

Università degli Studi di Napoli "Federico II"



DIPARTIMENTO DI AGRARIA

Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay"

**DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA
"INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY"**

XXV CICLO

TESI DI DOTTORATO

Uso di RNAi per il controllo degli insetti

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Relatore

Chiar. mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Candidata

Ilaria DI LELIO

Anno accademico 2012-2013

INDICE

Abstract	6
Riassunto	9
INTRODUZIONE: RNA interference (RNAi)	12
1 I piccoli RNA (sRNA) nel meccanismo RNAi	12
2 RNAi: meccanismo molecolare	14
2.1 Fase iniziatrice: processamento dei dsRNAs (o dei pre-miRNAs)	15
2.2 Fase effettrice: incorporazione dei siRNA (o dei miRNA) in un complesso proteico.....	15
2.3 Il pathway dei piccoli RNA in <i>Drosophila</i>	17
3 RNAi negli insetti	18
3.1 Assorbimento cellulare e esportazione del dsRNA	19
3.2 RNAi sistemico negli insetti	21
3.3 Legame tra RNAi e risposta immunitaria.....	22
3.3.1 Soppressione dell'RNAi da parte dei virus	23
3.4 Considerazioni sull'uso dell'RNAi negli insetti	23
3.4.1 Produzione di dsRNAs.....	23
3.4.2 Meccanismi di somministrazione del dsRNA negli insetti	25
3.5 Fattori che influenzano l'RNAi negli insetti.....	30
4 Prospettive future per il controllo dei fitofagi basato sull'RNAi	31
4.1 Controllo dei fitofagi mediato da RNAi	31
4.2 Individuazione di geni target per l'RNAi	32
5 Interazione insetto/altri organismi viventi	33
5.1 I parassitoidi	35
5.2 Regolazione dell'ospite	37
5.2.1 I fattori di regolazione di origine materna.....	39
5.2.2 Fattori di regolazione di origine embrionale.	43
5.3 Il sistema biologico <i>Heliothis virescens</i> – <i>Toxoneuron nigriceps</i>	44
5.3.1 <i>TnBV</i>	46
SCOPO DELLA TESI	50

CAPITOLO 1: Ruolo funzionale della proteina 102 di <i>H. virescens</i> nella risposta immunitaria cellulare	51
1.1 Introduzione.....	51
1.2 Amiloidi funzionali nella risposta immunitaria degli insetti.....	52
CAPITOLO 2: RNAi in larve di <i>H. virescens</i>.....	63
2.1 Scopo del lavoro.....	63
2.2 Materiali e metodi.....	64
2.2.1 Allevamento degli insetti.....	64
2.2.2. Clonaggio del trascritto rc5'nt <i>Tn</i> BV da vettore plasmidico	64
2.2.3 PCR con oligo contenenti la sequenza T7	66
2.2.4 Trascrizione <i>in vitro</i> delle molecole di dsRNA.....	67
2.2.5 Somministrazione del dsRNA attraverso microiniezioni nella cavità emocelica.....	69
2.2.6 Somministrazione del dsRNA attraverso microiniezioni orali.....	70
2.2.7 Saggio d'incapsulamento in larve di <i>H. virescens</i> interferite	70
2.2.8 Saggio d'incapsulamento <i>in vivo</i>	71
2.2.9 qRT-PCR	73
2.2.9.1 Estrazione dell'RNA totale	73
2.2.9.2 SYBR-Green qRT-PCR.....	74
2.2.9.3 Quantificazione relativa (metodo $\Delta\Delta$ CT).....	75
2.2.10 Analisi statistica	75
2.3 Risultati.....	76
2.3.1 Produzione del dsRNA102 di <i>H. virescens</i> da clone.....	76
2.3.2 Esperimenti di RNAi in <i>H. virescens</i>	78
2.3.3 qRT-PCR sulle larve di <i>H. virescens</i> sottoposte a RNAi.....	81
2.4 Discussione.....	82
CAPITOLO 3: Identificazione dell'omologo del gene 102 in <i>Spodoptera littoralis</i> e sua analisi funzionale.....	85
3.1 Scopo del lavoro.....	85
3.2 Materiali e metodi.....	86
3.2.1 Analisi bioinformatica	86
3.2.2 Materiale biologico	86
3.2.3 Estrazione di RNA dagli emociti di <i>S. littoralis</i>	87
3.2.4 Produzione del dsRNA	88

3.2.4.1 Amplificazione del cDNA (RT-PCR).....	88
3.2.4.2 PCR con oligo contenenti la sequenza del primer T7.....	90
3.2.4.3 Trascrizione <i>in vitro</i> delle molecole di dsRNA.....	92
3.2.5 RNAi in larve di <i>S. littoralis</i>	92
3.2.6 Saggio d'incapsulamento in larve di <i>S. littoralis</i> interferite.....	92
3.2.7 qRT-PCR.....	93
3.2.7.1 Estrazione dell'RNA totale.....	93
3.2.7.2 Real time PCR: quantificazione relativa.....	93
3.2.7.3 Quantificazione relativa (metodo $\Delta\Delta CT$).....	94
3.2.8 Analisi statistica.....	95
3.3 Risultati	95
3.3.1 Identificazione del cDNA 102 in <i>S. littoralis</i>	95
3.3.2 Produzione del dsRNA102 di <i>S. littoralis</i>	97
3.3.3 RNAi in larve di <i>S. littoralis</i>	100
3.3.4 Analisi trascrizionale con RT PCR quantitativa (qRT-PCR).....	102
3.4 Discussione	103
CAPITOLO 4: Sviluppo di possibili strategie per il controllo di <i>S. littoralis</i> basate sulla tecnologia RNAi	105
4.1 Scopo del lavoro	105
4.2 Materiali e metodi	106
4.2.1 Materiale biologico.....	106
4.2.2 RNAi mediata da dsRNA in uova di <i>S. littoralis</i>	106
4.2.3 qRT-PCR.....	107
4.2.4 Impatto di <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner var. <i>kurstaki</i> sulle larve di <i>S. littoralis</i> dopo il trattamento con dsRNA102Sl.....	107
4.2.5 Definizione della CL_{50} del Bt in larve di <i>S. littoralis</i> di V età.....	109
4.2.6 Analisi statistica.....	109
4.3 Risultati	110
4.3.1 RNAi sulle uova di <i>S. littoralis</i>	110
4.3.2 Impatto del Bt sulle larve di <i>S. littoralis</i> dopo il trattamento con dsRNA102Sl.....	112
4.4 Discussione	113
CONCLUSIONI	116

APPENDICE 120

BIBLIOGRAFIA 138

Abstract

The present PhD thesis contributes to the development of new strategies of insect control based on the use of RNA interference (RNAi) to silence genes playing an important role in physiological homeostasis and reproduction. One of the most crucial issues for RNAi use is the selection of target genes, which, ideally, should generate lethal phenotypes upon silencing and should show limited off-target effects. Here we address this issue by selecting genes that are targeted by virulence strategies adopted by parasitic wasps to subdue their host insects, trying to mimic mechanisms shaped by long-term co-evolution in these antagonistic associations.

The first part of my PhD work focuses on the functional analysis of a protein encoded by a gene (*102*) of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.). This gene was considered as a good candidate for silencing strategies, as data already available in our laboratories seem to indicate its down-regulation in larvae parasitized by the endophagous braconid *Toxoneuron nigriceps* (Viereck), through a mechanism mediated by a non-coding RNA (*rc5'ntTnBV*) complementary to the 5'UTR.

In vitro and *in vivo* experiments have demonstrated that *102* gene has a key role in insect immune response, as it is involved in the localization of the melanization process of the hemocyte capsule around foreign objects and it is crucial for capsule formation. This process is mediated by the amyloid fibrils, produced from fragments of P102, stored in large cisterns of rough endoplasmic reticulum of granulocytes and spherulocytes. Upon immune challenge, amyloid fibrils are released on the surface of the foreign body where they form a layer which functions as a molecular scaffold promoting localized melanin synthesis and encapsulation. These results demonstrate, for the first time, that the amyloid fibrils have a functional key role in insect immunity, and have been already published as a part of a collaborative effort among different laboratories (Falabella *et al.*, 2012).

To demonstrate that the non-coding transcript *rc5'ntTnBV* has the potential to actively suppress the immune response of *H. virescens*, by silencing the

102 gene expression through a putative RNAi mechanism, we treated *H. virescens* larvae with dsRNA targeting this gene. Oral microinjection of dsRNA targeting the *102* gene into mature *H. virescens* larvae (but not haemocoelic injections) inhibited encapsulation of injected chromatography beads and promoted systemic melanization and death of the experimental larvae upon immune challenge. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analysis demonstrated that this immunosuppressed phenotype is associated with a significant transcriptional down-regulation of the *102* gene. These changes are perfectly in line with the functional data gathered for the P102, and indicate that the silencing of this gene severely affects the immune response of the tobacco budworm larvae.

Sequences related to *102* gene are present in different insect species, suggesting that functionally homologue genes can occur. Analysis of the ESTs available in public databases allowed the identification of the *102* homologue in *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (*102Sl*). The role of this gene in the immune response was assessed by RNAi mediated silencing. Oral microinjections of dsRNA *102Sl* into mature host larvae markedly inhibited beads encapsulation and promoted only limited surface melanization of the beads. However, differently from what was observed in *H. virescens* larvae, systemic melanization did not occur, and treated larvae regularly survived upon immune challenge. The immunosuppressed phenotype is associated with significant silencing levels of the *102Sl* gene, confirming the immune role observed also for *H. virescens*. However, melanogenesis and the localized melanin deposition in these two species appear to be controlled by different mechanisms, worth of further research efforts.

These observations stimulated the idea of pursuing control strategies of *S. littoralis*, based on RNAi mediated silencing of *102Sl* gene. This gene, as the *102* gene, may presumably be involved also in the formation of the basal membrane of epithelia by hemocytes (Falabella *et al.*, 2012 and references therein cited). Therefore, the disruption of its expression can potentially affect both immunity and development.

To test this latter hypothesis, we first silenced the *102* gene in *S. littoralis* eggs, in order to see if the development of the fast-growing embryo was

somehow affected. This was performed by egg immersion in a solution containing dsRNA102*Sl*, and this resulted into a significant increase of egg and newborn larvae mortality, associated with transcriptional down-regulation of the target gene.

To exploit the impairment of the immune function induced by the silencing of 102*Sl*, we evaluated the possible effect of dsRNA102*Sl* treatment on the insecticide activity of *Bacillus thuringiensis*. Indeed, the immune disguise triggered by this treatment significantly enhanced the mortality rate of *S. littoralis* stages (i.e. mature larvae), which are virtually insensitive to Bt exposure. This experiment provides the proof of concept that the proposed RNAi based approach can enhance the impact of biological control agents.

Collectively, these experimental data indicate that the 102 gene is a promising target to be used for RNAi based pest control technologies.

Riassunto

La presente tesi di dottorato contribuisce allo sviluppo di nuove strategie di controllo degli insetti basate sull'utilizzo di RNA interference (RNAi) per silenziare geni che giocano un ruolo importante nella omeostasi fisiologica e nella riproduzione. Una delle questioni più importanti per l'uso dell'RNAi è la selezione di geni bersaglio il cui silenziamento, idealmente, dovrebbe generare fenotipi letali e mostrare limitati effetti off-target. In questo lavoro abbiamo affrontato questo problema selezionando geni che sono il target di strategie di virulenza adottate dagli imenotteri parassitoidi per sottomettere i propri ospiti, cercando di imitare i meccanismi generati dalla lunga co-evoluzione di queste associazioni antagonistiche.

La prima parte del mio lavoro di dottorato è stata dedicata all'analisi funzionale di una proteina codificata da un gene (102) della larva di *Heliothis virescens* (F.). Questo gene è stato ritenuto un buon candidato per le strategie di silenziamento, in quanto i dati già disponibili, ottenuti nei nostri laboratori, sembrano indicare la sua sotto-regolazione in larve parassitizzate dal braconide endofago *Toxoneuron nigriceps* (Viereck), attraverso un meccanismo mediato da un RNA non codificante (rc5'nt*TnBV*) complementare al 5'UTR. Esperimenti condotti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che il gene 102 ha un ruolo chiave nella risposta immunitaria dell'insetto, infatti esso risulta coinvolto nella localizzazione del processo di melanizzazione della capsula emocitaria intorno agli oggetti estranei ed è essenziale per la formazione della capsula stessa. Questo processo è mediato dalla produzione di fibre amiloidi, a partire da frammenti della P102, che sono raccolte in grandi cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso di granulociti e sferulociti. A seguito di stimolo immunitario, le fibre amiloidi sono rilasciate sulla superficie del corpo estraneo, dove formano uno strato che funge da impalcatura molecolare, che promuove la sintesi localizzata della melanina e l'incapsulamento. Questi risultati dimostrano, per la prima volta, che le fibre amiloidi hanno un ruolo funzionale chiave nell'immunità degli insetti, e sono stati già pubblicati in

un lavoro frutto della collaborazione tra gruppi di lavoro appartenenti a diversi laboratori (Falabella *et al.*, 2012).

Per dimostrare che il trascritto non codificante rc5'nt*TnBV* è in grado, potenzialmente, di sopprimere attivamente la risposta immunitaria di *H. virescens* silenziando l'espressione genica 102 attraverso un meccanismo RNAi, abbiamo trattato le larve del nottuidae con dsRNA diretto contro questo gene. Microiniezione orali di dsRNA102 in larve mature di *H. virescens* (ma non iniezioni emoceliche) hanno inibito l'incapsulamento delle sferette (beads) cromatografiche iniettate, provocando, in seguito a stimolo immunitario, la melanizzazione sistemica e quindi la morte. La Real Time PCR quantitativa (qRT-PCR) ha dimostrato che questo fenotipo immunodepresso è associato ad una significativa sotto-regolazione trascrizionale del gene 102. Questi cambiamenti sono perfettamente in linea con i dati funzionali raccolti per la P102, e indicano che il silenziamento di questo gene ha un forte impatto sulla risposta immunitaria di *H. virescens*.

Il fatto che sequenze nucleotidiche correlate al gene 102 siano presenti in diverse specie di insetti, suggerisce l'esistenza di geni omologhi dal punto di vista funzionale. L'analisi delle librerie ESTs disponibili nei database pubblici ha permesso l'identificazione dell'omologo 102 in *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (102*Sl*). Il ruolo di questo gene nella risposta immunitaria è stato valutato utilizzando il silenziamento mediato da RNAi. Microiniezioni orali di dsRNA 102*Sl* nelle larve ospiti mature hanno causato una notevole inibizione dell'incapsulamento delle beads, promuovendone solo una limitata melanizzazione superficiale. Tuttavia, diversamente da quanto osservato nelle larve di *H. virescens*, non si è verificata la melanizzazione sistemica, e larve trattate sono sopravvissute regolarmente. Il fenotipo immunosoppresso è associato a livelli significativi di silenziamento del gene 102*Sl*, confermandone il ruolo immunitario osservato anche per *H. virescens*. In realtà, la melanogenesi e la deposizione localizzata della melanina nelle due specie di lepidottero prese in considerazione appaiono controllate da meccanismi diversi. La comprensione di questo fenomeno richiede, pertanto, ulteriori studi.

Queste osservazioni hanno stimolato l'idea di perseguire strategie per il controllo di *S. littoralis*, basato sul silenziamento del gene 102*Sl* mediato da

RNAi. Inoltre, questo gene, così come il gene 102, è anche presumibilmente coinvolto nella formazione delle membrane basali degli epitelii da parte degli emociti (Falabella *et al.*, 2012 e riferimenti ivi citati), e quindi l'interruzione della sua espressione potrebbe potenzialmente influenzare sia l'immunità, sia lo sviluppo dell'insetto.

Per verificare questa ipotesi, abbiamo prima silenziato il gene 102 in uova di *S. littoralis*, per vedere se lo sviluppo embrionale fosse, in qualche modo, influenzato. Il silenziamento è stato eseguito mediante l'immersione delle uova in una soluzione contenente dsRNA102*Sl*, e questo ha portato ad un significativo aumento della mortalità delle uova e delle larve neonate, associato ad una sotto-regolazione trascrizionale del gene bersaglio.

Per poter sfruttare la compromissione della funzione immunitaria indotta dal silenziamento del gene 102*Sl*, abbiamo valutato il possibile effetto del trattamento con dsRNA102*Sl* sull'attività insetticida di *Bacillus thuringiensis*. È stato dimostrato che l'immunosoppressione innescata da questo trattamento ha significativamente migliorato il tasso di mortalità di stadi di *S. littoralis*, come le larve mature, che sono poco sensibili all'esposizione di Bt. Questo esperimento fornisce la prova pratica che l'approccio proposto, basato sull'RNAi, può migliorare l'attività degli agenti di controllo biologico.

Collettivamente, questi dati sperimentali indicano che il gene 102 è un bersaglio promettente per tecnologie di controllo di insetti dannosi basate sull'RNAi.

INTRODUZIONE

RNA interference (RNAi)

Un RNA messaggero (mRNA), in presenza di RNA complementare (di origine endogena o esogena), forma con questo un doppio filamento molto stabile, il quale non viene tradotto: ciò comporta la degradazione specifica dell'mRNA maturo e, pertanto, il blocco dell'espressione genica. Tale processo innescato dalla presenza di una molecola di RNA a doppio filamento nella cellula viene definito "RNA interference" (RNAi) (Fire *et al.*, 1998).

Diversi studi hanno dimostrato che l'RNAi è una risposta biologica filogeneticamente conservata presente in molti, se non tutti gli organismi eucarioti (Paddison *et al.*, 2002a, b). In natura, infatti, il fenomeno dell'RNAi sembra svolgere un importante ruolo protettivo del genoma da situazioni di instabilità causate dall'accumulo di trasposoni e di sequenze ripetute e costituisce parte di un meccanismo di difesa nei confronti di attacchi virali (Zamore *et al.*, 2000).

1 I piccoli RNA (sRNA) nel meccanismo RNAi

I piccoli RNA (small RNAs o sRNAs) attivi nell'RNAi possono essere classificati in tre categorie (Tabella 1) sulla base della struttura dei loro precursori e del pathway mediante il quale vengono processati: short interfering RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs) e Piwi-interacting RNAs (piRNAs).

Small interfering RNA o siRNA: sono corti filamenti di dsRNA di circa 20-25 nucleotidi, che hanno una distinta polarità e specifiche caratteristiche biochimiche, essenziali per lo svolgimento della loro funzione (Caplen *et al.*, 2001). Gli siRNA proteggono l'integrità del genoma da acidi nucleici estranei o invasivi e possono essere generati a partire da

lunghe molecole di dsRNA derivanti dalla replicazione di virus a RNA (vsiRNAs) (Umbach e Cullen, 2009) o da elementi trasponibili mobili (endo-siRNAs) (Brennecke *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008; Fagegaltier *et al.*, 2009; Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008; Ghildiyal e Zamore, 2009), o possono essere prodotti sinteticamente da transgeni che esprimono molecole di dsRNA.

Micro interfering RNA o miRNA: sono oligomeri di circa 22 nucleotidi non codificanti che contengono regioni invertite e ripetute, le quali permettono la formazione di un doppio filamento a forcina in grado di innescare il meccanismo dell'RNAi (Sledz e Williams, 2005). I miRNA sono trascritti dal genoma dell'organismo stesso, regolano l'espressione di geni endogeni (coinvolti in svariati processi biologici) e difendono la cellula dai potenziali effetti deleteri dei trasposoni (Sledz e Williams, 2005).

Piwi-interacting RNAs (piRNAs): sono lunghi 24-31 nucleotidi e differiscono dai miRNAs e dai siRNAs per tre caratteristiche principali. In primo luogo, si ritiene che i piRNAs siano generati da trascritti primari a singolo filamento codificati da regioni genomiche definite (Aravin *et al.*, 2007a). In secondo luogo, anche se la loro biogenesi non è completamente compresa, essa richiede l'intervento delle proteine Piwi (Fig. 3C) e sembra essere indipendente dalle attività dell'enzima Dicer (Houwing *et al.*, 2007; Vagin *et al.*, 2006). In terzo luogo, essi contribuiscono al silenziamento di elementi trasponibili esclusivamente nelle gonadi di animali (Aravin *et al.*, 2003, 2007b; Brennecke *et al.*, 2007; Olivieri *et al.*, 2010; Vagin *et al.*, 2006), dove operano il silenziamento di trasposoni e di retrotrasposoni nelle cellule germinali (Lin, 2007).

Piccoli RNA	Origine	Tipo di silenziamento	Organismo	Riferimento
siRNA				
siRNA ^a (21-25 nt)	Transgeni, virus e elementi endogeni ripetuti.	PTGS, CDGS	Funghi, piante e animali	Grosshans e Filipowicz (2008), Moazed (2009), Dunoyer <i>et al.</i> , (2010)
nat-siRNA (20-25 nt)	Trascritti <i>cis</i> -antisense naturali	PTGS	Piante e animali	Katiyar-Agarwal <i>et al.</i> , (2006), Okamura <i>et al.</i> , (2008)
ta-siRNA (21 nt)	Geni TAS	PTGS	Piante	Vazquez <i>et al.</i> , (2004), Allen <i>et al.</i> , (2005)
lsiRNAs (30-40 nt)	NAT	PTGS	Piante	Katiyar-Agarwal <i>et al.</i> , (2007)
miRNA (20-25 nt)	Geni codificanti MiRNA	PTGS, CDGS	Piante e animali	Carthew e Sontheimer (2009), Moazed (2009)
piRNA (24-31 o 21 ^b nt)	DNA ripetitivi, trasposoni	PTGS, CDGS	Animali (cellule germinali)	Hartig <i>et al.</i> , (2007), Lin (2007), Moazed (2009)

Tabella 1: Tipi di piccoli RNA. I meccanismi utilizzati dall'RNAi identificati finora sembrano agire sia nel pathway del silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS) sia in quello del silenziamento genico cromatina-dipendente (CDGS). I trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) e i long siRNAs (lsiRNAs) sono siRNA endogeni specifici delle piante (Xue-Yi Xue *et al.*, 2012).

2 RNAi: meccanismo molecolare

Il processo biologico attivato dall'RNA a doppia elica attraverso il quale viene inibita l'espressione genica può essere innescato a diversi stadi (Filipowicz *et al.*, 2005): nelle piante può avvenire sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, mentre nei mammiferi solamente il processo di inattivazione genica post-trascrizionale (PTGS) è stato confermato da dati sperimentali (Bernstein *et al.*, 2001).

Il meccanismo d'azione mediante il quale ha luogo il processo di silenziamento può essere schematicamente suddiviso in più tappe (una fase iniziatrice ed una effettrice) comuni nei funghi, nelle piante, nei nematodi, negli insetti e nei vertebrati. Il percorso di produzione dei piccoli RNA coinvolge diverse proteine, tra queste *Dicer* e *Argonauta* costituiscono il fulcro rispettivamente della fase iniziatrice, che porta alla produzione degli sRNAs, e della fase effettrice dell'RNAi.

2.1 Fase iniziatrice: processamento dei dsRNAs (o dei pre-miRNAs)

Le molecole di dsRNAs (introdotte sperimentalmente o presenti come bioprodotto virale), i pre-miRNA e i trasposoni vengono riconosciuti e tagliati in sRNAs per opera di *Dicer*, un enzima dimerico del peso molecolare di circa 200 kDa appartenente alla famiglia delle RNAsi di classe III (Sledz e Williams, 2005). Studi cristallografici mostrano due domini catalitici ad attività endonucleasica (RNAsi III), un dominio NH₂-terminale elicastico ATP-dipendente ed uno COOH-terminale con siti specifici per il legame con dsRNA (Fig. 1B) (Filipowicz *et al.*, 2005), oltre ad un dominio PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) (Moss, 2001).

Dicer funziona come un monomero contenente un singolo centro per il taglio ATP-dipendente del dsRNA, o delle strutture a stem loop dell'RNA precursore in sRNAs (microRNAs e siRNAs) (Moss, 2001).

2.2 Fase effettrice: incorporazione dei siRNA (o dei miRNA) in un complesso proteico

Gli sRNAs, prodotti dall'attività della proteina *Dicer*, vengono incorporati in un complesso nucleasico costituito da subunità multiple che, in base alla specie e alla fonte da cui i siRNAs (o i miRNAs) derivano, varia nella struttura e nell'effetto indotto sull'RNA:

- miRNAs agiscono come componenti di un complesso detto miRNP che dirige la degradazione dell'RNA nelle piante e la repressione della traduzione negli animali;
- siRNAs (sia di origine sintetica che derivanti da una naturale digestione dei dsRNA) sono incorporati in un complesso proteico di silenziamento indotto dall'RNA (RNA-induced silencing complex o RISC) e funzionano come sequenza guida per la degradazione specifica dell'mRNA (Sledz e Williams, 2005).

Il complesso multiproteico RISC (o miRNP) è fondamentale per il riconoscimento specifico e la degradazione nucleotidica dell'mRNA bersaglio (Hutvagner e Zamore, 2002; Meister e Tuschl, 2004). L'elemento centrale del complesso RISC è un membro della famiglia genica *Argonauta* (AGO), una proteina altamente basica, la cui attività nucleasica è responsabile del taglio dell'mRNA. Le proteine AGO sono presenti in tutti gli organismi eucarioti (Filipowicz *et al.*, 2005), hanno un peso molecolare di circa 100 kDa e contengono due domini di cui uno in posizione N-terminale, denominato PAZ, e l'altro in posizione C-terminale, detto PIWI (Carmell *et al.*, 2002), quest'ultimo implicato nell'interazione con la proteina *Dicer* (Meister e Tuschl, 2004).

Il complesso iniziale RISC (o miRNP) rimane inattivo sino al momento in cui lo svolgimento del doppio filamento del siRNA (o miRNA) non lo converte in una forma attiva, mediante un'attività elicastica del complesso stesso (Sledz e Williams, 2005). A questo punto RISC interagisce solamente con uno dei due filamenti di siRNA o miRNA, avviando la degradazione sequenza-specifica dell'mRNA complementare alla sequenza bersaglio nel caso dei siRNA, o, nel caso dei miRNA, parzialmente complementare (Martinez *et al.*, 2002). Tale processo comporta rispettivamente la degradazione dell'mRNA o l'inibizione della traduzione (Sledz e Williams, 2005). Evidenze sperimentali hanno dimostrato che gli miRNA sono in grado anche di causare il blocco dell'allungamento della catena amminoacidica o la sua terminazione (Meister e Tuschl, 2004).

La notevole efficienza dell'RNAi è stata attribuita ad un processo di amplificazione, proprio del meccanismo di interferenza. Questa amplificazione può avere come bersaglio i dsRNAs, al fine di produrre più siRNAs, o i siRNAs stessi. In questo modo, i complessi RISC hanno la possibilità di effettuare un maggior numero di reazioni ribonucleasiche sequenza-specifiche ("tagli"). È stato dimostrato che i siRNAs complementari all'mRNA bersaglio funzionano da primer per una RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRP) che trasforma l'mRNA in dsRNA, il quale a sua volta sarà il substrato di *Dicer*. Questo passaggio amplifica così la risposta dell'RNAi, la quale può autoalimentarsi fino a quando tutto l'mRNA bersaglio non è degradato. Il silenziamento genico mediato da

RNAi diventa così uno dei più eleganti ed efficienti meccanismi di silenziamento genico esistenti in natura (Baulcombe *et al.*, 2005; Campbell e Choy; 2005).

2.3 Il pathway dei piccoli RNA in *Drosophila*

In *D. melanogaster* il percorso dei miRNA è avviato dalla trascrizione di geni miRNA. Come già accennato, i miRNA necessitano di un processamento preliminare durante il quale il lungo trascritto primario (pri-miRNA) è digerito in un trascritto più piccolo, di circa 70 nucleotidi (pre-miRNA) (Novina e Sharp, 2004) dal complesso Drosha/Pasha (Drosha è un'endonucleasi appartenente alla famiglia delle RNase di classe III) (Lee *et al.*, 2003). Il pre-miRNA è poi traghettato nel citoplasma da un recettore nucleare denominato *Exportin-5* (Denli *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Filipowicz *et al.*, 2005), dove Dcr-1 e loquace (loqs) completano il processo e consegnano il miRNA maturo ad AGO1 contenente il complesso RISC. Il miRNA* viene eliminato e il miRNA guida dirige la repressione traduzionale o il taglio dell'mRNA bersaglio (Fig. 1A).

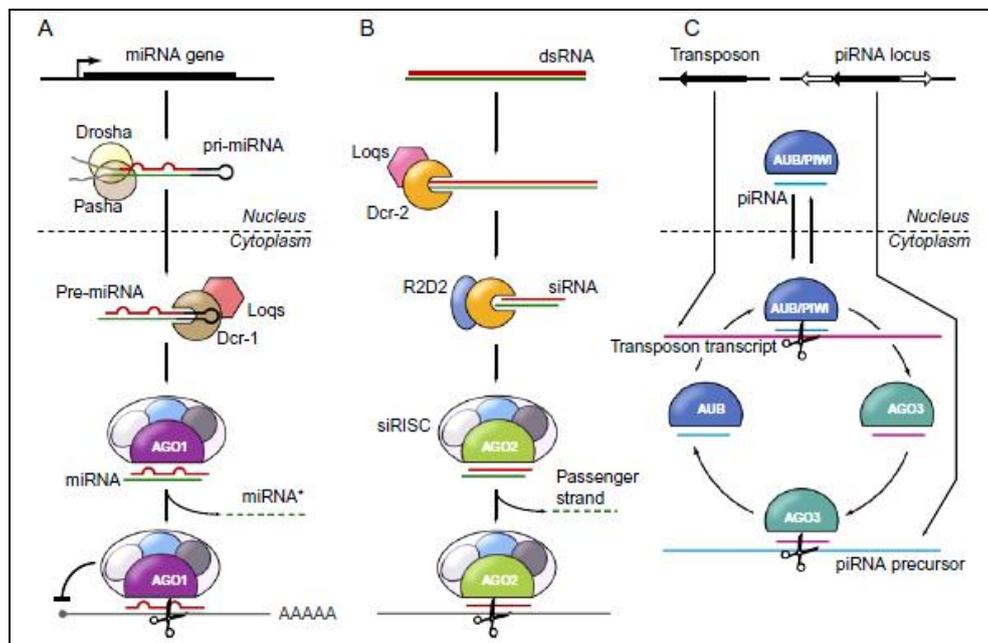


Figura 1: Rappresentazione schematica dei pathway dei piccoli RNA in *Drosophila*: (A) il pathway dei miRNA; (B) il pathway dei siRNA; (C) Il pathway dei piRNAs (Vadovar e Saleh, 2012).

Il pathway dei siRNA, invece, è avviato da dsRNA di origine virale o genomica che è riconosciuto e tagliato da Dcr-2 con l'aiuto di loqs. I siRNAs a doppio filamento che ne risultano sono consegnati a Ago2 contenente il complesso RISC. Il filamento guida del siRNA dirige la degradazione dell'RNA bersaglio sfruttando l'attività catalitica di Ago2 (Fig. 1B).

Il pathway dei piRNAs, infine, è avviato dai piRNAs incorporati nel complesso proteico Aubergine(Aub)/Piwi. Il pRNA viene amplificato attraverso un ciclo di amplificazione che coinvolge il trascritto senso e antisenso, AGO3 e Aub. I piRNAs prodotti ex-novo vengono incorporati in Aub e trasportati nel nucleo dove si pensa che siano coinvolti in modificazioni della cromatina (Fig. 1C).

3 RNAi negli insetti

In campo entomologico il silenziamento genico mediato da dsRNAs ha rivoluzionato lo studio della funzione genica nell'insetto modello *D. melanogaster* (Kennerdell e Carthew, 1998, 2000; Roignant *et al.*, 2003; Bischoff *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008), in *Tribolium castaneum* (Tomoyasu e Denell, 2004; Fujita *et al.*, 2006; Arakane *et al.*, 2008; Konopova e Jindra, 2008; Minakuchi *et al.*, 2009; Parthasarathy e Palli, 2009) e in *Bombyx mori* (Quan *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2008). Il silenziamento genico mediato da RNAi è stato riportato in diversi ordini di insetti, tra cui Ditteri (Misquitta e Paterson, 1999; Dzitoyeva *et al.*, 2001), Coleotteri (Tomoyasu e Denell, 2004; Bucher *et al.*, 2002; Tomoyasu *et al.*, 2008), Imenotteri (Amdam, *et al.*, 2003), Orthoptera (Dong e Friedrich, 2005), Blattodei (Cruz *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2006), Lepidotteri (Rajagopal *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2006) e Emitteri (Mutti *et al.*, 2006; Jaubert-Possamai *et al.*, 2007; Araujo, *et al.* 2006).

In agricoltura, e, più in particolare, nell'ambito delle biotecnologie per il controllo degli insetti dannosi alle colture, l'RNAi mostra enormi

potenzialità legate all'elevata specificità di azione che la caratterizza (Borovsky, 2005; Gordon e Waterhouse, 2007; Price e Gatehouse, 2008). Ovviamente, per ottenere un efficiente sistema di controllo degli insetti, occorre che essi siano in grado di assumere il dsRNA con il cibo e di assorbirlo a livello intestinale. Pertanto, lo sviluppo di efficienti strategie di somministrazione orale del dsRNA e la comprensione dei meccanismi di assorbimento di questa macromolecola sono un prerequisito fondamentale per l'uso dell'RNAi nella difesa delle piante.

3.1 Assorbimento cellulare e esportazione del dsRNA

Whangbo e Hunter (2008) hanno definito differenti meccanismi d'assorbimento del dsRNA, delineando due tipi di RNAi: cellula - indipendente (cell-autonomous RNAi) e cellula - dipendente (noncell-autonomous RNAi). Huvenne e Smaghe (2010) hanno recentemente rivisto la letteratura relativa a questi due meccanismi e ai tipi di diffusione del dsRNA negli insetti (Fig. 2).

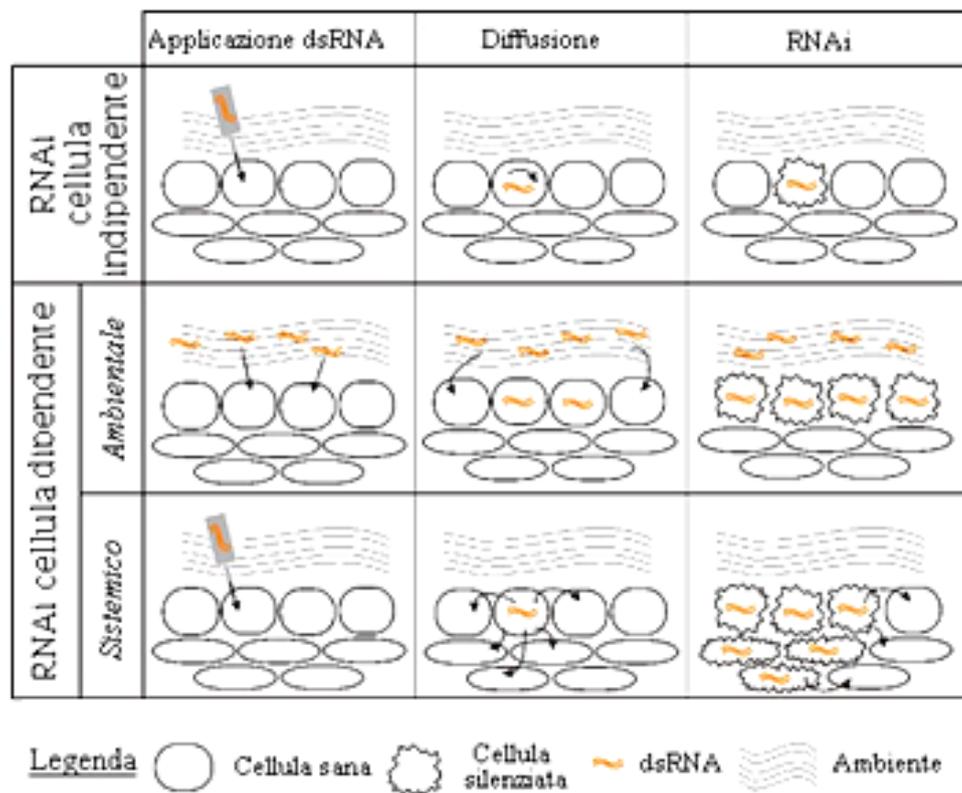


Figura 2: Rappresentazione schematica di diversi tipi di RNAi, spiegati attraverso l'effetto di silenziamento di un gene necessario per la vitalità cellulare. Nell'RNAi cellula-

indipendente il silenziamento genico è limitato alla cellula in cui il dsRNA è applicato o espresso. Nel caso dell'RNAi ambientale, il dsRNA viene assorbito dall'ambiente cellulare, ed il silenziamento genico è osservato in tutte le cellule che possono assorbire dsRNA. Questo può avvenire in organismi unicellulari e pluricellulari. L'RNAi sistemico include tutti i processi in cui il segnale di silenziamento è trasportato dalla cellula nella quale il dsRNA è espresso o applicato ad altri tessuti, nei quali avverrà il silenziamento (Huvenne e Smaghe, 2010).

Il meccanismo di assorbimento mediato da recettori trans-membrana

Diversi studi suggeriscono che i geni *sid-1* e *sid-2*, che nel nematode *Caenorhabditis elegans* codificano per proteine trans-membrana che mediano rispettivamente l'effetto sistemico dell'RNAi (Feinberg e Hunter, 2003) e l'RNAi di tipo ambientale (Winston *et al.*, 2007), non sono essenziali perché in alcuni insetti abbia luogo l'assorbimento del dsRNA e l'RNAi sistemico (Roignant *et al.*, 2003; Gordon e Waterhouse, 2007; Miller *et al.*, 2008, Feinberg e Hunter, 2003; Parrish *et al.*, 2000; Tomoyasu *et al.*, 2008). Quasi tutte le specie di insetti posseggono ortologi di *sid-1* (fatta eccezione per i ditteri) ma non di *sid-2*. Omologhi del gene *sid-1* sono stati identificati in alcuni insetti come *Tribolium castaneum*, *Bombix mori* (Tomoyasu *et al.*, 2008) e *Apis mellifera* (Aronstein *et al.*, 2006), ma non nel genoma di *Drosophila* (Winston *et al.*, 2007). Questo suggerisce che negli insetti esiste un sistema di assorbimento del dsRNA alternativo, considerato che l'RNAi sistemico è molto forte in *T. castaneum* (Tomoyasu *et al.*, 2008), anche dopo il silenziamento dei tre omologhi di *sid-1* individuati in questa specie. L'ipotesi è ulteriormente supportata dal fatto che, nonostante la presenza di tre omologhi di *sid-1*, in *B. mori* l'RNAi sistemico è un evento raro, e dal fatto che esso sia stato invece osservato in alcune specie di zanzara (Zhu *et al.*, 2003; Boisson *et al.*, 2006; Volz *et al.*, 2006; Tomoyasu *et al.*, 2008).

Il meccanismo di assorbimento mediato da endocitosi

In *D. melanogaster* non sono stati individuati ortologi dei geni *sid*, tuttavia è presente un meccanismo RNAi cellula indipendente e gli emociti sono in grado di rispondere all'RNAi ambientale (Roignant *et al.*, 2003; Gordon e Waterhouse, 2007; Miller *et al.*, 2008). Recenti studi hanno evidenziato che, in colture di cellule S2 (Schneider 2) di *Drosophila*, l'assorbimento del

dsRNA ha luogo grazie ad endocitosi mediata da recettori (Saleh *et al.*, 2006; Ulvila *et al.*, 2006), in quanto l'inibizione farmacologica dell'endocitosi inibisce anche l'effetto dell'RNAi. In totale sono stati individuati 23 geni coinvolti nell'assorbimento e nel processamento del dsRNA, tutti coinvolti, direttamente od indirettamente, nel pathway endocitico (Saleh *et al.*, 2006).

È stato inoltre dimostrato che l'endocitosi mediata da recettori è un meccanismo di assorbimento del dsRNA necessario anche in *C. elegans*, esso è pertanto diffuso ed è evolutivamente ben conservato (Saleh *et al.*, 2006). Tuttavia non è ancora chiaro come il dsRNA possa essere riconosciuto e localizzato in maniera adeguata nella cellula dall'endocitosi, sicuramente in tale processo sono coinvolti una combinazione di recettori "scavenger" (Saleh *et al.*, 2006). È già noto, infatti, che tali recettori giocano un ruolo importante nella fagocitosi di batteri patogeni (Erturk-Hasdemir e Silverman, 2005; Kocks *et al.*, 2005). Due recettori scavenger di *D. melanogaster*, SR-CI e Eater, sono responsabili di più del 90% dell'assorbimento del dsRNA da parte delle cellule S2 (Ulvila *et al.*, 2006). Entrambi giocano un ruolo fondamentale nella fagocitosi mediata da recettori dei batteri (Pearson *et al.*, 1995; Ramet *et al.*, 2001; Kocks *et al.*, 2005). Non si può comunque escludere che il dsRNA abbia trovato un modo di deviare il normale pathway di trasporto delle vescicole e di entrare nel citoplasma della cellula (Saleh *et al.*, 2006).

3.2 RNAi sistemico negli insetti

Studi condotti sul genoma completo di *D. melanogaster* hanno dimostrato l'assenza di geni codificanti per l'enzima RdRP, necessario per lo step di amplificazione dei siRNA e fondamentale per rendere gli effetti dell'RNAi persistenti e sistemici (Sijen *et al.*, 2001).

L'RNAi sistemico negli insetti è stato osservato per la prima volta nel coleottero *T. castaneum*, in due studi indipendenti, che hanno dimostrato, rispettivamente, che l'RNAi è trasmissibile sia da uno stadio allo stadio successivo (Tomoyasu e Denell, 2004), sia da una una generazione all'altra (Bucher *et al.*, 2002).

Attualmente, negli insetti non vi sono evidenze della presenza di RdRP (Roignant *et al.*, 2003; Jose e Hunter, 2007; Richards *et al.*, 2008; Tomoyasu *et al.*, 2008; Gordon e Weterhouse, 2008), pertanto la diffusione del dsRNA è basata su un meccanismo differente da quello osservato in *C. elegans*. La prima evidenza dell'esistenza di un sistema simile è stata osservata in studi che hanno dimostrato che una RNA polimerasi II mostra un'attività RdRP-simile in cellule embrionali di *D. melanogaster*, dove è coinvolta nell'immunità mediata da RNAi e nella soppressione dei trasposoni (Lipardi *et al.*, 2001, Lipardi e Paterson, 2009). Questo gene è universale nel regno animale e potrebbe essere coinvolto nell'attivazione dell'RNAi in particolari condizioni (Lipardi e Paterson, 2009).

3.3 Legame tra RNAi e risposta immunitaria

Il collegamento tra immunità antivirale e RNAi è stato recentemente dimostrato in *D. melanogaster* (Saleh *et al.*, 2009). Nelle cellule di questo insetto modello, l'infezione virale attiva una immunità virus-specifica intracellulare che impedisce la diffusione del virus (che richiede l'RNAi e un percorso assorbimento dsRNA). Ciò dimostra che, negli organismi multicellulari, l'RNAi cellula-indipendente e sistemica è necessaria per attivare la risposta immunitaria innata nelle cellule non infettate (Saleh *et al.*, 2009).

Attualmente la funzione dell'RNAi nella risposta antivirale è stata dimostrata in *Drosophila* (Li *et al.*, 2002; Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; van Rij *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Zambon *et al.*, 2006) e zanzara (Campbell *et al.*, 2008; Cirimotich *et al.*, 2009; Keene *et al.*, 2004; Khoo *et al.*, 2010; Sanchez-Vargas *et al.*, 2009; Adelman *et al.*, 2001; Gaines *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1996; Billecoq *et al.*, 2000). Diversi insetti presentano un sistema RNAi funzionale, presumibilmente coinvolto nella risposta antivirale (Vodovar e Saleh, 2012).

3.3.1 Soppressione dell'RNAi da parte dei virus

I virus hanno sviluppato meccanismi di evasione dell'RNAi passiva, utilizzando siti di replicazione dove le componenti dell'RNAi non possono agire o dove la sintesi dell'RNA virale è fortemente incrementata, e proteggendo il proprio RNA attraverso la formazione del capsido (Miller e Ahlquist, 2002; Miller *et al.*, 2001, 2003) e meccanismi di evasione attiva, attraverso la produzione di specifiche proteine virali denominate VSRs (Li e Ding, 2006). Le VSRs sopprimono l'effetto dell' RNAi nelle piante (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau e Carrington, 1998; Li *et al.*, 1999) e negli insetti (van Rij *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2010), interferendo con il sistema dell'RNAi in diverse fasi e attraverso meccanismi diversi (van Rij *et al.*, 2006; Silhavy *et al.*, 2002; Nayak *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2004), principalmente interferendo con il processamento dei dsRNAs.

3.4 Considerazioni sull'uso dell'RNAi negli insetti

3.4.1 Produzione di dsRNAs

dsRNAs sintetizzati *in vitro*

Nella maggior parte degli studi entomologici di laboratorio, il dsRNA utilizzato è prodotto utilizzando kit di trascrizione *in vitro* commerciali . Il principio generale è il seguente. Il template per la trascrizione *in vitro* è preparato tramite PCR, utilizzando primers gene-specifici con la sequenza promotrice T7 alla terminazione 5'. La reazione viene incubata alcune ore (da 4 a 8) a 37°C con la polimerasi T7, trattata con DNAsi e purificata.

dsRNAs prodotti in batteri

Il dsRNA può essere sintetizzato nei batteri oltre che *in vitro*. Colonie di *Escherichia coli* trasformate per esprimere molecole di dsRNA attive nei confronti di geni di *C. elegans* sono state utilizzate per ottenere la soppressione dell'espressione del gene corrispondente (Timmons e Fire, 1998).

Da allora, l'RNAi mediata da batteri è stato applicato con successo ad altri organismi, tra cui la planaria *Schmidtea mediterranea* (Newmark *et al.*, 2003) e il lepidottero *Spodoptera exigua* (Tian *et al.*, 2009).

Un vantaggio potenziale di questo approccio è che il dsRNA prodotto continuamente nei batteri è più stabile del dsRNA trascritto *in vitro* quando viene addizionato ad una dieta artificiale (Whyard *et al.*, 2009).

Inoltre, l'RNAi mediata da batteri è molto utile nello screening su ampia scala di nuovi geni target.

Grande interesse suscita anche la produzione di molecole di dsRNAs nei batteri simbiotici di insetti. Secondo una stima recente, il 20% degli insetti sono associati in maniera obbligata a microrganismi simbiotici, dei quali utilizzano i prodotti (Feldhaar e Gross, 2009). Questa simbiosi mutualistica obbligata offre l'opportunità di ingegnerizzare il batterio simbiotico per la produzione di molecole di dsRNA che abbiano come bersaglio geni fondamentali per lo sviluppo dell'ospite.

dsRNAs espressi in pianta

Per poter applicare la strategia dell'RNAi al controllo dei fitofagi in campo, la produzione di dsRNA in pianta offre notevoli potenzialità. Le piante possono produrre e accumulare considerevoli quantità di dsRNA, a costi molto bassi, attraverso le più svariate strategie di espressione, sia utilizzando promotori specifici, sia direzionando l'espressione in cloroplasto (McBride *et al.*, 1995). Quest'ultima strategia offre il vantaggio aggiuntivo dato dal fatto che i tratti codificati da cloroplasto sono, nella maggior parte delle piante, prevalentemente a trasmissione materna, e, pertanto, la probabilità che il transgene sia trasmesso a piante non transgeniche è più bassa. Con il raggiungimento di una trasformazione stabile del genoma dei cloroplasti nelle piante verdi (Dufourmantel *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Okumura *et al.*, 2006; Ruf *et al.*, 2001; Sidorov *et al.*, 1999), questa tecnica presenterebbe un enorme potenziale per la protezione delle colture contro i parassiti.

Produzione di dsRNAs attraverso il sistema VIGS

L'introduzione di geni virali nelle piante può condurre all'ottenimento di piante transgeniche resistenti al virus anche senza la produzione di proteine transgeniche (Lindbo e Dougherty, 1992). Il fattore alla base di questa resistenza ai virus è la degradazione sequenza-specifica dell'RNA (Waterhouse *et al.*, 1998). Sulla base di questo principio, i ricercatori hanno sfruttato il silenziamento genico indotto da virus (VIGS), basato sul meccanismo del sistema di difesa antivirale delle piante, come un potente strumento di genetica inversa nei vegetali. Vettori contenenti la sequenza del genoma di un virus combinato con geni dell'ospite sono state inoculate in pianta, inducendo la perdita di funzione dei geni corrispondenti attraverso la produzione di dsRNA (Purkayastha e Dasgupta, 2009). Può essere possibile imitare l'attività VIGS in pianta sostituendo i geni dell'ospite con i geni dei parassiti.

3.4.2 Meccanismi di somministrazione del dsRNA negli insetti

Il meccanismo di diffusione del dsRNA negli insetti e la scelta della modalità di somministrazione influenzano fortemente l'efficienza del silenziamento genico e le sue potenzialità come agente di controllo dei fitofagi (Terenius *et al.*, 2011)

Gli insetti possono assumere autonomamente il dsRNA diretto verso uno specifico gene target attraverso l'alimentazione; perché il silenziamento abbia luogo, il dsRNA deve essere assorbito dalle cellule del mesentero (RNAi ambientale), mentre, se il gene target è espresso in un tessuto diverso dall'intestino, il segnale di silenziamento deve diffondersi al tessuto bersaglio (RNAi sistemico) (Huvenne e Smagghe, 2010). Il mesentero è potenzialmente la struttura migliore per l'assorbimento del dsRNA, in quanto dotato di microvilli ricchi di canali ed apparati coinvolti in fenomeni di assorbimento ed endocitosi (Lehane e Billingsley, 1996; Hakim *et al.*, 2010).

Tuttavia, per quanto concerne la ricerca di base in campo entomologico, esistono diverse tecniche per somministrare il dsRNA agli insetti. Tra i possibili metodi di somministrazione abbiamo l'iniezione, l'immersione, le

infezioni virali e l'alimentazione, anche attraverso piante transgeniche (Guang *et al.*, 2011).

Microiniezioni

Con il termine “microiniezione” si vuole indicare l'iniezione diretta del dsRNA nella cavità emocelica dell'insetto. Tale tipo di somministrazione è il più efficiente per l'RNAi di tipo sistemico. Con questo sistema, il successo maggiore nel silenziamento genico è stato ottenuto con l'utilizzo di molecole di dsRNA corte (Siomi e Siomi, 2009). Iniezioni di dsRNA sono state condotte con successo in *D. melanogaster* (Kennerdell e Carthew, 2000) e in *T. castaneum* (Brown *et al.*, 1999; Tomoyasu e Denell, 2004; Tomoyasu *et al.*, 2008, Bucher *et al.*, 2002), nonché in studi di analisi comparativa della funzione di geni ortologi in embrioni di insetti evolutivamente distanti (Brown *et al.*, 1999, Hughes e Kaufman, 2000). Uno studio effettuato su *Plodia interpunctella* riporta la possibilità di iniettare il dsRNA anche nelle uova (Fabrick *et al.*, 2004).

Attualmente, la somministrazione del dsRNA attraverso microiniezione è un potente mezzo per lo studio della funzione genica in diverse specie d'insetti (Aljamali *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 1997; Isoe *et al.*, 2009; Jaubert-Possamai *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010a, b; Maleszka *et al.*, 2007; Narasimhan *et al.*, 2004; Vallier *et al.*, 2009). Il vantaggio dell'iniezione del dsRNA è l'elevata efficienza di inibizione dell'espressione genica. Il metodo presenta, tuttavia, alcune limitazioni, quali i costi relativamente elevati della sintesi *in vitro* e dello stoccaggio del dsRNA ed il fatto che l'iniezione, in sé, genera un inevitabile effetto sugli insetti di stimolazione del sistema immunitario. In ogni caso, a livello pratico, il metodo non è applicabile al controllo degli insetti.

Immersione

La tecnica dell'immersione in soluzioni contenenti dsRNA si è rivelata efficace nell'inibire l'espressione genica in embrioni e cellule di *D. melanogaster* (Eaton *et al.*, 2002; March and Bentley, 2007). L'efficienza del metodo è paragonabile a quella ottenuta con la microiniezione, ma richiede una concentrazione inferiore di dsRNA. L'immersione è però

utilizzabile solo per alcune cellule ed alcuni tessuti di insetti, ed esclusivamente in stadi di sviluppo che possono assorbire il dsRNA da una soluzione.

Alimentazione

Comparato con altri metodi di somministrazione del dsRNA, questo risulta sicuramente il più interessante, in quanto non solo costituisce il metodo più naturale per somministrare il dsRNA all'insetto, ma permette di farlo senza causare danni. Il metodo risulta anche conveniente e di facile manipolazione (Chen *et al.*, 2010) e permette di applicare l'RNAi ad un ampio numero di individui, nonché a insetti di ridotte dimensioni, per i quali è difficile utilizzare il metodo della microiniezione. Anche se il metodo non risulta applicabile per quegli insetti che hanno abitudini alimentari specifiche, esso è in generale applicabile a diverse specie di insetti (Huvenne e Smaghe, 2010).

I primi studi effettuati aggiungendo il dsRNA su dieta artificiale sono stati scoraggianti; ad esempio in *Spodoptera litura* l'iniezione di dsRNA silenziava il gene *slapn*, che codificava per un aminopeptidasi intestinale, ma alimentando le larve con dsRNA non si otteneva RNAi (Rajagopal *et al.*, 2002). Fortunatamente, altri studi mostrano che la somministrazione del dsRNA attraverso l'alimentazione si può utilizzare con successo per studiare l'RNAi negli insetti. Il metodo si è dimostrato efficace in larve di *Epiphyas postvittana* (Turner *et al.*, 2006), *Rhodnius prolixus* (Araujo *et al.*, 2006), nel coleottero *Phyllotreta striolata*, nella termite *Reticulitermes flavine* (Zhou *et al.*, 2008) e nel lepidottero *Plutella xylostella* (Bautista *et al.*, 2009). In letteratura non vi sono dati relativi alla somministrazione di dsRNAs con l'alimentazione in *T. castaneum*, probabilmente a causa del successo degli esperimenti di iniezione. Interessante è la presenza di cinque esperimenti di successo con diverse specie di lepidotteri, in quanto si presume che sia molto difficile effettuare l'RNAi in questo ordine (Terenius *et al.*, 2011). Per contro, in alcuni esperimenti di alimentazione si riesce ad ottenere l'RNAi ambientale ma non RNAi sistemico (Walshe *et al.*, 2009) e in altri esperimenti con l'iniezione del dsRNA si è riuscito ad ottenere il silenziamento del gene target che non si era riuscito a silenziare con

esperimenti di alimentazione (Rajagopal *et al.*, 2002). Quanto detto dimostra che il mancato silenziamento osservato somministrando il dsRNA attraverso l'alimentazione è dovuto a fattori dipendenti dal meccanismo di assorbimento di diversi tipi di cellule, ma non all'insensibilità del bersaglio. Una modifica dei protocolli di alimentazione normalmente utilizzati consiste nell'ottenimento di molecole di dsRNAs incapsulate nei lipidi. È stato dimostrato che la coniugazione con molecole lipofile (colesterolo, acidi biliari e acidi grassi a catena lunga) aumenta l'assorbimento dei siRNAs nelle cellule, migliorando il silenziamento genico nei topi (Wolfrum *et al.*, 2007). L'efficienza e l'assorbimento selettivo di questi lipidi associati ai siRNAs dipende dall'interazione tra le particelle di lipoproteine, i recettori di lipoproteine e le proteine transmembrana. Whyard e colleghi (2009) hanno dimostrato che molecole di dsRNA integrate in liposomi innescano in larve di *D. melanogaster* una risposta RNAi più efficiente.

Un'altra strategia per aumentare l'efficienza dell'assorbimento del dsRNA potrebbe essere la sua co-espressione con proteine "effettrici" come proteasi e chitinasi che potrebbero favorirne il passaggio dal mesentero all'emolinfa (Pennacchio *et al.*, 2012).

Un approccio differente potrebbe essere quello di legare il dsRNA a molecole che riescono a attraversare la matrice peritrofica (MP) con maggiore facilità, e che fungerebbero così da trasportatori, come le lectine vegetali (Fitches *et al.*, 2001; Ohizumi *et al.*, 2009).

I dsRNAs incorporati nelle diete artificiali sono stati principalmente sintetizzati *in vitro*. Un'alternativa potrebbe essere produrre dsRNA derivati da geni di insetti in un organismo ingegnerizzato, usando la strategia dell'RNAi mediata da batteri esprimenti il dsRNA ed addizionati alla dieta artificiale (Timmons *et al.*, 2001, Timmons e Fire, 1998; Newmark *et al.*, 2003, Tian *et al.*, 2009).

Il problema principale del metodo di somministrazione descritto è il bisogno di grandi quantità di dsRNA perchè il silenziamento non risulti incompleto (Chen *et al.*, 2010). Inoltre, bisogna considerare che differenti specie di insetti presentano una sensibilità differente alle molecole di dsRNA somministrate oralmente (Walshe *et al.*, 2009). Un altro svantaggio del

metodo è la difficoltà di misurare o controllare precisamente la quantità di dsRNA ingerito o comunque assorbito nel mesentero.

Un altro metodo di somministrare dsRNA attraverso l'alimentazione è l'uso di piante transgeniche che producono dsRNA. Queste ultime presentano il grande vantaggio di generare in maniera continua e stabile il dsRNA. Recentemente sono stati effettuati studi in cui sono state create piante transgeniche in grado di produrre dsRNA diretto contro specifici geni di insetti. Queste piante hanno mostrato un incremento della resistenza a fitofagi economicamente importanti come il lepidottero *Helicoverpa armigera* (Mao *et al.*, 2007) ed il coleottero *Diabrotica virgifera virgifera* (Baum *et al.*, 2007). Perché tale strategia possa avere successo è necessaria l'identificazione di specifici target (effettuare lo screening preventivo di librerie di cDNA e individuando geni fondamentali per lo sviluppo e la sopravvivenza dell'insetto) e la somministrazione di adeguate quantità di dsRNA. Inoltre, è importante considerare la specificità dell'RNAi quando si vuole utilizzare tale strategia in applicazioni pratiche, anche per minimizzare l'effetto insetticida sugli insetti non-bersaglio.

Sviluppo di insetti transgenici

Il vantaggio di utilizzare insetti transgenici che esprimono il dsRNA è l'ottenimento di un'espressione ereditabile, stabile e continua. La tecnica è stata proposta per aiutare sia a ridurre la popolazione attraverso l'introduzione di insetti sterili, sia per sostituire una popolazione. I test sono stati condotti su diverse specie con risultati promettenti ma, come affermato da Scolari e colleghi (2011), vi è la necessità di comprendere le influenze ambientali e genetiche quando si valuta il potenziale uso di tali organismi transgenici.

Il metodo transgenico è utilizzato per studi funzionali in *D. melanogaster* (Wakiyama *et al.*, 2005; Sandrelli *et al.*, 2007), *Aedes aegypti* (Travanty *et al.*, 2004) ed in *B. mori* (Sandrelli *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008; Kanginakudru *et al.*, 2007).

RNAi mediata da virus

L'RNAi mediato da virus è ottenuto attraverso l'infezione dell'ospite con virus che trasportano dsRNA, formati durante la replicazione virale, rivolti verso un gene di interesse nell'insetto ospite. La tecnica è stata utilizzata in *B. mori* (Uhlirova *et al.*, 2003).

Gli studi condotti utilizzando l'RNAi mediata da virus sono ancora rari, nonostante le ottime potenzialità del metodo che sfrutta l'infezione e la capacità del virus di diffondersi rapidamente nell'ospite.

3.5 Fattori che influenzano l'RNAi negli insetti

Basandosi sulla letteratura esistente, Huevenne e Smagghe (2010) hanno definito cinque fattori importanti che influenzano in maniera determinante l'effetto di silenziamento e di conseguenza l'efficienza dell'RNAi come tecnica per il controllo degli insetti fitofagi:

- La concentrazione del dsRNA: per ogni gene target e per ogni organismo occorre determinare una concentrazione ottimale per ottenere l'effetto di silenziamento. Il superamento di questa concentrazione ottimale non necessariamente fa ottenere un silenziamento maggiore (Meyering-Vos e Muller, 2007; Shakesby *et al.*, 2009).
- La sequenza nucleotidica utilizzata, che potrebbe determinare possibili effetti off-target nell'organismo bersaglio, ma anche effetti di silenziamento in altri insetti.
- La lunghezza del frammento di dsRNA: è un fattore determinante per l'assorbimento e l'efficienza del silenziamento (Mao *et al.*, 2007; Saleh *et al.*, 2006).
- Persistenza dell'effetto di silenziamento: l'effetto del silenziamento potrebbe essere transitorio (Shakesby *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2006) in funzione del tasso di turnover della proteina bersaglio.
- Stadio dell'organismo bersaglio: anche se gli stadi più avanzati sono più semplici da manipolare per la somministrazione del dsRNA, gli stadi più giovani spesso mostrano maggiore sensibilità all'RNAi (Araujo *et al.*, 2006; Griebler *et al.*, 2008).

4 Prospettive future per il controllo dei fitofagi basato sull'RNAi

4.1 Controllo dei fitofagi mediato da RNAi

È stato dimostrato che l'RNAi si può usare con successo nella protezione delle piante dagli insetti dannosi (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007). Questo approccio permette di sfruttare una vasta gamma di potenziali bersagli per la soppressione dell'espressione genica negli insetti e potrebbe offrire un'alternativa all'uso di piante transgeniche esprimenti la tossina del *Bacillus thuringiensis*

L'RNAi potrebbe anche essere utilizzato per integrare le strategie di controllo già esistenti. Per esempio, potrebbe essere utilizzato per ridurre il rischio di insorgenza di resistenza alla tossina Bt, sia interferendo con l'espressione di geni coinvolti in tali risposte, sia attraverso il piramidaggio di costrutti in grado di colpire più bersagli molecolari (Xue-Yi Xue *et al.*, 2012). Ottenere piante in grado di esprimere una combinazione di dsRNAs altamente efficaci contro gli insetti bersaglio offre ampie potenzialità applicative che devono essere, però, attentamente valutate anche dal punto di vista del rischio. Uno dei problemi posti dalle tecnologie basate sull'RNAi è l'effetto indesiderato che un dsRNA può avere su geni "off-target" che condividono parti di sequenza con il gene bersaglio. Effetti off-target possono verificarsi sia per diversi geni all'interno delle specie o tra specie diverse. Tuttavia, l'attenta scelta di sequenze geniche poco conservate limita notevolmente questa possibilità. Alcuni ricercatori, per limitare tale rischio, suggeriscono di scegliere, per la progettazione del dsRNA da somministrare, le sequenze geniche meno conservate, come ad esempio la regione 3'UTR (Whyard *et al.*, 2009). In tale ottica, l'uso dei geni housekeeping, benché possano fornire risultati molto efficaci, deve essere limitato o realizzato con particolare attenzione a questi aspetti. La crescente disponibilità di dati sui genomi di numerose specie di insetti rende questo compito di scelta delle sequenze bersaglio molto più affidabile.

In definitiva, l'aspetto più delicato per l'applicazione dell'RNAi al controllo degli insetti è quello di un'oculata scelta dei geni bersaglio, in quanto da questo dipende il successo della tecnica e la sua sicurezza.

4.2 Individuazione di geni target per l'RNAi

Il silenziamento o la sovraespressione di geni fondamentali per lo sviluppo e la fisiologia dell'insetto (come crescita, metamorfosi, digestione, detossificazione e così via) può produrre alterazioni, spesso esiziali. I geni coinvolti in queste funzioni di base, alcuni dei quali con funzioni "housekeeping", offrono potenzialità applicative molto efficaci, come dimostrato da esperimenti condotti in *D. virgifera virgifera*, in cui la soppressione di geni codificanti per l'actina, α/β -tubulina, ATP sintasi, una proteina ribosomale e per l'ADP/ATP traslocasi ha comportato l'arresto della crescita e/o la morte delle larve (Baum *et al.*, 2007). Non tutti i geni bersaglio selezionati in questo studio sono stati sottoespressi in seguito alla somministrazione di dsRNAs; infatti, solo 125 delle 290 specie di dsRNA saggiate hanno causato una mortalità larvale e/o l'arresto della crescita (Baum *et al.*, 2007). Questi dati suggeriscono che, anche all'interno di una specie, la risposta RNAi è diversa tra i singoli geni (Xue-Yi *et al.*, 2012).

Un'altra classe di potenziali geni bersaglio comprende quei geni correlati allo sviluppo degli insetti. Il silenziamento del gene *Bursicon* in *B. mori* provoca l'inibizione dell'espansione delle ali (Huang *et al.*, 2007), e l'interferenza di altri geni correlati allo sviluppo del baco da seta è risultato letale (Dai *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010a; Xiang *et al.*, 2011). In *T. castaneum*, la sottoespressione mediata da RNAi di geni implicati nell'attività degli ormoni ha determinato gravi alterazioni di sviluppo (Arakane *et al.*, 2008, Tan e Palli, 2008).

Anche i geni correlati con la detossificazione o la difesa sono ottimi bersagli per il controllo dei fitofagi mediato da RNAi, poiché il metabolismo indotto dei composti xenochimici è una caratteristica comune a molte interazioni insetto-pianta (Berge *et al.*, 1998; Scott e Wen, 2001; Luo *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2004; Stipanovic *et al.*, 2006; Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001; Wittstock *et al.*, 2004, Scott *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004;

Mao *et al.*, 2007). Rispetto ai geni housekeeping, questi geni presentano una maggiore selettività e riducono la possibilità di effetti off-target, offrendo un chiaro esempio di come lo studio di interazioni antagonistiche che vedono coinvolti gli insetti può fornire utili informazioni su come colpire obiettivi molecolari particolarmente sensibili.

Nei paragrafi seguenti verranno discusse più approfonditamente queste simbiosi antagonistiche, con particolare riguardo per l'interazione insetto-insetto. Lo studio delle strategie molecolari adottate dagli antagonisti degli insetti per alterare funzioni vitali dei loro ospiti e/o per sopprimerli, mette a disposizione geni e molecole per lo sviluppo di nuove strategie di controllo. Ciò non solo attraverso l'uso diretto dei fattori di virulenza utilizzati per attaccare gli insetti ospiti, ma anche attraverso strategie capaci di alterare in modo preciso i bersagli molecolari di tali fattori di virulenza. La possibilità di utilizzare l'RNAi al fine di bloccare l'espressione di geni di vitale importanza per gli insetti apre nuove prospettive d'intervento molto promettenti.

5 Interazione insetto/altri organismi viventi

Gli insetti costituiscono il più ampio gruppo di organismi viventi ed hanno colonizzato la maggior parte delle nicchie ecologiche. Il loro successo è dovuto ad un lungo processo di radiazione adattativa che ha generato una straordinaria varietà di meccanismi che hanno permesso a questi artropodi di sfruttare substrati nutritivi differenti e di superare condizioni ambientali estreme, grazie, talora, all'ausilio di peculiari associazioni simbiotiche in grado di completare quadri nutrizionali fortemente carenti.

Molti insetti, inoltre, sono aggressori inesorabili di altri organismi viventi e, allo stesso tempo, bersaglio di una folta schiera di nemici naturali e di patogeni. Per colonizzare e sfruttare fonti alimentari costituite da organismi viventi, gli insetti hanno dovuto fronteggiare le svariate strategie difensive che i propri ospiti hanno sviluppato come risultato di un continuo confronto con i propri antagonisti in un processo di coevoluzione. L'esempio più illuminante, a riguardo, è offerto dagli insetti fitofagi, che hanno dovuto far

fronte all'enorme diversità di sistemi di difesa sviluppati dalle piante (Walling, 2000).

Da parte loro, gli insetti si proteggono dall'attacco di numerosi organismi patogeni e parassiti, microrganismi e virus, anche se, paradossalmente, la maggior parte dei loro nemici naturali si ritrova proprio fra gli insetti stessi (Godfray, 1994).

L'associazione antagonista tra gli insetti e le altre specie di artropodi è una delle più interessanti dal punto di vista applicativo: tossine prodotte da predatori, quali scorpioni e ragni, sono state già usate in alcune applicazioni biotecnologiche per il controllo degli insetti dannosi (Tremblay, 2003). Di particolare interesse è da considerarsi l'interazione insetto/insetto, in quanto molti insetti sono nemici naturali di altri insetti. Tali relazioni antagonistiche mostrano diversi tipi di associazioni, con vari livelli di specializzazione. Dalla relazione trofica, relativamente semplice, che intercorre fra gli insetti predatori e le proprie vittime, si passa alle complesse interazioni fisiologiche e biologiche esistenti fra i parassiti protelici, comunemente definiti parassitoidi, ed i loro ospiti. I predatori, in genere molto mobili durante tutti gli stadi di sviluppo, si alimentano di più individui della specie vittima. I parassitoidi, invece, vivono a carico dell'ospite solo negli stadi giovanili, e, in genere, portano a morte la loro unica vittima, che possono rapidamente sopprimere al momento della parassitizzazione o lasciarla in vita per coesistere ed interagire per un periodo più o meno lungo. In tale caso, essi mostrano un notevole livello di integrazione con i loro ospiti (non dissimile da quello mostrato dai parassiti in senso stretto, che svolgono diverse generazioni a carico dell'ospite senza portarlo a morte), di cui regolano finemente fisiologia, sviluppo e riproduzione, al fine di realizzare condizioni nutrizionali ed ambientali idonee allo sviluppo della propria progenie. La diversità di interazioni antagonistiche insetto/insetto evolute nel processo adattativo degli insetti parassitoidi ha raggiunto livelli incredibilmente elevati (Vinson, 1975; Vinson e Iwantsch, 1980; Godfray, 1994; Quicke, 1997; Pennacchio e Strand, 2006). Lo studio dei meccanismi fisiologici e molecolari alla base di tali associazioni antagonistiche ha evidenziato che l'interazione ospite-parassitoide rappresenta un'interessante opportunità per isolare geni e molecole con potenziale attività insetticida, utilizzabili per lo

sviluppo di tecnologie innovative nel controllo degli insetti dannosi (Pennacchio *et al.*, 2003; Pennacchio *et al.*, 2012). Per comprendere a fondo l'entità di quanto affermato, nei paragrafi che seguono, verrà presentata più nel dettaglio la complessa interazione ospite-parassitoide, con particolare riguardo a quei parassitoidi in grado di regolare finemente lo sviluppo e la fisiologia del proprio ospite.

5.1 I parassitoidi

I **parassitoidi** sono insetti entomofagi che traggono dalle proprie vittime vantaggio (nutrimento, protezione) arrecando loro danno biologico. Essi presentano nel complesso le stesse prerogative del parassita, infatti, durante gli stadi giovanili hanno rapporti con un solo ospite, sono privi di vita autonoma e dipendono dall'ospite al quale sono più o meno intimamente legati. Tuttavia l'adulto può parassitizzare più individui della stessa specie o, in alcuni casi, di specie differenti. D'altro canto, al pari dei predatori, hanno un ciclo vitale più breve di quello dell'ospite, che si conclude con la morte dello stesso quando la larva del parassitoide ha completato il suo sviluppo larvale (Poiriè *et al.*, 2009).

Sebbene questa tipologia di strategia adattativa sia stata osservata per numerosi organismi (nematodi, ciliati, batteriofagi, ecc.) (Gomez-Gutiérrez *et al.*, 2003; Forde *et al.*, 2004), essa è particolarmente comune negli insetti olometaboli (Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera e Strepsiptera) (Eggleton e Bradshaw, 1992; Godfray, 1994), in particolare nell'ordine Hymenoptera, al quale appartiene più dell'80% del totale delle specie con tale habitus alimentare e modalità di sviluppo (Quicke, 1997). In funzione delle interazioni che i parassitoidi instaurano con i propri ospiti, sono stati individuati diversi gradi di parassitismo (primario, secondario, terziario e quaternario), che definiscono l'esistenza di un rapporto parassitario tra più parassitoidi che simultaneamente possono risiedere nello stesso ospite. In funzione del numero di specie ospiti che il parassitoide ha a disposizione per portare a compimento il proprio ciclo vitale e della permissività delle specie ospiti (host range), si distinguono specie monofaghe, oligofaghe o polifaghe.

I parassitoidi possono essere classificati in relazione a numerosi parametri: ad esempio, in base allo stadio dell'ospite attaccato e in corrispondenza del quale si completa lo sviluppo del parassitoide (oofagi, ovo-larvali, larvali, larva-pupali, pupali o immaginali), in base al numero di uova deposto dalla femmina nell'ospite (solitari o gregari) o in funzione della modalità nutrizionale. Riguardo quest'ultimo parametro, e indipendentemente dalle modalità di ovideposizione, i parassitoidi vengono distinti in ectoparassitoidi, che si nutrono dall'esterno del corpo dell'ospite, ed endoparassitoidi, che si nutrono del corpo dell'ospite dall'interno (Godfray, 1994).

Inoltre, i parassitoidi hanno sviluppato differenti strategie di regolazione della fisiologia dell'ospite e sono classificati in Idiobionti e Coinobionti (Askew e Shaw, 1986). I parassitoidi **idiobionti** (oofagi, pupali e ectoparassitoidi larvali) bloccano lo sviluppo del proprio ospite al momento della parassitizzazione, paralizzandolo e/o uccidendolo, quindi il substrato nutrizionale disponibile corrisponde all'ospite nel momento in cui il suo sviluppo è bloccato dall'iniezione di specifiche secrezioni della femmina del parassitoide (veleno o peptidi tossici), in grado di preservare i tessuti e/o di favorirne la digestione. Spesso si tratta di ectoparassitoidi con un ampio host-range che mostrano stadi larvali estremamente voraci e di breve durata. La fase da adulto è caratterizzata dalla produzione di poche uova di dimensioni relativamente grandi. L'ovideposizione in genere avviene nello stadio vitale dell'ospite in grado di fornire una completa e soddisfacente alimentazione alla larva del parassitoide (ultimi stadi larvali e pupe). Sono relativamente pochi sono i casi di endoparassitoidi che attaccano stadi sessili dell'ospite come uova o pupe (es. *Pimpla hypocondriaca*) (Dani *et al.*, 2004).

I parassitoidi **coinobionti** (ecto- od endoparassitoidi larvali ed endoparassitoidi di ospiti adulti) sono caratterizzati da stadi larvali più lunghi, se paragonati a quelli degli idiobionti, che si susseguono all'interno del corpo dell'ospite. Gli adulti hanno vita breve e producono molte uova di piccole dimensioni e spesso prive di vitello. L'host range è, in genere, più limitato, data l'elevata specializzazione che presentano.

Sebbene l'ovideposizione sia stadio-specifica, i coinobionti possono attaccare vari stadi dello sviluppo pre-immaginale dell'ospite. Alcuni coinobionti endoparassitoidi adattano il proprio sviluppo alla fisiologia dell'ospite ("conformers"), mentre un più ampio gruppo è in grado di modificare la fisiologia dell'ospite a proprio vantaggio, attraverso complessi meccanismi realizzati mediante una serie di fattori di regolazione parassitaria sia di origine materna che embrionale ("regulators"). Questi ultimi parassitizzano spesso stadi precoci che, come tali, non sono sufficienti a supportare il completo sviluppo della propria progenie, pertanto, non uccidono immediatamente l'ospite ma ne regolano la fisiologia, lo sviluppo e la morfologia, consentendogli di continuare il suo sviluppo e ridirezionandone il metabolismo a proprio vantaggio, fino al completo successo della parassitizzazione. La larva ospite è mantenuta in vita fino al termine dello sviluppo larvale del parassitoide, arrivando alla morte solo a conclusione di quest'ultimo (Godfray, 1994; Quicke, 1997). Questi parassitoidi, pertanto, instaurano con il proprio ospite uno stretto rapporto anatomico-fisiologico, presentando, in generale, un notevole grado di semplificazione morfologica associato ad un elevato grado di specializzazione (Pennacchio e Strand, 2006).

Questa specializzazione si tramuta nell'associazione stretta del parassitoide ad una determinata specie o ad un gruppo sistematico più ampio ma sostanzialmente omogeneo al suo interno. Nell'endofagia, pertanto, possono evolvere meccanismi fisiologici complessi che permettono al parassitoide di eludere le difese immunitarie dell'ospite e di realizzare una sua fine regolazione del metabolismo, della riproduzione e dello sviluppo, in un processo complesso che viene definito "host regulation" (Vinson e Iwantsch, 1980).

5.2 Regolazione dell'ospite

I parassitoidi endofagi, in particolare i coinobionti "regulators", mostrano sofisticati adattamenti fisiologici, finalizzati a potenziare le possibilità di sviluppo della propria progenie all'interno del corpo dell'ospite. Tali adattamenti mirano ad evadere passivamente o sopprimere attivamente il

sistema immunitario dell'ospite e ad alterarne lo sviluppo, la fisiologia e la morfologia, a vantaggio del parassitoide stesso (Pennacchio e Strand, 2006). Infatti, perché la parassitizzazione possa concludersi con successo in un ambiente ostile quale può essere l'emocele dell'insetto ospite, il parassitoide deve eludere la risposta immune che l'ospite mette in atto contro l'uovo e gli stadi larvali del parassitoide (Schmidt *et al.*, 2001; Lavine e Strand, 2002). Allo stesso tempo, il ridirezionamento del metabolismo e l'adattamento dello sviluppo dell'ospite, messi in atto dal parassitoide, rappresentano un altro aspetto di cruciale importanza per rendere la larva ospite un ambiente ideale per il sostentamento della propria progenie, attraverso un incremento delle disponibilità dei fattori nutrizionali (Vinson e Iwantsch, 1980). L'host regulation è ottenuta grazie a fattori parassitari di regolazione, costituiti da secrezioni di origine materna (rilasciate nell'emocele dalla femmina adulta del parassitoide al momento dell'ovideposizione) e/o di origine embrionale (Quicke, 1997) (Fig. 3).

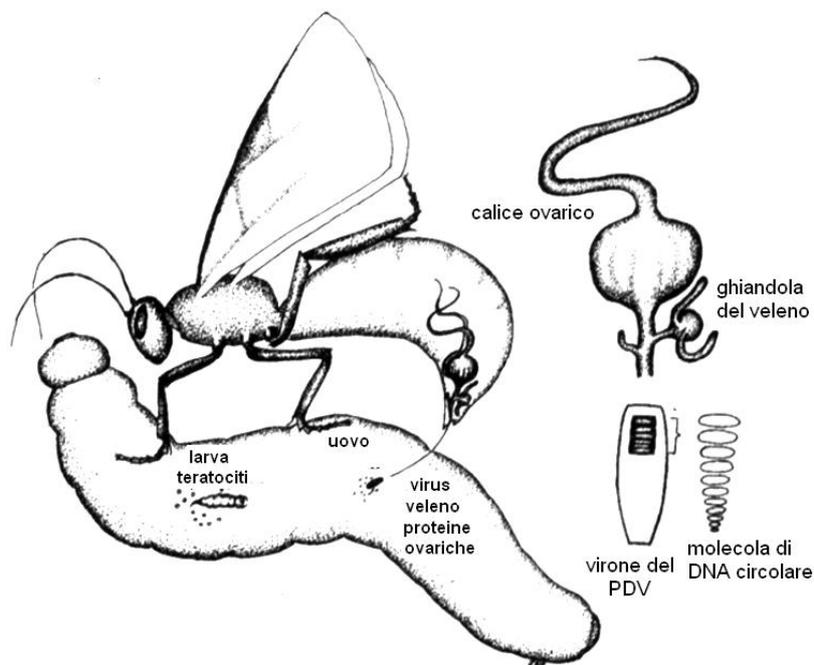


Figura 3: Schematizzazione grafica dei fattori di regolazione parassitari di origine materna ed embrionale che entrano in gioco nell'interazione ospite/parassitoide.

5.2.1 I fattori di regolazione di origine materna

I fattori di regolazione parassitari di origine materna possono includere: i polydnavirus (PDV), le proteine ovariche e il veleno (Webb *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2007; Pennacchio e Strand, 2006).

I polydnavirus (PDVs) sono virus endosimbionti appartenenti alla famiglia Polydnviridae e caratterizzati da un genoma multipartito costituito da molecole circolari e chiuse di DNA a doppia elica di diverse dimensioni (Krell, 1991; Fleming, 1992; Fleming e Krell, 1993; Stoltz, 1993). I PDV vivono in associazione simbiotica obbligata con alcuni parassitoidi di lepidotteri appartenenti alle famiglie Braconidae ed Ichneumonidae (Stoltz, 1993) e sono suddivisi in due generi indicati rispettivamente come bracovirus (BV) ed ichnovirus (IV) (Stoltz *et al.*, 1995).

IV e BV sono morfologicamente e geneticamente dissimili, e ciò indica che essi non sono evolutivamente correlati (Krell, 1991), tuttavia, sia il ciclo vitale, sia l'organizzazione del genoma dei due PDV, mostrano varie similitudini, suggerendo che una pressione selettiva comune subita da icneumonidi e braconidi abbia portato ad un'evoluzione convergente dei due generi (Stoltz *et al.*, 1995; Whitfield, 1997, 2002; Webb, 1998; Turnbull e Webb, 2002; Whitfield e Asgari, 2003; Webb e Strand, 2005). In particolare, l'analisi della sequenza genomica di BV ed IV ha evidenziato similitudini strutturali con gli eucarioti: bassa densità codificante e geni interrotti da introni (Espagne *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2006). Inoltre, l'analisi dell'omologia di sequenza e l'analisi funzionale dei geni dei PDV espressi nei tessuti dell'ospite indicano che, spesso, i prodotti codificati sono simili alle proteine cellulari, con le quali essi competono/interferiscono per distruggere "pathway" conservati (Espagne *et al.*, 2002; Provost *et al.*, 2004; Thoetkiattikul *et al.*, 2005; Pruijssers e Strand, 2007; Falabella *et al.*, 2007b). Attualmente non è noto se l'ampia regione non codificante nel genoma dei PDV abbia qualche ruolo funzionale, come riportato per molti organismi e virus (Storz, 2002; Matzke e Birchler, 2005; Washietl *et al.*, 2005; Zaratiegui *et al.*, 2007; Nair e Zavolan, 2006).

Il ciclo vitale dei PDV (Fig. 4) non è convenzionale se comparato con il ciclo vitale tipico di un virus. Sebbene, infatti, i PDV mostrino tutti gli stadi

che caratterizzano il normale ciclo virale (infezione, replicazione, trasmissione ad un nuovo ospite), questi stadi sono distribuiti tra il parassitoide ed il suo ospite parassitizzato. I PDV sono integrati come provirus all'interno del genoma del parassitoide e sono trasmessi verticalmente alla progenie attraverso la linea germinale; la loro replicazione avviene solamente in alcune cellule specializzate del calice ovarico della femmina del parassitoide ed è asintomatica. I virioni, accumulati all'interno del calice ovarico, vengono iniettati nell'emocele dell'ospite insieme con l'uovo, le proteine del calice ovarico ed il veleno. Le particelle virali entrano nelle cellule dell'ospite ed infettano diversi tessuti, dove danno inizio all'espressione dei propri geni virali (Theilmann e Summers, 1986; Varricchio *et al.*, 1999; Drezen *et al.*, 2003; Kroemer e Webb, 2004).

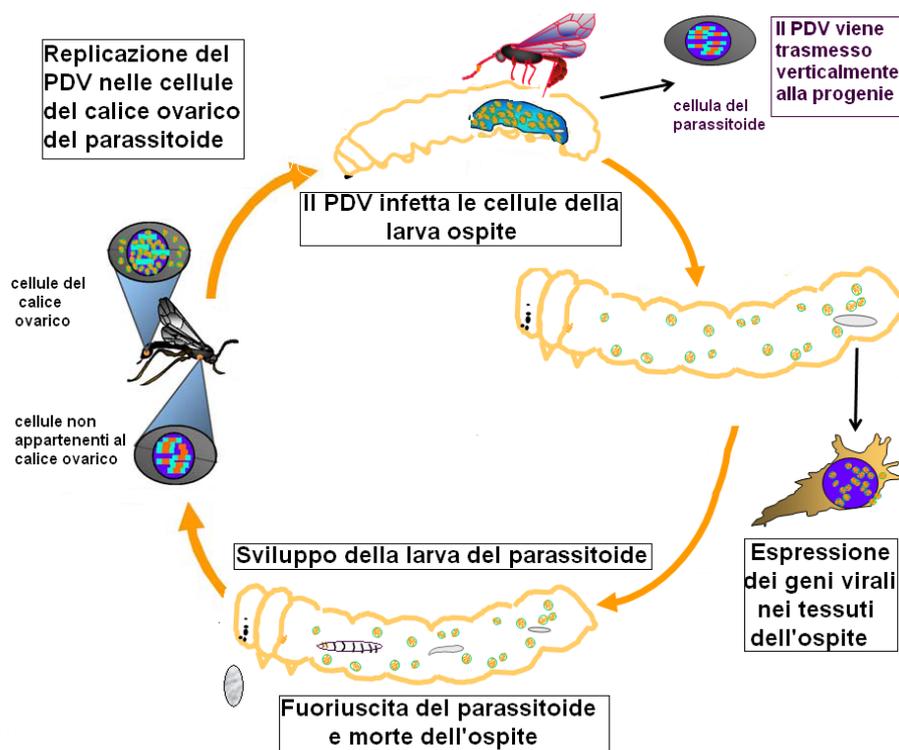


Figura 4: Ciclo vitale generico di un endoparassitoide e del suo polydnavirus.

I trascritti virali raggiungono livelli quantificabili poche ore dopo la parassitizzazione e sono presenti a differenti livelli durante lo sviluppo del parassitoide nella larva ospite (Fleming e Krell, 1993). L'infezione dei tessuti dell'ospite e l'espressione dei geni virali induce soppressione del

sistema immunitario dell'ospite e alterazione del suo equilibrio endocrino. Queste alterazioni della fisiologia e dello sviluppo dell'ospite sono di fondamentale importanza per la sopravvivenza della progenie del parassitoide, che, in loro assenza, potrebbe essere soppressa dal sistema immunitario e potrebbe non trovare le condizioni biochimiche favorevoli per la propria crescita ed il proprio sviluppo (Lawrence e Lanzrein, 1993; Stoltz, 1993; Lavine e Beckage, 1995; Strand e Pech, 1995; Webb, 1998, Rodriguez *et al.*, 2006; Pennacchio e Strand, 2006; Dupuy *et al.*, 2006).

Tra i fattori di regolazione parassitaria, i PDV sono quelli meglio conosciuti dal punto di vista genomico e funzionale. Infatti, sono stati già sequenziati i genomi di diversi PDV (Espagne *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2006; Drezen *et al.*, 2012) e sempre più numerosi sono gli studi di genomica funzionale finalizzati a chiarire i meccanismi di azione dei singoli fattori di virulenza (Webb e Strand, 2005; Pennacchio e Strand, 2006; Strand, 2012) e gli effetti che essi hanno complessivamente sull'ospite, modulandone l'espressione genica (Barat-Houari *et al.*, 2006) attraverso la produzione continuata e modulata nel tempo di fattori parassitari in grado di regolare la fisiologia dell'ospite. Ciò consente di prolungare l'azione di controllo del substrato nutrizionale vivente da parte del parassitoide, cosa non facilmente realizzabile con secreti materni contenenti solo proteine e peptidi bioattivi.

Il veleno è un secreto di origine materna, prodotto da ghiandole annesse al sistema riproduttore della femmina del parassitoide dette “ghiandole del veleno” (Fig. 5). Tale secreto risulta particolarmente ricco in proteine e peptidi, che costituiscono le componenti attive dei veleni di molti parassitoidi.

Negli ectoparassitoidi il ruolo del veleno è ben noto, in quanto, in genere, induce paralisi permanente, arresto dello sviluppo dell'ospite, regolazione del metabolismo e inibizione della risposta immunitaria (Nakamatsu e Tanaka, 2003). Le informazioni circa il ruolo del veleno nel caso degli imenotteri endoparassitoidi sono relative a studi piuttosto recenti: in diversi sistemi ospite-parassitoide il veleno (spesso associato alle proteine secrete dalle cellule del calice ovarico) sembrerebbe essenziale per il successo della parassitizzazione, specialmente per garantire la soppressione del sistema

immunitario immediatamente dopo l'ovideposizione, in alcuni casi anche grazie alla sua capacità di regolare l'espressione genica del polydnavirus associato (Asgari, 2006; Li *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Il ruolo e l'importanza del veleno nella parassitizzazione non si limita alla soppressione della risposta immunitaria, ma può avere un'importante funzione nell'alterazione del normale piano di sviluppo (Pennacchio e Strand, 2006) o risultare essenziale per la riduzione e/o soppressione del potenziale riproduttivo dell'ospite (Digilio *et al.*, 2000; Falabella *et al.*, 2007a; Pennacchio e Mancini, 2012). Il veleno, quindi, contribuisce attivamente al successo della parassitizzazione, agendo direttamente nella soppressione del sistema immunitario e coadiuvando l'azione di altri fattori di virulenza, come i PDVs.

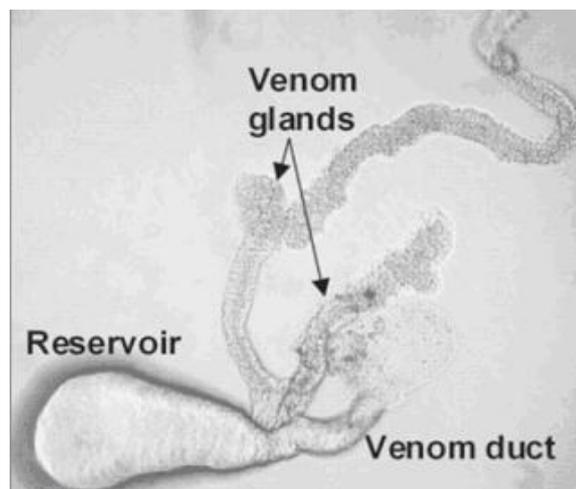


Figura 5: Ghiandola del veleno

Le *proteine del calice ovarico* (PO) giocano un ruolo importante nel successo della parassitizzazione. Il loro contributo può variare nei diversi sistemi ospite-parassitoide, ma è senz'altro fondamentale per i fenomeni di immunosoppressione che si verificano immediatamente dopo la parassitizzazione. Le PO possono essere componenti attive della parassitizzazione ed avere un'importanza primaria nel generare la rapida immunosoppressione dell'ospite, necessaria nel breve arco di tempo che precede l'espressione dei geni del PDV simbiote del parassitoide (Webb e Luckhart, 1994; Luckhart e Webb, 1996; Li *et al.*, 2007). In altri casi le PO

sono necessarie affinché il veleno possa esplicare la propria attività immunosoppressiva (Tanaka, 1987).

5.2.2 Fattori di regolazione di origine embrionale.

Oltre a fattori parassitari di origine materna, anche fattori di origine embrionale possono, in taluni casi, contribuire attivamente al successo della parassitizzazione (Howard *et al.*, 2004; Schepers *et al.*, 1998). I teratociti sono cellule giganti originatesi dalla dissociazione della membrana serosale e che persistono nell'emolinfa dell'ospite durante lo sviluppo larvale del parassitoide. Essi posseggono una membrana cellulare densa di microvilli, un abbondante reticolo endoplasmatico e numerosi mitocondri, strutture che sono alla base dell'intensa attività metabolica che li caratterizza (Schepers *et al.*, 1998).

I teratociti sono stati finora ritrovati soltanto in pochi gruppi di imenotteri parassitoidi, nell'ambito delle superfamiglie Ichneumonoidea, Platyastroidea e Calcidoidea (Pedata *et al.*, 2003; Pennacchio e Strand, 2006). Nella superfamiglia Ichneumonoidea sono stati ritrovati in sette delle 35 sottofamiglie di Braconidi (Shaw e Huddleston, 1991) e in un solo membro degli Icneumonidi (Rouleux-Bonnin *et al.*, 1999); nella superfamiglia Platyastroidea, invece, sono stati ritrovati sia nei Platygastridi (Hill e Emery, 1937) che negli Scelionidi (Gerling e Orion, 1973, Strand *et al.*, 1985; Volkoff e Colazza, 1992).

Il ruolo dei teratociti è stato studiato in un numero limitato di specie di Braconidi, e questi studi funzionali hanno dimostrato che tali cellule agiscono in modo differente sulla modulazione della disponibilità nutrizionale, del bilancio endocrino e della risposta immunitaria dell'ospite.

I teratociti producono e, spesso, secernono una varietà di proteine con caratteristiche e funzioni spesso piuttosto differenti nei diversi casi studiati (Howard *et al.*, 2004). Si ipotizza che i fattori secreti da queste cellule includano inibitori della risposta immunitaria, molecole fungicide, inibitori dell'ormone giovanile, proteasi, inibitori della fenolossidasi, molecole che sopprimono la produzione degli ecdisteroidi e fattori che, con diverse modalità, contribuiscono alla nutrizione del parassitoide (Bell *et al.*, 2004).

In definitiva, sulla base dei dati finora raccolti, è possibile concludere che i teratociti sono in diversi modi coinvolti nella regolazione dell'ospite, svolgendo un ruolo importante nella loro utilizzazione nutrizionale da parte delle larve del parassitoide (De buron *et al.*, 1997).

5.3 Il sistema biologico *Heliothis virescens* – *Toxoneuron nigriceps*

Studi dettagliati sulle alterazioni endocrine e di sviluppo dell'ospite indotte da endoparassitoidi sono stati realizzati in diversi sistemi modello. Fra questi, nel laboratorio presso cui ho svolto la mia tesi di dottorato è stata dedicata particolare attenzione al sistema *Heliothis virescens* (F.) / *Toxoneuron nigriceps* Viereck (Lepidoptera, Noctuidae / Hymenoptera, Braconidae) (Fig. 6).



Figura 6: Femmina di *T. nigriceps* che parassitizza una larva di IV età di *H. virescens*.

T. nigriceps è un parassitoide endofago coinobionte delle larve della nottua del tabacco *H. virescens*. Le larve dell'ospite parassitizzate, come in molte altre associazioni ospite-parassitoide, mostrano alcune patologie, quali l'alterazione dell'equilibrio endocrino (che causa l'arresto dello sviluppo

dell'ultima età larvale dell'ospite) e la soppressione del sistema immunitario (Pennacchio and Strand, 2006).

Le larve di *H. virescens* parassitizzate da *T. nigriceps* presentano un normale sviluppo fino all'ultima età larvale ma, giunte a maturità, sono incapaci di incrisalidarsi. Questo indica che *T. nigriceps* è in grado di alterare l'equilibrio neuroendocrino del proprio ospite causando l'arresto dello sviluppo, riconducibile ad un significativo aumento del titolo di ormone giovanile (Li *et al.*, 2003) e ad una considerevole riduzione dell'attività biosintetica delle ghiandole protoraciche, la cui struttura, tuttavia, rimane inalterata (Tanaka e Vinson, 1991). Le alterazioni osservate sono dovute all'azione combinata di fattori parassitari di origine materna ed embrionale. In particolare, le secrezioni materne ed il bracovirus associato a *T. nigriceps* (TnBV) (Tanaka e Vinson, 1991; Pennacchio *et al.*, 1997, Pennacchio *et al.*, 1998a, Pennacchio *et al.*, 2001; Pennacchio e Strand, 2006) interferiscono attivamente con la biosintesi dell'eccidione, mentre i teratociti sono responsabili della conversione selettiva del 20-idrossieccidione in ecdisteroidi polari non attivi, che si ritrovano accumulati nell'emolinfa dell'ospite (Pennacchio *et al.*, 1994b; Pennacchio *et al.*, 2001).

A seguito delle alterazioni endocrine, le larve parassitizzate di ultima età di *H. virescens* mostrano un profilo biochimico dell'emolinfa alterato ed un conseguente incremento del valore nutrizionale dell'ospite, di grande importanza perché la parassitizzazione abbia successo. I cambiamenti metabolici indotti dal parassitoide mantengono elevato il tenore di proteine in circolo nell'emolinfa nella larva ospite (Pennacchio *et al.*, 1992; Pennacchio *et al.*, 1993; Pennacchio *et al.* 1994a, b; Pennacchio e Strand, 2006). Appare chiaro che per incrementare l'idoneità nutrizionale dell'ospite, il parassitoide deve mobilitare le risorse immagazzinate e/o disabilitare quei processi metabolici dell'ospite particolarmente dispendiosi dal punto di vista energetico quali il completamento della metamorfosi (Pennacchio e Strand, 2006).

T. nigriceps è in grado di bloccare attivamente la risposta immunitaria del proprio ospite soprattutto grazie ai fattori di origine materna, quali il veleno e il fluido del calice ovarico, che la femmina inietta nella larva ospite al

momento dell'ovideposizione. Tra questi fattori, il bracovirus simbiote di *T. nigriceps* (*TnBV*) risulta di particolare importanza. L'espressione di diversi geni di questo virus comporta alterazioni strutturali e funzionali degli emociti e della risposta immunitaria umorale, che si registra fin dalle prime ore dopo la parassitizzazione (Ferrarese *et al.*, 2005). *TnBV*, pertanto, è il fattore parassitario più importante nell'induzione della sindrome immunosoppressiva osservabile nelle larve parassitizzate di *H. virescens*.

5.3.1 *TnBV*

TnBV è un tipico PDVs appartenente al genere bracovirus (BV); il suo genoma (costituito da 29 cerchi di DNA a doppio filamento) possiede un'ampia regione non codificante (>78%), un elevato contenuto di A-T (>68%) e una regione codificante corrispondente all'incirca al 22% dell'intero genoma. Quest'ultima è caratterizzata dalla presenza di geni in copie multiple, riuniti talora in membri di famiglie geniche.

Regione codificante del genoma di *TnBV*

Attualmente, in *TnBV*, i geni identificati e più ampiamente descritti appartengono alla classe di geni espressi solo nell'ospite e coinvolti nelle alterazioni fisiologiche osservate nella parassitizzazione (Theilmann e Summers, 1986; Stoltz, 1993).

I geni *TnBV1* e *TnBV2* a partire da 12 ore dalla parassitizzazione, producono trascritti presenti negli emociti, nei corpi grassi e nelle ghiandole protoraciche di larve parassitizzate, che raggiungono un picco massimo tra le 24 e le 48 ore dopo la parassitizzazione (Varricchio *et al.*, 1999, Falabella *et al.*, 2003). L'espressione transiente di questi geni in differenti tipologie cellulari, specialmente negli emociti, indica un loro possibile coinvolgimento nelle alterazioni della fisiologia dell'ospite, in particolare in processi di degenerazione apoptotica degli emociti in seguito a parassitizzazione (Varricchio *et al.*, 1999, Lapointe *et al.*, 2005).

Un'altra famiglia genica di *TnBV* include membri che codificano proteine "I_κB-simili", denominate anche con l'acronimo "ank" (dal termine inglese "ankyrin"), che mostrano una significativa identità di sequenza

(approssimativamente il 50%) con membri della famiglia di proteine I κ B. Queste ultime sono importanti fattori di regolazione, che agiscono come inibitori della via di trasduzione del segnale che in insetti e vertebrati porta all'attivazione di NF- κ B (Silverman e Maniatis, 2001). Le proteine NF- κ B o *Rel* sono fattori trascrizionali, ovvero proteine in grado di legare il DNA e modulare l'espressione di quei geni che sono sotto il controllo di promotori κ B. Le proteine "I κ B-simili" codificate da *TnBV* sono caratterizzate, come le proteine I κ B, dalla presenza di domini ripetuti di anchirina, ma non presentano la sequenza regolatrice in posizione N-terminale (Falabella *et al.*, 2007b; Rogers *et al.*, 1986; Ghosh e Karin, 2002; Ghosh *et al.*, 1998; Webb e Strand, 2005). Tali proteine, pertanto, sono in grado di interagire con i fattori NF- κ B in modo stabile e non modulabile, impedendo di fatto l'espressione di tutti i geni che sono sotto il controllo di NF- κ B.

In larve di *H. virescens* parassitizzate e immunosopresse, il blocco del segnale NF- κ B indotto da *TnBV* probabilmente inibisce sia la risposta immunitaria umorale che quella cellulare, come riportato per diversi sistemi ospite (lepidottero) - parassitoide (Strand, 2012). Le proteine ANK codificate da *TnBV* potrebbero essere coinvolte anche nell'induzione di apoptosi nelle cellule dell'ospite parassitizzato (Ferrarese *et al.*, 2005). Esse potrebbero, infatti, inibire la sintesi di fattori anti-apoptotici, andando così a completare l'attività del prodotto del gene *TnBV1* (Lapointe *et al.*, 2005)

Un'altra importante famiglia genica rinvenuta nel genoma del *TnBV* è quella delle proteine tirosino-fosfatasi (PTP), che risulta essere la più numerosa, contando più di 13 geni espressi in differenti tessuti dell'ospite. Le PTP svolgono un ruolo chiave nel controllo della fosforilazione delle proteine cellulari (Neel *et al.*, 1997) e, pertanto, hanno una funzione importante nella modulazione di innumerevoli meccanismi di trasduzione di segnale. Per due delle PTP di *TnBV* sono stati isolati i cDNA completi, denominati PTP5 e PTP7, la cui espressione è stata osservata negli emociti e nei corpi grassi dell'ospite parassitizzato (Provost *et al.*, 2004). Solo PTP7 è espresso nelle ghiandole protoraciche a 24 ore dalla parassitizzazione. Questo suggerisce che l'espressione delle PTP potrebbe essere tessuto e/o substrato specifica, e riconducibile al blocco dell'attività biosintetica delle ghiandole protoraciche dell'ospite (Falabella *et al.*, 2006). Tuttavia,

l'elevato livello di espressione di questi geni negli emociti e nel tessuto adiposo indica il loro coinvolgimento anche nella soppressione della risposta immunitaria, così come ampiamente riportato in altri sistemi ospite-parassitoide (Strand, 2012).

Numerosi altri geni sono stati identificati in *TnBV*, ma per essi, al momento, non sono state effettuate analisi funzionali che consentono una chiara interpretazione del loro ruolo nell'induzione della sindrome parassitaria mostrata dagli ospiti.

Regione del genoma del *TnBV* non codificante

Il genoma di *TnBV*, come già detto, presenta un'ampia porzione (circa il 78%) apparentemente priva di geni. Il significato funzionale di una porzione non codificante così rilevante è ancora oggi oggetto di studio. È possibile ipotizzare che essa possa svolgere un ruolo importante in fenomeni di regolazione della fisiologia dell'insetto ospite. Tuttavia, tale ipotesi resta non del tutto supportata da evidenze sperimentali.

Un lavoro precedentemente svolto nel nostro laboratorio ha portato all'identificazione nel genoma di *TnBV* di una sequenza che produce un RNA non codificante (ncRNAs). Tale sequenza è localizzata in un circolo virale del genoma di *TnBV* nel quale è stato individuato anche un membro della famiglia genica delle proteine "I_κB-simili". La sequenza del ncRNA è inversa e complementare rispetto alla regione 5'UTR di un gene di *H. virescens*, chiamato 102 (Fig. 7) la cui espressione negli emociti di larve parassitizzate risulta essere sotto-regolata dal ncRNA di *TnBV* (dati non pubblicati).

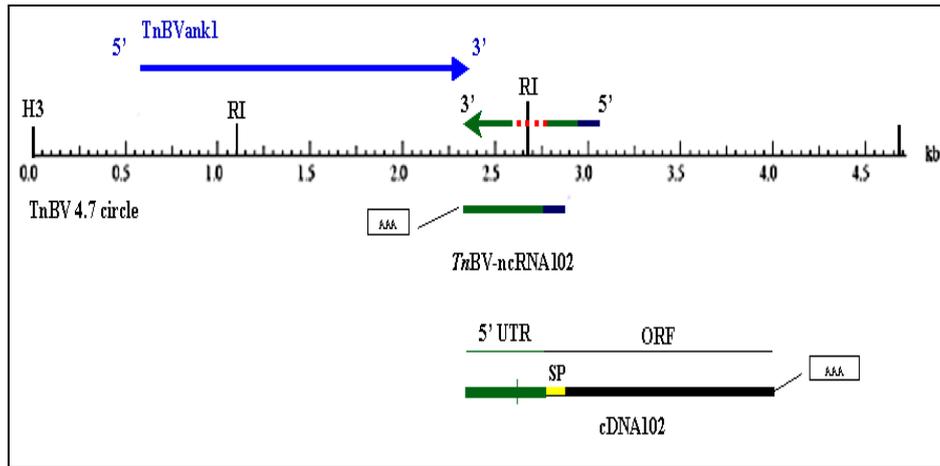


Figura7: Posizione del trascritto virale *rc5'ntnBV* nel circolo virale 4.7.

Per questo motivo è stato ipotizzato che il ncRNA potrebbe essere coinvolto in fenomeni di silenziamento del gene 102, portando alla degradazione dei trascritti del gene o bloccandone la traduzione.

SCOPO DELLA TESI

L'ipotesi stimolante appena formulata, che il ncRNA identificato possa essere responsabile di fenomeni di regolazione dell'espressione genica dell'ospite, ha aperto numerosi quesiti sul suo significato funzionale. Per potere fornire interpretazioni attendibili, è sembrato importante conoscere il ruolo funzionale del gene 102, prima di poter definire l'effetto di un suo silenziamento.

Pertanto, il mio lavoro di tesi, integrato in attività svolte in collaborazione con altre strutture di ricerca, si è posto i seguenti obiettivi:

- Analisi funzionale del gene 102 per definire il suo ruolo nella fisiologia dell'ospite (Capitolo 1)
- Valutazione degli effetti fenotipici del suo silenziamento con RNAi e loro confronto con le alterazioni osservate in ospiti parassitizzati (Capitolo 2)
- Sviluppo di strategie di controllo di specie dannose in agricoltura basate sulle conoscenze acquisite (Capitolo 3 e 4).

CAPITOLO 1

Ruolo funzionale della proteina 102 di *H. virescens* nella risposta immunitaria cellulare

1.1 Introduzione

Nell'ambito di uno studio mirante a isolare e caratterizzare i geni del bracovirus associato a *T. nigriceps* (*TnBV*), sono state individuate diverse sequenze espresse nelle larve parassitizzate di *H. virescens*. Il cDNA del gene 102 presenta una regione non tradotta all'estremità 5' (*5'nt102*), che è inversa e complementare rispetto al trascritto virale non codificante *rc5'ntTnBV*. Poiché il livello dei trascritti del gene 102 negli emociti di larve parassitizzate è più basso che nei controlli non parassitizzati (Pennacchio *et al.*, dati non pubblicati), si è ipotizzata l'esistenza di un meccanismo naturale di silenziamento, attivato da questa sequenza virale non codificante. Il gene target, il 102, sembrava avere una funzione immunitaria non definita, la cui soppressione, verosimilmente, concorre alla sindrome immunodepressiva degli ospiti parassitizzati.

La prima parte del mio lavoro di dottorato è stata dedicata ad esperimenti volti alla comprensione del ruolo funzionale della proteina codificata dal gene 102 in *H. virescens*. I dati da me ottenuti sono andati a integrare un più ampio studio la cui realizzazione ha richiesto la collaborazione di diversi gruppi di lavoro (Falabella *et al.*, 2012). Tale contributo viene di seguito presentato sommariamente e, quindi, inserito integralmente.

1.2 Amiloidi funzionali nella risposta immunitaria degli insetti

Il sistema immunitario innato degli insetti comprende una risposta umorale ed una cellulare, che forniscono protezione contro l'invasione di patogeni e parassiti (Lemaitre e Hoffmann, 2007). Le reazioni di difesa nei confronti di questi ultimi includono l'incapsulamento da parte delle cellule del sistema immunitario e la deposizione localizzata di melanina che, per evitare danni sistemici, è solitamente limitata al sito dove è avvenuta la lesione e alla superficie dei corpi esternei. La melanizzazione sembra svolgere una funzione immunitaria importante negli artropodi e, presumibilmente, in molti altri invertebrati (Cerenius *et al.*, 2008; Lemaitre e Hoffmann, 2007). L'approfondita analisi funzionale del gene 102, effettuata realizzando esperimenti sia *in vivo* che *in vitro*, dimostra che il processo localizzato di melanizzazione, che avviene durante l'incapsulamento di oggetti estranei negli insetti ad opera degli emociti, è mediato dalla produzione di fibre amiloidi a partire da frammenti della proteina 102. Queste fibre amiloidi si accumulano in ampie cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso degli emociti stessi e, dopo lo stimolo immunitario, sono rilasciate, e formano uno strato di rivestimento dei corpi estranei presenti nell'emocele, che funge da impalcatura molecolare, capace di promuovere la sintesi localizzata della melanina e l'incapsulamento. L'interruzione della formazione di fibre amiloidi pregiudica anche la formazione della capsula emocitaria, e questo suggerisce un loro ruolo nel coordinare le risposte di difesa umorali e cellulari. I risultati ottenuti dimostrano, per la prima volta, che le fibre amiloidi svolgono un ruolo funzionale chiave nella immunità dell'insetto.

Studi recenti indicano che il sistema di attivazione della pro-fenolossidasi (proPO) è strettamente associato alla comparsa di fattori che stimolano la reazione immunitaria, ed è fondamentale per l'eliminazione degli agenti patogeni e dei parassiti (Eleftherianos *et al.*, 2007, Cerenius *et al.*, 2008). Inoltre, l'inibizione della melanizzazione dell'emolinfa nell'interazione ospite/parassitoide è un'alterazione molto comune negli ospiti parassitizzati (Pennacchio e Strand, 2006), ed è mediata dalla distruzione sia della attivazione della proPO, sia dell'attività della PO (Beck e Strand, 2007;

Colinet *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2008; Nappi *et al.*, 2009). Questo sintomo è associato, nella maggior parte dei casi, all'inibizione della reazione d'incapsulamento dell'uovo del parassitoide. Pertanto, è probabile che la melanogenesi sia importante per la formazione della capsula emocitaria. Tuttavia, ad oggi, un collegamento funzionale diretto tra l'attivazione della proPO e l'incapsulamento non è stato ancora dimostrato. È interessante notare che la proPO aderisce solo ai granulociti e agli sferulociti di larve di lepidottero (Ling e Yu, 2005), che sono i due tipi di emociti che producono amiloidi, su cui è sintetizzata melanina. Questo sostiene indirettamente la teoria che ci sia una stretta interazione tra i componenti della cascata di attivazione della PO e l'impalcatura costituita da fibre amiloidi, su cui la sintesi della melanina è strettamente localizzata. Come questo processo sia associato alla formazione della capsula emocitaria è ancora da definire, e il chiarimento di tale fenomeno potrebbe far luce sui legami funzionali che intercorrono tra l'immunità umorale e quella cellulare, che negli invertebrati non sono ancora ben definiti, anche se evidenze sperimentali indicano la presenza di un'intensa interconnessione (Cerenius *et al.*, 2010; Kan *et al.*, 2008; Lavine e Strand, 2002).

La presenza di fibrille amiloidi derivante dalla P102 nei granulociti e negli sferulociti ha, probabilmente, anche implicazioni sulla formazione e sul ruolo funzionale della lamina basale che delimita la cavità emocelica e tutti gli organi interni degli insetti. Come descritto in diversi studi (Akai e Sato, 1973; Beaulaton, 1968; Sass *et al.*, 1994; Wigglesworth, 1973), gli emociti contribuiscono significativamente alla formazione della lamina basale, rilasciando quantità consistenti di materiale microfibrillare. Queste evidenze ultrastrutturali sono ulteriormente rafforzate da studi di immuno-rivelazione, che dimostrano la presenza di epitopi molecolari comuni nella lamina basale e negli emociti (Nardi e Miklasz, 1989; Sass *et al.*, 1994). La rottura del tegumento degli insetti e la perdita di emolinfa avvia la cicatrizzazione localizzata, attivando reazioni di coagulazione e melanizzazione (Lemaitre e Hoffmann, 2007). È ragionevole supporre che le fibre amiloidi generate dalla P102 siano coinvolte nella localizzazione della melanogenesi anche in questo caso.

Nei mammiferi, il problema della localizzazione della melanizzazione viene risolto in modo molto simile, in quanto la melanogenesi avviene esclusivamente nei melanosomi, un compartimento cellulare specializzato, dove amiloidi funzionali, impacchettati come inclusioni intracellulari, promuovono la polimerizzazione della melanina, e proteggono i melanociti dagli effetti collaterali dei precursori tossici melanogenici, impedendo la loro diffusione nel citoplasma (Fowler *et al.*, 2006, 2007).

Pertanto, sia nei mammiferi che negli invertebrati vengono utilizzati amiloidi funzionali in ruoli simili per risolvere il problema connesso con la sintesi *in vivo* di melanina, un composto altamente tossico. Il fatto che il processo di melanogenesi avvenga su un'impalcatura molecolare di fibre amiloidi in specie animali filogeneticamente distanti, è in sintonia con l'ipotesi che questi aggregati proteici ordinati, le fibre amiloidi, siano apparsi molto presto nella evoluzione della vita, giocando un ruolo importante anche nel mondo prebiotico (Greenwald e Riek, 2010).

I risultati di questo studio rafforzano ulteriormente il concetto che amiloidi si formino anche in contesti fisiologici, e non solo in quadri patologici (Chiti e Dobson, 2006; Fowler *et al.*, 2007; Greenwald e Riek, 2010). Vi è un numero crescente di esempi di amiloidi che svolgono importanti ruoli funzionali in batteri, funghi e mammiferi (Fowler *et al.*, 2007). Una maggiore comprensione dei diversi ruoli fisiologici delle amiloidi e dei meccanismi che controllano la loro formazione potrebbe fornire nuove e interessanti prospettive per il trattamento di malattie in cui è coinvolta la produzione di fibre amiloidi. Gli insetti potrebbero offrire nuovi ed efficaci sistemi sperimentali per lo studio dell'amiloidogenesi.



Functional amyloids in insect immune response

Patrizia Falabella^{a,1}, Lea Riviello^{a,1}, Mariarosa Pascale^a, Ilaria Di Lelio^{b,c}, Gianluca Tettamanti^d, Annalisa Grimaldi^d, Carla Iannone^e, Maria Monti^e, Piero Pucci^e, Antonio Mario Tamburro^{a,2}, Magda deEguileor^d, Silvia Gigliotti^{c,*}, Francesco Pennacchio^{b,*}

^aUniversità della Basilicata, Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, via dell'Ateneo Lucano 10, 85100 Potenza, Italy

^bUniversità di Napoli "Federico II", Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "F. Silvestri", via Università 100, 80055 Portici, Napoli, Italy

^cIstituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati-Traverso", CNR, via P. Castellino 111, 80131 Napoli, Italy

^dUniversità dell'Insubria, Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, via Dunant 3, 21100 Varese, Italy

^eCENGE Biotecnologie Avanzate-Università di Napoli "Federico II", via G. Salvatore 486, 80145 Napoli, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2011

Accepted 29 November 2011

Keywords:

Amyloids
Melanin synthesis
Cellular immunity
Humoral immunity
Haemocytes

ABSTRACT

The innate immune system of insects consists of humoral and cellular responses that provide protection against invading pathogens and parasites. Defence reactions against these latter include encapsulation by immune cells and targeted melanin deposition, which is usually restricted to the surface of the foreign invader, to prevent systemic damage. Here we show that a protein produced by haemocytes of *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae) larvae, belonging to XendoU family, generates amyloid fibrils, which accumulate in large cisternae of the rough endoplasmic reticulum and are released upon immune challenge, to form a layer coating non-self objects entering the haemocoel. This amyloid layer acts as a molecular scaffold that promotes localised melanin synthesis and the adhesion of immune cells around the non-self intruder during encapsulation response. Our results demonstrate a new functional role for these protein aggregates that are commonly associated with severe human diseases. We predict that insects will offer new powerful experimental systems for studying inducible amyloidogenesis, which will likely provide fresh perspectives for its prevention.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved

1. Introduction

Insects combat their natural antagonists using multiple innate defence reactions, which are largely shared with higher organisms. Physical barriers protecting the body cavity are complemented by both local and systemic immune responses. The cuticle and the epithelium beneath represent an effective physical barrier, as well as the source of local molecular defences. However, when external intruders overcome this barrier and enter the haemocoel, a complex array of humoral and cellular defence reactions, controlled by soluble molecules and haemocytes circulating in the haemolymph, is activated (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Melanisation is a rapid reaction detectable at the injury site and on the surface of foreign invaders, which appears to play an important

immune function in arthropods and, possibly, in many other invertebrate taxa (Cerenius et al., 2008; Lemaitre and Hoffmann, 2007). This widespread immune response generates toxic quinone precursors of melanin and cytotoxic short-lived reaction intermediates that are generally assumed to play an important role in killing the invading organism; however, some controversy exists on the interpretation of this functional role, as the successful combat of some pathogens and parasites does not seem to be dependent on melanogenesis (Cerenius et al., 2008; Nappi and Christensen, 2005).

There is overwhelming evidence that the activation of phenoloxidase (PO) is a crucial step of the immune response by insects, but the mechanisms and functions of the melanisation process are still not completely defined. In the last decade, a wealth of molecular data has been provided on the activation of proteolytic cascades for the prophenoloxidase (proPO) system by zymogenic serine proteinases, serine protease homologues and pattern recognition proteins, leading to melanin synthesis (Cerenius et al., 2008, 2010). However, there is still limited understanding of how PO activity is tightly controlled to avoid systemic production of melanin, which, if not strictly localised on the surface of the invader

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gigliott@igb.cnr.it (S. Gigliotti), fpennacchio@unina.it (F. Pennacchio).

¹ PF and LR contributed equally to this work.

² Deceased. This paper is in his memory.

or at the injury site, would be fatal (Cerenius et al., 2008, 2010; Lemaître and Hoffmann, 2007; Nappi et al., 2009). How the localisation of melanisation is controlled is currently unknown.

Recent data indicate that the proPO activating system is also closely associated with the appearance of factors stimulating cellular reactions towards non-self objects in arthropods (Cerenius et al., 2008). There are several studies that provide evidence that PO activity is crucial for the elimination of pathogens and parasites. In insects, for example, *Photobacterium*, a virulent bacterial pathogen of *Manduca sexta*, produces a PO inhibitor, absent in non-virulent mutated strains, which are phagocytosed at much higher rates (Eleftherianos et al., 2007). Moreover, many insect parasitoids overcome host immune barriers by disrupting humoral and cellular responses with virulence factors, which, in some cases, are encoded by symbiotic viruses in the family Polydnviridae (Pennacchio and Strand, 2006). The inhibition of haemolymph melanisation in parasitised hosts is a very common alteration (Pennacchio and Strand, 2006), which is mediated by the disruption of both proPO activation and PO activity (Beck and Strand, 2007; Colinet et al., 2009; Lu et al., 2008; Nappi et al., 2009). This symptom is in most cases associated with the disruption of capsule formation. Therefore, melanogenesis is likely to be important for promoting parasitoid encapsulation. However, to date, a direct functional link between proPO activation and encapsulation has not yet been defined.

In the framework of an extensive characterisation of the virulence factors encoded by the bracovirus (*TnBV*) associated with *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera, Braconidae), an endoparasitoid of the tobacco budworm larvae, *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae), we isolated a host gene, designated *102*, highly represented in the cDNA library of host haemocytes and, so, likely playing an important role in the immune response. Here we report an in-depth functional analysis of this gene, both *in vivo* and *in vitro*. We show that localised melanisation during encapsulation of non-self objects by insect immune cells is mediated by amyloid fibres produced by fragments of the protein encoded by this gene. These amyloids promote the polymerisation of toxic quinone precursors and melanin deposition around the encapsulated target. The disruption of amyloid fibre formation also impairs capsule formation, which suggests a role for fibrils in coordinating humoral and cellular defence responses. These results demonstrate, for the first time, that amyloids play a key-role in insect immunity, by providing a molecular scaffold that promotes melanin deposition and haemocyte adhesion.

2. Materials and methods

2.1. *In vitro* expression of recombinant P102 and antibody production

For bacterial expression, the cDNA 102 sequence coding for the entire P102 protein, except the signal peptide, was PCR-amplified using the following primers:

102 pET-32 forw 5' GACGACGACAAGATGGACGACTTGGCA-CATGCAG 3'
 102 pET-32 rev 5' GAGGAGAAGCCCGGTAGTAGAAGGGG-TATGCTGTGT 3'

The underlined sequences allowed direct cloning of the PCR fragment into the pET-32 Ek/LIC expression vector (Novagen), generating the 102pET-32 Ek/LIC construct, which was checked by DNA sequencing, and transformed by standard procedures into Rosetta-Gami (DE3) *Escherichia coli* cells (Novagen). The expression of the recombinant protein was induced by growing cells for 2 h at

room temperature, in the presence of 1 mM IPTG. Cell lysis was performed in non-denaturing conditions and the recombinant protein was purified by nickel-nitrilotriacetic acid-agarose affinity chromatography, on Protino Ni-TED 1000 packed columns, following manufacturer's instructions (Macherey–Nagel). The purified protein was quantified by using the Bio-Rad protein Assay Kit (BIO-RAD).

The purified recombinant protein was used to raise a polyclonal antibody in rabbit, as elsewhere described (Falabella et al., 2009).

2.2. Expression of P102 in insect cells

For expression into *Drosophila* Schneider's S2 cells, the coding sequence of the cDNA 102 was PCR-amplified by using the following primers:

- 102StrandP: 5' – CTAGTCTAGAATGATTTTGTATCGCGTAGAA – 3' forward
 - 102StnewR: 5' – TCCCCCGCGGTAGAAAGGGGTATGCTGTGTC – 3' reverse

XbaI and SacI restriction sites (underlined) were incorporated into the forward and reverse primer, respectively, to allow directional cloning of the cDNA sequence into the expression vector pIZT/V5-His, generating the 102pIZT/V5-His construct. The structure and orientation of the construct were confirmed by DNA sequencing.

Drosophila Schneider's S2 cells were cultured in Schneider's *Drosophila* medium (VWR), containing heat inactivated 10% Foetal Bovine Serum (Invitrogen). 24 h prior to transfection, cells were seeded, at 70–80% confluence, in 12-well (25 mm) plates (Corning). In transient expression experiments, cells were transfected with the 102pIZT/V5-His construct by using Cellfectin (Invitrogen), as described in Beck and Strand (2005). Stably transformed cells were selected with 400 µg/ml Zeocin (Invitrogen). Populations of antibiotic-resistant cells were amplified to obtain S2 cell lines stably expressing P102. The expression of the 102 gene was tested by RT-PCR and the production of the recombinant P102 protein was confirmed by Western blot analysis.

2.3. Amyloid fibrils extraction and analysis

The haemocyte pellet from 500 µl of haemolymph from *H. virescens* fifth instar larvae was lysed in 5 volumes of lysis buffer (1 mM Tris–HCl pH 8, 138 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton) containing protease inhibitors and incubated for 30 min at 4 °C. The suspension was ultracentrifuged for 30 min at 133,395 rcf, and treated according to Gejyo et al. (1986). The pellet was resuspended in washing buffer (1 mM Tris–HCl pH 8, 138 mM NaCl, 10 mM EDTA) and ultracentrifuged as above. The supernatant containing soluble protein contaminants was discarded and this procedure was repeated until the 280 nm absorbance of the supernatant fell below 0.051 mAU. The fibril material was then extracted in water several times and ultracentrifuged as described above.

The final pellet was resuspended in Laemmli buffer, sonicated, subjected to SDS-PAGE and analysed by western blot and staining with colloidal coomassie. The coomassie stained protein bands corresponding to the anti-P102 positive signals were excised from the gel, destained by repetitive washes with 0.1 M NH₄HCO₃, pH 7.5, reduced with 10 mM DTT and carboxyamidomethylated with iodoacetamide in 0.1 M NH₄HCO₃ buffer, pH 7.5 and finally digested with trypsin. Peptides were then extracted and analysed by nano-LC-MS/MS, on a LC/MSD Trap XCT Ultra equipped with a 1100 nanoHPLC system and a chip cube (Agilent Technologies, Palo Alto,

CA). Peptides eluted from the column were directly inserted into the ES mass spectrometry source, and their mass values accurately determined. Peptide ions were simultaneously isolated and fragmented within the mass spectrometer producing daughter ion spectra from which sequence information on individual peptides were obtained. This information was then used to search for protein databases, adopting the Mascot software.

2.4. Peptide synthesis and purification

The peptides were synthesised by using an automatic synthesiser APPLIED BIOSYSTEM model 431 A. Fmoc/DCC/HOBT chemistry was used. The Fmoc-aminoacids were purchased from Nova Biochem (Laufelfingen, Switzerland) and from Inbios (Pozzuoli, Italy). The cleavage of peptides from resin was carried out by using an aqueous solution of 95% trifluoroacetic acid, 1,2-Ethanedithiol (EDT), phenol, and thioanisole were also added to the cleavage mixture, when necessary. The peptides were lyophilised and purified by semipreparative and preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography. A binary gradient was used and the solvents were H₂O (0.1% TFA) and CH₃CN (0.1% TFA). The purity of peptides was assessed by either electrospray or MALDI-TOF mass spectrometry.

2.5. In vitro synthesis of melanin

Plasma obtained from haemolymph of *H. virescens* last instar larvae was added to a fresh assay buffer (5.0 mM D,L-DOPA, 125 mM CH₃COOH/CH₃COOK buffer [pH 5.0]) at a 1:20 ratio. This solution was added with 1 mg of amyloid or non-amyloid aggregates, to assess their impact on the rate of melanin biosynthesis. Plasma from the same haemolymph samples was used in control reactions in absence of aggregates. The reaction mixture was kept at room temperature, in the dark, for 3 h, then centrifuged at 16,000g for 15 min. The supernatant was discarded while the pellet (containing melanin) was resuspended in 125 mM CH₃COOH/CH₃COOK buffer (pH 5.0) and centrifuged again. Then, the pellet was dissolved in 1 M NaOH, by heating at 60 °C for 5 min and vigorous shaking on a vortex. Absorbance spectra were recorded at 350 nm.

2.6. Immune challenge experiments

Sephadex beads suspended in saline solution were injected into newly moulted *H. virescens* last instar larvae, using a low-volume chromatography syringe, equipped with a sharp tip needle (33 gauge o.d.). After 6 h, encapsulated beads were recovered upon dissection and processed for microscopy observations, as described in the following section. Protein G Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare) were coated with anti-P102 antibody or pre-immune serum, according to manufacturer instructions, and injected as described above. Their encapsulation rate was checked 24 and 48 h after injection, and scored with an index taking into account both the encapsulation degree of each recovered bead and the relative abundance of beads with a given encapsulation degree (Li et al., 2007).

2.7. Light microscopy, transmission (TEM) and scanning (SEM) electron microscopy

H. virescens haemocytes, *Drosophila* S2 cells and encapsulated Sephadex beads were processed for TEM and immunogold labelling, using 10 nm colloidal gold particles (Jackson Immuno Research), according to published protocols (Donini et al., 1989).

Anti-P102 immunofluorescence staining of *H. virescens* haemocytes was carried out using as secondary antibodies BODIPY FL

conjugated goat anti-rabbit IgGs (Molecular Probes), according to manufacturer's instructions. DNA staining was performed by 30 min incubation in PBS containing 2 μM TOTO-3 (Molecular Probes), followed by extensive washes in PBS. Stained haemocytes, mounted in Vectashield mounting medium (Vector Labs), were analysed by laser scanning confocal microscopy, using a Leica TCS SP2 AOBs microscope equipped with a HCX PL APO 63×/1,32-0,6 oil objective. Image cropping and adjustment were accomplished using Photoshop (Adobe).

Cells were stained with Congo red according to published methods (Romhányi, 1971; van Rijswijk and van Heusden, 1979) and observed under cross-polarised light with an Axioskop 2 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), equipped with a MC 80 DX camera (Carl Zeiss, Jena, Germany). Amyloid structures were also identified according to Le Vine (1999), by staining cells with thioflavine T and visualising the amyloid-specific yellow fluorescence with an Olympus BH2 microscope. Images were acquired with a DS-5M-L1 Nikon digital camera system.

Melanin detection was performed by Masson Fontana reaction and osmium post-fixation (Orlow, 1995).

2.8. Statistical analysis

Data analysis on the encapsulation rate of Protein G Sepharose beads coated with anti-P102 antiserum was carried out by ANOVA. Analysis of the experimental data on melanin synthesis *in vitro*, in presence of amyloid and non-amyloid aggregates, was carried out by ANCOVA, with the absorbance registered for the same sample in the absence of fibrils used as a covariate. Mean comparison (Tukey's test) was performed when statistical significance ($\alpha = 0.05$) occurred. Homogeneity of variances was checked for all data by Levene's test, and normality by K-S test and Shapiro–Wilk test. The statistical package Systat ver. 13 (Systat Software Inc.) was used.

3. Results

3.1. P102 identity and in vivo immunolocalization

The P102 gene (EBL-Bank ID: FR751090) encoded a predicted protein of 364 aa (P102), with a signal peptide of 31 aa, that showed 86% sequence identity with a venom protein from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae) larvae (Veiga et al., 2005), which is a member of the novel XendoU protein family (Renzi et al., 2006) (Fig. 1). Members of the XendoU family are described from both vertebrates and invertebrates and are characterised by RNA binding and hydrolytic activities (Laneve et al., 2008); some XendoU family members were also erroneously considered to be serine protease-like enzymes (Laneve et al., 2008).

As a first step towards the functional characterisation of P102, immunodetection experiments were performed on haemocytes from *H. virescens* larvae, using an anti-P102 antibody generated using the recombinant protein produced in bacteria. Anti-P102 bound large cytoplasmic compartments surrounding the nucleus of most haemocytes (Fig. 2A and B). Observations by TEM showed that both spherulocytes (Fig. 2C) and granulocytes (Fig. 2E) had dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum (Fig. 2D), filled with spatially organised fibrillar material. Immunogold labelling experiments with the anti-P102 antibody showed the presence of widespread positive signals (Fig. 2F), which were completely absent when the pre-immune antiserum was used (Fig. 2G).

3.2. P102 generates amyloid fibres

The fibrillar material observed in the haemocytes of *H. virescens* larvae showed staining properties typical of amyloid

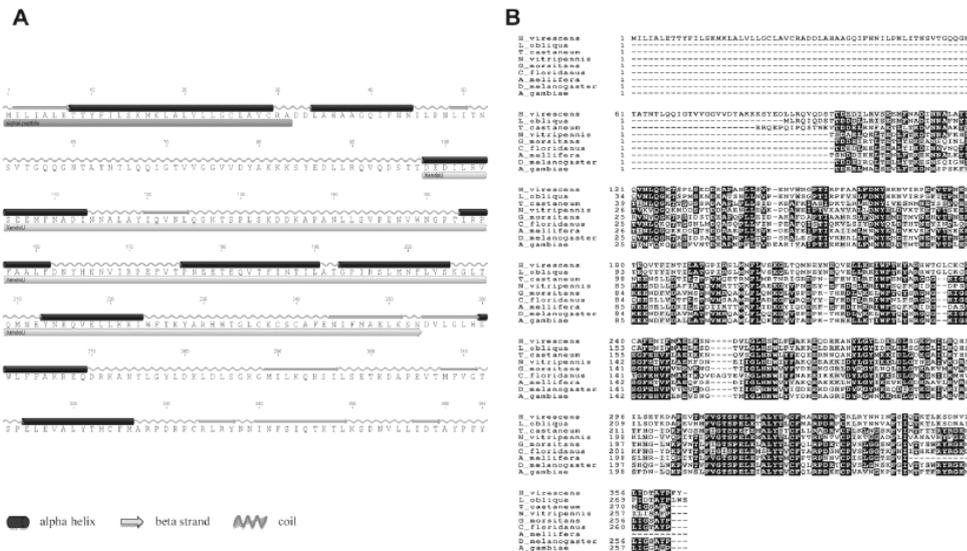


Fig. 1. Secondary structure and sequence conservation of P102. Prediction of the *Heliopsis virescens* 102 protein secondary structure carried out by PSIPRED method, with indicated signal-peptide and XendoU protein domain (A). Alignment of *Heliopsis virescens* 102 protein with *Lonomia obliqua* (gb|AAV91433), *Tribolium castaneum* (Ref XP968069), *Nasonia vitripennis* (Ref XP|001606738), *Glossina morsitans morsitans* (ADD19839), *Camponotus floridanus* (gb|EFN64513), *Apis mellifera* (XP|625112), *Drosophila melanogaster* (NP_572668) *Anopheles gambiae* (XP|311978) homologous proteins (B); black and grey shading indicate identity and high conservation of aminoacids, respectively. Prediction of protein secondary structure and alignment were performed by using Geneious[®] bioinformatics tool and the Tcoffee Core index.

fibrils (Chiti and Dobson, 2006; Vowles and Francis, 2002), as they were positive both to Congo red (Fig. 2H and I) and Thioflavine T (Fig. 2J and K). To confirm the occurrence of amyloid fibrils, last instar larvae of *H. virescens* were bled and the haemocytes used to extract and wash the fibrils, to remove contaminant proteins. The isolated fibrils were Congo red positive (Fig. 3A) and, when observed under polarised light, showed the typical apple-green birefringence of amyloids (Fig. 3B). Their analysis by western blot and LC/MS-MS evidenced the presence of P102 and its smaller fragments (Fig. 3C and E; Table 1), which were also found in western blots of haemolymph (Fig. 3D). To further demonstrate that P102 is directly involved in the production of amyloid fibrils, we expressed its gene in insect cells. The recombinant protein was abundantly produced in a polyclone of *Drosophila* S2 cells stably transformed with an expression construct containing the cDNA 102, (data not shown). These cells, unlike control cells transformed with the empty vector (Fig. 4A), showed the presence of amyloid fibrils in membrane-delimited compartments (Fig. 4B–E). As observed *in vivo*, these amyloid fibrils gave rise to positive signals in immunogold labelling experiments, when the anti-P102 antibody was used (Fig. 4F). This result was further corroborated by the western blot analysis of amyloid fibrils purified as above from a monoclonal of stably transformed S2 cells (Fig. 4G). Taken together, these data confirm the primary role of P102 in the production of amyloid fibrils.

3.3. Amyloids promote melanisation and encapsulation

Amyloid fibrils were first discovered in association with human diseases, but have since been implicated in a number of

physiological processes from diverse organisms (Chiti and Dobson 2006; Fowler et al., 2007; Greenwald and Riek, 2010). Relevant to this study is the endocellular restriction of melanin synthesis in the vertebrate melanosome, where functional amyloids sequester toxic quinone precursors and promote their polymerisation (Fowler et al., 2006).

To test the possible role of the amyloids generated by P102 in the localisation of melanin synthesis during encapsulation, microbeads were injected into mature *H. virescens* larvae, and subsequently recovered for TEM analysis. Capsules were made of several layers of haemocytes, interspersed with fibrillar material (Fig. 5A and B) released by the opening of the large cisternae present in the haemocytes (Fig. 5C). This fibrillar material, anti-P102 positive (Fig. 5F) uniformly coated the surface of the encapsulated beads (Fig. 5D and E) and was associated with large spots of melanin facing the bead surface (Fig. 5A, E and F).

To directly demonstrate that in insects, like in mammals (Fowler et al., 2006), the amyloid fold plays a key-function in enhancing the rate of melanin synthesis, we incubated L-DOPA with haemolymph plasma, in presence of amyloids and non-amyloids aggregates. We observed a significantly enhanced production of melanin *in vitro* (Fig. 6A) in the presence of a peptide, encoded by the exon 30 of elastin (E30) ($n=8$; $F=8.6$; $df 1, 5$; $P<0.005$), which generates amyloid fibrils (Pepe et al., 2005; Tamburro et al., 2005). In contrast non-amyloid aggregates, generated by the peptide encoded by the exon 19 of elastin (E19) (Pepe et al., 2005), failed to promote melanogenesis (Fig. 6A). These results expand and reinforce the hypothesis that the conserved quaternary structure of amyloids accounts for their functional role in melanin polymerisation (Fowler et al., 2006).

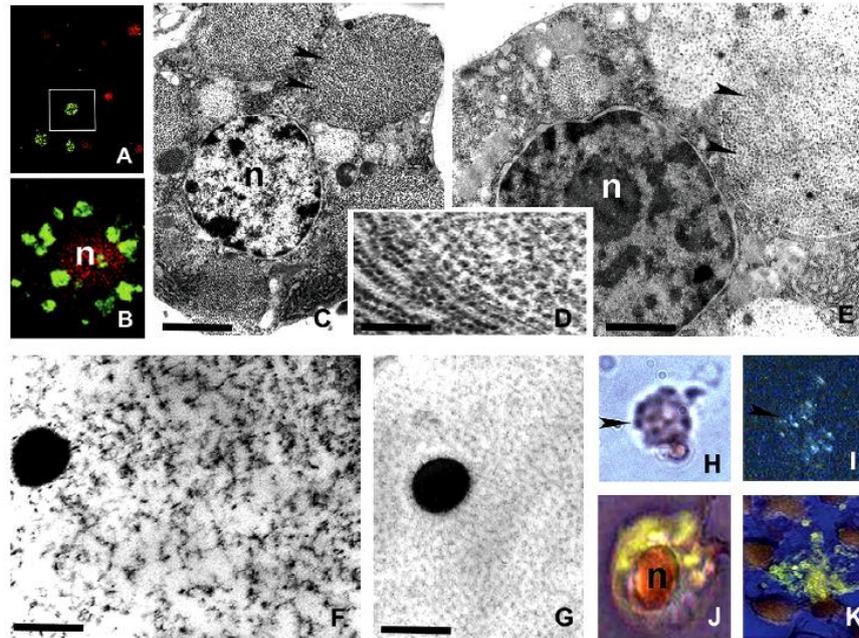


Fig. 2. In vivo detection of P102. Intracellular localisation of P102 (green) around the nuclei (red) of haemocytes of *Heliothis virescens* larvae (A, B). Haemocytes display the presence of fibrillar material in cross-section contained in rough endoplasmic reticulum disternae (arrowheads) (C, E), as indicated by the presence of ribosomes on the cytoplasmic side of the delimiting membrane (D). Immunogold labelling with colloidal gold particles conjugated with anti-P102 serum (F), or pre-immune serum (G). The tightly packed fibrils are stained by Congo red (arrowhead) (H), and show birefringence under polarised light (arrowhead) (I), which indicates the presence of amyloids. This is further corroborated by Thioflavine T staining of the fibrils, either when contained inside the cell (J) or after their release by degranulating haemocytes (K). Abbreviation used: n, nucleus. Scale bars (μm): C = 10; D = 0.13; E = 1; F = 0.5; G = 0.35.

The presence of a fibrillar matrix derived from P102 on the surface of an encapsulated non-self object prompted us to assess the possible role of the layer of amyloids in the encapsulation process. When Protein G Sepharose beads coated with anti-P102 antibody were injected into the haemocoel of *H. virescens* larvae, the encapsulation rate registered was significantly lower than that recorded with beads coated by pre-immune antiserum (Fig. 6B) ($n = 9$; $df = 3, 46$; $F = 24.6$; $P < 0.0001$). This result indicates that the antibody used interferes with the regular formation/function of the amyloid scaffold, which plays an important role in the regulation of the encapsulation response against the non-self intruder.

4. Discussion

The results reported in this study collectively demonstrate that the *102* gene encodes a protein which generates amyloid fibrils mediating localised melanogenesis and capsule formation. We propose that the amyloids made by P102 interact with the surface of non-self objects, forming a layer which functions as a molecular scaffold for the binding of toxic melanin precursors and polymerisation of melanin itself, avoiding their harmful diffusion outside the capsule (Fig. 7). This amyloid layer might also be used to localise components of the proteolytic cascade controlling melanogenesis, which closely interact when activated (Nappi et al., 2009; Piao et al.,

2005). The proPO activating factor II (PPAF-II) is a member of the non-catalytic clip-domain serine protease family, required for the appearance of PO activity; on processing by the upstream protease it forms a homo-oligomer, and its clip-domain functions as a module for active PO binding (Piao et al., 2005). It has been suggested that this interaction ensures that active PO does not spread in the haemolymph, as the clip domain also binds to an unknown stereotypical molecular structure on the pathogen surface (Piao et al., 2005). We suggest that the amyloid layer coating the non-self intruders may offer the surface on which this protein–protein interaction takes place. Indeed, it is interesting to note that proPO adheres only to granulocytes and spherulocytes of lepidopteran larvae (Ling and Yu, 2005), which, as noted above, are the two haemocyte types that produce amyloids, on which melanin is synthesised. This is indirectly supportive of a close interaction between PO cascade components and the amyloid scaffold on which melanin synthesis is strictly localised. How this process is associated with capsule formation remains to be investigated, and its clarification may shed light on the functional links between humoral and cellular immunity, which are still poorly defined in invertebrates, even though a growing evidence indicates the occurrence of intense cross-talk between different immune pathways (Cerenius et al., 2010; Kan et al., 2008; Lavine and Strand, 2002). It is reasonable to speculate that the process of amyloid formation during immune response may contribute to the interplay

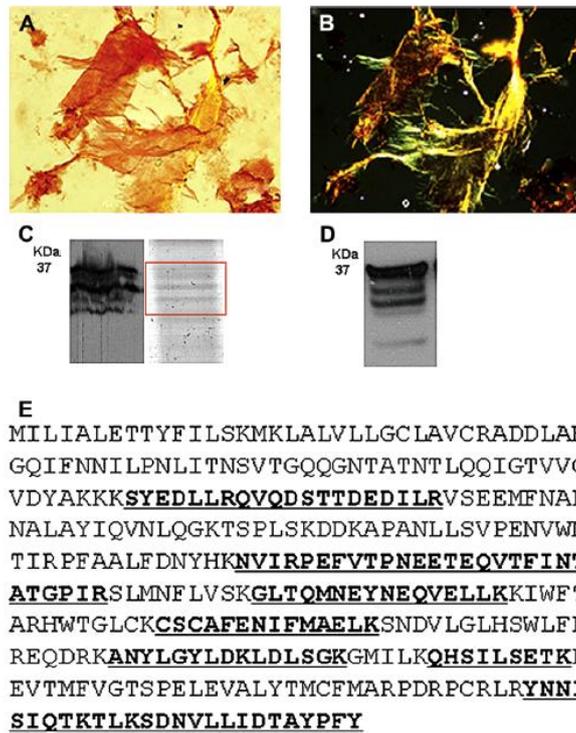


Fig. 3. Identification of P102 within the amyloid fibrils extracted from *Heliothis virescens* haemocytes. Amyloid fibrils, extracted and purified from haemocytes of *Heliothis virescens*, are Congo red positive (A), and show the typical apple-green birefringence when observed under polarised light (B). Proteins of amyloid fibrils (C-left lane) display the same pattern as proteins extracted from whole haemolymph (D), in western blot analyses using the anti-P102 antiserum. The corresponding bands are excised from the gel stained with colloidal Coomassie (C-right lane), digested and the resulting peptides, identified by nano-LC-MS/MS, are underlined in the sequence of P102 (E).

between humoral and cellular components, which is certainly worth of future research efforts.

The presence of amyloid fibrils deriving from P102 in the granulocytes and spherulocytes also has implications on the functional role of the basal lamina lining the haemocoel and all internal organs of insects. As described in different studies (Akai and Sato, 1973; Beaulaton, 1968; Sass et al., 1994; Wigglesworth, 1973), insect

haemocytes contribute significantly to the formation of the basal lamina by releasing consistent amounts of secreted tubular material, contained in large mature vesicles, which also accumulates in immune capsules. These ultrastructural evidences are further reinforced by immunodetection studies, which demonstrate the presence of shared molecular epitopes in the basal lamina and haemocytes (Nardi and Miklasz, 1989; Sass et al., 1994). The

Table 1

Peptides detected by LC-MS/MS analysis after tryptic digest of proteins recognised by anti-P102. The sequence of the peptides, the mass signals detected in the analysis and the theoretical and experimental mass values are reported.

Peptide sequence	Amino acid position	<i>m/z</i> observed	MW theoretical	MW expected
SYEDLLR	84–90	448.13	894.44	894.25
QVQDSTTDEDILR	91–103	760.14	1518.72	1518.27
NVIRPEFVTPNEETEQVTFINTILATGPIR	167–196	1133.60	3397.79	3397.78
GLTQMNEYNEQVELLK + oxidation (M)	206–221	962.69	1923.92	1923.37
CSCAFENIFMAELK + Pyro-cmC (N-term camC)	238–251	851.66	1701.72	1701.31
ANYLGYLDKLDLSGK	273–287	557.12	1668.87	1668.34
QHSILSEIK + Pyro-Glu (N-term Q)	293–301	513.04	1024.52	1024.07
YNNINFSIQTK	337–347	671.20	1340.67	1340.39
SDNVLLIDTAYPFY	351–364	815.54	1629.79	1629.07
TLKSDNVLLIDTAYPFY	348–364	986.66	1972.02	1971.31

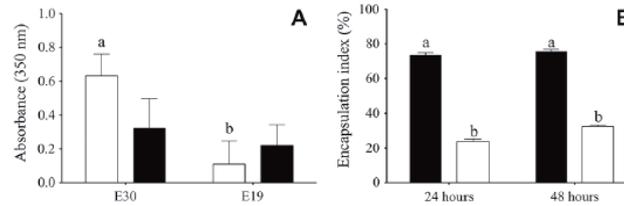


Fig. 6. Role of P102 in melanisation and encapsulation. Melanin synthesis *in vitro* in presence of amyloid (E30) and non-amyloid (E19) aggregates (white bars) or in their absence (black bars) (A). Abbreviations used: E19 and E30, exon 19 and 30 of elastin. Different letters denote significantly different mean values of white bars ($P < 0.005$). The encapsulation rate of Protein G Sepharose beads coated with anti-P102 antiserum (white bars) is drastically reduced at different times post-injection, compared with beads coated with pre-immune serum (black bars) (B), suggesting an important role of this protein in the process of capsule formation. Different letters denote significantly different mean values ($P < 0.0001$).

In insects, like most eukaryotic phyla, melanin acts as a chemical defence molecule, even though its biosynthesis *in vivo* is problematic, due to the high toxicity of quinone precursors (Land et al., 2004). In mammals, this problem has been solved by restricting melanogenesis to a specialised cell compartment, the melanosome, where functional amyloids, packed as intracellular inclusions, promote the polymerisation of melanin precursors, and protect the melanocytes from the toxic side effects of melanin biosynthesis (Fowler et al., 2006, 2007). The amyloid fibres in the melanosomes of mammals serve to bind and orient highly reactive melanogenic precursors, hastening their polymerisation and preventing the diffusion of cytotoxic intermediates in the cell cytoplasm (Fowler et al., 2006). The quinone precursors probably bind amyloids in a regular fashion, parallel to the fibre axis, as they share a core that is isostructural with the benzothiazole substructure of the amyloidophilic fluorophore thioflavin-T, which is known to bind in this manner (Krebs et al., 2005). This partly accounts for the similar promoting effect on melanin synthesis exerted by amyloids of

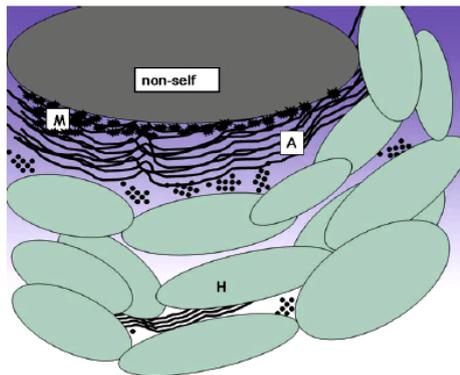


Fig. 7. Model of localised melanogenesis. Large foreign intruders elicit the formation of a capsule made of several haemocyte [H] layers, and are killed by the targeted formation of melanin [M] and toxic radicals produced during its biosynthesis. The surface of the non-self intruder is coated by a layer of amyloid [A] fibrils, which acts as a molecular scaffold promoting the polymerisation of toxic quinone precursors, produced upon activation of proteolytic cascades. The encapsulation process starts with the degranulation reaction of haemocytes activated by the non-self recognition, which release the amyloid fibrils contained in their large distemae to coat the foreign intruder. This coating layer is the physical milieu where dangerous killing reactions are confined. The amyloid fibrils interspersed among the outer cell layers will capture any melanin precursor, which may diffuse out of the centre of biosynthesis.

completely different biological origin, observed both in this study and in a previous study on mammals (Fowler et al., 2006).

In conclusion, here we show how mammals and invertebrates use functional amyloids in similar roles to solve the problem of synthesising a highly toxic compound, like melanin, *in vivo*. Melanogenesis on a molecular scaffold of amyloids in phylogenetically distant animal species is in tune with the hypothesis that these ordered protein aggregates appeared very early in the evolution of life, and played an important role even in the prebiotic world (Greenwald and Riek, 2010). The results of this study further reinforce the concept that amyloids do not always represent a misfolded toxic protein structure, but rather they can be considered a low-energy protein quaternary structure, formed either in a physiological context or in severe diseases (Chiti and Dobson, 2006; Fowler et al., 2007; Greenwald and Riek, 2010). There is a growing number of examples of beneficial amyloids, which play important functional roles in bacteria, fungi and mammals, even though the precise molecular role of currently identified functional amyloids remains poorly known in many cases (Fowler et al., 2007). However, it is obviously of vital importance to have molecular mechanisms that prevent the generation and accumulation of pathologic amyloid deposits or of their toxic intermediates in physiological contexts. A greater understanding of the diverse physiological roles played by amyloids and of the mechanisms tightly controlling their formation has the potential to provide fresh perspectives for the treatment of amyloid diseases. The invertebrate model system presented here and the impressive biodiversity of insects provide unique new tools and opportunities to tackle this important research issue.

Author Contributions

F.P., P.F. and S.G. conceived the research, planned the molecular/functional experiments and analysed the data. L.R., M.P., I.D.L., P.F. and S.G. performed all molecular biology experiments, immunofluorescence microscopy analyses and functional studies. A.M.T. performed peptide synthesis and structural analyses. G.T., A.G. and M.d.E. planned, performed and analysed all electron microscopy experiments, amyloid staining and immunogold labelling. C.L., M.M. and P.P. performed amyloid purification and proteomic analysis. F.P. and S.G. wrote the paper, which was edited by P.F., M.d.E. and P.P.

Acknowledgements

This work was supported by the Italian Ministry of University and Research (MiUR), in the framework of national research programmes, coordinated by FP (PRIN 2006079417 and PRIN 2008FBJP8). We would like to thank Dr. Michael Strand

(University of Georgia, Athens, GA, USA) for his critical reading of an early draft of the manuscript, Dr. Carla Malva and Dr. Franco Graziani (Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Napoli, Italy) for the many inspiring discussions over the years and for critical reading of the manuscript, Dr. Paolo Fanti (University of Basilicata, Potenza, Italy) for his advice on statistical analysis of experimental data, Dr. Donato Mancini (University of Napoli "Federico II", Napoli, Italy) for his advice on the use of bioinformatic tools.

References

- Akai, H., Sato, S., 1973. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 2, 207–231.
- Beaulaton, J., 1968. Etude ultrastructurale et cytochimique des glandes prothoraciques de vers a soie aux quatrieme et cinquieme ages larvaires. I. La tunica propria et ses relations avec les fibres conjonctives et les hemocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 23, 474–498.
- Beck, M., Strand, M.R., 2005. Gc1L8 from *Micropiliris demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect high five and S2 cells. *J. Virol.* 79, 1861–1870.
- Beck, M.H., Strand, M.R., 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19267–19272.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B.L., Nonaka, M., Söderhäll, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.* 35, 575–583.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 29, 263–271.
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366.
- Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezzen, J.M., Poirié, M., 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 681–689.
- Domini, U., Casanova, S., Zuccheri, P., Linke, R.P., 1989. Immunoelectron microscopic classification of amyloid in renal biopsies. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1101–1106.
- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Astam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T.J., Clarke, D.J., French-Constant, R.H., Reynolds, S.E., 2007. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defences through phenoloxidase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2419–2424.
- Falabella, P., Riviello, L., De stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Graziani, F., Gigliotti, S., Pennacchio, F., 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 801–813.
- Fowler, D.M., Koulou, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., Kelly, J.W., 2006. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4, 100–107.
- Fowler, D.M., Koulou, A.V., Balch, W.E., Kelly, J.W., 2007. Functional amyloid – from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 32, 217–224.
- Gejyo, F., Odani, S., Yamada, T., Honma, N., Saito, H., Suzuki, Y., Kobayashi, H., Maruyama, Y., Hirasawa, Y., Suzuki, M., Arakawa, M., 1986. Beta 2-microglobulin: a new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 30, 385–390.
- Greenwald, J., Biek, R., 2010. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure* 18, 1244–1260.
- Kan, H., Kim, C.H., Kwon, H.M., Park, J.W., Roh, K.B., Lee, H., Park, B.J., Zhang, R., Zhang, J., Söderhäll, K., Ha, N.C., Lee, B.L., 2008. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J. Biol. Chem.* 283, 25316–25323.
- Krebs, M.R., Bromley, E.H., Donald, A.M., 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.* 149, 30–37.
- Land, E.J., Ramsden, C.A., Riley, P.A., 2004. Quinone chemistry and melanogenesis. In: Packer, L., Sies, H. (Eds.), *Quinones and Quinone Enzymes*, Part A. Academic Press, New York, pp. 88–109.
- Laneve, P., Gioia, U., Ragno, R., Altieri, F., Di Franco, C., Santini, T., Arceci, M., Bozzoni, I., Caffarelli, E., 2008. The tumor marker human placental protein 11 is an endoribonuclease. *J. Biol. Chem.* 283, 34712–34719.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.
- Lemaître, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743.
- Le Vine III, H., 1999. Quantification of b-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* 309, 274–284.
- Li, Y., Jian-Feng, L., Feng, C., Ke, X., Fu, W., 2007. Role of venom and ovarian proteins in immune suppression of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid. *Insect Sci.* 14, 93–100.
- Ling, E., Yu, X.Q., 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1356–1366.
- Lu, Z., Beck, M.H., Wang, Y., Jiang, H., Strand, M.R., 2008. The viral protein Egfl10 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 283, 21325–21333.
- Nappi, A.J., Christensen, B.M., 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 443–459.
- Nappi, A., Poirié, M., Carton, Y., 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv. Parasitol.* 70, 99–121.
- Nardi, J.B., Miklasz, S.D., 1989. Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tissue Cell* 21, 559–567.
- Orlow, S.J., 1995. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J. Invest. Dermatol.* 105, 3–7.
- Pennacchio, F., Strand, M.R., 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 233–258.
- Pepe, A., Guerra, D., Boichicchio, B., Quaglino, D., Gheduzzi, D., Pasquali Ronchetti, I., Tamburro, A.M., 2005. Dissection of human tropoelastin: supramolecular organization of polypeptide sequences coded by particular exons. *Matrix Biol.* 24, 96–109.
- Piao, S., Song, Y.L., Kim, J.H., Park, S.J., Park, J.W., Lee, B.L., Oh, B.H., Ha, N.C., 2005. Crystal structure of a clip domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO J.* 24, 4404–4414.
- Renzi, F., Caffarelli, E., Laneve, P., Bozzoni, I., Brunori, M., Vallone, B., 2006. The structure of the endoribonuclease XendoU: from small nuclear RNA processing to severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12365–12370.
- Romhányi, G., 1971. Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with Congo red. *Virchows Arch.* 354, 209–222.
- Sass, M., Kiss, A., Locke, M., 1994. Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.* 40, 407–421.
- Tamburro, A.M., Pepe, A., Boichicchio, B., Quaglino, D., Ronchetti, I.P., 2005. Supramolecular amyloid-like assembly of the polypeptide sequence coded by exon 30 of human tropoelastin. *J. Biol. Chem.* 280, 2682–2690.
- van Rijswijk, M.H., van Heusden, C.W., 1979. The potassium permanganate method. A reliable method for differentiating amyloid AA from other forms of amyloid in routine laboratory practice. *Am. J. Pathol.* 97, 43–58.
- Veiga, A.B., Ribeiro, J.M., Guimarães, J.A., Francischetti, I.M., 2005. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene* 355, 11–27.
- Vowles, G.H., Francis, R.J., 2002. Amyloid. In: Bancroft, J.D., Gamble, M. (Eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, Hartcourt, London, pp. 303–324.
- Wigglesworth, V.B., 1973. Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*. *J. Insect Physiol.* 19, 831–844.

CAPITOLO 2

RNAi in larve di *H. virescens*

2.1 Scopo del lavoro

Il trascritto virale non codificante *rc5'ntTnBV* potrebbe essere in grado di silenziare l'espressione del cDNA 102, secondo un meccanismo ancora ignoto. La seconda parte del mio lavoro di dottorato è stata dedicata alla valutazione dell'effetto fenotipico indotto dal silenziamento del 102, attraverso l'uso di RNAi. In altri termini, si è voluto valutare se il silenziamento di questo gene possa determinare la soppressione della risposta immunitaria che si osserva nelle larve parassitizzate da *T. nigriceps*. Tale studio consente di valutare, indirettamente, il possibile ruolo funzionale di *rc5'ntTnBV*.

Sebbene nei lepidotteri la tecnica dell'RNAi sia risultata spesso difficile da applicare, il bersaglio che abbiamo scelto presenta caratteristiche tali da essere un buon candidato per l'RNAi, anche in quest'ordine di insetti. Infatti, secondo quanto riportato da Terenius *et al.* (2011), i geni che meglio si prestano al silenziamento con RNAi, indotto da dsRNA, sono quelli attivamente coinvolti nella risposta immunitaria (Hirai *et al.*, 2004; Eleftherianos *et al.*, 2006a, b, 2009). Inoltre, uno studio condotto in *D. melanogaster* ha dimostrato che gli emociti erano i soli in grado di assumere dsRNA iniettato, con conseguente silenziamento di un transgene espresso solo in tali cellule (Miller *et al.*, 2008). Il silenziamento del gene 102, che è altamente espresso negli emociti delle larve di *H. virescens*, sembra, pertanto, un buon candidato per l'approccio che si intende perseguire ai fini di una sua analisi funzionale.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Allevamento degli insetti

Le larve di *H. virescens* sono state allevate singolarmente, a partire dalla prima età larvale, in provette di plastica (cm 6 h x 2 ϕ) chiuse con cotone idrofilo, su dieta artificiale (Pennacchio *et al.*, 1998a). Gli stadi larvali di *H. virescens* sono stati individuati sulla base delle caratteristiche morfologiche descritte da Webb e Dahlman (1985) e sincronizzate, per gli esperimenti da svolgere, come riportato in letteratura (Pennacchio *et al.*, 1992). Le larve sono state mantenute in condizioni termoigrometriche controllate, in camera climatica a $29 \pm 1^\circ\text{C}$, con umidità relativa pari al $70 \pm 5\%$ e regime fotoperiodico di 16 ore di luce/ 8 ore di buio.

2.2.2. Clonaggio del trascritto rc5'ntTnBV da vettore plasmidico

Il trascritto rc5'ntTnBV, clonato nel vettore plasmidico pIZT/V5-His (Fig 2.1), è stato il punto di partenza per la produzione di molecole di dsRNA102 da impiegare in saggi biologici con *H. virescens*. Come prima cosa è stata effettuata la trasformazione di cellule *E. coli* DH5a mediante shock termico, aggiungendo, ad un'aliquota di cellule competenti scongelata in ghiaccio, 10 ng del plasmide ed incubando in ghiaccio per 30 min. Dopo uno shock termico a 42°C per 30 sec, le cellule sono state immediatamente trasferite in ghiaccio per 2 minuti. Le cellule trasformate sono state quindi aggiunte ad 1 ml di LB liquido (10 g/l di Triptone, 5 g/l di estratto di Lievito, 5 g/l di NaCl; pH 7,5). I tubi sono stati incubati a 37°C , per 1 h, in agitazione (250 rpm). In seguito, 200 μl della trasformazione sono stati piastrati su terreno LB "low salt" agar (LB con 15 g/l di agar batteriologico), contenente l'antibiotico Zeocina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Le piastre sono state incubate per 16 h a 37°C .

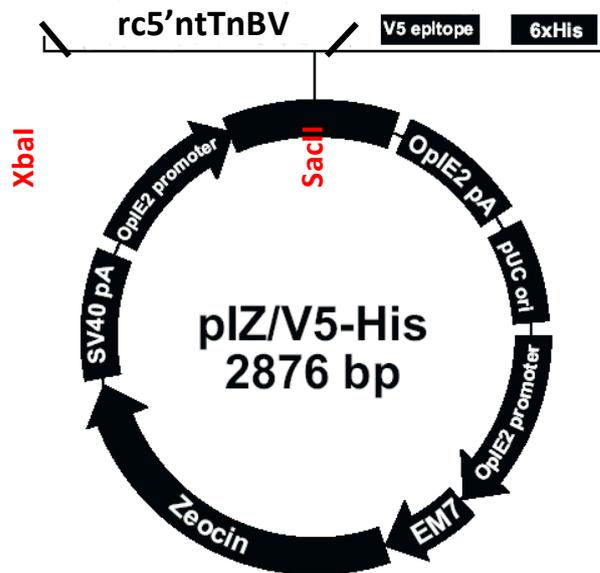


Figura 2.1: Rappresentazione schematica del costrutto ottenuto dal clonaggio del *rc5'ntTnBV*, corrispondente alla sequenza complementare e inversa della regione non tradotta al 5' del cDNA 102 nel vettore pIZT/V5-His.

Per l'isolamento e l'estrazione del DNA plasmidico, 3 ml di LB contenente l'antibiotico Zeocina (50 µg/µl) sono stati inoculati con una singola colonia cresciuta su piastra. La coltura è stata incubata per 16 h a 37°C in agitazione (250 rpm). Le cellule sono state pellettate centrifugando a 2.000 g, per 10 min a 4°C, e risospese in 100 µl di Sol I (50 mM Glucosio, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0), miscelate vigorosamente e lasciate in ghiaccio per 10 min. Successivamente sono stati aggiunti 200 µl di Sol II (0,2 N NaOH, 1% SDS). I tubi sono stati miscelati per inversione, posti in ghiaccio per 5 min, e dopo l'aggiunta di 150 µl di Sol III fredda (60% 5 M acetato di potassio, 11,5% acido acetico glaciale), nuovamente miscelati per inversione e lasciati in ghiaccio per 5 min. La miscela è stata centrifugata a 12.000 g per 10 min a 4°C e il sovrantante è stato trasferito in un nuovo tubo contenente 1 µl di RNase A (10 µg/µl). Dopo incubazione a 37°C per 30 min, un uguale volume di una soluzione di fenolo:cloroformio (1:1 v/v) è stato aggiunto, miscelato e centrifugato a 12.000 g per 2 min a 4°C. Recuperata la fase superiore, è stato di nuovo aggiunto un volume di cloroformio e, dopo

centrifugazione a 12.000 g per 5 min, la fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo, al quale sono stati aggiunti 600 µl di isopropanolo. La soluzione è stata successivamente centrifugata a 10.000 g per 5 min. Il pellet è stato lavato con 1 ml di 70% etanolo, asciugato all'aria per circa 5 min e solubilizzato in 50 µl di acqua bidistillata sterile.

Il DNA plasmidico estratto è stato sottoposto ad elettroforesi orizzontale in gel d'agarosio (1% w/v) in 1X TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) per quantificarlo mediante confronto visivo con uno standard di quantità note (DNA genomico del fago λ). Dopo aver applicato una differenza di potenziale di 70 Volt per 40 min, il DNA plasmidico è stato visualizzato tramite esposizione a raggi UV ed è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoR* I e *Sac* II. La reazione è stata allestita come mostrato in Tabella 2.1.

Componenti	Quantità
10X Buffer 4	3 µl
20U/µl <i>EcoR</i> I	0,2 µl
20U/µl <i>Sac</i> II	0,2 µl
Plasmide 300 ng	1,2 µl
H ₂ O	25,4 µl

Tabella 2.1: Componenti della reazione di digestione

La miscela di reazione è stata incubata per 1 h a 37°C. In seguito, i campioni sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

2.2.3 PCR con oligo contenenti la sequenza T7

La reazione di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è stata eseguita sul DNA plasmidico con l'utilizzo dei primer T7_102 fw e T7_102 rv (Tabella 2.2).

Nome	Sequenza
T7_102 fw	5'ATGCATAATACGACTCACTATAGGGGGCACGAGGGTTTGTAGTTA 3'
T7_102 rv	5'CCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAAAGTTTATTTTATGTC 3'

Tabella 2.2: Primer con la sequenza T7 utilizzati per l'amplificazione della sequenza *rc5'ntTnBV*

La reazione di PCR è stata allestita utilizzando i reagenti riportati nella Tabella 2.3. Le condizioni di amplificazione sono riportate nella Tabella 2.4.

Componenti	Concentrazione
Buffer (Promega)	1X
dNTPs	0,2 mM
Primer T7_102 fw	100 nM
Primer T7_102 rv	100 nM
PFU (Promega)	3 U
Plasmide	12,5 ng
H ₂ O	Fino a volume di 50 µl

Tabella 2.3: Componenti della reazione di amplificazione

Fase	T°C	Tempo	
Denaturazione	95°C	Per 3 minuti	
Denaturazione	94°C	Per 30 secondi	} 6X
<i>Annealing</i>	54°C	Per 30 secondi	
Polimerizzazione	72°C	Per 2 minuti	
Denaturazione	94°C	Per 30 secondi	} 30X
<i>Annealing</i>	65°C	Per 30 secondi	
Polimerizzazione	72°C	Per 2 minuti	
Polimerizzazione	72°C	Per 10 minuti	

Tabella 2.4: Condizioni di amplificazione per la sequenza *rc5'ntTnBV*

2.2.4 Trascrizione *in vitro* delle molecole di dsRNA

Per la trascrizione *in vitro* delle molecole di dsRNA è stato utilizzato il MEGAscript RNAi kit (Ambion).

La reazione di trascrizione è stata assemblata a temperatura ambiente, come riportato nella Tabella 2.5 e incubata a 37°C per l'intera notte.

Per verificare l'integrità e l'efficienza di formazione delle molecole di dsRNA è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. Sul gel è stato caricato 1/400 della reazione di trascrizione (5 µl di una diluizione 1:100). Successivamente la miscela è stata trattata con gli enzimi DNase I e *single-strand* RNase (Ambion), specifica per la degradazione di molecole di RNA a singolo filamento, per digerire il template di DNA ed eventuali ssRNA non appaiati. La reazione di digestione è stata allestita come riportato in Tabella 2.6 e incubata a 37°C per 1 h.

Componenti	Quantità
DNA stampo	1 µg
10X T7 reaction buffer	2 µl
ATP	2 µl
CTP	2 µl
GTP	2 µl
UTP	2 µl
T7 polimerase mix	2 µl
H ₂ O	Fino a 20 µl

Tabella 2.5: Componenti per la reazione di trascrizione in vitro del dsRNA a partire dall'amplificato ottenuto con gli oligo T7.

Componenti	Quantità
dsRNA	20 µl
10X Digestion Buffer	5 µl
DNase I	2 µl
<i>Single-strand</i> RNase	2 µl
H ₂ O	21 µl

Tabella2.6: Componenti per la reazione di digestione del dsRNA ottenuto con la trascrizione in vitro

Successivamente le molecole di dsRNA sono state purificate assemblando la reazione come mostrato nella Tabella 2.7.

Componenti	Quantità
dsRNA	50 µl
10X Binding Buffer	50 µl
100% Etanolo	250 µl
H ₂ O	150 µl

Tabella2.7: Componenti per la reazione di purificazione del dsRNA dopo la digestione.

Dopo aver preparato la miscela di purificazione, la reazione è stata caricata nelle colonnine "Filter Cartridge" fornite dal kit, centrifugata a 14.000 g per

2 min ed è stato allontanato l'eluato. Successivamente, sono stati aggiunti e centrifugati a 14.000 g per 2 min 500 µl della Wash Solution: tale passaggio è stato ripetuto due volte. Infine, sono stati aggiunti 100 µl della Elution Solution, incubati a 65°C per 2 min e centrifugati a 14.000 g per 2 min. Anche questo passaggio è stato ripetuto per due volte.

Il dsRNA è stato quantificato tramite lettura allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) di diluizioni 1:100 in H₂O sterile. La qualità e l'integrità delle molecole di dsRNA è stata nuovamente verificata, come descritto.

Il dsRNA aspecifico, utilizzato come controllo, è stato sintetizzato con la stessa strategia dalla sequenza genica dell'mGFP6 (Green Fluorescent Protein).

2.2.5 Somministrazione del dsRNA attraverso microiniezioni nella cavità emocelica

Per effettuare il saggio di RNAi, larve di *H. virescens* dell'ultimo giorno della IV età, sono state anestetizzate per immersione in acqua per 5-10 minuti. Dopo essere state asciugate su carta da filtro autoclavata, le larve sono state posizionate su parafilm. Con una siringa Hamilton Microliter 1701RNR 10µl (gauge 26s, lunghezza 55 mm, punta 2) è stato prelevato 1 µl di soluzione contenente la quantità di dsRNA prestabilita, che è stato iniettato nella membrana del collo, facendo attenzione a mantenere l'ago in posizione parallela rispetto al corpo, in modo da evitare di danneggiare i tessuti interni. Dopo due minuti di attesa, la larva è stata prelevata delicatamente con una pinzetta e trasferita in una provetta contenente la dieta, che è stata posta in camera climatica. Il dsRNA è stato iniettato in un'unica somministrazione, alla dose di 450 ng. Sono state realizzate 2 tesi: il trattato, costituito da larve che hanno ricevuto l'iniezione di dsRNA102, ed il controllo, dove le larve hanno ricevuto dsRNAGFP. Il saggio d'incapsulamento è stato effettuato a 12 e a 24 ore dalla somministrazione del dsRNA.

2.2.6 Somministrazione del dsRNA attraverso microiniezioni orali

Per effettuare il saggio di RNAi le larve di *H. virescens* di IV età primo giorno sono state anestetizzate previa immersione in acqua per 5-10 minuti. Dopo essere state asciugate su carta da filtro autoclavata, le larve sono state posizionate su parafilm. Con una siringa Hamilton Microliter 1701RNR 10 μ l (gauge 26s, lunghezza 55 mm, punta 3) è stato prelevato 1 μ l di soluzione contenente la quantità di dsRNA stabilita, che è stata somministrata oralmente ad ogni singola larva, infilando delicatamente l'ago della siringa direttamente nella cavità orale, facendo attenzione a non perforare l'intestino, ed estraendo poi l'ago con altrettanta delicatezza. Dopo due minuti di osservazione, per controllare che non rigurgitasse la soluzione, la larva è stata prelevata delicatamente con una pinzetta, trasferita in una provetta contenente la dieta e posta in camera climatica. Il dsRNA è stato iniettato oralmente alle larve per tre giorni (i tre giorni di durata della IV età), in due somministrazioni giornaliere, ogni 12 ore.

2.2.7 Saggio d'incapsulamento in larve di *H. virescens* interferite

L'esperimento di RNAi in *H. virescens* è stato effettuato somministrando alle larve rispettivamente 450 ng totali di dsRNA per iniezione emocelica e 1 ng, 4,5 ng, 45 ng, 100 ng, 200 ng e 450 ng di dsRNA per iniezione orale complessivamente in tre giorni, in due somministrazioni giornaliere. Per ogni dose di dsRNA somministrata è stata realizzata una prova costituita da due tesi: il trattato, consistente in larve a cui è stato somministrato dsRNA102; il controllo, costituito da larve a cui è stato somministrato dsRNAGFP. Ogni prova è stata realizzata in triplicato.

Per ogni tesi realizzata, 3 larve sono state destinate, 12 ore dopo l'ultima somministrazione di dsRNA, al saggio d'incapsulamento, effettuato come descritto nel paragrafo che segue, per valutare l'effetto sulla risposta immunitaria, e altre 4 larve sono state destinate ad esperimenti di qRT-PCR, per valutare l'avvenuto silenziamento del gene bersaglio. Di queste ultime

larve, a 2 sono state iniettate sfere CM sepharose fast flow, 12 ore dopo l'ultima somministrazione di dsRNA, al fine di valutare il livello trascrizionale in condizioni di stimolazione della risposta immunitaria. Dopo 12 ore tutte le larve destinate alla qRT-PCR sono state prelevate, lavate in acqua e EtOH 75%, poi in acqua RNAsi free, asciugate su carta da filtro autoclavata e congelate a -80°C prima di estrarne l'RNA.

2.2.8 Saggio d'incapsulamento *in vivo*.

Per effettuare il saggio di incapsulamento *in vivo* le larve di *H. virescens*, di V età primo giorno, sono state anestetizzate per immersione in acqua per 5-10 minuti, sterilizzate in etanolo al 70% e risciacquate in acqua sterile. Dopo essere state asciugate su carta da filtro autoclavata, le larve sono state posizionate su parafilm con il dorso rivolto verso l'alto. Con una siringa Hamilton Microliter (702RNR 25ul, gauge 22s, lunghezza ago 55 mm, punta 3) sono stati prelevati 5 μl di PBS 1X (20 mM fosfato di sodio pH 7.3; 150 mM NaCl.) contenenti circa 20 sfere cromatografiche CM Sepharose fast flow (Pharmacia), che sono state iniettate nella larva perforando la membrana del collo e mantenendo la siringa in posizione parallela al corpo della larva (Fig. 2.2), per evitare di danneggiarne l'intestino. L'ago della siringa è stato poi estratto con delicatezza, la larva è stata lasciata sul piano per due minuti, prelevata delicatamente con una pinzetta, trasferita in una provetta contenente la dieta e posta in camera climatica.



Figura 2.2: Iniezione delle sfere cromatografiche nella cavità emocelica di una larva di *H. virescens* di V età.

A 24 ore dall'iniezione le sfere iniettate sono state recuperate. Le larve, anestetizzate come sopra descritto, sono state posizionate con il ventre verso l'alto in 500 µl di soluzione anticoagulante MEAD (20 mM fosfato di sodio pH 7.3; 150 mM NaCl), decapitate con una microforbice e sezionate effettuando un taglio ventrale in direzione longitudinale, facendo attenzione a tagliare solo la cuticola, senza danneggiare l'intestino; quest'ultimo è stato rimosso con pinzette da dissezione e lavato in 500 µl di PBS per recuperare le sfere ad esso eventualmente adese. La parte rimanente della larva (esoscheletro e annessi) è stata lavata rivoltandola nel MEAD, e grattando delicatamente con la pinzetta per permettere il recupero di tutte le sfere. L'operazione è stata ripetuta spostando l'esoscheletro in una nuova goccia, costituita da 500 µl di PBS. Le sfere, individuate con l'ausilio di un microscopio stereoscopico, sono state recuperate con una pipetta Gilson, poste in 300 µl di PBS nei pozzetti di una piastra, ed osservate al microscopio ottico (Leica DM IRB Microsystem) per calcolare il grado d'incapsulamento.

L'indice d'incapsulamento complessivo per larva (indicato come I.I.%), è stato espresso da cinque gradi d'incapsulamento (Fig. 2.3), definiti come segue:

- 0 - nessuna cellula adesa alla sfera
- 1 - fino a 10 cellule adese
- 2 - più di 10 cellule adese ma con meno di uno strato completo
- 3 - uno o più strati completi ma senza melanizzazione
- 4 - uno o più strati completi con melanizzazione

L'indice d'incapsulamento è stato calcolato mediante la formula (Li *et al.*, 2007):

$$\text{I.I.(\%)} = [\sum (\text{grado d'incapsulamento} \times \text{totale sfere di questo grado}) / \text{totale sfere} \times 4] \times 100$$

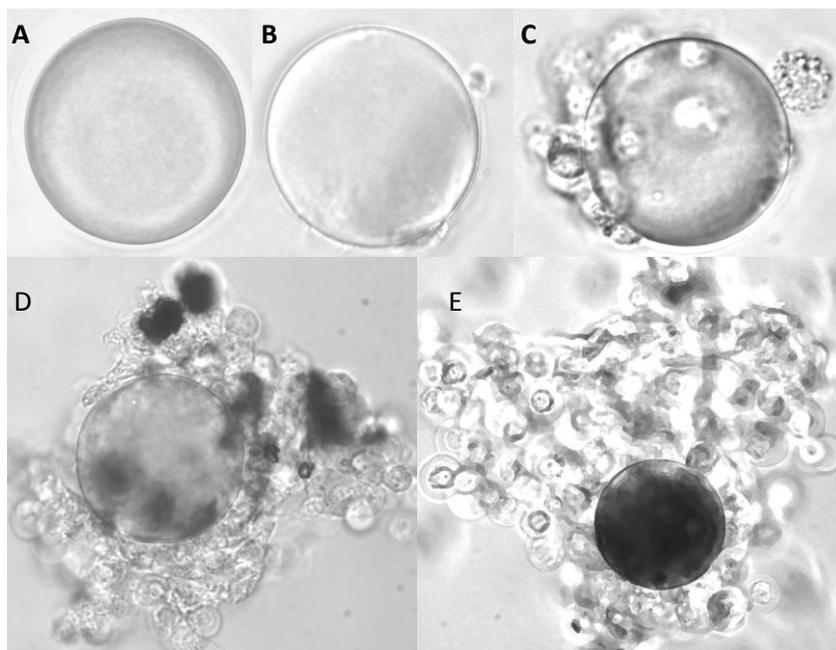


Figura 2.3: Gradi d'incapsulamento: A) 0 (nessuna cellula adesa alla sfera); B) 1 (fino a 10 cellule adese); C) 2 (più di 10 cellule adese ma meno di uno strato completo); D) 3 (uno o più strati completi ma senza melanizzazione); E) 4 (uno o più strati completi, con melanizzazione).

2.2.9 qRT-PCR

2.2.9.1 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto singolarmente dalle larve di *H. virescens* con TRIzol® Reagent (RNA extraction kit, Invitrogen, Carlsbad, CA), seguendo il protocollo suggerito dalla casa produttrice. A seguito di centrifugazione e precipitazione a freddo, il pellet di RNA risultante è stato risospeso in acqua con DEPC. La concentrazione di RNA totale è stata determinata misurando l'assorbimento a 260 nm, mentre la purezza è stata stimata calcolando il rapporto di assorbanza 260nm/280nm, utilizzando il biofotometro (BioPhotometer, Eppendorf). L'integrità dei campioni di RNA totale estratto da ogni singola larva è stata controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8 %, in condizioni denaturanti. I campioni di RNA sono stati conservati a -80 °C, fino al momento delle analisi successive.

2.2.9.2 SYBR-Green qRT-PCR

Per la quantificazione relativa del gene 102, l'RNA totale estratto dalle larve di *H. virescens* è stato sottoposto a Real Time-PCR (qRT-PCR), utilizzando il sistema "Applied Biosystems StepOne™ Real Time-PCR System 7900HT" a 48 pozzetti e come molecola intercalante del DNA il SYBR® Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Le coppie di primer (Tabella 2.8) sono state disegnate con il software Primer Express, version 1.0 (PE Applied Biosystems).

Nome	Primer	T _m
Hell02RT fw	5' CATGGCTGAGCTCAAGTCCAA 3'	60°C
Hell02RT rv	5' CGCGCTTAGCGAAGAACA 3'	59°C
SK4RT fw	5' GGGACCAACAAGGCAAGAAC 3'	62°C
SK4RT rv	5' TCGTCCTTGGGCTCTGTCA 3'	60°C

Tabella 2.8: Primer utilizzati nella qRT-PCR

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume finale di 20 µl e assemblate come indicato in Tabella 2.9.

Componenti	Quantità	Concentrazione
RT-PCR mix 2X	10 µl	1 X
Primer fw (10µM)	0,6 µl	300 nM
Primer rv (10µM)	0,6 µl	300 nM
RT-enzyme mix 125X	0,16 µl	1 X
H ₂ O	8,64 µl	

Tabella 2.9: componenti della reazione di qRT-PCR

Il ciclo termico adottato è riportato in Tabella 2.10.

Step	Cicli	Temperatura	Tempo
Holding Stage (Retro trascrizione)	1	48°C	30 min
	1	95°C	10 min
Cycling Stage (PCR)	40	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Melt Curve Stage	1	95°C	15 sec
		60°C	1 min
		95°C	15 sec

Tabella 2.10: Ciclo standard della qRT-PCR

2.2.9.3 Quantificazione relativa (metodo $\Delta\Delta Ct$)

I valori di Ct delle reazioni qRT-PCR sono stati mediati ed utilizzati per la quantificazione del titolo del target con il metodo del $\Delta\Delta Ct$. La quantità media di titolo del target di ciascun gruppo è stata normalizzata con l'SK come controllo endogeno, secondo la formula:

$$\Delta Ct = Ct(\text{target}) - Ct(\text{SK4RT}).$$

Il valore ΔCt di ciascun gruppo è stato confrontato con il valore del ΔCt utilizzato come calibratore, come da formula seguente: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{target}) - \Delta Ct(\text{calibratore})$. La quantità relativa è stata quindi calcolata utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Al fine di valutare la sensibilità del metodo sono state confrontate le efficienze delle reazioni qRT-PCR per il target e SK4 di diluizioni seriali, in triplicato, di un estratto totale quantificato allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) (t.q, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000). Per validare il metodo, è stato controllato che la retta di regressione ottenuta confrontando la quantità di target con i ΔCt avesse una curva con pendenza $<0,1$, indicando che le due efficienze sono approssimativamente uguali.

2.2.10 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con il software Statgraphics plus versione 3.0 (Statgraphics plus, 1997). Per l'analisi delle differenze nei

saggi di incapsulamento è stato utilizzato il test One-Way ANOVA, i risultati in termini di I.I. sono espressi come valore percentuale \pm la deviazione standard (SD). I risultati in termini di valori Ct sono stati espressi come valore medio \pm la deviazione standard (SD). Per l'analisi delle differenze nei saggi di incapsulamento è stato utilizzato il test One-Way ANOVA. Il test "t" di Student è stato usato, invece, per confrontare le medie ottenute dagli esperimenti di qRT-PCR.

2.3 Risultati

2.3.1 Produzione del dsRNA102 di *H. virescens* da clone.

La sequenza del dsRNA102 è complementare e inversa alla regione 5'UTR del gene 102 di *H. virescens*. Il vettore plasmidico pIZT/V5-His (Fig 2.1), è stato impiegato per effettuare una trasformazione mediante shock termico di cellule di *E. coli* DH5 α . Dalle colonie è stato isolato il DNA plasmidico e successivamente quantificato tramite elettroforesi su gel di agarosio (Fig. 2.4).

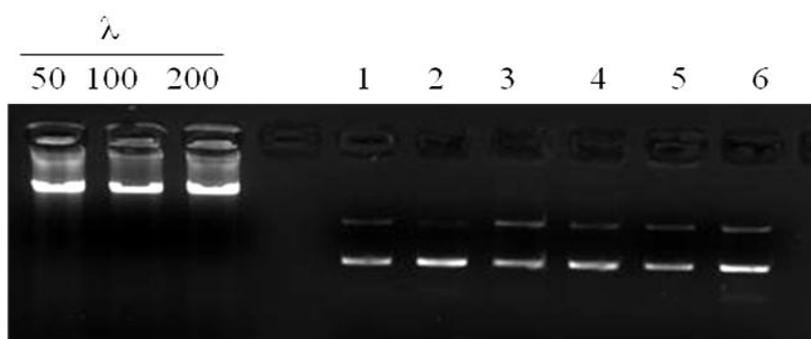


Figura 2.4 Quantificazione del DNA plasmidico. λ 50, 100, 200: DNA del fago λ nelle quantità di 50, 100, 200 ng; lane da 1 a 6: DNA del plasmide estratto da singole colonie.

Il DNA plasmidico estratto è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoR* I e *Sac* II. I due enzimi effettuano un taglio ai lati della sequenza

rc5'ntTnBV, generando, in questo modo, un frammento lungo circa 700 bp e un frammento di circa 2800 bp, corrispondente alla restante parte del vettore (Fig 2.5).

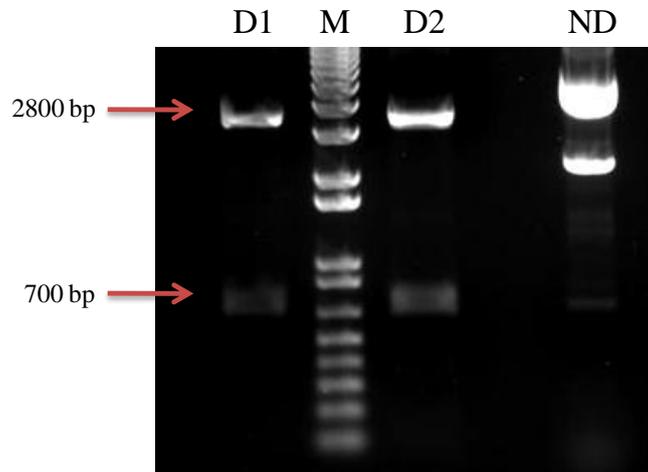


Figura 2.5: Digestione con la coppia di enzimi *EcoR* I e *Sac* II del DNA plasmidico estratto dai cloni 1 e 2. D1, D2: DNA plasmidico digerito; ND: DNA plasmidico non digerito; M: 1kb plus ladder (Invitrogen).

Con l'ausilio della coppia di primer T7 (T7-102 fw e T7-102 rw) è stato possibile produrre i frammenti di dsRNA102 a partire dalla sequenza del cDNA *rc5'ntTnBV*, utilizzando una strategia che si basa sulla trascrizione *in vitro* di sequenze stampo di DNA fiancheggiate dalla sequenza del promotore T7. I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio per verificare la presenza della banda di 650 bp attesa, corrispondente all'amplificazione del frammento *rc5'ntTnBV* (Fig. 2.6). Il prodotto di amplificazione è stato utilizzato come template per la sintesi *in vitro* delle molecole dsRNA tramite l'uso del MEGAscript RNAi kit.

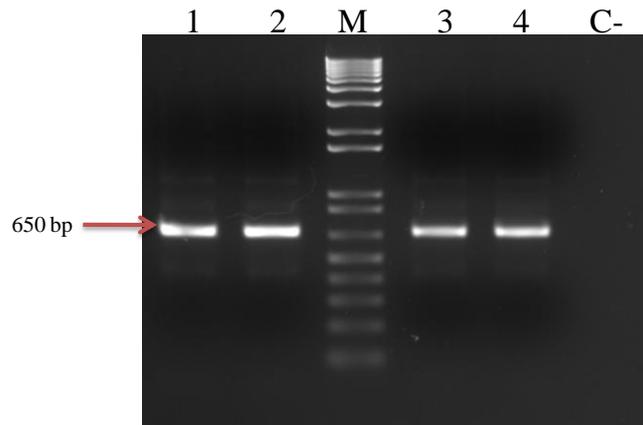


Figura 2.6: Amplificazione della sequenza *rc5'ntTnBV* con primer T7_102 fw/rv. Lane 1, 2, 3, 4: frammenti amplificati con primers T7_102 fw/rv; M: 1kb plus ladder (Invitrogen); C-: controllo negativo della PCR: mix privo di templato.

Il dsRNA102 ottenuto e purificato (650 bp) è stato sottoposto ad una elettroforesi su gel di agarosio 1% e poi quantificato tramite lettura allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf). Il dsRNA ottenuto e' stato stimato essere di circa 15 µg totali.

2.3.2 Esperimenti di RNAi in *H. virescens*

La somministrazione emocelica tramite microiniezione di dsRNA102 in larve di *H. virescens* di V età non ha prodotto l'inibizione della risposta d'incapsulamento, nè a 12 nè a 24 ore dalla somministrazione (Fig. 2.7). Gli indici di incapsulamento registrati per i controlli e i trattati non sono risultati statisticamente differenti al test ANOVA ($P = 0,6407$; $F=0,5672$; $n = 9$).

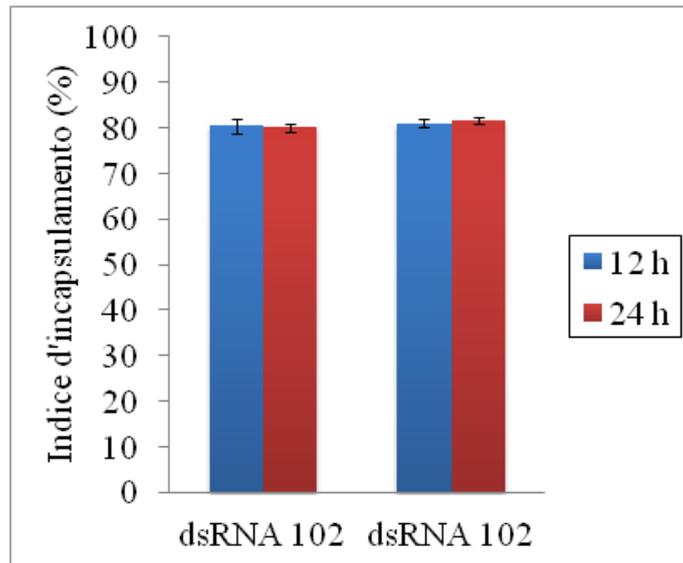


Figura 2.7: indice d'incapsulamento registrato a 12 e a 24 ore dall'interferenza

La somministrazione orale tramite microiniezione di dsRNA in larve di *H. virescens* di V età ha provocato, invece, un'inibizione della risposta immunitaria cellulare riscontrata con il mancato incapsulamento delle beads iniettate (Fig. 2.8). I valori ottenuti per l'I.I., confrontati mediante il test ANOVA, sono risultati statisticamente differenti ($p < 0,001$; $F = 1186,0$; $n=9$). In particolare, a partire dalla dose di 4,5 ng, si registra un significativo abbassamento del livello di incapsulamento delle microsferi iniettate, che diventa più marcato per i dosaggi sperimentali adottati più alti (Fig. 2.9).

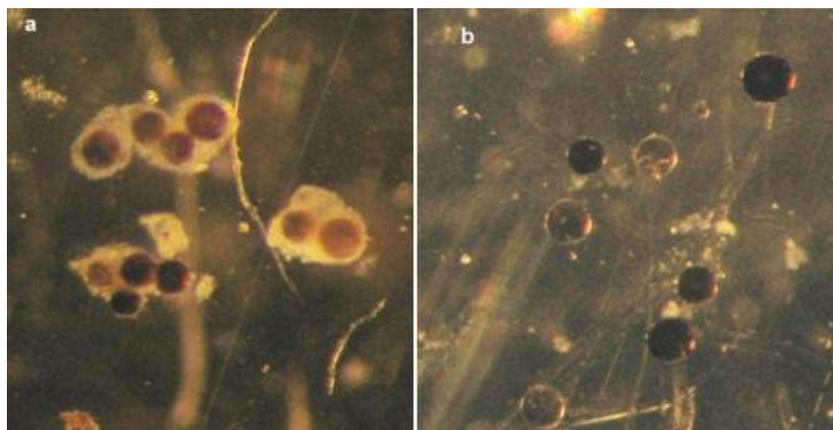


Figura 2.8: a) Le beads iniettate nelle larve controllo di *H. virescens* sono incapsulate e melanizzate; b) Le beads iniettate nelle larve di *H. virescens* interferite appaiono melanizzate ma non incapsulate.

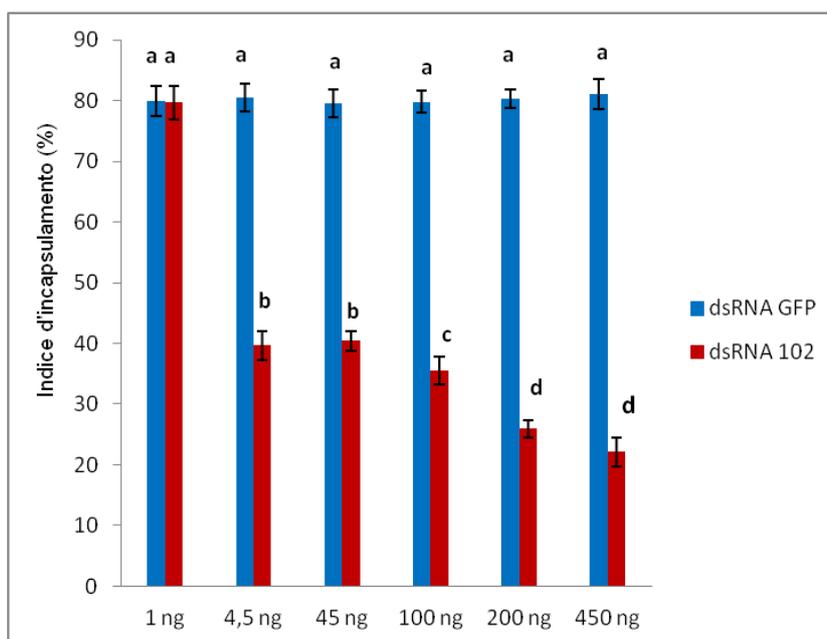


Figura 2.9: Indice di incapsulamento delle beads iniettate in larve di *H. virescens*, trattate con diverse dosi di dsRNA. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti ($p < 0,05$).

È interessante notare che nelle larve trattate con il dsRNA102, al ridotto livello di incapsulamento si associa l'attivazione di una reazione di melanizzazione sistemica, visualizzabile anche sulla superficie delle microsferi non incapsulate, che risulta letale per le larve di *H. virescens* (Fig. 2.10).



Figura 2.10: L'immagine mostra le larve controllo (a sinistra) confrontate con le larve interferite (a destra). Le larve iniettate con dsRNA102 muoiono dopo l'iniezione delle beads ed appaiono completamente melanizzate.

Pertanto, il fenotipo osservato sembra essere in linea con quanto prevedibile sulla base del silenziamento di un gene coinvolto nella produzione di una struttura molecolare di natura amiloide, coinvolta nella stretta localizzazione della reazione di melanizzazione (Falabella *et al.*, 2012).

2.3.3 qRT-PCR sulle larve di *H. virescens* sottoposte a RNAi

Per valutare se la somministrazione orale del dsRNA diretto contro il gene 102 provocasse una risposta RNAi e la sotto-regolazione del gene bersaglio nelle larve di *H. virescens* interferite sono stati condotti esperimenti di qRT-PCR utilizzando il metodo di quantificazione relativa. Per la validazione del metodo del $\Delta\Delta Ct$, 5 diluizioni seriali dell'RNA totale (4000; 400; 4; 0,4 e 0,004 ng) sono state confrontate con i valori dei ΔCt tra 102 e SK4. La curva risultante ha una pendenza $< 0,1$ e quindi il metodo è valido (Slope=0,0434; $R^2=0,04169$). Il livello del trascritto bersaglio nelle larve trattate con dsRNA diretto contro il gene 102 si riduce ad 1/3 di quello osservato nelle larve controllo ($P = 0,0872$; $t = 1,772$; $dF = 28$), ma tale differenza non è significativa, essendo il valore di P leggermente al di sopra del limite di 0,05 (Fig. 2.11).

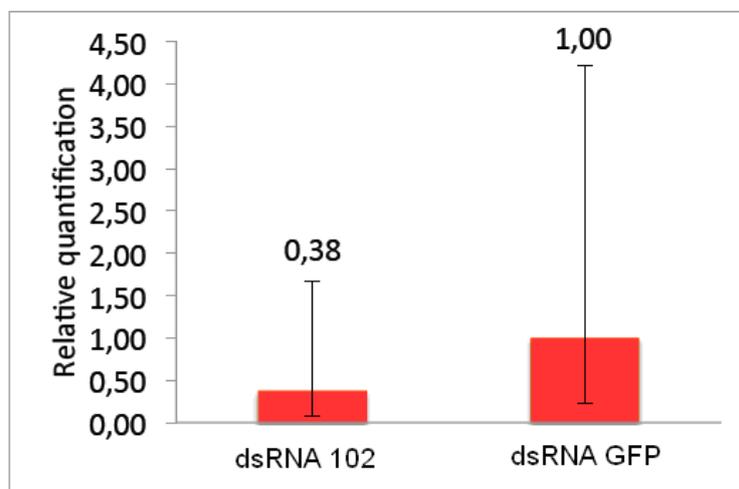


Figura 2.11: il livello di trascrizione del gene 102 delle larve trattate con dsRNA 102 non è statisticamente differente da quello registrato per le larve controllo ($P>0,05$)

Il livello del trascritto bersaglio risulta ridotto significativamente nelle larve trattate con dsRNA102, dopo stimolazione del sistema immunitario con l'iniezione di beads ($P = 0,0002$; $t = 4,218$; $df = 28$) (Fig. 2.12).

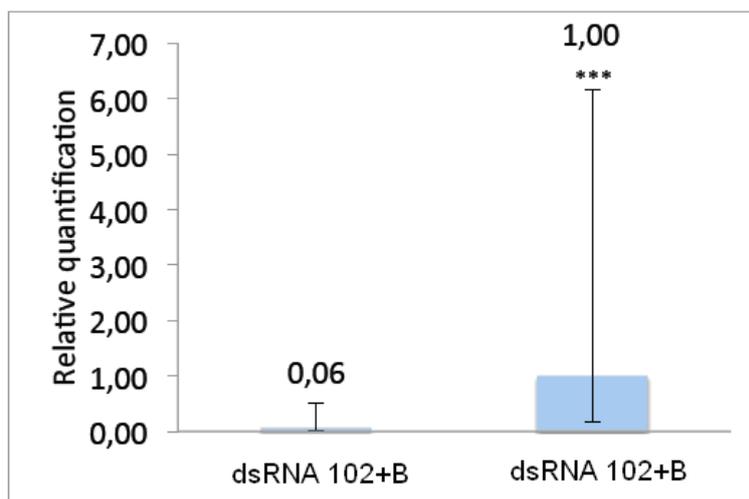


Figura 2.12: Il livello di trascrizione del gene 102 delle larve trattate con dsRNA 102 è statisticamente differente da quello registrato per le larve controllo dopo l'iniezione delle beads ($P > 0,0005$).

2.4 Discussione

T. nigriceps è un imenottero braconide, endoparassitoide di larve di lepidotteri, che inietta nell'ospite, *H. virescens*, insieme all'uovo, alle proteine ovariche e al veleno, un virus simbiote della famiglia dei Polydnviridae, *TnBV*. Questo virus è responsabile, come in molti altri sistemi analoghi (Webb e Strand, 2005; Pennacchio e Strand, 2006), della soppressione del sistema immunitario dell'ospite e di gravi alterazioni del suo sviluppo (Pennacchio *et al.*, 2001a, b; Pennacchio *et al.*, 1998a, b; Varricchio *et al.*, 1999; Falabella *et al.*, 2003; 2006). La sequenza completa del genoma di *TnBV*, così come quella già disponibile per altri polydnvirus, ha evidenziato la presenza di introni e di sequenze virali non codificanti, caratteri tipici degli organismi eucarioti (Espagne *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2006). Il ruolo delle porzioni codificanti dei genomi di polydnvirus è oggetto di numerosi studi e diversi fattori di virulenza sono stati isolati e caratterizzati (Pennacchio e Strand, 2006; Strand, 2012). Il

ruolo delle regioni non codificanti, presenti in maniera predominante nel genoma virale, non è stato invece ancora chiarito in nessuno dei polydnavirus conosciuti.

L'identificazione di un piccolo trascritto non codificante, *rc5'ntTnBV*, complementare al 5'UTR del gene 102, ha suggerito un suo ruolo regolativo nell'espressione di questo gene dell'ospite, coinvolto nella regolazione della risposta immunitaria. In particolare, sembrerebbe possibile che tale trascritto sia in grado di silenziare il gene 102 attraverso un meccanismo di RNAi. In attesa di effettuare studi *in vivo* in ospiti parassitizzati, si è voluto verificare sperimentalmente che il silenziamento del gene bersaglio putativo del trascritto virale non codificante fosse in grado di riprodurre il fenotipo immunosoppresso mostrato dalle larve ospiti parassitizzate. La scelta di tale approccio sperimentale è stata incoraggiata anche dal fatto che l'interferenza mediata da dsRNA sembra avere maggiore successo per quei geni coinvolti nella risposta immunitaria espressi negli emociti (Hirai *et al.*, 2004; Eleftherianos *et al.*, 2006a, b; 2009; Terenius *et al.*, 2011).

La somministrazione del dsRNA102 attraverso microiniezioni nella cavità emocelica non ha prodotto l'effetto RNAi atteso. Tuttavia, la somministrazione orale del dsRNA102 ha prodotto il fenotipo immunosoppresso atteso, a diverse dosi di dsRNA somministrato. Le larve trattate mostrano non solo il mancato incapsulamento delle beads cromatografiche, ma anche una melanizzazione sistemica e letale. Questo risultato conferma che le amiloidi derivanti dalla proteina 102 sono responsabili della localizzazione delle reazioni coinvolte nella melanogenesi e dell'attivazione dell'incapsulamento da parte degli emociti. Questi dati forniscono una prova indiretta della possibilità che il silenziamento del gene 102 *in vivo* possa effettivamente contribuire in modo significativo alla sindrome immunosoppressiva osservata nelle larve parassitizzate di *H. virescens*, che presentano livelli di espressione del gene 102 ridotti in corrispondenza dell'aumento del trascritto virale non codificante (Pennacchio *et al.*, dati non pubblicati).

La risposta differente alla somministrazione nella cavità emocelica rispetto a quella orale potrebbe essere dovuta a diverse condizioni degradative e alla presenza di diverse capacità di assorbimento del dsRNA, nonché alla

trasmissione sistemica del segnale di RNAi (Belles, 2010; Terenius *et al.*, 2011). La diversa presenza dei componenti molecolari coinvolti in questi processi nei differenti tessuti può fornire una possibile spiegazione per queste osservazioni discrepanti in funzione delle modalità di somministrazione. Per potere interpretare adeguatamente questa interessante osservazione è necessario comprendere come l'intestino sia in grado di assorbire dsRNA e quanto la dimensione di quest'ultimo sia importante nell'influenzare l'efficacia della somministrazione a larve di lepidottero, similmente a quanto si osserva in altri insetti (Huvenne e Smaghe, 2010). Verosimilmente, l'esito finale dipende da un equilibrio dinamico fra processi degradativi e di assorbimento di dsRNA di dimensione idonea ad innescare una risposta RNAi.

Nonostante la presenza di numerosi ortologi dei trasportatori di membrana *sid* presenti in *C. elegans*, poco si conosce sul loro ruolo di trasporto negli insetti, che sembra dipendere da altre vie di assorbimento, inclusa quella per endocitosi mediata da recettori (Saleh *et al.*, 2006; Ulvila *et al.*, 2006; Tomoyasu *et al.*, 2008; Price e Gatehouse, 2008; Huvenne e Smaghe, 2010; Xue-Yi Xue *et al.*, 2012). In questa ottica, il mesentero è una struttura potenzialmente idonea per l'assorbimento del dsRNA, in quanto presenta elevate capacità di assorbimento di macromolecole, attraverso meccanismi di endocitosi e di trasporto vescicolare che rendono possibile anche la somministrazione orale di macromolecole ad azione bioinsetticida con target molecolari a localizzazione emocelica (Pennacchio *et al.*, 2012). L'efficacia di questa potenziale via di ingresso di dsRNAs, da valutare sperimentalmente, potrebbe risultare in una pronta attivazione del pathway RNAi, visto che la funzione del complesso RISC è strettamente collegata al pathway endocitico (Siomi e Siomi, 2009a, b; Lee *et al.*, 2009) e che esiste un collegamento funzionale diretto tra la captazione del dsRNA da parte degli endosomi e la sua elaborazione da parte del complesso RISC a organelli dedicati alla degradazione dell'mRNA (Schneider *et al.*, 2006). La conoscenza in dettaglio di questi fenomeni di assorbimento e trasporto nelle specie di interesse è premessa indispensabile per lo sviluppo di strategie di controllo basate su tecnologie RNAi.

CAPITOLO 3

Identificazione dell'omologo del gene 102 in *Spodoptera littoralis* e sua analisi funzionale

3.1 Scopo del lavoro

Le osservazioni riportate nei capitoli precedenti consentono di concludere che il gene 102 svolge un importante ruolo nella risposta immunitaria in *H. virescens* e il suo silenziamento genera un fenotipo immunosoppresso, che riproduce, in parte, la sindrome osservata nelle larve parassitizzate da *T. nigriceps*. La funzione osservata lascia ipotizzare che, come noto per la maggior parte dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa, essa possa essere conservata anche in specie di lepidotteri correlate. Pertanto, si è voluto procedere a valutare questa ipotesi in una specie di interesse economico presente anche in Italia, al fine di potere trasferire proficuamente eventuali risultati di rilevanza applicativa. Lo scopo di questa parte del mio lavoro di dottorato è quello di identificare l'omologo del gene 102 in *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Nottuidae) e valutare gli eventuali effetti di un trattamento con dsRNA. Se fosse possibile riprodurre in *S. littoralis* gli stessi effetti a livello fenotipico e molecolare ottenuti somministrando dsRNA in *H. virescens* si potrebbe pensare all'interferenza del gene 102 attraverso RNAi come valido strumento di supporto alla lotta di *S. littoralis*, che è considerato tra gli insetti più temibili a livello mondiale in termini di danno economico.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Analisi bioinformatica

L'omologo del gene 102 di *S. littoralis* (102*Sl*) è stato identificato confrontando la sequenza del cDNA 102 di *H. virescens* (102*Hv*) con quelle presenti nelle banche dati utilizzando l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990; Gish e States, 1993) accessibile al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. La sequenza amminoacidica, tradotta dal cDNA 102*Sl*, è stata individuata utilizzando il programma di predizione genica GENSCAN (http://genes.mit.edu/cgi-bin/genscanw_py.cgi). Le regioni più conservate a livello amminoacidico sono state evidenziate utilizzando per l'allineamento multiplo ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

3.2.2 Materiale biologico

Le larve di *S. littoralis* sono state allevate singolarmente, a partire dal primo giorno della terza età larvale, in provette di plastica (cm 6 h X 2 ϕ), chiuse con cotone idrofilo, su dieta artificiale (Tabella 3.1).

Ingredienti	Quantità
Acqua	1140 ml
Farina di mais	189 g
Germe di grano	47,25 g
Lievito di birra	67,5 g
Agar agar	33,75 g
Vitamine	3 g
Olio di germe di grano	1,25 g
Ac. Ascorbico	6,75 g
Metylparaben	3 g
Propilparaben	0,5 g
Colesterolo	1,13 g

Tabella 3.1: Ingredienti per la dieta artificiale di *S. littoralis*

Gli stadi larvali di *S. littoralis* sono stati individuati su base morfologica e sincronizzate, per gli esperimenti da svolgere, come riportato in letteratura per *H. virescens* (Pennacchio *et al.*, 1992). Gli insetti sono stati tenuti in

camera climatica a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con umidità relativa pari al $70 \pm 5\%$ e regime fotoperiodico di 16 ore luce/ 8 ore buio.

3.2.3 Estrazione di RNA dagli emociti di *S. littoralis*

Le larve di *S. littoralis* sono state anestetizzate per immersione in acqua per qualche minuto, sterilizzate in etanolo 75% e risciacquate in acqua bidistillata sterile. Dopo essere state asciugate su carta da filtro autoclavata, le larve sono state posizionate su parafilm con il ventre rivolto verso l'alto per poter effettuare una piccola incisione a livello del terzo paio di zampe toraciche, con delle microforbici sterilizzate in etanolo 75%. Una leggera pressione sull'addome delle larve ha permesso la fuoriuscita dell'emolinfa, che è stata prelevata (50 μl di emolinfa/ larva) e raccolta in una eppendorf contenente 1 ml di PBS 1X freddo, mantenuto in ghiaccio. L'emolinfa è stata immediatamente centrifugata per 10 min a 300 g, 4°C , permettendo così agli emociti di depositarsi sul fondo dell'eppendorf. Il sovrinatante (prevalentemente plasma) è stato eliminato ed al pellet di emociti sono stati aggiunti 300 μl di TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il quantitativo di reagente da utilizzare è stato calcolato rispettando la proporzione secondo la quale 1 ml di TRIzol® è sufficiente per lisare $5\cdot 10^6$ cellule animali, vegetali e di lievito, o 10^7 cellule batteriche. La risospensione e l'omogeneizzazione del pellet è avvenuta pipettando ripetutamente il TRIzol® e agitando su vortex il campione. Quest'ultimo, infine, è stato centrifugato a 10000 g, per 10 min a 4°C per rimuovere eventuale materiale insolubile. Il sovrinatante, privo di impurità, è stato trasferito in una nuova eppendorf e lasciato 5 min a temperatura ambiente. In seguito, si è provveduto ad estrarre l'RNA come indicato dalla casa produttrice. Ogni campione di RNA estratto è stato quantificato allo spettrofotometro e caricato su gel di agarosio all'0,8%, in condizioni denaturanti, per valutarne la qualità. L'RNA è stato conservato a -80°C .

3.2.4 Produzione del dsRNA

3.2.4.1 Amplificazione del cDNA (RT-PCR)

Per le reazioni di amplificazione mediante la tecnica di RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) è stato preparato cDNA a partire dall'RNA totale (estratto dagli emociti di *S. littoralis*) utilizzando il RETROscript® Kit (Life technologies). La prima fase del processo prevede la denaturazione dell'RNA del quale 5 µl (circa 2 µg) sono stati prelevati, posti in 2 eppendorf diverse contenenti 5 µl di acqua e, rispettivamente, 2 µl di Oligo(dT) o 2 µl di decameri random. La miscela è stata pipettata delicatamente, agitata manualmente e centrifugata brevemente, quindi è stata messa nel termomixer a 85°C per 3 min, prelevata, posta in ghiaccio, centrifugata brevemente e nuovamente posta in ghiaccio. Sono state quindi aggiunte le altre componenti della RT-PCR (Tabella 3.2).

Componenti	Quantità
RNA denaturato	12 µl
10X RT Buffer	4 µl
dNTP mix	1 µl
M-MLV-RT	1 µl
Volume finale	20 µl

Tabella 3.2: Componenti della reazione di trascrittasi inversa

La miscela di reazione è stata agitata delicatamente, centrifugata brevemente e incubata a 42°C per 1 ora, dopo di che è stata posta a 92 °C per 10 min allo scopo di inattivare la Reverse Trascrittasi. Il cDNA ottenuto è stato letto allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) per la quantificazione e utilizzato immediatamente per effettuare delle amplificazioni PCR utilizzando una coppia di primer senso ed antisenso (Tabella 3.3) scelti sulla sequenza nucleotidica del cDNA 102*Sl*.

Nome	Sequenza
102S1 fw	3'-TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGC-5'
102S1 rv	3'-GGCCCAGAACATTCTCACCTC-5'

Tabella 3.3: Primer utilizzati per l'amplificazione della sequenza 580 bp del gene 102S1 necessaria per la produzione del amplificato con oligo T7.

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con 1 µl di cDNA in un volume finale di 50 µl (Tabella 3.4). Le condizioni di amplificazione sono indicate nella Tabella 3.5.

Componenti	Quantità
Prodotto della reazione RT	1 µl
10X PCR Buffer	5 µl
dNTP mix	2,5 µl
Acqua nucleasi-free	32,5 µl
102S1 fw (5 µM)	2,5 µl
102S1 rv (5 µM)	2,5 µl
DNA polimerasi termostabile (0,5 U/µl)	4 µl (2 U)
Volume finale	50 µl

Tabella 3.4: Componenti utilizzate nella reazione di amplificazione per ottenere il frammento da 580 bp.

	Cicli	Temperatura	Tempo
Denaturazione	1	94°C	2 min
Amplificazione	40	94°C	30 sec
		72°C	2 min
Estensione	1	72°C	5 min

Tabella 3.5: Condizioni di amplificazione del frammento da 580 bp.

Il prodotto ottenuto dalla reazione di amplificazione è stato sottoposto ad elettroforesi, quindi totalmente caricato su gel di agarosio allo 0,8 % ed osservato al transilluminatore. Il frammento da 580 bp è stato ritagliato con un bisturi, posto in microtubi eppendorf e purificato da gel, per centrifugazione, utilizzando il PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Life

technologies) come di seguito descritto. Poiché il gel di agarosio era stato preparato ad una concentrazione $\leq 2\%$ ed il peso del frammento recuperato era inferiore ai 400 mg, nell'eppendorf insieme al gel sono stati aggiunti 1,2 ml di Gel Solubilization Buffer del kit (L3). L'eppendorf è stato incubato a 50°C per 15 minuti, agitando ogni 3 minuti e controllando che il frammento di gel fosse totalmente disciolto, quindi è stato tenuto a 50°C per altri 5 minuti. Il gel disciolto è stato prelevato e posto in una colonnina per il recupero del frammento (Quick Gel Extraction Column) a sua volta inserita all'interno del Wash Tube (entrambi forniti dal kit), si è quindi provveduto a centrifugare a 10.000 g per 1 minuti a temperatura ambiente. L'amplificato è rimasto nel filtro e il Wash Tube è stato svuotato della soluzione di scarto. È stato quindi effettuato un lavaggio aggiuntivo con 500 μ l di L3, procedendo a centrifugare a 10.000 g per 1 minuto a temperatura ambiente e a svuotare nuovamente il Wash Tube. A questo punto nella colonnina sono stati aggiunti 700 μ l di Wash Buffer (W1), preventivamente addizionato di etanolo 100%, e si è lasciato agire la soluzione a temperatura ambiente per 5 min, procedendo a centrifugare a 10.000 g per 1 minuto a temperatura ambiente. Il Wash tube è stato svuotato nuovamente. Allo scopo di eliminare totalmente le tracce del W1 è stata effettuata una centrifugazione aggiuntiva a 10.000 g per 1 minuto a temperatura ambiente. Quindi la colonnina è stata inserita in un "Recovery Tube" per il recupero dell'amplificato. Sul filtro della colonnina sono stati aggiunti 50 μ l di Elution Buffer (E5), è stato lasciato 1 minuto a RT e, quindi si è provveduto a centrifugare 2 minuti a 10.000 g. Il prodotto di amplificazione presente all'interno del Recovery Tube è stato quantificato allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) e conservato a -20°C.

3.2.4.2 PCR con oligo contenenti la sequenza del primer T7

La reazione di PCR è stata eseguita sul cDNA ottenuto con i primer T7_102Sl fw e T7_102Sl rv (Tabella 3.6), utilizzando il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System con la Platinum® Taq High Fidelity. La reazione è stata assemblata come mostrato nella Tabella 3.7. Le condizioni di amplificazione sono indicate nella Tabella 3.8.

Nome	Sequenza
T7_102 <i>Sl</i> fw	5'-TAATACGACTCACTATAG GGAGAACCTCCTGAGCGTGCCTGA-3';
T7_102 <i>Sl</i> rv	5'-TAATACGACTCACTATAG GGAGGGAGTGCTGCTTCAGAATCAT-3'

Tabella 3.6: Primer T7_102*Sl* fw/rv per ottenere l'amplificato da 496 bp necessario per la produzione di dsRNA *in vitro*.

Componenti	Quantità
cDNA	5 µl
2X Reaction Mix	25 µl
SuperScript™ III RT/ Platinum [®] Taq High Fidelity Enzyme Mix*	1 µl
T7_102 <i>Sl</i> fw (10 µM)	1 µl
T7_102 <i>Sl</i> rv (10 µM)	1 µl
Acqua nucleasi-free	17 µl
Volume finale	50 µl

Tabella 3.7: Componenti utilizzate nella reazione per la produzione del frammento da 496 bp.

Fase	Cicli	Temperatura	Tempo
Denaturazione	1	95°C	4 min
Amplificazione	40	94°C	30 sec
		59°C	30 sec
		72°C	2 min
Estensione	1	72°C	5 min

Tabella 3.8: Condizioni di amplificazione del frammento da 496 bp.

Sono stati prelevati 5 µl dell'amplificato ottenuto che sono stati caricati e fatti correre su gel d'agarosio allo 0,8% per valutarne la qualità. Si è quindi provveduto a purificare il campione con fenolo-cloroformio portando la soluzione di cDNA ad un volume minimo di 100 µl con acqua ed aggiungendo 1 volume di una soluzione contenente fenolo e cloroformio in proporzione 1:1. Dopo aver miscelato, il campione è stato centrifugato per 2 minuti a 13.000 g per separare la fase acquosa (contenente gli acidi nucleici)

da quella organica. Il surnatante (circa 100 μ l) è stato prelevato, posto in un microtubo eppendorf e precipitato con l'aggiunta di 0,1 volumi di sodio acetato 3M, pH 5,2 e 2,5 volumi di EtOH 100%. Il tutto è stato miscelato, posto a -80°C per 20 minuti e immediatamente centrifugato a 14.000 g per 30 minuti a 4°C. Il sovrinatante è stato eliminato ed il pellet lavato con 500 μ l di EtOH 70% per 5 minuti a temperatura ambiente, asciugato e risospeso in 20 μ l di acqua bidistillata.

3.2.4.3 Trascrizione *in vitro* delle molecole di dsRNA

Per la trascrizione *in vitro* delle molecole di dsRNA è stato utilizzato il MEGAscript RNAi kit (Ambion), come descritto nel Capitolo 2.

3.2.5 RNAi in larve di *S. littoralis*

Per effettuare il saggio di RNAi in larve di *S. littoralis* è stato somministrato il dsRNA102*Sl* previa microiniezioni nella cavità orale, come descritto per *H. virescens* nel Capitolo 2 .

3.2.6 Saggio d'incapsulamento in larve di *S. littoralis* interferite

In *S. littoralis* l'esperimento di RNAi è stato condotto somministrando oralmente alle larve 4,5 ng, 45 ng, e 450 ng di dsRNA complessivamente per tre giorni, in due somministrazioni giornaliere. Per ogni dose di dsRNA somministrata è stata realizzata una prova costituita da due tesi: il trattato è costituito in larve a cui è stato somministrato dsRNA102*Sl*; il controllo è costituito da larve a cui è stato somministrato dsRNAGFP. Ogni prova è stata realizzata in triplicato. Per ogni tesi realizzata 3 larve sono state destinate, 12 ore dopo l'ultima somministrazione del dsRNA, al saggio d'incapsulamento effettuato come descritto nel Capitolo 2, per valutare l'effetto sulla risposta immunitaria, e altre 4 larve sono state destinate ad esperimenti di qRT-PCR, per valutare il livello di trascrizione del gene

bersaglio. Di queste ultime larve, 2 hanno ricevuto un'iniezione di beads cromatografiche CM sepharose fast flow, 12 ore dopo l'ultima somministrazione di dsRNA, al fine di valutare il livello trascrizionale in condizioni di stimolazione della risposta immunitaria. Dopo 12 ore tutte le larve destinate alla qRT-PCR sono state prelevate, lavate in acqua, in EtOH 75% e acqua RNAsi free, asciugate su carta da filtro autoclavata e congelate a -80°C prima di estrarne l'RNA.

3.2.7 qRT-PCR

3.2.7.1 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dalle larve di *S. littoralis* come descritto nel Capitolo 2 per *H. virescens*.

3.2.7.2 Real time PCR: quantificazione relativa

Per la quantificazione relativa del gene 102, l'RNA totale estratto dalle larve di *S. littoralis* è stato sottoposto a Real Time-PCR (qRT-PCR), utilizzando il sistema “Applied Biosystems StepOne™ Real Time-PCR System 7900HT” a 48 pozzetti e come molecola intercalante del DNA il SYBR® Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Le coppie di primer (Tabella 3.9) sono state disegnate con il software Primer Express, version 1.0 (PE Applied Biosystems).

Nome	Primer	Tm
102 _{STRT} fw	5' GGC GGTGTCGTCGATTATG 3'	60°C
102 _{STRT} rv	5' GAGCGAGGAAATGTTCAAT 3'	54°C
β -ActinRT fw	5' CCGTCTTCCCATCCATCGT 3'	59°C
β -ActinRT rv	5' CCTTCTGACCCATACCAACCA 3'	60°C

Tabella 3.9: Primer utilizzati nella qRT-PCR

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume finale di 20 μl , assemblata come indicato in Tabella 3.10. Il ciclo termico adottato è riportato nella Tabella 3.11.

Componenti	Quantità	Concentrazione
RT-PCR mix 2X	10 μl	1 X
Primer fv (10 μM)	0,4 μl	200 nM
Primer rv (10 μM)	0,4 μl	200 nM
RT-enzyme mix 125X	0,16 μl	1 X
H ₂ O	9,04 μl	

Tabella 3.10: Componenti della reazione della qRT-PCR.

Step	Cicli	Temperatura	Tempo
Holding Stage (Retro trascrizione)	1	48°C	30 min
	1	95°C	10 min
Cycling Stage (PCR)	40	95°C	15 sec
		54°C	1 min
Melt Curve Stage	1	95°C	15 sec
		60°C	1 min
		95°C	15 sec

Tabella 3.11: Ciclo standard della qRT-PCR.

3.2.7.3 Quantificazione relativa (metodo $\Delta\Delta\text{Ct}$)

I valori di Ct delle reazioni qRT-PCR sono stati mediati ed utilizzati per la quantificazione del titolo del target con il metodo del $\Delta\Delta\text{Ct}$. La quantità media di titolo del target di ciascun gruppo è stata normalizzata con β -Actin come controllo endogeno, secondo la formula:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{target}) - \text{Ct}(\beta\text{-Actin}).$$

Il valore ΔCt di ciascun gruppo è stato confrontato con il valore del ΔCt utilizzato come calibratore, come da formula seguente:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{target}) - \Delta Ct(\text{calibratore}).$$

La quantità relativa è stata quindi calcolata utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Al fine di valutare la sensibilità del metodo sono state confrontate le efficienze delle reazioni qRT-PCR per il gene target e per il gene endogeno di diluizioni seriali, in triplicato, di un estratto di Rna totale quantificato allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) (t.q. 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) Per validare il metodo, la retta di regressione ottenuta confrontando la quantità di target con i ΔCt deve avere una curva con pendenza $<0,1$, indicando, così, che le due efficienze sono approssimativamente uguali.

3.2.8 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati sperimentali è stata effettuata con il software Statgraphics plus versione 3.0 (Statgraphics plus, 1997). I dati relativi al saggio d'incapsulamento sono stati analizzati con il test One-Way ANOVA, i risultati in termini di I.I. sono espressi come valore percentuale \pm la deviazione standard (SD). I risultati in termini di valori Ct sono stati espressi come valore medio \pm la deviazione standard (SD). Il test "t" di Student è stato usato invece per confrontare le medie ottenute dagli esperimenti di qRT-PCR.

3.3 Risultati

3.3.1 Identificazione del cDNA 102 in *S. littoralis*

L'analisi è stata condotta confrontando la sequenza nucleotidica del cDNA 102 H_v presente in banca dati (accession number: FR751090.1) con un'analisi "Blastn". L'omologo del cDNA 102 H_v è stato identificato in una libreria EST (Expressed Sequences Tags) ottenuta da antenne di maschio di *S. littoralis* (accession number: FQ016824.1). Il cDNA 102 S_l , lungo 1355 nt, mostra un'identità dell'84% con il cDNA 102 H_v , lungo 1804 nt (dati non mostrati). Le regioni codificanti (ORF) dei due cDNA102 confrontate con

BLAST2 sequences (bl2seq) mostrano un'identità di sequenza pari all'87% (Fig. 3.1).

```

cDNA102 Hv  TGGTGTATTGGGTTGTTTGGCGGTTGTCGGCGCTGACGACTTGGCACATGCAGCGGGCC  118
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  TGGTTTTATTGGTTTGTGGCGGCAAGCCGGGCCGACGACTTCGGACAAGCAGCGGGCC  73

cDNA102 Hv  AAATCTTCAACAACTTTTGCCTCACTTGATCACCATTCCGTGACCGGTGACGCAAGGAA  178
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  AGATCTTCAACAGCATCTTACCCAATCTGATCAGCAACTCTGTGACTGGTCAACAAGGAA  133

cDNA102 Hv  ACACAGCGACC AACACTCTTCAGCAAATAGGCACAGTTGTCGGCGGAGTCTGTAGACTATG  238
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  ACACTGCTACCAACTCTTCAGCAGATAGGAACCGTAGTAGCGGTGTCGTGACTATG  193

cDNA102 Hv  CCAAGAAGAAGAGCTACGAGGACCTGCTGCCGTCAGTCAAGTCAAGACTCCACCACGGATGAAG  298
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  CCAAGAAGAAGAGCTACGAGGATCTGCTGCCGTCAGGTCAGGACTCCACCACAGATGAAG  253

cDNA102 Hv  ACATCCTGCGCGTGAGTGAGGAAATGTTCAACGCGGATATCAACAATGCATTAGCTTACA  358
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  ATATCCTGAGAGTGAGCGAGGAAATGTTCAATGCGGACATCAACAACGCTTTGCCATACA  313

cDNA102 Hv  TCCAAGTTAATCTGCAAAGGCAAAGACCAGCCACTATCGAAGGATGACAAAAGCCCAAGCA  418
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  TCCAAGTAAATTTGCAAAGGCCAAACCAGCGCTCTGTCGAAGGACGACAAAAGCACCCTCAA  373

cDNA102 Hv  ACCTCCTGAGCGTGCCGAAAAACGCTGTGGAATGGTCCAAACAATAAGGCCATTGCTGCAC  478
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  ACCTCCTGAGCGTGCCGAGAACGCTGTGGAATGGTCCAAACAATCAGGCTTTTGCTGCCC  433

cDNA102 Hv  TCTTCGACAATTACCACAAAAACGCTGATAAGACCAGAATTCGTCACGCCCAATGAGGAAA  538
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  TCTTTGACAACATACCACAAAAACGCTGATAAGGCCAGAATTCGTCACACCTAATGAGGAAA  493

cDNA102 Hv  CGGAACAAGTCACTTTTATAAACACAATCCTTGCACCGGACCAATTAGGAGTCTGATGA  598
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  CGGAACAAGTCACTTTTATAAACACAATCCTTGCACCGGCGGCGGCACTCAGGAGTCTAATGA  553

cDNA102 Hv  ACTTTTTGGTTAGCAAAGGCCCTTACCCAAATGAACGAGTACAACGAGCAGGTAGAGCTGC  658
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  ACTTTTTGGTCAGCAAAGGTTTGACTCAGATCAATGAATACAATGAGCAAAGTCAACTGC  613

cDNA102 Hv  TGAAGAAGATCTGGTTACAGGAAGTACGCGGCCACTGGACCGGCTGTGCAAGTGCAGCT  718
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  TGAAGAAGATCTGGTTACAGGAAGTACGCGGCCACTGGACCGGCTGTGCAAGTGCAGCT  673

cDNA102 Hv  GCGCCTTCGAGAACATCTTCATGGCTGAGCTCAACTCCAACGACGTGCTCGGCCCTCCACA  778
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  GCGCCTTCGAGAACATTTTTCATGGCGCAACTTAACTCCAACGACGTACTTGACTCCACA  733

cDNA102 Hv  GCTGGTTGTCTTTCGCTAAGCGGCAACAAGATCGCAAAGCCAAATTACTTTGGGCTACTTGG  838
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  GTTGGCTGTCTTTCGCCAAGCGTGAACAAGATCGCAAAGCCAAATTACTTAGGCTACATAG  793

cDNA102 Hv  ATAAACTAGATCTGTCCGGGAAA-GGAA  865
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
cDNA102 SI  ACAAAC TGGATCTCTCCTGGAAAAGGAA  821

```

Figura 3.1: Allineamento delle sequenze nucleotidiche della ORF del cDNA 102_{Hv} e della ORF del suo omologo cDNA 102_{Sl}. Le due sequenze mostrano un'omologia dell'87% .

Il cDNA 102_{Sl} codifica per una proteina attesa di 274 aa (P102_{Sl}) appartenente alla famiglia XendoU. L'allineamento multiplo della sequenza proteica della P102_{Sl} con la P102 di *H. virescens* (CBY85302.1) di 364 aa (P102_{Hv}) e con la proteina di *L. obliqua* (AAV91433.1) di 280 aa, ha mostrato un'identità di sequenza amminoacidica del 92% tra la proteina

P102Hv e la P102Sl e del 62% tra la P102 Sl e quella di *L. obliqua* (Fig. 3.2).

```

S. littoralis -----MKIVLVLLVCLAASRADDGQAAAGQIFNSILPNLISNSVTGQQGN
H. virescens MILIALETTYFILSKMKLALVLLGCLAVCRADDLHAAGQIFNNILPNLITNSVTGQQGN
L. obliqua -----

S. littoralis TATNTLQQIGTVVGGVWDYAKKKSIEDLLRQVQDSTTDEDILRVSEEMFNADINNALPYI
H. virescens TATNTLQQIGTVVGGVWDYAKKKSIEDLLRQVQDSTTDEDILRVSEEMFNADINNALAYI
L. obliqua -----MLRQIQDSTTDDDLLRISEEMFNADINNAFNYI
: ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : **

S. littoralis QVNLQQTSALESKDDKAPSNLLSVPENVVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNEET
H. virescens QVNLQGTSPLSKDDKAPANLLSVPENVVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNEET
L. obliqua QVNLQGTSPMSKNDKATSLLNVPENVWWSGPTIRPFVSLFDNYHKNVIRPGFITPNEET
***** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : **

S. littoralis EQVTFINTILATGPIRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVELLKKIWFTRYARHWTGLCKCSC
H. virescens EQVTFINTILATGPIRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVELLKKIWFTRYARHWTGLCKCSC
L. obliqua EQTTYINTILATGPIRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVELLKKIWFTRYARHWTGLCKCSC
** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : ** : **

S. littoralis AFENIFMAELKSNLVLGLHSWLFYAKREQDRKANYLCYIDKLDLSWKRK-----
H. virescens AFENIFMAELKSNLVLGLHSWLFYAKREQDRKANYLCYLDKLDLSGKGMILKQHSILSET
L. obliqua AFENIFMAELKSDTVLGLHSWLFYAKRELDKANYLCYIDKLDLSGKGLILKQHSILSDT
***** : ***** : *** ***** : ***** *

S. littoralis -----
H. virescens KDAPEVTHFVGTSPLEVALYTHCFMARPD RPCLRYNNINFSIQTKTLKSDNVLIDTA
L. obliqua KDAPEVHMFVGTSPLELTAlyTLCFMARPD RPCKLRyNNVAFTIQTKTLKSDNAIPIDTA

S. littoralis -----
H. virescens YPFY---
L. obliqua YPLWENS

```

Figura 3.2: Allineamento delle sequenze amminoacidiche della proteina XendoU di *L. obliqua*, della P102 di *H. virescens* del prodotto di traduzione del cDNA dell'omologo del gene 102 di *S. littoralis*. Gli asterischi in rosso indicano identità amminoacidica tra tutte e tre le proteine.

3.3.2 Produzione del dsRNA102 di *S. littoralis*

Il frammento di cDNA da utilizzare come template per la produzione del dsRNA102 di *S. littoralis* è stato amplificato tramite PCR, utilizzando primer appositamente scelti (con il programma Primer Express, version 1.0 PE Applied Biosystems), a partire dall'RNA totale estratto dagli emociti di larve di *S. littoralis* di V età, primo giorno. Un'aliquota dell'RNA totale ottenuto è stata caricata su gel di agarosio allo 0,8 % in condizioni denaturanti per valutarne la qualità (Fig. 3.3). L'RNA ottenuto è stato quantificato allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) il campione 1 è risultato 669,8 ng/µl e il campione 2 483,5 ng/µl.

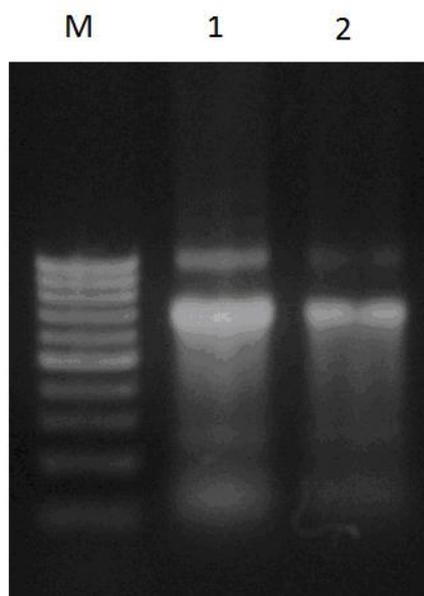


Figura 3.3: Lane 1 e 2: RNA totale estratto dagli emociti di 10 larve di *S. littoralis* V età primo giorno; M:1kb plus ladder (Invitrogen).

A partire dai due campioni di RNA totale è stato preparato il cDNA effettuando una RT-PCR utilizzando il RETROscript® Kit (Life technologies). I 50 µl della reazione sono stati caricati su gel di agarosio 0,8% per valutarne la qualità. È stata ottenuta la banda di 580 bp attesa. L'amplificato è stato recuperato e purificato da gel ed è stata effettuata una lettura allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf). Il campione 1 conteneva 33 ng/µl e il campione 2 conteneva 17 ng/µl di cDNA. I campioni sono stati sottoposti precipitazione in sodio acetato 3M ed EtOH 100%. Il cDNA è stato risospeso in 20 µl di acqua bidistillata. È stata effettuata una seconda amplificazione sui due campioni, per ottenere una quantità di template più consistente, quindi su gel di agarosio allo 0,8%, sono stati caricati 3 µl della reazione per valutare la qualità del template ottenuto ed è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) per la quantificazione. È stata ottenuta la banda di 580 bp attesa (Fig. 3.4).

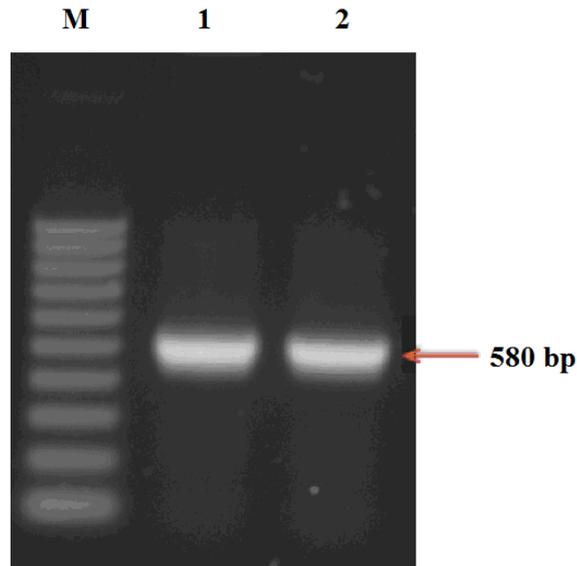


Figura 3.4: Amplificazione del prodotto di RT. Lane 1, 2: amplificato ottenuto con i primers 102*SI* fw/rv (580 bp); M: 1kb plus ladder (Invitrogen).

A partire dall'amplificato di 580 bp è stata effettuata una PCR con gli oligo T7, per ottenere il template di partenza necessario per produrre il dsRNA102*SI*. Sono state avviate tre reazioni a partire da 5 µl di template. La qualità del template ottenuto è stata controllata attraverso corsa elettroforetica gel di agarosio allo 0.8%. È stata ottenuta la banda di 469 bp attesa (Fig. 3.5).

Si è quindi provveduto alla lettura allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) per quantificare il template ottenuto.

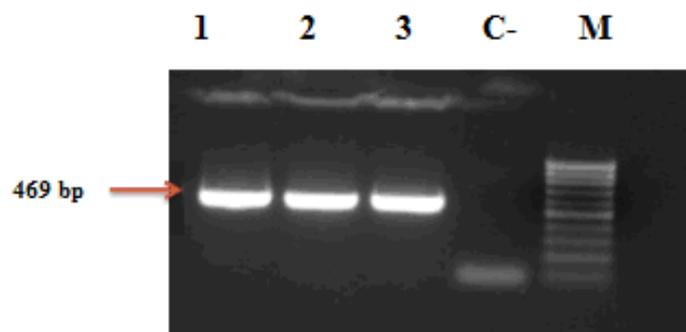


Figura 3.5: Amplificazione della sequenza da 469 bp con i primer T7_102*SI* fw e T7_102*SI* rv . Lane 1, 2, 3: frammenti amplificati con primers T7_102Spli fw/rv; C-: controllo negativo della PCR: mix priva di template. M:1kb plus ladder (Invitrogen).

Il prodotto di amplificazione (2 μ l) è stato utilizzato come template per la sintesi *in vitro* delle molecole dsRNA102*Sl* tramite l'uso del MEGAscript RNAi kit. Il dsRNA102*Sl* (469 bp) ottenuto e purificato è stato sottoposto ad una elettroforesi su gel di agarosio 0,8 % e poi quantificato tramite lettura allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf). Sono state avviate 5 reazioni ottenendo un totale di circa 480 μ g di dsRNA.

3.3.3 RNAi in larve di *S. littoralis*

La somministrazione orale tramite microiniezione di dsRNA102*Sl* in larve di *S.littoralis* di V età ha provocato un'inibizione della risposta immunitaria cellulare, evidenziata dal mancato incapsulamento delle beads iniettate .

Le larve trattate mostrano una marcata inibizione dell'incapsulamento delle beads (Fig. 3.6a e b) ma, diversamente a quanto osservato in larve di *H. virescens*, non si ha la melanizzazione sistemica e le larve sopravvivono regolarmente al trattamento (Fig. 3.7).

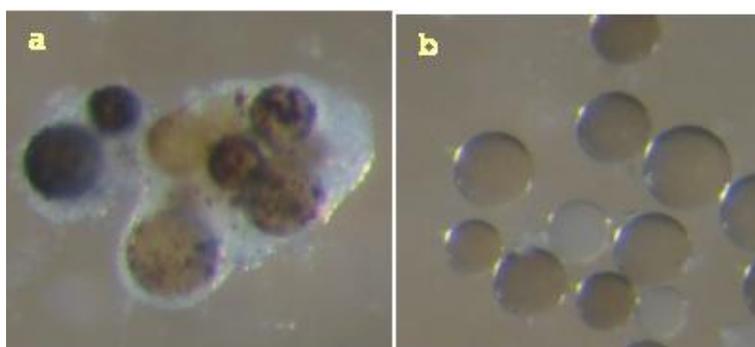


Figura 3.6: a) Beads iniettate in larve di *S. littoralis* trattate con dsRNA GFP; b) beads iniettate in larve trattate con il dsRNA102*Sl*. Le beads recuperate dalle larve interferite con il dsRNA102*Sl* risultano leggermente melanizzate ma non incapsulate.

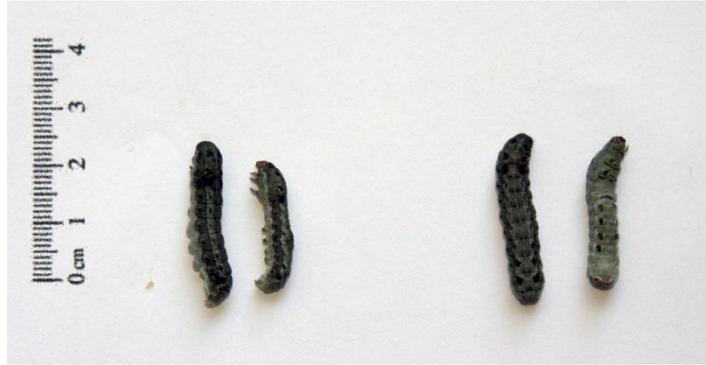


Figura 3.7: La foto mostra le larve controllo (a sinistra) paragonate alle larve trattate con dsRNA102Sl (a destra). Non si riscontrano evidenti alterazioni fenotipiche.

I valori ottenuti per l'I.I. (Fig. 3.8) risultano significativamente ridotti per le larve trattate con dsRNA102Sl rispetto ai controlli ($p < 0.001$; $F = 7916.3$; $n = 9$). La riduzione della capacità d'incapsulamento risulta molto più marcata per i dosaggi di dsRNA102Sl più elevati.

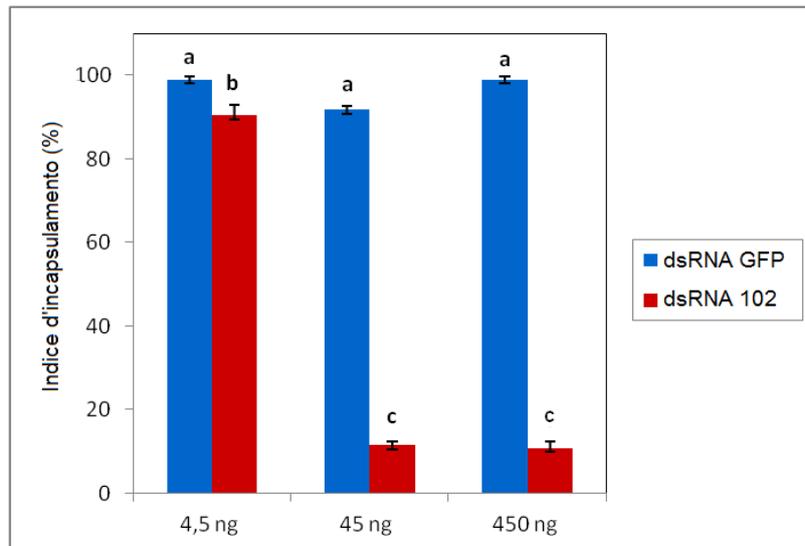


Figura 3.8: La somministrazione orale di molecole di dsRNA dirette contro il trascritto del gene 102Sl inibisce la risposta d'incapsulamento delle larve di *S. littoralis*. Nel grafico lettere differenti indicano differenze statistiche nel test ANOVA ($P < 0,001$).

3.3.4 Analisi trascrizionale con RT PCR quantitativa (qRT-PCR)

Per valutare se la somministrazione orale del dsRNA diretto contro il gene 102 provocasse una risposta RNAi e la sotto-regolazione del gene bersaglio nelle larve di *S. littoralis* interferite, sono stati condotti esperimenti di qRT-PCR utilizzando il metodo di quantificazione relativa. Per la validazione del metodo del $\Delta\Delta C_t$ 5 diluizioni seriali dell'RNA totale (5000; 500; 5; 0,5 e 0,005 ng) sono state confrontate con i valori dei ΔC_t di 102*Sl* e β -Actin. La curva risultante ha una pendenza $<$ di 0,1 e quindi il metodo è valido. (Slope=0.0154; $R^2=0.0776$). Nell'esperimento larve di *S. littoralis* iniettate oralmente con il dsRNA diretto contro la GFP sono state usate come controllo. Nelle larve interferite con i diversi dosaggi di dsRNA102*Sl* il livello del trascritto target risulta significativamente ridotto paragonato con quello delle larve controllo ($P < 0.0001$; $t = 5,348$; $df = 28$) (Fig 3.9).

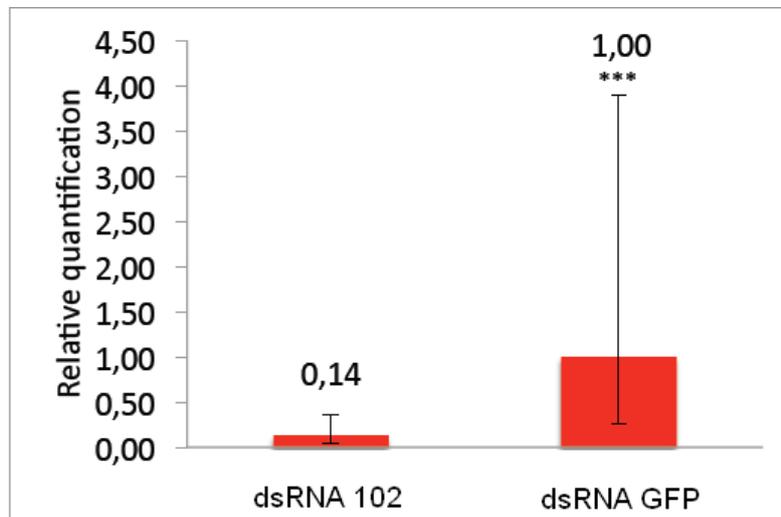


Figura 3.9: il livello di trascrizione del gene 102 delle larve trattate con dsRNA102*Sl* è statisticamente differente da quello registrato per le larve controllo ($P < 0,0001$)

Nelle larve iniettate oralmente con dsRNA102*Sl* il cui sistema immunitario è stato stimolato dall'iniezione di beads cromatografiche dopo il trattamento, il livello del trascritto target risulta significativamente ridotto se

paragonato con quello delle larve controllo ($P = 0,0009$; $t = 5,733$; $df = 28$) (Fig 3.10).

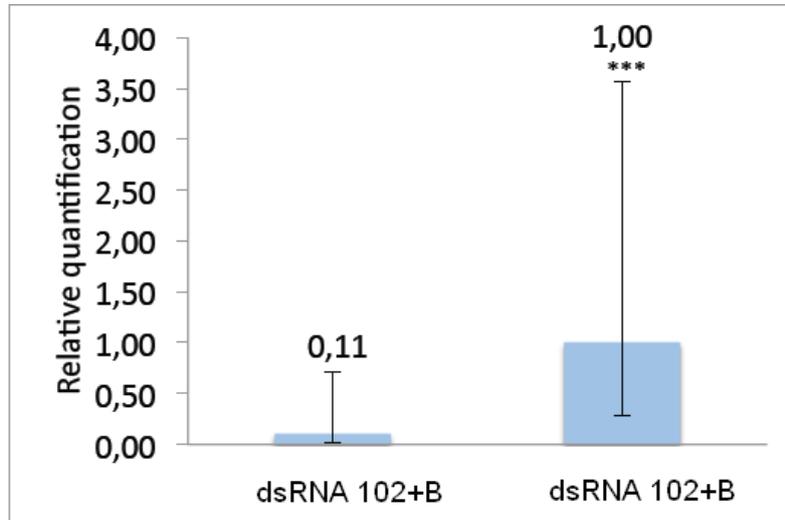


Figura 3.10: il livello di trascrizione del gene 102*Sl* delle larve interferite è statisticamente differente da quello registrato per le larve controllo ($P < 0,01$)

L'effetto di immunosoppressione sembrerebbe associato ad una sotto-espressione a livello trascrizionale del gene bersaglio.

3.4 Discussione

Un omologo del gene 102 di *H. virescens* è stato individuato in *S. littoralis*, attraverso l'analisi bioinformatica delle sequenze EST riportate in banca dati. Il cDNA 102*Sl* mostra un'identità di sequenza dell'84% con il cDNA 102*Hv*. La sequenza amminoacidica attesa dalla traduzione mostra che la P102*Sl* presenta il 92% d'identità con la P102*Hv* e il 62% con la proteina del veleno di larve di *L. obliqua*. Tale veleno è secreto da spine urticanti presenti sulla cuticola degli stadi larvali di questo lepidottero ed è coinvolto in una serie di reazioni che causano alla pelle umana gravi danni tra cui dermatiti urticanti, allergie a carico del sistema respiratorio e severe sindromi emorragiche (Batista *et al.*, 2003). Queste proteine appartengono alla famiglia XendoU, i cui membri sono stati descritti sia nei vertebrati che negli invertebrati (Laneve *et al.*, 2008). Alcuni membri della famiglia XendoU sono stati inizialmente considerati erroneamente enzimi con attività

serin proteasi simile, in realtà essi sono coinvolti in vari percorsi di elaborazione dell' RNA in diversi organismi.

L'elevata identità di sequenza del cDNA 102 tra *H. virescens* e *S. littoralis* si accompagna ad una notevole similitudine funzionale, come si desume dagli effetti del loro silenziamento sulla risposta immunitaria. Infatti, come in *H. virescens*, il silenziamento del gene 102*Sl* ha prodotto un fenotipo immunosoppresso in cui le beads non sono incapsulate. Tuttavia, nelle larve trattate con dsRNA102*Sl*, la stimolazione immunitaria con iniezione di beads non comporta l'attivazione di una reazione di melanizzazione sistemica e le larve sopravvivono regolarmente. Questo suggerisce che, pur essendo fondamentale per la risposta d'incapsulamento, il gene 102*Sl* interviene in modo differente nella regolazione dei processi di melanizzazione, rispetto a quanto osservato in *H. virescens*. Pertanto, la melanogenesi e la deposizione localizzata della melanina in queste due specie affini sembrano controllate da meccanismi differenti, che saranno oggetto di studi futuri.

Come osservato anche in *H. virescens*, in *S. littoralis* la somministrazione del dsRNA102 nella cavità orale produce un effetto RNAi sistemico, tuttavia non è possibile dare un'interpretazione certa delle basi molecolari che lo rendono possibile, data la scarsa conoscenza dei meccanismi di assorbimento gastrico e trasporto dei dsRNAs nei lepidotteri (Huvenne e Smagghe, 2010). Le osservazioni raccolte nelle due specie di lepidottero oggetto dei nostri studi lasciano supporre che nei lepidotteri, come già indicato per *D. melanogaster*, può esistere un percorso di internalizzazione del dsRNA per endocitosi (Saleh *et al.*, 2009; Siomi e Siomi, 2009a, b; Lee *et al.*, 2009). Tuttavia, questa è solo una delle tante ipotesi che è possibile avanzare sui meccanismi di assorbimento intestinale di dsRNA e necessita di un'attenta valutazione sperimentale.

CAPITOLO 4

Sviluppo di possibili strategie per il controllo di *S. littoralis* basate sulla tecnologia RNAi

4.1 Scopo del lavoro

S. littoralis è uno degli insetti più dannosi in agricoltura, in grado di causare ingenti perdite economiche attaccando una vasta gamma di colture (Hill, 1987). Per il suo controllo sono stati usati diversi tipi di insetticidi con conseguente sviluppo di fenomeni di resistenza (Davies *et al.*, 2007; Mosallanejad e Smaghe 2009). Studi recenti hanno anche segnalato la presenza di diversi tipi di resistenza alle tossine Bt tra diverse popolazioni di *S. littoralis* (Matten *et al.*, 2008). La difficoltà nella lotta a questo dannoso fitofago e la sua capacità di sviluppare rapidamente resistenza ai mezzi di controllo adottati fa capire quanto sia importante l'individuazione di nuove strategie per il suo controllo.

Il potenziale dell'RNAi come meccanismo di lotta agli insetti ha riscosso notevole attenzione, a cominciare dalla dimostrazione che è possibile ottenere il silenziamento genico alimentando i fitofagi con piante transgeniche che esprimono dsRNAs aventi come bersaglio geni fondamentali per la sopravvivenza degli insetti (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007). Il gene *102* sembrerebbe un promettente candidato da impiegare in tecniche di controllo utilizzando tale tecnologia. In questo capitolo sono riportate due possibili applicazioni di controllo di *S. littoralis* basate sul silenziamento del gene *102Sl*.

Il primo approccio utilizzato ha riguardato l'applicazione dell'RNAi alle uova di *S. littoralis* attraverso l'immersione delle stesse in soluzioni contenenti diverse concentrazioni di dsRNA_{102Sl}. Questo approccio è stato suggerito dalla possibilità che il gene *102* possa avere un ruolo nella formazione delle membrane basali degli epitelii, così come proposto da Falabella *et al.* (2012), sulla base di evidenze indirette disponibili in letteratura, che indicano come gli emociti intervengano in modo significativo in questo processo. Pertanto, la possibilità di potere interferire con questo possibile ruolo del gene *102Sl* nel processo di formazione delle

membrane basali durante l'embriogenesi è sembrata particolarmente interessante per approfondire le conoscenze a riguardo e per potere, eventualmente, mettere a punto una tecnica di controllo diretta verso stadi di sviluppo molto precoci, con ovvi vantaggi ai fini della limitazione del danno da parte di questo fitofago.

La logica alla base del secondo esperimento di seguito riportato è quella di valutare se l'immunosoppressione indotta nelle larve di *S. littoralis* trattate con il dsRNA102SI (Capitolo 3) possa portare ad un incremento della loro sensibilità a patogeni. A tale scopo è stato utilizzato il *Bacillus thuringiensis* (Bt), comunemente adottato per il controllo di lepidotteri, ma che nelle larve mature, in condizioni naturali, non esercita un'azione efficace di controllo. Più in generale, questo approccio sperimentale, oltre a potenziare l'effetto dei trattamenti Bt su stadi di sviluppo poco sensibili, vuole fornire la prova concettuale che il silenziamento di questo gene può avere un ruolo importante nel potenziamento dell'impatto che gli antagonisti naturali e i patogeni possono avere sugli insetti dannosi. Ciò rappresenterebbe una strategia di controllo innovativa, basata non su meccanismi tossici con potenziali effetti su organismi non bersaglio, ma sull'incremento dell'effetto di contenimento da parte di agenti naturali di controllo biologico.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Materiale biologico

Le uova e le larve di *S. littoralis* sono state ottenute dall'allevamento permanente del fitofago, in camera climatica a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con umidità relativa pari al $70 \pm 5\%$ e regime fotoperiodico di 16 ore luce/ 8 ore buio (Capitolo 3).

4.2.2 RNAi mediata da dsRNA in uova di *S. littoralis*

Le uova appena deposte di *S. littoralis*, raccolte da una stessa ovatura, sono state private delle scaglie materne che le ricoprivano e sono state utilizzate per condurre una prova di RNAi per immersione in 50 μl di una soluzione contenente acqua e dsRNA a tre diverse concentrazioni (50 ng/ μl , 100 ng/ μl and 250 ng/ μl). Per ogni

concentrazione di dsRNA sono state effettuate tre prove, ciascuna consistente di due tesi sperimentali: (1) trattato (immerso in dsRNA102*Sl*) e (2) controllo (immerso in dsRNAGFP). Dopo essere state totalmente immerse per due ore in un tubo eppendorf contenente la soluzione di dsRNA, le uova sono state lavate due volte con 1 ml di PBS 1X, prelevate con l'ausilio di una pipetta Gilson P1000 con puntale tagliato nella parte distale, asciugate su carta da filtro e osservate al microscopio ottico. Le uova ancora integre sono state prelevate con l'ausilio di un pennello e destinate in parte al biosaggio per la valutazione della sopravvivenza e in parte all'estrazione dell'RNA totale per esperimenti di qRT-PCR.

Le uova destinate al biosaggio sono state poste in piastre Petri, in camera di crescita a 25°C, con UR 75 ± 5 % e fotoperiodo di 18 ore luce/6 ore buio per valutarne la percentuale di schiusa. Per ogni trattamento le larve neonate ottenute sono state poste insieme in vassoi a 32 vaschette (Color-Dec, Italy), insieme con un pezzo di dieta artificiale per valutare il tasso di sopravvivenza larvale dalla I età alla III età.

Per ogni concentrazione di dsRNA 3 gruppi di 20 uova destinate alla qRT-PCR sono state raccolte a 24, 48 e 72 ore dal trattamento e congelate a a -80°C per estrarne l'RNA totale.

4.2.3 qRT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dalle larve e dalle uova di *S. littoralis* in TRIzol® Reagent (Invitrogen), come indicato nel Capitolo 3, risospeso in 20 µl di acqua con DEPC, visualizzato su gel di agarosio allo 0,8 % in condizioni denaturanti, per valutarne l'integrità, quantificato allo spettrofotometro e conservato a -80°C.

L'RNA totale è stato poi sottoposto a qRT-PCR per determinare la quantità di trascritto del gene 102*Sl* utilizzando le stesse condizioni descritte nel Capitolo 3.

4.2.4 Impatto di *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* sulle larve di *S. littoralis* dopo il trattamento con dsRNA102*Sl*

Il biosaggio di alimentazione è stato effettuato su due gruppi di larve di *S. littoralis* di V età primo giorno, alle quali era stato somministrato preventivamente (a partire

dal primo giorno fino all'ultimo dalla IV età) 450 ng di dsRNA102*Sl* (trattato) e 450 ng dsRNAGFP (controllo), come descritto nel Capitolo 3. Le larve interferite sono state alimentate con dieta contenente Delfin® (Dupont), un insetticida biologico a base del ceppo SA-11 di *B. thuringiensis* subspecie *kurstaki* serotipo 3a, 3b. La dose di Bt adottata è 53.000 US (=Unità Spodoptera), determinata in base a studi condotti su larve di prima età di *S. exigua*. Le US misurano la potenza del prodotto commerciale in rapporto a quella di una preparazione standard attraverso un biosaggio *in vivo* sull'insetto bersaglio (*S. exigua*). Alla preparazione standard viene attribuita una potenza arbitraria e la potenza in US del prodotto è data dalla formula:

$$US = (CL_{50 \text{ standard}}/CL_{50 \text{ prodotto}}) \times \text{Potenza standard}$$

Dove CL_{50} è la concentrazione di prodotto o di standard che uccide il 50% degli insetti campione in un biosaggio di laboratorio su substrato semiartificiale (Caroli *et al.*, 1998).

La quantità di Bt somministrata per singola larva è pari a oltre 5 volte la dose massima di utilizzo indicata in etichetta per larve di prima età.

Per entrambi i gruppi di larve è stata realizzata una prova consistente in tre tesi:

- tesi 1: 30 larve alle quali è stata somministrata dieta addizionata con Bt attivo;
- tesi 2: 30 larve alle quali è stato somministrata dieta addizionata con Bt[†] inattivato a seguito di sterilizzazione e trattamento ai raggi UV;
- tesi 3: 30 larve alle quali è stata somministrata dieta addizionata con acqua sterile.

Ogni prova è stata prodotta in triplicato come di seguito descritto.

Dopo il trattamento con dsRNA, le larve sono state poste singolarmente in vassoi da 32 vaschette (Color-Dec, Italy), insieme con un pezzo di dieta artificiale con superficie pari ad 1 cm² e spessore 2 mm (la quantità di dieta che una larva di *S. littoralis* di V età riesce a consumare totalmente in 48 ore). Sulla superficie della dieta sono stati distribuiti con una micropipetta Gilson, in maniera uniforme, 100 µl delle tre soluzioni preparate per la prova (Bt, Bt[†] e acqua sterile). Dopo 48 ore il pezzo di dieta è stato sostituito con un pezzo di dieta non trattato. I vassoi sono stati posti in camera climatica, a 25°C con un UR 75 ± 5 % e fotoperiodo di 16 ore luce/8 ore buio. La sopravvivenza delle larve è stata registrata ogni giorno dopo il trattamento, per 15 giorni, ed è terminata quando tutte le larve si sono incrisaldate.

4.2.5 Definizione della CL₅₀ del Bt in larve di *S. littoralis* di V età

La CL₅₀ orale per il formulato a base di Bt utilizzato in larve di *S. littoralis* di V età sane è stata definita somministrando alle larve, su dieta, cinque diverse concentrazioni di Bt, utilizzando un minimo di 40 larve per dose (da 662,500 US a 2.650.000 US). Si è provveduto quindi a definire la CL₅₀ di larve di *S. littoralis* di V età trattate con dsRNA, somministrando alle larve su dieta quattro diverse concentrazioni di Bt, utilizzando un minimo di 40 larve per dose (da 1000 US a 1.000.000 US). Per ogni concentrazione il biosaggio è stato effettuato in parallelo su larve a cui era stato somministrato rispettivamente il dsRNA102*Sl* e il dsRNAGFP come controllo.

Le larve (sane e trattate) sono state poste singolarmente in vassoi da 32 vaschette (Color-Dec, Italy), insieme con un pezzo di dieta artificiale con superficie pari ad 1 cm² e spessore 2 mm, sulla cui superficie sono stati pipettati in maniera uniforme 100 µl delle diverse soluzioni contenenti Bt a diverse concentrazioni. I vassoi sono stati posti in camera climatica a 25°C con un UR 75 ± 5 % e fotoperiodo di 16 ore luce/8 ore buio. La mortalità è stata osservata a 48 ore dal trattamento.

4.2.6 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati sperimentali è stata effettuato con il software Statgraphics plus versione 3.0 (Statgraphics plus, 1997). I risultati in termini di valori Ct sono stati espressi come valore medio ± la deviazione standard (SD). Il test t di Student è stato usato per confrontare le medie ottenute dagli esperimenti di qRT-PCR.

I dati relativi alla schiusa delle uova sono stati analizzati con il test del χ^2 . Per comparare le curve di sopravvivenza è stato usato il Log-rank (Mantel-Cox) test. Per calcolare la DL₅₀ è stata effettuata un'analisi probit come indicato da Finney (1971).

4.3 Risultati

4.3.1 RNAi sulle uova di *S. littoralis*

La percentuale di schiusa delle uova osservata 4 giorni dopo il trattamento per immersione in una soluzione contenente dsRNA102*Sl* è risultata significativamente più bassa rispetto a quella contenente dsRNAGFP come controllo (Fig. 4.1) ($P < 0.0001$; $X^2 = 214,6$; $df = 3$).

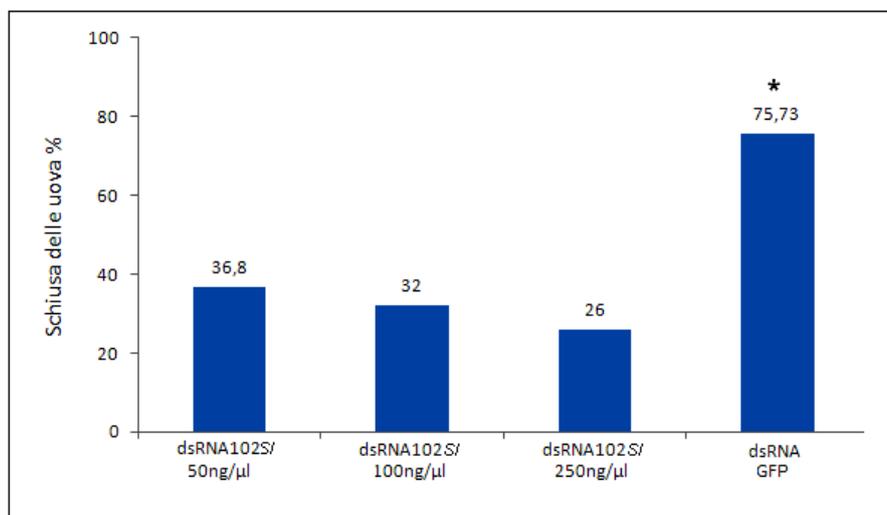


Figura 4.1: Il trattamento con dsRNA102*Sl* in uova di *S. littoralis* riduce in maniera significativa la loro percentuale di schiusa. L'asterisco indica differenze significative ($P \leq 0.0001$).

Le larve ottenute dalle uova trattate con il dsRNA102*Sl* hanno mostrato una significativa riduzione del tasso di sopravvivenza, tra la I e la III età, rispetto al controllo (Fig. 4.2) ($P < 0.0001$; $M = 35,65$)

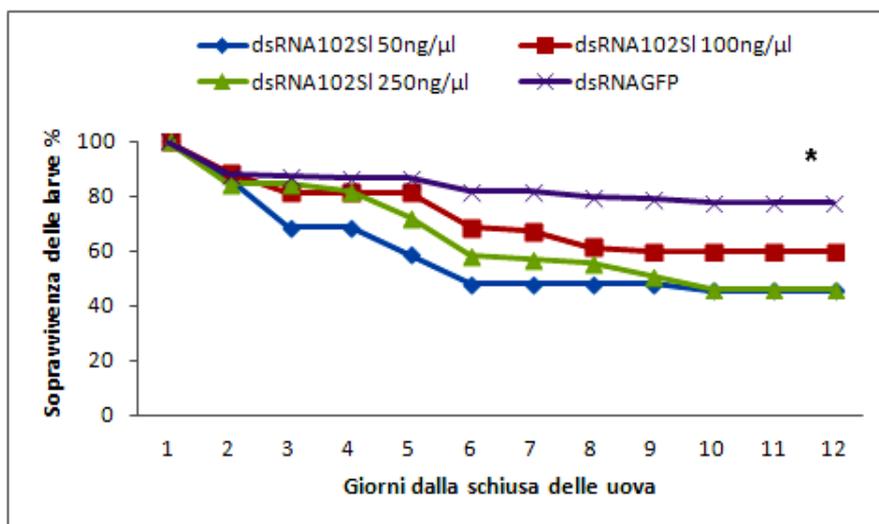


Figura 4.2: Le larve ottenute dalle uova trattate mostrano un ridotto tasso di sopravvivenza. L'asterisco indica differenze significative ($P \leq 0.0001$).

L'analisi qRT-PCR ha mostrato che l'incremento di mortalità riscontrato è associato ad un significativo decremento dei livelli del trascritto del gene *102Sl*, a tutte le dosi di dsRNA102Sl considerate: 50 ng/μl: ($P=0.0085$; $t=4.829$; $df=4$); 100 ng/μl: ($P=0.0056$; $t=3.750$, $df=8$); 250 ng/μl: ($P=0.0128$; $t=4.284$, $df=4$) (Fig. 4.3).

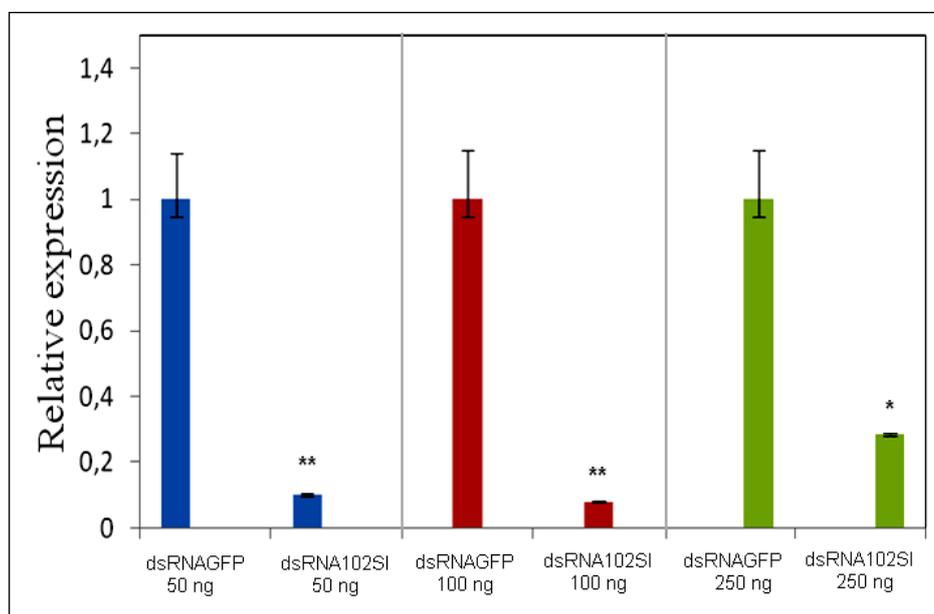


Figura 4.3: L'espressione del gene *102Sl* nelle uova di *S. littoralis* risulta significativamente ridotta dopo il trattamento con dsRNA102Sl comparato con il controllo. La barra di errore indica la deviazione standard. L'asterisco indica differenze statisticamente significative. (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

Questi risultati, nel loro complesso, indicano che il gene *102Sl* gioca un ruolo importante durante lo sviluppo embrionale e il suo silenziamento interferisce con la regolare schiusa, che, quando avviene, dà origine a larve caratterizzate da minore capacità di sopravvivenza.

4.3.2 Impatto del Bt sulle larve di *S. littoralis* dopo il trattamento con dsRNA102Sl

Il biosaggio di alimentazione su dieta contenente Bt è stato effettuato utilizzando larve trattate con il dsRNA102Sl e larve controllo. Le larve trattate mostrano un tasso di sopravvivenza, dopo il trattamento con il Bt, significativamente più basso rispetto al controllo (Fig. 4.4) ($P < 0.0001$; $M=162,3$). Nel grafico non sono mostrati i risultati relativi alle larve a cui è stata somministrata acqua per una questione di praticità.

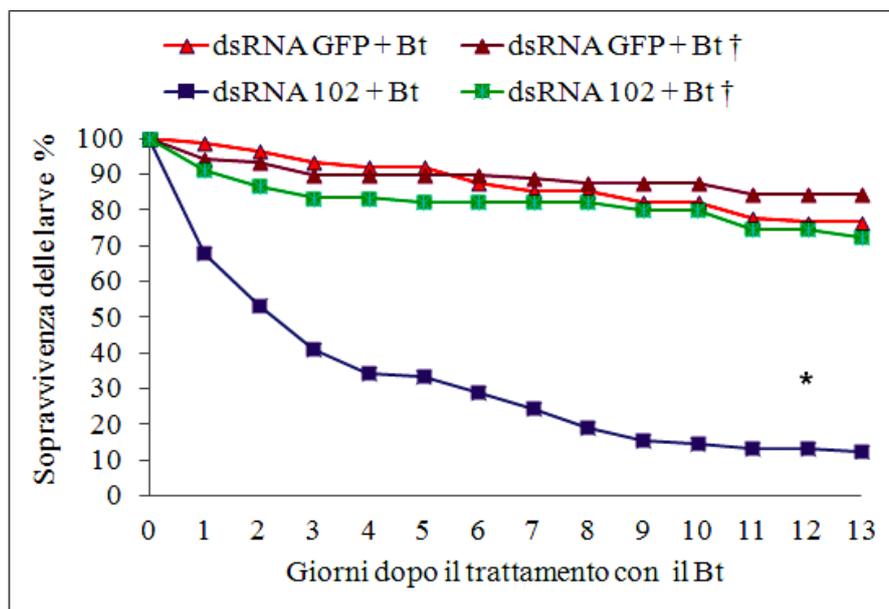


Figura 4.4: Impatto del *Bacillus thuringiensis* dopo il trattamento di RNAi. L'asterisco indica significatività statistica ($*P \leq 0.001$).

È interessante notare come alla dose di Bt adottata, ritenuta attiva sulle larve di prima e seconda età del notturno, la sensibilità quasi nulla delle larve mature scompare dopo il trattamento con il dsRNA102Sl e si nota un ragguardevole livello di sensibilità al Bt delle larve interferite. Per

quantificare meglio quale fosse l'incremento potenziale dell'attività insetticida del Bt in conseguenza all'RNAi è stata determinata la CL_{50} per larve mature di *S. littoralis* sottoposte a trattamento con dsRNA102Sl (Tabella 4.1). Sono state utilizzate quattro diverse concentrazioni di Bt utilizzando 40 larve per dose (espressa in US), e la mortalità osservata a 48h dal trattamento ha fatto registrare un evidente effetto sinergico fra trattamento con dsRNA102Sl e Bt, che ha determinato una riduzione di 3 volte rispetto alla DL_{50} registrata nelle larve controllo.

Tabella 4.1: CL_{50} dopo il trattamento con Bt in larve di <i>S.littoralis</i> di V età		
	Tempo (ore)	CL_{50} (95% C.I.)
Larve non trattate	48	1.5 E+06 US (1.3E+06 – 1.7E+06)
dsRNA102Sl	48	4.7 E+05 US (3.1E+05 – 7.1E+05)

4.4 Discussione

L'immersione delle uova di *S. littoralis* in una soluzione contenete dsRNA diretto contro il gene 102Sl ha prodotto un effetto RNAi alle diverse dosi considerate, con una riduzione della percentuale di schiusa delle uova dose-dipendente e un'elevata mortalità delle larve ottenute dalle uova trattate con dsRNA102Sl. Il fenotipo osservato è associato ad una riduzione del trascritto del gene 102Sl, tuttavia, per la concentrazione più elevata (250 ng/μl) tale riduzione risulta più bassa rispetto alle concentrazioni di dsRNA inferiori. Questo confermerebbe che non sempre applicando una concentrazione di dsRNA più alta di quella ottimale si ottiene un silenziamento maggiore (Meyering-Vos e Muller, 2007; Shakesby *et al.*, 2009) e potrebbe essere spiegato dall'esistenza di un efficiente feedback di regolazione del gene 102 che potrebbe andare a contrastare il totale esaurimento dei livelli di mRNA attraverso un aumento del tasso di trascrizione (Belles, 2010) che, tuttavia, in presenza di dsRNA non consente

al gene di ripristinare i livelli di trascritto presenti in condizioni normali. In ogni modo resta da indagare quale sia la funzione di questo gene nello sviluppo embrionale. L'ipotesi è che esso sia presumibilmente coinvolto nei processi di formazione di diversi tessuti nell'embrione e nella giovane larva, entrando nella costituzione delle membrane basali, come suggerito da Falabella *et al.* (2012). I risultati qui riportati sembrano corroborare questa ipotesi, la cui validità necessita di essere approfondita con studi funzionali più mirati. Inoltre, resta da valutare se la mortalità riscontrata nelle larve tra la prima e la terza età larvale sia imputabile ad un effetto RNAi trasmissibile da uno stadio allo stadio successivo, come già riportato in *T. castaneum* (Tomoyasu e Denell, 2004). La valutazione di questo aspetto sarebbe particolarmente importante per comprendere il funzionamento della risposta RNAi in questa specie e, più in generale, nei lepidotteri ad essa affini. La tecnica sembra molto interessante dal punto di vista applicativo ma richiede ancora molte indagini perché essa possa essere utilizzata proficuamente in nuove strategie di controllo.

La scoperta del Bt come agente di controllo degli insetti dannosi ha permesso la diffusione dell'uso in agricoltura e in ambito forestale e urbano di biopesticidi che hanno fornito una valida alternativa agli insetticidi chimici (Navon, 1993). Diversi studi presenti in letteratura mostrano una riduzione della tossicità del Bt negli dai primi stadi larvali agli ultimi, per cui nelle larve mature il Bt risulta scarsamente efficace (Ali e Young, 1996; Bauer, 1990, 1992; Ferro e Lyon, 1991; James *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 1996; Lorence *et al.*, 1995; Salama *et al.*, 1995; Van Frankenhuyzen *et al.*, 1991; Wierenga *et al.*, 1996). In *Spodoptera* spp., le cause di tale fenomeno sono riconducibili ad un incremento dell'attività di specifiche proteasi negli stadi più avanzati e da una variazione della densità dei recettori per alcune delle tossine Cry durante lo sviluppo larvale (James *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 1996). In diversi lepidotteri è stata riportata una modificazione della struttura dei recettori delle tossine del Bt nei diversi stadi larvali (Rausell *et al.*, 2000). Attualmente vi sono in commercio bioformulati contenenti diverse tossine Cry (provenienti da sierotipi di Bt differenti) miscelate insieme, al fine di limitare parzialmente il problema causato dall'instaurarsi di questi cambiamenti associati allo sviluppo.

I fenotipi immunosoppressi ottenuti con il trattamento mediante somministrazione orale del dsRNA102*Sl* (Capitolo 3) mostrano una sensibilità superiore al Bt attivo, paragonata non solo alle larve controllo ma anche al fenotipo immunosoppresso trattato con Bt inattivato (Fig. 4.4). Inoltre il trattamento con dsRNA102*Sl* riduce di 3 volte la CL₅₀ del prodotto commerciale a base di Bt utilizzato. Quanto osservato è imputabile ad un effetto sinergico della soppressione genica e della tossina attiva del Bt. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che una pur ridotta efficacia della tossina sia compensata da una maggiore aggressività della setticemia che si instaura, grazie alla minore capacità di difesa immunitaria che mostrano le larve trattate con dsRNA102*Sl*. Questa ipotesi necessita del supporto di ulteriori dati sperimentali.

La possibilità di aumentare la sensibilità del nottuide al Bt, attraverso la somministrazione del dsRNA102*Sl*, potrebbe influenzare significativamente l'efficacia dei formulati commerciali già presenti in commercio e quello delle piante transgeniche esprimenti la tossina. La tecnologia RNAi proposta apporterebbe inoltre un grande vantaggio nell'utilizzo del Bt, che risulterebbe efficace su tutti gli stadi larvali del nottuide. Inoltre, il possibile effetto di potenziamento di altri patogeni naturali andrebbe attentamente valutato per definire in modo più completo il reale impatto della tecnologia di controllo qui proposta.

CONCLUSIONI

La caratterizzazione funzionale dei geni codificati dal *TnBV* nelle larve di *H. virescens* parassitizzate da *T. nigriceps* ha permesso di isolare il trascritto virale non codificante *rc5'ntTnBV* inverso e complementare alla regione 5' non tradotta del gene 102 (5'nt102), altamente espresso negli emociti dell'ospite. Il fatto che l'espressione di questo gene, presumibilmente coinvolto nella risposta immunitaria, risultasse sottoregolata negli emociti delle larve di *H. virescens* parassitizzate, ha portato ad ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di silenziamento genico naturale mediato dal trascritto virale non codificante.

Per meglio comprendere il significato funzionale del fenomeno di regolazione genica ipotizzato è stato necessario definire il ruolo del gene 102 nella fisiologia di *H. virescens* (Capitolo 1). Studi condotti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che tale gene ha un ruolo chiave nel sistema immunitario dell'insetto ed è coinvolto nella localizzazione del processo di melanizzazione nella capsula emocitaria che viene a formarsi intorno agli oggetti estranei. Tale processo è mediato dalla produzione di fibre amiloidi, a partire da frammenti della proteina codificata dal gene 102 (P102), in ampie cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso di granulociti e sferulociti. Solamente in seguito allo stimolo immunitario le fibre amiloidi vengono rilasciate sulla superficie del corpo estraneo dove vanno a formare uno strato che funge da impalcatura molecolare per la sintesi localizzata della melanina e l'incapsulamento. Tali risultati dimostrano, per la prima volta, che le fibre amiloidi hanno ruolo funzionale chiave nell'immunità dell'insetto (Falabella *et al.*, 2012).

Il gene 102 è pertanto fondamentale nella risposta immunitaria cellulare. Il trascritto non codificante *rc5'ntTnBV*, concorrerebbe attivamente alla soppressione del sistema immunitario di *H. virescens*, svolgendo un ruolo regolativo nell'espressione di tale gene, presumibilmente utilizzando un meccanismo RNAi.

Il significato funzionale di questo trascritto virale non codificante è stato verificato utilizzando la tecnica dell'RNAi mediata da dsRNA (Capitolo 2). Gli esperimenti hanno fornito l'evidenza indiretta della possibilità che il silenziamento del gene 102 *in vivo* possa effettivamente contribuire in modo significativo alla sindrome immunosoppressiva osservata nelle larve parassitizzate di *H. virescens*, che presentano livelli di espressione del gene 102 ridotti in corrispondenza dell'aumento del trascritto virale non codificante (Pennacchio *et al.*, dati non pubblicati). Le larve di *H. virescens* a cui è stato somministrato il dsRNA con microiniezioni orali (ma non con microiniezioni nella cavità emocelica) mostrano un fenotipo immunosoppresso, che riproduce in parte la sindrome osservata nelle larve parassitizzate da *T. nigriceps* (Fig 2.9). Il silenziamento del gene 102 è in grado di causare non solo il mancato incapsulamento delle beads cromatografiche (Fig 2.8) ma anche una melanizzazione sistemica e letale (Fig 2.10). Questo risultato conferma che le amiloidi derivanti dalla proteina 102 sono responsabili della localizzazione delle reazioni coinvolte nella melanogenesi e dell'attivazione dell'incapsulamento da parte degli emociti (Falabella *et al.*, 2012). La differente risposta alla somministrazione emocelica del dsRNA rispetto a quella orale potrebbe essere dovuta a diverse condizioni degradative, alla presenza di differenti capacità di assorbimento del dsRNA e alla trasmissione sistemica del segnale di RNAi (Belles, 2010; Terenius *et al.*, 2011). Verosimilmente, l'esito finale degli esperimenti effettuati dipende da un equilibrio dinamico fra processi degradativi e di assorbimento di molecole di dsRNA di dimensione idonea ad innescare una risposta RNAi, come discusso nel Capitolo 2.

La funzione svolta dal gene 102 lascia ipotizzare che, come noto per la maggior parte dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa, essa possa essere conservata anche in specie di lepidotteri correlate. Un omologo del gene 102 è stato individuato attraverso analisi bioinformatiche in *S. littoralis*, una specie di interesse economico presente anche in Italia, al fine di potere trasferire proficuamente eventuali risultati di rilevanza applicativa (Capitolo 3). Il silenziamento del gene 102*Sl* infatti ha permesso, come in *H. virescens*, l'ottenimento di un fenotipo immunosoppresso in cui le beads non sono incapsulate (Fig. 3.6), tuttavia nelle larve interferite non è stata

osservata una reazione di melanizzazione sistemica e le larve sopravvivono regolarmente (Fig. 3.7). Questo suggerisce che l'elevata identità di sequenza del cDNA 102 tra *H. virescens* e *S. littoralis* (Fig. 3.1) si accompagna ad una notevole similitudine funzionale, tuttavia, pur essendo fondamentale per la risposta d'incapsulamento, il gene 102*Sl* interviene in modo differente nella regolazione dei processi di melanizzazione, rispetto a quanto osservato in *H. virescens*. Ciò indica che la melanogenesi e la deposizione localizzata della melanina in queste due specie affini possono essere controllate da meccanismi differenti, che saranno oggetto di studi futuri.

Le osservazioni raccolte nelle due specie di lepidottero oggetto dei nostri studi lasciano supporre che nei lepidotteri, come già indicato per *D. melanogaster*, possa esistere un percorso di internalizzazione del dsRNA per endocitosi (Saleh *et al.*, 2009; Siomi e Siomi, 2009a, b; Lee *et al.*, 2009). Tuttavia, questa è solo una delle tante ipotesi possibili sui meccanismi di assorbimento intestinale di dsRNA, che necessita di un'attenta valutazione sperimentale, anche nell'ottica che la conoscenza in dettaglio dei fenomeni di assorbimento e trasporto nelle specie di interesse è premessa indispensabile per lo sviluppo di strategie di controllo basate su tecnologie RNAi. Il gene 102 sembrerebbe un promettente candidato da impiegare in tecniche di controllo utilizzando tale tecnologia. Sono state realizzate due possibili applicazioni di controllo di *S. littoralis* basate sul silenziamento del gene 102*Sl* utilizzando due approcci differenti (Capitolo 4).

In un primo esperimento è stato dimostrato che è possibile attivare il silenziamento genico di uova di *S. littoralis* immergendole in una soluzione contenente dsRNA. La sottoespressione del gene 102 negli embrioni (Fig. 4.3) causa una riduzione del tasso di schiusa delle uova (Fig. 4.1) ed un'elevata mortalità delle larve ottenute dalle uova interferite tra la prima e la terza età larvale (Fig. 4.2). La comprensione del ruolo del gene 102 nello sviluppo embrionale necessita di ulteriori indagini, ma si può ipotizzare che esso sia presumibilmente coinvolto nella costituzione delle membrane basali, come suggerito da Falabella *et al.* (2012) sulla base di evidenze indirette disponibili in letteratura, che indicano come gli emociti intervengano in modo significativo in questo processo (Akai e Sato, 1973;

Beaulaton, 1968; Sass *et al.*, 1994; Wigglesworth, 1973, Nardi e Miklasz, 1989). Anche questa ipotesi necessita di ulteriori approfondimenti attraverso studi funzionali mirati. La tecnica sembra molto interessante dal punto di vista applicativo e potrebbe permettere di mettere a punto una tecnica di controllo diretta verso stadi di sviluppo molto precoci, con ovvi vantaggi ai fini della limitazione del danno da parte di questo fitofago, ma richiede ancora molte indagini perché essa possa essere utilizzata proficuamente in nuove strategie di controllo.

Un secondo esperimento ha permesso di constatare che i fenotipi immunosoppressi, ottenuti somministrando dsRNA102*Sl* alle larve di *S. littoralis*, mostrano un incremento della loro sensibilità al Bt, potenziandone l'effetto su stadi di sviluppo poco sensibili (Fig. 4.4). La possibilità di aumentare la sensibilità del nottuide al Bt, attraverso la somministrazione del dsRNA102*Sl*, potrebbe influenzare significativamente l'efficacia dei formulati commerciali già presenti in commercio (Tabella 4.1) e quello delle piante transgeniche esprimenti la tossina su tutti gli stadi larvali del nottuide. Ciò rappresenterebbe una strategia di controllo innovativa sull'incremento dell'effetto di contenimento da parte di agenti naturali di controllo biologico. Inoltre, il possibile effetto di potenziamento di altri patogeni naturali andrebbe attentamente valutato per definire in modo più completo il reale impatto della tecnologia di controllo che si propone.

APPENDICE

Nell'ambito dell'attività di ricerca svolta durante il corso di dottorato, è stata sviluppata una collaborazione con l'Arterra Bioscience, azienda interessata all'applicazione di nuove tecnologie di controllo basate sull'uso del silenziamento genico mediato da RNAi. Tale attività risulta perfettamente congrua con gli obiettivi scientifici del progetto di dottorato, essendo relativa allo sviluppo di piante transgeniche esprimenti dsRNA per il controllo di *S. littoralis*.

Il target scelto per gli esperimenti effettuati è stato individuato tra i geni codificanti per recettori accoppiati alle proteine G (GPCR). Essi sono recettori con 7 domini transmembrana e utilizzano proteine G eterotrimeriche per trasdurre il segnale nelle cellule, attivando effettori enzimatici localizzati a livello della membrana plasmatica e/o nel citoplasma (Woehler e Ponimaskin 2009; Marinissen e Gutkind 2001). I GPCR sono membri di una grande famiglia di proteine che giocano un ruolo chiave nella regolazione delle attività cellulari e del metabolismo, presenti in tutti gli animali.

Anche negli insetti lo studio dei recettori GPCRs può essere molto interessante per lo sviluppo di nuove strategie di controllo dei parassiti. Diversi studi hanno evidenziato che il coinvolgimento di geni GPCR è vitale in molti processi nei Lepidotteri, ma nessuno di questi ha mai riportato analisi *in vivo* per convalidare le loro funzioni. Tra tutti i 250 GPCR fin ora identificati negli insetti, maggior interesse è stato riscosso dai recettori dell'octopamina, che sono ancora utilizzati in procedure di screening per l'identificazione nuovi insetticidi (Ohta *et al.*, 2012).

Anche i recettori dei neuropeptidi possono rappresentare bersagli appetibili per il controllo degli insetti, perché hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi fisiologici vitali (Costa *et al.*, 2001). In particolare, i recettori dell'ormone diuretico (DHRs) sono essenziali per la regolazione dell'equilibrio idro-salino in quanto, se stimolati, determinano l'eliminazione dell'acqua e ne inibiscono il riassorbimento nell'intestino.

Nell'articolo che segue, per la prima volta, è descritto l'uso di un dsRNA nelle piante, per ridurre l'espressione di un gene GPCR *in vivo*. L'efficacia della tecnologia RNAi mediante alimentazione è già stata dimostrata in diversi studi ed ha permesso di ottenere il silenziamento genico in diverse specie di *Spodoptera* (Terenius *et al.*, 2011), ma pochi sono gli esempi in cui sono utilizzate piante transgeniche esprimenti dsRNAs (Zhu *et al.*, 2012).

Dall'analisi del genoma di *B. mori*, 5 geni putativi DHR sono stati identificati nei Lepidotteri (Fan *et al.*, 2010) di cui 4 sono simili ai recettori calcitonina dei vertebrati e di *Drosophila* (Johnson *et al.*, 2005; Mertens *et al.*, 2005), mentre il gene BmDHR (Ha *et al.*, 1999) è stato caratterizzato come omologo di due recettori DH₄₄ *Drosophila* (Hector *et al.*, 2009).

Allo scopo di utilizzare DHR nelle strategie di controllo degli insetti, è stato clonato il gene omologo di BmDHR in *S. littoralis* (Spoli-DHR) ed è stato studiato il suo ruolo potenziale *in vivo* utilizzando la tecnologia RNAi.

Gli esperimenti condotti hanno dimostrato che, alimentando le larve di *S. littoralis* su piante di tabacco transgenico (*Nicotiana tabacum*) che esprimono molecole di dsRNA corrispondenti al gene Spoli-DHR, si ottiene una riduzione del livello di trascrizione del gene bersaglio, provocando un aumento della mortalità degli insetti. I risultati suggeriscono che la regolazione dell'espressione del gene DHR in *S. littoralis* è essenziale per il sopravvivenza dell'insetto, e che questo recettore, costantemente espresso durante lo sviluppo larvale, può essere un facile bersaglio per l'RNAi. Tale gene è, pertanto, un buon candidato per il controllo di questo fitofago. Sebbene il metodo più utilizzato per somministrare dsRNAs nei Lepidotteri sia ancora oggi la microiniezione (Quan *et al.*, 2002), nei nostri esperimenti con *S. littoralis* questo metodo non ha dato risultati riproducibili. Questo è in accordo sia con l'elevata variabilità osservata in diversi esperimenti basati sulla tecnologia RNAi effettuati nei lepidotteri (dati non pubblicati, discussi in Terenius *et al.*, 2011), sia con i tentativi di silenziare i geni coinvolti nella segnalazione ormonale in *S. littoralis* (Iga e Smaghe, 2010), sia con i dati ottenuti nella presente tesi. Gli stadi larvali di *Spodoptera spp.* sono spesso refrattari all'RNAi somministrato per microiniezione, e mostrano una differente suscettibilità nei confronti di questa tecnologia, in funzione del

tipo e del livello di espressione del gene da silenziare. D'altra parte, in questo lavoro è stato dimostrato che l'efficacia della tecnologia RNAi utilizzando dsRNA espresso in pianta è molto più robusta ed affidabile, e permette di ottenere risultati sempre coerenti.

In conclusione, i risultati descritti in questo articolo suggeriscono che il gene Spoli-DHR è di importanza vitale per *S. littoralis* e quindi può essere sfruttato come bersaglio di nuove strategie di controllo dei parassiti. Due potenziale applicazioni emergono da questo studio: i) l'utilizzo di piante transgeniche esprimenti dsRNA diretto contro il gene Spoli-DHR, e ii) lo sviluppo di una piattaforma High Throughput Screening (HTS), per la ricerca di potenziali modulatori dell'attività del gene Spoli-DHR, da utilizzare nello sviluppo di insetticidi nuovi e selettivi per il controllo di *S. littoralis*.

L'articolo che segue è in pubblicazione sulla rivista "Journal of Insect Science".

Targeting the diuretic hormone receptor to control of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*

Fabio Apone^{1a*}, Alessandra Ruggiero^{2b}, Assunta Tortora^{1c}, Annalisa Tito^{1d}, Maria R. Grimaldi^{1e}, Stefania Arciello^{1f}, Davide Andrenacci^{3g}, Ilaria Di Lelio^{4h} and Gabriella Colucci¹ⁱ.

¹ Arterra Bioscience, via Brin 69, 80142 Napoli, Italy

² Arterra Bioscience, via Brin 69, 80142 Napoli, Italy; present address: Center for Cardiovascular Genetics, The University of Texas Health Science Center, 6770 Bertner Street, Houston, 77030 TX, USA

³ Institute of Genetics and Biophysics, CNR, via Castellino 111, 80131 Napoli, Italy

⁴ Department of Entomology and Agricultural Zoology, University of Napoli, via Università 100, 80055 Portici (NA), Italy

Correspondence: ^a fapone@arterrabio.it, ^b alessandra_ruggiero@hotmail.com, ^c assunta@arterrabio.it, ^d annalisa@arterrabio.it, ^e mariarosaria@arterrabio.it, ^f stefania@arterrabio.it, ^g andrenacci@igb.cnr.it, ^h ilariadilelio@libero.it, ⁱ gcolucci@arterrabio.it.

* Corresponding author

Keywords: insect pest, G protein coupled receptors, RNA interference, molecular target

Abbreviations: DHR, diuretic hormone receptors; GPCRs, G protein coupled receptors;

Abstract

The cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the most devastating pests for crop plants worldwide. Several types of treatments have been adopted so far against this pest, but unfortunately many of them have failed due to the rapid development of genetic resistance in the different populations of the insect. G protein coupled receptors (GPCRs) have vital functions in most of the organisms, including insects, thus they represent very appealing targets for species-specific pest control strategies. Among the insect GPCRs, the diuretic hormone receptors (DHR) have essential roles in water homeostasis regulation, but their importance *in vivo* and their potential role as targets of novel pest control strategies remain largely unexplored. To test the potentialities of DHR as targets to control *S. littoralis*, we cloned one of the genes in this species and expressed the corresponding dsRNA in tobacco plants, in order to knock down the receptor activity *in vivo* through RNA interference. We also expressed the receptor in a mammalian cell system to study its signalling pathways. The results suggested that this DHR gene has key roles in *S. littoralis* and thus represents an excellent molecular target to protect agriculturally important plants from the attacks of this pest.

Introduction

The cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) feeds on a wide range of important crops and is one of the most destructive pests in the tropical and subtropical areas of the world (Hill 1987). To control the attacks of this insect, several types of insecticides have been used so far, including synthetic pyrethroids, organophosphates and non-steroidal compounds (Casida & Quistad 1998). The wide use of these insecticides has caused resistant insect strains to emerge (Davies et al. 2007; Mosallanejad & Smagghe 2009) and has caused serious toxicological problems to humans and the environment (Costa et al. 2008; Relyea, 2009).

For some lepidopteran species, such as *Manduca sexta* and *Helicoverpa zea*, the most successful strategy of control has been the use of transgenic plants expressing Bt toxins (Kota et al. 1999), but *Spodoptera* species have shown very low or even negligible sensitivity towards these peptides (Sivasupramaniam et al. 2008) and recent studies even reported the presence of different types of resistance to Bt toxins among *Spodoptera* populations exposed to transgenic plants in the field (Tabashnik et al. 2008). A more effective and environmentally sustainable control of *S. littoralis* could be the use of alternative strategies that target specific molecules of this insect, and do not produce any toxicity to the natural ecosystems and to humans.

G Protein Coupled Receptors (GPCRs) constitute a large family of proteins in all animals, and have essential functions in most body tissues in insects. They are receptors with 7-transmembrane domains and use heterotrimeric G proteins to transduce their signal into the cells, by activating enzymatic effectors localized at the plasma membrane and/or in the cytoplasm (Woehler & Ponimaskin 2009; Marinissen & Gutkind 2001). The wide range of ligands, including hormones, neurotransmitters, ions, aminoacids, light, which signal through GPCRs underscores the importance of this class of receptors as key factors in the regulation of cellular activities and metabolism. In this regard, human GPCRs still remain a primary focus of many biomedical research and pharmaceutical drug discovery programs (Thomsen et al. 2005; Allen & Roth 2011). Also in insects, where more than 250 GPCR genes have been identified, GPCRs may represent very attractive targets for novel insecticides and pest control strategies. Among all the GPCRs, most of the attention has been given to the Octopamine receptors, which are still utilized in screening procedures for new insecticide identification (Ohta et al. 2012).

The neuropeptide receptors may as well represent attractive targets for insect control because they have fundamental roles in the regulation of vital physiological processes (Coast et al. 2001). In particular, the diuretic hormone receptors (DHR) are essential for water homeostasis, as they stimulate water loss and inhibit water re-absorption in the intestine, after binding diuretic hormone (DH) peptide ligands. Two types of DH have been characterized in Lepidoptera, both targeting Malpighian tubules: the DH₃₁ is structurally related to the mammalian calcitonin, while the DH₄₄ is more similar to the mammalian corticotropin-releasing factor (CRF) (Cabrero et al. 2002; Coast & Garside 2005). By the analysis of *Bombyx mori* genome, 5 putative DHR genes were identified in Lepidoptera (Fan et al. 2010): 4 of them have been reported to be similar to vertebrate calcitonin receptors and to *Drosophila* CG32843 and CG13758 (Johnson et al. 2005; Mertens et al. 2005), while another, BmDHR (Ha et al., 1999), had been previously characterized as the homolog of two *Drosophila* DH₄₄ receptors, CG8422 and CG12370 (Hector et al. 2009).

With the goal of using DHR in insect control strategies, we cloned the homolog of BmDHR gene in *S. littoralis* and studied its potential role *in vivo* by using RNA interference (RNAi) technology. The most successful results were obtained by feeding *S. littoralis* caterpillars on transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants expressing double strand RNA (dsRNA), corresponding to the DHR gene. The results of this study, besides underscoring the vital importance of DHR in *Spodoptera*, provided novel ways to protect agriculturally important plants from the attacks of this lepidopteran.

Materials and Methods

Growth of *S. littoralis*

S. littoralis larvae, maintained at temperature of 23 °C, 70 % of relative humidity and under 16/8 hours light/dark period, were fed on an artificial diet composed of: 41.4 g/L wheat germ, 59.2 g/L brewer's yeast, 165 g/L corn meal, 5.9 g/L ascorbic acid, 1.53 g/L benzoic acid, 1.8 g/L methyl 4-

hydroxybenzoate and 29.6 g/L agar. At the end of the VI instar, the larvae were transferred into plastic boxes containing vermiculite to let them reach the pupa stage. The adults obtained were reproduced to get new generations of larvae.

Cloning of *S. littoralis* DHR and RT-PCR experiments

In order to isolate the full cDNA encoding the DHR receptor from *S. littoralis*, protein sequences of *Bombyx mori*, *Acheta domesticus*, *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum* DH₄₄ receptors were retrieved from the GenBank database or literature and aligned using the program "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" (Corpet 1988). Total RNA was extracted from V-instar larvae of *S. littoralis* using the SV Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, WI, USA) and cDNA was synthesized using the RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas Int., Burlington, Ontario, CA) at the following reaction conditions: 70°C for 5 min, 37°C for 10 min, 42°C for 1 h and 72°C for 10 min. The cDNA was used in a standard PCR reaction with degenerate primers (DHR-Fw, 5'-TTYTNTAYTTYAARGANYTNMGNTGY-3'; DHR-Rv, 5'-ARYTTNGTNATNARNACCCACATNAT-3', corresponding to the amino acid sequences FLYFKDLRC and IMWVLITKL) at concentration of 2.5 µM. The PCR program included a denaturation step of 2 min at 98°C, followed by 35 cycles of 98°C 10 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec and a final extension step of 10 min at 72 °C. The amplified 500 bp fragment was cloned into the TA-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced. In order to get the full length cDNA sequence, a 5'/3' Race PCR was performed by using gene specific primers and anchor primers supplied in the 5'/3' RACE-KIT (Boeringer Ingelheim, Ridgefield, CT, USA).

For the 3' Race the oligos: 5'-AACCTCATGTCGACGTATATTCTGTCT-3'; 5'-ATGCTTGTAGAAGGTTTGTACCTGTAC-3' and 5'-TGGGTTATATGCAGGTGCTTCGTCAAC-3' were used, while for the 5' Race: 5'-CATACATATGACCAGAATCGTACACGA-3' and 5'-GGCGAGGTAGATGAGGCTGGTGACGTC-3'. The 3' and 5' Race reactions gave fragments of 800 and 500 bp, respectively, with 40 cycles of amplification consisting in 10 sec at 98 °C, 30 sec at 46°C, 60 sec at 72°C, followed by 10 min of final extension at 72°C. The full length cDNA was finally obtained by amplifying with the specific primers: 5'-ATGGCGGAGAAGTGCCCTGGCG-3' and 5'-TCATACCGTGAGTCGTATGCT-3'. For the analysis of the *S. littoralis* DHR expression in the different developmental stages and after micro-injection with dsRNA, total RNA was extracted from 3 to 10 larvae and cDNA synthesized as described above.

The sequence of the primers used for quantitative DHR expression analysis were: DHRqFw: 5'-ATGGCGGAGAAGTGCCCTGGCG-3' and DHRqRev: 5'-ACCACGAGCATGTACAGGTAC-3', which gave a fragment of 560 bp. As a control, the *S. littoralis* β-actin transcript was amplified by PCR using the same cDNA template and the actin specific primers: SlActinFw: 5'-GCGTCGCCCTGAGGAACAC-3'; SlActinRv: 5'-CGACGTACATGGCGGGGAG-3'. The typical scheme used for the amplifications was: 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55 °C, 30-60 sec at 72°C. All the PCR reactions were performed by using the enzyme Taq DNA polymerase (Euroclone, Wetherby, UK) in the master cycler Ep-gradients (Eppendorf, Hamburg, Germany). The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel, stained with 0.5 µg/ml ethidium bromide and displayed by the instrument Geliance 200 Imaging system (Perkin Elmer, Woodbridge, Ontario, CA).

Plant growth and transformation

Nicotiana tabacum plants, cultivar Samsun NN, were grown in a growth chamber at 24°C, light intensity of 250 µEinstein m⁻²s⁻¹, photoperiod of 16/8 h of light/dark and 70% of relative humidity.

To produce the transgenic lines, the full *S. littoralis* DHR sequence was sub-cloned into the plant expression vector, pH7GWTWG2(I), using the gateway technology. Briefly, the receptor gene was first sub-cloned into the gateway entry vector pENTR-2B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by restriction endonucleases, and then transferred into the destination binary vector pH7GWTWG2(I), according to the procedure described by Karimi et al. 2005. The binary vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 (Binns and Thomashow 1988), and used to transform the plants, according to the protocol described by Corrado et al. 2007. The transformed plants were analyzed by RT-PCR to verify the presence of the specific transgene and, whether positive, propagated to fresh medium and grown in soil.

RT-PCR analysis of *Nicotiana tabacum* plants

To verify the presence of the transgene in tobacco shoots or plants, total RNA was extracted from 50 mg of fresh tissue using Genelute Mammalian Total RNA kit (Sigma, St. Louis, MO, USA). The cDNA was synthesized using 2 µg of total RNA with RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Int., Burlington, Ontario, CA). All PCR reactions were carried out using the ribosomal RNA QuantumRNATM 18S Internal Standards (Ambion, Austin, TX, USA) as internal control. The primers and the conditions used for this RT-PCR reactions were the same as those described above for the analysis of DHR expression in the insect.

Microinjection of *S. littoralis* larvae with dsRNA.

The gene fragment of 560 bp (obtained by amplifying with the oligos DHRqFw and DHRqRev) was used to synthesize the dsRNA *in vitro* by the Megascript RNAi Kit (Ambion, Austin, TX, USA). V instar larvae (second day) were immobilized by carbon dioxide and injected with 3 µg of dsRNA, which was delivered into the haemolymph by the ventral part of the insect abdomen by using a Hamilton syringe (needle 4, gauge 32). As control, equivalent numbers of larvae were injected with 500 bp dsRNA fragments synthesized from a DNA template provided in the kit. After 48 h, total RNA was extracted and processed as described above. The results were analyzed by the “T test for paired samples” for statistical significance (Glantz 2005).

Feeding bioassays of *S. littoralis* larvae on transgenic tobacco plants.

Two hundreds I instar larvae were fed on artificial diet from the egg hatching to the end of the II instar. At the beginning of the III instar, 60 larvae for each condition were collected and placed separately in a Petri dish containing 0.5 g of fresh leaf, laid on 2% agar, in order to keep it moist. Every day, freshly cut leaves were provided to the larvae and the percentage of mortality measured. The percentage values reported in the graph are the averages of measures obtained from 4 independent experiments. The statistical significance of the measures was analyzed by the “T test for paired samples” (Glantz 2005) and resulted to be < 0.01.

Real-time PCR.

For cDNA synthesis, Quantitect Reverse Transcription kit (Quiagen Inc., Valencia, CA, USA) was used, starting from 1 µg of DNase-treated RNA per sample. To minimize variations during the cDNA synthesis step, all RNA samples were reverse-transcribed simultaneously. The sequences of the primers used for the amplification of the *Spodoptera* DHR gene fragment were: Fw: 5'-GACGGCGTGTGGCACAACTAC-3' and Rv: 5'-CGGCGAGGCTGAGCGAGTAG-3'. The size of the fragment obtained was 117 bp. Real-time PCR reactions were performed in triplicate in 20 µl reaction volumes, and the general protocol described in Conte et al. 2010 was followed. For each transcript, the values were analyzed by means of the ABI Prism 7900HT Fast Sequence Detection System software (Applied Biosystem, Carlsbad, California, USA) and normalized relative to the endogenous β-actin control values.

Cell transfection, cAMP and calcium measurements

Chinese Hamster Ovary (CHO) cells were transfected with lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using 10 µg DNA per 4 x 10⁶ cells. Stable lines expressing *Spodoptera* DHR were generated through selection of resistance to the antibiotic G418. Cells were maintained in a humidified incubator under 5% CO₂ atmosphere at 37°C and split 1:5 every three days. The growth medium was Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics.

To measure cAMP, the cells, stably expressing the receptor, were washed with PBS 1X (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaH₂PO₄ and 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4), detached from the flasks with a non enzymatic dissociation solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) and resuspended in stimulation buffer (BSA 0.1%, IBMX 0.5% in PBS 1X), containing Alexa Fluor 647 labelled anti-cAMP antibody, at concentration of 10⁶ cells per ml, according to the protocol described in the Lance kit (Perkin Elmer, Woodbridge, Ontario, CA). 12,000 cells were aliquoted in 384-well plates and treated with only buffer, 1 µM *Manduca sexta* diuretic hormone (DH44) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) and 5 µM forskolin (Sigma, St. Louis, MO, USA). In parallel, a standard curve for cAMP was prepared by diluting known concentrations of cAMP in stimulation buffer, in presence of anti-cAMP antibody. The cells were incubated for 1 hour at room temperature and then lysed in 12 µl of detection mix (provided in the kit), containing Eu-W8044-labelled streptavidin and biotin-labeled cAMP. The amount of cAMP produced by the cells was measured by exciting at 320 and recording at 615 and 665 nm by the instrument EnVision (Perkin Elmer, Woodbridge, Ontario, CA).

For calcium measures, cells were loaded with 5 µM of the calcium-sensitive fluorescent dye FLUO3-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), dissolved in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 20% HEPES buffer, 2.5 mM probenecid and 0.02 % pluronic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA). After 45 min incubation at 37°C, the cells were washed three times with HBSS/HEPES/probenecid and dispensed into 96 well-plates containing the agonists: 1 µM *M. sexta* diuretic hormone (DH44) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA), 1 µM carbachol or 0.1 µM ionomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA). The fluorescence at 535 nm (excitation at 495 nm) was recorded every second for 2 min after dispensing the cells by the microplate fluorescence reader Envision (Perkin Elmer, Woodbridge, Ontario, CA).

Results and Discussion

Cloning and characterization of a *S. littoralis* DHR gene

Based on the alignment of the DH₄₄ receptor sequences of *Bombyx mori*, *Acheta domesticus*, *Drosophila melanogaster* and *Tribolium castaneum* present in the Gene bank (except the one of *B. mori*, which was retrieved from Ha et al. 1999), degenerate primers in the conserved regions FLYFKDLRC and IMWVLITKL were designed, and used in PCR reactions on *S. littoralis* cDNA, extracted from larvae at different stages of development. After cloning a first gene fragment of 500 bp, the expression of the DHR gene in all the different larval stages was analyzed by using specific primers in PCR reactions, and compared to the constitutive expression of β-actin. The results, shown in Fig.1, indicated that the expression of the DHR gene was quite constant through the whole larval cycle of *S. littoralis*. On this basis, new cDNA from V-instar larvae was synthesized and used to obtain the whole coding sequence (1190 bp) by 5' and 3' RACE PCR. The gene sequence of *S. littoralis* DHR was deposited in the GenBank with the accession number FJ374690 and was named Spoli-DHR on the basis of the recently proposed consensus nomenclature for insect genes (Coast & Schooley 2011). The analysis of the protein sequence by the algorithm TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) revealed the

presence of the 7 transmembrane domains and a classical GPCR topology with an extracellular N-terminus and a cytosolic C-terminus. The comparison of Spoli-DHR protein sequence with those of other insects showed a high percentage of identity among the lepidopteran species (around 90 %), and a percentage of 52-53 % with other insect orders (Fig. 2).

RNA interference experiments on *S. littoralis* larvae

RNAi is one of the most successful techniques used to evaluate the roles of genes. Recent data have shown that it can be a valuable method to knock down genes even in lepidopteran species (Terenius et al. 2011). For species such as *Bombyx mori* and *Manduca sexta*, the efficiency of silencing for Hox genes and ATPase reached very good levels either by injecting dsRNA into the embryos (Masumoto et al. 2009) or by feeding the larvae with dsRNA (Whyard et al. 2009). For *Spodoptera* species, RNAi by feeding also gave positive results for the genes involved in hormone homeostasis (Griebler et al., 2008), chitin synthesis (Tian et al., 2009) and sugar metabolism (Tang et al., 2010).

To investigate the role of Spoli-DHR in *S. littoralis*, we performed a series of experiments aimed at reducing the expression of this receptor *in vivo*, by using RNAi. The dsRNA corresponding to Spoli-DHR gene was introduced in the insect larvae by two delivery methods: by micro-injection and by feeding.

In a first set of experiments, larvae, ranging in number from 30 to 60 for each condition, were injected with 3 µg of *in vitro* synthesized Spoli-DHR dsRNA (560 bp fragment) and observed for potential morphological changes and mortality rate. Only in 6 experiments out of 15, did the larvae injected with Spoli-DHR dsRNA show significant differences, in term of phenotype and mortality rate, compared to those injected with the control template. In these experiments, we observed an average percentage of mortality of $17.9\% \pm 5.47$ in the larvae injected with the Spoli-DHR-dsRNA before reaching the pupa stage, against $5.8\% \pm 4.6$ in those injected with the control template. A statistical analysis of the results gave a p value < 0.05. Moreover, $10.18\% \pm 3.43$ of the Spoli-DHR dsRNA injected larvae showed an evident phenotype, which was never observed in the controls: they exhibited lethargy the day before dying and appeared much smaller and thinner compared to the control larvae (Fig. 3). RT-PCR analysis conducted on 5 larvae injected with the dsRNA showed that the amount of mRNA corresponding to Spoli-DHR gene was specifically reduced after 48 h by $38.5\% \pm 12.8$ compared to control larvae (data not shown). Unfortunately, these results were not always reproducible, meaning that the technique used to deliver the dsRNA in this experimental system was not sufficiently reproducible. To overcome these difficulties, we decided to produce dsRNA expressing tobacco plants to feed the larvae and evaluate the effect on their development and viability. Thanks to its high versatility to genetic manipulation, tobacco represents a good system to study RNAi by feeding and has been successfully used to knock down gene expression in lepidopteran species, including *Spodoptera* (De Leo et al. 1998; Zhu et al. 2012).

The whole Spoli-DHR coding sequence was sub-cloned into a plant expression vector which, once in the plant cells, produced stable molecules of dsRNA corresponding to the gene of interest. After transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, 20 different tobacco transformants (T0) were selected and checked for the presence of the transgene, by isolating the RNA and performing RT-PCR with specific primers. Figure 4 shows that 11 plants had a detectable level of the specific transgene, in the form of expressed dsRNA. In particular the transgenic lines # 1 and # 6, those having the highest expression level, were propagated and used for all the following tests. In the feeding bioassays, 60 III-instar larvae were transferred into plastic boxes containing leaf disks, excised from either wild type (wt) or transgenic Spoli-DHR plants. Mortality was measured daily for 12 days, until the pupa formation. The experiment was repeated 4 times and the results were

always consistent. The values measured, reported in Fig. 5, indicate that the mortality rate of the larvae fed on the transgenic leaves, deriving from both the lines #1 and #6, was significantly higher than that calculated for the larvae fed on wt plants. Seven days after being fed on the transgenic plants (corresponding to the second day of instar V of the larvae), the mortality of the larval populations, which ate the transgenic leaves, reached almost 100 % compared to 25 % for the controls.

To verify whether the effect of mortality observed in the bioassays was associated with a reduction of the specific mRNA due to the interference, we performed an expression analysis of the DHR gene in the interfered larvae, and compared the levels of the gene product present in larvae fed on wt plants. For this analysis, 5 larvae were assayed at days 3, 5 and 7 from the beginning of the feeding experiment, and total RNA was extracted. By real-time PCR amplifications, we measured the amount of Spoli-DHR gene expression *in vivo*, and the results obtained are shown in Fig. 6. A significant reduction (around 27 %) of Spoli-DHR expression in the larvae fed on the transgenic leaves was observed only after 7 days of feeding, suggesting that the effect of interference caused by the dsRNA-expressing plants was specific and sufficient to cause mortality in the larval populations.

Expression of Spoli-DHR in mammalian cells and bioassays

Having validated Spoli-DHR as target in *Spodoptera*, this receptor was expressed in mammalian cells, in order to study its signaling transduction pathway. The whole Spoli-DHR coding sequence was cloned into pHM6 expression vector downstream of the sequence of the Hemo-Agglutinin (HA) epitope, and transfected in CHO (Chinese Hamster Ovary) cells. The receptor expression level was determined by ELISA assay, which was carried out on fixed cells by using a commercial anti-HA antibody. CHO stable lines expressing Spoli-DHR were produced in order to have a constant and homogeneous expression of the receptor in the cells and to standardize the screening conditions. The study of the signal transduction pathways activated by the receptor showed that both the second messengers cAMP and calcium were involved in the DHR signaling (Fig. 7). To confirm the specificity of the measures, in each experiment the cells were also treated with the compounds forskolin and ionomycin, which stimulate the production of cAMP and calcium, respectively. As comparison, the measures were also conducted on a cell line expressing another GPCR, the *Rattus norvegicus* Muscarinic receptor 3 (RnM3), which is known to be activated by the agonist carbachol and be involved in calcium signaling (Cheng et al. 2002). The study demonstrated that Spoli-DHR can be functionally expressed in mammalian cells and activated by the agonist DH₄, which produces increases of both cAMP and Ca levels, in agreement with previous studies which reported elevations of both Ca and cAMP for most of the DHR analyzed (Johnson et al. 2004; Reagan 1994; Clark et al. 1998).

Conclusions

In this article we demonstrate that feeding *S. littoralis* caterpillars on dsRNA expressing plants decreases the transcription level of the target gene, causing an increase of the mortality rate in the insect populations. RNAi technology by feeding has already been used in several studies to knock down genes in *Spodoptera* species (Terenius et al. 2011), but very few are the examples of using transgenic dsRNA expressing plants (Zhu et al., 2012). In this article, for the first time, it is described the use of a dsRNA in plants, which is directed to reduce the expression of a GPCR gene *in vivo*. Several studies have underlined the involvement of GPCR genes in many vital processes in Lepidoptera, but none of them has ever reported *in vivo* analyses to validate their functions.

Our results suggest that the regulation of DHR expression in *Spodoptera* is essential for the insect's survival, and that this receptor, constantly expressed during the larval development, can

be an easy target of RNAi, and thus represent a good candidate gene for insect control. Although the most widely used method to deliver dsRNA in Lepidoptera is still micro-injection (Quan et al. 2002), in our experiments with *S. littoralis* this method did not give reproducible results. This agrees with both the high range of variability observed in RNAi experiments with different lepidopterans (unpublished data, discussed in Terenius et al., 2011), and the unsuccessful attempts to knock down genes involved in hormone signaling in *S. littoralis* (Iga & Smaghe 2010). *Spodoptera* larval stages are often refractory to RNAi by microinjection and may have different susceptibility depending on the type and the expression level of the gene to knock down. On the other hand, we found out that the effectiveness of RNAi technology using dsRNA expressing plants was much more robust and reliable, giving always consistent results.

In conclusion, the results showed in this article suggest that DHR is of vital importance for *S. littoralis* and thus can be exploited as target of new pest control strategies. Two potential applications emerged from this study: i) the use of transgenic plants expressing dsRNA of Spoli-DHR gene, and ii) the development of a High Throughput Screening (HTS) platform to search for potential modulators of Spoli-DHR activity, which may represent novel and selective agrochemicals to use in the control of *S. littoralis*.

Acknowledgements

We want to thank prof. Maarten Chrispeels (University of San Diego, CA, USA), prof. Franco Pennacchio (University of Napoli, Federico II, Italy) and Dr. Lucio Filippini (Isagro Ricerca, Novara, Italy) for their critical reading of the article and suggestions. We also thank Dr. Marida Bimonte for her help in the statistical analysis of the data. The research was supported by the grants "PIA 598" and "GenoPom" (laboratorio Pubblico-Privato, MIUR 2005-2010).

References

- Allen JA, Roth BL. 2011. Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 51: 117-144.
- Binns AN, Thomashow MF. 1998. Cell biology of *Agrobacterium tumefaciens* infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiology* 42: 575-606.
- Cabrero P, Radford JC, Broderick KE, Costes L, Veenstra JA, Spana EP, Davies SA, Dow JA. 2002. The Dh gene of *Drosophila melanogaster* encodes a diuretic peptide that acts through cyclic AMP. *Journal of Experimental Biology* 205: 3799-807.
- Casida JE, Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology* 43: 1-16.
- Cheng K, Khurana S, Chen Y, Kennedy RH, Zimniak P, Raufman JP. 2002. Lithocholylcholine, a bile acid/acetylcholine hybrid, is a muscarinic receptor antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303: 29-35.
- Clark TM, Hayes TK, Holman GM, Beyenbach KW. 1998. The concentration-dependence of CRF-like diuretic peptide: mechanisms of action. *Journal of Experimental Biology* 201: 1753-1762.
- Coast GM, Garside CS. 2005. Neuropeptide control of fluid balance in insects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040: 1-8.
- Coast GM, Schooley D. 2011. Toward a consensus nomenclature for insect neuropeptides and peptide hormones. *Peptides* 32: 620-631.
- Coast GM, Webster SG, Schegg KM, Tobe SS, Schooley DA. 2001. The *Drosophila melanogaster* homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. *Journal of Experimental Biology* 204: 1795-804.

- Conte I, Carrella S, Avellino R, Karali M, Marco-Ferrerres R, Bovolenta P, Banfi S. 2010. miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 107: 15491–15496.
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890.
- Corrado G, Arciello S, Fanti P, Fiandra L, Garonna A, Di Gilio M, Lorito M, Giordana B, Pennacchio F, Rao R. 2007. The Chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. *Transgenic Research* 13: 1776-1785.
- Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. 2008. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience* 13: 1240-9.
- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. 2007. DDT, pyrethrins and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59: 151-162.
- De Leo F, Bonadè-Bottino MA, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L. 1998. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiology* 118: 997-1004.
- Fan Y, Sun P, Wang Y, He X, Deng X, Chen X, Zhang G, Chen X, Zhou N. 2010. The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 581-591.
- Glantz SA. 2005. *Primer of Biostatistics*, McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Griebler M, Westerlund SA, Hoffmann KH, Meyering-Vos M. 2008. RNA interference with the allatone-regulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *Journal of Insect Physiology* 54: 997-1007.
- Ha SD, Kataoka H, Suzuki A, Kim BJ, Kim HJ, Hwang SH, Kong JY. 2000. Cloning and sequence analysis of cDNA for Diuretic Hormone Receptor from the *Bombyx mori*. *Molecules and Cells* 10: 13-17.
- Hector CE, Bretz CA, Zhao Y, Johnson EC. 2009. Functional differences between two CRF-related diuretic hormone receptors in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* 212: 3142-3147.
- Hill DS. 1987. *Agricultural insect pests of temperate regions and their control*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Iga M, Smagghe G. 2010. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides* 31: 456-67.
- Johnson EC, Bohn LM, Taghert PH. 2004. *Drosophila* CG8422 encodes a functional diuretic hormone receptor. *Journal of Experimental Biology* 207: 43-48.
- Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, Taghert PH. 2005. A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *Journal of Experimental Biology* 208: 1239-46.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P. 2005. Modular cloning and expression of tagged fluorescent protein in plant cells. *Trends in Plant Science* 10: 103-105.
- Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 96: 1840-5.
- Marinissen MJ, Gutkind JS. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences* 22: 368-76.
- Masumoto M, Yaginuma T, Niimi T. 2009. Functional analysis of Ultrabithorax in the silkworm, *Bombyx mori*, using RNAi. *Development Genes and Evolution* 219: 437-44.

- Mertens I, Vandingenen A, Johnson EC, Shafer OT, Li W, Trigg JS, De Loof A, Schoofs L, Taghert PH. 2005. PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* 48: 213-219.
- Mosallanejad H, Smaghe G. 2009. Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pest Management Science* 65: 732-736.
- Ohta H, Oshiumi H, Hayashi N, Imai T, Ozoe Y, Morimure S, Kida K. 2012. A secreted placental alkaline phosphatase-based reporter assay system for screening of compounds acting at an Octopamine receptor stably expressed in a mammalian cell line. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76: 209-211.
- Quan GX, Kanda T, Tamura T. 2002. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Molecular Biology* 11: 217-22.
- Reagan J. 1994. Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9-12.
- Relyea RA. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159: 363-76.
- Sivasupramaniam S, Moar WJ, Ruschke LG, Osborn JA, Jiang C, Sebaugh JL, Brown GR, Shapley ZW, Oppenhuizen ME, Mullins JW, Greenplate JT. 2008. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. *Journal of Economical Entomology* 101: 546-54.
- Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology* 26: 199-202.
- Tang B, Chen J, Yao Q, Pan Z, Xu W, Wang S, Zhang W. 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *Journal of Insect Physiology* 56: 813-821.
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL, Barthel A, Bebas P, Bitra K et al. 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology* 57: 231-45.
- Thomsen W, Frazer J, Unett D. 2005. Functional assays for screening GPCR targets. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 655-665.
- Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, Zhang W. 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One* 4: e6225.
- Whyard S, Singh AD, Wong S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 824-832.
- Woehler A, Ponimaskin EG. 2009. G protein-mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Current Molecular Pharmacology* 2: 237-48.
- Zhu JQ, Liu S, Ma Y, Zhang JQ, Qi HS, Wei ZJ, Yao Q, Zhang WQ, Li S. 2012. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. *PLoS ONE* 7: 1-9.

Figures below

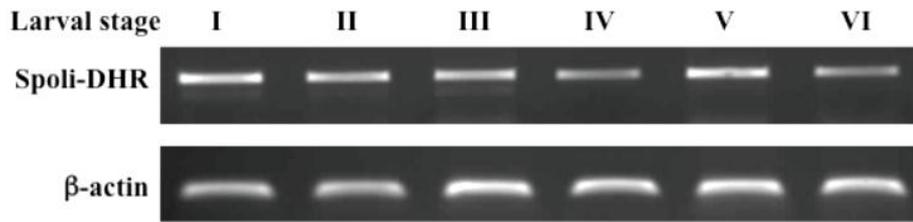


Figure 1. Spoli-DHR gene expression in the different larval stages of *S. littoralis*. For each stage, three to five larvae were frozen in liquid nitrogen and RNA extracted. The synthesized cDNA was used as template in PCR reactions by using specific oligo-nucleotides. The band of around 500 bp (upper panel) corresponds to the DHR gene. The gene of the β -actin (lower panel) was used as comparative standard to quantify the expression of the DHR gene.

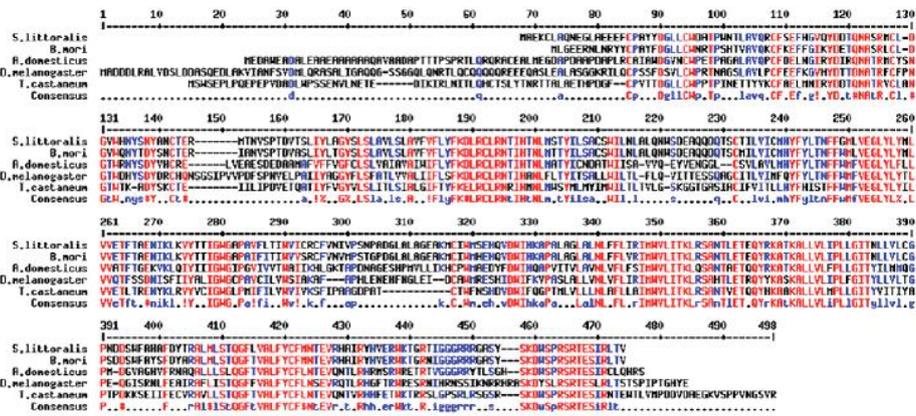


Figure 2. Alignment of the DHR protein sequences belonging to the species: *S. littoralis* ACJ06650.1; *B. mori* (Ha et al. 1999), *A. domesticus* AAC47000.1; *D. melanogaster* AAY55823.1; *T. castaneum* NP001167548.1. To make the alignment, the program "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" (Corpet, 1988) was used.



Figure 3. Photographs of *S. littoralis* interfered larvae. V-instar larvae were injected with dsRNA and observed after 48 h. A, larva injected with the dsRNA control template; B and C, larvae injected with 3 μ g of Spoli-DHR dsRNA.

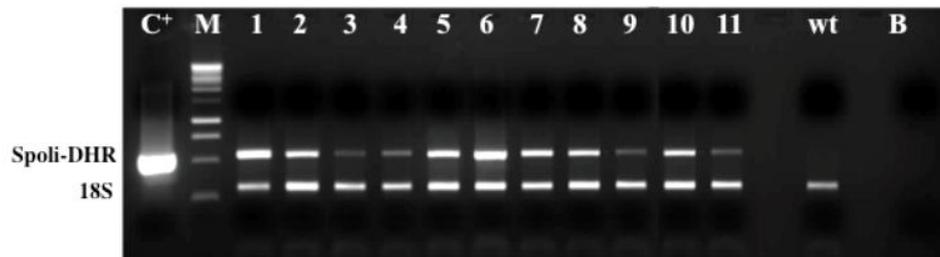


Figure 4. RT-PCR of transgenic tobacco plants expressing Spoli-DHR dsRNA. Spoli-DHR, 500 bp fragment corresponding to *S. littoralis* DHR gene; 18S, internal standard. Lanes: C⁺, pENTR-2B+DHR gene (positive control of the PCR); M, 1kb DNA ladder; 1-11, samples of the transformed plants; wt, untransformed tobacco plants; B, blank (negative control of the PCR).

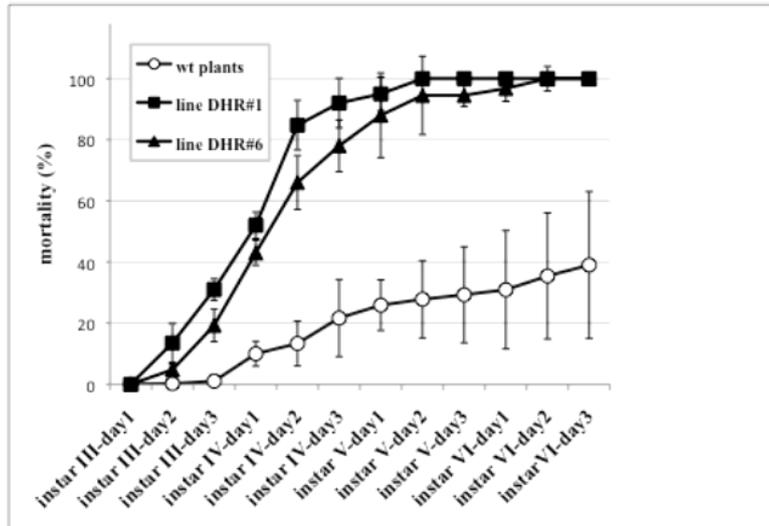


Figure 5. Daily percentage of mortality of *S. littoralis* larvae. Starting from the III instar, the larvae were fed on transgenic Spoli-DHR dsRNA plants, belonging to line #1 (full squares) and line #6 (full triangles), and on wt plants (empty circles). The mortality rate was measured every day until the pupa stage. The values are averages of 4 experiments and the error bars indicate standard deviations (* $p < 0.01$).

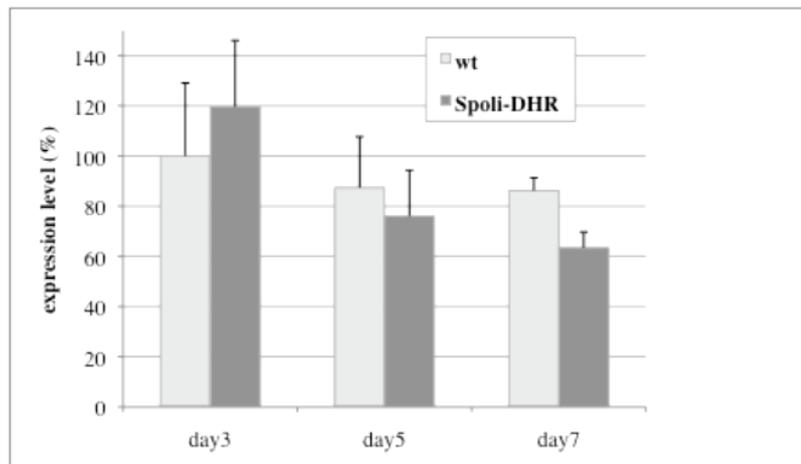


Figure 6. DHR gene expression level of *S. littoralis* larvae analyzed by real-time PCR. Larvae fed on wt plants (light columns) and transgenic plants (dark columns) were collected at the days 3, 5 and 7 after the beginning of the experiment and total RNA was extracted for the quantitative analysis. The values are averages of 3 experiments and error bars indicate standard deviations (* $p < 0.01$).

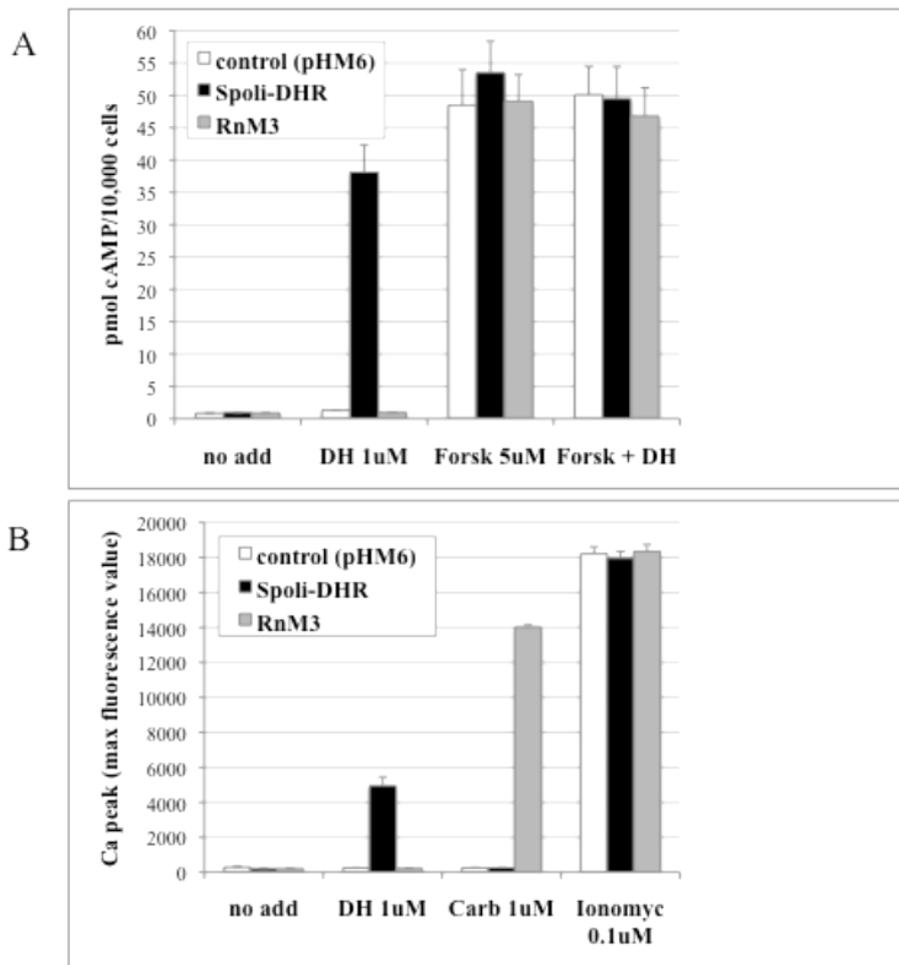


Figure 7. Measure of cAMP (A) and calcium (B) content in CHO cells. Cell lines stably expressing Spoli-DHR and *Rattus norvegicus* Muscarinic Receptor 3 (RnM3) were treated with the indicated agonists and the level of the two second messengers was measured. DH, *Manduca sexta* DH₄₄; Forsk, forskolin; Carb, carbachol; Ionomyc, ionomycin.

BIBLIOGRAFIA

- Adelman, Z. N., Blair, C. D., Carlson, J. O., Beaty, B. J. and Olson, K. E., 2001. Sindbis virus-induced silencing of dengue viruses in mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* **10**: 265-273.
- Akai, H., Sato, S., 1973. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **2**: 207-231.
- Ali, A. and Young, S. Y., 1996. Activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against different ages and stages of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. *J. Econ. Entomol.* **31**:1-8.
- Aljamali, M., Bowman, A. S., Dillwith, J. W., Tucker, J. S., Yates, G. W., Essenberg, R. C. and Sauer, J. R., 2002. Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**: 331-341.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M. and Carrington, J. C., 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207-221.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Amdam, G. V., Simoes, Z. L., Guidugli, K. R., Norberg, K. and Omholt, S. W., 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnol.* **3**: 1.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. and Vance, V. B., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 13079-13084.
- Arakane, Y., Li, B., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Kramer, K. J. and Park, Y., 2008. Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH,

- CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.* **125**: 984-995.
- Araujo, R. N., Santos, A., Pinto, F. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J., Pereira, M. H., 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophenol 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **36**: 683-693.
- Aravin, A. A., Hannon, G. J. and Brennecke, J., 2007a. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* **318**: 761-764.
- Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J. and Tuschl, T., 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell.* **5**: 337-350.
- Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K. and Hannon, G. J., 2007b. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science* **316**: 744-747.
- Aronstein, K., Pankiw, T., Saldivar, E., 2006. SID-1 is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *J. Apicultural Res.* **45**: 20-24.
- Asgari, S., 2006. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **61(3)**: 146-156.
- Askew, R. R. & Shaw, M. R., 1986. Parasitoid Communities: Their size, structure and development. In *Insect Parasitoids* (eds. J. Waage and D. Greathead), Academic Press, London. pp. 225-264.
- Barat-Houarim, Hilliou, F., Jousset F. X., Sofer, L., Deleury, E., Rocher, J., Ravallec, M., Galibert, L., Delobel, P., Feyereisen, R., Fournier, P., Volkoff, A. N., 2006. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnavirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. *BMC Genomics* **7**:160.
- Batista, C. V. F., del Pozo, L., Zamudio, F. Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E. e Possani, L. D., 2003. Proteomics of the venom from the

- Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromat.* **803(1)**: 55-66
- Bauer, L. S., 1990. Response of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*. *Environ. Entomol.* **19**: 428-431.
- Bauer, L. S., 1992. Response of the imported willow leaf beetle to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on poplar and willow. *J. Invertebr. Pathol.* **59**: 330-331.
- Baulcombe, D., 2005. "RNA silencing". *Trends Biochem. Sci.* **30(6)**: 290-293.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **25**: 1322-1326.
- Bautista, M. A., Miyata, T., Miura, K., Tanaka, T., 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 38-46.
- Beaulaton, J., 1968. Etude ultrastructural et cytochimique des glandes prothoraciques de vers a soie aux quatrieme and cinquieme ages larvaires. La tunica propria et ses relations avec les abres conjonctives et les hemocytes. *J. Ultrastruct. Res.* **23**: 474-498.
- Beck, M. and Strand, M. R., 2005. Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect high five and S2 cells. *J. Virol.* **79**: 1861-1870.
- Beck, M. H. and Strand, M. R., 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 19267-19272.
- Bell, H. A., Kirkbride-Smith, A. E., Marris, G. C., Edwards, G. P., 2004. Teratocytes of the solitary endoparasitoid *Meteorus gyrator*

- (Hymenoptera: Braconidae): morphology, numbers and possible functions. *Physiol. Entomol.* **29** (4): 335-343.
- Belles, X., 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Ann. Rev. Ent.* **55**: 111-128.
- Berge, J. B., Feyereisen, R. and Amichot, M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **353**: 1701-1705.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J., 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.
- Billecocq, A., Vazeille-Falcoz, M., Rodhain, F. and Bouloy, M., 2000. Pathogenspecific resistance to Rift Valley fever virus infection is induced in mosquito cells by expression of the recombinant nucleoprotein but not NSs non-structural protein sequences. *J. Gen. Virol.* **81**: 2161-2166.
- Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I. G., Hoffmann, J. A., Royet, J., 2006. Down regulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathogens* **2**: 139-147.
- Boisson, B., Jacques, J., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K., Bourgouin, C., 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett.* **580**: 1988-1992.
- Borovsky, D., 2005. Insect peptide hormones and RNA-mediated interference (RNAi): promising technologies for future plant protection. *Phytoparasitica* **33**: 109-112.
- Bowman, A. S., Coons, L. B., Needham, G. R. and Sauer, J. R. (1997). Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Med. Vet. Entomol.* **11**: 277-285.
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R. and Hannon, G. J., 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* **128**: 1089-1103.

- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. and Baulcombe, D. C., 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**: 6739-6746.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E. and Mahaffey, J. W., 1999. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol. Dev.* **1**: 11-15.
- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M., 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.* **12**: 85-86
- Campbell, C. L., Keene, K. M., Brackney, D. E., Olson, K. E., Blair, C. D., Wilusz, J. and Foy, B. D., 2008. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC Microbiol.* **8**: 47
- Campbell, T. N, Choy, F. Y., 2005. "RNA Interference: Past, Present and Future". *Curr. Issues Mol. Biol.* **7(1)**: 1-6.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R. A., 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 9742-9747.
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. & Hannon, G. J., 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes. Dev.* **16**: 2733-2742.
- Caroli, L., Valentini, F., Pasqualini, E. 1998. *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* and *aizawai* [bacterial pesticides - grapevine - fruit crops - vegetable crops]. *Informatore Fitopatologico* **48(7-8)**: 37-44
- Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J., 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642-655.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B. L., Nonaka, M., Söderhäll, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 575-583.

- Cerenius, L., Lee, B. L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* **29**: 263-271.
- Chen, J., Zhang, D., Yao, Q., Zhang, J., Dong, X., Tian, H. and Zhang, W., 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.* **19**: 777-786.
- Chiti, F., Dobson, C. M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 333-366.
- Chung, W. J., Okamura, K., Martin, R. and Lai, E. C., 2008. Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr. Biol.* **18**: 795-802.
- Cirimotich, C. M., Scott, J. C., Phillips, A. T., Geiss, B. J. and Olson, K. E. (2009). Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* **9**: 49.
- Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J. M., Poirié, M., 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenol-oxidase cascade. *Dev. Comp. Immunol.* **33**: 681-689.
- Cruz, J., Mané-Padrós, D., Bellés, X., Martín, D., 2006. Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect *Blattella germanica* revealed by systemic RNAi *in vivo*. *Dev. Biol.* **297**: 158-171.
- Dai, H., Ma, L., Wang, J., Jiang, R., Wang, Z. and Fei, J., 2008. Knockdown of ecdysis-triggering hormone gene with a binary UAS/GAL4 RNA interference system leads to lethal ecdysis deficiency in silkworm. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **40**: 790-795.
- Dani, M. P., Richards, E. H., Edwards, J. P., 2004. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **86**:19-25

- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R. and Williamson, M. S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* **59**: 151-162.
- De Buron, I., Beckage, N.E., 1997. Developmental changes in teratocytes of the braconid wasp *Cotesia congregata* in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect. Physiol.* **43(10)**: 915-930.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F. and Hannon, G. J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**: 231-235.
- Digilio, M. C., Isidoro, N., Tremblay, E., Pennacchio, F., 2000. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *J. Insect Physiol.* **46**: 1041-1050.
- Dong, Y. and Friedrich, M., 2005. Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnol.* **5**: 25
- Drezen, J. M., Herniou E. A., Bézier, A., 2012. Evolutionary progenitors of bracoviruses. In: Beckage Nancy. *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. p. 15-31, Elsevier, ISBN: 9780123848581, doi: 10.1016/B978-0-12-384858-1.00022-9
- Drezen, J. M., Provost, B., Espagne, Cattolico, E., L., Dupuy, C., Poirié, M., Periquet, G. and Huguet. E., 2003. Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. *J. Insect Physiol.* **49**: 407-417.
- Du, L., Ge, F., Zhu, S. and Parajulee, M. N., 2004. Effect of cotton cultivar on development and reproduction of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and its predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.* **97**: 1278-1283.
- Dufourmantel, N., Pelissier, B., Garcon, F., Peltier, G., Ferullo, J. M. and Tissot, G., 2004. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol.* **55**: 479-489.
- Dunoyer, P., Brosnan, C. A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C. and Voinnet, O., 2010. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.* **29**: 1699-1712.

- Dupuy, C., Huguet, E. e Drezen, J. M., 2006. Unfolding the evolutionary story of polydnviruses. *Virus Research*. **117(1)**: 81-89.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., Manev, H., 2001. Intra-abdominal injection of doublestranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol. Psychiatry* **6**: 665-670
- Eaton, B. A., Fetter, R. D., Davis, G. W., 2002. Dynactin is necessary for synapse stabilization. *Neuron* **34(5)**: 729-741
- Eggleton, P. & Bradshaw, R., 1992. Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **337**: 1-20.
- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S. A., Aslam, S., Marshall, J. W., Cox, R. J., Simpson, T. J., Clarke, D. J., Ffrench-Constant, R. H., Reynolds, S. E., 2007. An anti-biotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defences through phenoloxidase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 2419-2424.
- Eleftherianos, I., Marokhazi, J., Millichap, P. J., Hodgkinson, A. J., Sriboonlert, A., Ffrench-Constant, R. H., Reynolds, S. E., 2006a. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photorhabdus luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **36**: 517-525.
- Eleftherianos, I., Millichap, P. J., Ffrench-Constant, R. H., Reynolds, S. E., 2006b. RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photorhabdus*. *Dev. Comp. Imm.* **30**: 1099-1107.
- Eleftherianos, I., Xu, M., Yadi, H., Ffrench-Constant, R. H., Reynolds, S. E., 2009. Plasmatocyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *J. Exp. Biol.* **212**: 1840-1848.
- Erturk-Hasdemir, D., Silverman, N., 2005. Eater: a big bite into phagocytosis. *Cell* **123**: 190-192.

- Espagne, E., Balhadère, P., Penin, M. L., Barreau, C. and Turcq, B., 2002. HET-E and HET-D Belong to a New Subfamily of WD40 Proteins Involved in Vegetative Incompatibility Specificity in the Fungus *Podospora anserina*. *Genetics*, **161**: 71-81.
- Espagne, E., Dupuy, C., Huguet, E., Cattolico, L., Provost, B., Martins, N., Poiriè, M., Periquet, G. & Drezen, J.-M., 2004. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* **306**: 286-289.
- Fabrick, J. A., Kanost, M. R., Baker, J. E., 2004. RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *J. Insect Sci.* **4**:15
- Fagegaltier, D., Bouge, A. L., Berry, B., Poisot, E., Sismeiro, O., Coppee, J. Y., Theodore, L., Voinnet, O. and Antoniewski, C., 2009. The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 21258-21263.
- Falabella, P., Caccialupi, P., Varricchio, P., Malva, C. and Pennacchio, F., 2006. Protein Tyrosine Phosphatases of *Toxoneuron nigriceps* Bracovirus as Potential Disrupters of Host Prothoracic Gland Function. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **61**: 157-169.
- Falabella, P., Riviello, L., Caccialupi, P., Rossodivita, T., Valente, M. T., De Stradis, M. L., Tranfaglia, A., Varricchio, P., Gigliotti, S., Graziani, F., Malva, C., Pennacchio, F., 2007a. A γ -Glutamyl Transpeptidase of *Aphidius ervi* induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**: 456-465.
- Falabella, P., Riviello, L., Pascale, M., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Grimaldi, A., Iannone, C., Monti, M., Pucci, P., Tamburro, A. M., de Eguileor, M., Gigliotti, S., Pennacchio, F., 2012. Functional amyloids in insect immune response. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **42**: 203-211.
- Falabella, P., Varricchio, P., Gigliotti, S., Tranfaglia, A., Pennacchio, F., and Malva, C., 2003. *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus encodes a putative aspartyl protease highly expressed in parasitized host larvae. *Insect Molec. Biol.* **12**: 9-17

- Falabella, P., Varricchio, P., Provost, B., Espagne, E., Ferrarese, R., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Fimiani, G., Ursini, M. V., Malva, C., Drezen, J. M., and Pennacchio, F., 2007b. Characterization of the IKB-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies. *Gen. Virol.* **88**: 92-104.
- Fan, Y., Sun, P., Wang, Y., He, X., Deng, X., Chen, X., Zhang, G., Chen, X., Zhou, N., 2010. The G protein coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. and Molec. Biol.* **40**: 581-591.
- Feinberg, E., Hunter, C., 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* **301**: 1545-1547
- Feldhaar, H. and Gross, R., 2009. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 1-8.
- Ferro, D. N. and Lyon, S. M., 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval mortality: operative effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *J. Econ. Entomol.* **84**: 806-809.
- Filipowicz, W., 2005. RNAi: The nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* **122**: 17-20.
- Finney, D. J., 1971. Probit Analysis. *Cambridge University Press*.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fitches, E., Woodhouse, S. D., Edwards, J. P. and Gatehouse, J. A., 2001. *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*, Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae, mechanisms of insecticidal action. *J. Insect Physiol.* **47**: 777-787.
- Fleming, J. G. W., 1992. Polydnaviruses: mutualist and phathogens. *Annu. Rev. Entomol.* **37**: 401-425.
- Fleming, J. G. W., Krell, P. J., 1993. Polydnavirus genome organization. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A. (Eds.), Parasites and pathogens of insects. *Parasites, Academic Press, New York.* **1**: 189-225.

- Forde, S. E., Thompson, J. N. and Bohannan, B. J. M., 2004. Adaptation varies through space and time in a coevolving hostparasitoid interaction. *Nature* **431**:841-844.
- Fowler, D. M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., Kelly, J. W., 2006. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* **4**: 100-107.
- Fowler, D. M., Koulov, A.V., Balch, W. E., Kelly, J. W., 2007. Functional amyloid e from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 217-224.
- Fujita, K., Shimomura, K., Yamamoto, K., Yamashita, T., Suzuki, K., 2006. A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochem. Biophysic. Res. Com.* **345**: 502-507.
- Gaines, P. J., Olson, K. E., Higgs, S., Powers, A. M., Beaty, B. J. and Blair, C. D., 1996. Pathogen-derived resistance to dengue type 2 virus in mosquito cells by expression of the premembrane coding region of the viral genome. *J. Virol.* **70**: 2132-2137.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. A. and Imler, J. L., 2006. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat. Immunol.* **7**: 590-597.
- Gerling, D. & Orion, T., 1973. The giant cells produced by *Telenomus remus* Nixon (Hym., Scelionidae). *J. Invert. Pathol.* **21**.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P. D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 94-108.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L., Zapp, M. L., Weng, Z. and Zamore, P. D., 2008. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* **320**: 1077-1081.
- Ghosh, S. & Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* **109**: 81-96.

- Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B., 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-260.
- Gish, W. and States, D. J., 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3**: 266-272.
- Godfray, H. C. J., 1994. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology, Princeton University Press, Princeton.
- Gómez-Gutiérrez, J., Peterson, W. T., De Robertis, A., Brodeur, R. D., 2003. Mass mortality of krill caused by parasitoid ciliates. *Science* **301(5631)**: 339.
- Gordon, K. H. J., Waterhouse, P. M., 2007. RNAi for insect-proof plants. *Nat. Biotechnol.* **25**: 1231-1232.
- Greenwald, J., Riek, R., 2010. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure.* **18**: 1244-1260.
- Griebler, M., Westerlund, S. A., Hoffmann, K. H., Meyering-Vos, M., 2008. RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *J. Insect Phys.* **54**: 997-1007.
- Grosshans, H. and Filipowicz, W., 2008. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* **451**: 414-416.
- Guang Yang, Minsheng You, Liette Vasseur, Yiyang Zhao and Chunhui Liu, 2011. Development of RNAi in Insects and RNAi-Based Pest Control, Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-457-3
- Ha, S. D., Kataoka, H., Suzuki, A., Kim, B. J., Kim, H. J., Hwang, S. H., Kong, J. Y., 2000. Cloning and sequence analysis of cDNA for Diuretic Hormone Receptor from the *Bombyx mori*. *Molecules and Cells.* **10**: 13-17.
- Hakim, R. S., Baldwin, K., Smaghe, G., 2010. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Ann. Rev. Ent.* **55**: 593-608.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H. and Kim, V. N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**: 3016-3027.
- Hartig, J. V., Tomari, Y. and Forstemann, K., 2007. piRNAs the ancient hunters of genome invaders. *Genes Dev.* **21**: 1707-1713.
- Hector, C. E., Bretz, C. A., Zhao, Y., Johnson, E. C., 2009. Functional differences between two CRF related diuretic hormone receptors in *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* **212**: 3142-3147.
- Hill, C. C. and Emery, W. T., 1937. The biology of *Platygaster herrickii*, a parasite of the hessian fly. *J. Agric. Res.* **55**.
- Hill, D. S., 1987. Agricultural Insect Pests of Temperate Regions and Their Control. *2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge*.
- Hirai, M., Terenius, O., Faye, I., 2004. Baculovirus and dsRNA induce hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi*. *Insect Mol. Biol.* **13**: 399-405.
- Hossain, M., Shimizu, S., Matsuki, M., Imamura, M., Sakurai, S., Iwami, M., 2008. Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **38**: 1001-1007.
- Hou, B.-K., Zhou, Y.-H., Wan, L.-H., Zhang, Z.-L., Shen, G.-F., Chen, Z.-H. and Hu, Z.-M., 2003. Chloroplast transformation in oilseed rape. *Trans. Res.* **12**: 111-114.
- Houwing, S., Kamminga, L. M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D. V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C. B., Plasterk, R. H., Hannon, G. J., *et al.*, 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in *Zebrafish*. *Cell* **129**: 69-82.
- Howard, A., Bell, A., Kirkbride-Smith, G. and Edwards, J., 2004. Teratocytes of the solitary endoparasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae): morphology, numbers and possible functions. *Physiol. Entomol.* **29**: 335-343.

- Huang, J., Zhang, Y., Li, M., Wang, S., Liu, W., Couble, P., Zhao, G. and Huang, Y., 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *FEBS Lett.* **581**: 697-701.
- Hughes, C. L. and Kaufman, T. C., 2000. RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development* **127**: 3683-3694.
- Hutvagner, G. & Zamore, P. D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**: 2056-2060.
- Huvenne, H., Smagghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potentials of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol* **56**: 227-235
- Iga, M., Smagghe, G., 2010. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides* **31**: 456-67.
- Isoe, J., Rascon, A. A. Jr., Kunz, S. and Miesfeld, R. L., 2009. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 903-912.
- James, R. R., Croft, B. A. and Strauss, S. H., 1999. Susceptibility of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to different strains and transgenic toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* **28**: 108-115.
- Jaubert-Possamai, S., Le Trionnaire, G., Bonhomme, J., Christophides, G., Rispe, C. and Tagu, D., 2007. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Biotechnol.* **7**: 63.
- Johnson, E. C., Shafer, O. T., Trigg, J. S., Park, J., Schooley, D. A., Dow, J. A., Taghert, P. H., 2005. A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *J. Exp. Biol.* **208**: 1239-1246.
- Jose, A. M., Hunter, C. P., 2007. Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Ann. Rev. Gen.* **41**: 305-330.

- Kan, H., Kim, C. H., Kwon, H. M., Park, J. W., Roh, K.B., Lee, H., Park, B. J., Zhang, R., Zhang, J., Söderhäll, K., Ha, N. C., Lee, B. L., 2008. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *J. Biol. Chem.* **283**: 25316-25323.
- Kanginakudru, S., Royer, C., Edupalli, S. V., Jalabert, A., Mauchamp, B., Chandrashekaraiah, Prasad, S. V., Chavancy, G., Couble, P. and Nagaraju, J., 2007. Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. *Insect Mol. Biol.* **16**: 635-644.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C., 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**: 461-470.
- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A. and Jin, H., 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **21**: 3123-3134.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B. J. and Jin, H., 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 18002-18007.
- Keene, K. M., Foy, B. D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B. J., Blair, C. D. and Olson, K. E., 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus, Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 17240-17245.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J. and Zilberstein, A., 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**: 365-373.
- Kennerdell, J. R., Carthew, R. W., 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using doublestranded RNA. *Nature Biotech.*, **18(8)**: 896-898.
- Khoo, C. C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K. E. and Franz, A. W., 2010. The RNA interference pathway affects midgut infection and

- escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol.* **10**: 130.
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., Strom, C., Conto, S. L., Hetru, C., Stuart, L. M., Stehle, T., Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M., Ferrandon, D., Ramet, M., Ezekowitz, R. A. B., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* **123**: 335-346.
- Konopova, B., Jindra, M., 2008. Broad-complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive Holometabolan metamorphosis. *Development* **135**: 559-568
- Krell, P. J., 1991. The polydnaviruses: multipartite DNA viruses from parasitic Hymenoptera. In: Kurstak, E. (Ed.), *Viruses of invertebrates*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 141-177.
- Kroemer, J. A. & Webb, B. A., 2004. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. *Annu. Rev. Entomol.* **49**: 431-456.
- Kumar, S., Dhingra, A. and Daniell, H., 2004. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol. Biol.* **56**: 203-216.
- Laneve, P., Gioia, U., Ragno, R., Altieri, F., Di Franco, C., Santini, T., Arceci, M., Bozzoni, I., Caffarelli, E., 2008. The tumor marker human placental protein 11 is an endoribonuclease. *J. Biol. Chem.* **283**: 34712-34719.
- Lapointe, R., Wilson, R., Vilaplana, L., O'Reilly, D. R., Falabella, P., Douris, V., Bernier-Cardou, M., Pennacchio, F., Iatrou, K. & other authors, 2005. Expression of a *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus-encoded protein causes apoptosis-like programmed cell death in lepidopteran insect cells. *J. Gen. Virol.* **86**: 963-971.
- Lavine, M. D., Beckage, N. E., 1995. Polydnaviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitol. Today* **11**: 368-378.
- Lavine, M. D., Strand, M. R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**: 1295-1309.

- Lawrence, P. O., Lanzrein, B., 1993. Hormonal interactions between insect endoparasites and their host insects. In: Beckage, N. E., Thompson, S. N., Federici, B. A. (Eds.), *Parasites and pathogens of insects. Parasites. Academic Press, N.Y.* **1**: 59-86.
- Lee, Y. S., Pressman, S., Andress, A. P., Kim, K., White, J. L., Cassidy, J. J., Li, X., Lubell, K., Lim, D. H., Cho, I. S., Nakahara, K., Preall, J. B., Bellare, P., Sontheimer, E. J., Carthew, R.W., 2009. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat. Cell Biol.* **11**: 1150-1156.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V. N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415-419.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 697-743.
- Li, F. and Ding, S. W., 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 503-531.
- Li, H. W., Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., Ji, L. H., Wong, S. M. and Ding, S. W., 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* **18**: 2683-2691.
- Li, H., Li, W. X. and Ding, S. W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296**: 1319-1321.
- Li, S., Falabella, P., Kuriachan, I., Vinson, S. B., Borst, D. W., Malva, C., Pennacchio, F., 2003. Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. *J. Insect Physiol.* **49**: 1021-1030.
- Li, W., Zangerl, A. R., Schuler, M. A. and Berenbaum, M. R., 2004. Characterization and evolution of furanocoumarin-inducible cytochrome P450s in the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*. *Insect Mol. Biol.* **13**: 603-613.

- Li, Y., Jian-Feng, L., Feng, C., Ke, X., Fu, W., 2007. Role of venom and ovarian proteins in immune suppression of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid. *Insect Sci.* **14**: 93-100.
- Lin, H., 2007. piRNAs in the germ line. *Science* **316**: 397-403.
- Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**: 725-733.
- Ling, E., Yu, X.Q., 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**: 1356-1366.
- Lipardi, C. and Paterson, B. M., 2009. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* involved in RNAi and transposon suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 15645-15650
- Lipardi, C., Paterson, B. M., 2010. Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in *Drosophila* establishes a common theme in RNA silencing. *Fly* **4**: 1-6.
- Lipardi, C., Wei, Q., Paterson, B. M., 2001. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* **107**: 297-307.
- Liu, C., Yamamoto, K., Cheng, T.-C., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Liu, S.-P., Han, Y., Futahashi, R., Kidokoro, K., Noda, H., Kobayashi, I. Tamura, T., et al., 2010a. Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 12980-12985.
- Liu, C., Yamamoto, K., Cheng, T.-C., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Liu, S.-P., Han, Y., Futahashi, R., Kidokoro, K., Noda, H., Kobayashi, I. Tamura, T., et al., 2010a. Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 12980-12985.

- Liu, S., Ding, Z., Zhang, C., Yang, B. and Liu, Z., 2010b. Gene knockdown by introthoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvatalugens*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**: 666-671.
- Lorence, A., Darszon, A., Diaz, C., Lievano, A., Quintero, R. and Bravo, A., 1995. d-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membrane vesicles in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **360**: 217-222.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O. and Ding, S. W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20 kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 15742-15747.
- Lu, Z., Beck, M. H., Wang, Y., Jiang, H., Strand, M. R., 2008. The viral protein Egfl.0 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **283**: 21325-21333.
- Luckhart, S., Webb, B. A., 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. *Dev. Comp. Imm.* **20**: 1-21.
- Maleszka, J., Foret, S., Saint, R. and Maleszka, R., 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol.* **217**: 189-196.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., Huang, Y. P., Chen, X. Y., 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* **25**: 1307-1313.
- March, J. C., Bentley, W. E., 2007. RNAi-based tuning of cell cycling in *Drosophila* S2 cells: Effects on recombinant protein yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73(5)**:1128-1135.
- Marinissen, M. J., Gutkind, J. S., 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharma. Sci.* **22**: 368-76.

- Martín, D., Maestro, O., Cruz, J., Mane-Padros, D., Bellés, X., 2006. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.* **52**: 410-416.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Tuschl, T., 2002. Single stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574.
- Matten, S. R., Head, G. P., Quemada, H. D., 2008. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs, eds Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG (Springer, New York), pp 27-39.
- Matzke, M. A., Birchler, J. A., 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 24-35.
- Mazumdar-Leighton, S. and Broadway, R. M., 2001. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**: 633-644.
- McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M. and Maliga, P., 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (N.Y.)* **13**: 362-365.
- Meister, G., Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-349
- Mertens, I., Vandingenen, A., Johnson, E. C., Shafer, O. T., Li, W., Trigg, J. S., De Loof, A., Schoofs, L., Taghert, P. H., 2005. PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* **48**: 213-219.
- Meyering-Vos, M., Muller, A., 2007. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **53**: 840-848.
- Miller, D. J. and Ahlquist, P., 2002. Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for

- mitochondrial localization and membrane insertion. *J. Virol.* **76**: 9856-9867.
- Miller, D. J., Schwartz, M. D. and Ahlquist, P., 2001. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells. *J. Virol.* **75**: 11664-11676.
- Miller, D. J., Schwartz, M. D., Dye, B. T. and Ahlquist, P., 2003. Engineered retargeting of viral RNA replication complexes to an alternative intracellular membrane. *J. Virol.* **77**: 12193-12202.
- Miller, S. C., Brown, S. J., Tomoyasu, Y., 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Genes Evol.* **218**: 505-510.
- Minakuchi, C., Namiki, T., Shinoda, T., 2009. Kruppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Develop. Biol.* **325**: 341-350.
- Misquitta, L. and Paterson, B. M., 1999. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNAi): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 1451-1456
- Moazed, D., 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **457**: 413-420.
- Mosallanejad, H. and Smagghe, G. 2009. Biochemical mechanisms of methoxyfenozide resistance in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *Pest Manag. Sci.* **65**: 732-736
- Moss, E. G., 2001. RNA interference: It's a small RNA world. *Curr. Biol.* **11**: 772-775
- Mutti, N. S., Park, Y., Reese, J. C., Reeck, G. R., 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Ins. Sci.* **6**:38.
- Nair, V., and Zavolan, M., 2006. Virus-encoded microRNAs: novel regulators of gene expression. *Trends Microbiol.* **14**: 169-175.

- Nakamatsu e Tanaka, 2003. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separate* (Lepidoptera: Noctuidae) host as food resource. *J. Insect Physiol.* **49**: 149-159.
- Nappi, A., Poirié, M., Carton, Y., 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv. Parasitol.* **70**: 99-121.
- Narasimhan, S., Montgomery, R. R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., Anderson, J. F., Sauer, J. R., Cappello, M., Kantor, F. S. and Fikrig, E., 2004. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 1141-1146.
- Nardi, J. B., Miklasz, S. D., 1989. Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of *Manduca sexta*. *Tissue Cell* **21**: 559-567.
- Navon, A. 1993. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*, p. 125-146. In: Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Nayak, A., Berry, B., Tassetto, M., Kunitomi, M., Acevedo, A., Deng, C., Krutchinsky, A., Gross, J., Antoniewski, C. and Andino, R., 2010. Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 547-554.
- Neel, B. G., and Tonks, N. K., 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 193-204.
- Newmark, P. A., Reddien, P. W., Cebria, F. and Sanchez Alvarado, A., 2003. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Suppl.* **1**: 11861-11865.
- Novina, C. D. and Sharp, P. A. 2004. The RNAi revolution. *Nature* **430**: 161-164.

- Ohizumi, Y., Gaidamashvili, M., Ohwada, S., Matsuda, K., Kominami, J., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Naganuma, T., Ogawa, T. and Muramoto, K., 2009. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* **57**: 2896-2902.
- Ohnishi, A., Hull, J.J., Matsumoto, S., 2006. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 4398-4403.
- Ohta, H., Oshiumi, H., Hayashi, N., Imai, T., Ozoe, Y., Morimure, S., Kida, K., 2012. A secreted placental alkaline phosphatase-based reporter assay system for screening of compounds acting at an Octopamine receptor stably expressed in a mammalian cell line. *Biosci., Biotech. Biochem.* **76**: 209-211.
- Okamura, K., Balla, S., Martin, R., Liu, N. and Lai, E. C., 2008a. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 581-590.
- Okumura, S., Sawada, M., Park, Y. W., Hayashi, T., Shimamura, M., Takase, H. and Tomizawa, K., 2006. Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res.* **15**: 637-646.
- Olivieri, D., Sykora, M. M., Sachidanandam, R., Mechtler, K. and Brennecke, J., 2010. An *in vivo* RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J.* **29**: 3301-3317.
- Olson, K. E., Higgs, S., Gaines, P. J., Powers, A. M., Davis, B. S., Kamrud, K. I., Carlson, J. O., Blair, C. D. and Beaty, B. J. 1996. Genetically engineered resistance to dengue-2 virus transmission in mosquitoes. *Science* **272**: 884-886.

- Paddison, P. J., Caudy, A. A., and Hannon, G. J., 2002a. Stable suppression of gene expression in mammalian cells by RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1443-1448.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S., 2002b. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**: 948-958.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. and Fire, A., 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell* **6**: 1077-1087.
- Parthasarathy, R., Palli, S. R., 2009. Molecular analysis of juvenile hormone analog action in controlling the metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **70(1)**: 57–70.
doi: 10.1002/arch.20288
- Pearson, A., Lux, A., Krieger, M., 1995. Expression cloning of DSR-CI, a class-C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 4056-4060.
- Pedata, P. A., Garonna, A. P., Zabatta, A., Zeppa, P., Romani, R. e Isidoro, N., 2003. Development and morphology of teratocytes in *Encarsia Berlesei* and *Encarsia citrina*: first record of Chalcidoidea. *J. Insect Physiol.* **49**: 1063-1071.
- Pennacchio, F. & Strand, M. R., 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entom.* **51**: 233-258.
- Pennacchio, F., Falabella, P., Sordetti, R., Varricchio, P., Malva, C. and Vinson, S. B., 1998a. Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera:Braconidae). *J. Insect Physiol.* **44**: 845-857.
- Pennacchio, F., Falabella, P., Vinson, S. B., 1998b. Regulation of *Heliothis virescens* prothoracic glands by *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **38**: 1-10.
- Pennacchio, F., Giordana, B., Rao, R., 2012. Applications of parasitoid virus and venom research in agriculture. In: Beckage Nancy. *Parasitoid*

Viruses: Symbionts and Pathogens. p. 269-283, Elsevier, ISBN: 9780123848581, doi: 10.1016/B978-0-12-384858-1.00022-9

Pennacchio, F., Malva, C., Vinson, S. B., 2001. Regulation of host endocrine system by the endophagous braconid *Cardiochiles nigriceps* and its polydnavirus. In: Edwards, J. P., Weaver, R. J., (eds) Endocrine interactions of insect parasites and pathogens. *BIOS Scientific, Oxford*, pp 123-132.

Pennacchio, F., Mancini, D., 2012. Aphid parasitoid venom and its role in host regulation. In: Beckage Nancy. *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. p. 247-254 Elsevier, ISBN: 9780123848581, doi: 10.1016/B978-0-12-384858-1.00022-

Pennacchio, F., Sordetti, R., Falabella, P., Vinson, S. B., 1997. Biochemical and ultrastructural alterations in prothoracic glands of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) last instar larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27(5)**: 439-450.

Pennacchio, F., Tranfaglia, A., Malva, C., 2003. Host-parasitoid antagonism in insects: New opportunities for pest control? *Pest Control AGROFood industry hi-tech* **38**: 53-56

Pennacchio, F., Tremblay, E., Tranfaglia, A., Bin, F., Rao, R. e Malva, C., 2001b. Biotecnologie per il controllo degli insetti fitofagio. *Rendiconti Accademia Nazionale della Scienze detta dei XL. Memoria delle scienze fisiche e naturali*. 119 Vol. **XXV**: 511-524.

Pennacchio, F., Vinson, S. B., Tremblay, E., 1992. Host regulation effects of *Heliothis virescens* (F.) larvae induced by teratocytes of *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Lepidoptera, Noctuidae Hymenoptera, Braconidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **19**: 177-192.

Pennacchio, F., Vinson, S. B., Tremblay, E., 1993. Growth and development of *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) larvae and their synchronization with some changes of the hemolymph composition of their host, *Heliothis virescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **19**: 177-192.

- Pennacchio, F., Vinson, S. B., Tremblay, E., 1994a. Morphology and ultrastructure of the serosal cells (teratocytes) in *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) embryos. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **23**: 93-104.
- Pennacchio, F., Vinson, S. B., Tremblay, E., Ostuni, A., 1994b. Alteration of ecdysone metabolism in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) teratocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**: 383-394.
- Poirié, M., Carton, Y., Dubuffet, A., 2009. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *C. R. Biol.* **332**: 311-320.
- Price, D.R.G., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotech.* **26**: 393-400.
- Provost, B., Varricchio, P., Arana, E., Espagne, E., Falabella, P., Huguet, E., La Scaleia, R., Cattolico, L., Poirié, M., Malva, C., Olszewski, J. A., Pennacchio, F., and Drezen, J. M., 2004. Bracoviruses contain a large multigene family coding for protein tyrosine phosphatases. *J. Virol.* **78(23)**: 13090-13103.
- Pruijssers, A. J. and Strand, M. R., 2007. PTP-H2 and PTP-H3 from *Microplitis demolitor* Bracovirus localize to focal adhesions and are antiphagocytic. *Insect Immune Cells. J. Virol.* **81**:1209-1219.
- Purkayastha, A. and Dasgupta, I., 2009. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 967-976.
- Quan, G. X., Kanda, T., Tamura, T., 2002. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Molec. Biol.* **11**: 217-222.
- Quicke, D. L. J., 1997. Parasitic wasps. Chapman & Hall, London.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by

- double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* **277(49)**: 46849-46851.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfruelli, P., Li, X.H., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., Ezekowitz, R.A.B., 2001. *Drosophila* scavenger receptor Cl is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* **15**: 1027-1038.
- Rausell, C., Martinez-Ramirez, A. C., Garcia-Robles, I., Real, M. D., 2000. A Binding Site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Is Lost during Larval Development in Two Forest Pests. *Applied Environ. Microb.* **66(4)**: 1553-1558.
- Richards, S., *et al.*, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **452**: 949-955.
- Rodriguez-Perez, M. A., Beckage, N. E., 2006. Co-evolutionary strategies of interaction between parasitoids and polydnviruses. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **48(1)**: 31-43.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M., 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364-368.
- Roignant, J. Y., Carre, C., Mugat, R., Szymczak, D., Lepesant, J. A., Antoniewski, C., 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoformspecific RNAi in *Drosophila*. *RNA* **9**: 299-308.
- Rouleux-Bonnin, F., Rouleux-Bonnin, S., Renault, A., Rabouille, G., Periquet, G. and Bigot, Y., 1999. Free serosal cells originating from the embryo of the wasp *Diadromus pulchellus* in the pupal body of parasitized leek-moth *Acrolepiosis assectella*. Are these cells teratocytes-like? *J. Insect. Physiol.* **45**.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I. J., Carrer, H. and Bock, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.* **19**: 870-875.

- Salama, H. S., Ragaei, M. and Sabbour, M., 1995. Larvae of *Phthorimaea operculella* (Zell) as affected by various strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Entomol.* **119**: 241-243.
- Saleh, M. C., Tassetto, M., van Rij, R. P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C., Andino, R., 2009. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature* **458**: 346-351.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., Andino, R., 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat. Cell Biol.* **8**: 793-802.
- Sanchez-Vargas, I., Scott, J. C., Poole-Smith, B. K., Franz, A. W., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K. E. and Blair, C. D., 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog.* **5(2)**: e1000299.
- Sandrelli, F., Cappelozza, S., Benna, C., Saviane, A., Mastella, A., Mazzotta, G. M., Moreau, S., Pegoraro, M., Piccin, A., Zordan, M. A., Cappelozza, L., Kyriacou, C. P., Costa, R., 2007. Phenotypic effects induced by knock-down of the period clock gene in *Bombyx mori*. *Genet. Res.* **89(2)**: 73-84.
- Sass, M., Kiss, A., Locke, M., 1994. Integument and hemocyte peptides. *J. Insect Physiol.* **40**: 407-421.
- Schepers, E. J., Dahlman, D. L., Zhang, D., 1998. *Microplitis croceipes* teratocytes: in vitro culture and biological activity of teratocyte secreted protein. *J. Insect Physiol.* **44**: 767-777.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M. R., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays* **23**: 344-351.
- Schneider, M. D., Najand, N., Chaker, S., Pare, J. M., Haskins, J., Hughes, S. C., Hobman, T. C., Locke, J., Simmonds, A. J., 2006. Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early *Drosophila* development. *J. Cell Biol.* **174**: 349-358.

- Scolari, F., Siciliano, P., Gabrieli, P., Gomulski, L. M., Bonomi, A., Gasperi, G., Malacrida, A.R., 2011. Safe and fit genetically modified insects for pest control: from lab to field applications. *Genetica* **139**: 41-52.
- Scott, J. G. and Wen, Z., 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* **57**: 958-967.
- Scott, J. G., Liu, N. and Wen, Z., 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**: 147-155.
- Shakesby, A. J., Wallace, I. S., Isaacs, H. V., Pritchard, J., Roberts, D. M., Douglas, A. E., 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 1-10.
- Shaw, M. R. & Huddleston, T., 1991. Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Handbooks for the Identification of British Insects* 7: 11.
- Sidorov, V. A., Kasten, D., Pang, S. Z., Hajdukiewicz, P. T., Staub, J. M. and Nehra, N. S., 1999. Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* **19**: 209-216.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyan, J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070-3080.
- Silverman, N. & Maniatis, T., 2001. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**: 2321-2342.
- Siomi, H., Siomi, M. C., 2009a. On the road to reading the RNA interference code. *Nature* **457**: 396-404
- Siomi, H., Siomi, M. C., 2009b. RISC hitches onto endosome trafficking. *Nat. Cell Biol.* **11**: 1049-1051.
- Sledz, C. A. and Williams, B.R., 2005. RNA interference in biology and disease. *Blood* **106**: 787-794.

- Statgraphics plus version 3.0, 1997. *Manugistics. Maryland USA.*
- Stipanovic, R. D., Lopez, J. D. Jr., Dowd, M. K., Puckhaber, L. S. and Duke, S. E., (2006). Effect of racemic and (p)- gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae. *J. Chem. Ecol.* **32**: 959-968.
- Stoltz, D. B., 1993. The polydnavirus life cycle. In: Beckage, N.E., Thompson, S.N., Federici, B.A. (Eds.), Parasites and pathogens of insects. Parasites. *Academic Press, N.Y.* **1**: 167-187.
- Stoltz, D. B., Beckage, N. E., Blissard, G. W., Fleming, J. G. W., Krell, P. J., Theilmann, D. A., Summers, M. D., Webb, B. A., 1995. Polydnaviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Eds.), Virus taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Vienna and New York, pp. 143-147.
- Storz, G., 2002. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* **296**: 1260-1263.
- Strand, M. R., 2012. Polydnavirus gene expression profiling: what we know now. In: Beckage Nancy. Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens. p. 139-147, Elsevier, ISBN: 9780123848581, doi: 10.1016/B978-0-12-384858-1.00022-9
- Strand, M. R., Burke, G. R., 2012. Polydnaviruses as symbionts and gene delivery systems. *PLoS Pathog.* **8(7)**: e1002757. doi:10.1371/journal.ppat.1002757
- Strand, M. R., Pech, L. P., 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* **40**: 31-56.
- Strand, M. R., Quarles, J. M., Meola, S. M. e Vinson, S. B., 1985. Cultivation of teratocytes of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). *In vitro Cell. Dev. Biol.* **21**: 34-46.
- Tam, O. H., Aravin, A. A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E. P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R. M. and

- Hannon, G. J., 2008. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* **453**: 534-538.
- Tan, A. and Palli, S. R., 2008. Identification and characterization of nuclear receptors from the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**: 430-439.
- Tan, X. P., Liang, W. Q., Liu, C. J., Luo, P., Heinstejn, P. and Chen, X. Y., 2000. Expression pattern of (p)-delta-cadinene synthase genes and biosynthesis of sesquiterpene aldehydes in plants of *Gossypium arboreum* L. *Planta* **210**: 644-651.
- Tanaka, T., 1987. Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanteles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. *J. Insect. Physiol.* **33**: 413-420.
- Tanaka, T., Vinson, S. B., 1991. Depression of prothoracic gland activity of *Heliothis virescens* by venom and calyx fluids from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*. *J. Insect Physiol.* **37**: 139-144.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.-L., Barthel, A., Bebas, P. Bitra, K., *et al.*, 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* **57**: 231-245.
- Theilmann, D. A., Summers, M. D., 1986. Molecular analysis of *Campoletis sonorensis* virus. *J. Gen. Virol.* **67**: 1961-1969.
- Thoetkiattikul, H., Beck, M. H. & Strand, M. R., 2005. Inhibitor κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 11426-11431.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B. and Zhang, W., 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One* **4**: e6225.
- Timmons, L. and Fire, A., 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395(6705)**: 854.

- Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A., 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**: 103-112.
- Tomoyasu, Y., Denell, R. E., 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.* **214**: 575-578.
- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D. and Bucher, G., 2008. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol.* **9(1)**: R10.
- Travanty, E. A., Adelman, Z. N., Franz, A. W. E., Keene, K. M., Beaty, B. J., Blair, C. D., James, A. A., Olson, K. E., 2004. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34(7)**: 607-613.
- Tremblay, E., 2003. Entomologia applicata I. Generalità e mezzi di controllo. 7^a Ed., Liguori Editore, Napoli.
- Turnbull, M. W., Webb, B. A., 2002. Perspectives on polydnavirus origin and evolution. *Adv. Virus Res.* **58**: 203-254
- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P. and Newcomb, R. D., 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.* **15**: 383-391
- Uhlírova, M., Foy, B. D., Beaty, B. J., Olson, K. E., Riddiford, L. M., Jindra, M., 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad Complex in insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100(26)**: 15607-15612.
- Ulvila, J., Hultmark, D. and Ramet, M., 2010. RNA silencing in the antiviral innate immune defence-role of DEAD-box RNA helicases. *Scand. J. Immunol.* **71**: 146-158.
- Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R. A., Kocks, C. and Ramet, M., 2006. Double-stranded RNA is internalized by

- scavenger receptormediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 14370-14375.
- Umbach J. L., Cullen B. R., 2009. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev.* **23(10)**: 1151-1164.
- Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V. and Zamore, P. D., 2006. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* **313**: 320-324.
- Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Laurencon, A. and Heddi, A., 2009. RNAi in the cereal weevil *Sitophilus spp*: systemic gene knockdown in the bacteriome tissue. *BMC Biotechnol.* **9**: 44.
- Van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J. L., Milne, R. E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, B. and Masson, L., 1991. Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest lepidoptera. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1650-1655.
- van Rij, R. P., Saleh, M. C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C. and Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **20**: 2985-2995.
- Varricchio, P., Falabella, P., Sordetti, R., Graziani, F., Malva, C., Pennacchio, F., 1999. *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus: molecular characterization and gene expression in parasitized *Heliothis virescens* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**: 1087-1096.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J. L., Bartel, D. P. and Crete, P., 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol. Cell* **16**: 69-79.
- Vinson, S. B., 1975. Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts. In: Price, P.W. (Ed.), *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites*. Plenum Press, New York, pp. 14-48.

- Vinson, S. B., Iwantsch, G. F., 1980. Host regulation by insect parasitoids. *Quart. Rev. Biol.* **55**: 143-165.
- Vodovar, N. and Saleh, M. C., 2012. Chapter 1-Of Insects and Viruses: The Role of Small. RNAs in Insect Defence. *Ad. Insect Physiol.* **42**:1-36
- Volkoff, N. & Colazza, S., 1992. Growth patterns of teratocytes in the immature stages of *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Insect Morphol. Embryol.* **21**.
- Volz, J., Müeller, H. M., Zdanowicz, A., Kafatos, F. C., Osta, M. A., 2006. A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to Plasmodium. *Cell. Microbiol.* **8**: 1392-1405
- Wakiyama, M., Matsumoto, T., Yokoyama, S., 2005. *Drosophila* U6 promoter-driven short hairpin RNAs effectively induce RNA interference in Schneider 2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331(4)**: 1163-1170.
- Walling, L. L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.* **19**: 195-216.
- Walshe, D. P., Lehane, S. M., Lehane, M. J., Haines, L. R., 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Mol. Biol.* **18(1)**: 11-19.
- Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P. and Ding, S. W., 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* **312**: 452-454.
- Washietl, S., Hofacker, I. L., Lukasser, M., Hüttenhofer, A. & Stadler, P. F., 2005. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat. Biotech.* **23**: 1383-1390.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M. A., Sakaki, Y., et al., 2008. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* **453**: 539-543.

- Waterhouse, P. M., Graham, M. W. and Wang, M.-B., 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 13959-13964.
- Webb, B. A. & Strand, M. R., 2005. The biology and genomics of polydnaviruses. In *Compr. Molec. Insect Sci.* **6**: 323-360.
- Webb, B. A., 1998. Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In *The Insect Viruses*, ed. LK Miller, LA Balls, pp. 105- 39. New York: Plenum.
- Webb, B. A., Beckage, N. E., Hayakawa, Y., Krell, P. J., Lanzerein, B., Strand, M. R., Stoltz, D. B. and Summers, M. D., 2000. Family Polydnaviridae. In: . In: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. C., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (Eds.), *Taxonomy of Virus: VII Report of the International Committee on Virus Taxonomy. Academic Press London* pp. 253-259.
- Webb, B. A., Dahlman, D. L., 1985. Developmental pathology of *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Microplitis croceipes*: parasitemediated host developmental arrest. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2**: 131-139.
- Webb, B. A., Luckhart, S., 1996. Factors mediating short- and long-term immune suppression in a parasitized insect. *J. Insect Physiol.* **42**: 33-40.
- Webb, B. A., Strand, M. R., Dickey, S. E., Beck, M. H., Hilgarth, R. S., Barney, W. E., Kadash, K., Kroemer, J. A., Lindstrom, K. G. & other authors, 2006. Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. *Virology* **347**: 160-174.
- Whangbo, J. S., Hunter, C. P., 2008. Environmental RNA interference. *Trends Gen.* **24**: 297-305.
- Whitfield J.B., 2002. Estimating the age of the polydnavirus/braconid wasp symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 7508-7513.
- Whitfield J.B., Asgari S., 2003. Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. *J. Insect Physiol.* **49**: 397-405.

- Whitfield, J. B., 1997. Molecular and morphological data suggest a single origin of the PDVs among braconid wasps. *Naturwissenschaften* **84**: 502-517.
- Whyard, S., Singh, A. D. and Wong, S., 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 824-832.
- Whyard, S., Singh, A. D. and Wong, S., 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 824-832.
- Wierenga, J. M., Norris, D. L., and Whalon M. E., 1996. Stage-specific mortality of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on transgenic potatoes. *J. Econ. Entomol.* **89**: 1047-1052.
- Wigglesworth, V. B., 1973. Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*. *J. Insect Physiol.* **19**: 831-844.
- Winston, W. M., Molodowitch, C., Hunter, C. P., 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**: 2456-2459.
- Wittstock, U., Agerbirk, N., Stauber, E. J., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J. and Vogel, H., 2004. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 4859-4864.
- Woehler, A., Ponimaskin, E. G., 2009. G protein-mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Cur. Mol. Pharm.* **2**: 237-48.
- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Koteliensky, V., *et al.*, 2007. Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **25**: 1149-1157.
- Xiang, H., Li, M. W., Guo, J. H., Jiang, J. H. and Huang, Y. P., 2011. Influence of RNAi knockdown for E-complex genes on the silkworm proleg development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **76**: 1-11.

- Xue-Yi Xue, Ying-Bo Mao, Xiao-Yuan Tao, Yong-Ping Huang and Xiao-Ya Chen, 2012. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. In: *Adv. Insect Physiol.* **42**: 73-117
- Yu, R. X., Chen, Y., Chen, X., Huang, F., Lou, Y., Liu, S., 2007. Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. *J. Insect Physiol.* **53(1)**: 22-29.
- Zambon, R. A., Vakharia, V. N. and Wu, L. P., 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell. Microbiol.* **8**: 880-889.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.
- Zaratiegui, M., Irvine, D. V., Martienssen, R. A., 2007. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* **23**: 763-776.
- Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M., Scharf, M. E., 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38(8)**: 805-815.
- Zhu, J. Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J. Q., Qi, H. S., Wei, Z. J., Yao, Q., Zhang, W. Q., Li, S., 2012. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect associated gene EcR. *PLoS ONE* **7**: 1-9.
- Zhu, J., Chen, L., Raikhel, A., 2003. Posttranscriptional control of the competence factor beta FTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 13338-13343.

Ringraziamenti

Ringrazio il **Professor Francesco Pennacchio**, paziente relatore di questa tesi, per avermi dato la possibilità di realizzare quest'esperienza di dottorato in un ambiente lavorativo ricco di stimoli dal punto di vista scientifico. Un ringraziamento particolare per essere stato, in questi anni, la mia guida intellettuale, il faro che mi ha indicato costantemente la giusta rotta da seguire per arrivare alla fine di questo percorso di crescita umana oltre che professionale.

Voglio ringraziare la **dott.ssa Paola Varricchio** e il **dott. Gennaro Di Prisco** che hanno collaborato attivamente al mio lavoro di dottorato, con il loro instancabile impegno professionale. Grazie per il vostro aiuto, per tutto quello che avete avuto la pazienza di insegnarmi, grazie per il vostro sostegno lavorativo e morale, non ho parole per dirvi quanto siete stati preziosi, com'è stato importante avervi al mio fianco...non mi sono mai sentita sola nelle difficoltà, mi avete resa una persona migliore, non solo da un punto di vista professionale.

Un grazie tutto speciale va ad **Adriana**, amica sincera e compagna di "sventure" da tanti anni.

Grazie alla **Prof.ssa Maria Cristina Digilio** per il suo prezioso aiuto e per la pazienza nella revisione della tesi.

Grazie ad **Alessandro, Fatima, Maddalena e Marina**, colleghi di laboratorio sui quali si può sempre contare.

Grazie a **Valentina** che mi ha affiancata nella prima parte di questo lavoro.

Grazie a **Chiara, Silvia, Alessandro e Maria** per il loro aiuto, per il loro sostegno morale e psicologico e per essermi stati vicino, oltre che nel lavoro, anche nel privato, nei momenti belli e nelle difficoltà.

Grazie ai **miei genitori** per aver sempre creduto in me e per avermi dato la possibilità di diventare la persona che, in fondo, avrei sempre voluto essere.

Rivolgo un particolare ringraziamento a tutte le persone che hanno con le quali ho collaborato in questi tre anni e che non ho menzionato ma non per questo sono state meno importanti in questo lungo cammino.