

Η παρεμπόδιση μέσω RNA (RNA interference, RNAi) έχει πρόσφατα αναπτυχθεί ως μια ισχυρή τεχνική της αναστροφής γενετικής για την ανάλυση της λειτουργίας των γονιδίων με πιθανή εφαρμογή στην καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων (1). Στο μεταξοσκώληκα, *B. mori*

(Λεπιδόπτερα), δεν προκαλείται ισχυρή απόκριση RNAi έπειτα από έγχυση ή χορήγηση τροφής που περιέχει dsRNA (

2

). Η παρατήρηση αυτή μας ώθησε να αξιολογήσουμε ορισμένους παράγοντες που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην αποτελεσματικότητα του RNAi (ή στην έλλειψη αυτής) στο μεταξοσκώληκα, όπως:

Πρότυπα έκφρασης των βασικών ενδοκυτταρικών παράγοντων RNAi

Μελέτες έκφρασης έδειξαν ότι η απουσία έκφρασης του R2D2, ενός βασικού συμπαράγοντα των Dicer-2 και Ago-2, μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ανθεκτικότητα της συστημικής απόκρισης RNAi στον *Bombyx* (3). Ωστόσο, λειτουργικές μελέτες δείχνουν ότι ο ενδοκυτταρικός μηχανισμός του RNAi μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά απουσία του R2D2 στα κύτταρα Bm5, μια κυτταρική σειρά του μεταξοσκώληκα (

4

).

Έκφραση ενζύμων αποικοδόμησης του dsRNA

Αποδείχθηκε ότι μια μη ειδική DNA/RNA νουκλεάση («dsRNase») εκφράζεται ευρέως σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς, και είναι ικανή τόσο να αποικοδομεί το dsRNA ενδοκυτταρικά, όσο και να παρεμβαίνει στο μηχανισμό του RNAi (5).

Το dsRNA ως (μη-ειδικό) "παθογόνο-συνδεδεμένο μοριακό μοτίβο" (pathogen-associated molecular pattern, PAMP)

Παρατηρήθηκε ότι η έγχυση dsRNA στην αιμολέμφο των προνυμφών του *Bombyx* επάγει την έκφραση γονιδίων του RNAi μηχανισμού (Dicer-2, Ago-2) και του ενζύμου «dsRNase» στο μεσέντερο, ενώ η έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα Toll9-1 της έμφυτης ανοσίας

αναστέλλεται (

6

). Η εκτοπική έκφραση του υποδοχέα Toll9-1 σε κύτταρα Bm5 παρατηρήθηκε ότι ρυθμίζει την απόκριση έναντι των PAMPs (δηλαδή του dsRNA και του λιποπολυσακχαρίτη (LPS)) όσον αφορά στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον RNAi μηχανισμό και την έμφυτη ανοσία (

7

).

Εμμένουσα μόλυνση από RNA ιούς

Υπήρξε η υπόθεση ότι μια εμμένουσα ιϊκή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σοβαρά τη λειτουργία του RNAi μηχανισμού, σύμφωνα με πολλούς διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς (**8**). Για την αξιολόγηση της απόκρισης του συνόλου των mRNA και των μικρών μορίων RNA κατά τη διάρκεια της μόλυνσης προνύμφων του μεταξοσκώληκα από τον κυτταροπλασματικό ιό πολυέδρωσης (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV), ο οποίος χαρακτηρίζεται από ένα τμηματικό γονιδίωμα dsRNA (*Cypovirus*, Reoviridae), χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της αλληλούχησης RNA νέας γενιάς (RNA next generation sequencing). Η ανάλυση αποκαλύπτει μια μοναδική απόκριση του μεταξοσκώληκα στη μόλυνση από τον dsRNA ιό, χωρίς αυτή να επικαλύπτεται από τα κλασσικά μονοπάτια έμφυτης ανοσίας που ενεργοποιούνται από βακτήρια ή μύκητες.

1. Swevers, L. and Smagghe, G. (2012). Use of RNAi for control of insect crop pests. In: "Arthropod-Plant Interactions, Novel Insights and Approaches for IPM", Progress in Biological Control, Volume 14. G. Smagghe & I. Diaz (Eds.), pp 177-197. Springer-Verlag, Dordrecht.

2. Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Sriramana, K., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.-L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., Bravo, A., Chevalier, F., Collinge, D.P., Crava, C.M., de Maagd, R.A., Duvic, B., Erlandson, M., Faye, I., Felföldi, G., Fujiwara, H., Futahashi, R., Gandhe, A.S., Gatehouse, H.S., Gatehouse, L.N., Giebertowicz, J., Gómez, I., Grimmlikhuijzen, C.J., Groot, A.T., Hauser, F., Heckel, D.G., Hegedus, D.D., Hrycaj, S., Huang, L., Hull, J., Iatrou, K., Iga, M., Kanost, M.R., Kotwica, J., Li, C., Li, J., Liu, J., Lundmark, M., Matsumoto, S., Meyering-Vos, M., Millichap, P.J., Monteiro, A., Mrinal, N., Niimi, T., Nowara, D., Ohnishi, A., Oostra, V., Ozaki, K., Papakonstantinou, M., Popadic, A., Rajam,

M.V., Saenko, S., Simpson, R.M., Soberón, M., Strand, M.R., Tomita, S., Toprak, U., Wang, P., Wee, C.W., Whyard, S., Zhang, W., Nagaraju, J., French-Constant, R.H., Herrero, S., Gordon, K., Swevers, L., and Smagghe, G. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* **57**, 231-245.

3. Swevers, L., Liu, J., Huvenne, H., and Smagghe, G. (2011). Search for limiting factors in the RNAi pathway in silkworm tissues and Bm5 cells: the RNA-binding proteins R2D2 and Translin. *PLoS ONE* **6**:e20250.

4. Liu, J., Swevers, L., Iatrou, K., Huvenne, H., and Smagghe, G. (2012). *Bombyx mori* DNA/RNA non-specific nuclease isoforms: expression in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. *J. Insect Physiol.* **58**, 1166-1176.

5. Kolliopoulou, A., and Swevers, L. (2013). Functional analysis of the RNAi response in ovary-derived silkworm Bm5 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **42**, 654-663.

6. Liu, J., Smagghe, G., and Swevers, L. (2013). Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **59**, 646-654.

7. Liu, J., Kolliopoulou, A., Smagghe, G., and Swevers, L. (2013). Modulation of the transcriptional response of innate immune and RNAi genes upon exposure to dsRNA in silkworm-derived Bm5 cells overexpressing BmToll9-1 receptor. Submitted for publication.

8. Swevers, L., Vanden Broeck, J., and Smagghe, G. (2013). The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis. *Frontiers in Integrative Physiology* (In Press).

9. Swevers, L., Van Nieuwerburgh, F., Kolliopoulou, A., Sun, J., and Smagghe, G. (2013). Transcriptome and small RNA analysis of larval midgut tissue persistently and acutely infected

by cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) in the silkworm *Bombyx mori*. 38th FEBS Congress, St. Petersburg, July 6-11. FEBS Journal

280

(Suppl. 1) 584-585.