικές σειρές εντόμων είναι ο φορέας CRISPR-Cas9 ή pCas9 (Mabashi-Asazuma and Jarvis, 2017). Ο φορέας αυτός περιλαμβάνει: α) τον *ie1* υποκινητή του μπακουλοϊού AcMNPV, β) το γονίδιο του *Streptococcus pyogenes Cas9*, που παράγει την ενδονουκλεάση SpCas9, γ) τον ειδικό υποκινητή U6, που διαφέρει για κάθε κυτταρική σειρά και ο οποίος δεσμεύει την RNA πολυμεράση III, δ) τον οδηγό κλώνο sgRNA, ε) δύο θέσεις αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου *SapI*, μεταξύ των οποίων γίνεται η ενσωμάτωση της επιλεγμένης αλληλουχίας-στόχου, και στ) τον δείκτη ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη (*pac*) που βρίσκεται υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας ενίσχυσης *hr5* του μπακουλοϊού AcMNPV και των στοιχείων του υποκινητή *ie1* (Εικόνα 2.3).

Στα πλαίσια της διαδικασίας κλωνοποίησης στον φορέα pCas9, επιλέγονται αρχικά πιθανές αλληλουχίες PAM (NGG), που εμπεριέχονται στο επιθυμητό γονίδιο, καθώς η PAM είναι απαραίτητη για την πέψη από την SpCas9. Ακολουθεί προσδιορισμός της 5' θέσης έναρξης της αλληλουχίας-στόχου, αριθμώντας 20 νουκλεοτίδια ανοδικά της PAM.



Εικόνα 2.3. Κασέτα για την έκφραση ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pCas9 (Προσαρμογή από Mabashi-Asazuma and Jarvis, 2017).

Οι ειδικές αλληλουχίες-στόχοι, μέσω των οποίων θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία κοπής από την ενδονουκλεάση SpCas9, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του online εργαλείου: crispr.dbcls.jp/doc με βάση τις εξής παραμέτρους:

- για λόγους σταθερότητας του RNA, προτιμάται η αλληλουχία να διαθέτει περιεχόμενο βάσεων GC σε ποσοστό 40-80%,
- για την αποφυγή δράσης εκτός στόχου, συνιστάται η αλληλουχία να έχει μήκος 17-24 βάσεις, και
- η προς κλωνοποίηση αλληλουχία πρέπει να ξεκινά με G.

Σημειώνεται ότι εδώ, στο πρόσθιας κατεύθυνσης ολιγονουκλεοτίδιο προστέθηκε η αλληλουχία TTC στο 5' άκρο του, ενώ παράλληλα στο 5' άκρο του αντίθετης κατεύθυνσης συμπληρωματικού ολιγονουκλεοτιδίου έγινε η προσθήκη της αλληλουχίας AAC, προκειμένου να δημιουργηθούν άκρα συμβατά με την πέψη από το *SapI*.

Μετά το σχεδιασμό και τη σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στις αλληλουχίες-στόχους για την κάθε κυτταρική σειρά, ακολούθησε η διαδικασία της υβριδοποίησης και σύνδεσής τους με το φορέα pCas9 σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Τα ολιγονουκλεοτίδια, καθώς βρίσκονται σε μορφή σκόνης, διαλύονται σε ddH₂O έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου να είναι ίδια και διπλάσια από την επιθυμητή συγκέντρωση μετά την υβριδοποίηση τους.

- Δημιουργείται μίγμα ζεύγους συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων, αποτελούμενο από ίσο όγκο του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου σε ένα μικροσωλήνα.
- Ακολουθεί επώασή τους σε θερμοκρασία 95 °C για 5 λεπτά και αργή ψύξη, ώστε να φτάσουν τελικά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα υβριδοποιημένα πλέον ολιγονουκλεοτίδια φωσφορυλιώνονται σε μίγμα που αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης (περιέχει ATP), την κινάση T4 PNK και ddH₂O.
- Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά και στη συνέχεια αραιώνεται με ddH₂O σε δεκαπλάσιο όγκο.
- Παράλληλα, πραγματοποιείται πέψη του φορέα pCas9 στους 37 °C για 1h με το περιοριστικό ένζυμο *SapI*, το οποίο αναγνωρίζει δύο θέσεις περιορισμού εντός του φορέα. Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει, εκτός του φορέα pCas9 (2 μg), ακόμη 10x NEBuffer 4, την περιοριστική ενδονουκλεάση *SapI* και ddH₂O.
- Ακολουθεί η προσθήκη 1 μL φωσφατάσης και επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά.
- Ο ευθυγραμμισμένος πλέον φορέας απομονώνεται μέσω πηκτής και καθαρίζεται.
- Τέλος, πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης του φορέα pCas9 με τα υβριδοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια σε μίγμα που αποτελείται από το φορέα, τα υβριδοποιημένα ολιγονουκλεοτίδια που κατασκευάστηκαν για την κάθε κυτταρική σειρά, ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης 10x, ATP, T4 DNA λιγάση και ddH₂O.

Οι αλληλουχίες-στόχοι κλωνοποιήθηκαν λοιπόν, στις θέσεις *SapI* καθοδικά του υποκινητή U6 της RNA πολυμεράσης III στα αντίστοιχα πλασμίδια pCas9, για την κάθε κυτταρική σειρά Hi5 και Sf21 δημιουργώντας έτσι τα εξής ανασυνδυασμένα πλασμίδια:

Για την κυτταρική σειρά Hi5:

- **pCas9-Tn1923** και **pCas9-Tn2044**, που στοχεύουν την περιοχή Dicer dimer του γονιδίου
- **pCas9-Tn2647** και **pCas9-Tn2773**, που στοχεύουν την περιοχή PAZ του γονιδίου

Για την κυτταρική σειρά Sf21:

- **pCas9-Sf1669**, που στοχεύει την περιοχή της ελικάσης του γονιδίου
- **pCas9-Sf1794**, που στοχεύει την περιοχή Dicer dimer του γονιδίου
- **pCas9-Sf3662** και **pCas9-Sf3782**, που στοχεύουν την περιοχή Ribo c του γονιδίου

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια θα παράγουν τελικά την ενδονουκλεάση SpCas9, η οποία καθοδηγούμενη από έναν RNA οδηγό, μέσω συμπληρωματικότητας, θα προξενεί αποδιάταξη των κλώνων και βλάβη στο γονιδιωματικό DNA με τη μορφή δίκλωνης κοπής. Η επιδιόρθωση της βλάβης γίνεται με επαναϋβριδισμό των κλώνων με αποτέλεσμα την απώλεια βάσεων.

2.2.3 Πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες

2.2.3.1 Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων

Η χρωστική Trypan Blue έχει την ιδιότητα να διαπερνά τις μεμβράνες μόνο των νεκρών κυττάρων, με αποτέλεσμα αυτά τα κύτταρα να αποκτούν μπλε χρωματισμό. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά καταμετρούνται σε πλάκα Neubauer στο οπτικό μικροσκόπιο. Η καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων μίας καλλιέργειας γίνεται με την παρακάτω διαδικασία:

- Σε σωλήνα τύπου erpendorf αναμιγνύονται 30 μL από την κυτταροκαλλιέργεια με 120 μL από διάλυμα της χρωστικής Trypan Blue (0,1% σε 1x PBS, Gibco, USA).
- Μέρος του αραιωμένου κυτταρικού διαλύματος φορτώνεται στην πλάκα Neubauer.
- Ακολουθεί παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο (Euromex Microscopes Holland, The Netherlands), καταμέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε πέντε από τα οριοθετημένα τετράγωνα εμβαδού 1 mm^2 και άθροισή τους (κάθε τετράγωνο αντιστοιχεί σε όγκο καλλιέργειας 0,1 μL).
- Υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων ανά mL κυτταροκαλλιέργειας πολλαπλασιάζοντας το άθροισμα των καταμετρημένων κυττάρων επί 10^4 .

2.2.3.2 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Η παροδική διαμόλυνση κυττάρων συντελείται με την εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού σε αυτά, με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασης αυτού και της ανταπόκρισης των κυττάρων. Για τη επίτευξη του αποτελέσματος αυτού, χρησιμοποιείται ο παράγοντας EscortTM IV (Sigma-Aldrich GmbH, Germany), ο οποίος αποτελεί μίγμα ενός πολυκατιονικού και ενός ουδέτερου λιπιδίου, ικανό να σχηματίζει ένα σταθερό θετικά φορτισμένο λιποσωμικό σύμπλοκο όταν αναμιχθεί με το αρνητικά φορτισμένο DNA (ή

RNA), απουσία ορού. Το μίγμα αφού προστεθεί στο κυτταρικό θρεπτικό μέσο, συντήκεται στην συνέχεια με την κυτταρική μεμβράνη, και δίνει την δυνατότητα στα νουκλεϊκά οξέα να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης εκτελείται ως εξής:

- Σε μικροπλάκα καλλιέργειας 24 βοθρίων (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Austria), επιστρώνονται 250.000 κύτταρα Λεπιδοπτέρων ανά βοθρίο σε τελικό όγκο 500 μL θρεπτικού υλικού IPL-41 (Gibco, USA) με προσθήκη 10% ορού FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, USA). Οι μικροπλάκα αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 30' στους 28 °C.
- Σε σωλήνα τύπου erpendorf αναμιγνύονται 2,5 μL Escort IV™ (για κύτταρα Hi5) ή 3,75 μL Escort IV™ (για τα κύτταρα Sf21) με 90 μL απλού IPL-41 (basal IPL-41, Gibco, USA) για το κάθε βοθρίο, και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45'.
- Προετοιμάζεται από ένας σωλήνας τύπου erpendorf ανά δύο βοθρία, όπου προστίθενται 1,5-2,5 μg νουκλεϊκών οξέων σε 180 μL απλού IPL-41.
- Ακολουθεί αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τα κύτταρα και προσθήκη 300 μL απλού IPL-41 στο τοίχωμα του βοθρίου με προσοχή ώστε να μην αποκολληθούν τα κύτταρα. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά, ώστε να ξεπλυθούν τα κύτταρα από υπολείμματα ορού και πρωτεϊνών.
- Στη συνέχεια, προστίθενται 180 μL από το μίγμα του Escort IV™ σε κάθε σωλήνα που περιέχει το μίγμα των νουκλεϊκών οξέων, ενώ ακολουθεί καλή μηχανική ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
- Έπειτα, το υπερκείμενο των κυττάρων απορρίπτεται και αντίστοιχα προστίθενται 180 μL μίγματος διαμόλυνσης ανά βοθρίο.
- Η μικροπλάκα ανακινείται ελαφρώς και καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη, ούτως ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του θρεπτικού μέσου, και τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν στους 28 °C για 5-16h.
- 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 γενταμυκίνη (Gibco, USA) σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τελικά, τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για όσο χρόνο απαιτείται στους 28 °C.

Ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε διαμόλυνσης, οι αριθμοί των κυττάρων που διαμολύνονται και ο τύπος της μικροπλάκας ποικίλλουν, και συνεπώς οι τιμές του πρωτοκόλλου μεταβάλλονται αναλόγως.

2.2.3.3 Δημιουργία και αποθήκευση σταθερών κυτταρικών σειρών

Με σκοπό την μελέτη της έκφρασης γονιδίων του RNAi μηχανισμού, επιλέχθηκε η μέθοδος του σταθερού κυτταρικού μετασχηματισμού παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, κύτταρα Hi5 και Sf21 διαμολύνονται με τα επιθυμητά πλασμίδια σε συνδυασμό πάντα με κάποιον φορέα που εκφράζει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό της επιλογής μας. Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας, τα κύτταρα αρχικά καλλιεργούνται στη μικροπλάκα καλλιέργειας 6 βοθρίων, σε θρεπτικό υλικό IPL-41, που περιέχει ορό FBS (10%) χωρίς το αντιβιοτικό επιλογής. Λίγες ημέρες μετά την αρχική διαμόλυνση, στην καλλιέργεια προστίθεται το αντιβιοτικό επιλογής (πουρομυκίνη), συνήθως σε τελική συγκέντρωση 15 µg/mL και τα κύτταρα παρακολουθούνται για μερικές εβδομάδες (3-6), έως ότου επιλεγεί ένας ανθεκτικός μικτός πληθυσμός.

Για την κατασκευή των κυττάρων που θα χρησιμοποιούνταν σε πειράματα μελέτης της αποδοτικότητας του RNAi μηχανισμού, κύτταρα Hi5 και Sf21 διαμολύνθηκαν με: α) τους φορείς pEA-TnHpDcr2 και pEA-SfHpDcr2 αντίστοιχα (1,6-1,8 µg), β) το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (0,4-0,45 µg) που ενισχύει την έκφραση της φουρκέτας και γ) το φορέα έκφρασης pEA.pac (0,25-0,5 µg), που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη.

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

- Κυτταροκαλλιέργεια υψηλής πυκνότητας (5 mL) που έχει αναπτυχθεί σε φλάσκα των 25 cm² συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon (15 mL) και φυγοκεντρείται στις 2.500 rpm για 5'.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 mL μίγματος 90% FBS (Biosera, HyClone, USA) και 10% DMSO (Hybri-MaxTM, SigmaAldrich GmbH, Germany). Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει πολύ σύντομα, καθώς το DMSO είναι κυτταροτοξικό.

- Το κυτταρικό διάλυμα χωρίζεται σε 2 φιαλίδια (cryovials) και αποθηκεύεται στους -70 °C σε ειδικό κουτί (cryobox).
- Την επόμενη ημέρα τα φιαλίδια μεταφέρονται στο υγρό άζωτο.

2.2.3.4 Μολύνσεις κυττάρων με τον μπακουλοϊό AcMNPV

2.2.3.4.1 Εισαγωγή

Η οικογένεια των μπακουλοϊών (*Baculoviridae*) αποτελείται από ιούς με δίκλωνο μόριο DNA μήκους 80-200 kbp, που αναπαράγονται μόνο σε αρθρόποδα (Blissard and Rohrmann, 1990; Szewczyk et al., 2009). Οι περισσότεροι μπακουλοϊοί είναι ειδικοί προς τους ξενιστές που μολύνουν, μολύνοντας ένα είδος ή μερικά συγγενικά είδη, με τον AcMNPV ιό (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus) να έχει την ικανότητα μόλυνσης μεγάλου εύρους λεπιδόπτερων εντόμων (Guo et al., 2005).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένοι ιοί AcMNPV και συγκεκριμένα οι AcMNPV-GFP, AcMNPV-dsLuc και AcMNPV-GFP/dsLuc, με στόχο την μόλυνση κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 (εκφράζει την φουρκέτα του γονιδίου *dicer-2*). Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 βοθρίων, όπου επιστρώθηκαν 250.000 κύτταρα ανά βοθρίο σε θρεπτικό μέσο μέσο IPL-41 (Gibco, USA) με 10% FBS (Biosera, HyClone, USA) και γενταμυκίνη 50 µg/mL. Ακολούθησε η διαδικασία παρακολούθησης της σταδιακής μόλυνσης των κυττάρων από τους ιούς ανά μέρα και η συλλογή τους την πρώτη, δεύτερη, τέταρτη και έβδομη ημέρα, για έλεγχο της αποδοτικότητας της μόλυνσης σε επίπεδο DNA και RNA.

2.2.3.4.2 Συλλογή και λύση μολυσμένων κυττάρων

- Τα κύτταρα συλλέγονται σε σωλήνα τύπου erpendorf, έπειτα από σχολαστικό πλύσιμο και φυγοκεντρώνται στη συνέχεια στις 13.000 rpm για 10'.
- Το υπερκείμενο από κάθε erpendorf μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, ενώ τα ιζήματα διαλύονται καλά σε 50 µL PBS. Όλα τα δείγματα φυλάσσονταν στους -30 °C.
- Με την πραγματοποίηση της συλλογής των κυττάρων κατά τις επιλεγμένες ημέρες και την ακολουθία της παραπάνω διαδικασίας, γίνεται στην συνέχεια προετοιμασία νέων σωληναρίων τύπου erpendorf για το κάθε δείγμα που έχουμε διαλύσει σε PBS.

- Τα δείγματα ξεπαγώνονται καλά και φυγοκεντρώνονται στις 13.000 rpm για 10'.
- Ακολουθεί η μεταφορά του νέου υπερκείμενου (διαλυτό κυτταρικό κλάσμα) στο προετοιμασμένο σωληνάριο τύπου erpendorf. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο, καθώς τα δείγματα είναι ευπαθή.

Από το διαλυτό κυτταρικό κλάσμα θα απομονωθεί RNA από τα κύτταρα που λύθηκαν, ενώ από το ίζημα (μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα) θα απομονωθεί DNA. Η διαδικασία αυτή θα γίνει με σκοπό τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του ιού και της έκφρασης του διαγονιδίου που φέρει ο ιός ανά ημέρα.

2.2.3.4.3 Στύπωμα κηλίδας (Dot Blot)

Η ανοσοδοκιμασία του στυπώματος κηλίδας, που εφαρμόστηκε στα πειράματα, στηρίζεται στην ανίχνευση διπλού κλώνου RNA, με την τοποθέτηση δείγματος σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη, μέσω χρήσης αντισώματος (J2, JenaBioscience) που ανιχνεύει ειδικά μόρια dsRNA. Το δείγμα RNA που χρησιμοποιείται προέρχεται από μολυσμένα κύτταρα Sf21 και SfhpDcr2, τα οποία μολύνθηκαν από τους ιούς AcMNPV, που εκφράζουν την πρωτεΐνη GFP ή την φουρκέτα της λουσιφεράσης αντίστοιχα. Τα δίκλιωνα μόρια RNA, που θα προσδιοριστούν προέρχονται από τα dsRNA που παράγονται φυσιολογικά από τα κύτταρα, καθώς και από τα κύτταρα που παράγουν τη φουρκέτα της λουσιφεράσης μέσω του ιού AcMNPV. Αναλυτικότερα η διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

- Αφού γίνει η προετοιμασία των δειγμάτων RNA, ακολουθεί η προσθήκη τους (5 μ L) στη θετικά φορτισμένη μεμβράνη, σε σημεία που ορίσαμε. Καθώς τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, θα προσκολληθούν στη μεμβράνη και μέσω διασύνδεσης με ακτινοβολία UV για 2 λεπτά, θα σταθεροποιηθεί αυτή η αλληλεπίδραση RNA-μεμβράνης (cross-linking). Η μεμβράνη, τοποθετείται μέσα σε 50 mL διαλύματος πρωτεΐνης γάλακτος 10% (Blocking Buffer) υπό συνεχή ανακίνηση για μία ώρα. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος θα προσδεθούν σε σημεία της μεμβράνης με μη ειδικό τρόπο, ώστε να διευκολυνθεί στη συνέχεια η εξειδικευμένη πρόσδεση του αντισώματος στο στόχο του.
- Ακολουθεί μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα πρωτεΐνης γάλακτος 10% όγκου 5 mL, που περιέχει το αντίσωμα J2 (1:1000), ούτως ώστε αυτό να προσδεθεί σε όποιο σημείο της μεμβράνης υπάρχει δίκλινο RNA. Η μεμβράνη μαζί με το αντίσωμα

τοποθετούνται σε ζελατίνα και, αφού απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες, σφραγίζεται και τοποθετείται υπό συνεχή ανακίνηση για 16 ώρες στους 4 °C.

- Την επόμενη μέρα, το διάλυμα του αντισώματος συλλέγεται σε σωλήνα και η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με PBS-Tween (0,1%) για 5'.
- Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα (α-mouse 1:1000), που είναι συζευγμένο με την HRP (horseradish peroxidase), για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 5' και 2 πλύσεις των 20' σε PBS-Tween (0,1%). Στη μεμβράνη προστίθεται το μίγμα του αντιδραστηρίου ECL (GE Healthcare, USA) για 1', καθώς η HRP υπεροξειδάση υπό την επίδραση του ECL παράγει χημειοφωταύγεια. Η χημειοφωταύγεια ανιχνεύεται και μετριέται από το σύστημα απεικόνισης LAS-4000 (Fujifilm, Japan).

2.2.3.4.4 Αποδιάταξη πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης και ανοσοστύπωμα Western (Western Blot)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες καθιστά εφικτό το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από ένα ουδέτερο, τρισδιάστατο πλέγμα υδρογονανθράκων συνδεδεμένων με μεθυλενομάδες. Κατασκευάζεται από δύο διακριτά τμήματα, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και την πηκτή συμπύκνωσης (stacking gel). Τα μόρια που ηλεκτροφορούνται μετακινούνται διαμέσου της πηκτής με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το μέγεθός τους και με το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Το μέγεθος των πόρων ρυθμίζεται ανάλογα με την συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που προστίθεται. Οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται στην πηκτή διαχωρίζονται παρουσία ενός ανιονικού απορρυπαντικού SDS (sodium dodecyl sulphate). Τα ιόντα SDS έχουν την ικανότητα να επενδύουν στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, με αποτέλεσμα την αποδιάταξή της και προσδίδοντας της ομοιόμορφα ένα αρνητικό φορτίο, το οποίο επιτρέπει τελικά τη μετακίνηση των πρωτεϊνών προς τον θετικό πόλο της πηκτής. Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται στη συνέχεια από την πηκτή σε μια ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω εφαρμογής ηλεκτρικής τάσης, ώστε να επωαστούν κατόπιν με τα κατάλληλα αντισώματα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανίχνευση των πρωτεϊνών με χρήση χημειοφωταύγειας. Αναλυτικά, όλη η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

- Αρχικά κατασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού, η οποία αφήνεται να πήξει. Βοηθητικά γίνεται προσθήκη αιθανόλης 100% στο πάνω μέρος της πηκτής, αφού αυτή φορτωθεί, προκειμένου να μην στεγνώσει η ανώτερη επιφάνειά της.
 - Με την πήξη της πηκτής διαχωρισμού αδειάζεται η αιθανόλη και προστίθεται η πηκτή συμπύκνωσης. Στο πάνω μέρος της πηκτής συμπύκνωσης, τοποθετείται κάλυμμα (χτενάκι) που θα δημιουργήσει τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων. Η πηκτή αφήνεται να πήξει.
 - Δείγματα κυτταρικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, στα οποία έχει προστεθεί το αποδιατακτικό ρυθμιστικό διάλυμα (cracking buffer) και το Laemmli buffer (περιέχει χρωστική) θερμαίνονται στους 95 °C για 5'.
 - Τα δείγματα εισάγονται στις ειδικές θέσεις φόρτωσης της πηκτής συμπύκνωσης μέσα σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, ενώ σε μία θέση ακόμα φορτώνεται ο δείκτης πρωτεϊνών γνωστών μοριακών βαρών (PiNK prestained protein ladder, Nippon Genetics Europe GmbH, Germany).
 - Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση (120 V, 350 mA) για ~1.5h, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (running buffer 1x).
 - Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare, USA) εντός ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer 1x) στα 100 V για 2h.
 - Προκειμένου να καλυφθούν οι μη-ειδικές θέσεις της μεμβράνης, ακολουθεί επώαση με διάλυμα πρωτεΐνης γάλακτος 10% (blocking buffer) για 45' υπό συνεχή ανακίνηση.
 - Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα (α-νρ39 1:100 εδώ), το οποίο ανιχνεύει τον επίτοπο της μελετούμενης πρωτεΐνης, για 16h στους 4 °C, υπό συνεχή ανακίνηση. Ακολουθούν 3 σύντομες πλύσεις των 5' σε 1x PBS-T.
 - Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα (α-mouse 1:1000 εδώ), που είναι συζευγμένο με την HRP (horseradish peroxidase), για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 5' και 2 πλύσεις των 20' σε 1x PBS-T.
- Στη μεμβράνη προστίθεται το μίγμα του αντιδραστηρίου ECL (GE Healthcare, USA) για 1', καθώς η HRP υπεροξειδάση υπό την επίδραση του ECL παράγει χημειοφωταύγεια. Η χημειοφωταύγεια ανιχνεύεται και μετριέται από το σύστημα απεικόνισης LAS-4000 (Fujifilm, Japan).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

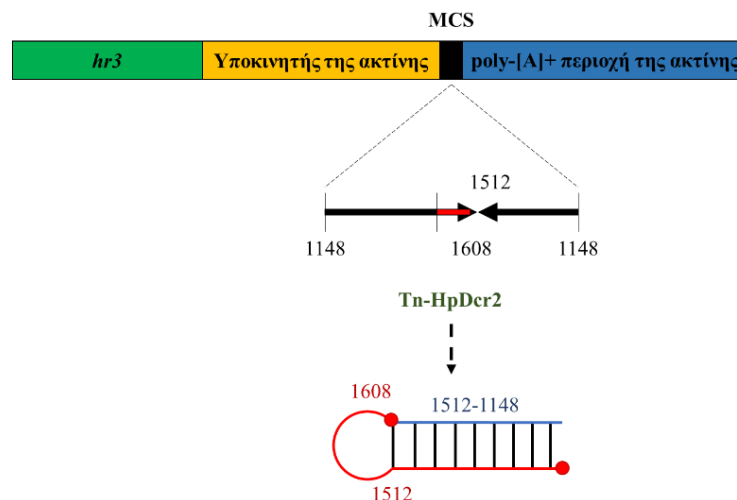
3.1 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *dicer-2* ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ RNAi

Προκειμένου να δημιουργηθούν μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Hi5 και Sf21 όπου θα αποσιωπείται σταθερά το γονίδιο *dicer-2* με τη μέθοδο RNAi, χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική κλωνοποίησης σε ειδικό φορέα έκφρασης (pEA) κατάλληλων αλληλουχιών DNA, οι οποίες έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε τα RNA μετάγραφέ τους να αυτοϋβριδοποιούνται και να σχηματίζουν φουρκέτες που στοχεύουν το γονίδιο εκείνο, με βάση την αλληλουχία του οποίου σχεδιάστηκαν. Έτσι, αξιοποιώντας τον ενεργό RNAi μηχανισμό του κυττάρου, τα RNA αναμένεται να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία μέσα στο κύτταρο ούτως ώστε να αποσιωπήσουν το συμπληρωματικό mRNA-στόχο τους. Ειδικότερα, προβλέπεται ότι η παραγόμενη φουρκέτα θα κατακερματίζεται από τη δράση του ενζύμου Dicer-2 σε μικρά μόρια (siRNA), τα οποία λόγω της συμπληρωματικότητας τους θα υβριδίζουν με το mRNA του *dicer-2* και θα το αποσιωπούν.

3.1.1 Κατασκευή φορέων που παράγουν φουρκέτες έναντι του γονιδίου *dicer-2*

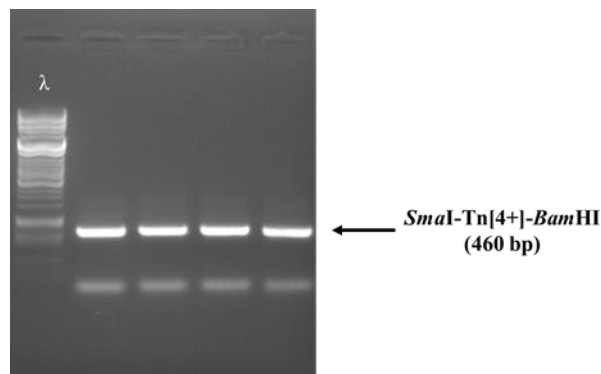
3.1.1.1 Κλωνοποίηση της φουρκέτας Tn-HpDcr2 στο φορέα έκφρασης pEA

Με σκοπό τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς *Trichoplusia ni*, ελαττωματικής ως προς την παραγωγή του γονιδίου *dicer-2*, πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός της φουρκέτας, το DNA της οποίας επρόκειτο να κλωνοποιηθεί στο φορέα pEA. Το κλωνοποιημένο DNA θα διαθέτει αλληλουχία συμπληρωματική σε σχέση με επιλεγμένη περιοχή του γονιδίου *dicer-2*, με αποτέλεσμα όταν αυτό μεταγράφεται να οδηγεί στην παραγωγή ειδικής ως προς το γονίδιο *dicer-2* RNA φουρκέτας (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Σχεδιασμός φουρκέτας, που στοχεύει την περιοχή-στόχο (περιοχή ελικάσης) του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Hi5.

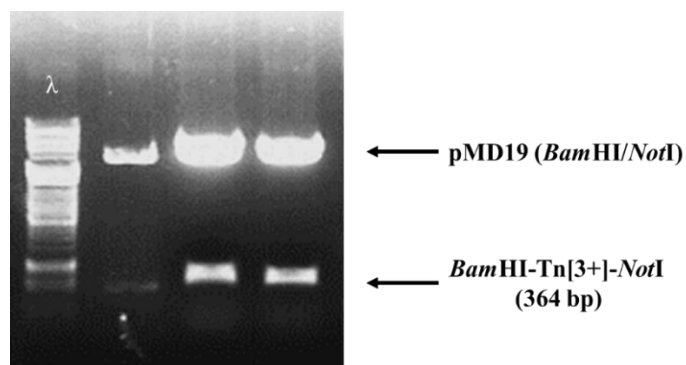
Η διαδικασία κατασκευής του ανασυνδυασμένου φορέα pEA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια κλωνοποίησης. Ειδικότερα, το πρώτο τμήμα της φουρκέτας μήκους 460 βάσεων (Tn[4+]) ενισχύθηκε μέσω PCR από cDNA κυττάρων Hi5, χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές, οι οποίοι στα άκρα του προϊόντος της PCR έφεραν τις κατάλληλες αλληλουχίες περιορισμού (*SmaI* και *BamHI*), ούτως ώστε να είναι εφικτή έπειτα η πέψη τους με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα. Ακολούθησε η πέψη του προϊόντος της αντίδρασης PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI/BamHI*, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, απομόνωση από την πηκτή, και τελικά προέκυψε το κομμάτι *SmaI*-Tn[4+]-*BamHI* (Εικόνα 3.2).



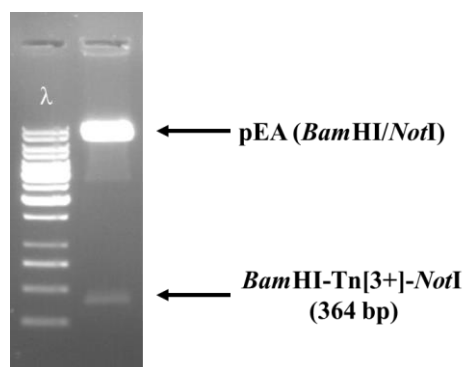
Εικόνα 3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του τμήματος *SmaI*-Tn[4+]-*BamHI*, που προέκυψε από την πέψη των προϊόντων της PCR με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI* και *BamHI*. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε απομόνωση του τμήματος DNA από την πηκτή.

Όσον αφορά το δεύτερο τμήμα της φουρκέτας, αυτό ήταν ήδη κλωνοποιημένο στον ενδιάμεσο φορέα pMD19 (pMD19-Tn[3+]). Συνεπώς, ακολούθησε πέψη του φορέα pMD19-Tn[3+] με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BamHI* και *NotI*, δίνοντας το κομμάτι *BamHI*-Tn[3+]-*NotI* (Εικόνα 3.3). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης του αποφωσφορυλιωμένου φορέα pEA, ο οποίος είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα (*BamHI* και *NotI*), με την αλληλουχία *BamHI*-Tn[3+]-*NotI*, με αποτέλεσμα να προκύψει ο φορέας pEA-Tn[3+] (Εικόνα 3.4). Ακολούθως, έγινε πέψη του νέου φορέα pEA-Tn[3+] με τα ένζυμα *SmaI/BamHI*, αποφωσφορυλίωσή του, και αντίδραση σύνδεσης με την αλληλουχία *SmaI*-Tn[4+]-*BamHI* η οποία έφερε συμπληρωματικά άκρα. Για τον έλεγχο της επιτυχημένης κατασκευής του φορέα που θα παράγει την φουρκέτα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση έπειτα από πέψη ελέγχου με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών *SmaI* και *NotI*, που κόβουν τα άκρα του κομματιού Tn[4+/3+] και άρα απελευθερώνουν το τμήμα DNA που αντιστοιχεί στη φουρκέτα (Εικόνα 3.5). Τελικά, ο ανασυνδυασμένος φορέας που φέρει και τα δύο κομμάτια Tn[4+]

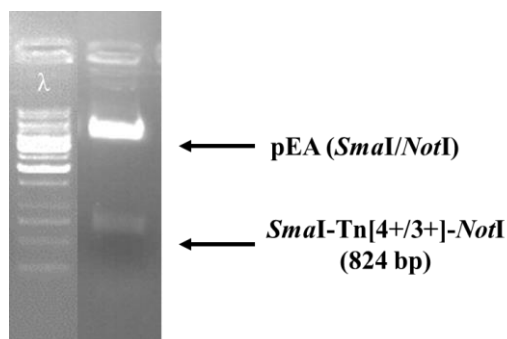
και Tn[3+], από τα οποία προβλέπεται να σχηματιστεί η φουρκέτα στο κύτταρο, αλληλουχήθηκε ώστε να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια των κλωνοποιημένων αλληλουχιών και ονομάστηκε pEA-Tn-HpDcr2.



Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του φορέα pMD19-Tn[3+] που έχει υποστεί πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Not*I. Η ζώνη μεγέθους 364 βάσεων, που αντιστοιχεί στο κομμάτι *Bam*HI-Tn[3+]-*Not*I, μετά την ηλεκτροφόρηση απομονώθηκε και καθαρίστηκε.



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης της αντίδρασης πέψης ελέγχου του φορέα pEA-Tn[3+], με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Not*I. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης υποδεικνύει την επιτυχή ενσωμάτωση της αλληλουχίας Tn[3+] στο φορέα pEA.

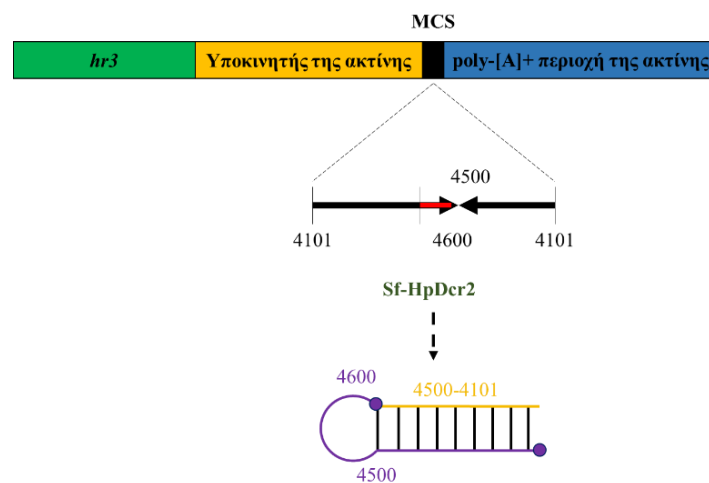


Εικόνα 3.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης της αντίδρασης πέψης ελέγχου του φορέα pEA-Tn[4+/3+] (δηλαδή pEA-Tn-HpDcr2) με τα περιοριστικά ένζυμα *Sma*I και *Not*I. Παρατηρείται η παρουσία της ζώνης που αναλογεί στο κομμάτι *Sma*I-Tn[4+/3+]-*Not*I.

Ο κατασκευασμένος φορέας έπειτα από βακτηριακό μετασχηματισμό, καλλιέργεια και απομόνωση, χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων Hi5, με σκοπό τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς. Επιπλέον, τα κύτταρα Hi5 διαμολύνθηκαν με το βοηθητικό φορέα pBmIE1 και το πλασμίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη, pEA.pac (βλ. §2.2.3.3). Ωστόσο, έπειτα από τακτική παρακολούθηση μερικών εβδομάδων, παρατηρήθηκε πως τα διαμολυσμένα κύτταρα δεν επιβίωσαν, συνεπώς η διαδικασία αυτή δεν ολοκληρώθηκε επιτυχώς.

3.1.1.2 Κλωνοποίηση της φουρκέτας Sf-HpDcr2 στο φορέα έκφρασης pEA

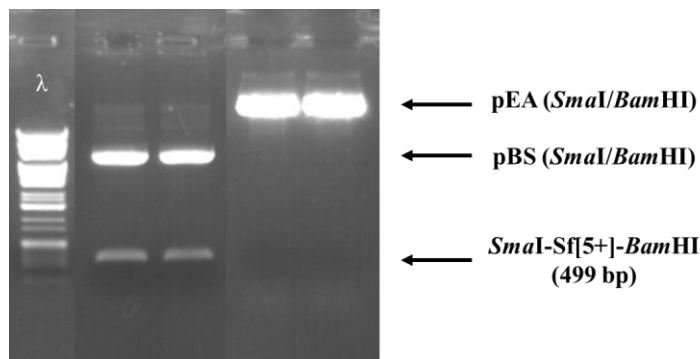
Με σκοπό τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς *Spodoptera frugiperda*, ελαττωματικής ως προς την παραγωγή του γονιδίου *dicer-2*, προηγήθηκε ο σχεδιασμός αλληλουχίας συμπληρωματικής με αυτή του *dicer-2*, η οποία όταν μεταγράφεται θα οδηγεί στην παραγωγή ειδικής RNA φουρκέτας. Το DNA που αντιστοιχεί στη φουρκέτα επρόκειτο να κλωνοποιηθεί στο φορέα έκφρασης pEA, ούτως ώστε να προκύψει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pEA-Sf-HpDcr2 (Εικόνα 3.6).



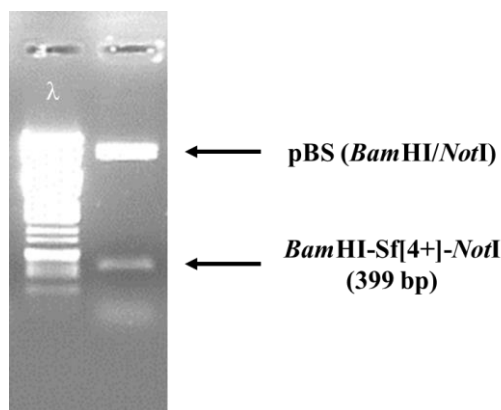
Εικόνα 3.6. Σχεδιασμός φουρκέτας, που στοχεύει την περιοχή-στόχο (Ribo c) του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Sf21.

Η διαδικασία κατασκευής του ανασυνδυασμένου φορέα pEA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια κλωνοποίησης. Ειδικότερα, το πρώτο τμήμα της φουρκέτας μήκους 499 βάσεων (Sf[5+]) ήταν ήδη κλωνοποιημένο στον ενδιάμεσο φορέα pBS (pBluescript) υπό τη μορφή του ανασυνδυασμένου φορέα pBS-Sf[5+]. Το δεύτερο τμήμα της φουρκέτας μήκους 399 βάσεων (Sf[4+]) ήταν κλωνοποιημένο ομοίως στον ίδιο φορέα ως pBS-Sf[4+]. Συνεπώς, ακολούθησε η πέψη του φορέα pBS-Sf[5+] με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες

*Sma*I και *Bam*HI, δίνοντας το κομμάτι *Sma*I-Sf[5+]-*Bam*HI (Εικόνα 3.7). Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η πέψη του φορέα pBS-Sf[4+] με τα περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI και *Not*I, δίνοντας το κομμάτι *Bam*HI-Sf[4+]-*Not*I (Εικόνα 3.8).



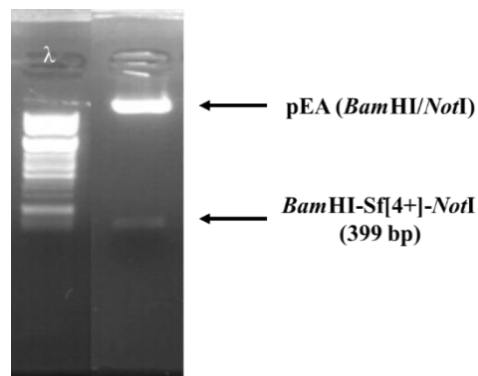
Εικόνα 3.7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των φορέων pBS-Sf[5+] και pEA, που έχουν υποστεί πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Sma*I και *Bam*HI. Η ζώνη μεγέθους 499 βάσεων, που αντιστοιχεί στο κομμάτι *Sma*I-Sf[5+]-*Bam*HI, μετά την ηλεκτροφόρηση απομονώθηκε και καθαρίστηκε.



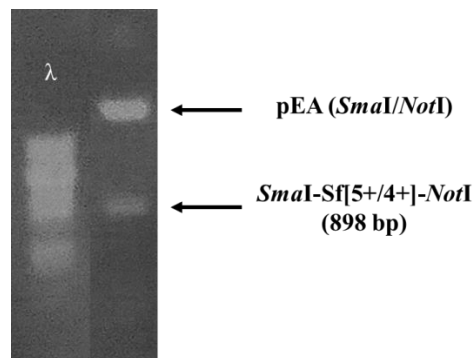
Εικόνα 3.8. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του φορέα pBS-Sf[4+], που έχει υποστεί πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Not*I. Η ζώνη μεγέθους 399 βάσεων, που αντιστοιχεί στο κομμάτι *Bam*HI-Sf[4+]-*Not*I, μετά την ηλεκτροφόρηση απομονώθηκε, καθαρίστηκε και μεταφέρθηκε στον αποφωσφορυλιωμένο φορέα pEA, που είχε κοπεί από τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης του αποφωσφορυλιωμένου φορέα pEA, ο οποίος είχε κοπεί με τα ίδια ένζυμα (*Bam*HI και *Not*I), με την αλληλουχία *Bam*HI-Sf[4+]-*Not*I, με αποτέλεσμα να προκύψει ο φορέας pEA-Sf[4+] (Εικόνα 3.9). Ακολούθως, έγινε πέψη του νέου φορέα pEA-Sf[4+] με τα ένζυμα *Sma*I/*Bam*HI, αποφωσφορυλίωσή του, και αντίδραση σύνδεσης με την αλληλουχία *Sma*I-Sf[5+]-*Bam*HI

η οποία έφερε συμπληρωματικά άκρα. Για τον έλεγχο της επιτυχημένης κατασκευής του φορέα που θα παράγει την φουρκέτα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση έπειτα από πέψη ελέγχου με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών *SmaI* και *NotI*, που κόβουν τα άκρα του κομματιού Sf[5+/4+] και άρα απελευθερώνουν το τμήμα DNA που αντιστοιχεί στη φουρκέτα (**Εικόνα 3.10**). Τελικά, ο ανασυνδυασμένος φορέας που φέρει και τα δύο κομμάτια Sf[5+] και Sf[4+], από τα οποία θα σχηματιστεί η φουρκέτα στο κύτταρο, αλληλουχίθηκε ώστε να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια των κλωνοποιημένων αλληλουχιών, και ονομάστηκε pEA-Sf-HpDcr2.



Εικόνα 3.9. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης της αντίδρασης πέψης ελέγχου του φορέα pEA-Sf[4+], με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *NotI*.



Εικόνα 3.10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης της αντίδρασης πέψης ελέγχου του φορέα pEA-Sf[5+/4+] (δηλαδή pEA-Sf-HpDcr2) με τα περιοριστικά ένζυμα *SmaI* και *NotI*.

Ο κατασκευασμένος φορέας έπειτα από βακτηριακό μετασχηματισμό, καλλιέργεια και απομόνωση, χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό κυττάρων Sf21, με σκοπό τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς.

3.1.2 Δημιουργία μετασηματισμένων κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 και Sf-HpLuc

Ο ανασυνδυασμένος φορέας pEA-Sf-HpDcr2 χρησιμοποιήθηκε για το μετασηματισμό κυτταρικών σειρών Sf21, οι οποίες διαμολύνθηκαν ταυτόχρονα επίσης με το βοηθητικό φορέα pBmIE1, καθώς και το φορέα που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη, pEA.pac, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3.3. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες διαμολύνσεις για τη δημιουργία κυτταρικής σειράς-μάρτυρα, όπου θα κωδικοποιείται RNA φουρκέτα με στόχο το μη ενδογενές γονίδιο της λουσιφεράσης (HpLuc). Συγκεκριμένα, τα κύτταρα Sf21 διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEA-HpLuc, pBmIE1 και pEA.pac. Το γονίδιο της λουσιφεράσης, προερχόμενο από την πυγολαμπίδα, χρησιμοποιείται συχνά ως ευαίσθητος γενετικός μάρτυρας σε διάφορους τύπους κυττάρων (Leskinen et al., 2003).

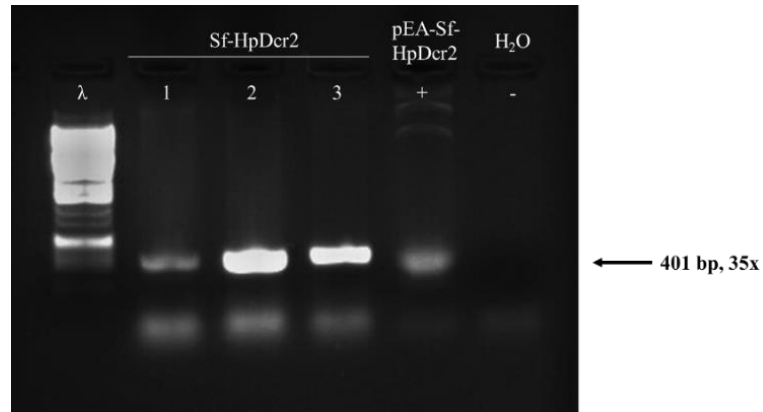
Και στις δύο περιπτώσεις σταθερού μετασηματισμού (pEA-Sf-HpDcr2 ή pEA-HpLuc), τα κύτταρα παρακολουθούνταν και ανακαλλιεργούνταν, έως ότου γίνει επιτυχώς η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων παρουσία πουρομυκίνης (5 µg/ml για 5-7 εβδομάδες). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο επιτυχής μετασηματισμός των κυττάρων Sf21 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, κατόπιν της διαδικασίας επιλογής των κυττάρων ακολούθησε έλεγχός τους, τόσο σε επίπεδο γονιδιώματος, όσο και σε επίπεδο μεταγραφώματος.

3.1.2.1 Έλεγχος σε επίπεδο γονιδιώματος

Για τον έλεγχο των μετασηματισμένων κυτταρικών σειρών, αρχικά ελέγχθηκε η ύπαρξη του διαγονιδίου, που ευθύνεται για την παραγωγή φουρκέτας έναντι είτε του γονιδίου *dicer-2* (Sf-HpDcr2) στα κύτταρα Sf21-HpDcr2, είτε του γονιδίου της λουσιφεράσης (HpLuc), σε επίπεδο DNA. Τα πλασμίδια, με τα οποία διαμολύνθηκαν οι κυτταρικές σειρές πρέπει να διατηρούνται στα κύτταρα και να παράγουν την επιθυμητή πληροφορία. Για τον λόγο αυτό, απομονώθηκε DNA από τα μετασηματισμένα κύτταρα που συλλέχθηκαν, το οποίο διαλύθηκε σε ddH₂O.

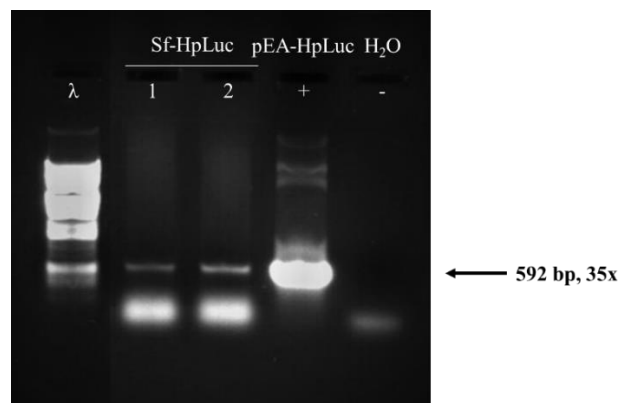
Ακολούθησε αντίδραση PCR για τον έλεγχο της ύπαρξης του εκάστοτε διαγονιδίου στα DNA των κυτταρικών σειρών, με το πέρας της οποίας τα τελικά προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Ειδικότερα, αρχικά ελέγχθηκε η παρουσία του διαγονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της φουρκέτας Sf-HpDcr2 στα σταθερά μετασηματισμένα κύτταρα Sf21 (**Εικόνα 3.11**). Όπως φαίνεται, η διαμόλυνση και η

διατήρηση του πλασμιδίου, που παράγει τη φουρκέτα για το γονίδιο *dicer-2* στα κύτταρα Sf21 πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, καθώς το εν λόγω διαγονίδιο εντοπίστηκε σε όλα τα δείγματα, που αντιστοιχούν σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2, με ένα μικρότερο ποσοστό στο πρώτο δείγμα.



Εικόνα 3.11. Έλεγχος παρουσίας της φουρκέτας Sf-HpDcr2 σε επίπεδο DNA στα μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (pEA-Sf-HpDcr2) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Αντίστοιχα, στην PCR για το διαγονίδιο της φουρκέτας της λουσιφεράσης, παρατηρήθηκε ενίσχυση των ζωνών που αντιστοιχούν στο επιθυμητό προϊόν της PCR για τις κυτταρικές σειρές Sf21-HpLuc (1 και 2) (**Εικόνα 3.12**), και συνεπώς διαπιστώθηκε η παρουσία του διαγονιδίου της φουρκέτας HpLuc, στις κυτταρικές σειρές Sf-HpLuc 1 και 2.



Εικόνα 3.12. Έλεγχος παρουσίας της φουρκέτας HpLuc σε επίπεδο DNA στα μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21-HpLuc. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (pEA-HpLuc) και ο αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Συνεπώς, σύμφωνα με τον έλεγχο σε επίπεδο γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του DNA των φουρκετών Sf-HpDcr2 και HpLuc στις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Sf21.

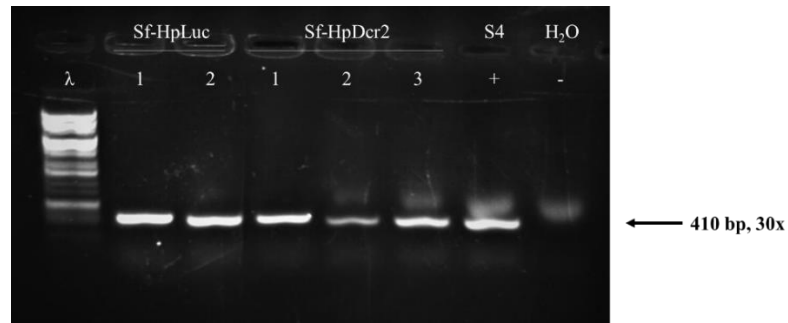
3.1.2.2 Έλεγχος σε επίπεδο μεταγραφώματος

Αφού αποδείχθηκε η παρουσία των διαγονιδίων Sf-HpDcr2 και HpLuc στο γονιδίωμα των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών, επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός της έκφρασής τους σε επίπεδο μεταγραφώματος. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη, ώστε να ελεγχθεί εάν τα διαγονίδια παράγουν το επιθυμητό προϊόν.

Ακολούθησε λοιπόν, απομόνωση RNA από τα κύτταρα των μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του αντιδραστηρίου Nucleozol. Τα RNA στην συνέχεια, φωτομετρήθηκαν στην συσκευή NanoDrop και υποβλήθηκαν σε αντίστροφη μεταγραφή. Κατόπιν, τα cDNA που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία σε αντιδράσεις PCR, οι οποίες σχεδιάστηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της φουρκέτας έναντι του γονιδίου *dicer-2* και έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, του ίδιου του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Sf21 Sf-HpDcr2, καθώς και του γονιδίου αναφοράς της α -τουμπουλίνης,

▪ Έλεγχος έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης

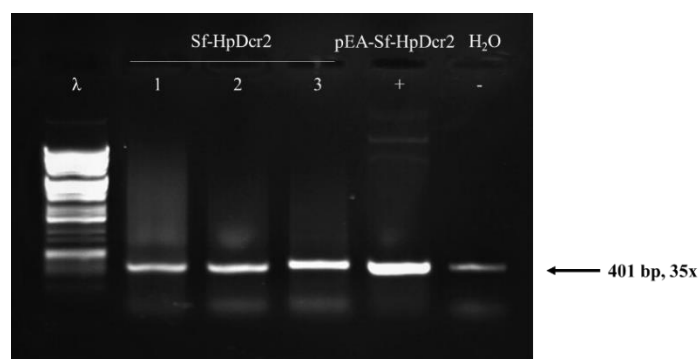
Οι τουμπουλίνες ανήκουν στην οικογένεια ευκαρυωτικών, δομικών γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων, οι οποίοι αποτελούν βασικά συστατικά του κυτταροσκελετού, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση, το σχήμα του κυττάρου, την κινητικότητα του και την ενδοκυτταρική διακίνηση (Nielsen et al., 2010). Το επιλεγμένο γονίδιο της α -τουμπουλίνης, καθώς λοιπόν αποτελεί βασικό γονίδιο του κυτταροσκελετού, αναμένεται να εκφράζεται σταθερά σε μεγάλο βαθμό από τις κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα, επιλέγεται ως γονίδιο αναφοράς, με σκοπό την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίου, τα οποία ελέγχονται μέσω PCR, σε σχέση με αυτό. Όπως παρατηρείται, υπάρχει ικανοποιητική έκφραση του γονιδίου της α -τουμπουλίνης σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν, συνεπώς σε όλες τις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Sf21 που κατασκευάστηκαν εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα το βασικό αυτό γονίδιο (**Εικόνα 3.13**).



Εικόνα 3.13. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α-τουμπουλίνης σε δείγματα cDNA από τις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 και Sf-HpLuc. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας που αντιστοιχεί σε μη διαμολυσμένα κύτταρα Sf21 και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

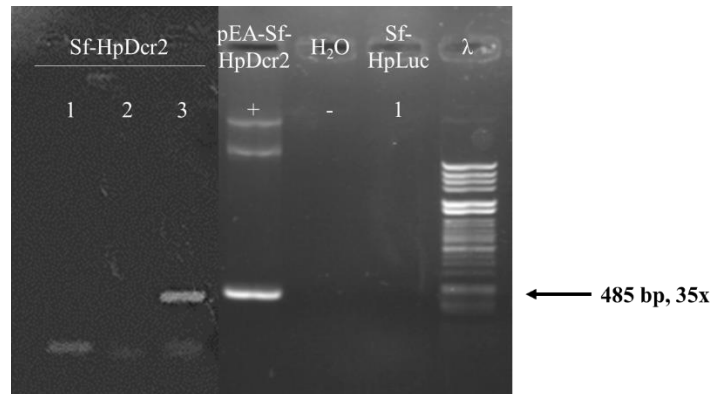
▪ Έλεγχος έκφρασης της φουρκέτας Sf-HpDcr2

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση της φουρκέτας Sf-HpDcr2 στα αντίστοιχα μετασηματισμένα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR, όπου διαπιστώθηκε ότι όλα τα δείγματα εκφράζουν την επιθυμητή φουρκέτα (**Εικόνα 3.14**). Ωστόσο, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στοχεύουν εντός του γονιδίου *dicer-2*, και συνεπώς θα μπορούσαν πιθανόν να υβριδίζουν με το ενδογενές γονίδιο *dicer-2* και όχι με το διαγονίδιο Sf-HpDcr2. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O) παρουσιάζει επιμόλυνση με τη μορφή ζώνης μικρής έντασης στο ίδιο μέγεθος με τα υπόλοιπα δείγματα, η οποία μπορεί να προέκυψε ως αποτέλεσμα πιθανής επιμόλυνσης από το διπλανό βοθρίο κατά τη φόρτωση.



Εικόνα 3.14. Έλεγχος της έκφρασης της φουρκέτας Sf-HpDcr2 σε δείγματα cDNA από μετασηματισμένα κύτταρα Sf21. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (pEA-SfHpDcr2) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Προς επαλήθευση των ανωτέρω αποτελεσμάτων, σχεδιάστηκε νέα αντίδραση PCR για τα ίδια δείγματα, με χρήση νέου ζεύγους εκκινητών, από τους οποίους ο εκκινητής πρόσθιας κατεύθυνσης στοχεύει εντός του ενθέματος (Sf-HpDcr2 BamHI F), ενώ ο δεύτερος σε πλασμιδιακή αλληλουχία που βρίσκεται ακριβώς μετά το ένθεμα (Actin R), με αποτέλεσμα να αναμένεται ενίσχυση αποκλειστικά του εκφραζόμενου διαγονιδίου Sf-HpDcr2 (**Εικόνα 3.15**).

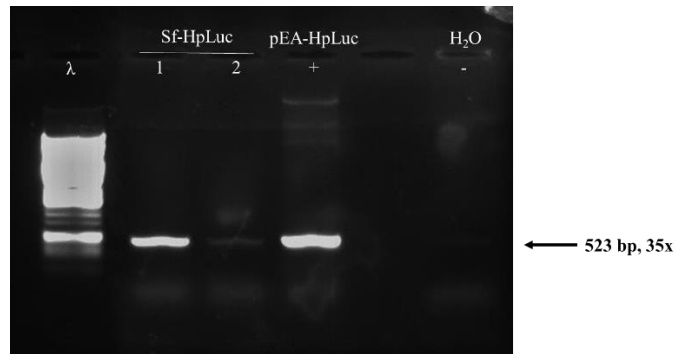


Εικόνα 3.15. Έλεγχος της έκφρασης της φουρκέτας Sf-HpDcr2 σε δείγματα cDNA από μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21, με χρήση νέου ζεύγους εκκινητών. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (pEA-Sf-HpDcr2) και δύο αρνητικοί μάρτυρες (ddH₂O και Sf-HpLuc 1). Η χρήση δείγματος cDNA από την κυτταρική σειρά Sf-HpLuc 1 ως αρνητικού μάρτυρα εξυπηρετεί στον έλεγχο των κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 ως προς την έκφραση του σωστού διαγονιδίου.

Συνδυαστικά, από τα αποτελέσματα των **Εικόνων 3.14** και **3.15** διαπιστώνεται πως μόνο η τρίτη κυτταρική σειρά έδωσε θετικό αποτέλεσμα και στις δύο αντιδράσεις PCR, άρα κρίνεται ως καταλληλότερη για τη συνέχιση των πειραμάτων.

▪ Έλεγχος έκφρασης της φουρκέτας HpLuc

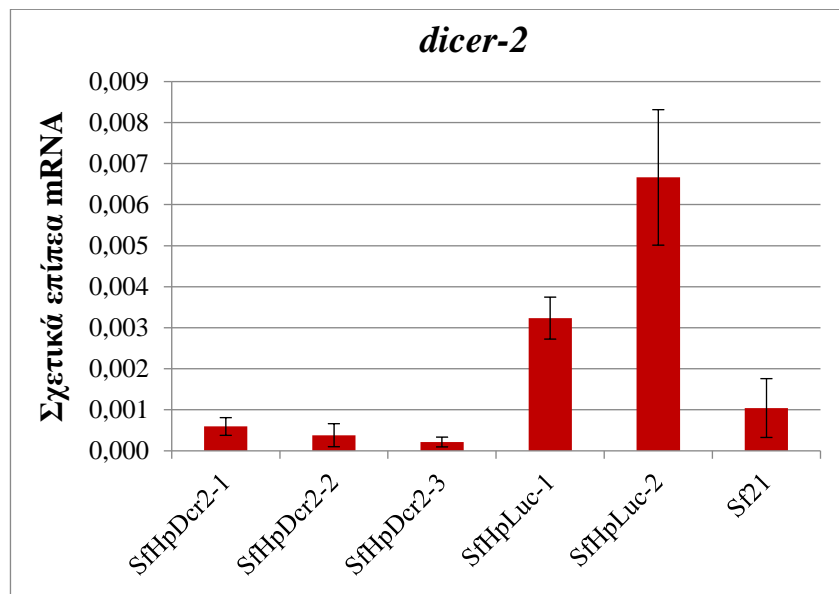
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης της φουρκέτας Hp-Luc από κυτταρικές σειρές Sf-HpLuc μέσω αντίδρασης PCR (**Εικόνα 3.16**). Στα δείγματα των κυττάρων Sf-HpLuc 1 και 2 διαπιστώθηκε έκφραση της φουρκέτας Hp-Luc, ωστόσο σε πολύ μικρότερο ποσοστό στο δείγμα Sf-HpLuc 2. Οι κυτταρικές σειρές Sf-HpLuc φαίνεται να μετασχηματίστηκαν επιτυχώς, φέροντας και παράγοντας την φουρκέτα της λουσιφεράσης, ωστόσο λόγω των αποτελεσμάτων ελέγχου σε επίπεδο μεταγραφώματος η κυτταρική σειρά Sf-HpLuc 1 κρίνεται ως καταλληλότερη για τη συνέχιση των πειραμάτων σε σύγκριση με τα κύτταρα Sf-HpDcr2.



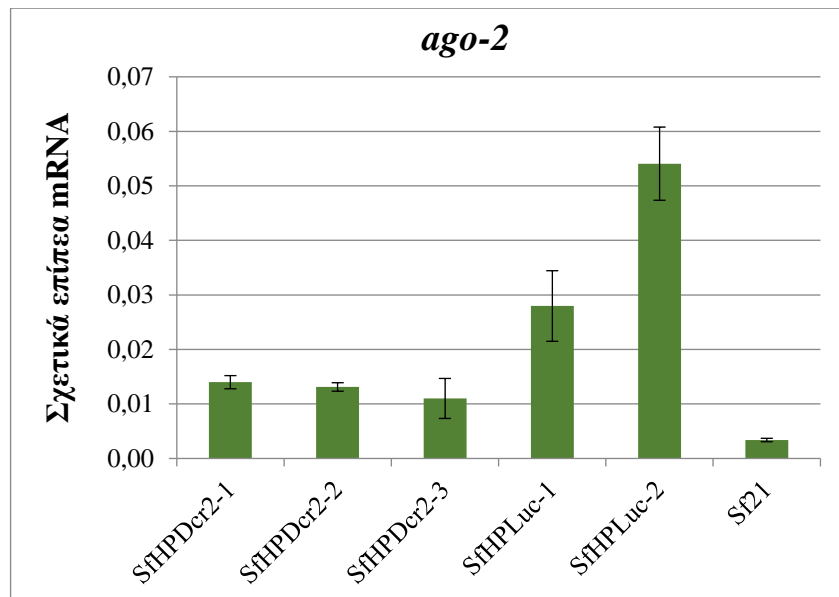
Εικόνα 3.16. Έλεγχος της έκφρασης της φουρκέτας HpLuc σε δείγματα cDNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα Sf-HpLuc. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (pEA-HpLuc) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

- Έλεγχος έκφρασης των γονιδίων *dicer-2* και *ago-2*

Η έκφραση τόσο του γονιδίου *dicer-2*, όσο και του γονιδίου *ago-2*, εξετάστηκε μέσω αντίδρασης qRT-PCR στις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 και Sf-HpLuc, καθώς και στα κύτταρα Sf21, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς την *α-τουμπουλίνη* (Εικόνες 3.17-3.18).



Εικόνα 3.17. Έλεγχος των επιπέδων mRNA του γονιδίου *dicer-2* στις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 και Sf-HpLuc. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της *α-τουμπουλίνης*. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Sf21) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι (±SE) δύο επαναλήψεων της αντίδρασης qRT-PCR για κάθε δείγμα.



Εικόνα 3.18. Έλεγχος των επιπέδων mRNA του γονιδίου *ago-2* στις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 και Sf-HpLuc. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της α -τουμπουλίνης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Sf21) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι (\pm SE) δύο επαναλήψεων της αντίδρασης qRT-PCR για κάθε δείγμα.

Παρατηρείται πως το γονίδιο *dicer-2* εκφράζεται σε πολύ μικρότερο ποσοστό στις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές Sf-HpLuc και τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21. Ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση παρουσιάζεται στη δεύτερη και την τρίτη κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2, ενώ εντοπίζεται επίσης μειωμένη έκφραση του γονιδίου *dicer-2* στην πρώτη κυτταρική σειρά Sf-HpLuc, σε σχέση με τη δεύτερη κυτταρική σειρά. Με την πραγματοποίηση της αντίδρασης qRT-PCR αποδείχθηκε τελικά η επιτυχής εξασθένηση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* στις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2.

Όσον αφορά το γονίδιο *ago-2*, αυτό επίσης εκφράζεται σε μικρότερο ποσοστό στις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές Sf-HpLuc, ακολουθώντας παρόμοια πρότυπα έκφρασης με το γονίδιο *dicer-2*. Ωστόσο σημειώνεται υψηλότερη έκφρασή του στις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 σε σχέση με τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην εξασθένηση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2*, με σκοπό να επανέλθει μια είδους ισορροπία. Τέλος παρατηρείται και εδώ ότι μεταξύ των κυτταρικών σειρών Sf-HpLuc, η πρώτη σειρά έχει μειωμένα επίπεδα έκφρασης του *ago-2*.

Με βάση τα παραπάνω συνοψίζεται πως η φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*, έχει επιδράσει σε μεγάλο βαθμό στις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2-2 και Sf-HpDcr2-3, με

αποτέλεσμα να παρατηρείται πολύ χαμηλή έκφραση του γονιδίου αυτού. Διαπιστώθηκε συνεπώς, ότι η καταλληλότερη σειρά για τη συνέχιση των πειραμάτων είναι η Sf-HpDcr2-3, καθώς παρατηρείται μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης των γονιδίων *dicer-2* και *ago-2* σε αυτή την κυτταρική σειρά, άρα και αποτελεσματικότερη αποσιώπηση.

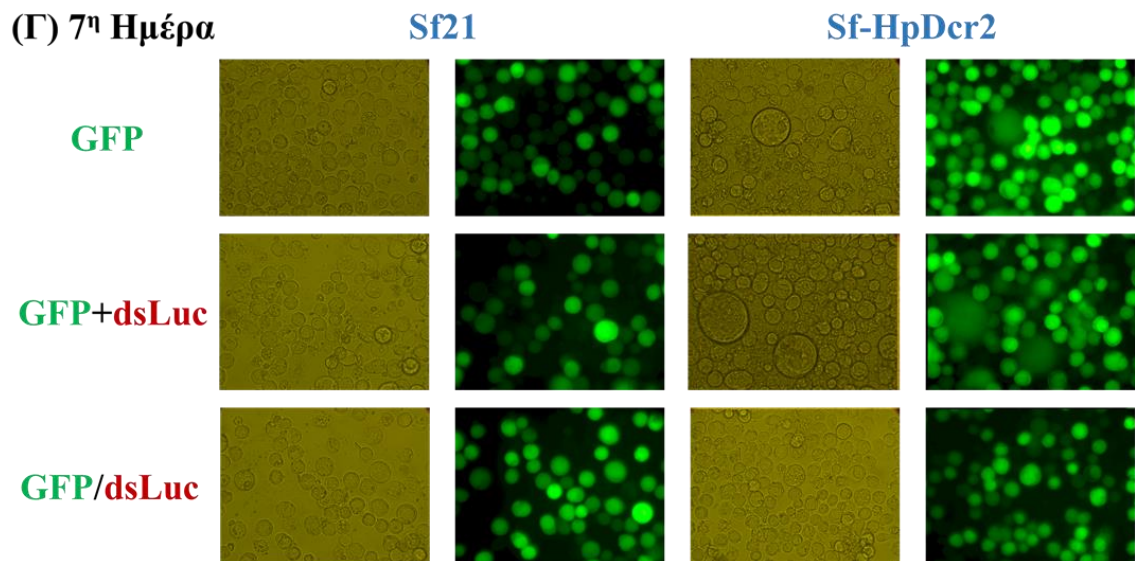
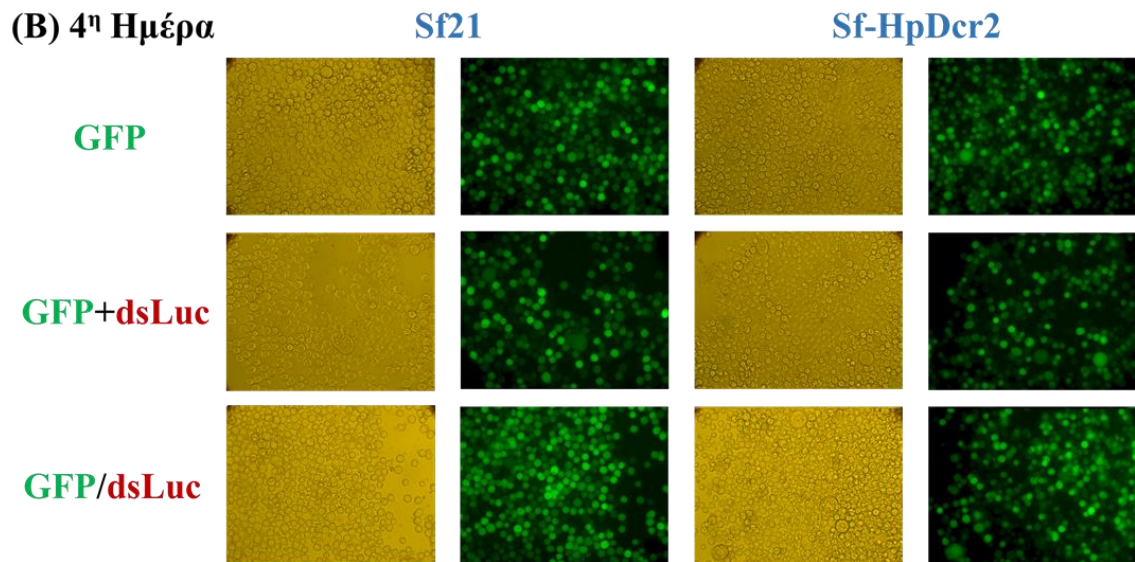
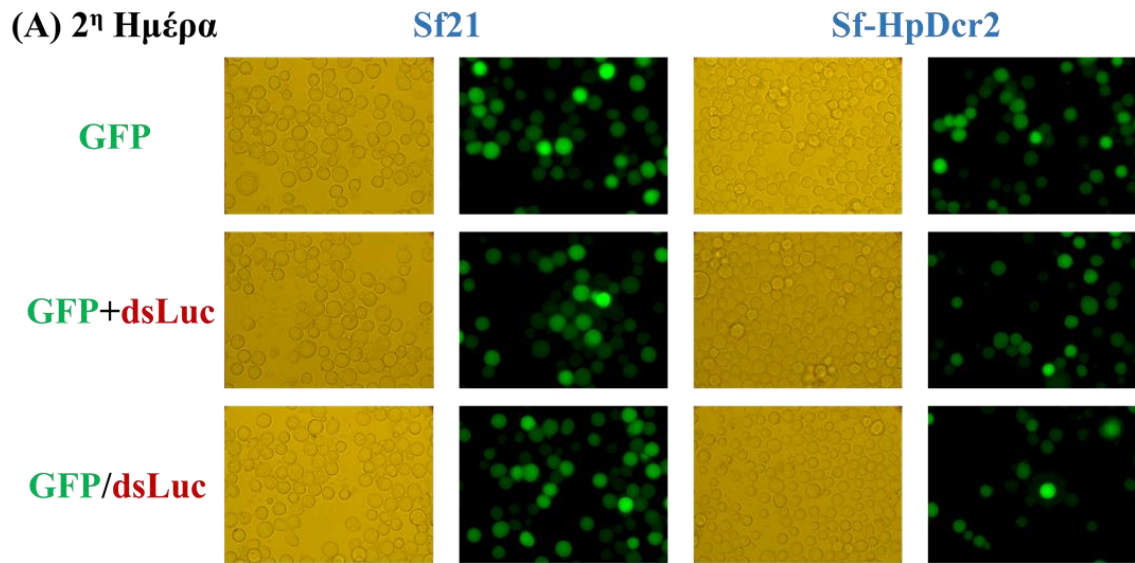
3.1.3 Απόκριση μετασηματισμένων κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 σε ιούς που υπερπαράγουν την πρωτεΐνη GFP και/ή dsRNA

Τα μετασηματισμένα κύτταρα Sf-HpDcr2-3, που επιλέχθηκαν ως τα καταλληλότερα από την άποψη επίδρασης σε αυτά του μηχανισμού RNAi, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια, για μολύνσεις με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς AcMNPV που υπερπαράγουν δίκλινα RNA (dsRNA). Συγκεκριμένα έγιναν μολύνσεις με: α) τον ιό AcMNPV που περιέχει το ORF της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP (AcMNPV-GFP, ιός μάρτυρας), β) συνδυασμό των ιών AcMNPV που παράγουν τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP και τη φουρκέτα έναντι της λουσιφεράσης dsLuc (AcMNPV-GFP, AcMNPV-dsLuc) και γ) τον ιό AcMNPV, ο οποίος εκφράζει τόσο τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP όσο και τη φουρκέτα της λουσιφεράσης dsLuc (AcMNPV-GFP/dsLuc).

Η παραγωγή της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης κάτω από ακτινοβολία UV, υποδεικνύει τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό, ενώ η παρουσία ή όχι της φουρκέτας dsLuc αποτελεί έμμεσα σημείο ελέγχου των επιπέδων έκφρασης/αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* από τα κύτταρα. Καθώς λοιπόν, το ένζυμο Dicer-2 προκαλεί τον κατακερματισμό μορίων dsRNA, αναμένεται η κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2 να μην προκαλέσει κατακερματισμό του dsLuc αφού γίνει η μόλυνση, διότι η έκφραση του γονιδίου *dicer-2* θα μειορρυθμίζεται σε αυτή την κυτταρική σειρά.

Μετά τη μόλυνση, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 28 °C για 7 ημέρες παρουσία γενταμικίνης (50 μg/μL) για αποφυγή βακτηριακής επιμόλυνσης, κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε καθημερινή μικροσκόπηση και συλλογή των κυττάρων κατά την πρώτη, την δεύτερη, την τέταρτη και την έβδομη ημέρα.

Κατά την πρώτη ημέρα της μόλυνσης παρατηρήθηκαν κύτταρα με φυσιολογικό σχήμα, χωρίς την παρουσία διογκώσεων ή χαρακτηριστικών «ουρών», όπως και την δεύτερη ημέρα στο λευκό φως. Ωστόσο υπό φως UV, διαπιστώνεται πως τα κύτταρα την δεύτερη ημέρα άρχισαν να παρουσιάζουν πράσινο φθορισμό, ο οποίος οφείλεται στην πρωτεΐνη GFP που παράγεται από τους ιούς. Η παρουσία διογκωμένων κυττάρων παρατηρήθηκε κατά την τέταρτη ημέρα και κυρίως στην κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2. Το



Εικόνα 3.19. Κύτταρα Sf21 και Sf-HpDcr2 μολυσμένα με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV. Παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες από: Α) τη 2^η ημέρα (Μεγέθυνση 40x), Β) την 4^η ημέρα (Μεγέθυνση 20x) και Γ) την 7^η ημέρα (Μεγέθυνση 40x) μετά τη μόλυνση.

ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων φαίνεται στο φως UV και σημειώνεται επίσης ως πολύ υψηλό. Τέλος, την έβδομη ημέρα διαπιστώθηκε πως τα κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών παρουσίασαν αλλοιωμένα σχήματα, με τα κύτταρα Sf-HpDcr2 να φέρουν έντονες διογκώσεις (**Εικόνα 3.19**). Μετά τη συλλογή των μολυσμένων κυττάρων, έγινε ο διαχωρισμός του υπερκείμενου (supernatant) από το κυτταρικό ίζημα, το οποίο στη συνέχεια διαχωρίστηκε σε διαλυτό (soluble) και μη διαλυτό (insoluble) κυτταρικό κλάσμα. Το διαλυτό κυτταρικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκε ακολούθως για πειράματα απομόνωσης RNA από τα κύτταρα που λύθηκαν, ενώ από το μη διαλυτό κυτταρικό κλάσμα πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA των κυττάρων. Ακόμη, το υπερκείμενο των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πρωτεϊνών του ιού. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα, με απώτερο σκοπό τον έλεγχο της ποσότητας και της επίδρασης του ιού ανά ημέρα, αλλά και την εκτίμηση των επιπέδων του συνολικού περιεχομένου των κυττάρων σε dsRNA.

3.1.3.1 Μέτρηση του παραγόμενου φθορισμού από τα μολυσμένα κύτταρα Sf21 και Sf-HpDcr2

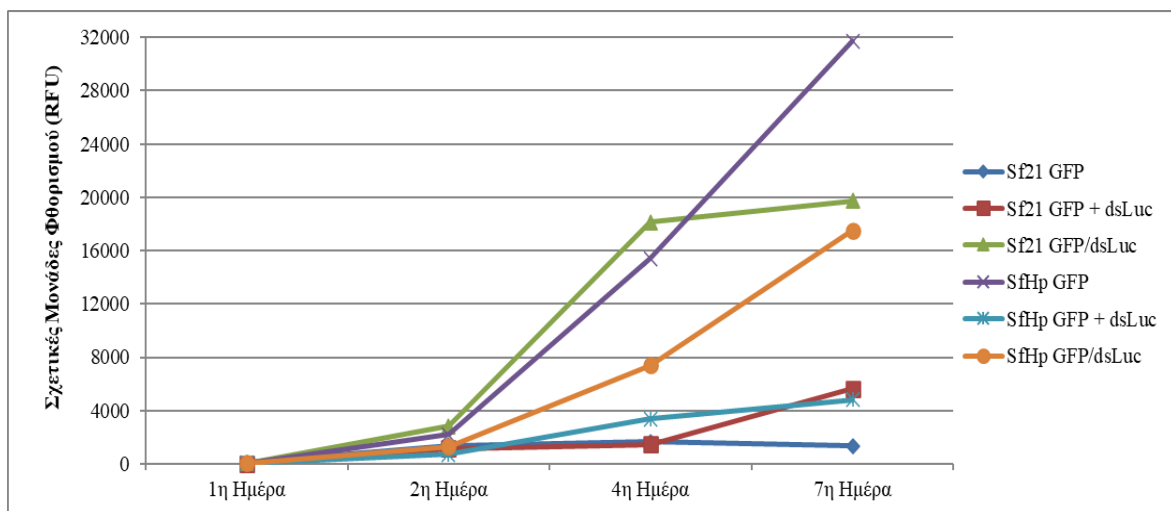
Όπως προαναφέρθηκε, το επίπεδο φθορισμού που παράγεται μέσω της πρωτεΐνης GFP είναι ενδεικτικό των κυττάρων που μολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο ιό. Με σκοπό τον έλεγχο και τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας μόλυνσης των κυτταρικών σειρών Sf21 και Sf-HpDcr2 από τους ιούς που προαναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του εκλυόμενου φθορισμού, τόσο από τα διαλυτά κυτταρικά κλάσματα, όσο και από το υπερκείμενο των μολυσμένων κυττάρων, μέσω της συσκευής Infinite M200 TECAN σε πλάκα μικροτιτλοδότησης των 96 θέσεων.

Τα τελικά αποτελέσματα από τη μέτρηση του φθορισμού των διαλυτών κυτταρικών κλασμάτων παρουσιάζονται κανονικοποιημένα σε σχέση με την τιμή «θορύβου» που αντιστοιχεί στο PBS, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (**Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.20**). Όπως παρατηρείται, ο φθορισμός αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που υποδεικνύει ότι ανά ημέρα μολύνονταν ολοένα και περισσότερα κύτταρα. Τη μόνη εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα Sf21 που ήταν μολυσμένα με τον ιό που εκφράζει GFP, όπου και παρατηρείται χαμηλότερο επίπεδο φθορισμού την έβδομη ημέρα. Ωστόσο,

παρατηρείται πως τα κύτταρα Sf-HpDcr2 που είχαν μολυνθεί με τον ίδιο ιό εμφανίζουν πολύ υψηλές τιμές φθορισμού.

ΔΙΑΛΥΤΟ ΚΛΑΣΜΑ	Ημέρα 1 ^η (RFU)	Ημέρα 2 ^η (RFU)	Ημέρα 4 ^η (RFU)	Ημέρα 7 ^η (RFU)
Sf21 GFP	91,6	1367,8	1659,3	1337,8
Sf21 GFP + dsLuc	31,3	1161,9	1470,8	5641,1
Sf21 GFP/dsLuc	57,5	2843,8	18135,0	19735,0
SfHp GFP	64,9	2210,9	15411,0	31741,0
SfHp GFP + dsLuc	37,5	717,9	3358,3	4817,1
SfHp GFP/dsLuc	61,5	1318,7	7393,4	17496,0

Πίνακας 3.1. Ο φθορισμός που παράγεται από τα διαλυτά κλάσματα των κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 (SfHp εδώ).



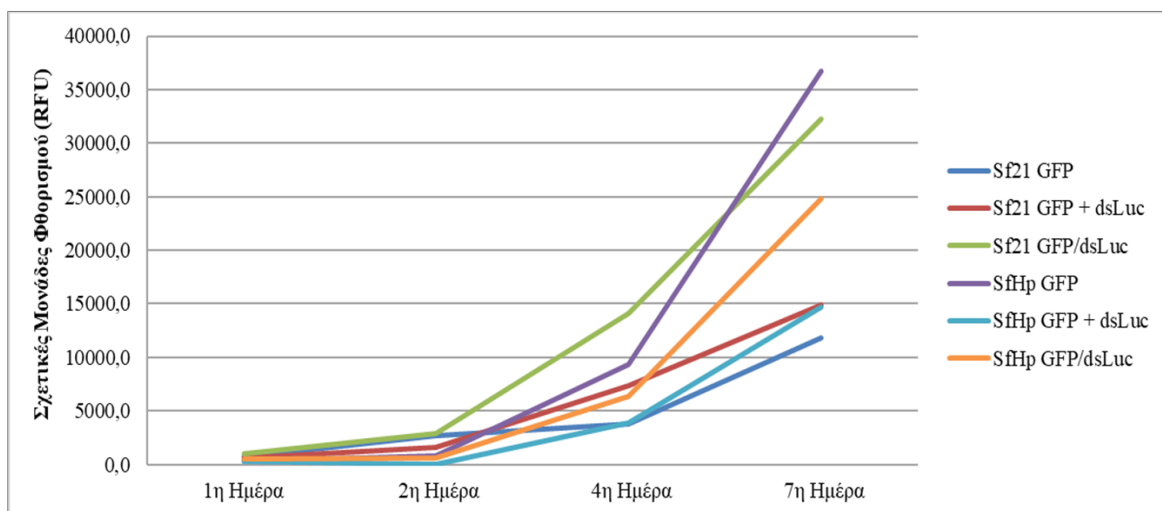
Εικόνα 3.20. Διαγραμματική απεικόνιση της διακύμανσης του φθορισμού στα διαλυτά κλάσματα των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 (SfHp).

Ακολούθησε έλεγχος του παραγόμενου φθορισμού από το υπερκείμενο των κυττάρων, προκειμένου τα αποτελέσματα να αξιολογηθούν σε συνδυασμό με τις τιμές φθορισμού που προέκυψαν από τα δείγματα του διαλυτού κυτταρικού κλάσματος. Τα τελικά αποτελέσματα παρουσιάζονται κανονικοποιημένα σε σχέση με την τιμή «θορύβου» που αντιστοιχεί στο IPL+FBS, που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (**Πίνακας 3.2, Εικόνα 3.21**). Όπως παρατηρήθηκε, υπήρξε αύξηση του παραγόμενου φθορισμού από την πρωτεΐνη GFP με την πάροδο του χρόνου, πράγμα που υποδεικνύει τη μόλυνση περισσότερων κυττάρων ανά ημέρα. Ωστόσο, εξαίρεση αποτελούν τα κύτταρα Sf-HpDcr2

που ήταν μολυσμένα ταυτόχρονα με τον ιό που εκφράζει GFP και τον ιό που εκφράζει την φουρκέτα έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, όπου παρατηρείται χαμηλότερος φθορισμός τη δεύτερη ημέρα σε σχέση με την πρώτη.

ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ	Ημέρα 1 ^η (RFU)	Ημέρα 2 ^η (RFU)	Ημέρα 4 ^η (RFU)	Ημέρα 7 ^η (RFU)
Sf21 GFP	674,3	2684,6	3734,4	11852,3
Sf21 GFP + dsLuc	564,6	1604,6	7384,9	14918,3
Sf21 GFP/dsLuc	964,6	2881,1	14101,3	32220,3
SfHp GFP	355,6	800,2	9307,3	36711,3
SfHp GFP + dsLuc	264,1	-31,2	3851,7	14684,3
SfHp GFP/dsLuc	543,1	593,7	6359,2	24778,3

Πίνακας 3.2. Ο φθορισμός που παράγεται από τα υπερκείμενα των κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 (SfHp).

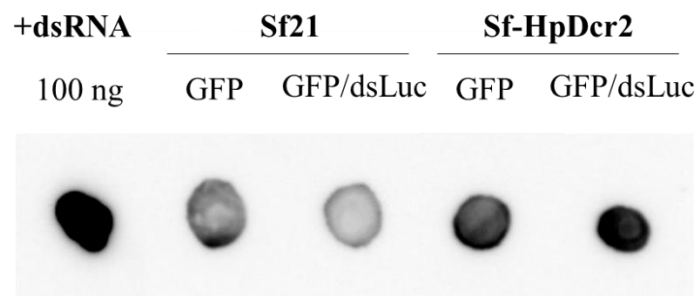


Εικόνα 3.21. Διαγραμματική απεικόνιση της διακύμανσης του φθορισμού στα υπερκείμενα των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 (SfHp).

Κατά την σύγκριση των αποτελεσμάτων του διαλυτού κλάσματος και του υπερκειμένου των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 παρατηρείται μία παρόμοια τάση αύξησης του φθορισμού στα κύτταρα με την πάροδο των ημερών. Έντονη διαφορά ωστόσο εντοπίζεται στα κύτταρα Sf21 που ήταν μολυσμένα με τον ιό AcMNPV-GFP, καθώς στο διαλυτό κλάσμα σημειώνεται πτώση της έντασης του φθορισμού κατά την έβδομη ημέρα, γεγονός που δεν παρατηρείται κατά τις αντίστοιχες μετρήσεις στο υπερκείμενο των κυττάρων αυτών.

3.1.3.2 Ανίχνευση ολικού dsRNA στο διαλυτό κυτταρικό κλάσμα

Με σκοπό την ανίχνευση ολικού dsRNA στα μολυσμένα δείγματα Sf21 και Sf-HpDcr2, πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση ολικού RNA από το διαλυτό κυτταρικό κλάσμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου NucleoZol. Έπειτα, τα μόρια του dsRNA ανιχνεύτηκαν στα μολυσμένα δείγματα Sf21 και Sf-HpDcr2, με τη μέθοδο του στυπώματος κηλίδας (Dot Blot) μέσω χρήσης αντισώματος (J2), το οποίο προσδένεται μη ειδικά σε μόρια dsRNA. Τα δίκλιωνα μόρια RNA που ανιχνεύτηκαν αναμένεται να προέρχονται από τα dsRNA που παράγονται φυσιολογικά από τα κύτταρα, καθώς και από τα dsRNA που παράγονται μέσω της φουρκέτας dsLuc του ιού AcMNPV και της φουρκέτας HpDcr2. Τα δείγματα RNA που χρησιμοποιήθηκαν εδώ, προέρχονται από κύτταρα Sf21 και Sf-HpDcr2, και απομονώθηκαν την έβδομη ημέρα μετά τη μόλυνση, ενώ αντιστοιχούν σε ποσότητα 250 ng ολικού RNA (Εικόνα 3.22).

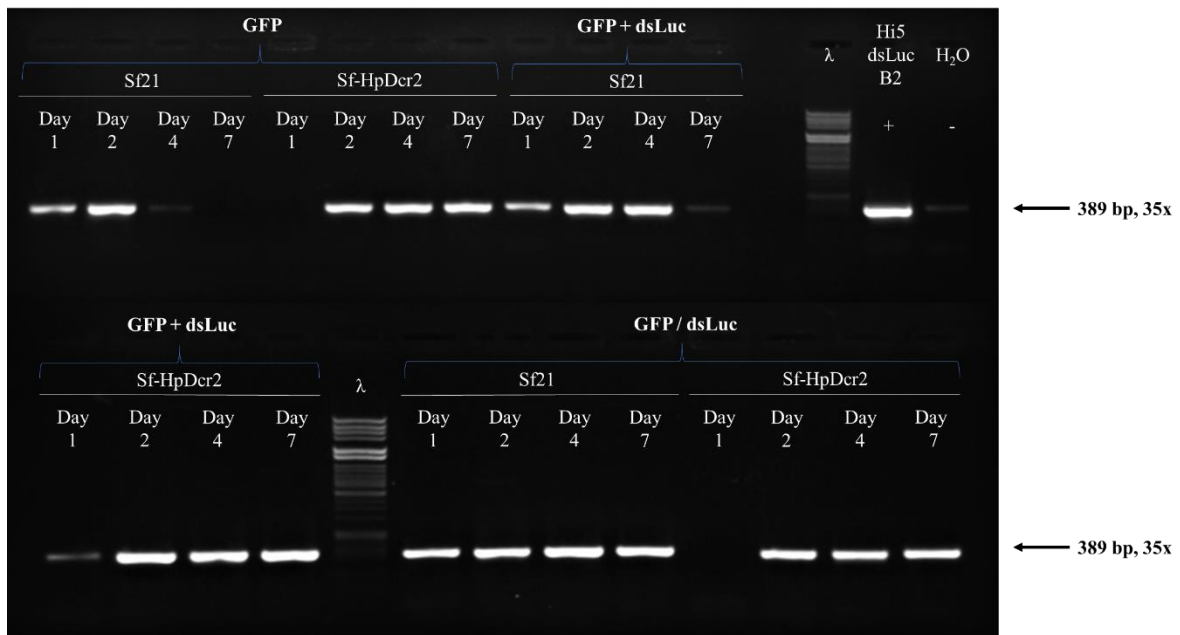


Εικόνα 3.22. Παρουσία dsRNA σε ολικό RNA που απομονώθηκε από τα δείγματα διαλυτού κλάσματος κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2, κατά την έβδομη (7 dpi) ημέρα μετά τη μόλυνση.

Όπως παρατηρείται, τα κύτταρα Sf-HpDcr2 εμφανίζουν μεγαλύτερη συσσώρευση dsRNA ανά 250 ng δείγματος ολικού RNA σε σχέση με τα κύτταρα Sf21, καθώς οι κηλίδες που εντοπίζονται στα δείγματα Sf-HpDcr2 είναι πιο έντονες σε σχέση με τα δείγματα Sf21.

3.1.3.3 Έλεγχος των ιικών επιπέδων μέσω PCR για το γονίδιο *he65*

Με στόχο τον έλεγχο των επιπέδων του ιού μέσω ελέγχου της παρουσίας του ιικού γονιδίου *he65* σε επίπεδο γονιδιώματος, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR προκειμένου να παρατηρηθούν τυχόν διαφορές στο προϊόν που παράγεται από δείγματα που αντιστοιχούν σε διαφορετικές ημέρες (Εικόνα 3.23).



Εικόνα 3.23. Έλεγχος της παρουσίας του ιικού γονιδίου *he65* σε επίπεδο DNA, στις μολυσμένες κυτταρικές σειρές Sf21 και Sf-HpDcr2. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Hi5 dsLuc B2) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Στα δείγματα που ήταν μολυσμένα με τον ιό AcMNPV-GFP παρατηρείται μείωση του πολλαπλασιασμού του ιού στα κύτταρα Sf21, γεγονός που ενδεχομένως έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μέτρησης του φθορισμού και της δοκιμασίας του στυπώματος κηλίδας. Στα κύτταρα Sf-HpDcr2, εξαιρώντας την πρώτη μέρα, διαπιστώνεται έντονος πολλαπλασιασμός του ιού. Στη συνέχεια, διαπιστώνεται ότι ο συνδυασμός μόλυνσης με τους ιούς AcMNPV-GFP και AcMNPV-dsLuc, στα κύτταρα Sf21 προκάλεσε σταδιακή αύξηση του ιικού πολλαπλασιασμού που κορυφώθηκε την τέταρτη ημέρα και μειώθηκε έπειτα την έβδομη ημέρα. Αντίθετα στα κύτταρα Sf-HpDcr2 παρατηρείται μία ανοδική πορεία του πολλαπλασιασμού του ιού. Τέλος, στα δείγματα που προέρχονταν από κύτταρα μολυσμένα με τον ιό AcMNPV-GFP/dsLuc, παρατηρείται και στις δύο κυτταρικές σειρές έντονος πολλαπλασιασμός του ιού, χωρίς να παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ημερών, με μόνη εξαίρεση την πρώτη ημέρα στα κύτταρα Sf-HpDcr2, όπου δεν εντοπίζεται ζώνη.

3.1.3.4 Έλεγχος των ιϊκών επιπέδων μέσω PCR για το διαγονίδιο dsLuc

Για τον έλεγχο των επιπέδων παραγωγής της φουρκέτας dsLuc από τον ιό, σχεδιάστηκε στη συνέχεια αντίδραση PCR για την ανίχνευση της δομής μίσχου (stem) της φουρκέτας στις μολυσμένες κυτταρικές σειρές Sf21 και Sf-HpDcr2 (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24. Έλεγχος της παρουσίας σε επίπεδο DNA της δομής μίσχου της φουρκέτας dsLuc του ιού, στις μολυσμένες κυτταρικές σειρές Sf21 και Sf-HpDcr2. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Hi5 dsLuc B2) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Όπως ήταν αναμενόμενο, στα δείγματα που ήταν μολυσμένα με τον ιό AcMNPV-GFP/dsLuc παρατηρείται μια βαθμιαία αύξηση της έντασης των ζωνών στα κύτταρα Sf21, γεγονός που υποδεικνύει τον πολλαπλασιασμό του ιού και την επακόλουθη αύξηση της παραγωγής της φουρκέτας. Στα κύτταρα Sf-HpDcr2, διαπιστώνεται μια θολή ζώνη την δεύτερη ημέρα και μία ελαφρώς εντονότερη την έβδομη. Αντιθέτως, στα δείγματα που ήταν μολυσμένα με συνδυασμό των ιών AcMNPV-GFP και AcMNPV-dsLuc, που θα ήταν αναμενόμενο να παράγουν τη φουρκέτα της λουσιφεράσης, δεν διαπιστώνεται καμία ζώνη. Πιθανό ενδεχόμενο αποτελεί η απώλεια του γονιδίου που παράγει την φουρκέτα της λουσιφεράσης από τους ιούς ή η μειωμένη παραγωγή της φουρκέτας λόγω ανταγωνισμού μεταξύ των δύο ιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση (GFP και dsLuc). Τέλος, σε κανένα από τα δείγματα που ήταν μολυσμένα με τον ιό AcMNPV-GFP δεν παρατηρείται ζώνη, γεγονός αναμενόμενο, καθώς τα δείγματα αυτά δεν παράγουν dsLuc.

3.1.3.5 Έλεγχος των ιϊκών επιπέδων μέσω ανάλυσης έκφρασης της πρωτεΐνης vp39

Με σκοπό την ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης vp39 του ιού AcMNPV, με μέγεθος 39 kDa (Pearson et al., 1988) και η οποία αποτελεί βασική πρωτεΐνη του καψιδίου του, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και κατόπιν ανίχνευση της πρωτεΐνης με ανοσοστόπωμα Western.



Εικόνα 3.25. Ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης vp39 του ιού AcMNPV στα ιϊκά στοκ που χρησιμοποιήθηκαν για τις μολύνσεις (διαδρομές 2-4), και στα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν την τέταρτη ημέρα από μολυσμένες κυτταρικές σειρές Sf21 και Sf-HpDcr2 (διαδρομές 5-10).

Τα δείγματα που μολύνθηκαν από τους ιούς αυτούς παρουσιάζουν αρκετά ικανοποιητική ομοιομορφία ως προς την παρουσία της πρωτεΐνης vp39. Ωστόσο, στα δείγματα από τα ιϊκά στοκ παρατηρείται σχετική ανομοιομορφία ως προς την αντίστοιχη ζώνη (Εικόνα 3.25).

3.2 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *dicer-2* ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ CRISPR/Cas9

3.2.1 Στρατηγική κλωνοποίησης των αλληλουχιών-στόχων στο φορέα pCas9

Στα πλαίσια της αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* με τη χρήση του μηχανισμού CRISPR/Cas9 επιλέχθηκαν ειδικές αλληλουχίες-στόχοι, μέσω των οποίων θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία κοπής από την ενδονουκλεάση SpCas9. Η SpCas9, καθοδηγούμενη από έναν RNA-οδηγό, και μέσω συμπληρωματικότητας, προξενεί αποδιάταξη των κλώνων και βλάβη στο γονιδιωματικό DNA με τη μορφή δίκλωνης πέψης. Η επιδιόρθωση της βλάβης γίνεται με επαναυβριδισμό των κλώνων, με αποτέλεσμα την απώλεια βάσεων. Με τον τρόπο αυτό, το παραγόμενο ένζυμο Dicer-2 αναμένεται να μην είναι πλήρως λειτουργικό.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο εντοπισμός πιθανών αλληλουχιών PAM στο γονίδιο *dicer-2*, δηλαδή συγκεκριμένων αλληλουχιών που διαβάζονται από την ενδονουκλεάση Cas9 (5'-NGG-3' εδώ), τόσο για τα κύτταρα Sf21, όσο και για τα κύτταρα Hi5. Ακολούθησε προσδιορισμός της 5' θέσης έναρξης της αλληλουχίας-στόχου, αριθμώντας 20 νουκλεοτίδια ανοδικά της PAM. Ακολούθως επιλέχθηκαν 4 αλληλουχίες-στόχοι για την κάθε κυτταρική σειρά (Πίνακας 3.3), οι οποίες ειδικότερα ήταν τα κομμάτια Sf1794, Sf1669, Sf3662 και Sf3782 για τα κύτταρα Sf21, και τα κομμάτια Tn1923, Tn2044, Tn2647 και Tn2773 για τα κύτταρα Hi5. Οι επιλεγμένες αλληλουχίες-στόχοι κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις *SapI* του πλασμιδίου pCRISPR/Cas9 καθοδικά του υποκινητή SfU6 ή TnU6 της RNA πολυμεράσης III, αντίστοιχα για την κάθε κυτταρική σειρά (Mabashi-Asazuma & Jarvis, 2017).

κύτταρα Hi5

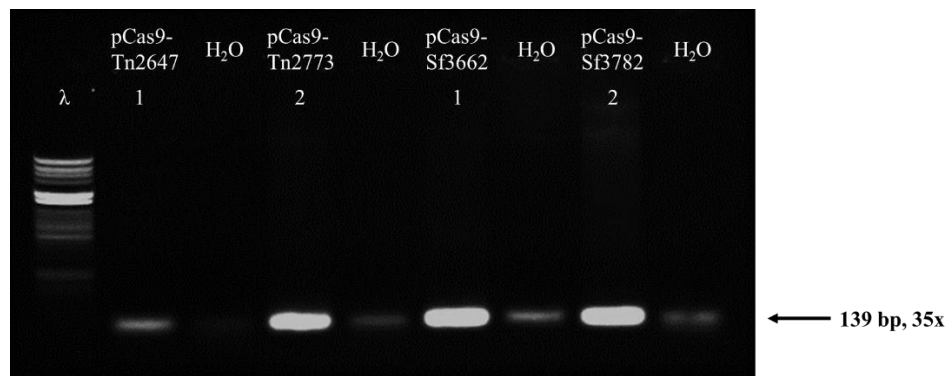
Θέση έναρξης	Κλώνος	Αλληλουχία	GC %	Περιοχή-στόχος
1923	+	GCCCATCGCTTGCCCTATTAAGG	55.00	Dicer dimer
2044	-	CCCTTGACGATGCTGCCAATGCG	55.00	Dicer dimer
2647	-	CCGCCGTATGAGGACAGGATTAA	45.00	PAZ
2773	-	CCTCAGTCTCATTTTCGATTCAGA	40.00	PAZ

κύτταρα Sf21

Θέση έναρξης	Κλώνος	Αλληλουχία	GC %	Περιοχή-στόχος
3662	-	CCTTCCTGAAATTTGCAGCCAGT	45.00	Ribo c
3782	+	AAAGGTTCAATCTGGCTGGTAGG	45.00	Ribo c
1669	-	CCGACTACAGCGGAGATCGCTCG	60.00	Helicase domain
1794	+	ACTCCCACACGATCAGTTCACGG	50.00	Dicer-dimer

Πίνακας 3.3. Οι αλληλουχίες-στόχοι του γονιδίου *dicer-2* που επιλέχθηκαν.

Συνήθως, έπειτα από απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, οι επιθυμητοί κλώνοι επιβεβαιώνονται μέσω πέψων ελέγχου για το ένθεμα και το πλασμίδιο. Καθώς όμως σε αυτή την περίπτωση το ένθεμα αντιστοιχεί σε μικρό αριθμό βάσεων (23 βάσεις), δεν θα είναι ευδιάκριτη η διαφορά μεταξύ του ανασυνδυασμένου και του μη ανασυνδυασμένου φορέα μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των απομονωθέντων πλασμιδιακών DNA μέσω αντίδρασης PCR. Για την κάθε αλληλουχία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, με τον εκκινητή αντίστροφης κατεύθυνσης CR να είναι κοινός για όλα τα πλασμίδια, καθώς υβριδίζει με περιοχή του φορέα που βρίσκεται μετά το ένθεμα. Στην **Εικόνα 3.26** παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της PCR για τους κλώνους pCas9-Tn2647 1, pCas9-Tn2773 2, pCas9-Sf3662 1 και pCas9-Sf3782 2.



Εικόνα 3.26. Έλεγχος των πλασμιδιακών κλώνων που αντιστοιχούν στους ανασυνδυασμένους φορείς pCas9. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O.

Κατά την αντίδραση PCR παρατηρείται πως ο αρνητικός μάρτυρας δίνει μια αχνή ζώνη που μπορεί να ερμηνευθεί ψευδώς ως θετικό αποτέλεσμα, το οποίο ενδεχομένως οφείλεται σε επιμόλυνση του εκκινητή CR με DNA. Παρόλα αυτά τα δείγματα παρουσιάζουν σαφώς εντονότερη ζώνη σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Για την επιβεβαίωση του ανασυνδυασμού στα επιλεγμένα πλασμίδια, έγινε αλληλούχιση τους στην περιοχή του εκάστοτε ενθέματος, και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (Midi prep) ώστε να παραχθεί η απαιτούμενη ποσότητα για χρήση στα επακόλουθα πειράματα.

3.2.2 Έλεγχος αποτελεσματικότητας/λειτουργικότητας των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCas9 που στοχεύουν στο γονίδιο *dicer-2* μέσω παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Hi5 και Sf21

Για τον έλεγχο των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που κατασκευάστηκαν, σε λειτουργικό επίπεδο, επόμενο στάδιο αποτέλεσε η παροδική διαμόλυνση κυττάρων Hi5 και Sf21 σύμφωνα με τους συνδυασμούς πλασμιδίων pCas9 που αναφέρονται στους Πίνακες 3.4-3.7. Επιπλέον, σκοπός ήταν να συγκριθούν τα τελικά αποτελέσματα με εκείνα που προκύπτουν από κύτταρα διαμολυσμένα με τους φορείς που εκφράζουν την φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*, αντίστοιχα για την κάθε κυτταρική σειρά (pEA-Sf-HpDcr2, pEA-Tn-HpDcr2), ώστε να ελεγχθεί παράλληλα η αποδοτικότητα των δύο μεθόδων CRISPR/Cas9 και RNAi.

3.2.2.1 Κύτταρα Hi5

Πείραμα Α

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς pCas9 που στοχεύουν σε πρόκληση βλάβης στο γονίδιο *dicer-2* των κυττάρων Hi5, χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση αυτών των κυττάρων (Πίνακας 3.4).

Κύτταρα Hi5	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
pCas9-Tn2647	600 ng		300 ng					-
pCas9-Tn2773		600 ng	300 ng					-
pCas9-Tn1923				600 ng		300 ng		-
pCas9-Tn2044					600 ng	300 ng		-
pEA-YFP	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	-
pEA-Tn-HpDcr2							500 ng	-
pBmIE1							100 ng	-

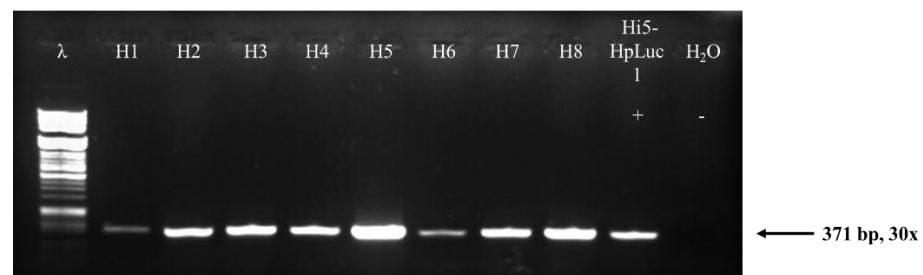
Πίνακας 3.4. Σχεδιασμός πειράματος διαμόλυνσης με συνδυασμούς πλασμιδίων pCas9 σε κύτταρα Hi5. Η στήλη H8 αντιστοιχεί σε μη διαμολυσμένα κύτταρα Hi5, που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες.

Όπως και στην παροδική διαμόλυνση των κυττάρων Sf21, έτσι και εδώ τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9 χρησιμοποιήθηκαν είτε μεμονωμένα, είτε κατά ζεύγη, με σκοπό την διερεύνηση της βέλτιστης απόδοσης στην αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*. Χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEA-YFP, που φέρει πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, για τον

προσδιορισμό των διαμολυσμένων κυττάρων και ο βοηθητικός φορέας pBmIE1, για την ενίσχυση της έκφρασης του διαγονιδίου που παράγει την φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2* (pEA-TnHpDcr2).

▪ Έλεγχος των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 σε επίπεδο μεταγραφώματος

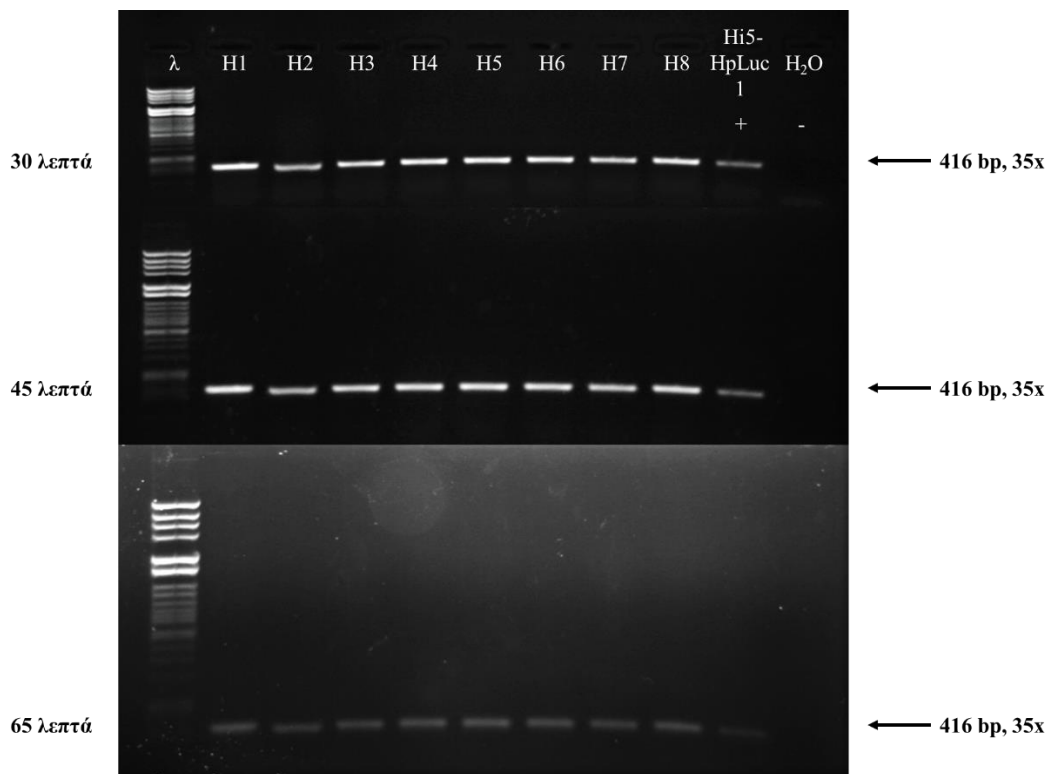
Έπειτα από παρακολούθηση των κυττάρων για δύο με τρεις μέρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, με απώτερο σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας εφαρμογής της μεθόδου CRISPR στο γονίδιο *dicer-2* μέσω ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου αυτού. Κατόπιν απομόνωσης του RNA τους, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Έπειτα, αρχικά έγινε έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης, ως γονιδίου αναφοράς μέσω PCR (**Εικόνα 3.27**), από τον οποίο διαπιστώθηκε ικανοποιητική έκφρασή του σε όλα τα δείγματα, με σαφείς ωστόσο διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 3.27. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε ο θετικός μάρτυρας Hi5-HpLuc 1 και ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Στη συνέχεια σχεδιάστηκε αντίδραση PCR για το γονίδιο *dicer-2*, ώστε να διερευνηθεί η έκφρασή του στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν. Όπως γνωρίζουμε, η γονιδιωματική επεξεργασία υπό την επίδραση του μηχανισμού CRISPR, μπορεί να οδηγήσει στην έλλειψη μερικών βάσεων στην αλληλουχία-στόχο κατά την επανένωση των κλώνων. Για τον λόγο αυτό, το προϊόν που ηλεκτροφορείται ενδέχεται να έχει μικρότερη αλληλουχία σε σχέση με την αρχική, αν και κάτι τέτοιο εδώ δεν είναι ευδιάκριτο (**Εικόνα 3.28**). Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR παρατηρήθηκε σε τρεις χρονικές περιόδους, ώστε να προσδιοριστεί σαφέστερα η πιθανή επίδραση του μηχανισμού CRISPR/Cas9 στο γονίδιο *dicer-2*. Με το πέρας 30 λεπτών παρατηρείται μικρή διαφορά

του δεύτερου δείγματος (H2) σε σχέση με τα υπόλοιπα cDNA, ενώ μετά από διάστημα 65 λεπτών παρατηρείται καλύτερα η διαφορά της ζώνης του δεύτερου δείγματος (H2), το οποίο έχει διανύσει ελαφρώς μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με τα άλλα δείγματα, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση του μηχανισμού CRISPR/Cas9. Επισημαίνεται ότι το δείγμα H2 αντιστοιχεί σε κύτταρα Hi5 διαμολυσμένα από το φορέα pCas9-Tn2773, συνεπώς το παρατηρούμενο αποτέλεσμα αναφορικά με το δείγμα αυτό πιθανώς να οφείλεται στη στόχευση της περιοχής PAZ, η οποία είναι υπεύθυνη για την ακριβή επεξεργασία του δίκλωνου RNA (Zhang et al., 2004), του γονιδίου *dicer-2* από το φορέα αυτόν.



Εικόνα 3.28. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης, όπου παρατηρήθηκαν σε χρόνο 30, 45 και 65 λεπτών. Χρησιμοποιήθηκε ο θετικός μάρτυρας Hi5-HpLuc 1 και ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Από τους παραπάνω ελέγχους σε επίπεδο μεταγραφώματος διαπιστώνουμε ότι όλα τα δείγματα των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 εκφράζουν επιτυχώς το γονίδιο της α-τουμπουλίνης, αλλά και το *dicer-2*.

Πείραμα Β

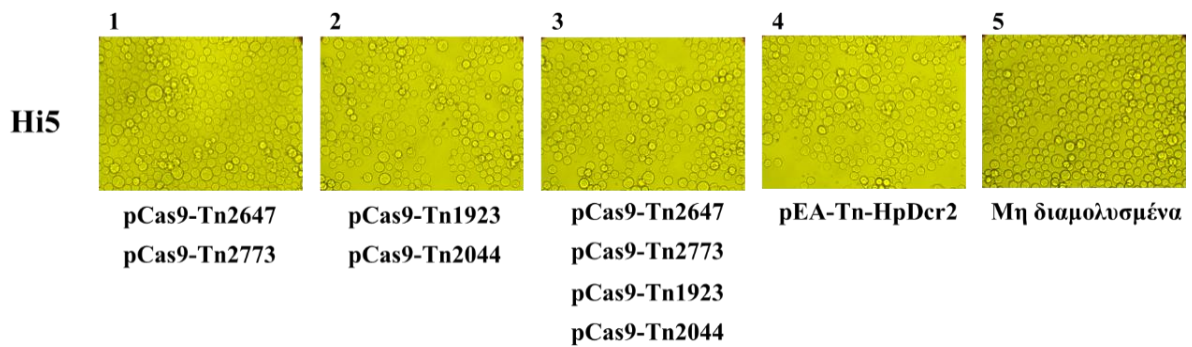
Σχεδιάστηκε νέα παροδική διαμόλυνση κυττάρων Hi5, ώστε να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου CRISPR/Cas9 με την δοκιμή άλλων συνδυασμών των πλασμιδίων pCas9, ενώ ακόμη τα τελικά αποτελέσματα θα συγκριθούν με κύτταρα διαμολυσμένα με τον φορέα pEA-Tn-HpDcr2 (**Πίνακας 3.5**).

Hi5	H1	H2	H3	H4	H5
pCas9-Tn2647	300 ng		150 ng		-
pCas9-Tn2773	300 ng		150 ng		-
pCas9-Tn1923		300 ng	150 ng		-
pCas9-Tn2044		300 ng	150 ng		-
pEA-YFP	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	-
pEA-TnHpDcr2				500 ng	-
pBmIE1				100 ng	-

Πίνακας 3.5. Σχεδιασμός πειράματος διαμόλυνσης με συνδυασμούς πλασμιδίων pCas9 σε κύτταρα Hi5. Η στήλη H5 αντιστοιχεί σε μη διαμολυσμένα κύτταρα Hi5, που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες.

Στο πείραμα αυτό, τα πλασμίδια για τη διαμόλυνση των κυττάρων Hi5 χρησιμοποιήθηκαν σε ζεύγη (H1, H2), ενώ σχεδιάστηκε και χειρισμός, κατά τον οποίο έγινε διαμόλυνση με όλα τα πλασμίδια pCas9 (H3), με σκοπό την πιθανή βελτιστοποίηση της επίδρασης στο γονίδιο *dicer-2*. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ο φορέας pEA-YFP, και ο βοηθητικός φορέας pBmIE1 στο χειρισμό που περιλαμβάνει διαμόλυνση με το πλασμίδιο pEA-TnDcr2 (H4). Η στήλη H5 αντιστοιχεί σε μη διαμολυσμένα κύτταρα Hi5, που λειτουργούν ως κύτταρα-μάρτυρες.

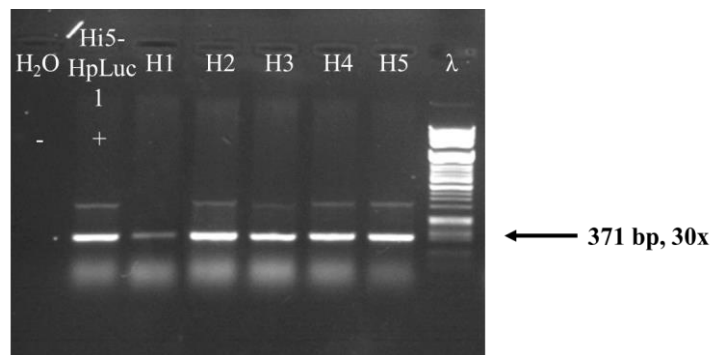
Τα κύτταρα παρακολούθηθηκαν στη συνέχεια για δύο με τρεις ημέρες, με επακόλουθο βήμα την διαδικασία της απομόνωσης του DNA και RNA τους, με σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας εφαρμογής της μεθόδου CRISPR στο γονίδιο *dicer-2*. Από την μικροσκοπική παρατήρηση (**Εικόνα 3.29**) φαίνεται ότι τα κύτταρα Hi5 διατηρούν το φυσιολογικό τους σχήμα και, τουλάχιστον μορφολογικά, δεν παρατηρούνται εμφανή σημεία καταπόνησης, όπως στα κύτταρα Sf21, όπου παρουσιάστηκαν διογκώσεις και χαρακτηριστικές «ουρές» (**Εικόνα 3.38**)



Εικόνα 3.29. Κύτταρα Hi5 διαμολυσμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9, που στοχεύουν στο γονίδιο *dicer-2*, κατά τη 2^η ημέρα μετά τη διαμόλυνση (Μεγέθυνση 40x).

▪ Έλεγχος των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 σε επίπεδο γονιδιώματος

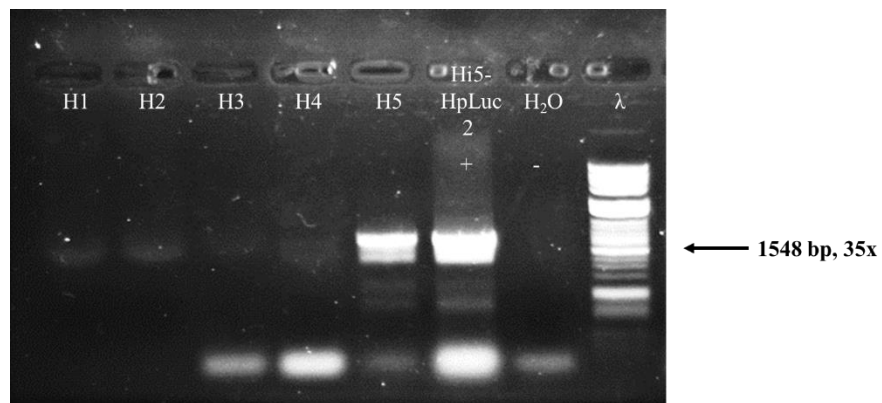
Πρώτο βήμα αποτέλεσε ο έλεγχος των γονιδίων *α-τουμπουλίνη* και *dicer-2* σε επίπεδο DNA μέσω PCR, ώστε να αξιολογηθεί η παρουσία των γονιδίων αυτών στα διαμολυσμένα κύτταρα Hi5. Από τα παρακάτω αποτελέσματα της αντίδρασης PCR (Εικόνα 3.30) παρατηρήθηκε η παρουσία του γονιδίου αναφοράς της *α-τουμπουλίνης* σε όλα τα δείγματα DNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 με τους φορείς pCas9.



Εικόνα 3.30. Έλεγχος ύπαρξης του γονιδίου της *α-τουμπουλίνης* στο γονιδίωμα των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Hi5-HpLuc 1) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Στη συνέχεια σχεδιάστηκε αντίδραση PCR για τα DNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5, με σκοπό να γίνει ο έλεγχος του γονιδίου *dicer-2*. Από τα αποτελέσματα της PCR παρατηρήθηκε ότι μόνο το δείγμα H5 (μη διαμολυσμένα κύτταρα Hi5) και ο θετικός μάρτυρας (Hi5-HpLuc 2) έδωσαν έντονο θετικό αποτέλεσμα (Εικόνα 3.31). Αντίθετα, διαπιστώθηκαν πολύ χαμηλής έντασης ζώνες στα προϊόντα PCR των χειρισμών

H1 και H2, τα οποία αναλογούν σε κύτταρα Hi5 που διαμολύνθηκαν με τα ζεύγη pCas9-Tn2647/pCas9-Tn2773 και pCas9-Tn1923/pCas9-Tn2044, αντίστοιχα. Ακόμη, η ζώνη που εντοπίστηκε στον χειρισμό H3, που αντιστοιχεί σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με συνδυασμό όλων των ανασυνδυασμένων φορέων pCas9, ήταν ακόμα χαμηλότερης έντασης. Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδεικνύει την επιτυχή επεξεργασία του γονιδίου *dicer-2* από τον μηχανισμό CRISPR/Cas9. Σημειώνεται ωστόσο ότι πολύ χαμηλής έντασης ζώνη παρουσίασε και το δείγμα των διαμολυσμένων κυττάρων H4 που αντιστοιχεί στα κύτταρα όπου παράγεται η φουρκέτα Tn-HpDcr2.

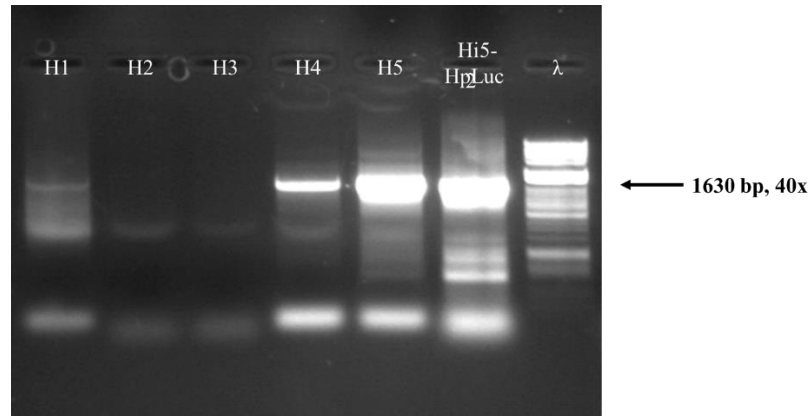


Εικόνα 3.31. Έλεγχος παρουσίας του γονιδίου *dicer-2* στο γονιδίωμα των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζη. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Hi5-HpLuc 2) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Προς επιβεβαίωση των ανωτέρων αποτελεσμάτων από την επίδραση του μηχανισμού CRISPR/Cas9 στα κύτταρα Hi5 που διαμολύνθηκαν, σχεδιάστηκε νέα PCR για τα δείγματα H1-H5, χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών. Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR διαπιστώθηκαν έντονες ζώνες στα προϊόντα PCR των κυττάρων-μαρτύρων της διαμόλυνσης H4 και H5, καθώς και του θετικού μάρτυρα της PCR (**Εικόνα 3.32**). Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της προηγούμενης PCR, παρατηρείται απουσία του αναμενόμενου προϊόντος στα δείγματα των χειρισμών H1, H2 και H3. Ειδικότερα, εντοπίζεται μια θολή ζώνη στο δείγμα H1, που αντιστοιχεί σε στόχευση της περιοχής PAZ του γονιδίου *dicer-2* από το ζεύγος των φορέων pCas9-Tn2647 / pCas9-Tn2773.

Συνεπώς, από τον γονιδιωματικό έλεγχο του γονιδίου *dicer-2*, παρατηρείται ότι και τα δύο ζεύγη εκκινητών δίνουν παρόμοια αποτελέσματα. Ενώ στο DNA των μη

διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 (H5) εντοπίζεται το γονίδιο *dicer-2* με μορφή έντονης ζώνης, ωστόσο οι ζώνες που παρατηρούνται στα υπόλοιπα δείγματα DNA στα οποία εφαρμόστηκε ο μηχανισμός CRISPR/Cas9 είναι χαμηλής έντασης ή δεν παρατηρούνται καθόλου (π.χ. H3).



Εικόνα 3.32. Έλεγχος παρουσίας του γονιδίου *dicer-2* στο γονιδίωμα των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5, με τη χρήση δεύτερου ζεύγους εκκινητών. Πραγματοποιήθηκε PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας (Hi5-HpLuc 2) και αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

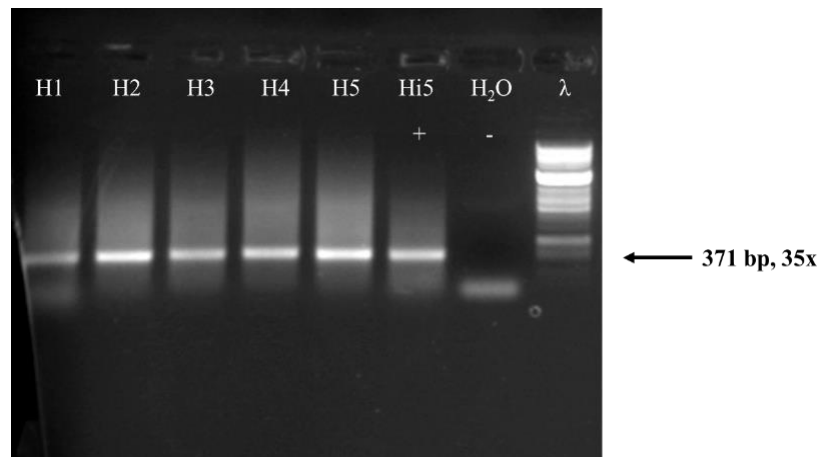
Οι παραπάνω παρατηρήσεις συγκλίνουν στην επιτυχία της πρόκλησης βλάβης στο γονίδιο *dicer-2* στα κύτταρα Hi5 μέσω διαμόλυνσης με τους φορείς pCas9.

▪ Έλεγχος των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 σε επίπεδο μεταγραφώματος

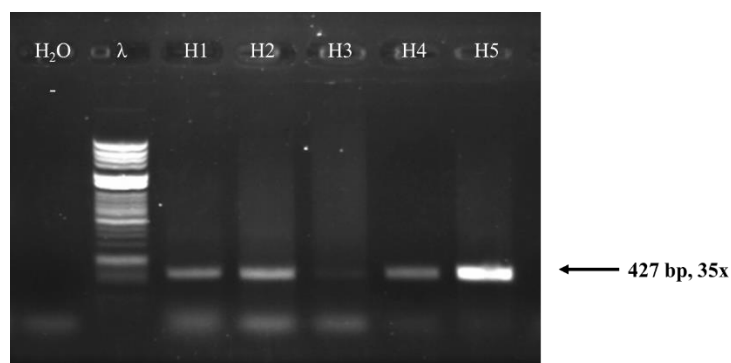
Αφού πραγματοποιήθηκε ο γονιδιωματικός έλεγχος, ακολούθησε ο έλεγχος των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 σε επίπεδο mRNA. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA, το οποίο ελέγχθηκε ως προς την ακεραιότητά του, ενώ έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Τα έτοιμα cDNA χρησιμοποιήθηκαν για τον επακόλουθο έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της α-τουμπουλίνης, όπου και παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασής του σε όλα τα διαμολυσμένα κύτταρα Hi5 (**Εικόνα 3.33**).

Κατόπιν ακολούθησε αντίδραση PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2*. Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR παρατηρήθηκαν ζώνες σε όλα τα δείγματα των cDNA των μετασχηματισμένων κυττάρων Hi5 (**Εικόνα 3.34**). Ωστόσο η ζώνη που αντιστοιχεί στο δείγμα H3, από κύτταρα διαμολυσμένα με το συνδυασμό όλων των ανασυνδυασμένων φορέων pCas9, είναι ιδιαίτερα χαμηλής έντασης σε σχέση με τις

ζώνες των υπολοίπων δειγμάτων. Επιπλέον, τα προϊόντα PCR των δειγμάτων H1 και H2 εμφανίζονται επίσης μειωμένα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα H5. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν την επιτυχή δράση του μηχανισμού CRISPR/Cas9 στη μείωση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2*.



Εικόνα 3.33. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το cDNA μη διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 και ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

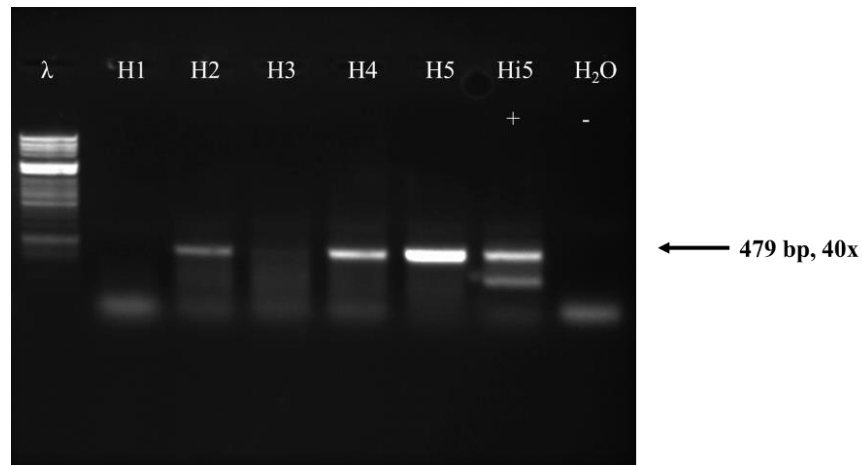


Εικόνα 3.34. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης. Χρησιμοποιήθηκε ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων μέσω αποκοπής τους από την πηκτή αγαρόζης, κάτω από ακτινοβολία UV, προκειμένου αυτά να αλληλουχηθούν. Τα δείγματα που απομονώθηκαν ήταν τα H1 και H5, με σκοπό να διαπιστωθούν οι τυχόν διαφορές στις αλληλουχίες τους. Αναφορικά με το δείγμα H3, αυτό εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων έκφρασης δεν κατέστη δυνατή η απομόνωσή του.

Σημειώνεται ότι τα δείγματα H1 και H3 αντιστοιχούν σε χειρισμούς με πλασμίδια, τα οποία κόβουν το γονίδιο *dicer-2* σε σημεία όπου φυσιολογικά υβριδίζουν οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές. Ωστόσο, από την αλληλούχιση δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην αλληλουχία που ενισχύθηκε μεταξύ των H1 και H5.

Τέλος, σχεδιάστηκε νέα PCR για τα ίδια δείγματα cDNA με χρήση του δεύτερου ζεύγους εκκινητών, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην PCR της **Εικόνας 3.32**. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *dicer-2* στα δείγματα cDNA των δειγμάτων H2 και H4, αλλά και του δείγματος-μάρτυρα H5 (**Εικόνα 3.35**). Παρόλα αυτά, στο δείγμα H2 η έκφραση είναι μικρότερη σε σχέση με το δείγμα H5, γεγονός που ενδεχομένως υποδεικνύει την επιτυχή δράση του μηχανισμού CRISPR στα διαμολυσμένα κύτταρα Hi5.



Εικόνα 3.35. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5, με τη χρήση δεύτερου ζεύγους εκκινητών. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το cDNA μη διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 και ως αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O.

Πραγματοποιήθηκε έπειτα απομόνωση των ζωνών H2 και H5, με σκοπό να διαπιστωθούν οι τυχόν διαφορές στις αλληλουχίες τους. Ωστόσο, από την αλληλούχιση δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην αλληλουχία που ενισχύθηκε μεταξύ των H2 και H5.

3.2.2.2 Κύτταρα Sf21

Πείραμα Α

Οι ανασυνδυασμένοι φορείς pCas9 που κατασκευάστηκαν ώστε να στοχεύουν στη πρόκληση βλάβης στο γονίδιο *dicer-2* των κυττάρων Sf21, χρησιμοποιήθηκαν για την παροδική διαμόλυνση της ίδιας κυτταρικής σειράς (**Πίνακας 3.6**).

Κύτταρα Sf21	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
pCas9-Sf1669	600 ng		300 ng					-
pCas9-Sf1794		600 ng	300 ng					-
pCas9-Sf3662				600 ng		300 ng		-
pCas9-Sf3782					600 ng	300 ng		-
pEA-RFP	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	-
pEA-Sf-HpDcr2							500 ng	-
pBmIE1							100 ng	-

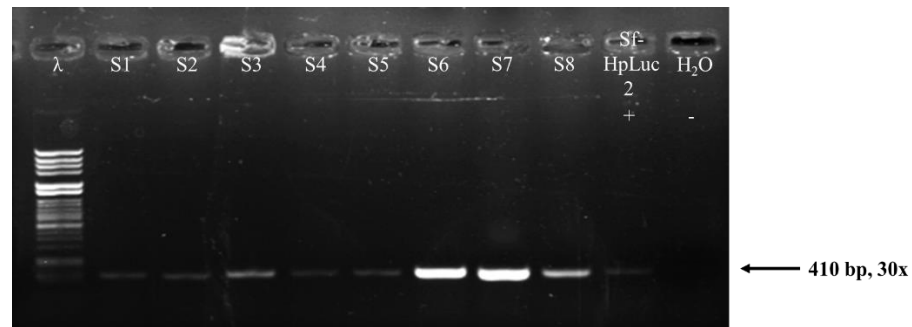
Πίνακας 3.6. Σχεδιασμός πειράματος διαμόλυνσης με συνδυασμούς πλασμιδίων pCas9 σε κύτταρα Sf21. Η στήλη S8 αντιστοιχεί σε μη διαμολυσμένα κύτταρα Sf21, που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες.

Τα πλασμίδια pCas9 χρησιμοποιήθηκαν είτε μεμονωμένα, είτε σε ζευγάρια, με σκοπό τη διερεύνηση της βέλτιστης απόδοσης στην αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*. Ο φορέας pEA-RFP φέρει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης για την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Red Fluorescent Protein) και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των κυττάρων που διαολύνθηκαν. Ο φορέας pBmIE1 αποτελεί βοηθητικό φορέα, για την ενίσχυση της έκφρασης της φουρκέτας έναντι του *dicer-2* από το πλασμίδιο pEA-SfHpDcr2.

▪ Έλεγχος κυττάρων Sf21 σε επίπεδο μεταγραφώματος

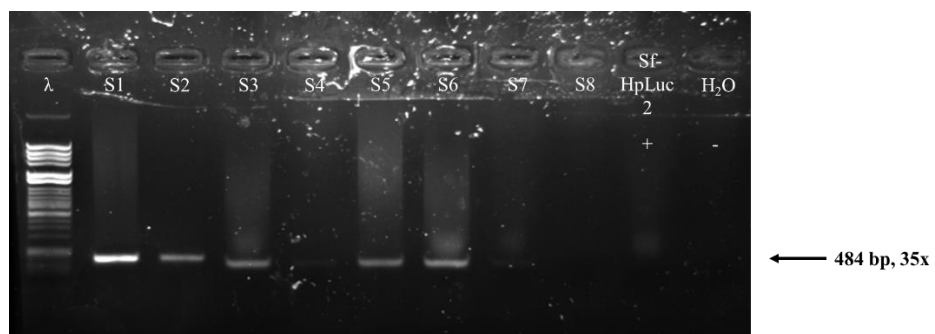
Μετά από παρακολούθηση των κυττάρων για δύο με τρεις μέρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, με απώτερο σκοπό τον έλεγχο της επιτυχίας εφαρμογής της μεθόδου CRISPR στο γονίδιο *dicer-2* μέσω ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου αυτού. Κατόπιν απομόνωσης του RNA τους, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Έπειτα, αρχικά έγινε έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης, ως γονιδίου αναφοράς μέσω PCR (**Εικόνα 3.36**), από τον οποίο παρατηρήθηκε μία μη ομοιόμορφη έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα Sf21. Το γεγονός αυτό είναι μη αναμενόμενο καθώς φυσιολογικά η α -τουμπουλίνη παρουσιάζει ισχυρή

έκφραση σε όλα τα δείγματα των διαμολυσμένων κυττάρων Sf21, αφού αποτελεί βασικό γονίδιο του κυτταροσκελετού.



Εικόνα 3.36. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Sf21 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε ο θετικός μάρτυρας Sf-HpLuc 2 και ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Σχεδιάστηκε, ωστόσο αντίδραση PCR για το γονίδιο *dicer-2*, ώστε να διερευνηθεί η έκφρασή του στα διαμολυσμένα κύτταρα Sf21 (**Εικόνα 3.37**). Όπως παρατηρείται, εντοπίζεται ζώνη σε όλα τα δείγματα εκτός από τα μη διαμολυσμένα κύτταρα S8. Επιπλέον, οι ζώνες των κυττάρων S3, S5, S6 βρίσκονται πιο χαμηλά από τα υπόλοιπα δείγματα, καθώς πιθανόν να διαθέτουν μικρότερη αλληλουχία και να έτρεξαν πιο γρήγορα. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα για τον έλεγχο του γονιδίου *dicer-2* δεν μπορούν να αξιολογηθούν με βεβαιότητα καθώς το δείγμα S8, το οποίο προέρχεται από κύτταρα-μάρτυρες, δεν παρουσιάζει την αναμενόμενη ζώνη, ενώ φυσιολογικά τα κύτταρα αυτά μεταγράφουν το γονίδιο της *dicer-2*, παράγοντας το αντίστοιχο ένζυμο.



Εικόνα 3.37. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Sf21 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε ο θετικός μάρτυρας Sf-HpLuc 2 και ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Από τους παραπάνω ελέγχους των διαμολυσμένων κυττάρων Sf21 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9 σε επίπεδο μεταγραφώματος, προέκυψαν προς το παρόν μη σαφή αποτελέσματα για της έκφραση των γονιδίων της α -τουμπουλίνης και του *dicer-2*. Υπάρχει συνεπώς ανάγκη διερεύνησης των αιτίων των παραπάνω αποτελεσμάτων, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση του μηχανισμού CRISPR/Cas9 στην κυτταρική σειρά αυτή.

Πείραμα Β

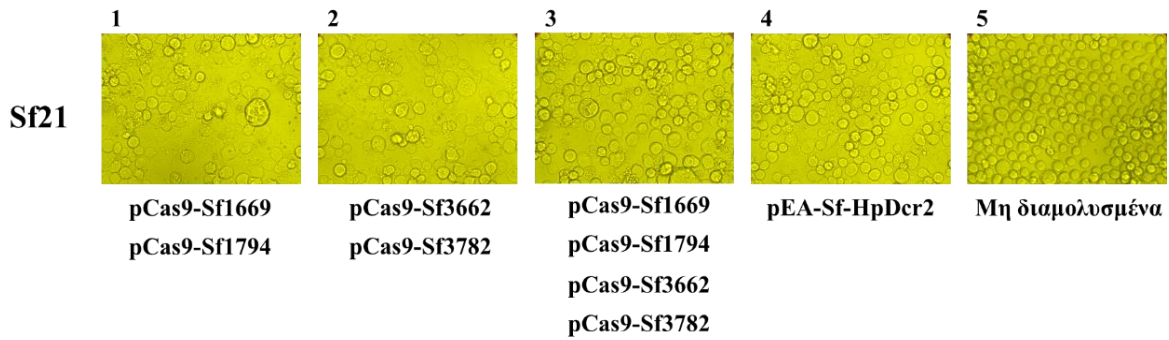
Σχεδιάστηκε νέα παροδική διαμόλυνση κυττάρων Sf21, ώστε να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου CRISPR/Cas9 με την δοκιμή άλλων συνδυασμών των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pCas9, ενώ ακόμη τα τελικά αποτελέσματα θα συγκριθούν με κύτταρα διαμολυσμένα με τον φορέα pEA-Sf-HpDcr2.

Ομοίως με το πείραμα Α, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς πλασμιδίων. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pEA-YFP, που φέρει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Yellow Fluorescent Protein) και το βοηθητικό πλασμίδιο pBmIE1 (**Πίνακας 3.7**).

Τα διαμολυσμένα κύτταρα Sf21 παρακολούθηθηκαν στη συνέχεια για δύο με τρεις ημέρες, όπου και συλλέχθηκε φωτογραφικό υλικό (**Εικόνα 3.38**), με επακόλουθο βήμα την διαδικασία της απομόνωσης του DNA και RNA τους. Από την μικροσκοπική παρατήρηση φαίνεται, ότι τα κύτταρα Sf21 αποκτούν μη φυσιολογικό σχήμα, με παρουσία χαρακτηριστικών «ουρών», γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη συνθηκών καταπόνησης έπειτα από εφαρμογή της μεθόδου CRISPR/Cas9.

Sf21	S1	S2	S3	S4	S5
pCas9-Sf1669	300 ng		150 ng		-
pCas9-Sf1794	300 ng		150 ng		-
pCas9-Sf3662		300 ng	150 ng		-
pCas9-Sf3782		300 ng	150 ng		-
pEA-YFP	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	-
pEA-Sf-HpDcr2				500 ng	-
pBmIE1				100 ng	-

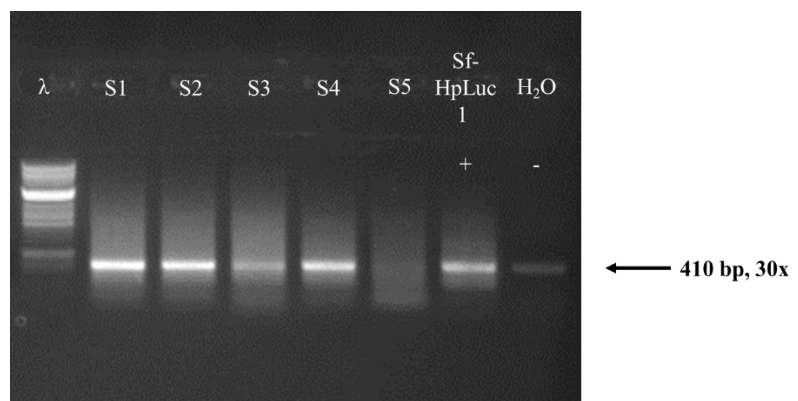
Πίνακας 3.7. Σχεδιασμός πειράματος διαμόλυνσης με συνδυασμούς πλασμιδίων pCas9 σε κύτταρα Sf21. Η στήλη S5 αντιστοιχεί σε μη διαμολυσμένα κύτταρα Sf21, που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-μάρτυρες.



Εικόνα 3.38. Κύτταρα Sf21 διαμολυσμένα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9, που στοχεύουν στο γονίδιο *dicer-2*, κατά τη 2^η ημέρα μετά τη διαμόλυνση (Μεγέθυνση 40x).

▪ Έλεγχος κυττάρων Sf21 σε επίπεδο μεταγραφώματος

Μετά από παρακολούθηση των κυττάρων για δύο με τρεις μέρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, ενώ απομονώθηκε το ολικό RNA τους, ώστε να ακολουθήσει στην συνέχεια η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Τα έτοιμα cDNA χρησιμοποιήθηκαν για τον επακόλουθο έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης, όπου και παρατηρήθηκαν μη ομοιόμορφα επίπεδα έκφρασής του μεταξύ των δειγμάτων από τα διαμολυσμένα κύτταρα Sf21 (**Εικόνα 3.39**), όπως επίσης παρατηρήθηκε και κατά τον έλεγχο της έκφρασης της α -τουμπουλίνης κατά το Πείραμα Α (**Εικόνα 3.36**).



Εικόνα 3.39. Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της α -τουμπουλίνης σε δείγματα cDNA των διαμολυσμένων κυττάρων Sf21 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCas9. Πραγματοποιήθηκε RT-PCR και τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκε ο θετικός μάρτυρας Sf-HpLuc 1 και ο αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συγκριτική ανάλυση της εφαρμογής των μεθόδων RNAi και CRISPR/Cas9 σε κυτταρικές σειρές εντόμων

Οι μοριακές τεχνικές RNAi και CRISPR/Cas9 χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά ως εργαλεία παρέμβασης στη γονιδιακή έκφραση των εντόμων, με στόχο την καταστολή βασικών γονιδίων και την ταυτόχρονη επίτευξη της μειωμένης άμυνας ή/και της θνησιμότητάς τους. Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία εξετάστηκε η χρήση των μεθόδων RNAi και CRISPR/Cas9 για την πρόκληση αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τα έντομα *Trichoplusia ni* και *Spodoptera frugiperda*. Το γονίδιο *dicer-2* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της ενδονουκλεάσης Dicer-2, η οποία διασπά μακρά δίκλιωνα μόρια RNA σε μικρότερα μόρια γνωστά ως siRNA (Kim et al. 2006). Για την επιτυχή εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων ακολουθήθηκαν διαφορετικές στρατηγικές, από τις οποίες προέκυψαν αποτελέσματα, που χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης.

Βασικά σημεία και προκλήσεις της πειραματικής διαδικασίας με τη μέθοδο RNAi

Οι τρόποι μεταφοράς του dsRNA στα έντομα για την πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης μέσω RNAi είναι πολλοί, όπως ο εμβαπτισμός, η χορήγηση μέσω της τροφής, η μικροέγχυση, καθώς και η χρήση διαγονιδιακών φυτών (Niu et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, σχεδιάστηκαν ειδικές φουρκέτες RNA, που στοχεύουν το γονίδιο της ενδονουκλεάσης Dicer-2 στις κυτταρικές σειρές Hi5 και Sf21, οι οποίες προέρχονται από τα Λεπιδόπτερα *T. ni* και *S. frugiperda*, αντίστοιχα. Οι ειδικές αυτές RNAi φουρκέτες θα μπορούσαν να μεταφερθούν με κάποιον από τους παραπάνω τρόπους, με σκοπό την αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα των Λεπιδοπτέρων. Η επιτυχία μιας παρόμοιας στρατηγικής γονιδιακής αποσιώπησης έχει αποδειχθεί κατά την κατανάλωση από έντομα φυτικού υλικού, που εκφράζει dsRNA φουρκέτες ενάντια σε επιλεγμένα γονίδια-στόχους (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Ωστόσο, η κατασκευή των ανασυνδυασμένων φορέων, που παράγουν την εκάστοτε επιθυμητή φουρκέτα, αποτελεί μία από τις πρώτες προκλήσεις στην εφαρμογή της μεθόδου RNAi, καθώς για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, που θα παράγει την επιθυμητή RNA φουρκέτα πρέπει να κατασκευαστούν δύο επιμέρους φορείς, οι οποίοι θα περιλαμβάνουν την αλληλουχία-στόχο του γονιδίου. Στην παρούσα εργασία, το ένθεμα του δεύτερου φορέα υποκλωνοποιήθηκε στον πρώτο φορέα με αντίθετο προσανατολισμό, ώστε κατά τη διαδικασία της μεταγραφής να παράγεται η επιθυμητή φουρκέτα λόγω αυτοϋβριδισμού

του παραγόμενου μορίου RNA (βλ. §3.1.1.1, §3.1.1.2). Προκειμένου δε να επιβεβαιωθεί η ακρίβεια στην αλληλουχία των τμημάτων που κλωνοποιήθηκαν στον τελικό φορέα, ώστε να παράγεται επιτυχώς η επιθυμητή φουρκέτα, η διαδικασία αυτή χρειάστηκε να υποβληθεί σε πολλαπλούς ελέγχους.

Το μήκος του σχεδιασμένου dsRNA φαίνεται να είναι επίσης ένας καθοριστικός παράγοντας για την αποτελεσματική γονιδιακή αποσιώπηση, προκειμένου για πειράματα πρόσληψης από το εξωκυττάριο μέσο (Mao et al., 2007). Σε κυτταρική σειρά S2 της *Drosophila* αποδείχθηκε πως το ελάχιστο μήκος για την πρόσληψη του dsRNA είναι 211 bp (Saleh et al., 2006), ενώ σε δοκιμασίες RNAi στα ημίπτερα έντομα, οι περισσότερες αλληλουχίες dsRNA είχαν μήκος μεταξύ 185-675 bp (Li et al., 2013). Οι RNA φουρκέτες που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη αφενός εκφράζονταν ενδογενώς κατόπιν μετασχηματισμού, αφετέρου δε είχαν μήκος 366 bp και 401 bp για τα κύτταρα Hi5 και Sf21, αντίστοιχα (Εικόνες 3.1, 3.6). Επιπλέον, στη μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2-3 παρατηρήθηκε η επιτυχημένη ενσωμάτωση του DNA της φουρκέτας στο γονιδιώμα τους (Εικόνα 3.11) και η εξίσου επιτυχημένη έκφρασή της σε επίπεδο μεταγραφώματος (Εικόνα 3.15). Έγινε λοιπόν, η αποτελεσματική πρόσληψη και έκφραση του επιθυμητού διαγονιδίου από τα κύτταρα Sf-HpDcr2-3.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου RNAi μπορεί επίσης να επηρεάζεται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ιστού (Bellés, 2010). Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι τα αιμοκύτταρα αποτελούν έναν εύκολο στόχο για εφαρμογή του RNAi στα λεπιδόπτερα έντομα, όπως το *Manduca sexta* (Eleftherianos et al., 2007), αλλά και τα ωθηκικά κύτταρα στο *Bombyx mori* (Kolliopoulou and Swevers, 2013). Στην παρούσα εργασία τα κύτταρα Λεπιδοπτέρων που χρησιμοποιούνται για τα πειράματα RNAi (Hi5 και Sf21) αποτελούν ωθηκικά κύτταρα (βλ. §2.1.1.1). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι στα σταθερά μετασχηματισμένα ωθηκικά κύτταρα Sf21 επιτυγχάνεται η παραγωγή της σχεδιασμένης RNA φουρκέτας (Εικόνα 3.15) σε συνδυασμό με την επακόλουθη μειωμένη έκφραση του γονιδίου *dicer-2* κατά τον έλεγχο με qRT-PCR (Εικόνα 3.17).

Ένα ακόμα βασικό στοιχείο στις πειραματικές διαδικασίες της μεθόδου RNAi αποτέλεσε ο κατάλληλος σχεδιασμός της διαμόλυνσης προκειμένου να προκύψουν οι σταθερά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές. Η επίτευξη του μετασχηματισμού είναι μια διαδικασία που απαιτεί χρόνο, καθώς είναι πιθανό να απαιτηθούν αρκετές προσπάθειες προκειμένου να επιτευχθεί ο επιτυχής σταθερός μετασχηματισμός των κυττάρων, αφού τα κύτταρα ενδέχεται να μην προσλάβουν τους φορείς ή στην πορεία να χάσουν την επιθυμητή πληροφορία. Για τους λόγους αυτούς στη παρούσα εργασία ήταν απαραίτητος ο

έλεγχος των μετασχηματισμένων κυττάρων σε επίπεδο γονιδιώματος, με την απομόνωση του DNA των ανασυνδυασμένων κυττάρων και τον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου HpDcr2 (βλ. §3.1.2.1), αλλά και σε επίπεδο μεταγραφώματος, κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση RNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα, ώστε να εξεταστεί η έκφραση του διαγονιδίου αυτού (βλ. §3.1.2.2). Οι έλεγχοι, που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαίωσαν τον επιτυχή μετασχηματισμό των κυττάρων Sf21 και απέδειξαν την παρουσία και έκφραση του διαγονιδίου Sf-HpDcr2, αλλά και του διαγονιδίου HpLuc σε κυτταρική σειρά-μάρτυρα Sf21. Αντίθετα, στα κύτταρα Hi5 η επίτευξη των σταθερών σειρών δεν κατέστη εφικτή στα χρονικά πλαίσια πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας.

Βασικά σημεία και προκλήσεις της πειραματικής διαδικασίας με τη μέθοδο CRISPR/Cas9

Παράλληλα με το μηχανισμό RNAi, εφαρμόστηκε η πρόκληση αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* μέσω του μηχανισμού CRISPR/Cas9. Η εφαρμογή της μεθόδου απαιτεί την επιλογή ειδικών αλληλουχιών-στόχων του γονιδίου *dicer-2*, μέσω των οποίων θα πραγματοποιηθεί η κοπή τους από την ενδονουκλεάση SpCas9. Κατά τη διαδικασία της επιλογής των ολιγονουκλεοτιδίων, οι αλληλουχίες-στόχοι του γονιδίου *dicer-2* επιλέγονται προσεκτικά με βάση συγκεκριμένες παραμέτρους (βλ. §2.2.2.8.2), οι οποίες προβλέπεται να καθορίσουν την αποτελεσματικότητα του μηχανισμού CRISPR/Cas9 (Πίνακας 3.3). Η αλληλουχία του γονιδίου-στόχου πρέπει να εξεταστεί με προσοχή ώστε να πληρούνται συγκεκριμένες προϋποθέσεις, με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων αλληλουχιών που θα κλωνοποιηθούν στους ανάλογους φορείς. Ως εκ τούτου, η λανθασμένη επιλογή αλληλουχιών-στόχων μπορεί να επηρεάσει την επιτυχία της μεθόδου.

Σύμφωνα με αναφορές σχετικά με την εφαρμογή της μεθόδου CRISPR/Cas9 στα Λεπιδόπτερα, έχει ήδη δείχθει ότι μπορεί να είναι αποτελεσματική στην πρόκληση βλαβών στο γονίδιο-στόχο. Ειδικότερα, σε ανάλυση του βασικού γονιδίου της εμβρυογένεσης *Wnt1* (*BmWnt1*) του λεπιδοπτέρου *B. mori*, οι δύο αλληλουχίες-στόχοι του γονιδίου που επιλέχθηκαν, αφού υπέστησαν επεξεργασία αποτελεσματικά διαμέσου του μηχανισμού CRISPR/Cas9, οδήγησαν σε δυσκολία εκκόλαψης των εμβρύων, αλλά και σε σοβαρά σωματικά και χρωματικά ελαττώματα (Zhang et al., 2015). Ομοίως, επιλέχθηκαν δύο αλληλουχίες-στόχοι του γονιδίου *BmBLOS2* του *B. mori*, σύμφωνα με τον κανόνα GGN19GG, ώστε να κατευθύνουν την ενδονουκλεάση SpCas9 στην πρόκληση της

δίκλωνης βλάβης (Wang et al., 2013). Ως αποτέλεσμα παρατηρήθηκε υψηλή μεταλλαξιγένεση στην κάθε περιοχή-στόχο (94% και 95,6%, αντίστοιχα). Στην παρούσα μελέτη οι αλληλουχίες-στόχοι μήκους 20 nt που επιλέχθηκαν στοχεύουν περιοχές του γονιδίου *dicer-2*, οι οποίες βρίσκονται στην αρχή (περιοχή ελικάσης, περιοχή Dicer-dimer) ή στη μέση (περιοχή PAZ) της αλληλουχίας του γονιδίου, με στόχο την πρόκληση της μεγαλύτερης δυνατής βλάβης με τη μορφή πρόδρομης λήξης της μεταγραφής ή/και της δημιουργίας μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Επιλέχθηκαν επιπλέον δύο αλληλουχίες-στόχοι του γονιδίου *dicer-2*, στα κύτταρα Sf21, που βρίσκονται προς το τέλος της αλληλουχίας του γονιδίου (περιοχή Ribo c), ώστε να διερευνηθεί η αποδοτικότητα στην πρόκληση βλάβης του γονιδίου, μέσω της επεξεργασίας με CRISPR/Cas9. Ωστόσο, στο έντομο *Drosophila* δείχθηκε ότι ένα sgRNA μήκους 18 nt διατηρεί τη μεταλλαξιγένεση σε ίδια επίπεδα με ένα sgRNA μήκους 20 nt, μειώνοντας ταυτόχρονα τις μεταλλαγές που ενδεχομένως προκαλούνται εξαιτίας της μη-ειδικής επίδρασης στο γονιδίωμα (Ren et al., 2014). Οι αυξημένες μεταλλαγές μη-ειδικής επίδρασης στο γονιδίωμα μπορούν παρόλα αυτά να παρατηρηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις του συμπλόκου Cas9-sgRNA (Pattanayak et al., 2013).

Μετά το σχεδιασμό και τη σύνθεση των επιλεγμένων αλληλουχιών-στόχων, ακολούθησε η κλωνοποίησή τους στον κατάλληλο για το κάθε είδος εντόμου φορέα pCas9 και η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων Hi5 και Sf21 (Πίνακες 3.4-3.7). Στις εφαρμογές του CRISPR/Cas9, ο κύριος τρόπος μεταφοράς του οδηγού RNA και της ενδονουκλεάσης Cas9, που εφαρμόζεται στα έντομα *in vivo* είναι η μικροέγχυση (Taning et al., 2017). Ωστόσο, στα κύτταρα εντόμων πραγματοποιείται κυρίως πλασμιδιακή διαμόλυνση (Böttcher et al., 2014; Liu et al., 2014; Mabashi-Asazuma et al., 2015), ενώ σε περίπτωση κυττάρων που εμφανίζουν δυσκολία στη διαμόλυνση μπορεί να εφαρμοστεί και κάποια μέθοδος παραμόρφωσης της μεμβράνης των κυττάρων, για την αποτελεσματική μεταφορά του sgRNA και της ενδονουκλεάσης Cas9 (Han et al., 2015). Εδώ, τα κύτταρα Hi5 και Sf21 διαμολύνθηκαν με διάφορους συνδυασμούς φορέων, ώστε να εξεταστεί η αποδοτικότητα στην ελάττωση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2*. Παρατηρείται ότι στα περισσότερα πειράματα επεξεργασίας μέσω CRISPR/Cas9 στοχεύονται ταυτόχρονα δύο θέσεις του γονιδίου-στόχου από την ενδονουκλεάση Cas9 (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί φορέων pCas9 (Πίνακες 3.4-3.7), οι οποίοι απέδειξαν μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς την αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* σε κύτταρα Hi5 διαμολυσμένα με δύο ή παραπάνω ανασυνδυασμένους φορείς pCas9 (βλ. §4.2).

Τέλος, σημειώνεται ότι ο μηχανισμός CRISPR/Cas9 επεμβαίνει στο γονιδιωματικό DNA προκαλώντας την αποδιάταξη των κλώνων και προξενώντας βλάβη με τη μορφή δίκλωνης πέψης. Ο επαναϋβριδισμός των κλώνων επέρχεται με αποτέλεσμα την απώλεια βάσεων, ενώ το μεταγραφόμενο κομμάτι αναμένεται να διαφέρει σε μέγεθος σε σχέση με το αρχικό, με αυτό να είναι πιθανότατα μικρότερο (Εικόνα 3.28, 3.37). Ωστόσο, κατόπιν ελέγχου της αποδοτικότητας σε επίπεδο μεταγραφώματος μέσω RT-PCR, τυχόν διαφορές ενδέχεται να μην είναι εμφανείς κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης. Καθώς, λοιπόν, το σύστημα CRISPR/Cas9 λειτουργεί σε γονιδιωματικό επίπεδο, εφόσον παρουσιαστούν ασαφή αποτελέσματα κατά τον έλεγχο της έκφρασης, είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που λαμβάνονται μέσω του RNAi, το οποίο και λειτουργεί σε μεταγραφικό επίπεδο (Zhang et al., 2015). Ωστόσο, για την επιβεβαίωση της δράσης του μηχανισμού CRISPR/Cas9 χρειάζεται να γίνει και η αλληλούχιση των προϊόντων.

Αξιολόγηση της εφαρμογής των μηχανισμών RNAi και CRISPR/Cas9 στις κυτταρικές σειρές εντόμων

Οι δύο μέθοδοι γονιδιακής αποσιώπησης στις κυτταρικές σειρές εντόμων χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, με το RNAi να προκαλεί αποσιώπηση σε επίπεδο mRNA, ενώ το CRISPR/Cas9 να επεξεργάζεται την αλληλουχία-στόχο σε επίπεδο DNA. Ως επακόλουθο, η αποσιώπηση RNAi λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, ενώ το σύστημα CRISPR/Cas9 δρα στον πυρήνα του κυττάρου (Barrangou et al., 2015). Επιπλέον, η αποσιώπηση μέσω RNAi μπορεί να είναι παροδική με διάρκεια 2-7 ημερών (siRNA) με τη δυνατότητα να γίνει και μακροπρόθεσμη (RNA φουρκέτα), σε αντίθεση με την επεξεργασία μέσω CRISPR/Cas9, που προκαλεί ένα μόνιμο αποτέλεσμα στο DNA όπου επιδρά (Barrangou et al., 2015). Ειδικότερα, για τον έλεγχο των επιβλαβών εντόμων, είναι επιθυμητό το σχεδιασμένο dsRNA που χρησιμοποιείται στην εφαρμογή του RNAi να εκφράζεται έως ότου το έντομο θανατωθεί, ώστε να αποφευχθεί η πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας (Huvenne and Smagghe, 2010). Παρόλα αυτά σημειώνεται, ότι ακόμα και η μερική αποσιώπηση ορισμένων γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές και μη αναστρέψιμες βλάβες, αλλά και σε μια θανατηφόρα επίδραση στο έντομο (Huvenne and Smagghe, 2010).

Η στρατηγική της γονιδιακής αποσιώπησης σε κυτταρικές σειρές εντόμων μέσω CRISPR/Cas9 αποδείχθηκε πιο απλή στην υλοποίησή της, δεδομένου ότι περιλαμβάνει

ένα βήμα κλωνοποίησης, σε σχέση με τις κλωνοποιήσεις των φορέων του RNAi που περιλαμβάνουν δύο ενδιάμεσα βήματα έως ότου παραχθεί ο φορέας που θα εκφράζει την επιθυμητή φουρκέτα. Αυτό συμβαίνει, διότι στην περίπτωση του CRISPR/Cas9 δεν υπάρχει ανάγκη χρήσης ενδιάμεσου φορέα και απομόνωσης αλληλουχιών από αυτόν. Συνεπώς, η κατασκευή του ανασυνδυασμένου φορέα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο RNAi κρίνεται ότι είναι πιο πολύπλοκη σε σχέση με την μέθοδο CRISPR/Cas9.

Όσον αφορά τα διαμολυσμένα κύτταρα με τους ανασυνδυασμένους φορείς, παρατηρούνται σημαντικά στοιχεία που διαφέρουν ανά κυτταρική σειρά. Η μέθοδος RNAi αναφέρεται ότι δημιουργεί ένα φαινοτυπικό αποτέλεσμα, το οποίο είναι συνήθως ανιχνεύσιμο σε έναν κυτταρικό πληθυσμό, σε αντίθεση με την μέθοδο CRISPR/Cas9 όπου η φαινοτυπική διαφορά μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμη (Barrangou et al., 2015). Ωστόσο στην παρούσα εργασία, κατά τη διαμόλυνση των κυττάρων Sf21 με πλασμίδια pCas9, δημιουργήθηκαν μεγάλα ογκώδη κύτταρα και κύτταρα με χαρακτηριστικές «ουρές» (Εικόνα 3.38), σε αντίθεση με τα κύτταρα Hi5, τα οποία κατάφεραν να διατηρήσουν το σχήμα τους (Εικόνα 3.29). Το στοιχείο αυτό υποδεικνύει τη διαφορετική απόκριση των κυτταρικών σειρών ανάλογα με το είδος του εντόμου από το οποίο προέρχονται, στη διαμόλυνση τους με τους φορείς pCas9. Βέβαια η παρατήρηση αυτή εξηγείται από το γεγονός ότι τα κύτταρα Sf21 είναι πιο ευαίσθητα στην απόπτωση, ειδικά λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η μέθοδος CRISPR/Cas9 προκαλεί θραύση στο DNA, άρα επάγει την απόκριση του κυττάρου στην προκαλούμενη βλάβη του DNA. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά τη μέθοδο RNAi στα κύτταρα Sf21, που ήταν σταθερά μετασηματισμένα με το πλασμίδιο, το οποίο παράγει τη φουρκέτα HpDcr2. Τα κύτταρα αυτά, κατόπιν της μόλυνσης με τους ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV, με το πέρας μερικών ημερών εμφάνισαν διογκώσεις και παρουσίασαν έντονες διαφορές στο μέγεθός τους, σε σχέση με τα κύτταρα Sf21, που δεν έφεραν την αντίστοιχη φουρκέτα (Εικόνα 3.19). Συνεπώς, κατά την εφαρμογή τους σε κυτταρικές σειρές εντόμων, οι μηχανισμοί γονιδιακής αποσιώπησης RNAi και CRISPR/Cas9 ενδέχεται να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την κάθε σειρά φαινοτυπικά.

4.2 Εξέταση της αποδοτικότητας του RNAi και CRISPR/Cas9 στη γονιδιακή αποσιώπηση

Οι δύο μοριακές μέθοδοι RNAi και CRISPR/Cas9 ενδέχεται να παρουσιάζουν διαφορές ως προς την αποδοτικότητά τους για την επίτευξη της αποσιώπησης του γονιδίου

dicer-2 στις κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων, καθώς χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης στην αλληλουχία-στόχο. Το γεγονός αυτό ίσως δικαιολογεί τις πειραματικές παρατηρήσεις σύμφωνα με τις οποίες η αποδοτικότητα της γονιδιακής αποσιώπησης μέσω της κάθε μεθόδου ποικίλλει, με το RNAi να φτάνει σε ποσοστά > 75% (Ebalunode et al., 2011), ενώ η επεξεργασία με CRISPR/Cas9 να κινείται συνήθως σε ποσοστά 5-65% (Cong et al. 2013; Fu et al., 2013). Ωστόσο, στην παρούσα εργασία αξιοποιώντας τα αποτελέσματα των πειραματικών δοκιμασιών, δίνεται η δυνατότητα της μελέτης της αποδοτικότητας των μεθόδων αυτών σε επίπεδο γονιδιώματος και μεταγραφώματος, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την λειτουργία των μεθόδων αυτών.

Ανάλυση της αποδοτικότητας του RNAi στην αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*

Η αποδοτικότητα του RNAi μηχανισμού σε προσπάθειες συστημικής και περιβαλλοντικής εφαρμογής του θεωρείται χαμηλή στα λεπιδόπτερα έντομα, σε σχέση με άλλα είδη εντόμων, ενώ απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα dsRNA για την απόκριση του RNAi σε αυτή την τάξη εντόμων (Terenius et al., 2011). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η αποικοδόμηση και η ενδοκυτταρική μεταφορά του dsRNA είναι οι κύριοι παράγοντες που ευθύνονται για τη μειωμένη αποτελεσματικότητα του RNAi στα Λεπιδόπτερα (Shukla et al., 2016). Η αποδοτικότητα του RNAi, ωστόσο, εξαρτάται και από πολλούς άλλους παράγοντες, όπως η τάξη του εντόμου, το γονίδιο-στόχος, ο τρόπος μεταφοράς του RNAi κ.ά.

Το γονίδιο-στόχος, που επιλέγεται για την αποσιώπηση μέσω RNAi μηχανισμού πρέπει να είναι ένα βασικό γονίδιο, το οποίο θα εκφράζεται με σταθερότητα σε όλα τα διαφορετικά στάδια ζωής του εντόμου (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Σε αναλύσεις γονιδίων Λεπιδοπτέρων, τα οποία έχουν επιχειρηθεί να αποσιωπηθούν μέσω της τεχνικής του RNAi, φαίνεται ότι τα γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό είναι και πιο ευαίσθητα στην αποσιώπηση, με τα ποσοστά επιτυχίας να φτάνουν έως και το 80% (Terenius et al., 2011). Αντιθέτως, στα ημίπτερα έντομα τα πιο ευαίσθητα γονίδια θεωρούνται αυτά, που εκφράζονται στο έντερο και τους σιελογόνους αδένες (Zotti and Smagghe, 2015). Στην παρούσα μελέτη το γονίδιο-στόχος που επιλέχθηκε είναι το γονίδιο της ενδονουκλεάσης *Dicer-2*, η οποία συμμετέχει στην αντιϊκή άμυνα (Marques et al., 2013) και είναι υπεύθυνη για την επεξεργασία του dsRNA (Lee et al. 2004). Στα πλαίσια της στρατηγικής για την εφαρμογή της μεθόδου RNAi, σχεδιάστηκε μία ειδική RNA

φουρκέτα για τις κυτταρικές σειρές Hi5 και Sf21, η οποία καθώς θα κατακερματίζεται από τη δράση του ενζύμου Dicer-2 σε μικρά δίκλιωνα μόρια (siRNA), θα οδηγεί στην αποσιώπηση του γονιδίου, μέσω υβριδισμού του οδηγού κλώνου με το mRNA του *dicer-2*.

Όπως δείχθηκε ήδη (βλ. §3.1.2.1), η RNA φουρκέτα που σχεδιάστηκε ειδικά για τα κύτταρα Sf21 ανιχνεύεται επιτυχώς σε όλες τις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 (**Εικόνα 3.11**). Ωστόσο από τον έλεγχο της έκφρασης της φουρκέτας Sf-HpDcr2 στα μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21, διαπιστώθηκε ότι μόνο στην κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2-3 επιβεβαιώνεται η έκφραση της αντίστοιχης φουρκέτας (**Εικόνα 3.15**). Επιπλέον, ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* σε όλες τις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 μέσω της χρήσης qRT-PCR επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα της φουρκέτας Sf-HpDcr2 στην αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* στην κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2-3, καθώς παρατηρείται πως η έκφραση του γονιδίου *dicer-2* είναι ιδιαίτερα μειωμένη στην σειρά αυτή, σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα κύτταρα Sf21 (**Εικόνα 3.17**). Από τα δεδομένα της αντίδρασης qRT-PCR διαπιστώνεται ότι το ποσοστό ελάττωσης της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* στην κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2 υπολογίζεται στα ~80% σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Επιπλέον σημειώνεται ότι κατά το σχεδιασμό της διαμόλυνσης για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών, στην κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2-3 προστέθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που παράγει την φουρκέτα Sf-HpDcr2, γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται με την αποδοτικότητα του RNAi.

Χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να συλλεχθούν, ωστόσο, και από τη σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* με το γονίδιο *ago-2*. Το γονίδιο *ago-2* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης Argonaute 2, η οποία καταλύει την διάσπαση του mRNA στόχου (Wang et al., 2009). Από τα δεδομένα της αντίδρασης qRT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *ago-2* παρατηρείται ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με το αντίστοιχο του γονιδίου *dicer-2* (**Εικόνα 3.18**). Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου *ago-2* παρουσιάζεται χαμηλή στις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2, σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές, που εκφράζουν το διαγονίδιο HpLuc. Τα κύτταρα Sf-HpLuc εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τα γονίδια *ago2* και *dicer-2*, σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές Sf-HpDcr2 και τα κύτταρα-μάρτυρες. Το φαινόμενο μπορεί να ερμηνευτεί, καθώς στα κύτταρα Sf-HpLuc αναμένεται να υπάρχει αυξημένη ανάγκη συνεχούς παραγωγής τη ενδονουκλεάσης Dicer-2 και της πρωτεΐνης Ago2, προκειμένου να κατακερματιστεί η φουρκέτα HpLuc μέσω του μηχανισμού RNAi. Αντίθετα, στα μετασχηματισμένα κύτταρα Sf21 που φέρουν τη φουρκέτα Sf-HpDcr2, η αποδοτική παραγωγή της ενδονουκλεάσης

Dicer-2 παρεμποδίζεται, με αποτέλεσμα να μην παράγονται φυσιολογικά siRNA, και συνεπώς να μην πραγματοποιείται η μεταφορά των siRNA στην πρωτεΐνη Ago2 ή αυτή να πραγματοποιείται σε μικρότερο βαθμό. Για τον λόγο αυτό παρατηρείται σαφώς μειωμένη η έκφραση του *ago2* στα κύτταρα Sf-HpDcr2 σε σχέση με τα κύτταρα Sf-HpLuc.

Συνεπώς, τα παραπάνω δεδομένα που αναλύθηκαν αποδεικνύουν την επιτυχή εφαρμογή του μηχανισμού RNAi για την αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* στην κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2-3. Η κυτταρική σειρά αυτή, αποτέλεσε στη συνέχεια βάση των πειραμάτων μόλυνσης με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV, με σκοπό τον έλεγχο της απόκρισης των κυττάρων σε μια ιϊκή μόλυνση, τα αποτελέσματα των οποίων συζητούνται στη συνέχεια (βλ. §4.3).

Ανάλυση της αποδοτικότητας του CRISPR/Cas9 στην αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*

Ως δεύτερη προσέγγιση για την αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* χρησιμοποιήθηκε η τεχνική CRISPR/Cas9. Το σύστημα CRISPR/Cas9, χάρις στην υψηλή του εξειδίκευση και απλότητα, μπορεί να αξιοποιηθεί για την αποτελεσματική επεξεργασία γονιδίων σε πλήθος οργανισμών και κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων (Mabashi-Asazuma and Jarvis, 2017). Καθώς λειτουργεί σε επίπεδο γονιδιώματος, αποδεικνύεται ως πιο διεισδυτικό και χρήσιμο για την ανάλυση λειτουργικών γονιδίων των Λεπιδοπτέρων σε πολλές περιπτώσεις, συγκριτικά με τη μέθοδο RNAi (Bi et al., 2016).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με διαφορετικούς συνδυασμούς ανασυνδυασμένων φορέων pCas9, οι οποίοι στοχεύουν στο γονίδιο *dicer-2* (Πίνακες 3.4-3.7). Ο σχεδιασμός αυτός της παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων Hi5 και Sf21 είχε ως απώτερο σκοπό τη διερεύνηση της βέλτιστης απόδοσης ως προς την πρόκληση βλάβης στο γονίδιο *dicer-2*. Όπως αποδεικνύεται από τους ελέγχους των κυττάρων Hi5 σε επίπεδο γονιδιώματος και μεταγραφώματος (βλ. §3.2.2.1), η συνδυαστική δράση δύο ή περισσότερων ανασυνδυασμένων φορέων pCas9 φέρει καλύτερα αποτελέσματα, καθώς οδηγεί σε μεγαλύτερη εξασθένηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου, σε σχέση με τη διαμόλυνση από έναν μόνο φορέα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στη διαμόλυνση των κυττάρων Hi5 με έναν φορέα pCas9, που στοχεύει το γονίδιο *dicer-2*, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου εμφανίζονται παρόμοια με εκείνα διαμολυσμένων κυττάρων με το φορέα που εκφράζει τη φουρκέτα έναντι του *dicer-2* (Εικόνα 3.28). Ωστόσο, κατά τον έλεγχο της έκφρασης του

γονιδίου *dicer-2* σε κυτταρικές σειρές Hi5, που διαμολύνθηκαν με διάφορους συνδυασμούς φορέων pCas9, παρουσιάζεται μία εμφανής εξασθένηση της έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα αυτά, σε σχέση με τα κύτταρα που παράγουν την φουρκέτα HpDcr2 (Εικόνα 3.34-3.35). Σημειώνεται ότι η στόχευση δύο περιοχών του γονιδίου-στόχου αποτελεί συνήθη στρατηγική στα περισσότερα πειράματα CRISPR/Cas9 που αφορούν λεπιδόπτερα έντομα (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2015; Bi et al., 2016).

Συγκρίνοντας περαιτέρω τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τους φορείς pCas9 και τα κύτταρα που φέρουν την φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*, μπορούν να αντληθούν σημαντικές πληροφορίες για την αποτελεσματική εφαρμογή της μεθόδου CRISPR/Cas9. Κατόπιν γονιδιωματικού ελέγχου των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5 παρατηρείται, ότι δεν επιτυγχάνεται η αποτελεσματική ενίσχυση του γονιδίου *dicer-2*, σε αντίθεση με τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που παράγει τη φουρκέτα HpDcr2 (Εικόνα 3.32). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στη φύση της δράσης του συστήματος CRISPR/Cas9, η οποία στηρίζεται στην επεξεργασία του γονιδίου-στόχου σε επίπεδο DNA. Αντίθετα, τα σταθερά μετασχηματισμένα κύτταρα Hi5 που φέρουν τη φουρκέτα δεν υποβλήθηκαν σε γονιδιωματική επεξεργασία, με αποτέλεσμα να παρατηρείται σαφώς μεγαλύτερη ενίσχυση του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα αυτά. Συνεπώς, η παρουσία χαμηλών επιπέδων, ή ακόμα και η πλήρης απουσία, ενίσχυσης του γονιδίου *dicer-2* αποδεικνύει ότι πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η γονιδιωματική επεξεργασία των διαμολυσμένων κυττάρων Hi5.

Επιπλέον, το τμήμα του γονιδίου στο οποίο γίνεται η κοπή μέσω της ενδονουκλεάσης SpCas9 παίζει σημαντικό ρόλο. Η δημιουργία βλάβης σε βασικές περιοχές της Dicer-2, όπως είναι οι περιοχές PAZ και RIIIID, οι οποίες ευθύνονται για την ακριβή επεξεργασία του dsRNA (Zhang et al., 2004), μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αποδοτικότητα της μεθόδου. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα στοχεύουν τις περιοχές PAZ και RIIIID αναμένεται να προκαλέσουν βλάβη, κατά την οποία δεν θα παράγεται το αναμενόμενο προϊόν ή η παραγόμενη πρωτεΐνη δεν θα είναι πλήρως λειτουργική. Κατά το γονιδιωματικό έλεγχο των κυτταρικών σειρών Hi5 που διαμολύνθηκαν με φορείς pCas9, οι οποίοι στόχευαν τις περιοχές του γονιδίου *dicer-2* που κωδικοποιούν αντίστοιχα τις περιοχές PAZ και Ribo c του ενζύμου Dicer-2, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μειωμένη ενίσχυση του DNA του *dicer-2* και για τις δύο περιοχές αυτές (Εικόνα 3.31-3.32). Ομοίως, κατά τον έλεγχο σε επίπεδο μεταγραφώματος παρατηρήθηκε η μείωση ή η πλήρης απουσία της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τους φορείς pCas9, και για τις 2 περιοχές του γονιδίου που ελέγχθηκαν (Εικόνα 3.34-3.35).

Ένα σημαντικό στοιχείο της μεθόδου CRISPR/Cas9, που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης είναι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς και συγκεκριμένα της α-τουμπουλίνης στα διαμολυσμένα κύτταρα από τους ανασυνδυασμένους φορείς pCas9. Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο αυτό αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταροσκελετού των κυττάρων που εξετάζονται (Nielsen et al., 2010), με αποτέλεσμα να είναι αναμενόμενη η ισχυρή και ομοιόμορφη έκφρασή του. Ωστόσο, κατά τον έλεγχο του γονιδίου της α-τουμπουλίνης σε επίπεδο μεταγραφώματος διαπιστώθηκαν ιδιαίτερα ανομοιόμορφα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου τόσο στα διαμολυσμένα κύτταρα Sf21 (**Εικόνα 3.36, 3.39**), όσο και στα διαμολυσμένα κύτταρα Hi5 (**Εικόνα 3.27**). Μια αιτιολόγηση αυτού του φαινομένου, μπορεί να προσδιοριστεί από τον φαινότυπο των κυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πως τα κύτταρα Sf21, ανεξάρτητα από τον αριθμό των φορέων pCas9 με τους οποίους θα διαμολυνθούν, δεν μπορούν να διατηρήσουν το φυσιολογικό τους κυκλικό σχήμα και παρουσιάζουν έντονες διογκώσεις και χαρακτηριστικές «ουρές» (**Εικόνα 3.38**). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη συνθηκών καταπόνησης, που ενδεχομένως σχετίζονται άμεσα με την εφαρμογή του CRISPR/Cas9, οι οποίες επηρεάζουν και τη φυσιολογική έκφραση της α-τουμπουλίνης στα διαμολυσμένα κύτταρα Sf21. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στα διαμολυσμένα κύτταρα Hi5, ωστόσο αυτά καταφέρνουν να διατηρήσουν το σχήμα τους, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της έκφρασης της α-τουμπουλίνης να μην εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ τους (**Εικόνα 3.29**).

Συνεπώς, τα αποτελέσματα των πειραμάτων CRISPR/Cas9, που συλλέχθηκαν από τους ελέγχους σε επίπεδο γονιδιώματος και μεταγραφώματος, παρουσιάζουν σημαντική αποδοτικότητα όσον αφορά την πρόκληση αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2*. Ωστόσο η επιτυχία της αποσιώπησης του γονιδίου, πρέπει ακόμα να διερευνηθεί σε περαιτέρω δοκιμασίες που περιγράφονται στη συνέχεια (βλ. §4.4).

4.3 Ανάλυση της απόκρισης των μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών Sf-HpDcr2 σε μολύνσεις με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV

Στα πλαίσια της εφαρμογής του μηχανισμού RNAi στις κυτταρικές σειρές Sf21, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στην επιλεγμένη κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2-3, η οποία μολύνθηκε με ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς AcMNPV. Ο ιός AcMNPV είναι ένας DNA ιός, ο οποίος αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα βιοελέγχου των λεπιδόπτερων εντόμων (Erlandson, 2008; Haase et al., 2015). Προκειμένου, λοιπόν, να εξεταστεί η επίδραση μολύνσεων με ιούς που υπερπαράγουν dsRNA, τα μολυσμένα κύτταρα που

εκφράζουν τη φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2* ελέγχθηκαν σε πολλαπλά επίπεδα. Αρχικά, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σε λευκό φως και σε ακτινοβολία UV. Οι εικόνες των μικροσκοπήσεων παρουσιάζουν με σαφήνεια την πορεία της μόλυνσης των κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2, από τους ιούς AcMNPV, καθώς υπό την ακτινοβολία UV φαίνεται η σταδιακή αύξηση του αριθμού των μολυσμένων κυττάρων με το πέρασμα του χρόνου (**Εικόνα 3.19**). Παράλληλα, διαπιστώνεται ότι με την πάροδο των ημερών τα μολυσμένα κύτταρα αποκτούν αλλοιωμένο σχήμα με την κυτταρική σειρά που φέρει τη φουρκέτα Sf-HpDcr2 να παρουσιάζει έντονες διογκώσεις. Η εικόνα αυτή των κυττάρων μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες καταπόνησης, τις οποίες υφίστανται τα κύτταρα εξαιτίας της μόλυνσης με τους ανασυνδυασμένους μπακουλοϊούς AcMNPV. Σημειώνεται ότι σε μόλυνση των κυττάρων Sf9 του *S. frugiperda* με ανασυνδυασμένο ιό AcMNPV, παρατηρήθηκε επίσης μεγέθυνση των κυττάρων, αλλά και αύξηση του ενδοκυτταρικού επιπέδου ATP κατά 50-80% (Tran et al., 2012).

Για την καλύτερη, ωστόσο, αξιολόγηση της φαινοτυπικής εικόνας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε έλεγχος του παραγόμενου φθορισμού στα διαλυτά κλάσματα και τα υπερκείμενα των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2. Η ανάλυση της διακύμανσης του φθορισμού στα μολυσμένα κύτταρα των *T. ni* και *S. frugiperda* αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο για να αξιολογηθεί η εξέλιξη της μόλυνσης των κυττάρων (Clarke and Clem, 2002). Από τη συγκριτική ανάλυση του φθορισμού στα δείγματα των διαλυτών κλασμάτων, παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δειγμάτων Sf-HpDcr2, που φέρουν την RNA φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2* και των κυττάρων Sf21 που δεν φέρουν την αντίστοιχη φουρκέτα (**Εικόνα 3.20**). Τα μολυσμένα κύτταρα Sf-HpDcr2 με τους ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV-GFP και AcMNPV-GFP/dsLuc εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα φθορισμού GFP, σε σχέση με τα κύτταρα Sf21. Ωστόσο στα κύτταρα Sf-HpDcr2 που μολύνθηκαν με τον συνδυασμό των ιών AcMNPV-GFP και AcMNPV-dsLuc παρατηρούνται χαμηλά και παρόμοια επίπεδα φθορισμού σε σχέση με τα μολυσμένα κύτταρα Sf21. Παρόμοια διακύμανση του φθορισμού διαπιστώνεται και στα δείγματα των υπερκειμένων των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 (**Εικόνα 3.21**). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στον πιθανό ανταγωνισμό των ανασυνδυασμένων ιών, έχοντας ως αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα φθορισμού, τόσο στα μολυσμένα κύτταρα Sf-HpDcr2, όσο και στα μολυσμένα κύτταρα Sf21.

Ακολούθησε η ανίχνευση του dsRNA στο διαλυτό κλάσμα των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 με τη μέθοδο του στυπώματος κηλίδας. Σκοπός του πειράματος ήταν να προσδιοριστούν τα επίπεδα dsRNA που περιέχονται στα κύτταρα, τα

οποία μπορούν να προέρχονται από τα dsRNA που παράγονται φυσιολογικά από τα κύτταρα, καθώς και τόσο από τη φουρκέτα dsLuc που παράγεται μέσω του ιού AcMNPV όσο και από τη φουρκέτα HpDcr2. Καθώς η χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2 διαθέτει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *dicer-2*, είναι αναμενόμενη η ανίχνευση μεγαλύτερης ποσότητας dsRNA στα κύτταρα που μολύνθηκαν με τον dsRNA ιό και ταυτόχρονα υπερέκφραζαν τη φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*, σε σχέση με τα κύτταρα Sf21 που παρήγαγαν το ένζυμο Dicer-2 σε φυσιολογικά επίπεδα. Όπως παρατηρήθηκε (Εικόνα 3.22), κατά την 7^η ημέρα μετά τη μόλυνση η συσσώρευση του dsRNA ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην Sf-HpDcr2 σειρά σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες Sf21. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα της παρεμπόδισης του κατακερματισμού του ιικού dsRNA (dsLuc) εξαιτίας της δράσης της παραγόμενης φουρκέτας HpDcr2 από την κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2, η οποία εμποδίζει την αποτελεσματική παραγωγή της ενδονουκλεάσης Dicer-2, και άρα την επεξεργασία των dsRNA σε siRNA.

Στα δείγματα μη διαλυτού κλάσματος των μολυσμένων κυττάρων Sf21 και Sf-HpDcr2 πραγματοποιήθηκε επίσης ο έλεγχος παρουσίας του ιικού γονιδίου *he65* και του διαγονιδίου dsLuc. Από την αντίδραση PCR παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των ιικών επιπέδων σε όλους τους χειρισμούς έως και την 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση (Εικόνα 3.23). Εξαιρέση αποτελούν τα κύτταρα Sf21 που μολύνθηκαν με τον AcMNPV-GFP, με το αποτέλεσμα αυτό ίσως να οφείλεται σε κάποιο τεχνικό λάθος κατά την προετοιμασία της αντίδρασης, καθώς έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μέτρησης του φθορισμού (Πίνακας 3.1-3.2) και τη δοκιμασία ανίχνευσης του dsRNA (Εικόνα 3.22). Όσον αφορά στον έλεγχο της παρουσίας του διαγονιδίου dsLuc, στα δείγματα από κύτταρα μολυσμένα με συνδυασμό των ιών AcMNPV-GFP και AcMNPV-dsLuc, που φυσιολογικά παράγουν τη φουρκέτα της λουσιφεράσης, δεν διαπιστώνεται καμία ζώνη, σε αντίθεση με τα κύτταρα μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό AcMNPV-GFP/dsLuc, όπου παρατηρούνται εντονότερες ζώνες ανά ημέρα. (Εικόνα 3.24). Πιθανό ενδεχόμενο αποτελεί η απώλεια του γονιδίου που παράγει τη φουρκέτα της λουσιφεράσης από τους ιούς ή η μειωμένη παραγωγή της φουρκέτας λόγω ανταγωνισμού μεταξύ των δύο ιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση, που διαπιστώνεται και κατά την ανάλυση του φθορισμού στα κύτταρα Sf21 και Sf-HpDcr2.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης vp39 του ιού AcMNPV στα υπερκείμενα της τέταρτης ημέρας των μολυσμένων κυτταρικών σειρών Sf21 και Sf-HpDcr2, μέσω ανοσοστυπώματος Western. Όπως παρατηρείται, η έκφραση

της πρωτεΐνης είναι εντονότερη στα μολυσμένα κύτταρα Sf-HpDcr2 σε σχέση με τα μολυσμένα κύτταρα Sf21, καθώς παρατηρούνται μεγαλύτερες ζώνες που αντιστοιχούν στην πρωτεΐνη vp39 στα κύτταρα, τα οποία φέρουν την φουρκέτα HpDcr2 (Εικόνα 3.25). Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει τη μεγαλύτερη αναπαραγωγή του ιού στα κύτταρα που φέρουν την φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να θεωρούνται πιο ευαίσθητα σε μόλυνση με ιό AcMNPV.

Τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από τα παραπάνω πειράματα μόλυνσης με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV φαίνεται να αποδεικνύουν τη διαφορά στην απόκριση των κυττάρων στη μόλυνση, ανάλογα με την αποσιώπηση ή μη του γονιδίου *dicer-2*. Η κυτταρική σειρά Sf-HpDcr2, που φέρει την φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*, παρουσιάζεται να είναι πιο ευάλωτη σε μια ιϊκή μόλυνση, αλλά και να παράγει μεγαλύτερη ποσότητα dsRNA, σε αντίθεση με τα κύτταρα Sf21. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να ακολουθήσουν περαιτέρω πειραματικές δοκιμασίες και επαναλήψεις, οι οποίες θα επιβεβαιώσουν τις αρχικές ενδείξεις που προκύπτουν από τα πειράματα της παρούσας εργασίας.

4.4 Μελλοντικές προοπτικές στα πλαίσια της παρούσας έρευνας

Στην παρούσα μελέτη διεκπεραιώθηκαν πειραματικές δοκιμασίες, με σκοπό την επίτευξη της αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2* με τις μοριακές τεχνικές RNAi και CRISPR/Cas9 στις κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων Hi5 και Sf21. Τα αποτελέσματα της έρευνας αποδεικνύουν σε πολλά επίπεδα εφαρμογής των δύο μεθόδων, την αποδοτικότητά τους ως προς την εξασθένηση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* στα κύτταρα Hi5 και Sf21. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα που προέκυψαν χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αποσιώπησης του γονιδίου *dicer-2*.

Ξεκινώντας από την μέθοδο RNAi, βασικό μέλημα είναι η δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών Hi5, που να εκφράζουν τη φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2*. Όπως προαναφέρθηκε (βλ. §3.1.1.1), κατασκευάστηκε επιτυχώς ο ανασυνδυασμένος φορέας pEA-Tn-HpDcr2, που παράγει τη φουρκέτα έναντι του *dicer-2* και έγιναν προσπάθειες δημιουργίας σταθερών κυτταρικών σειρών Hi5, που θα εκφράζουν την αντίστοιχη φουρκέτα. Ωστόσο τα κύτταρα αυτά δεν κατάφεραν να επιβιώσουν. Είναι επιθυμητό, λοιπόν, να πραγματοποιηθεί εκ νέου η διαμόλυνση των κυττάρων Hi5, ώστε να προκύψουν σταθερές κυτταρικές σειρές που θα παράγουν την φουρκέτα Tn-HpDcr2. Τα κύτταρα αυτά στην συνέχεια, πρέπει να ελεγχθούν, όπως και στην περίπτωση των

μετασηματισμένων κυττάρων Sf21 (βλ. §3.1.2.1 και §3.1.2.2), για τη γονιδιωματική παρουσία του διαγονιδίου και την έκφρασή του.

Στη συνέχεια, με σκοπό να ολοκληρωθούν τα πειράματα μόλυνσεων των κυττάρων Sf-HpDcr2 με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV, είναι αναγκαίο να ακολουθήσουν επαναλήψεις των διαδικασιών. Στα πειράματα με ανασυνδυασμένους μακουλοϊούς AcMNPV διαπιστώθηκε πως τα κύτταρα Sf-HpDcr2 είναι περισσότερο επιρρεπή σε μια ιική μόλυνση και φαίνεται να είναι κατάλληλα για την αυξημένη παραγωγή του dsRNA (βλ. §4.3). Ωστόσο η αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων είναι πρώιμη προς το παρόν, έως ότου ακολουθήσει επανάληψη των πειραμάτων μόλυνσης και διαπιστωθούν παρόμοια αποτελέσματα. Ίδια πορεία πρέπει να ακολουθηθεί και στην κυτταρική σειρά Hi5 που θα κατασκευαστεί και στην οποία θα επιτυγχάνεται η αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2*, λόγω της παρουσίας της RNA φουρκέτας.

Όσον αφορά τη μέθοδο CRISPR/Cas9, τα πειράματα ολοκληρώθηκαν με τον έλεγχο των μετασηματισμένων κυττάρων Hi5 σε επίπεδο γονιδιώματος και μεταγραφώματος (βλ. §3.2.2.1). Επόμενο βήμα είναι ο έλεγχος των κυττάρων Sf21, που διαμολύνθηκαν από τους ανασυνδυασμένους φορείς pCas9, σε επίπεδο DNA και RNA, ώστε να επιβεβαιωθεί η βλάβη που δημιουργήθηκε μέσω του μηχανισμού CRISPR/Cas9. Η παρουσία τυχόν μεταλλαγών στα προϊόντα των PCR που θα αλληλουχηθούν, θα επιτρέψει τη συνέχιση των πειραμάτων με τη δημιουργία νέων σταθερών κυτταρικών σειρών, μετασηματισμένων με φορείς pCas9, που θα προκαλούν αποτελεσματικά τη βλάβη στις περιοχές-στόχους του γονιδίου *dicer-2*. Τα μετασηματισμένα κύτταρα Hi5 και Sf21, θα ελεγχθούν έπειτα σε γονιδιωματικό επίπεδο και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μόλυνσης με ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV. Μέσα από αυτή την διαδικασία, θα αξιολογηθεί η απόκριση των μετασηματισμένων κυττάρων Hi5 και Sf21 σε μια ιική μόλυνση, αλλά και θα αναλυθεί η ικανότητα παραγωγής των dsRNA στα κύτταρα αυτά. Ταυτόχρονα, θα επιτραπεί η αντικειμενικότερη σύγκριση τελικά μεταξύ των μεθόδων RNAi και CRISPR/Cas9 ως προς την καταλληλότητα και την αποδοτικότητά τους για την αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* και τη δυνατότητα αυξημένης παραγωγής dsRNA.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι δύο παράλληλες προσεγγίσεις όπως είναι οι τεχνικές RNAi και CRISPR/Cas9, μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην παρεμπόδιση της έκφρασης του γονιδίου *dicer-2* σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων, ούτως ώστε να είναι εφικτή σε μελλοντικά πειράματα η αυξημένη παραγωγή ειδικών μορίων dsRNA έναντι επιβλαβών εντόμων.

Οι δύο τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ευρέως γνωστές για την ικανότητά τους στην επίδραση επί των γονιδίων. Παρουσιάζουν μια διαφορετική πορεία δράσης στην επίτευξη μιας αποτελεσματικής γονιδιακής αποσιώπησης, με το RNAi να προκαλεί αποσιώπηση σε επίπεδο mRNA, ενώ το CRISPR/Cas9 να επεξεργάζεται την αλληλουχία-στόχο σε επίπεδο DNA, επηρεάζοντας εξίσου διαφορετικά την κάθε κυτταρική σειρά από φαινοτυπικής άποψης. Η αποδοτικότητα τους ποικίλλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, με την μέθοδο RNAi να αποτελεί μια απαιτητική τεχνική στην πρόκληση γονιδιακής αποσιώπησης στα λεπιδόπτερα έντομα. Από την άλλη πλευρά, το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί μια φθηνή και απλή μέθοδο, η οποία μπορεί να δώσει τις απαραίτητες απαντήσεις στις προκλήσεις που συναντώνται στα Λεπιδόπτερα κατά την χρήση του RNAi.

Η κατασκευή μιας φουρκέτας RNA, που θα εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου *dicer-2* φαίνεται ότι είναι μια καλή στρατηγική του μηχανισμού RNAi. Η έκφραση του γονιδίου παρατηρείται ότι μειώνεται από τη δράση της κατασκευασμένης φουρκέτας RNA στα διαμολυσμένα κύτταρα Sf21, φτάνοντας σε ποσοστό αποσιώπησης ~80%. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα, που εκφράζουν τη φουρκέτα έναντι του γονιδίου *dicer-2* φαίνεται να είναι και πιο επιρρεπή σε μια ιϊκή μόλυνση, ενώ παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή dsRNA σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες, γεγονός που διαπιστώνεται κατά τις μολύνσεις από τους ανασυνδυασμένους ιούς AcMNPV.

Από την άλλη, σημειώνεται ότι η γονιδιωματική επεξεργασία μέσω του μηχανισμού CRISPR/Cas9 μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς σε κυτταρικές σειρές Λεπιδοπτέρων. Η παρουσία χαμηλών επιπέδων ενίσχυσης του γονιδίου *dicer-2* και η ελαττωμένη έκφρασή του στις μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές Hi5 φαίνεται ότι είναι πιο αποδοτική, εφόσον εφαρμοστεί συνδυαστικά η δράση δύο η περισσότερων ανασυνδυασμένων φορέων pCas9, που στοχεύουν σε αλληλουχίες του γονιδίου *dicer-2*. Διαπιστώνεται πως η προσεκτική επιλογή κατάλληλων περιοχών του γονιδίου-στόχου, για πρόκληση βλάβης στο γονιδίωμα μέσω CRISPR/Cas9 μπορεί να αποφέρει καλύτερη αποδοτικότητα στην εφαρμογή της αποσιώπησης του γονιδίου.

Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα Διπλωματική Εργασία σχετικά με την πρόκληση της γονιδιακής αποσιώπησης σε κύτταρα Λεπιδοπτέρων θα μπορούσαν να προσφέρουν σημαντικά στοιχεία στο χειρισμό των γονιδίων των εντόμων και να συνεισφέρουν στον επιστημονικό τομέα της Βιοτεχνολογίας των εντόμων. Οι πληροφορίες, που συλλέχθηκαν από τα πειράματα CRISPR/Cas9 μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα δεδομένα σε μελλοντικές δοκιμασίες στα Λεπιδόπτερα, καθώς είναι μια μέθοδος που αναδείχθηκε και εφαρμόζεται πιο πρόσφατα, σε αντίθεση με την μέθοδο RNAi. Τέλος, τα δύο εργαλεία αυτά φαίνεται ότι μπορούν να αλληλοσυμπληρώνονται σε εφαρμοσμένες μελέτες γονιδίων των εντόμων και να δώσουν πρωτοπόρες λύσεις στην καταπολέμησή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Επιβλαβή Λεπιδόπτερα προκαλούν μεγάλες γεωργικές και οικονομικές ζημιές παγκοσμίως, ενώ η καταπολέμησή τους με τα παραδοσιακά εντομοκτόνα δεν φέρει τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική προσέγγιση είναι η πρόσληψη μέσω ιόμορφων σωματιδίων, ειδικά σχεδιασμένων δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) από τα έντομα για την αποσιώπηση γονιδίων μέσω RNA παρεμβολής (RNAi). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η λειτουργία του ενζύμου-κλειδιού του RNAi μηχανισμού, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *dicer-2* μετατρέπει τα dsRNA σε μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA). Προκειμένου λοιπόν να καταστεί εφικτή η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων dsRNA διερευνήθηκε η χρήση μοριακών κατασκευών, οι οποίες αξιοποιούν τις τεχνικές RNAi και CRISPR/Cas9, για την αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* σε κύτταρα ωοθήκης των Λεπιδοπτέρων *Spodoptera frugiperda* (Sf21) και *Trichoplusia ni* (Hi5). Η στρατηγική εφαρμογής της τεχνικής RNAi αποσκοπεί στη μόνιμη αποσιώπηση του γονιδίου *dicer-2* μέσω σταθερής έκφρασης μιας ειδικής RNA φουρκέτας σε μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά. Η παραγόμενη φουρκέτα θα κατακερματίζεται από τη δράση του ενζύμου Dicer-2 σε μικρά μόρια, τα οποία λόγω της συμπληρωματικότητάς τους θα υβριδίζουν με το mRNA του *dicer-2* και θα το αποσιωπούν. Αντιθέτως, η στρατηγική εφαρμογής της τεχνικής CRISPR/Cas9 περιλαμβάνει την επιλογή ειδικών αλληλουχιών-στόχων, μέσω των οποίων θα στοχεύεται το γονίδιο *dicer-2* από την ενδονουκλεάση SpCas9, προκαλώντας βλάβη σε αυτό μέσω απώλειας βάσεων και συνεπώς σημαντική μείωση της έκφρασής του. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν κατά την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνουν την αποδοτικότητα των δύο τεχνικών και μπορούν να αξιοποιηθούν σε συνδυασμό με περαιτέρω διερεύνηση, για μελλοντικές μελέτες σχετικά με τον έλεγχο επιβλαβών εντόμων.

ABSTRACT

Lepidopteran pests cause severe agricultural and economic damage worldwide, while their control by use of traditional insecticides does not lead to the expected results. An interesting alternative approach is gene silencing through RNA interference (RNAi), mediated by the uptake of specially designed double-stranded RNA (dsRNA) molecules, being encapsidated into viral-particles. However, the key RNAi mechanism enzyme, encoded by the *dicer-2* gene, is known to function by converting dsRNAs into small interfering RNAs (siRNAs). Therefore, in order to enable the production of dsRNA in large quantities, the use of molecular constructs utilizing RNAi and CRISPR/Cas9 techniques was investigated to silence the *dicer-2* gene in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) and *Trichoplusia ni* (Hi5) ovary-derived cells. The application strategy of the RNAi technique aims at the permanent silencing of the *dicer-2* gene through the stable expression of a specific hairpin RNA in a transformed cell line. The produced hairpin will be fragmented into small molecules due to the action of Dicer-2 enzyme, which will hybridize to the complementary mRNA of *dicer-2* and silence it. In contrast, the implementation strategy of CRISPR/Cas9 technique involves the selection of specific target sequences, which will lead the SpCas9 endonuclease to target the *dicer-2* gene, causing damage to it through loss of bases and thus significant downregulation in terms of gene expression. The data collected in the present study confirm the efficiency of both techniques and can be used in conjunction with further investigation for future studies on insect pest control.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abou Elela S, Ji X. Structure and function of Rnt1p: An alternative to RNAi for targeted RNA degradation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2019 May;10(3):e1521.
- Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of biotechnology*. 2006 Jun 25;124(1):12-25.
- Albright III VC, Wong CR, Hellmich RL, Coats JR. Dissipation of double-stranded RNA in aquatic microcosms. *Environmental toxicology and chemistry*. 2017 May;36(5):1249-53.
- Amitai G, Sorek R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*. 2016 Feb;14(2):67.
- Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014 Sep;513(7519):569-73.
- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2004 Mar 1;34(3):291-304.
- Arslan Z, Hermanns V, Wurm R, Wagner R, Pul Ü. Detection and characterization of spacer integration intermediates in type I-E CRISPR–Cas system. *Nucleic acids research*. 2014 Jun 11;42(12):7884-93.
- Ashley TR, Wiseman BR, Davis FM, Andrews KL. The fall armyworm: a bibliography. *Florida Entomologist*. 1989 Mar 1:152-202.
- Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1994 Aug 1;202(2):586-605.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.
- Barrangou R, Birmingham A, Wiemann S, Beijersbergen RL, Hornung V, Smith AV. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic acids research*. 2015 Apr 20;43(7):3407-19.
- Batista Pereira LG, Petacci F, Fernandes JB, Corrêa AG, Vieira PC, da Silva MF, Malaspina O. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. *Pest management science*. 2002 May;58(5):503-7.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology*. 2007 Nov;25(11):1322-6.
- Bellés X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual review of entomology*. 2010 Jan 7;55:111-28.
- Bernardi O, Bernardi D, Amado D, Sousa RS, Faretto J, Medeiros FC, Conville J, Burd T, Omoto C. Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. *Journal of economic entomology*. 2015 Dec 1;108(6):2711-9.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan;409(6818):363-6.
- Bettencourt R, Terenius O, Faye I. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect molecular biology*. 2002 Jun;11(3):267-71.

- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*. 2011 Dec 15;45:273-97.
- Bi HL, Xu J, Tan AJ, Huang YP. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene mutagenesis in *Spodoptera litura*. *Insect science*. 2016 Jun;23(3):469-77.
- Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*. 2001 Dec 1;9(12):1225-36.
- Blaszczyk J, Gan J, Tropea JE, Court DL, Waugh DS, Ji X. Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure*. 2004 Mar 1;12(3):457-66.
- Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual review of entomology*. 1990 Jan;35(1):127-55.
- Boiça Júnior AL, Souza BH, Costa EN, Ribeiro ZA, Stout MJ. Factors influencing expression of antixenosis in soybean to *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology*. 2015 Feb 1;108(1):317-25.
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, Ilagan O, Lawrence C, Levine S, Moar W, Mueller G. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PloS one*. 2012 Oct 11;7(10):e47534.
- Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Kanno RH, Malaquias JB, Omoto C. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. *Pest management science*. 2019 Oct;75(10):2682-9.
- Böttcher R, Hollmann M, Merk K, Nitschko V, Obermaier C, Philippou-Massier J, Wieland I, Gaul U, Förstemann K. Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/cas9 and PCR-based homologous recombination donors in cultured *Drosophila* cells. *Nucleic acids research*. 2014 Apr 19;42(11):e89-.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007 Mar 23;128(6):1089-103.
- Brokowski C, Adli M. CRISPR ethics: moral considerations for applications of a powerful tool. *Journal of molecular biology*. 2019 Jan 4;431(1):88-101.
- Bronkhorst AW, van Cleef KW, Vodovar N, Ince İA, Blanc H, Vlak JM, Saleh MC, van Rij RP. The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Dec 18;109(51):E3604-13.
- Bronkhorst AW, van Rij RP. The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Current opinion in virology*. 2014 Aug 1;7:19-28.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van Der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008 Aug 15;321(5891):960-4.
- Campbell CL, Keene KM, Brackney DE, Olson KE, Blair CD, Wilusz J, Foy BD. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC microbiology*. 2008 Dec 1;8(1):47.
- Capinera JL. Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* (Hübner)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EDIS. 2002;2002(7).
- Capinera JL. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EDIS. 2002;2002(7).

- Carte J, Wang R, Li H, Terns RM, Terns MP. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & development*. 2008 Dec 15;22(24):3489-96.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55.
- Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One*. 2013 Apr 17;8(4):e62268.
- Cenik ES, Fukunaga R, Lu G, Dutcher R, Wang Y, Hall TM, Zamore PD. Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease. *Molecular cell*. 2011 Apr 22;42(2):172-84.
- Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current genetics*. 2006 Aug 1;50(2):81-99.
- Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, Sternberg SH, Joung JK, Yildiz A, Doudna JA. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*. 2017 Oct;550(7676):407-10.
- Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H. Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*. 2015 Mar 12;160(6):1246-60.
- Chen W, Yang X, Tetreau G, Song X, Coutu C, Hegedus D, Blissard G, Fei Z, Wang P. A high-quality chromosome-level genome assembly of a generalist herbivore, *Trichoplusia ni*. *Molecular ecology resources*. 2019 Mar;19(2):485-96.
- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*. 2013 Mar;31(3):230-2.
- Christiaens O, Dzhambazova T, Kostov K, Arpaia S, Joga MR, Urru I, Sweet J, Smagghe G. Literature review of baseline information on RNAi to support the environmental risk assessment of RNAi-based GM plants. *EFSA Supporting Publications*. 2018 May;15(5):1424E.
- Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA biology*. 2013 May 1;10(5):726-37.
- Clarke TE, Clem RJ. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelic injection. *Journal of general virology*. 2002 Jul 1;83(7):1565-72.
- Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*. 1991 Nov 29;254(5036):1388-90.
- Clemens JC, Worby CA, Simonson-Leff N, Muda M, Maehama T, Hemmings BA, Dixon JE. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Jun 6;97(12):6499-503.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819-23.
- Cooper AM, Silver K, Zhang J, Park Y, Zhu KY. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest management science*. 2019 Jan;75(1):18-28.
- Court DL, Gan J, Liang YH, Shaw GX, Tropea JE, Costantino N, Waugh DS, Ji X. RNase III: genetics and function; structure and mechanism. *Annual review of genetics*. 2013 Nov 23;47:405-31.

- Cui Y, Sun JL, Yu L. Application of the CRISPR gene-editing technique in insect functional genome studies—a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2017 Feb;162(2):124-32.
- Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature news*. 2016 Nov 24;539(7630):479.
- Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ. An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*. 2008 Jun;453(7196):798-802.
- Dagdas YS, Chen JS, Sternberg SH, Doudna JA, Yildiz A. A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPR-Cas9. *Science advances*. 2017 Aug 1;3(8):eaao0027.
- Das M, Musetti S, Huang L. RNA interference-based cancer drugs: the roadblocks, and the “delivery” of the promise. *Nucleic acid therapeutics*. 2019 Apr 1;29(2):61-6.
- Davidson BL, McCray PB. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Reviews Genetics*. 2011 May;12(5):329-40.
- Davidson RH, Lyon WF. *Insect pests of farm, garden, and orchard*. John Wiley & Sons; 1987.
- Day R, Abrahams P, Bateman M, Beale T, Clotey V, Cock M, Colmenarez Y, Corniani N, Early R, Godwin J, Gomez J. Fall armyworm: impacts and implications for Africa. *Outlooks on Pest Management*. 2017 Oct 1;28(5):196-201.
- De Jesus FG, Boiça AL, Alves GC, Zanuncio JC. Behavior, development, and predation of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed transgenic and conventional cotton cultivars. *Annals of the Entomological Society of America*. 2014 May 1;107(3):601-6.
- Deddouche S, Matt N, Budd A, Mueller S, Kemp C, Galiana-Arnoux D, Dostert C, Antoniewski C, Hoffmann JA, Imler JL. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. *Nature immunology*. 2008 Dec;9(12):1425.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirezada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011 Mar;471(7340):602-7.
- Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*. 2008 Feb 15;190(4):1390-400.
- Ding SW. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2010 Sep;10(9):632-44.
- Dong S, Lin J, Held NL, Clem RJ, Passarelli AL, Franz AW. Heritable CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PloS one*. 2015 Mar 27;10(3):e0122353.
- Dong Y, Taylor HE, Dimopoulos G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol*. 2006 Jun 20;4(7):e229.
- 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. *Advances in virus research*. 2006 Jan 1;68:113-56.
- Driehuis E, Clevers H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2017 Mar 1;312(3):G257-65.

- Dubelman S, Fischer J, Zapata F, Huizinga K, Jiang C, Uffman J, Levine S, Carson D. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PloS one*. 2014 Mar 27;9(3):e93155.
- Ebalunode JO, Jagun C, Zheng W. Informatics approach to the rational design of siRNA libraries. *Chemoinformatics and Computational Chemical Biology*. 2011:341-58.
- Eleftherianos I, Gökçen F, Felföldi G, Millichap PJ, Trenczek TE, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cellular microbiology*. 2007 May;9(5):1137-47.
- Erlandson M. Insect pest control by viruses. 2008:125-133.
- Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. Emerging technology: concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife*. 2014 Jul 17;3:e03401.
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*. 2000 Mar 7;245(1):213-21.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*. 1998 Feb;391(6669):806-11.
- Fletcher SJ, Reeves PT, Hoang BT, Mitter N. A perspective on RNAi-based biopesticides. *Frontiers in Plant Science*. 2020 Feb 12;11:51.
- Förstemann K, Tomari Y, Du T, Vagin VV, Denli AM, Bratu DP, Klattenhoff C, Theurkauf WE, Zamore PD. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol*. 2005 May 24;3(7):e236.
- Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*. 2010 Jun;465(7299):818-22.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*. 2013 Sep;31(9):822-6.
- Gabrieli P, Smidler A, Catteruccia F. Engineering the control of mosquito-borne infectious diseases. *Genome Biology*. 2014 Nov;15(11):1-9.
- Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler JL. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nature immunology*. 2006 Jun;7(6):590-7.
- Gammon DB, Duraffour S, Rozelle DK, Hehnly H, Sharma R, Sparks ME, West CC, Chen Y, Moresco JJ, Andrei G, Connor JH. A single vertebrate DNA virus protein disarms invertebrate immunity to RNA virus infection. *Elife*. 2014 Jun 25;3:e02910.
- Gammon DB, Mello CC. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Current opinion in insect science*. 2015 Apr 1;8:111-20.
- Gan J, Shaw G, Tropea JE, Waugh DS, Court DL, Ji X. A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Molecular microbiology*. 2008 Jan;67(1):143-54.
- Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010 Nov;468(7320):67-71.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Sep 25;109(39):E2579-86.

- Ghosh D, Venkataramani P, Nandi S, Bhattacharjee S. CRISPR–Cas9 a boon or bane: the bumpy road ahead to cancer therapeutics. *Cancer Cell International*. 2019 Dec 1;19(1):12.
- Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PloS one*. 2016 Oct 27;11(10):e0165632.
- Gong WJ, Golic KG. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Mar 4;100(5):2556-61.
- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. 2015 Mar 27;347(6229).
- Granados RR, Derksen AC, Dwyer KG. Replication of the *Trichoplusia ni* granulosis and nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. *Virology*. 1986 Jul 30;152(2):472-6.
- Granados RR, Guoxun L, Derksen AC, 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 Nov 1;64(3):260-6.
- Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*. 2013 Aug 1;194(4):1029-35.
- Grützmacher AD, Busato G, Garcia M, Giolo F, Stefanello Jr G, Zotti M. PREFERÊNCIA PARA ALIMENTAÇÃO DE BIÓTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (JE SMITH, 1797)(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POR MILHO, SORGO, ARROZ E CAPIM-ARROZ. *Current Agricultural Science and Technology*. 2004;10(2).
- Gu L, Knipple DC. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection*. 2013 Mar 1;45:36-40.
- Guan RB, Li HC, Fan YJ, Hu SR, Christiaens O, Smagghe G, Miao XX. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *Journal of Biological Chemistry*. 2018 Apr 20;293(16):6011-21.
- Guedes RN, Smagghe G, Stark JD, Desneux N. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annual review of entomology*. 2016 Mar 11;61:43-62.
- Guo S, Kemphues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995 May 19;81(4):611-20.
- Guo T, Wang S, Guo X, Lu C. Productive infection of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus in silkworm *Bombyx mori* strain Haoyue due to the absence of a host antiviral factor. *Virology*. 2005 Oct 25;341(2):231-7.
- Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, Kazi TA, Gupta R, Sinharoy S, Acharya K, Chattopadhyay D. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life sciences*. 2019 Sep 1;232:116636.
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014 Aug;15(8):509-24.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*. 2015 May;7(5):2230-67.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999 Oct 29;286(5441):950-2.
- Han X, Liu Z, chan Jo M, Zhang K, Li Y, Zeng Z, Li N, Zu Y, Qin L. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. *Science advances*. 2015 Aug 1;1(7):e1500454.

- Han YH, Luo YJ, Wu Q, Jovel J, Wang XH, Aliyari R, Han C, Li WX, Ding SW. RNA-based immunity terminates viral infection in adult *Drosophila* in the absence of viral suppression of RNA interference: characterization of viral small interfering RNA populations in wild-type and mutant flies. *Journal of virology*. 2011 Dec 15;85(24):13153-63.
- Haney CH, Wiesmann CL, Shapiro LR, Melnyk RA, O'Sullivan LR, Khorasani S, Xiao L, Han J, Bush J, Carrillo J, Pierce NE. Rhizosphere-associated *Pseudomonas* induce systemic resistance to herbivores at the cost of susceptibility to bacterial pathogens. *Molecular ecology*. 2018 Apr;27(8):1833-47.
- Hartig JV, Esslinger S, Böttcher R, Saito K, Förstemann K. Endo-siRNAs depend on a new isoform of loquacious and target artificially introduced, high-copy sequences. *The EMBO journal*. 2009 Oct 7;28(19):2932-44.
- Hartig JV, Förstemann K. Loqs-PD and R2D2 define independent pathways for RISC generation in *Drosophila*. *Nucleic acids research*. 2011 May 1;39(9):3836-51.
- Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*. 2010 Sep 10;329(5997):1355-8.
- Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, Thielke A, Aster JC, Regev A, Ebert BL. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature biotechnology*. 2014 Sep;32(9):941-6.
- Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, Marraffini LA. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*. 2015 Mar;519(7542):199-202.
- Herniou EA, Arif BM, Becnel JJ, Blissard GW, Bonning B, Harrison R, Jehle JA, Theilmann DA, Vlak JM. Baculoviridae. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2011 Nov 8:163-74.
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics*. 2010 Dec 1;44:113-39.
- Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*. 2016 Nov 5;371(1707):20150496.
- Hink WF. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature*. 1970 May 2;226(5244):466-7.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010 Jan 8;327(5962):167-70.
- Hu XF, Zhang B, Liao CH, Zeng ZJ. High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2019 May 1;9(5):1759-66.
- Huang Z, Pan M, Zhu S, Zhang H, Wu W, Yuan M, Yang K. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac83 gene contains a cis-acting element that is essential for nucleocapsid assembly. *Journal of virology*. 2017 Mar 1;91(5).
- Hussain M, Abraham AM, Asgari S. An ascovirus-encoded RNase III autoregulates its expression and suppresses RNA interference-mediated gene silencing. *Journal of virology*. 2010 Apr 1;84(7):3624-30.
- Huvenne H, Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of insect physiology*. 2010 Mar 1;56(3):227-35.
- Ikeda M, Kobayashi M. Cell-Cycle Perturbation in Sf9 Cells Infected with *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 1999 May 25;258(1):176-88.

- Ikeda M, Yamada H, Hamajima R, Kobayashi M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology*. 2013 Jan 5;435(1):1-3.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1987 Dec 1;169(12):5429-33.
- Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*. 2018 Apr 1;200(7).
- Ivančić-Baće I, Cass SD, Wearne SJ, Bolt EL. Different genome stability proteins underpin primed and naive adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity. *Nucleic acids research*. 2015 Dec 15;43(22):10821-30.
- Ivashuta S, Zhang Y, Wiggins BE, Ramaseshadri P, Segers GC, Johnson S, Meyer SE, Kerstetter RA, McNulty BC, Bolognesi R, Heck GR. Environmental RNAi in herbivorous insects. *Rna*. 2015 May 1;21(5):840-50.
- Jackson CG, Butler Jr GD, Bryan DE. Time required for development of *Voria ruralis* and its host, the cabbage looper, at different temperatures. *Journal of Economic Entomology*. 1969 Feb 1;62(1):69-70.
- Jackson RN, Golden SM, van Erp PB, Carter J, Westra ER, Brouns SJ, van der Oost J, Terwilliger TC, Read RJ, Wiedenheft B. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science*. 2014 Sep 19;345(6203):1473-9.
- Jackson RN, Wiedenheft B. A conserved structural chassis for mounting versatile CRISPR RNA-guided immune responses. *Molecular cell*. 2015 Jun 4;58(5):722-8.
- Janakiraman K, Krishnaswami V, Rajendran V, Natesan S, Kandasamy R. Novel nano therapeutic materials for the effective treatment of rheumatoid arthritis-recent insights. *Materials Today Communications*. 2018 Dec 1;17:200-13.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*. 2002 Mar;43(6):1565-75.
- Jayachandran B, Hussain M, Asgari S. RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus. *Journal of virology*. 2012 Dec 15;86(24):13729-34.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology*. 2006 Jul 1;151(7):1257-66.
- Ji X. The mechanism of RNase III action: how dicer dices. In *RNA interference 2008* (pp. 99-116). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes & development*. 2005 Jul 15;19(14):1674-9.
- Jiang F, Zhou K, Ma L, Gressel S, Doudna JA. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*. 2015 Jun 26;348(6242):1477-81.
- Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*. 2017 May 22;46:505-29.
- Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *nature*. 2009 Jan;457(7228):405-12.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21.

- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014 Mar 14;343(6176).
- Jo A, Ham S, Lee GH, Lee YI, Kim S, Lee YS, Shin JH, Lee Y. Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9. *BioMed research international*. 2015 Oct;2015.
- Jones G, Schelling D, Chhokar V. Overview of the regulation of metamorphosis-associated genes in *Trichoplusia ni*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*. 1996;32(3-4):429-37.
- Joshua-Tor L, Hannon GJ. Ancestral roles of small RNAs: an Ago-centric perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011 Oct 1;3(10):a003772.
- Karlikow M, Goic B, Saleh MC. RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: setting up a systemic immune response. *Developmental & Comparative Immunology*. 2014 Jan 1;42(1):85-92.
- Kawamata T, Tomari Y. Making risc. *Trends in biochemical sciences*. 2010 Jul 1;35(7):368-76.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):209-16.
- Kim K, Lee YS, Harris D, Nakahara K, Carthew RW. The RNAi pathway initiated by Dicer-2 in *Drosophila*. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 2006 Jan 1 (Vol. 71, pp. 39-44)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kim K, Lee YS, Carthew RW. Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *Rna*. 2007 Jan 1;13(1):22-9.
- Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *Journal of molecular biology*. 2013 Dec 13;425(24):4921-36.
- Kistler KE, Vosshall LB, Matthews BJ. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell reports*. 2015 Apr 7;11(1):51-60.
- Klattenhoff C, Theurkauf W. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*. 2008 Jan 1;135(1):3-9.
- Kohno H, Suenami S, Takeuchi H, Sasaki T, Kubo T. Production of Knockout Mutants by CRISPR/Cas9 in the European Honeybee, *Apis mellifera L.* *Zoological science*. 2016 Oct;33(5):505-12.
- Kolliopoulou A, Swevers L. Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkworm Bm5 cells. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2013 Aug 1;43(8):654-63.
- Kong M, Zuo H, Zhu F, Hu Z, Chen L, Yang Y, Lv P, Yao Q, Chen K. The interaction between baculoviruses and their insect hosts. *Developmental & Comparative Immunology*. 2018 Jun 1;83:114-23.
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in microbiology*. 2017 Jun 1;37:67-78.
- Krebs J, Coldstein E, Kilpatrick S: *Lewin's Γονίδια X*. 10^η έκδοση. BROKEN HILL PUBLISHERS LTD. Λευκωσία 2011.
- Kreuze JF, Savenkov EI, Cuellar W, Li X, Valkonen JP. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of virology*. 2005 Jun 1;79(11):7227-38.
- Kumar J, Jain K, Kumari P, Mohanty A, Rajani K, Kumar RR, Ranjan T. RNA Interference: An Overview. In *Genetic Transformation in Crops 2020 Jun 12*. IntechOpen.
- Kumela T, Simiyu J, Sisay B, Likhayo P, Mendesil E, Gohole L, Tefera T. Farmers' knowledge, perceptions, and management practices of the new invasive pest, fall

- armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Ethiopia and Kenya. *International Journal of Pest Management*. 2019 Jan 2;65(1):1-9.
- Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural & molecular biology*. 2012 Feb;19(2):145.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
- Lam F, McNeil JN, Donly C. Octopamine receptor gene expression in three lepidopteran species of insect. *Peptides*. 2013 Mar 1;41:66-73.
- Lamontagne B, Abou Elela S. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Rnt1p nuclease. In *Methods in enzymology* 2001 Jan 1 (Vol. 342, pp. 159-167). Academic Press.
- Lamontagne B, Larose S, Boulanger J, Elela SA. The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Yeast*. 2001;45(191):154-8.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858-62.
- Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA biology*. 2019 Apr 3;16(4):380-9.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep;425(6956):415-9.
- Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004 Apr 2;117(1):69-81.
- Leskinen P, Virta M, Karp M. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast*. 2003 Oct 15;20(13):1109-13.
- Li F, Scott MJ. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *white* and *Sex lethal* loci in the invasive pest, *Drosophila suzukii*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016 Jan 22;469(4):911-6.
- Li J, Wang XP, Wang MQ, Ma WH, Hua HX. Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. *Insect Science*. 2013 Feb;20(1):31-9.
- Li Z, Rana TM. Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries. *Accounts of chemical research*. 2012 Jul 17;45(7):1122-31.
- Liang C, Li M, Dai X, Zhao S, Hou Y, Zhang Y, Lan D, Wang Y, Chen X. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus PK-1 is essential for nucleocapsid assembly. *Virology*. 2013 Sep 1;443(2):349-57.
- Lin KH, Xie A, Rutter JC, Ahn YR, Lloyd-Cowden JM, Nichols AG, Soderquist RS, Koves TR, Muoio DM, MacIver NJ, Lamba JK. Systematic dissection of the metabolic-apoptotic interface in AML reveals heme biosynthesis to be a regulator of drug sensitivity. *Cell metabolism*. 2019 May 7;29(5):1217-31.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.
- Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*. 2003 Sep 26;301(5641):1921-5.
- Liu S, Jaouannet M, Dempsey DM, Imani J, Coustau C, Kogel KH. RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnology advances*. 2020 Mar 1;39:107463.

- Liu TX, Sparks Jr AN, Chen W, Liang GM, Brister C. Toxicity, persistence, and efficacy of indoxacarb on cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) on cabbage. *Journal of Economic Entomology*. 2002 Apr 1;95(2):360-7.
- Liu Y, Ma S, Wang X, Chang J, Gao J, Shi R, Zhang J, Lu W, Liu Y, Zhao P, Xia Q. Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2014 Jun 1;49:35-42.
- Lohman GJ, Zhang Y, Zhelkovsky AM, Cantor EJ, Evans Jr TC. Efficient DNA ligation in DNA–RNA hybrid helices by *Chlorella* virus DNA ligase. *Nucleic acids research*. 2014 Feb 1;42(3):1831-44.
- Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9–mediated editing of germline DNA. *Science*. 2014 Sep 5;345(6201):1184-8.
- Lundgren JG, Duan JJ. RNAi-based insecticidal crops: potential effects on nontarget species. *Bioscience*. 2013 Aug 1;63(8):657-65.
- Lundström A, Liu G, Kang D, Berzins K, Steiner H. *Trichoplusia ni* gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial insect protein. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2002 Jul 1;32(7):795-801.
- Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. 2005 Mar;434(7033):666-70.
- Mabashi-Asazuma H, Kuo CW, Khoo KH, Jarvis DL. Modifying an insect cell N-glycan processing pathway using CRISPR-Cas technology. *ACS chemical biology*. 2015 Oct 16;10(10):2199-208.
- Mabashi-Asazuma H, Jarvis DL. CRISPR-Cas9 vectors for genome editing and host engineering in the baculovirus–insect cell system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Aug 22;114(34):9068-73.
- MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current opinion in structural biology*. 2007 Feb 1;17(1):138-45.
- Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research*. 2002 Jan 15;30(2):482-96.
- Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*. 2006 Dec 1;1(1):7.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, Van Der Oost J. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2011 Jun;9(6):467-77.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015 Nov;13(11):722-36.
- Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, Jin S. CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing. *Trends in plant science*. 2019 Dec 1;24(12):1102-25.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature biotechnology*. 2007 Nov;25(11):1307-13.
- Marques JT, Wang JP, Wang X, de Oliveira KP, Gao C, Aguiar ER, Jafari N, Carthew RW. Functional specialization of the small interfering RNA pathway in response to virus infection. *PLoS Pathog*. 2013 Aug 29;9(8):e1003579.

- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *science*. 2008 Dec 19;322(5909):1843-5.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*. 2010 Jan;463(7280):568-71.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Mar;11(3):181-90.
- Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 Oct;526(7571):55-61.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):607-20.
- McGinn J, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Jan;17(1):7-12.
- Mehrabadi M, Hussain M, Matindoost L, Asgari S. The baculovirus antiapoptotic p35 protein functions as an inhibitor of the host RNA interference antiviral response. *Journal of virology*. 2015 Aug 15;89(16):8182-92.
- Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*. 2013 Jul;14(7):447-59.
- Merkling SH, van Rij RP. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *Journal of insect physiology*. 2013 Feb 1;59(2):159-70.
- Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS chemical biology*. 2018 Feb 16;13(2):357-65.
- Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes & development*. 2005 Dec 1;19(23):2837-48.
- Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*. 1993 Aug;9(3):613-21.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*. 2000 Apr;36(1):244-6.
- Mojica FJ, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*. 2005 Feb 1;60(2):174-82.
- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009 Mar 1;155(3):733-40.
- Monk JM, Koza A, Campodonico MA, Machado D, Seoane JM, Palsson BO, Herrgård MJ, Feist AM. Multi-omics quantification of species variation of *Escherichia coli* links molecular features with strain phenotypes. *Cell systems*. 2016 Sep 28;3(3):238-51.
- Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In vivo delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. *Bioconjugate chemistry*. 2017 Apr 19;28(4):880-4.
- Murhammer DW, editor. Baculovirus and insect cell expression protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2007 Jul 6.
- Murúa G, Molina-Ochoa J, Coviella C. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in northwestern Argentina. *Florida Entomologist*. 2006 Jun;89(2):175-82.
- Nam KH, Haitjema C, Liu X, Ding F, Wang H, DeLisa MP, Ke A. Cas5d protein processes pre-crRNA and assembles into a cascade-like interference complex in subtype IC/Dvulg CRISPR-Cas system. *Structure*. 2012 Sep 5;20(9):1574-84.

- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The plant cell*. 1990 Apr 1;2(4):279-89.
- Nascimento AR, Farias JR, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest management science*. 2016 Apr;72(4):810-5.
- Nicholson AW. The ribonuclease III family: forms and functions in RNA maturation, decay, and gene silencing. *RNAi: A guide to gene silencing*. 2003:149-74.
- Nielsen MG, Gadagkar SR, Gutzwiller L. Tubulin evolution in insects: gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. *BMC evolutionary biology*. 2010 Dec 1;10(1):113.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014 Feb 27;156(5):935-49.
- Nishimasu H, Nureki O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Current opinion in structural biology*. 2017 Apr 1;43:68-78.
- Niu J, Taning CN, Christiaens O, Smagghe G, Wang JJ. Rethink RNAi in insect pest control: challenges and perspectives. In *Advances in Insect Physiology 2018 Jan 1* (Vol. 55, pp. 1-17). Academic Press.
- Nuñez JK, Lee AS, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature*. 2015 Mar;519(7542):193-8.
- Obbard DJ, Jiggins FM, Halligan DL, Little TJ. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes. *Current biology*. 2006 Mar 21;16(6):580-5.
- Obbard DJ, Gordon KH, Buck AH, Jiggins FM. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009 Jan 12;364(1513):99-115.
- Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*. 2008 Jun;453(7196):803-6.
- Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C. Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. *Pest management science*. 2018 Jun;74(6):1441-8.
- Park SH, Lee CM, Deshmukh H, Bao G. Therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing for treating sickle cell disease. 2016:4703-4703.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. *Nature*. 2005 Mar;434(7033):663-6.
- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology*. 2013 Sep;31(9):839-43.
- Pearson MN, Russell RL, Rohrmann GF, Beaudreau GS. p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. *Virology*. 1988 Dec 1;167(2):407-13.
- Pennington MJ, Rothman JA, Dudley SL, Jones MB, McFrederick QS, Gan J, Trumble JT. Contaminants of emerging concern affect *Trichoplusia ni* growth and development on artificial diets and a key host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Nov 14;114(46):E9923-31.
- Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*. 2008 Jul;26(7):808-16.

- Pijlman GP, van den Born E, Martens DE, Vlak JM. *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology*. 2001 Apr 25;283(1):132-8.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS one*. 2011 Oct 5;6(10):e25709.
- Pitre HN, Hogg DB. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn [*Spodoptera frugiperda*]. *Journal of the Georgia Entomological Society*. 1983.
- Price DR, Gatehouse JA. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in biotechnology*. 2008 Jul 1;26(7):393-400.
- Prikhod'ko EA, Miller LK. Role of baculovirus IE2 and its RING finger in cell cycle arrest. *Journal of Virology*. 1998 Jan 1;72(1):684-92.
- Qin F, Xu C, Lei C, Hu J, Sun X. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus enters host cells via clathrin-mediated endocytosis and direct fusion with the plasma membrane. *Viruses*. 2018 Nov;10(11):632.
- Qureshi A, Tantray VG, Kirmani AR, Ahangar AG. A review on current status of antiviral siRNA. *Reviews in medical virology*. 2018 Jul;28(4):e1976.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 2013 Nov;8(11):2281-308.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):621-9.
- Rangasamy M, Siegfried BD. Validation of RNA interference in western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) adults. *Pest management science*. 2012 Apr;68(4):587-91.
- Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015 Oct 1;117:119-28.
- Ren X, Yang Z, Xu J, Sun J, Mao D, Hu Y, Yang SJ, Qiao HH, Wang X, Hu Q, Deng P. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell reports*. 2014 Nov 6;9(3):1151-62.
- Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*. 1992 Nov;6(22):3343-53.
- Rong YS, Golic KG. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *science*. 2000 Jun 16;288(5473):2013-8.
- Sahel DK, Mittal A, Chitkara D. CRISPR/Cas system for genome editing: progress and prospects as a therapeutic tool. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019 Sep 1;370(3):725-35.
- Saleh MC, van Rij RP, Hekele A, Gillis A, Foley E, O'Farrell PH, Andino R. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature cell biology*. 2006 Aug;8(8):793-802.
- Saleh-Gohari N, Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic acids research*. 2004 Jan 1;32(12):3683-8.
- Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog*. 2009 Feb 13;5(2):e1000299.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*. 2011 Nov 1;39(21):9275-82.

- Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bissell DM, Desnick R, Parker C, Phillips J, Bonkovsky HL, Vassiliou D. Phase 1 trial of an RNA interference therapy for acute intermittent porphyria. *New England Journal of Medicine*. 2019 Feb 7;380(6):549-58.
- Schuster S, Miesen P, van Rij RP. Antiviral RNAi in insects and mammals: parallels and differences. *Viruses*. 2019 May;11(5):448.
- Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE. Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of insect physiology*. 2013 Dec 1;59(12):1212-21.
- Shabalina SA, Koonin EV. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in ecology & evolution*. 2008 Oct 1;23(10):578-87.
- Shah PS, Schaffer DV. Antiviral RNAi: translating science towards therapeutic success. *Pharmaceutical research*. 2011 Dec 1;28(12):2966-82.
- Shibata M, Nishimasu H, Kodera N, Hirano S, Ando T, Uchihashi T, Nureki O. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy. *Nature communications*. 2017 Nov 10;8(1):1-9.
- Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews microbiology*. 2017 Mar;15(3):169-82.
- Shorey HH, Andres LA, Hale Jr RL. The biology of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). I. Life history and behavior. *Annals of the Entomological Society of America*. 1962 Sep 1;55(5):591-7.
- Shorey HH. The biology of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). II. Factors affecting adult fecundity and longevity. *Annals of the Entomological Society of America*. 1963 Jul 1;56(4):476-80.
- Shukla JN, Kalsi M, Sethi A, Narva KE, Fishilevich E, Singh S, Mogilicherla K, Palli SR. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA biology*. 2016 Jul 2;13(7):656-69.
- Simmons J, D'Souza O, Rheault M, Donly C. Multidrug resistance protein gene expression in *Trichoplusia ni* caterpillars. *Insect molecular biology*. 2013 Feb;22(1):62-71.
- Sinha NK, Trettin KD, Aruscavage PJ, Bass BL. *Drosophila* dicer-2 cleavage is mediated by helicase-and dsRNA termini-dependent states that are modulated by Loquacious-PD. *Molecular cell*. 2015 May 7;58(3):406-17.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011 Apr;12(4):246-58.
- Soares ZG, Gonçalves AN, de Oliveira KP, Marques JT. Viral RNA recognition by the *Drosophila* small interfering RNA pathway. *Microbes and infection*. 2014 Dec 1;16(12):1013-21.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2003 Dec;10(12):1026-32.
- Song MS, Rossi JJ. Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochemical Journal*. 2017 May 15;474(10):1603-18.
- Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual review of biochemistry*. 2013 Jun 2;82:237-66.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 Mar;507(7490):62-7.
- Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular cell*. 2015 May 21;58(4):568-74.

- Sternberg SH, LaFrance B, Kaplan M, Doudna JA. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. *Nature*. 2015 Nov;527(7576):110-3.
- Sun D, Guo Z, Liu Y, Zhang Y. Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Frontiers in physiology*. 2017 Sep 6;8:608.
- Sürün D, Schwäble J, Tomasovic A, Ehling R, Stein S, Kurrle N, von Melchner H, Schnütgen F. High efficiency gene correction in hematopoietic cells by donor-template-free CRISPR/Cas9 genome editing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2018 Mar 2;10:1-8.
- Sutherland DW, Greene GL. Cultivated and wild host plants. Suppression and management of cabbage looper populations. *USDA Technical Bulletin*. 1984;1684:1-3.
- Suzuki Y, Truman JW, Riddiford LM. The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. *Development*. 2008 Feb 1;135(3):569-77.
- Szczelkun MD, Tikhomirova MS, Sinkunas T, Gasiunas G, Karvelis T, Pschera P, Siksnys V, Seidel R. Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Jul 8;111(27):9798-803.
- Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz I, De Souza ML. Baculoviruses—re-emerging biopesticides. *Biotechnology advances*. 2006 Mar 1;24(2):143-60.
- Szewczyk B, Rabalski L, Krol E, Sihler W, de Souza ML. Baculovirus biopesticides-safe alternative to chemical protection of plants. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. 2009.
- Szlachta K, Kuscü C, Tufan T, Adair SJ, Shang S, Michaels AD, Mullen MG, Fischer NL, Yang J, Liu L, Trivedi P. CRISPR knockout screening identifies combinatorial drug targets in pancreatic cancer and models cellular drug response. *Nature communications*. 2018 Oct 15;9(1):1-3.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. 1999 Oct 15;99(2):123-32.
- Taning CN, Van Eynde B, Yu N, Ma S, Smagghe G. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of insect physiology*. 2017 Apr 1;98:245-57.
- Taylor RG, Walker DC, McInnes RR. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research*. 1993 Apr 11;21(7):1677.
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL, Barthel A, Bebas P. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of insect physiology*. 2011 Feb 1;57(2):231-45.
- Thurtle-Schmidt DM, Lo TW. Molecular biology at the cutting edge: a review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2018 Mar;46(2):195-205.
- Toba HH, Kishaba AN, Pangaldan R, Vail PV. Temperature and the development of the cabbage looper. *Annals of the Entomological Society of America*. 1973 Sep 17;66(5):965-74.
- Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*. 2004 Nov 19;306(5700):1377-80.
- Tomari Y, Du T, Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell*. 2007 Jul 27;130(2):299-308.

- Tran TT, Dietmair S, Chan LC, Huynh HT, Nielsen LK, Reid S. Development of quenching and washing protocols for quantitative intracellular metabolite analysis of uninfected and baculovirus-infected insect cells. *Methods*. 2012 Mar 1;56(3):396-407.
- Trivedi B. Bug silencing: the next generation of pesticides. *New Scientist*. 2010 Mar 17;205(2752):34-7.
- Van Der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2014 Jul;12(7):479-92.
- van Houte S, Ros VI, Mastenbroek TG, Vendrig NJ, Hoover K, Spitzen J, van Oers MM. Protein tyrosine phosphatase-induced hyperactivity is a conserved strategy of a subset of baculoviruses to manipulate lepidopteran host behavior. *PLoS One*. 2012 Oct 15;7(10):e46933.
- van Rij RP, Saleh MC, Berry B, Foo C, Houk A, Antoniewski C, Andino R. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & development*. 2006 Nov 1;20(21):2985-95.
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley PJ. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; noctuidae). *In vitro*. 1977 Apr 1;13(4):213-7.
- Volkman LE. Baculoviruses and nucleosome management. *Virology*. 2015 Feb 1;476:257-63.
- Wang F, Wang L, Zou X, Duan S, Li Z, Deng Z, Luo J, Lee SY, Chen S. Advances in CRISPR-Cas systems for RNA targeting, tracking and editing. *Biotechnology advances*. 2019 Sep 1;37(5):708-29.
- Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature structural & molecular biology*. 2009 Nov;16(11):1148.
- Wang P, Zhao JZ, Rodrigo-Simón A, Kain W, Janmaat AF, Shelton AM, Ferré J, Myers J. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Applied and environmental microbiology*. 2007 Feb 15;73(4):1199-207.
- Wang XH, Aliyari R, Li WX, Li HW, Kim K, Carthew R, Atkinson P, Ding SW. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*. 2006 Apr 21;312(5772):452-4.
- Wang Y, Li Z, Xu J, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, Huang Y, Tan A. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell research*. 2013 Dec;23(12):1414-6.
- Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R: Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου. 7^η αμερικάνικη-2^η ελληνική έκδοση. UTOPIA ΕΚΔΟΣΕΙΣ Μ. ΕΠΕ. Αθήνα 2016.
- Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of virology*. 2006 May 15;80(10):5059-64.
- Wei Y, Terns RM, Terns MP. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR–Cas adaptation. *Genes & development*. 2015 Feb 15;29(4):356-61.
- Welker NC, Maity TS, Ye X, Aruscavage PJ, Krauchuk AA, Liu Q, Bass BL. Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode. *Molecular cell*. 2011 Mar 4;41(5):589-99.
- Weng Y, Xiao H, Zhang J, Liang XJ, Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnology advances*. 2019 Sep 1;37(5):801-25.

- Whyard S, Singh AD, Wong S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2009 Nov 1;39(11):824-32.
- Wood HA, Granados RR. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annual review of microbiology*. 1991 Oct;45(1):69-87.
- Wright AV, Doudna JA. Protecting genome integrity during CRISPR immune adaptation. *Nature structural & molecular biology*. 2016 Oct;23(10):876.
- Wright AV, Liu JJ, Knott GJ, Doxzen KW, Nogales E, Doudna JA. Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science*. 2017 Sep 15;357(6356):1113-8.
- Wyckhuys KA, O'Neil RJ. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. *Crop Protection*. 2006 Nov 1;25(11):1180-90.
- Wynant N, Santos D, Broeck JV. Biological mechanisms determining the success of RNA interference in insects. In *International review of cell and molecular biology* 2014 Jan 1 (Vol. 312, pp. 139-167). Academic Press.
- Wynant N, Santos D, Broeck JV. The evolution of animal Argonautes: evidence for the absence of antiviral AGO Argonautes in vertebrates. *Scientific reports*. 2017 Aug 23;7(1):1-3.
- Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, Kan YW. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome research*. 2014 Sep 1;24(9):1526-33.
- Xing H, Meng LH. CRISPR-cas9: a powerful tool towards precision medicine in cancer treatment. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020 May;41(5):583-7.
- Xue XY, Mao YB, Tao XY, Huang YP, Chen XY. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. In *Advances in insect physiology* 2012 Jan 1 (Vol. 42, pp. 73-117). Academic Press.
- Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteliansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature biotechnology*. 2014 Jun;32(6):551-3.
- Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*. 2012 Jul 1;40(12):5569-76.
- Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smagghe G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect science*. 2013 Feb;20(1):4-14.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*. 2006 Dec;7(1):1-2.
- Zambon RA, Vakharia VN, Wu LP. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular microbiology*. 2006 May;8(5):880-9.
- Zeng B, Zhan S, Wang Y, Huang Y, Xu J, Liu Q, Li Z, Huang Y, Tan A. Expansion of CRISPR targeting sites in *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2016 May 1;72:31-40.
- Zenke K, Kim KH. Functional characterization of the RNase III gene of rock bream iridovirus. *Archives of virology*. 2008 Sep 1;153(9):1651-6.
- Zhang D, Hussain A, Manghwar H, Xie K, Xie S, Zhao S, Larkin RM, Qing P, Jin S, Ding F. Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. *Plant Biotechnology Journal*. 2020 Apr 9.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004 Jul 9;118(1):57-68.

- Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2015 Jan 1;4:e264.
- Zhang Y, Calin-Jageman I, Gurnon JR, Choi TJ, Adams B, Nicholson AW, Van Etten JL. Characterization of a chlorella virus PBCV-1 encoded ribonuclease III. *Virology*. 2003 Dec 5;317(1):73-83.
- Zhang Z, Aslam AF, Liu X, Li M, Huang Y, Tan A. Functional analysis of *Bombyx Wnt1* during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of insect physiology*. 2015 Aug 1;79:73-9.
- Zhao S, He G, Yang Y, Liang C. Nucleocapsid assembly of baculoviruses. *Viruses*. 2019 Jul;11(7):595.
- Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J, Palli SR. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest management science*. 2011 Feb;67(2):175-82.
- Zotti M, dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CN, Smagghe G. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest management science*. 2018 Jun;74(6):1239-50.
- Zotti MJ, Smagghe G. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments. *Neotropical Entomology*. 2015 Jun 1;44(3):197-213.
- Παπανικολάου Γ, Παλαιολόγου Δ, Κατσαρέλη Ε. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. 2015: 129-152.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ PCR

Γονίδιο/Διαγονίδιο	Εκκινητής F	Εκκινητής R	Αποδιάταξη	Υβριδοποίηση	Επιμήκυνση	Κόκλοι	Παράγραφος
dsLuc	Stem F	Stem R	94 °C (45")	55 °C (30")	72 °C (30")	35	3.1.3.4
<i>he65</i>	He65 F	He65 R	94 °C (45")	55 °C (30")	72 °C (30")	35	3.1.3.3
HpLuc	Actin 1	Luc 5' (1)	94 °C (45")	52 °C (30")	72 °C (30")	35	3.1.2.1
HpLuc	Luc 5' (1)	Luc 3'	94 °C (45")	58 °C (30")	72 °C (35")	35	3.1.2.2
Sf-HpDcr2	HP-SfDcr2- BamHI F	HP-SfDcr2- NotI R	94 °C (45")	52 °C (30")	72 °C (30")	35	3.1.2.1 / 3.1.2.2
Sf-HpDcr2	HP-SfDcr2- BamHI F	Actin R	94 °C (45")	54 °C (30")	72 °C (30")	35	3.1.2.2
<i>α-tubulin</i>	Sf-Tub F	Sf Tub R	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (30")	30	3.1.2.2

Πίνακας Π1. Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR που εφαρμόστηκαν στα πλαίσια ελέγχου της μεθόδου RNAi.

Γονίδιο/Αλληλουχία	Εκκινητής F	Εκκινητής R	Αποδιάταξη	Υβριδοποίηση	Επιμήκυνση	Κύκλοι	Παράγραφος
Sf3662	Sf3662A	CR	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (25")	35	3.2.1
Sf3782	Sf3782B	CR	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (25")	35	3.2.1
<i>Sf-dicer-2</i>	Sf-Dcr2 F	Sf-Dcr2 R	94 °C (45")	52 °C (30")	72 °C (30")	35	3.2.2.2
<i>Sf-α-tubulin</i>	Sf-Tub F	Sf-Tub R	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (25")	30	3.2.2.2
Tn2647	Tn2647A	CR	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (25")	35	3.2.1
Tn2773	Tn2773A	CR	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (25")	35	3.2.1
<i>Tn-dicer-2</i>	Tn-Dcr2 F	Tn-Dcr2 R	94 °C (45")	55 °C (30")	72 °C (30")	35	3.2.2.1
<i>Tn-dicer-2</i>	TnDcr2 1762F	TnDcr2 2188R	95 °C (30")	56 °C (45")	72 °C (45")	35	3.2.2.1
<i>Tn-dicer-2</i>	TnDcr2 2498F	TnDcr2 2976R	95 °C (30")	55 °C (45")	72 °C (3'15")	40	3.2.2.1
<i>Tn-α-tubulin</i>	Tn-Tub F	Tn-Tub R	94 °C (45")	60 °C (30")	72 °C (30")	30/35	3.2.2.1

Πίνακας Π2. Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR που εφαρμόστηκαν στα πλαίσια ελέγχου της μεθόδου CRISPR/Cas9.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
Actin 1	GACGAAGAAGTTGCCGCGTTGG
Actin R	GCCTCTGGGCAACGGAATCT
CR	GCCGCACTAGTCTGCAGAAA
He65 F	ATCGCATGCACGTTTCTAAA
He65 R	GCGAGTATCAACAAGAATGG
HP-SfDcr2-BamHI F	ATCAGGATCCTCTTAAGTCTGTCATCTCAC
HP-SfDcr2-NotI R	TATTGCGGCCGCGTGGAAGCGCTCATCGGTA
Luc 3'	AATTGGATCCAATTCAGCGGGGGCCACCTG
Luc 5' (1)	CATGGAATTCTGCGTTGCTAGTACCAACCC
Sf3662A	ACCGACTGGCTGCAAATTTTCAGGA
Sf3782B	AACACCAGCCAGATTGAACCTTTC
Sf-Dcr2 F	TCCTCGAACATATGACGCCG
Sf-Dcr2 R	TTGGGCTAGCAGGGAATTGG
Sf-Tub F	TCTACCGAGAAGGCGTACCA
Sf-Tub R	ATACCCTCACCGACGTACCA
Stem F	AATTCAGCGGGGGCCACCTG
Stem R	GAAGTCGGGGAAGCGGTTGC
Tn2647A	ATTGTTAATCCTGTCCTCATACGG
Tn2773A	ATTGTCTGAATCGAAATGAGACTG
Tn-Dcr2 1762F	CCGTATGGAGGTCGCCTAAC
Tn-Dcr2 2188R	GCACTCTTCCCTTAGTCCCG
Tn-Dcr2 2498F	TCGAGCAAGTTTTAGCCATTGC
Tn-Dcr2 2 2976R	CTGTGATGCGGACACTAGCT
Tn-Dcr2 F	TCCCACGTGTTTCGAGAAGTGC
Tn-Dcr2 R	TTCACTGGCTGTTGCGGTAT
Tn-Tub F	TGAGATCACCAACGCTTGCT
Tn-Tub R	ATACCCTCACCGACGTACCA

Πίνακας Π3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR στην παρούσα Διπλωματική Εργασία.

Γονίδιο	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')
<i>ago-2</i>	Tn-Ago2 qF	GACTGCGCGTCGTATAAAACC
	Tn-Ago2 qR	TGACATTGCCGTCCTCAAA
<i>dicer-2</i>	Tn-Dcr2 qF	CGGTGACTTGCAGACTGTCT
	Tn-Dcr2 qR	TTCACTGGCTGTTGCGGTAT
<i>a-tubulin</i>	Tn-Tub qF	CGCAACCTCGACATTGAAC
	Tn-Tub qR	TCGGTAAGGTCGACGTTGA

Πίνακας Π4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις μέσω qRT-PCR στην παρούσα Διπλωματική Εργασία.

