

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA
VARESE

Dottorato di Ricerca in
INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
XXIV ciclo

Identification and characterization of small non-coding RNA molecules transcribed in *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae).

RELATORE

Dott.ssa Gigliotti Silvia

CANDIDATO

Adriana Marinelli

MATR. 708201

CO-RELATORE

Prof. Pennacchio Francesco

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

A mia madre

*Voglio ringraziare il coordinatore del dottorato, il **Prof. Pennacchio Francesco** per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso di dottorato e la mia relatrice, la **Dott.ssa Gigliotti Silvia** che mi ha accolta nel suo laboratorio e seguita in questi 3 anni.*

*Grazie al **Dott. Graziani Franco** per le preziose cose che ha saputo insegnarmi e per aver reso piacevoli le mie giornate all'IGB.*

*Grazie al **Dott.ssa Silvia Andone** per le nostre piacevoli chiacchierate mattutine.*

Inoltre, un grazie dal profondo del cuore:

*Al **Dott. Andrenacci Davide** per la sua disponibilità, per i mille consigli e l'immenso sostegno che ha saputo offrirmi;*

*Alla mia compagna di avventura **Deborah**, per i preziosi consigli;*

*A **Valentina**, per la sua dolcezza e la positività che solo lei sa trasmettere;*

*Alla mia amica **Serena**, ormai lontana ma sempre al mio fianco;*

*Ad **Ilaria**, mia grande amica e perfetta "spalla" in questo lungo percorso;*

*A **Gennaro** per la sua infinita pazienza e disponibilità, ma soprattutto per la sua amicizia;*

*Al mio **Michele**, con me in ogni momento;*

*Alla mia **famiglia**, mia grande forza e senza la quale non sarei diventata la persona che sono oggi;*

Grazie a tutti coloro (non faccio nomi ma siete in tanti!) che, in un modo o nell'altro, mi sono stati vicini ed hanno creduto in me.

Adriana

ABSTRACT

Toxoneuron nigriceps (Hymenoptera, Braconidae) is an endophagous parasitoid of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). Parasitized larvae show a complex array of pathological symptoms including immune response suppression, largely due to a symbiotic virus, named *TnBV*, belonging to the family Polydnviridae (PDV). A striking characteristic of the *TnBV*, as well as the other PDV genomes sequenced to date, is the large preponderance of non-coding regions, which raises the question of their functional relevance. To start addressing this question, we decided to analyze the small RNA fraction present in haemocytes of parasitized larvae and search for *TnBV*-derived sequences that might interfere with the host immune response.

To investigate this hypothesis in the case of *TnBV*, a specialized cDNA library, representative of the small RNA fraction present in haemocytes of parasitized larvae, was prepared. The generated cDNA library was validated by two types of quality control analyses.

Real-time PCR Absolute Quantification was performed using a standard curve method. This analysis essentially allowed me to evaluate the concentration of the library and also to obtain indications on its purity, by assessing the presence and relative abundance of adapter dimers contaminants.

A further quality test was carried out by cloning a small amount of the cDNA products in a plasmid vector and by sequencing through conventional technology few randomly selected clones. Two cloned sequences turned to be microRNA species already known in other organisms, miR-184 and miR-970, evolutionarily conserved from insects to mammals. In *Drosophila melanogaster* miR-184 is expressed in all developmental stages (Ping Li *et al.*, 2011). Moreover, functional analysis identified a role for this miRNA in the female germline, where it is involved in multiple steps of oogenesis (Iovino *et al.*, 2009).

The presence of authentic miRNA species in our library, as well as the finding of a correct size range (21-27) in our cloned cDNA sequences represented valid quality control criteria, empowering further analysis of the cDNA library by high-throughput sequencing technologies.

Specifically, cDNA sequencing was performed using the Illumina platform and resulted in about 6 million total reads. Sequence alignment with the *TnBV* genome was then performed using the FAST (Fast Aligning of Short Tags) software developed by the Institute of Applied Genomics of Udine. These preliminary analyses allowed the identification of 52 cDNA sequences, ranging in size between 20 and 27 nucleotides, that align with the viral genome. 46 are present in the viral genome in single copy, while 6 are located in two different positions and are therefore represented twice. These sequences were extensively analyzed by bioinformatical tools, in particular computational methods based on secondary structure prediction to assess the ability of these genomic regions to generate appropriate small RNA precursor molecules. Specific analyses were performed using a web tool, **MirEval**. 5 sequences were selected as potential miRNA species, deriving from viral genomic regions that show structural features typical of precursor-miRNA (pre-miRNA) molecules. RT-PCR experiments of these genomic regions, aimed at detecting presumptive primary-miRNA (pri-miRNA) species, indicated that these genomic regions are actively transcribed in haemocytes, 6 and 12 hours after parasitization. In parallel, transcriptional profiling of the *TnBV* genomic regions where the remaining presumptive *TnBV* small ncRNA sequences were mapped, as well as of randomly selected regions, that do not contain any protein coding genes or any putative small ncRNAs, indicated that the non-coding portion of the *TnBV* genome is extensively transcribed in host haemocytes. These analyses indicated that most, if not all, of the non-coding portion of the *TnBV* genome is transcribed in host haemocytes. This unexpected finding raises several questions concerning: 1) the functional meaning of generalized transcription and 2) the possible existence of specific mechanisms acting downstream of transcription to discriminate biologically relevant RNA molecules from “transcriptional noise”.

Functional characterization of the sequences identified as potential microRNAs is expected to shed light on the role played by the non-coding regions of the *TnBV* genome during parasitization. Furthermore, future work aimed at target identification may disclose the possible involvement of these sequences in the alteration of host immune system. The generated information will be essential for defining a more comprehensive model of the immunosuppression phenomena occurring during parasitization.

INDICE

I.Introduzione.....	1
I.1 Insetti entomofagi: I Parassitoidi.....	2
I.2 Fattori di regolazione dell'ospite	5
I.2.1 Fattori di origine materna.....	5
I.2.2 Fattori di origine embrionale.....	13
I.3 Interazione <i>Toxoneuron nigriceps</i> – <i>Heliothis virescens</i>	14
I.4 <i>Toxoneuron nigriceps</i> <i>Bracovirus</i> (<i>TnBV</i>).....	19
I.4.1 Regione codificante.....	19
I.4.2 Regione non codificante.....	23
I.5 RNA non codificanti.....	24
I.5.1 microRNA.....	25
I.6 microRNA e virus.....	28
I.7 Scopo del lavoro.....	31
II.Materiali e metodi.....	33
II.1 Allevamento degli insetti.....	33
II.2 Analisi bioinformatica per la predizione dei geni putativi presenti nel genoma del <i>TnBV</i>	34
II.3 Estrazione dell' RNA totale da emociti di larve di <i>H.virescens</i> Parassitizzate.....	34
II.4 Preparazione di una libreria di piccoli RNA a partire da RNA estratto da emociti di larve parassitizzate.....	36
II.5 Controllo qualitativo della libreria di cDNA da emociti di larve parassitizzate.....	41
II.5.1 Clonaggio in pCR4Blunt-TOPO vector.....	41
II.5.2 Real time PCR: quantificazione assoluta.....	43
II.6 Sequenziamento libreria piccoli ncRNA.....	45
II.7 Analisi bioinformatiche.....	46
II.8 Analisi trascrizionale dei putativi microRNA.....	47
II.9 Analisi trascrizionale dei putativi piccoli ncRNA e di regioni del genoma del <i>TnBV</i> selezionate random.....	49

III. Risultati.....	52
III.1 Analisi della composizione genica del <i>TnBV</i>	52
III.2 Costruzione di una libreria di cDNA rappresentativa della popolazione di piccoli RNA di emociti di larve parassitizzate.....	57
III.3 Sequenziamento ed analisi della libreria di cDNA.....	60
III.4 Distribuzione dei putativi piccoli ncRNA nei circoli virali.....	61
III.5 Identificazione di putativi miRNA.....	72
III.6 Analisi trascrizionale.....	76
IV. Discussione.....	80

I. Introduzione

Gli **Insetti** o **Entomi** (**Insecta** LINNAEUS, 1758) sono una classe di viventi appartenente al phylum degli Arthropoda. Questa classe rappresenta il più grande tra i raggruppamenti animali che popolano la Terra e si ritiene che siano tra i più antichi colonizzatori delle terre emerse. L'eterogeneità nella morfologia, nell'anatomia, nella biologia e nell'etologia ha conferito loro, da oltre 300 milioni di anni, un ruolo di primo piano nella colonizzazione del globo terrestre cui hanno contribuito in modo decisivo una notevole capacità di competizione e lo sviluppo di specifici adattamenti, grazie ai quali gli insetti sono in grado di utilizzare i più svariati substrati alimentari e di superare condizioni ambientali estreme. Molti insetti sono aggressori inesorabili di altri organismi viventi e, allo stesso tempo, bersaglio di una folta schiera di nemici naturali e di patogeni.

Alla base delle relazioni che essi stabiliscono con altri organismi esistono innumerevoli meccanismi di interazione, spesso di grande significato economico, sanitario e sociale. Infatti, l'instaurarsi di tali associazioni è spesso mediata dallo sviluppo di fattori di virulenza e/o meccanismi di resistenza, selezionati da lunghi processi coevolutivi, durati centinaia di milioni di anni.

Le associazioni antagonistiche tra gli insetti e le altre specie di artropodi sono considerate tra le più interessanti, in particolare le interazioni insetto/insetto, caratterizzate da diverse modalità e vari livelli di specializzazione. Infatti si passa da interazioni trofiche relativamente semplici come ad esempio quelle che intercorrono fra gli insetti predatori e le proprie vittime, alle complesse interazioni fisiologiche e biologiche esistenti fra gli insetti parassitoidi ed i loro ospiti.

Lo studio e la manipolazione delle associazioni fra gli insetti e gli altri organismi ha una lunga e consolidata tradizione, considerati gli svariati risvolti applicativi di una dettagliata comprensione di queste interazioni.

In particolare, negli ultimi decenni, l'avanzamento delle conoscenze nel campo dell'Entomologia di base e applicata ha consentito l'attuazione di strategie di controllo integrato a basso impatto ambientale e tossicologico

(Viggiani, 1997). Inoltre, le crescenti informazioni accumulate nei campi della genomica e post-genomica hanno portato allo sviluppo di nuove metodologie di controllo degli insetti dannosi all'uomo e ai suoi prodotti. In particolare lo studio delle interazioni molecolari "pianta-fitofago-entomofago" ha notevolmente ampliato le basi conoscitive per lo sviluppo di nuove strategie sostenibili per la protezione delle piante. Attraverso l'investigazione di queste relazioni antagonistiche e dei meccanismi che le regolano, nonché l'approfondimento delle conoscenze a livello molecolare di fisiologia, sviluppo, riproduzione e comportamento degli insetti è infatti già stato possibile disegnare biotecnologie di controllo degli insetti fitofagi basate sull'uso/manipolazione di agenti biologici. E' facile prevedere che, a mano a mano che gli studi andranno avanti, lo sviluppo di tali tecnologie riceverà un impulso sempre crescente, con prospettive applicative pressoché illimitate.

I.1 Insetti entomofagi: I Parassitoidi

I parassitoidi sono insetti entomofagi, parassiti di altri artropodi dai quali traggono vantaggio (nutrimento, protezione) arrecando loro danno biologico. In realtà si tratta di una forma di transizione tra il parassita propriamente detto e il predatore. Hanno nel complesso le stesse prerogative del parassita, in quanto sono privi di vita autonoma durante gli stadi giovanili e dipendono dall'ospite al quale sono più o meno intimamente legati da relazioni anatomiche e fisiologiche. Inoltre hanno rapporti con un solo ospite durante gli stadi pre-immaginali mentre l'adulto conduce vita libera e può deporre le proprie uova in più individui della stessa specie o, in alcuni casi, specie differenti. D'altro canto, al pari dei predatori essi uccidono il proprio ospite che viene portato alla morte quando la larva del parassitoide termina il suo sviluppo (Poiriè et al, 2009).

Sebbene numerosi organismi abbiano sviluppato questa tipologia di strategia adattativa, essa è particolarmente comune negli insetti olometaboli (Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera e Strepsiptera) ma più

dell'80% delle specie descritte appartengono all'ordine degli Hymenoptera (Quicke, 1997).

I parassitoidi possono essere classificati sulla base di diversi criteri. Quando si fa riferimento alle correlazioni esistenti tra più parassitoidi che simultaneamente possono risiedere nello stesso ospite si parla di diversi gradi di parassitismo (primario, secondario, terziario e quaternario). Si distinguono invece specie monofaghe, oligofaghe o polifaghe in funzione dell' "host range" (numero di specie ospiti che il parassitoide ha a disposizione per portare a compimento il proprio ciclo vitale) e della permissività che le specie ospiti mostrano. Sulla base del numero di uova deposte per ospite, si parla di parassitoidi solitari (depongono un uovo in un singolo ospite) e parassitoidi gregari (depongono più uova in un singolo ospite). Si distinguono inoltre ectoparassitoidi in caso di ovideposizione all'esterno del corpo dell'ospite ed endoparassitoidi in caso di ovideposizione all'interno della cavità corporea dell'ospite. I parassitoidi, inoltre, possono attaccare determinati stadi di sviluppo dell'ospite (uovo, larva, pupa, ecc.) ed hanno sviluppato differenti abitudini alimentari e strategie di regolazione della fisiologia dell'ospite.

In funzione dello stile di vita Askew & Shaw (1986) hanno classificato gli Imenotteri parassitoidi in Idiobionti e Koinobionti. In particolare, si parla di **Idiobionti** quando l'ospite è completamente paralizzato dall'azione del veleno della vespa e quindi incapace di difendere se stesso e di portare a compimento il proprio sviluppo. Spesso si tratta di ectoparassitoidi con un ampio host-range che mostrano stadi larvali estremamente voraci e brevi. La fase da adulto è lunga e caratterizzata dalla produzione di poche uova di grandi dimensioni. 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). Pochi sono i casi di endoparassitosi in cui vengono attaccati stadi sessili dell'ospite come uova o pupe (es. *Pimpla hypocondriaca*) (Dani et al., 2004).

Nei caso dei **Koinobionti** invece il veleno della vespa svolge un'azione paralizzante transitoria e l'ospite prosegue il proprio sviluppo fino alla completa maturazione della larva del parassitoide. Si tratta per lo più di

endoparassitoidi caratterizzati da stadi larvali più lunghi che si susseguono all'interno della cavità corporea dell'ospite, il cui sviluppo viene ritardato per far sì che esso raggiunga dimensioni adeguate per il sostentamento del parassitoide. Gli adulti hanno vita breve e producono molte uova di piccole dimensioni, completamente sviluppate già al momento dello sfarfallamento. Sebbene l'ovideposizione sia in genere stadio-specifica, i koinobionti possono attaccare vari stadi dello sviluppo pre-immaginale dell'ospite. L' "host range" è estremamente limitato, il veleno agisce su un numero ristretto di ospiti, spesso si tratta di una singola specie per via delle sofisticate interazioni fisiologiche e biologiche che si stabiliscono tra l'ospite e il parassitoide. Molto rari sono i casi di ectoparassitoidi il cui veleno può avere azione paralitica e alterare i fenomeni di muta dell'ospite (*Marris, et al., 2001*)

Sia nel caso degli Idiobionti che in quello dei Koinobionti il successo del parassitismo dipende da una serie di fattori che inducono profonde alterazioni fisiologiche/metaboliche e permettono al parassitoide di eludere le difese immunitarie dell'ospite. Questo è particolarmente vero per i Koinobionti, capaci di realizzare una fine regolazione delle secrezioni endocrine, del metabolismo, della riproduzione e dello sviluppo dell'ospite stesso. Il quadro complessivo degli effetti prodotti nell'ospite dal parassitoide viene definito con il termine di "**host regulation**" (*Vinson e Iwantsch, 1980*).

I.2 Fattori di regolazione dell'ospite

Le più specializzate strategie di regolazione della fisiologia dell'ospite, messe in atto da i parassiti otidi Koinobionti, sono il risultato all'azione di quelli che vengono definiti “**fattori parassitari di regolazione**”. Tali fattori sono costituiti da secrezioni di origine embrionale e/o materna (Quicke, 1997).

I.2.2 Fattori di origine materna

I **fattori di regolazione di origine materna** sono costituiti da secrezioni che la femmina adulta secerne nell'ospite al momento della parassitizzazione. Esse comprendono veleno, proteine ovariche e polidnavirus (PDVs) (Webb *et al.*, 2000).

Il **veleno**, prodotto da ghiandole annesse al sistema riproduttore della femmina del parassitoide dette “ghiandole del veleno”, viene immagazzinato in una speciale sacca che funge da serbatoio.

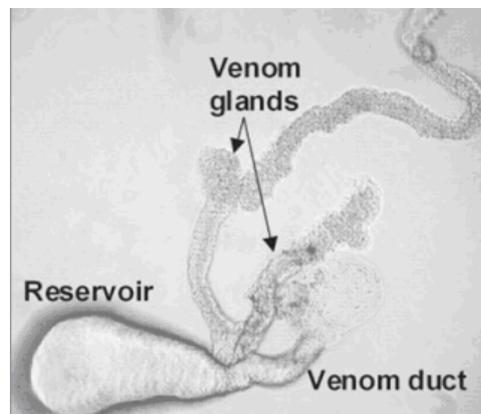


Fig 2. Esempio di ghiandole del veleno e serbatoio annessi al sistema riproduttore femminile in Imenotteri parassitoidi.

Il serbatoio del veleno è direttamente collegato con il tratto terminale dell'ovidotto comune da cui sia il veleno che i fluidi del calice ovarico vengono iniettati nell'ospite all'atto dell'ovideposizione (Fig 2).

Il veleno dei parassitoidi è costituito da una miscela complessa di componenti di varia natura (fattori paralitici e citolitici, neurotossine, ammine, enzimi di

medio ed alto peso molecolare, inibitori di proteasi), tutti coinvolti nella manipolazione della fisiologia dell'ospite (Asgari e Rivers, 2011) (Tab 1).

Tab 1. Proteine del veleno note per alcuni endoparassitoidi (Asgari e Rivers, 2011)

Protein/peptide	Length (aa) ^a	Putative function	Species
Enzymes			
Trehalase	585	Release of hydrocarbons	Ph
Laccase	680	Oxidation	Ph
Putative serine protease	248	Protease	Ph
Phenoloxidase I	699	Melanization	Ph
Phenoloxidase II	690	Melanization	Ph
Phenoloxidase III	708	Melanization	Ph
Reprolysin	539	Metalloprotease	Ph, Ma, Mh
Chitinase	483	Chitinolytic	Cc, Ma, Mh
Aspartylglucosaminidase-like	NA	Lysosomal	At
Acid phosphatase	405	Release of hydrocarbons?	Pp, Ph
Phospholipase B	NA	Cytolytic?	Pt
γ -glutamyl transpeptidase	541	Induce apoptosis	Ae
Cathepsin	NA	Associated with lysozymes	Ma, Mh
Thiol reductase	222	Lysosomal thiol reductase	Ma, Mh
Protease inhibitors			
Cys-rich venom protein 1	85	Protease inhibitor	Ph
Cys-rich venom protein 2	77	Kunitz type protease inhibitor	Ph
Cys-rich venom protein 4	203	Pacifastin; protease inhibitor	Ph
Cys-rich venom protein 6	77	Protease inhibitor	Ph
LbSPN _y	411	Inhibitor of melanization	Lb
Neurotoxin-like/paralytic factors			
Pimplin	143	Paralytic factor	Ph
Cys-rich venom protein 5	115	Similar to conotoxins	Ph
Cys-rich venom protein 3	63	Similar to atracotoxins	Ph
Vn4.6	65	Similar to atracotoxins	Cr
VG3	232	Similar to allergen from fire ant	Ma, Mh
Icarapin	NA	Similar to <i>Apis mellifera</i> allergen	Ma, Mh
Other functions			
Vn50	388	Inhibitor of melanization	Cr
Vn1.5	14	Facilitate PDV gene expression	Cr
Calreticulin	403	Inhibit hemocyte spreading	Cr, Ma, Mh
Virulence protein, P4	282	Rho-GAP protein affecting cell adhesion	Lb
Tetraspanin	NA	Involved in cell adhesion, motility	Ma, Mh
Ferritin	NA	An iron binding protein	Ma, Mh
TEGT	NA	Testis enhanced gene transcript, suppression of apoptosis	Ma, Mh
VG10	120	Ion transport-like protein	Ma, Mh
VG8	197	Heat-shock protein	Ma, Mh
VPr3	312	Antihemocyte aggregation	Ph
Vn.11	NA	Inhibit encapsulation	Pp

Studi comparativi sul profilo elettroforetico delle proteine del veleno di diversi Ichneumonidi e Braconidi, hanno mostrato che la maggior parte di queste proteine sono ad alto peso molecolare (>100kDa) ed hanno natura prevalentemente acida (Moreau e Guillot, 2005; Asgari e Rivers, 2011). Questo dato risulta particolarmente degno di nota in quanto, nei veleni di altri

organismi, proprietà citotossiche o neurotossiche sono associate a peptidi di piccole dimensioni (Piek, 1986; Rappuoli and Montecucco, 1997).

La sintesi delle proteine del veleno nelle ghiandole secretrici inizia durante lo sviluppo pupale della femmina del parassitoide e si intensifica durante le 24 ore precedenti allo sfarfallamento.

Negli ectoparassitoidi il ruolo del veleno è ben noto in quanto è associato a fenomeni di paralisi e arresto dello sviluppo dell'ospite (Beard, 1978).

Anche il veleno degli endoparassitoidi non associati a PDVs può causare paralisi transiente nell'ospite (Moreau et al., 2002) ed in molti casi è stato ipotizzato che esso possa avere caratteristiche ancestrali comuni con il veleno degli ectoparassitoidi. Inoltre, in questi endoparassitoidi il veleno ha un ruolo fondamentale nell'alterazione del sistema immunitario dell'ospite. Ciò può essere interpretato come una strategia adattativa messa in atto dal parassitoide per compensare l'assenza di altri fattori immunosoppressivi e garantire il successo della parassitizzazione (Richard e Parkinson 2000). Inducendo lisi cellulare ed apoptosi il veleno produce infatti una drastica riduzione del numero degli emociti circolanti. Promuovendo poi alterazioni del citoscheletro esso inibisce la capacità degli emociti di aggregarsi ed aderire a corpi estranei (Asgari e Rivers, 2011).

Una componente del veleno potenzialmente coinvolta in molti di questi effetti è stata identificata in *Leptopilina boulardi*. Tale proteina, denominata P4, è infatti in grado di regolare il citoscheletro di actina, e di modificare la morfologia e le proprietà adesive dei lamellociti in larve di *D. melanogaster* parassitizzate (Labrosse et al., 2003; Asgari e Rivers, 2011). Nel caso degli Imenotteri endoparassitoidi associati a PDVs, l'induzione di paralisi è lieve o assente (Strand et al, 1994; Asgari et al., 2003b). Altri effetti sono allora imputabili all'azione del veleno e sono soprattutto legati alla manipolazione della fisiologia dell'ospite e alla soppressione delle componenti cellulari ed umorali del sistema immunitario (Asgari, 2006). Riguardo a quest'ultimo punto, sembra che le proteine del veleno agiscano in sinergia con i PDVs. Si ipotizza infatti che il veleno possa facilitare l'ingresso e la stabilità delle particelle dei PDVs nelle cellule dell'ospite e che entrambe le componenti

agiscono insieme per debilitare il sistema immunitario a vari livelli. Zhang *et al* (2004) hanno evidenziato come il peptide Vn1.5 del veleno di *Cotesia rubecula* sia necessario per l'espressione dei geni del PDV associato al parassitoide, negli emociti dell'ospite. Inoltre, sempre in *C. rubecula*, l'attivazione della risposta umorale è inibita dall'azione di due proteine del veleno (Vn4.6 e Vn50) le quali agiscono sinergicamente con una proteina immunosoppressiva del PDV (Asgari *et al.*, 1996, 1997) ed una proteina del calice ovarico (Asgari *et al.*, 1998, 2003b). Le proteine del veleno contribuiscono quindi attivamente al successo della parassitizzazione agendo direttamente nella soppressione del sistema immunitario e coadiuvando l'azione di altri fattori di virulenza, come i PDVs.

Le **proteine del calice ovarico** sono peptidi sintetizzati nell'apparato riproduttivo femminile del parassitoide ed iniettati nel corpo dell'insetto ospite all'atto dell'ovideposizione (Webb e Luckhart, 1996). Queste proteine svolgono un ruolo importante nel successo della parassitizzazione e persistono nel plasma degli insetti parassitizzati, in continuo contatto con gli emociti circolanti, fino a 96h dopo l'ovideposizione (Webb e Luckhart., 1994).

In *Campoletis sonorensis* le proteine più rappresentate nei fluidi del calice ovarico consistono in un gruppo di 5-7 glicoforme di un'unica proteina, di peso compreso tra 29 e 36 kDa (Webb e Luckhart, 1994). In larve di *Heliothis virescens* parassitizzate da *C. sonorensis*, esse vengono internalizzate dagli emociti mediante endocitosi entro 30 min dall'ovideposizione, tempo in cui, in esperimenti condotti *in vitro*, sono stati osservati profondi effetti sull'actina del citoscheletro degli emociti e sulle loro capacità adesive e di incapsulamento (Webb e Luckhart, 1994). Per incapsulamento si intende la capacità degli emociti di formare una capsula a strati multipli intorno ad un corpo estraneo bersaglio, il quale viene soppresso attraverso l'azione di sostanze tossiche, fra cui la melanina, prodotte ad opera della capsula stessa (Pech e Strand, 1996; Loret e Strand, 1998).

Inibendo tale processo, le proteine del calice ovarico prevengono perciò l'incapsulamento dell'uovo da parte degli emociti dell'ospite. Questa azione

protettiva precoce servirebbe dunque a complementare un'attività più tardiva, compiuta dai PDVs (*Edson et al., 1981; Webb and Luckhart, 1999*).

Nell'imenottero ichneumonide *Venturia canescens*, “virus like particles” (VLPs) che rivestono il corion delle uova, sono essenziali per eludere la risposta immunitaria dell'ospite, *Ephestia kuehniella* (*Feddersen et al., 1986*).

Beck *et al.* (2000) hanno dimostrato che queste VLPs agiscono in combinazione con i fluidi del calice ovarico e sono in grado di inibire sia la risposta immunitaria cellulare che quella umorale. Infatti, le VLPs servono a camuffare le uova del parassitoide, che non vengono riconosciute come corpi estranei dal sistema immunitario dell'ospite, mentre i fluidi del calice ovarico bloccano, attraverso l'ausilio di specifici inibitori, l'attività di serin-proteasi presenti nell'emolinfa dell'ospite, capaci di neutralizzare le VLPs. Inoltre, l'attività proteolitica dei fluidi ovarici porta ad una riduzione dei fenomeni di melanogenesi ed inibizione dell'attività della fenolossidasi (PO).

Per quanto riguarda la risposta immunitaria cellulare, esperimenti *in vitro* hanno evidenziato che gli emociti di *E. kuehniella*, se trattati con l'inibitore di serin-proteasi p-APMSF, presentano ridotte capacità adesive. Questo indica che l'adesione cellulare è un meccanismo regolato da eventi proteolitici. Sembra quindi plausibile l'ipotesi che gli inibitori di serin-proteasi presenti nel fluido del calice ovarico possano influenzare l'adesività degli emociti in ospiti parassitizzati (*Beck et al., 2000*).

I **Polydnavirus (PDVs)** sono un gruppo di virus specificamente associati con Imenotteri endoparassitoidi appartenenti alle famiglie *Braconidae* (circa 18.000 specie suddivise in 5 subfamiglie) e *Ichneumonidae* (circa 13.000 specie suddivise in 2 subfamiglie). (*Stolz e Vinson, 1979; Whitfield e Asgrai, 2003; Webb e Strand, 2005*).

Delle numerose specie di parassitoidi associati con i PDVs estimate molte sono di importanza economica rilevante in quanto agenti di contenimento biologico di specie dannose in agricoltura (*Whitfield, 2000*)

Di solito la specie-specificità di questi endoparassitoidi è ristretta ed include una o poche specie correlate, per lo più appartenenti all'ordine Lepidoptera (in

genere stadi larvali), mentre pochi sono i casi in cui gli ospiti appartengono ad altri ordini quali Hymenoptera e Coleoptera.

I PoliDNAvirus devono il proprio nome alla struttura del loro un genoma, suddiviso in segmenti circolari di DNA a doppia elica ("polyDNA") (*Webb et al., 2000*).

Due generi di PDVs sono stati identificati: i **bracovirus** (BVs) associati ad Imenotteri braconidi e gli **ichnovirus** (IVs) associati ad Imenotteri ichneumonidi (*Webb et al., 2000*). Tutti gli IVs hanno nucleocapsidi biconvessi, di 85x330 nm, circondati da una doppia membrana. I BVs invece hanno nucleocapsidi cilindrici di larghezza standard (40nm) e lunghezza variabile (25-100nm), circondati da una singola unità membranosa. I nucleocapsidi degli IVs sono assemblati nel nucleo delle cellule del calice ovarico dell'Imenottero cui sono associati ed acquisiscono un primo involucro nel nucleo stesso, mentre il secondo involucro membranoso avvolge il virione quando quest'ultimo, una volta fuoriuscito dal nucleo, transita attraverso la membrana cellulare. La porzione di membrana cellulare interessata diventa perciò parte integrante del virione, il quale viene rilasciato nel lume del calice ovarico per gemmazione. I virioni dei BVs vengono invece rilasciati nell'ovidotto tramite lisi cellulare, la quale comporta una continua rigenerazione di cellule del calice ovarico con conseguente ininterrotta produzione di prodotti virali (*Stolz e Vinson, 1979a*).

I PDVs sono stabilmente integrati come provirus nel genoma del parassitoide (sia maschio che femmina) e sono trasmessi verticalmente alla progenie attraverso la linea germinale. La loro replicazione ha luogo soltanto nella femmina del parassitoide, in cellule specializzate appartenenti al calice ovarico, porzione dell'apparato riproduttivo della vespa compresa tra gli ovari e l'ovidotto laterale. Durante lo sviluppo, la replicazione virale ha inizio verso il termine della fase pupale della vespa e continua nello stadio adulto (*Norton e Vinson, 1983; Stoltz e Vinson, 1979; Volkoff et al, 1995*). Questo particolare profilo di attività suggerisce che la replicazione dei BVs e IVs venga indotta da fattori sia tessuto che sesso-specifici, ed è stato in particolare osservato che essa ha inizio in concomitanza con un aumento dei livelli di ecdisteroidi

(Webb e Summer, 1992; Webb, 1998; Gruber et al, 1996). Le particelle virali si accumulano nel lume del calice ovarico in un liquido blu iridescente molto viscoso, chiamato fluido del calice ovarico, che avvolge completamente le uova del parassitoide.

Al momento della parassitizzazione la femmina rilascia nell'emocele dell'ospite, assieme all'uovo, particelle virali, proteine del calice ovarico e veleno. I virioni dei BVs e IVs infettano diversi tipi di cellule dell'ospite e all'interno di esse esprimono i propri geni senza però andar incontro a replicazione. I prodotti genici virali inibiscono la risposta immunitaria e regolano la fisiologia dell'ospite, creando le condizioni necessarie alla sopravvivenza e allo sviluppo della larva del parassitoide (Fig 3).

L'interazione esistente tra il PDVs e la vespa è dunque di tipo mutualistico: la trasmissione virale dipende dalla sopravvivenza del parassitoide e la sopravvivenza del parassitoide dipende dall'infezione dell'ospite ad opera del virus (Webb e Strand, 2005).

I PDVs sono definiti virus "atipici" per via del loro peculiare ciclo vitale e delle caratteristiche strutturali dei loro genomi, riconducibili ad organismi eucarioti piuttosto che a virus. Dati derivanti da progetti di sequenziamento dei segmenti incapsidati di vari polydnavirus hanno infatti evidenziato l'esistenza di ampie regioni non codificanti, sia intergeniche che introniche, la presenza di famiglie geniche e l'assenza, invece, di geni codificanti per proteine strutturali del capsido nonché geni dell'apparato replicativo virale (Cui e Webb, 1997; Wyder et al., 2002). In generale, i geni identificati sembrano non avere alcuna omologia con i geni trovati in altri virus (Asgari et al., 1997; Cui e Webb, 1997; Hilgarth e Webb, 2002; Volkoff et al., 2002; Falabella et al., 2003) e sono esclusivamente correlati con l'attività patogenica che questi virus svolgono negli ospiti parassitizzati (Cui e Webb, 1997; Strand et al., 1997).

Analisi filogenetiche hanno evidenziato che i due diversi generi di PDVs hanno origine differente. Tali analisi sono state confermate da recenti indagini molecolari. In particolare, uno studio condotto da Bézier et al (2009) su *Chelonus inanitus* (Cheloninae) e *Cotesia congregata* (Microgasterinae), ha confermato l'ipotesi secondo la quale i bracovirus derivano da un nudivirus

ancestrale integratosi nel genoma della vespa 100 milioni di anni fa (*Murphy et al., 2008*). Infatti, analisi del trascrittoma delle cellule del calice ovarico, durante la fase in cui si ha il picco massimo di produzione delle particelle virali (fase terminale dello stadio pupale), hanno portato all'identificazione di numerosi trascritti codificanti per proteine che mostrano elevata omologia con proteine di nudivirus (*Bézier et al., 2009*). I corrispondenti geni risiedono stabilmente nel genoma del parassitoide e dunque non vengono incapsidati, ma servono a produrre le componenti strutturali dei virioni.

Per quanto riguarda gli Ichnovirus (IVs), studi analoghi a quelli effettuati per i bracovirus sono stati condotti su *Hyposoter didymator*, ma non hanno portato all'identificazione di geni riconducibili a nudivirus o ad altri virus noti. Analisi proteomiche dei costituenti del capsido hanno dato lo stesso risultato. La recente scoperta di nuovi virus associati ad insetti lascia tuttavia ipotizzare che gli IVs derivino da un gruppo di virus non ancora caratterizzato (*Volkoff et al., 2010*).

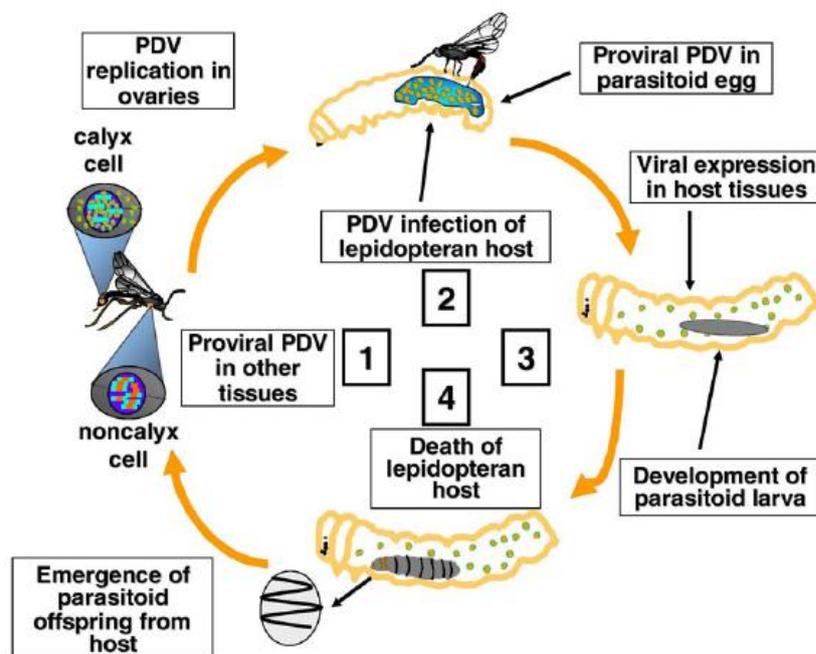


Fig 3. Ciclo vitale di un PolidNAVirus

I.2.1 Fattori di origine embrionale

I fattori di regolazione di origine embrionale derivano da particolari membrane di rivestimento membrane serosali che, durante lo sviluppo embrionale, svolgono principalmente un ruolo protettivo (*Stolz, 1986*).

Negli Imenotteri parassitoidi tali membrane possono avere origine molto varia e, come suggerito dalla loro organizzazione strutturale, svolgono anche una funzione nutrizionale, sia durante lo sviluppo dell'embrione, che nella fase successiva alla schiusa dell'uovo. (*Pennacchio et al., 1999; Li et al., 2002*)

E' in quest'ultima fase che vengono rilasciati nell'emolinfa i **teratociti**, cellule extra-embryonali derivanti dalla dissociazione della membrana serosale, che vagano liberamente nell'emocele dell'ospite e si accrescono senza mai dividersi, mostrando spesso un alto livello di ploidia (*Pedata et al., 2003*).

Il numero dei teratociti rilasciati nell'ospite è specie-specifico ed è variabile da 8 (*Tremblay e Calvert, 1972*) a 900 (*Zhang et al., 1994*). Essi persistono nell'emolinfa durante tutto lo sviluppo larvale del parassitoide al termine del quale, in alcuni casi, il numero dei teratociti si riduce drasticamente per fenomeni di degenerazione, ingestione da parte della larva stessa (*Sluss, 1968*) o espulsione da parte dell'ospite (*Volkoff e Colazza, 1992*).

Dal punto di vista citologico i teratociti 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, legata alla secrezione di proteine coinvolte nell'alterazione della fisiologia e del metabolismo dell'ospite (*Schepers et al., 1998*). I teratociti svolgono infatti un ruolo fondamentale nella regolazione dell'ospite in seguito alla parassitizzazione (*de Buron e Beckage, 1997*). 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*).

Nelle larve di *Heliothis virescens* parassitizzate da *Microplitis croceipes* Cresson (Hymenoptera: Braconidae) i teratociti inibiscono l'accrescimento ed alterano lo sviluppo ed i parametri fisiologici ad esso associati (Dahlman et al., 2003). Inoltre, Zhang & Dahlman, (1989) hanno dimostrato che i teratociti provenienti da uova di *Microplitis croceipes*, iniettati in larve non parassitizzate di *Heliothis virescens*, sono in grado di mimare alcuni degli effetti fisiologici riscontrabili in larve parassitizzate, come ad esempio arresto dello sviluppo prepupale, morte larvale, soppressione dei livelli di ormone giovanile (JH) e ecdisone (Zhang et al., 1992), riduzione del livello proteico nell'emolfa e delle proteine di riserva accumulate nei corpi grassi.

I teratociti sono stati finora rinvenuti soltanto in pochi gruppi di Imenotteri parassitoidi, nell'ambito delle superfamiglie Ichneumonoidea, Platygastroidea e Calcidoidea (Pedata et al., 2003; Pennacchio e Strand, 2006). Per quanto riguarda la superfamiglia Ichneumonoidea sono stati identificati in sette delle 35 sottofamiglie di Braconidi (Shaw e Huddleston, 1991) e in un solo membro degli Icnemonidi (Rouleux-Bonnin et al., 1999).

I.3 Interazione *Toxoneuron nigriceps* – *Heliothis virescens*

Toxoneuron nigriceps (Viereck) (Hymenoptera, Braconidae) è un endoparassitoide larvale della nottua del tabacco *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera, Noctuidae). 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 causandone l'arresto dello sviluppo, riconducibile ad significativo aumento del titolo di JH (Li et al., 2003) ed ad una considerevole riduzione dell'attività biosintetica delle PTG 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 e il bracovirus associato a *T. nigriceps* (TnBV) (Tanaka e Vinson, 1991; Pennacchio et al., 1997, Pennacchio et al., 1998b, Pennacchio et

al., 2001; Pennacchio e Strand 2006) interferiscono attivamente con la biosintesi dell'ecdisione (alterando la via di traduzione del segnale del PTH attraverso la sottofosforilazione della proteina S6 e della β -tubulina), mentre i teratociti sono responsabili della conversione selettiva del 20E in ecdisteroidi polari non attivi, che si ritrovano accumulati nell'emolinfa dell'ospite (Pennacchio *et al.*, 1994b; Pennacchio *et al.*, 2001). Inoltre, è stato dimostrato che i teratociti rilasciano nell'emocele dell'ospite (Vinson *et al.*, 1994; Cònsoli *et al.*, 2005) proteine parassitismo-specifiche (PSPs), tre delle quali sono state recentemente parzialmente caratterizzate (Cònsoli *et al.*, 2007). La PSP3 (56 kDa) è una chitinasi che si ipotizza possa svolgere un doppio ruolo protettivo: (a) favorisce l'inibizione dei meccanismi di risposta immune evitando, allo stesso tempo, contaminazioni microbiche nell'emocele dell'ospite (b) aiuta la larva del parassitoide a fuoriuscire dal corpo dell'insetto ospite attuando una disgregazione della cuticola e degli altri tessuti (Cònsoli *et al.*, 2007). La larva di *T. nigriceps* infatti non possiede mandibole potenti per cui si tratta di un meccanismo particolarmente importante per permettere alla stessa, una volta emersa, di consumare dall'esterno tutti i restanti tessuti dell'ospite e completare il suo sviluppo (Lewis & Vinson, 1968). PSP1 e PSP2 sono proteine ad alto peso molecolare (118 e 116 kDa) la cui presenza coincide con la prima muta della larva del parassitoide e con l'incremento del tenore proteico dell'emolinfa dell'ospite (Pennacchio *et al.*, 1992; Pennacchio *et al.*, 1993; Pennacchio *et al.* 1994a; Pennacchio *et al.* 1994b; Pennacchio e Strand, 2006). Si tratta per lo più di proteine che, negli ospiti sani, vengono immagazzinate come risorsa energetica nel tessuto adiposo del lepidottero, per essere rese disponibili durante l'ultima età larvale, al fine di fornire il supporto nutrizionale e il necessario apporto di aminoacidi aromatici necessari all'incrisalidamento ed alla metamorfosi (Pennacchio *et al.*, 2001; Vinson *et al.*, 2001). 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 la metamorfosi, la riproduzione, o altri (Pennacchio e Strand, 2006). Ad esempio nelle larve di lepidottero l'intestino

occupa la maggior parte della cavità emocelica ed è una struttura complessa che svolge nell'insetto funzioni digestive e di assorbimento dei nutrienti, determinando, pertanto, il livello di sostanze nutritive presenti nella larva (Dow 1986). Di recente è stato caratterizzato il processo che consente la sostituzione del canale alimentare in larve di V età di *H. virescens* non parassitizzate, che è il risultato di una proliferazione cellulare rigenerativa (Tettamanti et al., 2007; Tettamanti et al., 2008) e che richiede un supporto metabolico considerevole in un periodo di tempo relativamente breve. La soppressione di tale processo, ottenuta mediante l'alterazione endocrina subita dalle larve parassitizzate, rappresenta un vantaggio nutrizionale per la progenie del parassitoide (Pennacchio e Strand 2006; Vinson et al. 2001).

È stato di recente dimostrato (Tettamanti et al., 2008) che la parassitizzazione da parte di *T. nigriceps* causa nelle larve di ultima età di *H. virescens* la mancata proliferazione di cellule rigenerative e quindi la mancata sostituzione dell'intestino. Ciò avviene perché il processo è sotto controllo ormonale, infatti, l'eliminazione del vecchio epitelio e la formazione del nuovo è inibita dall'azione combinata di elevati livelli di JH (Li et al., 2003) e dall'assenza, o quasi, di 20E (Pennacchio et al., 2001; Pennacchio e Strand 2006), che promuove la differenziazione e la crescita delle cellule rigenerative (Lee e Baehrecke 2001; Lee et al., 2002; Parthasarathy e Palli 2007; Wu et al., 2006).

Nelle larve di *Heliothis virescens* parassitizzate da *Toxoneuron nigriceps* sono state infine riportate alterazioni nei livelli di altri neuroormoni e neurotrasmettitori, potenzialmente in grado di influire sullo sviluppo.

Alle alterazioni dello sviluppo si affiancano, nelle larve parassitizzate, pesanti alterazioni del sistema immunitario.

Il sistema immunitario degli insetti è costituito da una componente cellulare e da una componente umorale. La **componente umorale** fa riferimento all'azione di molecole solubili circolanti nell'emolinfa, in particolare peptidi antimicrobici, intermedi reattivi dell'ossigeno e dell'azoto ed il complesso di cascate enzimatiche che regolano la coagulazione e la melanizzazione dell'emolinfa stessa. Si tratta di molecole prodotte da diversi tessuti quali

corpi grassi, emociti, intestino medio ed epidermide (*Schmidt et al., 2001*). La **componente cellulare** è rappresentata dagli emociti. Questi sono distinti in varie classi, ciascuna caratterizzata da specifici aspetti morfologici e funzionali. Nei Lepidotteri si distinguono proemociti, plasmaciti, granulociti, cellule sferiche e enocitoidi. I granulociti sono in particolare responsabili dei processi di fagocitosi di patogeni di piccole dimensioni. Essi partecipano inoltre, assieme ai plasmaciti, ai processi di nodulazione ed incapsulamento attraverso i quali vengono neutralizzati, rispettivamente, aggregati di batterio metazoi parassiti (*Strand, 2008*).

La suddivisione del sistema immunitario in umorale e cellulare è piuttosto arbitraria, in quanto alcune componenti umorali riescono a stimolare la funzione degli emociti e gli emociti sono, a loro volta, fonte di molecole coinvolte nella risposta umorale. La risposta umorale e quella cellulare si vengono, pertanto, a sovrapporre nel processo di riconoscimento del corpo estraneo introdotto e nella conseguente reazione di difesa (*Lavine e Strand, 2002*).

T. nigriceps è in grado di eludere tale processo di riconoscimento attraverso meccanismi di difesa passiva o soppressione attiva del sistema immunitario dell'ospite.

In generale, le strategie di difesa passiva adottate dai parassitoidi consistono nella deposizione o lo sviluppo in un tessuto dell'ospite inaccessibile agli emociti oppure nel ricoprire le uova con uno strato protettivo. In quest'ultimo caso si parla di “**mimetismo molecolare**” quando lo strato protettivo dell'uovo ha similarità antigenica con le componenti dell'ospite oppure di “**immunocamuffamento**” quando proteine specifiche mascherano strutture superficiali con potenziale funzione di elicitore della risposta immunitaria (*Theopold et al., 2000*).

Lewis e Vinson (1986) hanno osservato che *T. nigriceps* è in grado di deporre le proprie uova in due specie di *Heliothis*. In *H. zea* le uova vengono incapsulate, mentre in *H. virescens* il parassitoide porta a compimento il suo sviluppo. Questo accade perché lo strato fibroso che ricopre esternamente le uova di *Toxoneuron*, costituito da proteine ovariche (*Asgari et al., 1998*;

Davies e Vinson, 1986; Hayakawa e Yazaki 1997; Schmidt et al, 2001; Tanaka et al, 2002), viene riconosciuto dal sistema immunitario di *H. zea*, mentre rappresenta il primo meccanismo di difesa passiva in *H. virescens*, spesso accompagnato da una precoce e transitoria soppressione dell'attività della fenolossidasi (PO). Tale enzima rappresenta uno maggiori componenti del sistema immunitario umorale degli insetti ed è attivato, in seguito a cascata proteolitica, a partire da un precursore inattivo, profenolossidasi (PPO). La PO è coinvolta in tre processi fisiologici fondamentali: 1) incapsulamento e melanizzazione; 2) sclerotizzazione della cuticola; 3) riparazione di tessuti danneggiati (*Hartzer, et al., 2005*).

L'attività della PO cade drasticamente già a 15 min dalla ovideposizione per poi riprendere gradualmente entro 4h. In realtà, probabilmente, è inibita sia la reazione di melanizzazione che la produzione di molecole segnale in grado di attivare la risposta immunitaria cellulare. Le fonti dei fattori di regolazione coinvolti nell'inattivazione della PO sono ancora sconosciute, ma poiché queste alterazioni avvengono entro pochi minuti dalla parassitizzazione, veleno e fluidi ovarici potrebbero svolgere un ruolo fondamentale (*Ferrarese et al., 2005*).

Le larve parassitizzate mostrano anche una temporanea riduzione del numero di emociti circolanti, con un picco minimo registrato già a poche ore dall'ovideposizione, seguito da un lento ritorno a valori normali, raggiunti a distanza di 40h (*Ferrarese et al., 2005*). Durante questo intervallo gli emociti mostrano notevoli alterazioni strutturali e funzionali, in particolare distruzione dell'actina del citoscheletro e perdita di proprietà adesive, e spesso rivelano cambiamenti morfologici riconducibili a fenomeni di apoptosi (*Ferrarese et al., 2005*). Queste alterazioni sembrano essere selettivamente indotte nei granulociti, mentre i plasmacociti mostrano morfologia inalterata ma perdono qualsiasi capacità di incapsulare. Questo potrebbe essere conseguenza: (a) della degenerazione dei granulociti, necessari per l'ancoraggio dei plasmacociti durante i processi di incapsulamento (*Lavine and Strand, 2002*), (b) di una profonda alterazione funzionale dei plasmacociti.

Tutto questo complesso di modifiche strutturali e funzionali degli emociti viene indotto da veleno e fluidi ovarici subito dopo l'ovideposizione e, dopo qualche ora, rafforzato dall'espressione dei geni del *TnBV* (Ferrarese et al., 2005).

I.4 Toxoneuron nigriceps Bracovirus (*TnBV*)

Toxoneuron nigriceps Bracovirus è un tipico polyDNAvirus appartenente al genere bracovirus (BV). Si tratta dunque di un virus con genoma segmentato, costituito da molecole circolari di DNA a doppia elica, presenti in rapporto non equimolare (Xu e Stoltz, 1993; Cui e Webb, 1997). La caratterizzazione di queste molecole, effettuata nel nostro laboratorio, ha portato all'identificazione di 28 circoli di dimensioni comprese tra 4 e 13 kb (dati non pubblicati).

In parallelo, la costruzione e l'analisi di genoteche di cDNA di diversi tessuti di larve parassitizzate ha portato all'isolamento di 12 cDNA corrispondenti ad altrettanti geni virali.

I.4.1 Regione codificante

I geni dei PDVs possono essere suddivisi, in funzione del loro pattern di espressione, in tre classi: (a) **classe I**, geni espressi solo nel parassitoide e presumibilmente coinvolti nella replicazione virale e nell'assemblaggio dei virioni (b) **classe II**, geni espressi solo nell'ospite e coinvolti nelle alterazioni fisiologiche derivanti dalla parassitizzazione (c) **classe III**, geni espressi sia nell'ospite che nel parassitoide (Theilmann e Summers, 1987, 1988; Stoltz, 1993). Attualmente, in *TnBV*, i geni identificati e più ampiamente descritti appartengono alla classe II.

Il primo gene di *TnBV* isolato, ***TnBV1***, contiene un introne e codifica per una proteina putativa con massa molecolare stimata pari a ~15 kDa (Varricchio et al., 1999), ed una sequenza di 124 amminoacidi che non mostra alcuna omologia con proteine note. *TnBV1* produce un trascritto di circa 0,5 kb che compare nelle larve parassitizzate 12h dopo l'ovideposizione e raggiunge un

picco massimo di espressione tra le 24-48h. Tale trascritto è presente nei corpi grassi, negli emociti e nelle ghiandole protoraciche. L'espressione transiente di questo gene in differenti tipi cellulari, specialmente negli emociti dove risulta particolarmente abbondante, indica un possibile coinvolgimento del *TnBV1* nell'alterazioni della fisiologia dell'ospite, in particolare in processi di degenerazione apoptotica degli emociti derivanti in seguito a parassitizzazione (Varricchio et al., 1999, Lapointe et al., 2005).

Il secondo gene caratterizzato (Falabella et al., 2003), denominato ***TnBV2***, è costituito da due esoni ed un introne. Tale gene è presente in copie multiple nel genoma del virus e codifica per una proteina putativa di 153 a.a. con una massa molecolare stimata di 18 kDa.

Il prodotto genico è rappresentato da un trascritto di ca. 0.6 kb presente nelle larve parassitizzate già a 6h, con un picco massimo tra le 24-48h dall'avvenuta parassitizzazione. Il trascritto è espresso in diversi tessuti quali corpi grassi, emociti e regione del capo/torace. Dagli emociti è stato isolato un secondo trascritto di 2,5kb sia a 24h che a 48h dalla parassitizzazione, la cui origine è sconosciuta, ma si ipotizza possa derivare da geni che mostrano analogia con il *TnBV2* ed espressi esclusivamente negli emociti. Dunque *TnBV2*, probabilmente, gioca un ruolo importante nelle prime fasi della parassitizzazione, andando ad interferire con diverse funzioni fisiologiche, in differenti tessuti della larva ospite. In particolare, la proteina putativa codificata da *TnBV2* contiene tra gli a.a. 42 e 119 un dominio conservato di un'aspartil proteasi di tipo retrovirale (Pearl e Taylor, 1987). È interessante notare che una proteasi aspartica del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1 PR), responsabile della maturazione delle proteine *gag* e *gag-pol*, è richiesta per l'infettività dell'HIV-1. È stato infatti dimostrato che HIV-1 PR rompe i filamenti intermedi delle cellule infettate, distruggendo la struttura e le funzioni del citoscheletro (Shoeman et al., 1990) e inibisce i meccanismi di traduzione cap-dipendente attraverso taglio proteolitico del fattore di inizio eucariotico eIF4G (Ventoso et al., 2001). *TnBV2* potrebbe agire funzionalmente come HIV-1 PR ed avere bersagli simili in differenti tipi

di cellule, compatibili con alterazioni funzionali precedentemente descritte (*Pennacchio et al., 2001; Falabella et al., 2003*).

Un'importante famiglia genica identificata nel genoma di *TnBV* è quella delle proteine tirosino-fosfatasi (**PTP**) che risulta essere la più grande in quanto consta di 13 membri espressi in differenti tessuti dell'ospite.

Il gran numero di geni che compone questa famiglia, il loro complesso profilo d'espressione ed il loro ruolo fondamentale, insieme all'attività delle tirosino-chinasi, nella regolazione di pathway di trasduzione del segnale (*Andersen et al., 2001*) suggeriscono che queste proteine possono essere coinvolte nell'alterazione di differenti aspetti della fisiologia degli ospiti parassitizzati (*Falabella et al., 2006*).

Sono stati isolati e caratterizzati i cDNA per il gene PTP5 e il gene PTP7, i quali contengono introni e codificano per proteine di 293 (PTP5) e 294 (PTP7) amminoacidi con una massa molecolare di 34,7 kDa.

Saggi di northern blot su mRNA estratti da corpi grassi ed emociti dell'ospite mostrano la presenza di entrambi i trascritti (PTP5 e PTP7) in larve parassitizzate, già a 3h, con un picco massimo d'espressione tra le 24-48h dalla parassitizzazione. La PTP7, a differenza della PTP5, è espressa anche nelle PTGs a 24 ore dalla parassitizzazione (*Falabella et al., 2007*). Questo suggerisce che l'espressione delle PTP potrebbe essere tessuto e/o substrato specifica. Non è tuttavia da escludere che *TnBV* PTP5 possa essere presente nelle PTGs ma a tempi/livelli diversi da quelli fin ora analizzati (*Falabella et al., 2007*).

Le PTP in realtà interagiscono con numerosi target nell'ospite, generando una serie complessa di sindromi patologiche. L'espressione delle PTP negli emociti di larve parassitizzate, soprattutto nella fase terminale dello sviluppo larvale del parassitoide, conferma il ruolo di tali geni nei meccanismi di inattivazione degli emociti. Questo, in combinazione con l'azione di veleno, l'espressione del *TnBV1* e di geni del *TnBV* per proteine "I_B-simili", porta all'incremento di fenomeni apoptotici e di perdita di adesione osservati negli emociti in seguito a parassitizzazione (*Ferrarese et al., 2005*)

Inoltre, la PTP7, a 24h dalla parassitizzazione, è presente nelle PTGs dell'ospite mostrando un importante ruolo nella defosforilazione di proteine regolatrici della via di trasduzione del segnale dell'ormone protoracicotropico (PTTH), quali la β -tubulina e la proteina ribosomale S6, suggerendo un'intensa attività nella soppressione dell'ecdisteroidogenesi in larve di *H. virescens* parassitizzate da *T. nigriceps* (Falabella et al., 2006).

Pertanto è possibile concludere che le PTP di *TnBV*, insieme con altri geni come *TnBV1* (Varricchio et al., 1999) e *TnBV2* (Falabella et al., 2003), concorrono, con modalità ancora non chiaramente definite, all'alterazione degli equilibri neuroendocrini e di sviluppo che si osservano nell'ospite parassitizzato.

Un'altra famiglia genica di *TnBV* include membri che codificano proteine “**I κ B-simili**”, caratterizzate dalla presenza di domini ripetuti di anchirina (da qui la denominazione proteine “ank”) e mostranti significativa identità sequenza (approssimativamente il 50%) con membri della famiglia di proteine I κ B. Queste ultime sono importanti fattori di regolazione che, nei vertebrati e negli insetti, agiscono come inibitori della via di trasduzione del segnale che porta all'attivazione di NF- κ B (Silverman e Maniatis, 2001).

In *Drosophila melanogaster*, la proteina I κ B “Cactus” regola risposte cellulari multiple attivate mediante la traslocazione nel nucleo di fattori trascrizionali (proteine NF- κ B o *Rel*) in grado di modulare l'espressione di geni che, sotto il controllo di promotori κ B, controllano negli embrioni il patterning dorso-ventrale (Bergmann et al., 1996) e la risposta antimicrobica (De Gregorio et al., 2001; Hoffmann, 2003). In larve di *Heliothis* parassitizzate, le proteine “I κ B-simili” prodotte dal *TnBV*, in combinazione con veleno, proteine del calice ovarico e altri prodotti virali, si legano irreversibilmente alle proteine immunoreattive NF- κ B/ *Rel* immobilizzandole nel citoplasma e inducendone la soppressione.

Le larve di *H. virescens* parassitizzate sono perciò incapaci di incapsulare corpi estranei, in quanto la distruzione del pathway dell' NF- κ B ad opera del *TnBV*, probabilmente inibisce sia la risposta immunitaria umorale che cellulare.

Le proteine ank sono inoltre coinvolte nei fenomeni apoptotici in quanto inibiscono la sintesi di fattori anti-apoptotici (*Ferrarese et al., 2005*) che complementano l'azione dei prodotti genici del *TnBV1* (*Lapointe et al., 2005*). Nel genoma di *TnBV* sono state trovate tre sequenze codificanti per putative proteine "I_B-simili" denominate *TnBVank1-3*. Da librerie di cDNA preparate a partire dall'mRNA estratto da emociti di larve di *H. virescens* parassitizzate sono stati isolati i cDNA di *TnBVank1* e *TnBVank3*, ma non di *TnBVank2*. Ciò indica che, per quanto riguarda *TnBV ank2*, potrebbe trattarsi di un pseudogene o che il gene potrebbe essere potenzialmente espresso e funzionale in altri ospiti (*Falabella et al., 2007*). *TnBV ank 1* e *ank3* vengono espressi già a 3h nelle larve parassitizzate ma il loro livello di espressione tende a decrescere a 48h dalla parassitizzazione.

I.4.2 Regione non codificante

I genomi dei PDVs ad oggi sequenziati (*Espagne et al., 2004; Webb et al., 2006; Choi et al., 2005; Desjardins et al., 2008; Xu and Stoltz, 1993; Tanaka et al., 2007; Varricchio et al., unpublished data*) presentano una larga preponderanza di regioni apparentemente prive di geni. Tale caratteristica, che non trova corrispondenza nei genomi di altri tipi di virus, potrebbe riflettere l'esistenza di sequenze non codificanti con ruolo regolativo.

Nel nostro laboratorio è stato identificato un trascritto non codificante (ncRNA) prodotto dal *TnBV*. Il relativo gene è stato localizzato in un circolo del genoma del *TnBV* nel quale è stato individuato anche un membro della famiglia genica delle proteine "I_B-simili". Il ncRNA ha sequenza antisenso rispetto alla sequenza della regione 5'UTR di un trascritto di *H. virescens*, chiamato 102, espresso negli emociti. Considerata la sua peculiare struttura, il ncRNA del *TnBV* potrebbe essere capace di silenziare il gene 102 dell'ospite, mediante degradazione del suo trascritto o blocco della traduzione. Evidenze sperimentali indicano che il gene 102 è implicato nella risposta immunitaria (*Falabella et al., in stampa*). Il ncRNA del *TnBV* potrebbe quindi avere un ruolo importante nella soppressione del sistema immunitario di *H. virescens* in seguito a parassitizzazione da parte di *T. nigriceps*. La scoperta di questo

ncRNA consente di ipotizzare che altre sequenze funzionalmente importanti possano celarsi nelle regioni non codificanti del genoma di questo virus e possano essere coinvolte nei processi di regolazione dell'ospite.

I.5 RNA non codificanti

Le analisi comparative fra genomi, rese possibili dai progetti di sequenziamento su larga scala condotti negli ultimi decenni, hanno smentito la vecchia concezione per la quale la complessità di un organismo è direttamente proporzionale al numero di geni codificanti per proteine che esso esprime. E' attualmente evidente come organismi dotati di un'elevata complessità, quali uomo e topo, posseggano approssimativamente lo stesso numero di geni codificanti per proteine di un organismo decisamente meno complesso, come il nematode *C. elegans*. In molti casi, poi, i genomi degli organismi multicellulari contengono addirittura un numero inferiore di geni codificanti per proteine rispetto a semplici eucarioti unicellulari (Taft *et al.*, 2007).

Di fatto, la complessità di un organismo è strettamente correlata all'abbondanza di specie funzionali di RNA non codificanti da esso prodotte ed implicate in numerosissimi processi biologici.

Per i mammiferi è riportato che solo il 2% del genoma dà origine a molecole di RNA messaggero mentre la stragrande maggioranza è trascritta in molecole di RNA non codificanti (Taft *et al.*, 2007; Birney *et al.*, 2007; Core *et al.*, 2008; Carninci *et al.*, 2005-2006; Cheng *et al.*, 2005; Cloonan *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2005 ; Kapranov *et al.*, 2007 ; . Seila *et al.*, 2008). Il "vecchio" concetto espresso dal cosiddetto "dogma centrale della biologia molecolare" che considerava l'RNA come un semplice intermediario tra DNA e proteine ha dunque lasciato spazio a discorsi più articolati.

Numerose sono le specie che rientrano nella categoria dei ncRNAs, si passa infatti da RNA altamente espressi come RNA transfer (tRNA) e RNA ribosomiali (rRNA), a specie di RNA con funzione regolativa quali small nucleolar RNA (snoRNAs), microRNA (miRNAs), small interfering RNA (siRNAs), piwi associated RNA (piRNAs) e long ncRNA (lncRNA). Una lista

completa di tutte le classi di ncRNA identificate nei mammiferi è riportata nella sottostante **Tab 2** (Talf *et al.*, 2010).

Tab 2. Classi di ncRNAs indentificati nei mammiferi (Talf *et al.*, 2010).

NcRNA class	Characteristics
<i>Established ncRNA classes</i>	
Long (regulatory) non-coding RNAs (lncRNAs)	The broadest class, lncRNAs, encompass all non-protein-coding RNA species >~200 nt, including mRNA-like ncRNAs. Their functions include epigenetic regulation, acting as sequence-specific tethers for protein complexes and specifying subcellular compartments or localization
Small interfering RNAs (siRNAs)	Small RNAs ~21–22 nt long, produced by Dicer cleavage of complementary dsRNA duplexes. siRNAs form complexes with Argonaute proteins and are involved in gene regulation, transposon control and viral defence
microRNAs (miRNAs)	Small RNAs ~22 nt long, produced by Dicer cleavage of imperfect RNA hairpins encoded in long primary transcripts or short introns. They associate with Argonaute proteins and are primarily involved in post-transcriptional gene regulation
PIWI-interacting RNAs (piRNAs)	Dicer-independent small RNAs ~26–30 nt long, principally restricted to the germline and somatic cells bordering the germline. They associate with PIWI-clade Argonaute proteins and regulate transposon activity and chromatin state
Promoter-associated RNAs (PARs)	A general term encompassing a suite of long and short RNAs, including promoter-associated RNAs (PASRs) and transcription initiation RNAs (tiRNAs) that overlap promoters and TSSs. These transcripts may regulate gene expression
Small nucleolar RNAs (snoRNAs)	Traditionally viewed as guides of rRNA methylation and pseudouridylation. However, there is emerging evidence that they also have gene-regulatory roles
<i>Other recently described classes</i>	
X-inactivation RNAs (xiRNAs)	Dicer-dependent small RNAs processed from duplexes of two lncRNAs, Xist and Tsix, which are responsible for X-chromosome inactivation in placental mammals
Sno-derived RNAs (sdRNAs)	Small RNAs, some of which are Dicer-dependent, which are processed from small nucleolar RNAs (snoRNAs). Some sdRNAs have been shown to function as miRNA-like regulators of translation
microRNA-offset RNAs (moRNAs)	Small RNAs ~20 nt long, derived from the regions adjacent to pre-miRNAs. Their function is unknown
tRNA-derived RNAs	tRNAs can be processed into small RNA species by a conserved RNase (angiogenin). They are able to induce translational repression
MSY2-associated RNAs (MSY-RNAs)	MSY-RNAs are associated with the germ cell-specific DNA/RNA binding protein MSY2. Like piRNAs, they are largely restricted to the germline and are ~26–30 nt long. Their function is unknown
Telomere small RNAs (tel-sRNAs)	Dicer-independent ~24 nt RNAs principally derived from the G-rich strand of telomeric repeats. May have a role in telomere maintenance
Centrosome-associated RNAs (crasiRNAs)	A class of ~34–42 nt small RNAs, derived from centrosomes that show evidence of guiding local chromatin modifications

I.5.1 microRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante, di dimensioni comprese tra i 18 e i 30 nt, che costituiscono la maggiore classe di molecole responsabili della regolazione genica. Essi svolgono un ruolo fondamentale in numerosi processi biologici tra i quali sviluppo, apoptosi, immunità e longevità.

I miRNA vengono generalmente trascritti a partire da sequenze localizzate in regioni intergeniche, tuttavia una consistente minoranza è stata individuata

negli introni di geni noti. Spesso sono riuniti in cluster genici, probabilmente trascritti come singole unità trascrizionali policistroniche (Kim, 2005).

La trascrizione dei geni dei miRNA è mediata dalla RNA polimerasi II (pol II), tuttavia sono noti alcuni casi di trascrizione ad opera di RNA polimerasi III (Pfeffer et al., 2005; Winter et al., 2009).

La trascrizione avviene nel nucleo e porta alla sintesi di un trascritto primario (pri-miRNA) che presenta una peculiare struttura a “stem-loop”. Tale trascritto, che può contenere una (trascritto monocistronico) o multiple (trascritto policistronico) strutture a stem loop, è processato nel nucleo per dar luogo alla formazione di un precursore (pre-miRNA) di circa 70 nt.

L’enzima responsabile di tale processamento è la ribonucleasi Drosha che agisce insieme alla proteina DGCR8/Pasha in quel che viene definito complesso multiprocessore. DGCR8/Pasha è essenziale affinché Drosha possa svolgere la sua funzione ed effettuare un taglio alle estremità 5’ e 3’ della struttura a stem-loop. Tale taglio avviene in maniera tale da lasciare una sporgenza di 2 nt all’estremità 3’ del pre-miRNA (3’-overhangs), definendo una delle estremità mature del futuro miRNA.

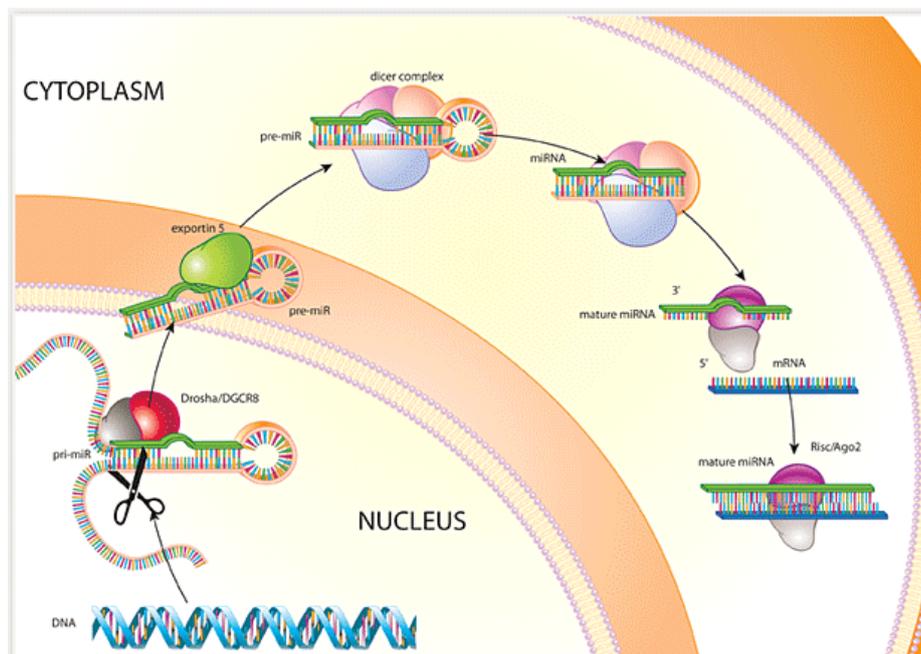


Fig 3. Schematizzazione grafica della biogenesi dei microRNA.

Il pre-miRNA è poi trasportato nel citoplasma attraverso i pori nucleari, ovvero larghi canali proteici che attraversano la membrana nucleare (*Lei e Silver, 2002*).

Specifici recettori individuano e guidano il pre-miRNA attraverso i pori nucleari mediante interazione con le nucleoporine, specifiche proteine che ne costituiscono la struttura (*Kim, 2004*). In particolare, è stato dimostrato che l'Esportina 5 (Exp5), recettore appartenente alla famiglia dei nuclear transport receptors (NTRs), svolge un ruolo chiave nel mediare il passaggio nucleocitoplasmatico dei precursori dei miRNA (*Kim, 2004*).

Una volta arrivato nel citoplasma il pre-miRNA subisce un secondo processamento. L'enzima responsabile di questo secondo taglio è la RNasi III Dicer, che insieme al fattore TRBP (TAR RNA binding protein nei mammiferi e *loquacious* in *Drosophila melanogaster*), escinde la porzione terminale ad anello dal pre-miRNA, generando un RNA a doppio filamento di circa 22 nt (miRNA-miRNA*) che conserva l'estensione di 2 nt all'estremità 3', prodotti dal taglio di Drosha.

Uno solo dei due filamenti costituenti il dsRNA rappresenta il miRNA maturo. Questo viene rilasciato in seguito a denaturazione del complesso miRNA-miRNA*, attraverso l'instaurarsi di complesse interazioni RNA-proteine e proteina-proteina e l'intervento di un'elicasi che srotola il dsRNA (*Singh et al., 2008*).

In genere, il filamento che possiede all'estremità 5' la minore stabilità termodinamica viene scelto come miRNA maturo (guide strand) mentre l'altro filamento viene degradato (passenger strand). Tuttavia, in alcuni casi, entrambe i filamenti possono essere accumulati in determinati tessuti ed essere sottoposti a selezione successiva (*Ro et al., 2007*). *Ro et al.* hanno inoltre dimostrato che entrambe i filamenti del dsRNA possono legarsi ed inibire l'espressione degli stessi geni bersaglio.

Il miRNA maturo viene incorporato nel complesso effettore, noto come miRPN (microRNA ribonucleoprotein), Mirgonauta o miRISC.

Componenti fondamentali del complesso RISC sono le proteine Argonaute (AGO). Queste proteine appartengono ad una famiglia proteica altamente

conservata e sono coinvolte nella regolazione dello sviluppo. Diversi omologhi sono stati identificati in numerosi organismi quali l'uomo (*Sasaki et al., 2003*), *D. melanogaster* (*Carmell et al., 2002*), *C.elegans* (*Sigova et al., 2004*) e lievito (*Sigova et al., 2004; Verdel et al., 2004*). Tutti gli omologhi sono caratterizzati dalla presenza di un dominio PAZ (Piwi / Argonaute / Zwiille) che lega l'estremità 3' del ssRNA, e un dominio PIWI (*Lingel et al., 2003; Yan et al., 2003*).

Il complesso miRNA-RISC espleta la sua funzione di inibizione dell'espressione del gene bersaglio attraverso ancoraggio alla regione 3'UTR del suo mRNA.

Il meccanismo di regolazione messo in atto dai miRNA, dipende dalla complementarità parziale o completa che essi possiedono con la sequenza bersaglio. Negli animali, la modalità di regolazione predominante comporta l'inibizione della traduzione e, qualche volta, conseguente degradazione del target (*Bushati e Cohen, 2007; Lagos-Quintana et al., 2001*).

Inoltre, alcune proteine Ago, svolgono un'attività RNasi H endonucleolitica. Quando queste proteine sono associate a miRNA, che possiedono una complementarità perfetta con l'mRNA bersaglio, esse inducono la degradazione del target. Si tratta di una modalità di regolazione predominante in piante e virus e molto rara negli animali (*Asgari e Sullivan, in: Insect Virology, 2010*).

1.6 miRNA e virus

I miRNA svolgono un ruolo importante nella regolazione di geni coinvolti in diversi processi fondamentali nello sviluppo, differenziazione, controllo della crescita cellulare e risposta immunitaria.

Non stupisce quindi che virus, organismi che normalmente utilizzano componenti cellulari dell'ospite per portare a compimento il loro ciclo vitale, possano codificare miRNA. Studi estensivi su numerose famiglie di virus hanno evidenziato l'espressione di miRNA ad opera virus con genoma a DNA. In particolare, la maggior parte dei miRNA sono stati identificati in virus

appartenenti alle famiglie *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Retroviridae*. Analisi computazionali recenti hanno però mostrato la presenza di possibili miRNA in Adenovirus e Poxvirus (Pfeffer et al., 2005).

Dal punto di vista funzionale ed evolutivo, i miRNA rappresentano per i virus un elemento di regolazione fondamentale dei propri geni ma anche dei geni dell'ospite (Cullen, 2009). Rispetto ai geni codificanti per proteine, i geni per i miRNA sono di piccole dimensioni ed occupano uno spazio limitato nel genoma virale, che in genere è di dimensioni ridotte. In aggiunta, le piccole dimensioni potrebbero facilitare un rapido adattamento di questi ncRNA a nuovi bersagli, attraverso piccole modifiche a livello della loro composizione nucleotidica. Infatti, un miRNA può avere diversi bersagli e inibire l'espressione di differenti geni contemporaneamente. Queste caratteristiche rendono i miRNA candidati ideali per il controllo delle interazioni ospite-patogeno.

Gli *Herpeviridae*, sono una larga famiglia di virus a DNA caratterizzati da un ciclo biologico in cui si distinguono due fasi: una fase di infezione criptica o latente ed una fase replicativa o litica. I primi miRNA di origine virale studiati sono stati quelli appartenenti all' EBV, un herpesvirus dell'uomo. Si tratta di miRNA che deriva da raggruppamenti genici presenti nella regione intronica del gene BART (BamHI-A region rightword transcript) ed espressi durante la fase di infezione latente (Salmon et al., 2005; Umbach et al., 2008). In particolare, i miRNA sono in grado di inibire la replicazione virale facilitando l'istaurarsi e il mantenimento della fase di infezione latente del virus (Barth et al., 2008). Similmente, il miRNA *HvAV-miR-1*, espresso dall'ascovirus *HvAV-3e* di *H.virescens*, è in grado di regolare la replicazione virale attraverso un controllo a livello genico della DNA polimerasi (Hussain et al., 2008) e di manipolare la risposta immunitaria dell'ospite durante questa fase (Cullen, 2009).

Inoltre, negli herpesvirus HSV-1 e HSV-2, è stato dimostrato che i miRNA hanno come target principale diversi geni implicati nella riattivazione del ciclo replicativo del virus, ma anche fattori trascrizionali importanti per l'espressione di molti geni virali durante l'infezione litica (Tang et al., 2008; Umbach et al.,

2008), tra cui trascritti associati a fenomeni apoptici nell'ospite (*Gupta et al. 2006*).

Recentemente, *Singh et al. (2010)* hanno identificato e caratterizzato quattro miRNA da uno specifico baculovirus di *B.mori*, *B.mori* nucleopoliedrovirus (*BmNPV*). *BmNPV* è un patogeno naturale di *B.mori* che infligge un alto tasso di mortalità nei bachi con conseguente danno economico per la l'industria della seta. Il virus mostra una localizzazione bifasica intracellulare durante l'infezione. Inizialmente si moltiplica nel nucleo e in uno stadio più avanzato si localizza nel citoplasma (*Singh et al., 2010*).

Due geni target, bro-I e bro-III, sono stati individuati rispettivamente per *bmnpv-miR-1* and *bmnpv-miR-3*. Si tratta di geni noti per essere coinvolti nei processi implicati nel passaggio nucleo-citoplasma dei virioni (*Kang et al., 2006*). Altri geni target candidati sono la fusolina, nota per la sua capacità di incrementare fortemente l'infettività via orale di diversi virus in insetti, e *lef-8* che, insieme ad altri fattori, costituisce una componente fondamentale della RNA polimerasi (*Acharya e Gopinathan, 2002*).

Tali esempi di adattamenti a simili meccanismi di regolazione della replicazione e dei processi coinvolti nell'alterazione della risposta immunitaria dell'ospite suggeriscono che i miRNA virali sono fattori con funzione determinante nel ciclo vitale dei virus.

Allo stesso tempo, gli organismi ospiti hanno però sviluppato diversi meccanismi per combattere le infezioni virali. Un meccanismo individuato, prima in pianta e poi negli invertebrati, è proprio quello del silenziamento genico o RNA silencing ad opera di ncRNA, tra cui miRNA (*Ding e Voinnet., 2007*). Studi condotti in *Drosophila melanogaster* hanno infatti dimostrato che tale meccanismo è messo in atto per generare piccoli ncRNAs, che incorporati nel complesso RISC, portano alla degradazione del genoma virale (*Zambon et al., 2006*). I ncRNA, quindi, rappresentano uno strumento di difesa contro l'infezione virale, in associazione con l'attivazione dei pathway metabolici Toll e IMD, principali responsabili della produzione di peptidi antimicrobici in *Drosophila* (*De Gregorio et al., 2002*).

Inoltre, analisi microarray condotte su miRNA da linee cellulari di fat body di *H.zea* (*Hz-miRs*), dimostrano un'espressione differenziale di miRNA cellulari in risposta ad infezione di *HvAV-3e* (*Hussain e Asgari, 2010*).

Attualmente, l'unico caso di studio riguardante la sintesi di ncRNAs in un'associazione ospite-parassitoide, è quello di *Limantria dispar-Glyptapanteles flavicoxis*. Il profilo dei miRNA cellulari differenzialmente espressi in emociti di larve, a 24h dalla parassitizzazione, ha portato all'identificazione di 27 miRNA. Analisi successive, riguardati emolinfa, corpi grassi, cervello e intestino medio, hanno evidenziato un incremento dei profili d'espressione di miRNA come conseguenza diretta della parassitizzazione (*Gundersen-Rindal e Pedroni, 2010*).

I.7 Scopo dei lavori di tesi

Le interazioni tra patogeni-parassitoidi /insetti ospiti sono oggetto di numerosi studi mirati ad individuare nuovi approcci per incrementare l'efficienza di agenti di contenimento biologico. Lo scopo è quello di progettare nuove strategie di controllo degli insetti dannosi attraverso la conoscenza/manipolazione delle complesse interazioni fisiologiche che essi instaurano con altri organismi.

In particolare, suscitano un notevole interesse i processi di risposta immune messi in atto dagli insetti ospiti contro all'attacco di patogeni/parassiti, nonché le sottili e mirate alterazioni attuate dagli organismi invasori per eludere tali risposte. Analisi filo genomiche, condotte sul sistema immunitario di svariati insetti, hanno rivelato la presenza di elementi altamente conservati (molti geni coinvolti nella ricognizione e trasduzione del segnale) ma anche di numerose categorie di geni funzionali in rapida evoluzione (geni effettori). Tuttavia, in molti casi, il coinvolgimento di ncRNA nei fenomeni associati alla risposta immunitaria non è stato ancora sperimentalmente provato.

Le interazioni tra insetti ospiti e patogeni, inclusi virus, rappresentano perciò una interessante fonte di dati per lo studio di queste molecole, apparentemente coinvolte in numerosi processi biologici.

Nulla o molto poco è noto in merito a ncRNA potenzialmente espressi da PDV. I PDV rappresentano una considerevole fonte di geni codificanti per fattori di virulenza implicati nella regolazione dell'ospite. Lo studio di tali fattori e delle complesse interazioni fisiologiche e metaboliche che si instaurano nei sistemi ospite-parassitoide potrebbe quindi fornire nuove informazioni in merito a possibili ruoli svolti da miRNA.

Scopo del seguente lavoro di tesi è quindi l'identificazione di possibili molecole di ncRNA coinvolte nell'alterazione risposta immunitaria nel sistema *Heliothis virescens-Toxoneuron nigriceps*.

Progetti di sequenziamento, eseguiti in diversi laboratori, hanno rivelato caratteristiche strutturali peculiari nei genomi di PDV, riconducibili ad organismi eucarioti piuttosto che a virus. In particolare, è emersa come tratto comune, una notevole preponderanza di ampie regioni non codificanti (circa il 70% o più dei genomi PDV). Questo suggerisce la possibile esistenza di strategie di regolazione dell'ospite basate sulla produzione di molecole ncRNA virale, in grado di modulare l'espressione genica e indurre soppressione del sistema immunitario.

Per approfondire tale ipotesi, nel caso di *TnBV*, è stata preparata una libreria specializzata di cDNA, rappresentativa della frazione di piccoli RNA presenti in emociti di larve parassitizzate.

II. MATERIALI E METODI

II.1 Allevamento degli insetti

Gli insetti utilizzati nel seguente lavoro sono stati ottenuti dall'allevamento permanente di *Heliothis virescens* - *Toxoneuron nigriceps* presso il Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri", Facoltà di Agraria, Portici, Napoli.

Le larve neosgusciate di *H.virescens* sono state isolate e allevate singolarmente in barattolini contenenti dieta artificiale, in accordo con Pennacchio *et al.* (1998b). I differenti stadi larvali del lepidottero sono stati identificati in funzione 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 regime termo-igrometrico controllato, in camera climatica a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidità relativa pari al $70\pm 5\%$ e regime fotoperiodico di 16 ore luce/ 16 ore buio.

Gli adulti di *T. nigriceps* sono stati alimentati con una soluzione al 20% w/h e mantenuti in provette singole a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidità relativa pari al $70\pm 5\%$ e fotoperiodo di 16 ore luce/ 16 ore buio. Le femmine appena sfarfallate sono state lasciate in accoppiamento per 24 h ed utilizzate per parassitizzare larve di *H. virescens* allo stadio di IV età primo giorno. Le larve parassitizzate sono state poi mantenute in camera climatica (T $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, HR $70\pm 5\%$, 16L:16D) per l'intera durata del ciclo di sviluppo del parassitoide.

II.2 Analisi bioinformatica per la predizione dei geni putativi presenti nel genoma del *TnBV*

La predizione dei geni putativi presenti nel genoma del *TnBV* è avvenuta mediante l'ausilio di diversi tool bioinformatica: GENE SCAN(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>); FGENESV (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=gfindv>) progettato principalmente per la ricerca di geni in genomi virali; FGENESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=gfind>) progettato per la ricerca di geni nei genomi virali e per la predizione di geni nei genomi di organismi Eucarioti. Esoni ed ORF predetti sono stati poi sottoposti ad analisi BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

II.3 Estrazione dell' RNA totale da emociti di larve di *H.virescens* parassitizzate.

L'RNA totale è stato estratto da emociti di 10 larve di *H. virescens* (V età primo giorno) a 12 ore dalla parassitizzazione con femmine feconde di *T. nigriceps*.

Le larve utilizzate per l'estrazione sono state alimentate con dieta artificiale e mantenute in condizioni standard di temperatura, umidità, fotoperiodo (T 29±1°C, UR 70±5%, 16L:16D).

Per la raccolta dell'emolinfa, le larve sono state anestetizzate previa immersione in acqua per qualche minuto, sterilizzazione in etanolo 70% e risciacquo in acqua dd. Dopo essere state asciugate, sono state posizionate su parafilm con il ventre rivolto verso l'alto ed incise a livello del terzo paio di zampe toraciche, con delle forbicine opportunamente sterilizzate in etanolo 70%.

Una leggera pressione sull'addome ha permesso la fuoriuscita dell'emolinfa, opportunamente prelevata (30µl di emolinfa/ larva) e raccolta in una eppendorf contenente 1ml di PBS 1X freddo, mantenuto in ghiaccio.

L'emolinfa è stata immediatamente centrifugata per 10 min a 300g, 4°C, permettendo così agli emociti di pellettare. Il sovrinatante, costituito prevalentemente da plasma, è stato eliminato ed al pellet di emociti sono stati aggiunti 400µl di TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Il quantitativo di reagente da utilizzare è stato calcolato rispettando la proporzione secondo la quale 1ml di TRI-Reagent è sufficiente per lisare 5-10⁶ cellule animali, vegetali e lievito, o 10⁷ cellule batteriche.

La risospensione del pellet è avvenuta pipettando ripetutamente il TRI-reagent e agitando su vortex il campione, garantendo così la sua completa omogeneizzazione.

Il campione omogeneizzato è stato centrifugato a 12000g, per 10 min a 4°C per rimuovere eventuale materiale insolubile (membrane extracellulari, polisaccaridi o DNA ad alto peso molecolare). Il sovrinatante, privo di impurità, è stato trasferito in una nuova eppendorf e lasciato 5 min a RT. In seguito, sono stati aggiunti 80µl di cloroformio (200 µl per ogni ml di TRI-Reagent utilizzato). La mix TRI-reagent/cloroformio è stata agitata su vortex per 15 sec, lasciata 15 min a RT e centrifugata a 12000g, per 15 min a 4°C. Il campione è risultato quindi suddiviso in tre fasi: una fase organica sottostante (contenente proteine), un'interface (contenente DNA) e una fase acquosa sovrastante (contenente RNA). La fase acquosa è stata trasferita in una nuova eppendorf, contenente 200 µl di isopropanolo freddo (0.5 ml per ogni ml di TRI-Reagent usato), e agitata su vortex. Il campione è stato poi lasciato per 10 min a RT e successivamente centrifugato a 12000g, per 10 min a 4°C. L'RNA, precipitato a formare un pellet, è stato lavato con 1ml di EtOH 75%, asciugato all'aria e in seguito risospeso 40 µl di H₂O DEPC.

Successivamente, l'RNA estratto è stato letto allo spettrofotometro per la quantizzazione e caricato su gel di agarosio all'1% per valutarne la qualità. Un RNA di alta qualità mostra una banda del rRNA 28S (a 4.5kb) di un'intensità doppia rispetto alla banda dell' rRNA 18S (a 1.8kb). Negli insetti (ordine Diptera e Lepidoptera) un'ampia frazione degli rRNA è rappresentata dall' rRNA 26S il quale, in seguito a trattamento con il calore o inizio di degradazione, spesso si dissocia in sottoprodotti 18S. L'RNA estratto da

H. virescens su gel è risultato quindi in due bande (26S e 18S) all'incirca della stessa intensità (Shine and Dalgarno, 1973). In seguito, l'RNA è stato frazionato in aliquote da 10µg, conservate a -80°C in precipitazione con Sodio Acetato 0.3M e 3 volumi di EtOH 100%.

II.4 Preparazione di una libreria di piccoli RNA a partire da RNA estratto da emociti di larve parassitizzate.

La libreria è stata preparata secondo il protocollo di estrazione dell'Illumina che permette la purificazione, a partire da RNA totale, di cDNA rappresentativi della frazione di RNA a basso peso molecolare.

I piccoli RNA sono stati selezionati sulla base della loro lunghezza (18-30 nucleotidi) e recuperati da gel denaturante tramite taglio di una banda corrispondente alla lunghezza nucleotidica di interesse.

La libreria è stata preparata a partire da un' aliquota di 10µg di RNA totale estratto da emociti di larve di *H. virescens* a 12 ore dalla parassitizzazione.

L'RNA, prelevato direttamente dal -80°C, è stato centrifugato a 12000g, per 15 min a 4°C. Il pellet ottenuto è stato lavato con 1ml di EtOH 75% freddo, centrifugato (12000g, 10 min, 4°C), asciugato e risospeso, in ghiaccio, in 10µl di acqua extra pura (da kit dell'Illumina).

Tutto il materiale necessario per l'assemblaggio del gel e per la corsa elettroforetica è stato lavato con una soluzione di SDS 1%-NaOH 1M, mentre tutte le soluzioni impiegate sono state preparate utilizzando H₂O DEPC.

Il gel è stato ottenuto per polimerizzazione di una soluzione di TBE 1X, Urea 8M e acrilamide 15%. In seguito a polimerizzazione del gel, è stata avviata una precorsa di 30 min in TBE 1X, 200V.

Prima di essere caricati, i campioni sono stati denaturati a 65°C per 5 min e messi in ghiaccio per qualche minuto per bloccare i processi di rinaturazione dell'RNA. Successivamente stato è stata avviata una corsa di 1h a 200V. Oltre al campione di RNA, sul gel sono stati caricati tre marcatori di peso molecolare, SRA ladder 20-100 basi (**Fig 5**), UDP 31b e GFP 20b, per

permettere di delimitare l'intervallo di peso molecolare entro cui recuperare la banda di gel contenente gli RNA a basso peso.

Una volta rimosso dall'apparato per la corsa elettroforetica, il gel è stato lasciato in agitazione in una soluzione TBE1x/Bromuro di Etidio per 2 min. Con l'ausilio di uno scalpel, è stata tagliata una banda di gel in un intervallo di peso compreso tra 18-30bp.

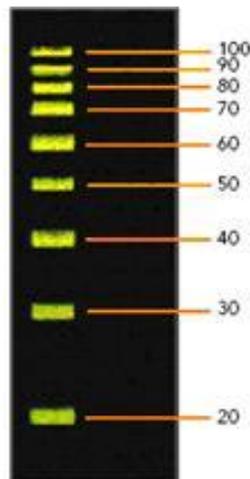


Fig 5. SRA ladder

La slide di gel recuperata è stata frammentata attraverso il passaggio in un'epENDORF 0.5ml, precedentemente forata con un ago arroventato, poggiata in un tubo da 2ml come mostrato nelle Fig 6.



Fig 6. Eppendorf da 0.5 ml forata con ago arroventato e poggiata in un tubo da 2ml

Le due eppendorf, così sistemate, sono state centrifugate per 2 min a 14000 rpm. Ai frammenti di gel ottenuti sono stati aggiunti 300 μ l di una soluzione 0.3M NaCl (da kit dell'Illumina). Il campione è stato lasciato su dispositivo rotante, a RT per 4h, per permettere la completa eluizione dell'RNA.

Successivamente, frammenti di gel e soluzione di eluizione sono stati trasferiti su di un filtro di cellulosa (Spin X cellulose acetate filter) e centrifugati per 2 min a 14000 rpm.

All'eluato è stato aggiunto 1 μ l di glicogeno e 750 μ l di EtOH 100% a RT. Il tutto è stato incubato a -80°C per 30 min e successivamente centrifugato a 14000 rpm per 25 min a 4°C .

Dopo aver eliminato il sovrantante, il pellet è stato poi lavato con 750 μ l di EtOH 75% a RT, asciugato, risospeso in 5.7 μ l di acqua extrapura (da kit Illumina) e lasciato in ghiaccio per 5 min.

Al campione, trasferito in una eppendorf da 0.5ml, sono stati poi aggiunti 1,3 μ l di 5'adapter (da kit), 1 μ l 10x T4 RNA ligasi buffer (da kit), 1 μ l RNase OUT(da kit) e 1 μ l T4 RNA ligasi (da kit). Il tutto è stato poi incubato a 20°C per 6h e lasciato O/N a 4°C .

La reazione di ligasi è stata fermata mediante l'aggiunta di 10 μ l di SRA gel loading dye (da kit) e l'RNA, a cui è stato aggiunto un adapter all'estremità 5', è stato caricato su un gel TBE 1X, Urea 8M e acrilamide 15% (lasciato precorrere per 30 min, come descritto in precedenza).

Tutti i campioni da caricare (RNA e i tre marcatori molecolari descritti in precedenza) sono stati preriscaldati a 65°C per 5 min e successivamente messi in ghiaccio per qualche minuto. Il gel è stato caricato e lasciato correre per 1h a 200V.

Successivamente il gel è stato rimosso dall'apparato per la corsa elettroforetica e lasciato in agitazione in una soluzione TBE/Bromuro di etidio per 2 min. Con l'ausilio di uno scalpel è stata tagliata una banda di gel in un intervallo di peso compreso tra 40-60 nucleotidi.

Il gel recuperato è stato frammentato ed eluito con 300 μ l di una soluzione 0.3M NaCl (da kit dell'Illumina) per 4h su dispositivo ruotante, a RT. Soluzione di eluizione e frammenti di gel sono stati poi trasferiti su di un filtro di cellulosa (Spin X cellulose acetate filter) e centrifugati per 2 min a 14000rpm. All'eluato è stato aggiunto 1 μ l di glicogeno e 750 μ l di EtOH 100% a RT. Il tutto è stato incubato a -80°C per 30 min e successivamente centrifugato a 14000rpm per 25 min a 4°C . Dopo aver eliminato il

sovranatante, il pellet è stato poi lavato con 750 μ l di EtOH 75% a RT, asciugato, risospeso in 6.4 μ l di acqua extrapura (da kit Illumina) e lasciato in ghiaccio per 5 min.

Al campione, trasferito in una eppendorf da 0.5ml, sono stati poi aggiunti 0.6 μ l di 3'adapter al (da kit), 1 μ l 10x T4 RNA ligasi buffer (da kit), 1 μ l RNase OUT (da kit) e 1 μ l T4 RNA ligasi (da kit). Il tutto è stato poi incubato a 20°C per 6h e lasciato O/N a 4°C.

La reazione di ligasi è stata fermata mediante l'aggiunta di 10 μ l di SRA gel loading dye (da kit) e l'RNA, ora dotato di un adapter al 5' ed uno al 3', è stato caricato su un gel TBE 1X, Urea 8M e acrilamide 10% (lasciato precorrere per 30 min, come descritto in precedenza).

I campioni a caricare (RNA e i tre marcatori molecolari descritti in precedenza) sono stati preriscaldati a 65°C per 5 min e successivamente messi in ghiaccio per qualche minuto. Il gel è stato lasciato correre per 1h a 200V. Successivamente il gel è stato rimosso dall'apparato per la corsa elettroforetica e lasciato in agitazione in una soluzione TBE/Bromuro di etidio per 2 min.

Con l'aiuto di uno scalpel è stata tagliata una banda di gel in un intervallo di peso compreso tra 70-90 nucleotidi. Il gel recuperato è stato frammentato e eluito con 300 μ l di una soluzione 0.3M NaCl (da kit dell'Illumina) per 4h su dispositivo ruotante, a RT. Soluzione di eluizione e frammenti di gel sono stati poi trasferiti su di un filtro di cellulosa (Spin X cellulose acetate filter) e centrifugati per 2 min a 14000rpm. All'eluato è stato aggiunto 1 μ l di glicogeno e 750 μ l di EtOH 100% a RT. Il tutto è stato incubato a -80°C per 30 min e successivamente centrifugato a 14000rpm per 25 min a 4°C. Dopo aver eliminato il sovrinatante, il pellet è stato poi lavato con 750 μ l di EtOH 75% a RT, asciugato, risospeso in 4.5 μ l di acqua extrapura (da kit Illumina) e 0.5 μ l di RT primer. Il campione (5 μ l) è stato preriscaldato a 65°C per 10 min e in seguito lasciato in ghiaccio.

Successivamente, sono stati aggiunti 4 μ l di una mix composta da: 2 μ l first strand buffer, 0.5 μ l 12.5mM dNTP mix (0.5 μ l acqua extra pura + 0.5 μ l 25mM dNTP mix), 1 μ l 100mM DTT e 0.5 μ l RNase OUT, per un volume totale di 9 μ l. La mix così ottenuta è stata preriscaldata a 48°C per 3 min ed è stato

aggiunto 1µl di SuperScript II Reverse Transcriptase (volume totale 10µl). La reazione di reverse trascrittasi è stata incubata a 44°C per 1h.

10µl della reazione di RT sono stati poi mixati con 40µl di una PCR master mix composta da: 28µl di acqua extra pura, 10µl di 5x Phusion HF buffer, 0.5µl di primer GX1, 0.5µl di primer GX2, 0.5µl di 25mM dNTP mix, 0.5µl Phusion DNA Polymerase. L'amplificazione è stata poi avviata secondo il seguente protocollo :

- a. 30 sec a 98°C
- b. 15 cicli di:
 - 10 sec a 98°C
 - 30 sec a 60°C
 - 15 sec a 72°C
- c. 10 min a 72°C
- d. 4°C for ever.

Il prodotto della PCR (50µl), a cui sono stati poi aggiunti 10µl di 6x DNA loading dye (Ficol Type 400 18%, TBE 10X, BBF 0,12%, XC 0,12%), è stato caricato su gel di acrilamide al 6% non denaturante. In questo caso su gel è stato caricato un marker di peso molecolare, con un range in peso di 25-2652bp (Fig 7), che permettesse il recupero di una banda di dimensioni di circa 92pb.

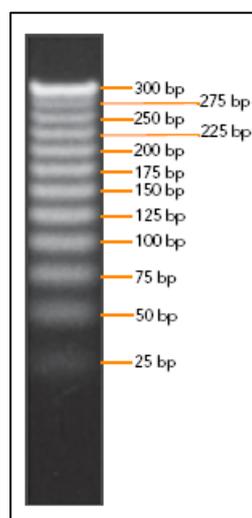


Fig 7. 25 bp ladder

La slide di gel è stata messa frammentata come descritto in precedenza e centrifugata per 2 min a 14000rpm a 4°C. I frammenti di gel così ottenuti sono stati poi eluiti con 100 µl di 1x gel elution buffer (da kit) e lasciati in agitazione, su dispositivo rotante, per 2 h a RT. L'eluato e i frammenti di gel sono stati poi trasferiti su di un filtro (Spin X filter) e centrifugati per 2 min a 14000 rpm a 4°C. All'eluato così raccolto sono stati aggiunti 1µl di glicogeno, 10µl di 3M sodio acetato e 325µl di EtOH 100% raffreddato a -20°C. Il tutto è stato immediatamente centrifugato a 14000 rpm per 20 min a 4°C. Il sovranatante è stato eliminato ed il pellet lavato con 500µl di EtOH 70% a RT, asciugato e risospeso in 10µl di resuspension buffer (da kit). La libreria di cDNA così ottenuta è stata poi conservata a -80°C.

II.5 Controllo qualitativo della libreria di cDNA da emociti di larve parassitizzate.

II.5.1 Clonaggio in pCR4Blunt-TOPO vector

Per valutare qualitativamente la libreria rappresentativa della frazione di piccoli RNA derivanti emociti di larve di *H. virescens* a 12 dalla parassitizzazione, una piccola quantità di cDNA è stato clonato nel vettore pCR4Blunt-TOPO. Tale vettore è stato scelto in quanto caratterizzato da alta efficienza nella strategia di clonaggio per diretta inserzione nel plasmide di prodotti caratterizzati da estremità blunt, come i putativi piccoli ncRNA presenti nella libreria.

La reazione di clonaggio è stata assemblata mixando gentilmente 3µl di acqua sterile, 1µl di cDNA, 1µl di soluzione salina e 1µl di vettore. La mix è stata incubata per 20 min a RT e per almeno 1 min in ghiaccio.

La trasformazione è avvenuta aggiungendo ad un tubo (50µl) di cellule competenti, One Shot®TOP 10 Chemically Competent *E. coli*, 2µl della reazione di clonaggio. Le cellule, in fase di trasformazione, sono state incubate

in ghiaccio per 30 min ed in seguito sottoposte ad heat-shock per 30 sec a 42°C, con successiva rapida immissione in ghiaccio per qualche minuto.

Alle cellule competenti, così trasformate, sono stati aggiunti 250µl di S.O.C. medium equilibrato a RT. Il tutto è stato lasciato in agitazione a 200rpm per 1h a 37°C.

Successivamente, le cellule sono state distribuite in concentrazioni diverse su piastre LB-agar 1,5% + ampicillina (50µg/ml), preriscaldate a 37°C).

Le colonie, ottenute in seguito a incubazione delle piastre O/N a 37°C, sono state inoculate in 5ml LB + ampicillina (100µg/ml) e lasciate in agitazione O/N a 37°C.

Le colture batteriche così cresciute sono state sottoposte a lisi alcalina mediante SDS per permettere la raccolta del DNA plasmidico (da MANIATIS, Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

Il DNA plasmidico è stato trattato con una mix di RNasiT1/RNasiA per eliminare eventuali tracce di RNA contaminante e purificato mediante soluzione PEG (glicol polietilene). Tale purificazione ha permesso, grazie all'alta concentrazione salina della soluzione impiegata, di precipitare selettivamente il DNA plasmidico di elevato peso molecolare e di lasciare nel sovrinatante piccoli frammenti contaminanti di DNA ed RNA eventualmente non eliminato tramite RNasi.

Una piccola quantità del DNA plasmidico, per ogni singola preparazione, è stata digerita con l'enzima EcoR1, i cui siti di taglio sono situati a monte e a valle del punto di inserzione dei frammenti clonati.

I campioni digeriti sono stati poi analizzati mediante corsa elettroforetica per accertare la presenza delle bande di dimensione attese: plasmide (3956pb) e inserto (adapter al 5'+ putativo piccolo ncRNA + adapter al 3' = 90pb).

I cloni che hanno dato esito positivo sono stati sequenziati, presso la Primm Biotech, utilizzando i primer "T3 priming site" e "M13 forward priming site", così come indicato nella mappa del plasmide nella Figura 8.

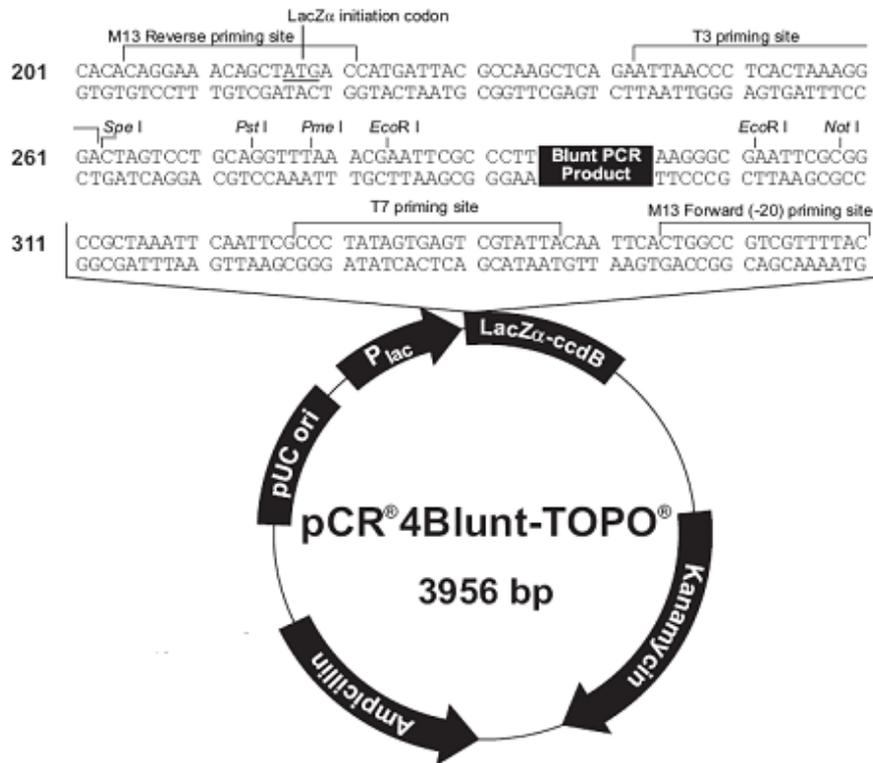


Fig 8. pCR4Blunt-TOPO Map

II.5.2 Real time PCR: quantificazione assoluta

La quantificazione dei putative piccoli ncRNA presenti nella libreria di cDNA da emociti di larve parassitizzate è stata eseguita mediante Real-Time qPCR con il sistema “Applied Biosystems 7900HT quantitative PCR”. Per rilevare i prodotti di PCR è stato utilizzato il SYBR-Green, agente intercalante e fluorescente dei dsDNA.

A partire da 0,5µl cDNA della libreria, sono state preparate 4 diluizioni (1:2.000, 1:20.000, 1:200.000, 1:2.000.000) ognuna analizzata in duplice copia. La reazione è stata assemblata seguendo il protocollo standard dell’Applied Biosystem's 7900HT Sequence, aggiungendo 1µl di templat, a 24µl di una mix composta da 2x SYBR green PCR, 400 nM dei primer GX1 (5’-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3’) e GX3 (5’GACCACCGACAGG TTCAGAGTT-3’) ed acqua dd fino ad un volume totale di 25 µl.

Il profilo termico delle reazioni è stato: un ciclo a 95°C per 10 minuti seguito da 40 cicli di 95°C per 15 sec e 60°C per 1 min. Dopo l'amplificazione, un'analisi delle curve di melting è stata eseguita per determinare la specificità dei prodotti di PCR. Questi ultimi, sono stati incubati per 1 minuto a 95° C con ritorno a 55° C ad una velocità di 0.2°C/sec. seguiti da 81 cicli di incubazione dove la temperatura aumentava di 0,5 °C/ciclo, con inizio a 55°C e fine a 95°C. Controlli negativi (no trascrittasi inversa e no templat) sono stati inclusi in ogni esecuzione della reazione e non hanno fornito prodotti.

La quantità assoluta del target è stata determinata interpolando i Ct risultanti con la curva standard assoluta. La costruzione della curva per la quantificazione assoluta è avvenuta utilizzando come standard il vettore di clonaggio, descritto precedentemente (pCR4Blunt-TOPO), nel quale è stata clonata una piccola quantità di cDNA della libreria da larve parassitizzate e per il quale è stata accertata, mediante sequenziamento, la presenza dell'inserito di dimensioni attese. Il numero di copie del DNA plasmidico ricombinante è stato calcolato in base alla concentrazione molare e la massa molecolare dello stesso [N.° copie = (concentrazione di DNA) × (volume della reazione) × (n.° di Avogadro, $6,022 \times 10^{23}$ molecole/mole)/(massa molare del plasmide ricombinante)]. Sei diluizioni seriali a concentrazione nota del DNA plasmidico (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 molecole) sono state sottoposte a SYBR-Green qPCR. Ogni campione è stato analizzato in duplice copia. Per valutare la relazione tra i valori di Ct ed il numero di copie di target standard è stata utilizzata la regressione lineare. L'efficienza di amplificazione (E), dipendente dalla pendenza della curva standard è stata calcolata in base alla seguente formula: $E=10(-1/slope)-1$. Tutti i risultati sono stati espressi come media e deviazione standard delle copie assolute di target analizzati.

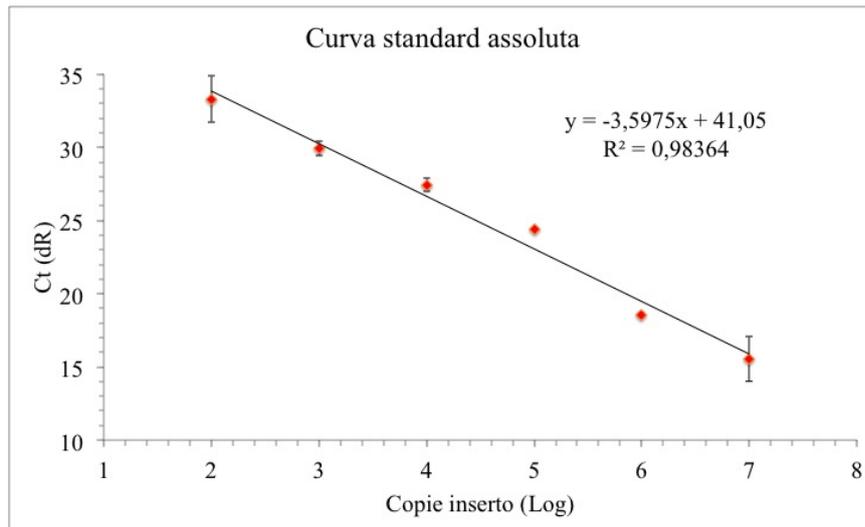


Fig. 9 Curva standard assoluta per le librerie di piccoli ncRNA. Sono state analizzate con RealTime qPCR sei diluizioni seriali di DNA plasmidico risultante dal clonaggio di una piccola aliquota della libreria di piccoli ncRNA da larve parassitizzate nel vettore pCR4Blunt-TOPO (10^7 - 10^2 copie). \blacklozenge = SYBR Green standard; $Y = -3,60 \cdot \text{Log}(X) + 41,05$; $R^2 = 0,9725$; $E = 90\%$.

II.6 Sequenziamento libreria piccoli ncRNA

La libreria di cDNA ottenuta da emociti di larve parassitizzate è stata sequenziata tramite piattaforma Illumina/ Solexa Genome Analyzer, presso l'Istituto di Genomica Applicata di Udine. Tale piattaforma è stata scelta in quanto appartiene ad una nuova generazione di tecnologie di sequenziamento che trova diversi campi d'applicazione. Inoltre, permette sequenziamenti rapidi e in larga scala, con l'ottenimento di quantità massive di sequenze di DNA lette in parallelo.

II.7 Analisi bioinformatiche

I putativi piccoli ncRNA sequenziati, sono stati allineati con il genoma completo del *TnBV*, ottenuto presso i nostri laboratori. L'allineamento è stato effettuato presso l'Istituto di Genomica Applicata di Udine, utilizzando il software FAST (Fast Aligning of Short Tags) messo a punto dallo stesso istituto.

La seguente analisi bioinformatica è stata eseguita solo su quelle sequenze, derivanti dal genoma del virus, di dimensione compresa tra 18-30 nt.

I putativi piccoli ncRNA sono stati sottoposti ad analisi **BLAST** (The Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per verificare eventuali omologie con sequenze note presenti in database. Inoltre, gli stessi sono stati confrontati anche con **miRBase**, la banca dati “ufficiale” per i miRNA (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), nella quale sono immagazzinate tutte le informazioni in merito a miRNA noti (sequenze dei miR maturi, sequenze dei precursori, struttura secondaria dei precursori ed eventuali target).

Per ogni putativo piccolo ncRNA identificato, è stata stabilita la collocazione all'interno dei circoli virali, calcolando anche l'esatta posizione rispetto a geni noti e ORF di dimensioni superiori alle 150pb. Sono state selezionate soltanto le sequenze presenti negli introni di geni noti e quelle distanti almeno 200pb da geni noti/ ORF. Questo criterio è stato stabilito allo scopo di individuare le sole sequenze poste al di fuori delle regioni codificanti e sufficientemente distanti dalle regioni 5' e 3' non tradotte.

Considerando che i microRNA sono gli unici piccoli RNA non codificanti che possono essere discriminati in funzione della caratteristica struttura a “stem-loop” dei loro precursori, il genoma del *TnBV* è stato sottoposto ad analisi computazionale dello struttura secondaria. L'analisi è stata condotta con l'ausilio tool bioinformatico **MirEval** (<http://tagc.univ-mrs.fr/mirava>) (*Ritchie et al., 2008*) allo scopo di individuare regioni dei circoli virali in grado di generare precursori con caratteristiche strutturali tipiche dei primi miRNA.

Quindi, i putativi ncRNA selezionati dalla libreria sono stati analizzati allo scopo di individuare le sole sequenze in grado di appaiarsi con le regioni genomiche del *TnBV* selezionate tramite MirEval.

La struttura secondaria dei precursori derivanti dalle regioni selezionate è stata disegnata tramite il tool on-line MFold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>) (Zuker, 2003). Delle strutture considerate plausibili sono state scelte soltanto quelle nelle quali i putativi miRNA fossero collocati nella regione a doppio filamento della struttura a “stem-loop” e non in quella a filamento singolo del “loop”.

II.8 Analisi trascrizionale dei putativi microRNA

Le regioni genomiche da cui hanno origine i precursori dei putativi microRNA selezionati (pri-miRNA104, pri-miRNA78, pri-miRNA23 e pri-miRNA97) sono state sottoposte ad analisi trascrizionale.

Un'aliquota da 10µg di RNA totale, estratto da emociti di larve parassitizzate, è stata prelevata dal -80°C e centrifugata al max delle g, per 15 min a 4°C. Il pellet ottenuto è stato lavato con EtOH 75% in H₂O DEPC e centrifugato per 10 min a 4°C, al max delle g. Una volta eliminato il surnatante, l'RNA pellettato è stato asciugato, risospeso in 44µl di H₂O DEPC ed incubato con Turbo DNase (Ambion) per 30 min a 37°C. Il campione è stato quindi sottoposto per due volte ad estrazione con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) per disattivare la DNasi ed eliminare eventuali impurità presenti. L'RNA derivante dall'estrazione è stato precipitato con Na Ac. 0,3M, 3Vol di EtOH 100% e lasciato 10 min in bagnetto di ghiaccio secco/alcool denaturato.

Il campione è stato quindi centrifugato al max delle g, per 15 min a 4°C, lavato con EtOH 75% in DEPC e risospeso in 30µl di H₂O DEPC.

L'RNA è stato in seguito quantizzato mediante lettura al spettrofotometro e sottoposto a PCR di controllo per verificare l'eventuale presenza di DNA contaminante. Brevemente, 150ng di RNA sono stati aggiunti in 24µl di una mix composta da 2,5µl di 10X Reaction buffer, 0,75µl di 50mM MgCl₂, 1µl

10 μ M primer 124cirR, 1 μ l 10 μ M primer 154FP, 1 μ l di 5mM dNTP, 0,125 μ l di 5u/ μ l di EuroTaq e H₂O per portare a volume. Come controllo positivo sono stati utilizzati 2 μ l di DNA genomico del *TnBV*. La reazione è stata amplificata secondo il seguente programma:

- a. 5 min a 95°C
- b. 40 cicli di:
 - 10 sec a 94°C
 - 30 sec a 54°C
 - 1 min a 72°C
- c. 10 min a 72°C
- d. 4°C for ever.

Dopo aver verificato l'assenza di contaminazioni, il campione di RNA è stato sottoposto a reazione di reverse trascrittasi. In particolare, sono state allestite 3 reazioni:

1. 2 μ g di RNA+2 μ l di dNTP 5mM +1 μ l di 50 μ M oligo dT;
2. 2 μ g di RNA+2 μ l di dNTP 5mM +1 μ l di 50 μ M oligo dT^(*);
3. 2 μ g di RNA+2 μ l di dNTP 5mM +1 μ l di pd(N)₆ (250ng/ μ l);

I primi due campioni sono stati retro trascritti utilizzando come primer gli oligo dT, mentre per il terzo campione la reazione è avvenuta utilizzando gli esameri pd(N)₆.

Successivamente, i tre campioni sono stati denaturati a 65°C per 5 min, lasciati in ghiaccio per almeno un minuto e centrifugati brevemente. In seguito sono stati aggiunti 4 μ l di 5X First-Strand Buffer, 1 μ l di 0.1 M DTT; 1 μ l di RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor, 1 μ l di SuperScript III RT (200 units/ μ l). Uno dei due campioni con gli oligo dT (*) è stato utilizzato come controllo negativo dell'RT, per cui non è stata aggiunta la SuperScript III RT, sostituita con 1 μ l di H₂O. I campioni con gli oligo dT sono stati pre-incubati 5 min a 42°C, mentre per il campione con i pd(N)₆ la pre-incubazione è avvenuta a 25°C per 5 min. Tutte le reazioni assemblate sono state poi incubate a 55°C per 1h ed in seguito a 75°C per 15 min, per disattivare la reazione.

Per tracciare il profilo trascrizionale dei putativi pri-miRNA, i cDNA ottenuti sono stati amplificati con le coppie di oligo indicate nella tabella 3.

Per essere sicuri di analizzare i pri-miRNA, gli oligo impiegati sono stati disegnati considerando un amplificato di circa 150-200 pb che comprendesse la sequenza dei putativi miRNA maturi.

Putative miRNAs	Primer names	Primer sequences
miR-23	pri-23 forw	5'-ACTGTCTATGAGACATTCAT-3'
	pri-23 rev	5'-GGTGATACTGCTAGAATATC-3'
miR-78	4(111)T2	5'-TTCCTATGATGACAGTAC-3'
	pri-78rev	5'-GGTGTATTGACAAAGATG-3'
miR-97	53P2	5'-AGCTCTCGTAATCACTTA-3'
	pri-97rev	5'-TAACACATTTCTGTGACC-3'
miR-104	124cirR	5'-AATAACACCGACTACAGC-3'
	154FP	5'-AGATCATTTCGAATTCCTT-3'

Tab 3. Coppie di primers utilizzate per l'analisi trascrizionale dei putativi pri-miRNA selezionati

II.9 Analisi trascrizionale dei putativi piccoli ncRNA e di regioni del genoma del *TnBV* selezionate random.

Un profilo trascrizionale è stato tracciato anche per le regioni del genoma del *TnBV* dove sono stati individuati alcuni dei restanti putativi piccoli RNA non codificanti selezionati. Allo stesso modo, sono state analizzate delle regioni dello stesso genoma prive di ORF/geni codificanti per proteine e di qualsiasi sequenza della libreria.

I cDNA impiegati sono stati preparati ed amplificati secondo le condizioni riportate nel paragrafo precedente.

Per l'analisi trascrizionale dei putativi ncRNA, sono state disegnate coppie di oligo in grado di amplificare regioni di 150-300pb (**Tab 4**), mentre per l'analisi delle regioni selezionate random sono stati scelti oligo che amplificano porzioni del genoma del *TnBV* più ampie, di dimensione compresa tra le 300-700 pb (**Tab 5**)

Tab 4. Primers amplificanti alcuni dei piccoli ncRNA selezionati nella libreria

Circoli	Putativi piccoli ncRNAs	Primer	Sequenza dei primer
34	Small ncRNA 27	SR27a SR27b	5'-CCGTTACGTTTCGTGAATA-3' 5'-GATACACATTCATAGGGATGC-3'
	Small ncRNA 128	SR128a SR128b	5'-TGTTCAATAGTTTATGGTCTG-3' 5'-ACTTCATTGGAATATCTGC-3'
	Small ncRNA 91	SR91a SR 91b	5'-CGTGAATAACAGAGTTACTG-3' 5'-GCAGATATCCAATGAAGT-3'
35	Small ncRNA 11	SR11a SR11b	5'-TAGCATTGTAGTGGAAAGTCA-3' 5'-CTCAACTATTTGGACACCTTC-3'
	Small ncRNA 79	SR79a 35T2 rev	5'-TTATACAGTCACCTACGAAGAGG-3' 5'-CTCAATCTGTTTCATCACAAC-3' –
44	Small ncRNA 4	SR4b 44F rev	5'-ACTGTATATGGCTTACGATT-3' 5'-GACGAATGTGGTACAGAG-3'
	Small ncRNA 122	SR122a SR122b	5'-GTATCTCGAATTTCTCAATGTG-3' 5'-TACTGTTGTTGCACATGATATG-3'
47	Small ncRNA 96	SR100-96a SR100-96b	5'-CGCTGAAAGTGATACACC-3' 5'-TCGACAACCTCATTACAGCA-3'
	Small ncRNA 14	SR14a SR14b	5'-AACCGTGTGTCTAGTTCGTA-3' 5'-GCTGTTGTGATACGGTGTAAAT-3'
	Small ncRNA 121	SR121a SR121b	5'-AATACAGGCCTCCCACTT-3' 5'-GAGTTCACAGACTCCATCG-3'
	Small ncRNA 70	SR70-139a SR70-139b	5'-GGTTTGTTTATTCACTAAATGGA-3' 5'-CCTAAATCTCTTACAGCAGC-3'

Tab 5. Primers amplificanti regioni del genoma del *TnBV* selezionate random.

Circoli	Primer	sequenze Primer
133	133cirP	5'-AACGACCATTCTGATTCA-3'
	1cirR	5'-ATGGTGAGCACTTGATAG-3'
81	11B	5'-TGGCTTTCTGAAGTATGA-3'
	11T2	5'-CCTGGGATTATTAGATTC-3'
87	87cirP	5'-TTGGCAAGTACTTCACCA-3'
	87cirR	5'-TCCTGATTGACAATGTGG-3'
	87B	5'-CCATATTTAGCAACTCTC-3'
	87T5	5'-GACCATGAATGTAAACCA-3'

III. RISULTATI

III.1 Analisi della composizione genica del *TnBV*

Recentemente nel nostro laboratorio è stato portato a termine il sequenziamento del genoma del bracovirus associato a *Toxoneuron nigriceps* (*TnBV*). Tale genoma ha una dimensione complessiva di 203,236 Kb, suddivise in 28 circoli di dimensioni comprese tra 3,957 e 13,396 Kb.

Le sequenze virali sono state sottoposte ad analisi bioinformatiche per ricercare omologie di sequenza con altri PDVs, nonché per identificare sequenze codificanti per putativi prodotti proteici.

In particolare, analisi BLAST hanno permesso di identificare 42 geni putativi, variamente distribuiti nei circoli virali (**Tab 1 e Fig 10**).

Tab 6. Geni putativi identificati nel genoma del *TnBV*

Geni	N° di geni	Funzioni proteiche predette
Geni per proteine tirosino fosfatasi (PTPs)	16	Componenti di vie di trasduzione del segnale
Geni per proteine contenenti domini ripetuti di Ankirina (IKB like)	4	Inibitori di fattori trascrizionali NF-KB
Geni per proteine ipotetiche	4	sconosciuta
Geni per proteine ipotetiche con domini BEN e PHAO	11	sconosciuta
Geni per Trasportatori UDP-zuccheri	2	Legano e trasportano UDP- carboidrati
Geni per UDP Glucosio 6 fosfato deidrogenasi	1	Coinvolte nella via metabolica del fosfogluconato
Geni per Aspartil proteasi	1	Azione peptidasica
Geni per DNA Elicasi	1	Srotolano la struttura a doppia elica del DNA
Geni per putativi omologhi della proteina CG2206-PA di <i>Nasonia vitripennis</i>	1	sconosciuta
Geni per trasportatori di tipo MFS	1	Trasportano ioni, zuccheri, peptidi, aminoacidi e neurotrasmettitori nel citoplasma

Molti dei geni del *TnBV* appartengono a specifiche famiglie geniche, presenti anche in altri bracovirus. (**Tab 6**).

La famiglia genica più ampia comprende 16 membri codificanti per putative Proteine Tirosino Fosfatasi (PTP). Le PTP sono note svolgere ruoli chiave in diverse vie di trasduzione del segnale ed operano attraverso la

defosforilazione di residui di tirosina di varie componenti proteiche (*Andersen et al., 2001*).

Le PTP del *TnBV* sono classiche PTP citosoliche e sono codificate da geni privi di introni. Unica eccezione è rappresentata da un gene localizzato nel circolo 47, per il quale sono stati individuati 3 introni.

La seconda famiglia genica identificata nel genoma del *TnBV* comprende 4 membri distribuiti in tre circoli (93, 139 e 6057). Tali geni codificano per proteine caratterizzate dalla presenza di domini ripetuti di anchirina che mostrano omologia con proteine I κ B presenti sia negli insetti che nei vertebrati.

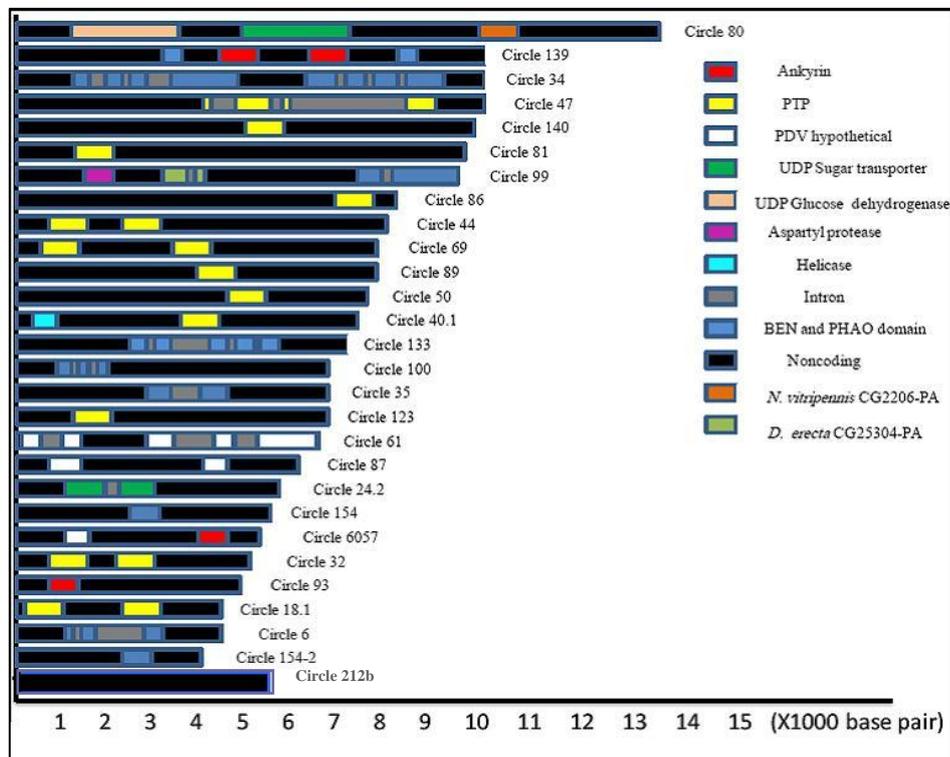


Fig 10. Distribuzione dei geni putativi identificati nei circoli del *TnBV*

La terza famiglia genica comprende due geni localizzati in due differenti circoli (80 e 24.2), codificanti per proteine trasportatrici di UDP-zuccheri.

Accanto alle famiglie geniche, il genoma del *TnBV* contiene geni presenti in singola copia. Quattro di essi, localizzati in tre differenti circoli (99, 80 e 40.1), codificano per proteine che mostrano omologia di sequenza con

proteine note in altri organismi. Si tratta di una putativa aspartil proteasi, una putativa UDP glucosio 6 fosfato deidrogenasi, un putativo trasportatore appartenente alla famiglia dei trasportatori MFS (Major Facilitator Superfamily) e una putativa DNA elicasi (**Tab 6**).

Sono stati inoltre individuati 15 geni putativi codificanti per prodotti privi di somiglianza con proteine a funzione nota. Quattro di questi geni, codificanti per proteine ipotetiche di dimensione compresa tra 74 e 451 amminoacidi, sono distribuiti nei circoli 61, 87 e 6057. I rimanenti undici geni putativi codificano per proteine di dimensioni comprese tra 74 e 819 amminoacidi, contenenti due particolari domini (BEN e PHAO), presenti anche in proteine derivanti da altri polidnavirus, ma a funzione ancora sconosciuta.

Infine, un gene identificato nel circolo 80 codifica per un prodotto che mostra una significativa omologia di sequenza con una proteina di *Nasonia vitripennis* (CG2206-PA), di cui, tuttavia, non è nota la funzione.

Per quanto riguarda la struttura, 11 geni, corrispondenti al 26% del numero totale di geni identificati nel genoma del *TnBV*, contengono uno o più introni. In particolare, 8 di questi geni appartengono al gruppo di geni codificati per proteine con domini BEN e PHAO, cui si aggiungono uno dei due geni codificanti per trasportatori di UDP-zuccheri, il gene codificante per un trasportatore secondario appartenente alla famiglia MFS, ed uno dei geni codificanti per PTP che rappresenta un'eccezione rispetto alle PTP tipiche dei bracovirus, le quali generalmente non contengono introni.

Tab 7. Caratteristiche dei geni putativi selezionati nei circoli virali del *TnBV*

Circoli	Posizione dei Geni (bps)	N. di esoni	Amino acidi	Similarità con le sequenze presenti in database (protein ID), identità di sequenza amminoacidica espressa in %	Nome dei geni (per PTPs e geni Ank)
123	1507-2400+	1	297	C. glomerata bracovirus PTP AAR99279.1, 39% (114/290)	TnBV123PTP1
133	3020-6010+	5	819	Geni per proteine ipotetiche ORF301 [<i>Cotesia plutellae</i> polydnavirus], domini BEN e PHAO2737, AAZ04269.1, 35%(219/689) (PDV H.P. BEN/PHAO)	
139	3535-3771	1	78	Gene per proteine ipotetiche	

				CcBV_20.2 [Cotesia congregata bracovirus], domini BEN e PHAO2737, YP184853, 37%(26/70) (PDV H.P. BEN/PHAO)	
	5310-5831+	1	173	Ankirina virale [Glyptapanteles indiensis], ACE75454.1, 38%(56/147) (TnBV Ank1)	TnBV139Ank1
	6428-6934+	1	168	GfV-B29-ORF1 [Glypta fumiferanae ichnovirus, YP001029373.1, 33%(55/166)	TnBV139Ank2
	8962-9219+	1	85	Geni per proteine ipotetiche conservate [Glyptapanteles indiensis], dominio PHAO2744, ACE75406.1, 32%(24/75) (PDV H.P. PHAO)	
140	5107-5997+	1	296	PTP 2 Microplitis demolitor bracovirus, YP239391.1, 28%(82/290)	TnBV140PTP1
154	2083-2442+	1	119	Geni per proteine ipotetiche GFP_L2_0020 [Glyptapanteles flavicoxis bracovirus], PHAO 2747 super family, ACE75228.1, 25%(18/71) (PDV H.P. PHAO)	
154-2	2083-2442+	1	119	Geni per proteine ipotetiche GFP_L2_0020 [Glyptapanteles flavicoxis bracovirus], PHAO 2747 super family, ACE75228.1, 25%(18/71) (PDV H.P. PHAO)	
34	2215-4927+	4	678	Geni per proteine ipotetiche [Glyptapanteles flavicoxis bracovirus], domni BEN e PHAO2737, ACE75243.1, 31%(126/378)(PDV H.P. BEN/PHAO)	
	6690-8465+	4	432	Geni per proteine ipotetiche [Glyptapanteles flavicoxis bracovirus], dominio BEN, ACE75153.1, 44%(92/216) (PDV H.P. BEN)	
35	3369-4678+	3	378	Geni per proteine ipotetiche [Glyptapanteles flavicoxis bracovirus], dominio BEN e PHAO2737, ACE75501, 36%(57/149) (PDV H.P. BEN/PHAO)	
44	1309-1885+	1	193	proteine tirosino fosfatasi [Cotesia plutellae polydnavirus], AAZ04264.1, 26%(25/96) (PTP)	TnBV44PTP1
	2710-3536+	1	275	proteine tirosino fosfatasi [Cotesia plutellae polydnavirus], AAZ04264.1, 37%(48/132) (PTP)	TnBV44PTP2
47	4527-9117	4	419	PTP 2 [Microplitis demolitor bracovirus], YP239400.1, 40%(64/157)	TnBV47PTP1
50	4777-5706+	1	309	PTP 2 [Microplitis demolitor bracovirus], YP239391.1, 28%(88/304)	TnBV50PTP1
80	5367-7214+	1	615	Trasportatore NTP-zuccheri [Apis mellifera], XP395030.3, 46%(155/332)	
	1894-3245+	1	450	UDP-glucosio- 6-deidrogenasi [Apis mellifera],	

				XP396801.3, 69%(81/117)	
	11876-12682+	1	271	Omologia con il gene CG2206-PA [Nasoniavitripennis], XP001606517.1, 33%(45/135)	
61	3086-504+	5	451	Geni per proteine ipotetiche [Glyptapanteles flavicoxis bracovirus], ACE75505.1, 53%(119/225) (PDV H.P.)	
69	660-1592+	1	310	PTP 2 [Microplitis demolitor bracovirus], YP239393.1, 27% (80/287)	TnBV69PTP1
	3354-4182+	1	276	PTP 2 [Microplitis demolitor bracovirus], YP239391.1, 27% (42/127)	TnBV69PTP2
81	1462-2379+	1	305	Omologia con il gene GA15974-PA [Nasonia vitripennis], XP001606932.1, 34%(103/300)	TnBV81PTP1
86	6484-7434	1	316	PTP 2 [Microplitis demolitor bracovirus], YP239393.1, 30% (91/302)	TnBV86PTP1
87	830-1330	1	166	Geni per proteine ipotetiche ORF904 [Cotesia plutellae polydnavirus], AAZ04286.1, 34%(29/85) (PDV H.P.)	
	4097-4321	1	74	Geni per proteine ipotetiche conservate [Glyptapanteles indiensis bracovirus], ACE75434.1, 35%(25/71) (PDV H.P.)	
89	3881-4819+	1	312	PTP 2 [Microplitis demolitor bracovirus], YP239393.1, 28%(89/310)	TnBV89PTP1
93	601-1068+	1	155	Ankirina virale [Glyptapanteles indiensis bracovirus], ace75303.1, 40%(63/154)	TnBV93Ank1
99	7851-9588+	2	532	Geni per proteine ipotetiche [Microplitis demolitor bracovirus], dominio BEN, YP239364.1, 42%(48/112) (PDV H.P. BEN)	
	3077-3595	1	172	CG25304 [Drosophila erecta], XP001979163.1, 31%(28/91)	
	1835-2257+	1	140	Famiglia A2 unassigned peptidasi (A02 family) [Schistosoma mansoni], XP002569446.1, 34%(33/97)	
100	1116-2618	3	219	DUF-like 1 [Cotesia plutellae polydnavirus], domini BEN and PHAO2737, ABK63308.1, 28%(23/80)	
32	837-1718+	1	293	proteine tirosino fosfatasi [Cotesia glomerata bracovirus], AAR29979.1, 34%(103/300) (PTP)	TnBV32PTP1
	2245-3147+	1	300	proteine tirosino fosfatasi [Cotesia glomerata bracovirus], AAR29979.1, 36%(109/298)	TnBV32PTP2
6	1507-3379	3	318	Geni per proteine ipotetiche [Microplitis demolitor bracovirus], dominio PHAO2744, YP239392.1, 30%(42/140) (PDV H.P. PHAO)	

18.1	325-1233+	1	302	PTP1 [Glyptapanteles indiensis bracovirus], ACE30023.1, 35%(108/302)	TnBV18.1PTP1
	2475-3368+	1	297	proteine tirosino fosfatasi [Glyptapanteles indiensis bracovirus], ACE75313.1, 35%(108/303) (PTP)	TnBV18.1PTP2
40.1	3967-4581+	1	294	proteine tirosino fosfatasi [Glyptapanteles indiensis], ACE75355.1, 29%(67/225) (PTP)	TnBV40.1PTP1
	159-410	1	83	DNA elicasi [Adineta vaga],AAZ67118.1, 64%(46/71)	
24.2	1121-2611+	2	496	Trasportatore UDP -zuccheri UST74c (fringe connection protein), putative [Nasonia vitripennis], XP001599500.1, 44%(116/260)	
6057	3922-4446	1	174	GfV-B29-ORF1 [Glypta fumiferanae ichnovirus], YP001029373, 34%(60/174)	TnBV6057Ank1
	1402-1644+	1	80	Geni per proteine ipotetiche [Cotesia plutellae polydnavirus], ABK63307.1, 36%(27/65) (PDV H.P.)	

III.2 Costruzione di una libreria di cDNA rappresentativa della popolazione di piccoli RNA di emociti di larve parassitizzate

L'analisi della sequenza genomica del *TnBV* ha evidenziato la presenza di un'ampia porzione (circa il 78%) apparentemente priva di geni.

Questa caratteristica è certamente inusuale, in confronto alla generale "compattezza" riscontrata nei genomi della maggior parte dei virus conosciuti, i quali presentano un' elevata densità di sequenze codificanti. D'altro canto il *TnBV*, in quanto polidnavirus, differisce da tutti gli altri virus per le sue peculiari modalità di trasmissione e di ciclo replicativo (vedi introduzione). Abbiamo allora ipotizzato che l'esistenza di un'ampia porzione genomica non codificante nel genoma di questo virus possa essere correlata alla sua peculiare biologia e che di fatto possa svolgere un ruolo importante nei fenomeni di regolazione della fisiologia dell'insetto ospite. Una prima indicazione a sostegno di questa ipotesi è venuta dall'identificazione nel nostro laboratorio di un trascritto non codificante prodotto dal *TnBV* ed avente come bersaglio un gene dell'ospite coinvolto nella risposta immunitaria.

Abbiamo allora deciso di effettuare una ricerca sistematica di piccole molecole di RNA non codificante (ncRNA) derivanti dal genoma del *TnBV*. Il primo passo è stato costruire una libreria di molecole di cDNA rappresentativa della popolazione di molecole di RNA a basso peso molecolare presenti in emociti di larve di *H. virescens* parassitizzate (vedi materiali e metodi).

La libreria è stata quindi sottoposta ad un controllo qualitativo. Una piccolissima frazione delle molecole di cDNA generate è stata clonata in un vettore plasmidico e 9 delle colonie ottenute sono state sequenziate ottenendo 5 diverse sequenze. Tali sequenze sono state sottoposte ad analisi BLAST, per ricercare eventuali omologie con sequenze nucleotidiche presenti nelle banche dati. E' stata inoltre eseguita una ricerca mirata all'interno di **miRBase**, la banca dati nella quale sono immagazzinati tutti i dati di sequenza dei miRNA identificati a tutt'oggi nei vari organismi. Due delle 5 sequenze analizzate sono risultate corrispondere a due specie di microRNA, **miR-184** e **miR-970**, già note in altri organismi. La sequenza del miR-970 è probabilmente molto rappresentata nella popolazione di piccoli RNA di emociti di larve parassitizzate in quanto è stata ritrovata in 5 dei 9 cloni sequenziati. Questo primo tipo di controllo di qualità è servito a verificare che:

- la frazione di RNA utilizzata per la creazione della libreria di cDNA fosse stata correttamente selezionata e dunque corrispondesse effettivamente alla popolazione di piccoli RNA con dimensioni comprese fra i 18-30 nucleotidi.
- la struttura delle molecole ricombinanti ottenute per addizione sequenziale dei "linkers" sintetici fosse corretta.

La libreria è stata quindi sottoposta ad un controllo di tipo quantitativo attraverso Real time qPCR che ha permesso di stabilire il numero assoluto delle sequenze di cDNA presenti, mediante interpolazione dei dati ottenuti con i valori di una curva standard (vedi materiali e metodi)

La figura 11 mostra che in 1 μ l di una diluizione 1:2000 della libreria sono presenti $2,65 \cdot 10^9$ molecole di cDNA. Quindi, considerando che il volume complessivo della libreria è pari a 10 μ l, la collezione di cDNA ottenuti da

piccoli RNA estratti da emociti di larve di *H. virescens* a 12h dalla parassitizzazione è composta da un numero di molecole pari a $5,3 \cdot 10^{13}$.

Inoltre, lo studio delle curve di dissociazione dei prodotti ottenuti nelle reazioni di Real Time-PCR ha fornito dati qualitativi relativi all'assenza di artefatti costituiti da dimeri dei "linkers" sintetici (Fig 12 A e B)

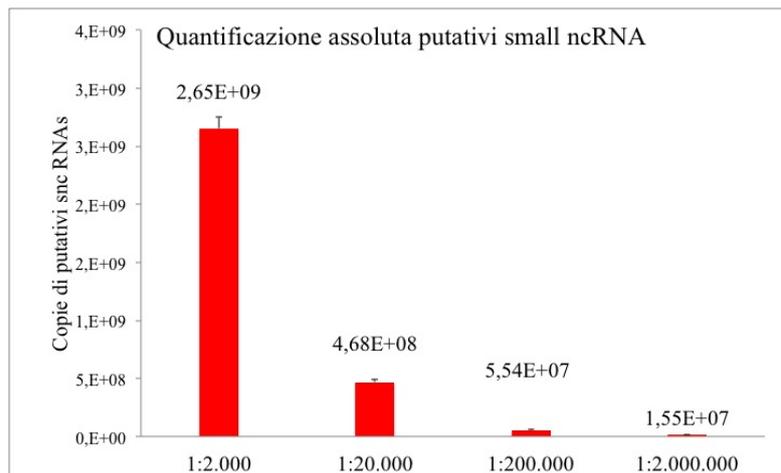


Fig.11 Analisi quantitativa assoluta della libreria di sequenze di putativi piccoli ncRNA estratti da emociti di larve di *H. virescens* a 12h dalla parassitizzazione. Il titolo è espresso come media del n.° copie di molecole ed è indicata la deviazione standard.

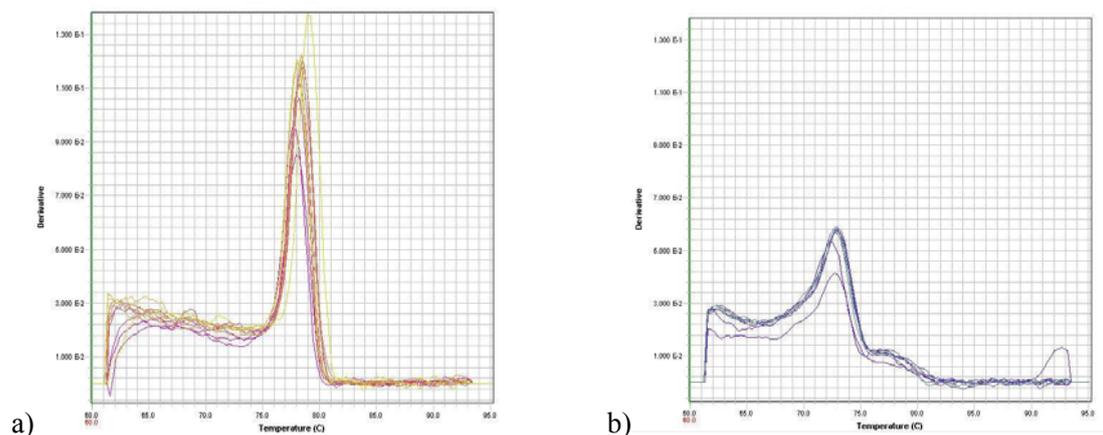


Fig.12 Curve di dissociazione dei prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando come stampo un cDNA di controllo (a) o la libreria di cDNA (b)

In conclusione, i controlli eseguiti tramite Real Time qPCR hanno fornito valori soddisfacenti sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo e dunque è stato possibile procedere al sequenziamento della libreria di cDNA.

III.3 Sequenziamento ed analisi della libreria di cDNA

Il sequenziamento della libreria di cDNA, derivante da RNA a basso peso molecolare estratto da emociti di larve parassitizzate, è stato eseguito presso l'Istituto di Genomica Applicata di Udine. Per questa procedura è stato impiegato l'Illumina Genome Analyzer II, un sequenziatore di nuova generazione grazie al quale è possibile ottenere centinaia di megabasi di sequenze in un singolo esperimento.

Il sequenziamento della libreria di cDNA da me costruita ha prodotto in totale 6 milioni di sequenze.

Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante un programma bioinformatico denominato FAST (Fast Aligning of Short Tags), messo a punto dallo stesso istituto presso il quale è stato effettuato il sequenziamento. Tale programma bioinformatico consente di effettuare l'allineamento di un intero pacchetto di dati generati da procedure di sequenziamento massivo parallelo su di un DNA di riferimento, in questo caso rappresentato dalla sequenza genomica completa del *TnBV*. Tramite questa analisi è in pratica possibile stabilire quante e quali sequenze si appaiano senza errori con il genoma di riferimento, in posizione unica o in posizioni multiple.

Sono state in questo modo identificate 361 sequenze presenti nel genoma del *TnBV* in unica copia, e 486 sequenze presenti in copie multiple.

Alcune informazioni di sequenza ottenute risultavano comunque incomplete (in conseguenza di lettura parziale durante il processo di sequenziamento e/o di erronea inclusione nella libreria di cDNA di una frazione di molecole di dimensioni inferiori alle dimensioni attese per piccoli RNA non codificanti di tipo funzionale). Si è allora deciso di selezionare all'interno della collezione di sequenze derivanti dal genoma del *TnBV* le sole sequenze di dimensioni comprese tra i 18 e i 30 nt.

Il numero totale dei putativi piccoli RNA identificati è dunque risultato pari a 149, di cui 139 presenti in un'unica posizione, e 10 allineati in due differenti posizioni del genoma del *TnBV*.

III.4 Distribuzione dei putativi piccoli ncRNA nei circoli virali.

I 149 piccoli ncRNA putativi identificati sono stati precisamente mappati all'interno della sequenza genomica del *TnBV*, stabilendo per ciascuno di essi l'esatta posizione ed orientamento rispetto alle sequenze dei 42 geni codificanti per proteine presenti nei circoli virali.

Secondo quanto riportato in letteratura, i geni che danno origine ad un particolare tipo di piccoli ncRNA, i miRNA, sono preferenzialmente localizzati in regioni intergeniche, in posizione abbastanza distante rispetto ad altri geni, mentre una frazione minoritaria di essi è contenuta negli introni di geni codificanti per proteine, in orientamento sia senso che antisense rispetto a questi (Bartel, 2004; Kim, 2005). Quindi, analizzando la collocazione delle sequenze dei putativi ncRNA del *TnBV* all'interno dei circoli virali, sono state selezionate quelle posizionate al di fuori di regioni codificanti, stabilendo una distanza arbitraria rispetto ad esse di almeno 200 basi. Per questo tipo di analisi sono state prese in considerazione non solo le regioni codificanti dei 42 geni precedentemente identificati (vedi paragrafo II.1), ma anche cornici di lettura aperte (Open Reading Frames, ORFs) superiori alle 150 basi che potrebbero rappresentare geni funzionali, non ancora riconosciuti come tali per insufficienza di dati.

Al termine dunque delle analisi su indicate si è arrivati a restringere l'insieme delle sequenze dei putativi piccoli ncRNA derivanti dal genoma del *TnBV* a 52 candidati, dei quali 46 presenti in singola copia, e 6 localizzati in due differenti posizioni del genoma stesso (Tab 8).

Le 52 sequenze sono distribuite all'interno di 14 dei 28 circoli genomici virali (Fig 13). Uno di questi circoli, il circolo 154, mostra una densità di geni per putativi ncRNA particolarmente elevata.

Tab 8. 52 piccoli ncRNA selezionati.

Circoli	Putativi sncRNAs	nt Start	nt Stop	Posizione rispetto a Geni/ORF	Geni
34	putative sncRNA 23	5287	5307	+1373 -368	PDV H.P BEN/PHAO PDV H.P. BEN
	putative sncRNA 128	1384	1404	+810 -2935	PDV H.P BEN/PHAO PDV H.P. BEN
	putative sncRNA 91	1543	1563	+474 -8669	ORF ORF
	putative sncRNA 27	6559	6579	+5491 -3652	ORF ORF
35	putative sncRNA 11"	2663	2683	+681 -683	ORF PDV H.P BEN/PHAO
40.1	putative sncRNA 77	4803	4823	-222 +1700	PTP ORF
44	putative sncRNA 4	4415	4436	+4245 -989	ORF ORF
	putative sncRNA 122	3288	3308	+3118 -2116	ORF ORF
47	putative sncRNA 100	234	254	+535 -3719	ORF ORF
	putative sncRNA 96	366	386	+667 -3587	ORF ORF
	putative sncRNA 70	6763	6783	+913 -2757	ORF ORF
	putative sncRNA 139	6896	6916	+1046 -2623	ORF ORF
	putative sncRNA 14	13	33	+314 -3940	ORF ORF
6	putative sncRNA 21	510	530	+1451 -977	PDV H.P PHAO PDV H.P PHAO
80	putative sncRNA 11"	9446	9466	+1620 -1053	Trasportatore UDP-zuccheri Trasportatore UDP-zuccheri
	putative sncRNA 60	9084	9104	+1983 -690	Trasportatore UDP-zuccheri Trasportatore UDP-zuccheri
	putative sncRNA 37	4227	4252	+936 -435	Trasportatore UDP-zuccheri UDP-glucosio 6-fosf deidrogen.
	putative sncRNA 62	4632	4656	+532 -840	Trasportatore UDP-zuccheri UDP-glucosio 6-fosf deidrogen.
	putative sncRNA 78	5792	5813	+629 -786	ORF ORF
	putative sncRNA 41	5936	5956	+773 -642	ORF ORF
	putative sncRNA 10"	880	900	+1719 -1881	ORF ORF
81	putative sncRNA 10	81	101	+2029 -4002	ORF ORF
	putative sncRNA 106	2332	2352	+1750 -2004	ORF ORF
87	putative sncRNA 43	5082	5102	-761 +3211	PDV H.P. ORF
99	putative sncRNA 87	4346	4366	+274 -3699	ORF ORF
	putative sncRNA 63	8640	8660	+202 -1269	ORF ORF
133	putative sncRNA 13	2137	2157	+3128 -246	ORF ORF
	putative sncRNA 25	4990	5010	+442 -267	ORF ORF

139	putative sncRNA 13	4696	4716	+320 -2099	TnBV Ank 1 PDV H.P BEN/PHAO
	putative sncRNA 97	2723	2743	+652 -791	ORF ORF
140	putative sncRNA 3	7398	7418	+376 -2995	ORF ORF
	putative sncRNA 47	9067	9087	+404 -212	ORF ORF
	putative sncRNA 129	7547	7567	+3793 -1550	ORF PTP
154	putative sncRNA 104	5	25	+200 -200	ORF ORF
	putative sncRNA 40	167	187	+487 -2123	ORF TnBV1
	putative sncRNA 131	3484	3504	+390 -759	ORF ORF
	putative sncRNA 107	1236	1256	+469 -1692	ORF ORF
	putative sncRNA 30	1495	1515	+728 -1426	ORF ORF
	putative sncRNA 64	1837	1857	+1070 -1089	ORF ORF
	putative sncRNA 95	3113	3133	+2353 -1336	ORF ORF
	putative sncRNA 69	2036	2056	+1269 -886	ORF ORF
	putative sncRNA 3''	2223	2243	+1553 -690	ORF ORF
	putative sncRNA 48	1668	1688	+395 -805	TnBV1 ORF
	putative sncRNA 88	1792	1812	+1025 -1131	ORF ORF
	putative sncRNA 102	2154	2174	+1387 -773	ORF ORF
	putative sncRNA 68	2314	2334	+1547 -616	ORF ORF
	putative sncRNA 111	2306	2326	introne	TnBV1
	putative sncRNA 82	2683	2703		TnBV1
putative sncRNA 72	1020	1040	+253 -1907	ORF ORF	

Tab 8. 52 piccoli ncRNA selezionati e relativa posizione all'interno dei circoli virali del *TnBV*. In particolare per ogni ncRNA è indicato il circolo in cui è stato mappato; la posizione (nt start - nt stop) all'interno del circolo; la posizione rispetto a geni noti/ORF indicando con il segno (+) la distanza che intercorre tra l'estremità 3' del ncRNA ed il 5' del gene putativo/ORF e con il segno (-) la distanza che intercorre tra l'estremità 5' del ncRNA ed il 3' del gene putativo/ORF. Per ORF si intendono cornici aperte di lettura di dimensione superiore a 150pb. I geni putativi invece sono indicati con delle sigle, come indicato nella **Tab 7**.

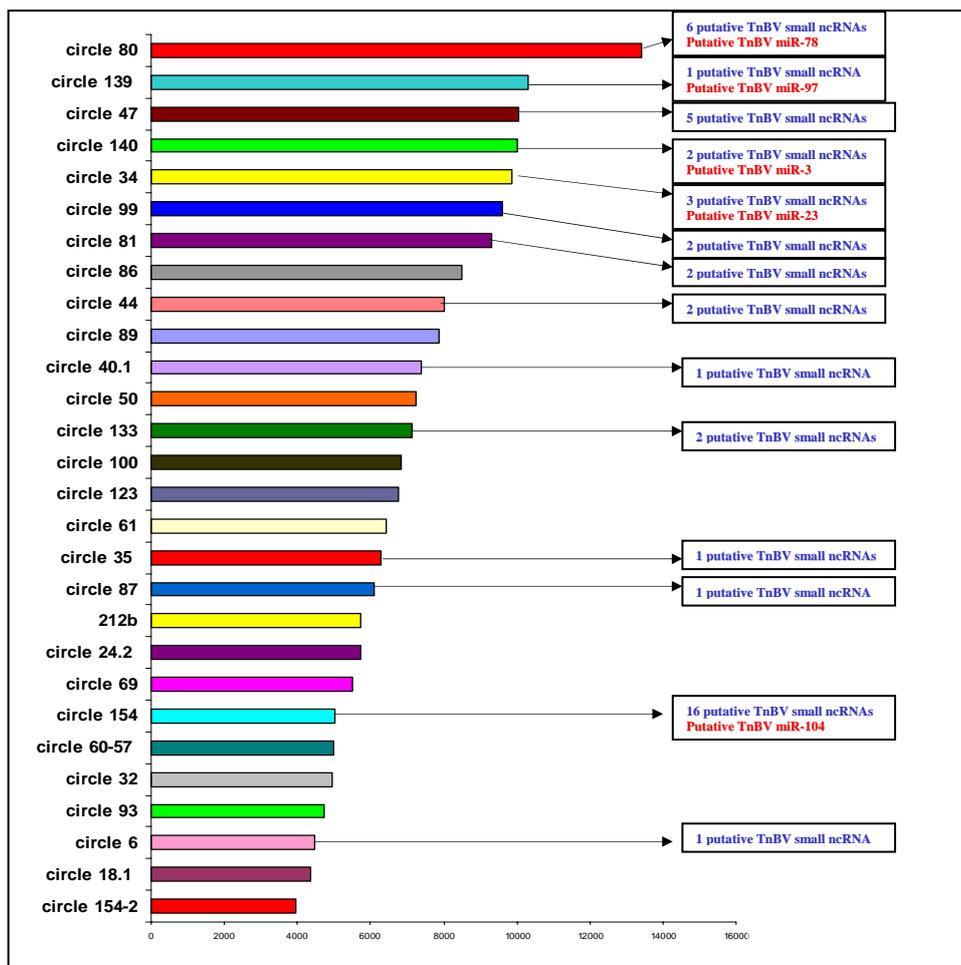


Fig 13. Distribuzione dei piccoli RNA non codificanti putativi nei circoli del *TnBV*

Tale circolo ha infatti una dimensione di 5000 pb e contiene ben 17 delle sequenze selezionate, con una densità media pari a una sequenza ogni 294 pb (Fig 14). I circoli 80, 47 e 34 contengono rispettivamente 7, 5 e 4 geni per putativi piccoli ncRNA, con densità medie comparabili (1914 pb per il circolo 80, 2011 pb per il circolo 47, 2466 pb per il circolo 34) (Fig 15-16-17). Nei circoli 139 e 140 sono stati identificati 3 putativi piccoli ncRNA con densità medie molto simili (rispettivamente pari a 3430pb e 3331pb) (Fig 19-20). Nei circoli 44, 81, 99 e 133 sono stati individuati 2 putativi piccoli ncRNA, con densità media compresa fra le 3564 e le 4795pb (Fig 21-22-23-18). Infine nei circoli 6, 35, 87, 40.1 è stato mappato un unico putativo piccolo ncRNA (Fig 24-25-26-27).

Le sequenze dei 52 piccoli ncRNA putativi sono state sottoposte ad analisi BLAST e confrontate con le sequenze contenute nella banca dati dei microRNA, miRBase. Entrambe le analisi non hanno fornito alcuna informazione utile in quanto le sequenze selezionate non mostrano alcuna omologia con geni noti.

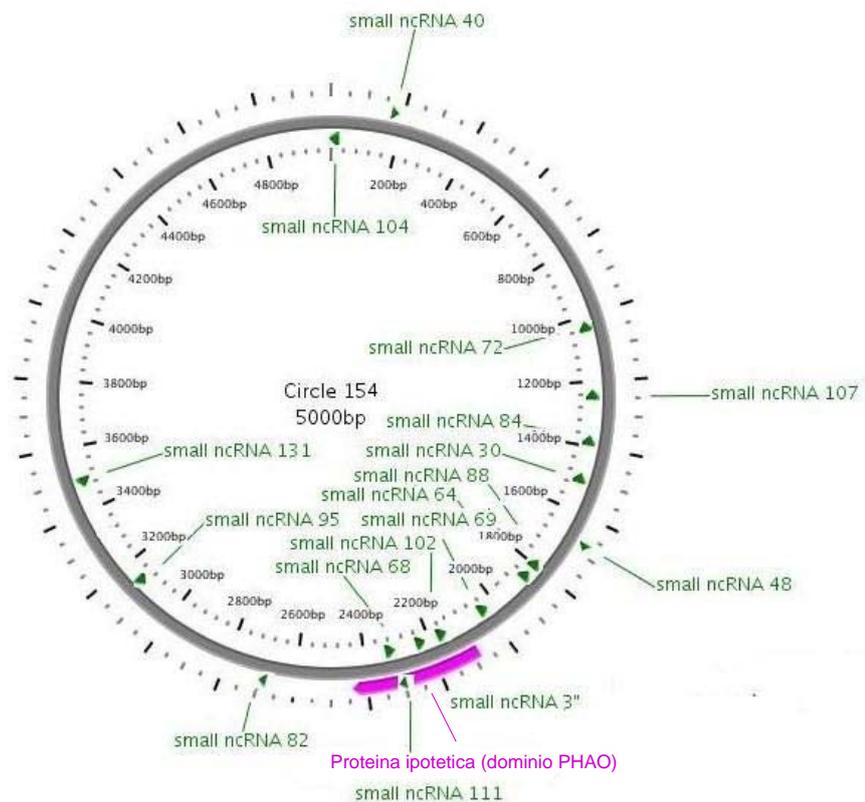


Fig 14. Rappresentazione grafica del circolo 154 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

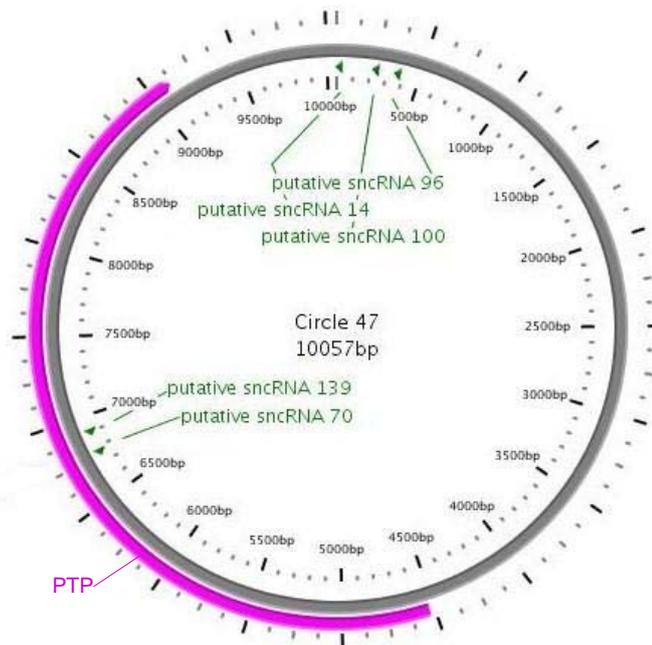


Fig 15. Rappresentazione grafica del circolo 47 e rispettivi piccoli ncRNA putativi

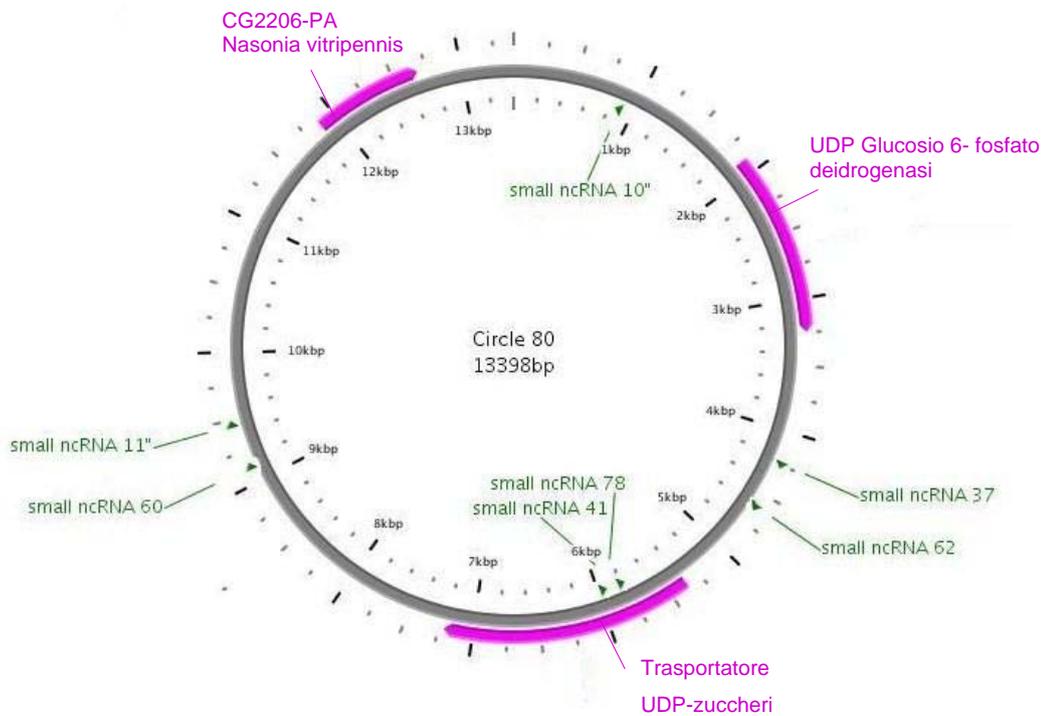


Fig 16. Rappresentazione grafica del circolo 80 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

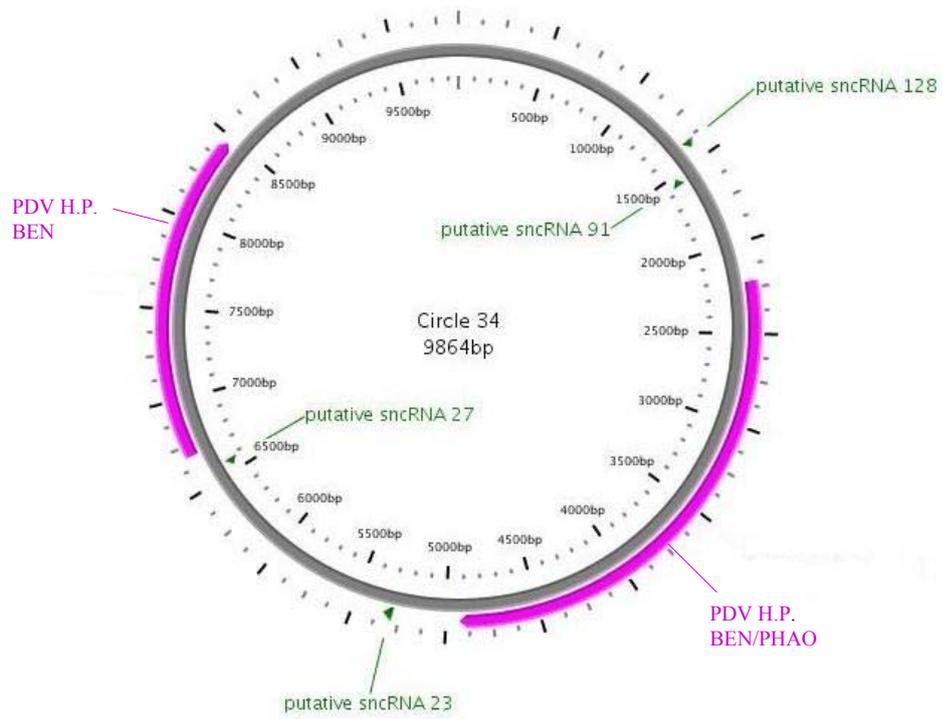


Fig 17. Rappresentazione grafica del circolo 34 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

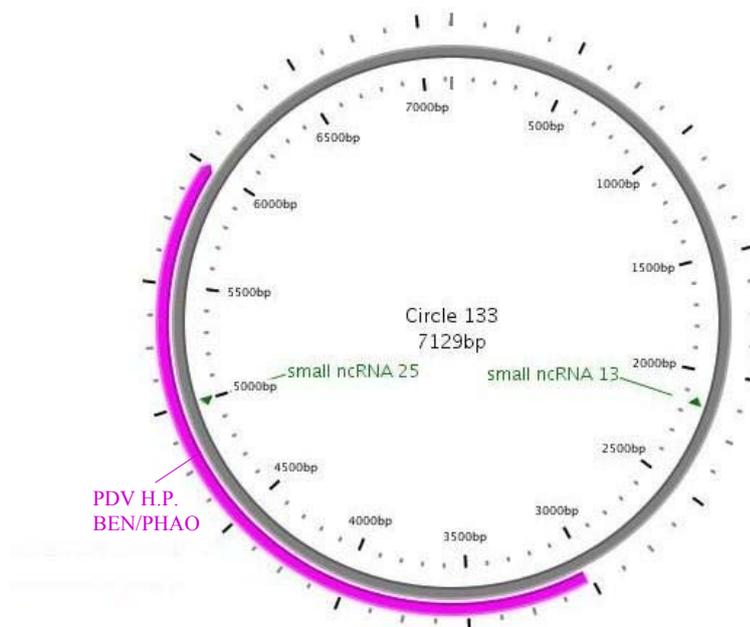


Fig 18. Rappresentazione grafica del circolo 133 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

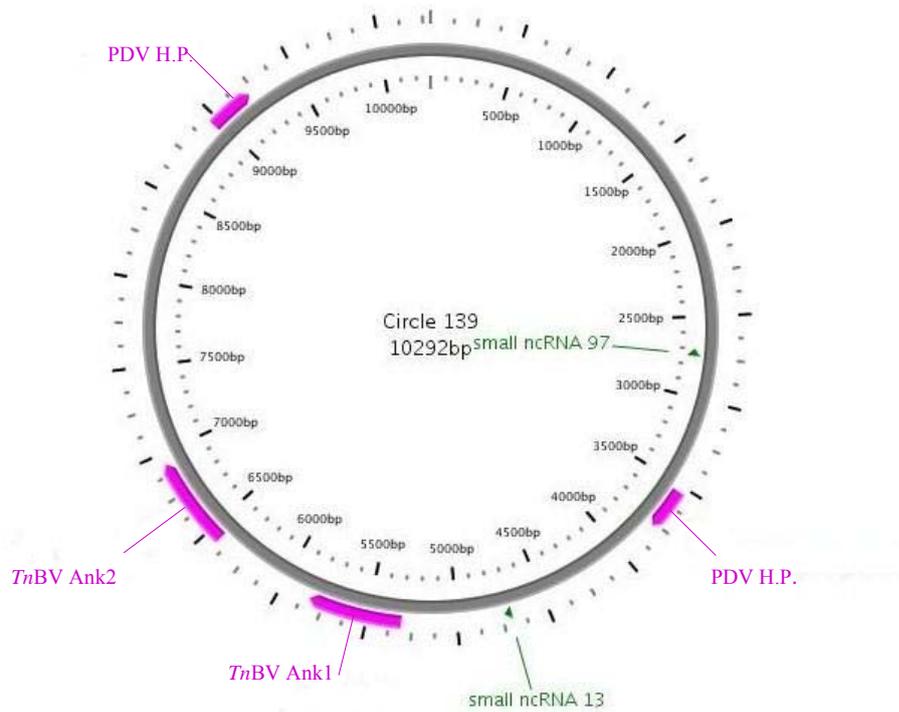


Fig 19. Rappresentazione grafica del circolo 139 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

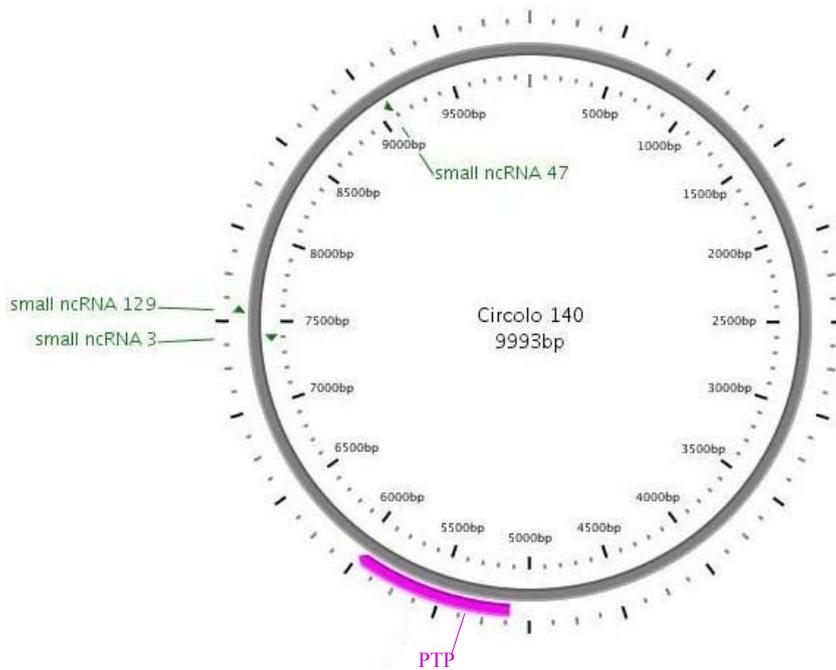


Fig 20. Rappresentazione grafica del circolo 140 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

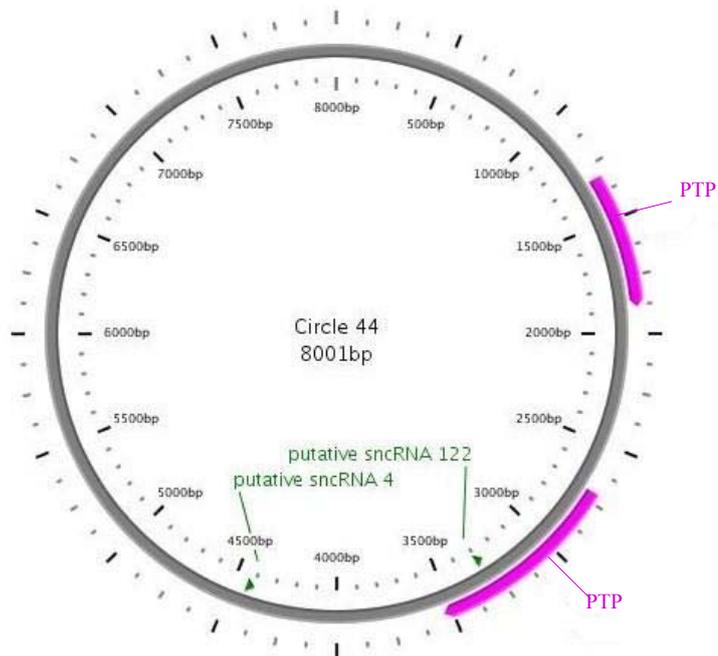


Fig 21. Rappresentazione grafica del circolo 44 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

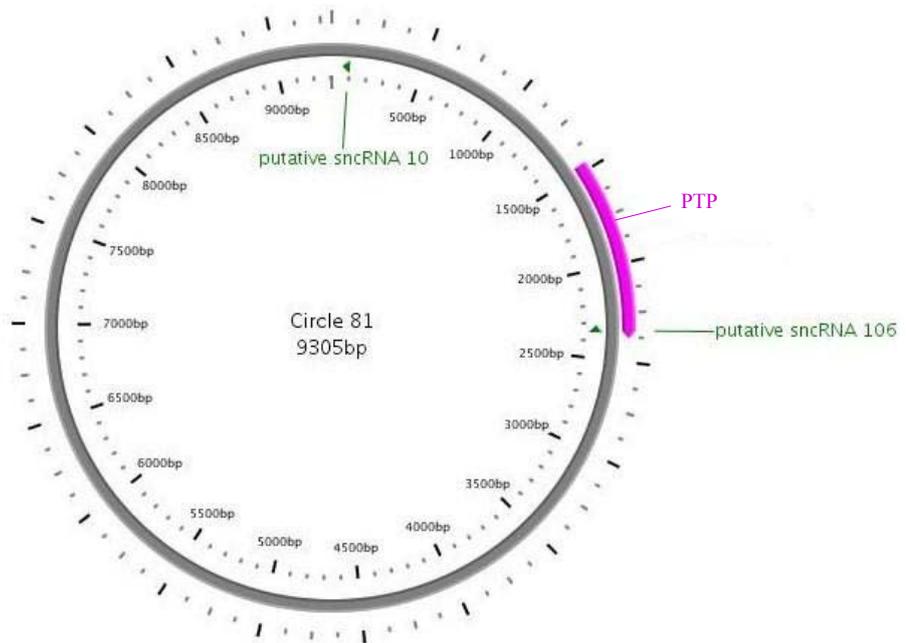


Fig 22. Rappresentazione grafica del circolo 81 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

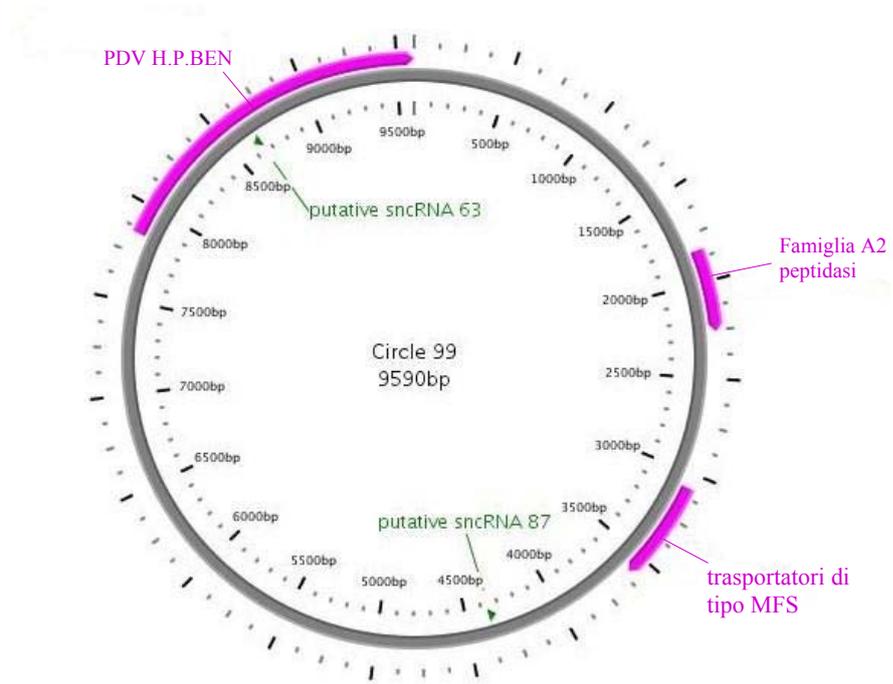


Fig 23. Rappresentazione grafica del circolo 99 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

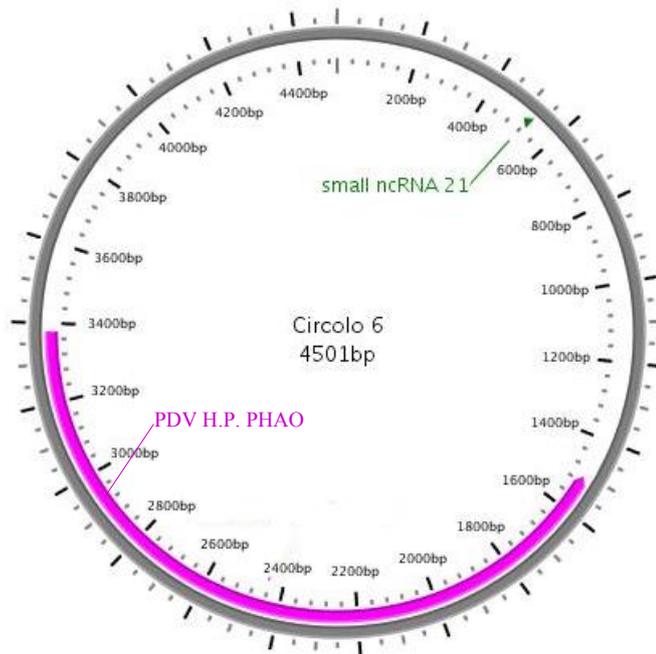


Fig 24. Rappresentazione grafica del circolo 6 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

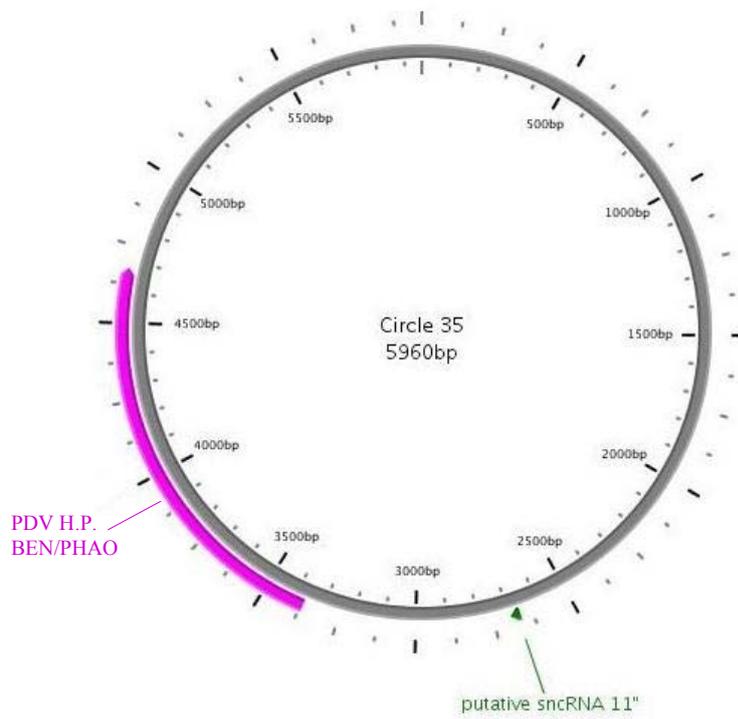


Fig 25. Rappresentazione grafica del circolo 35 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

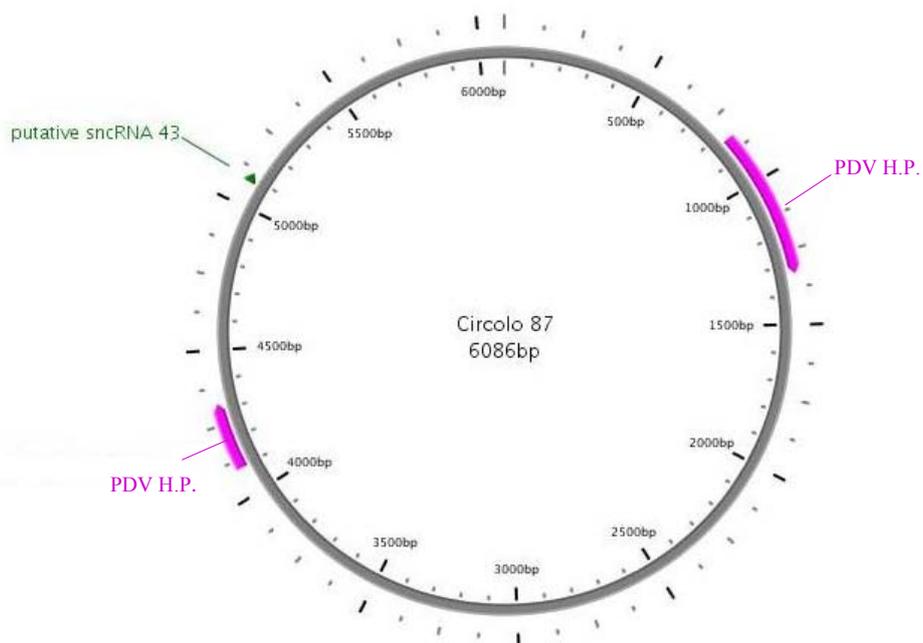


Fig 26. Rappresentazione grafica del circolo 87 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

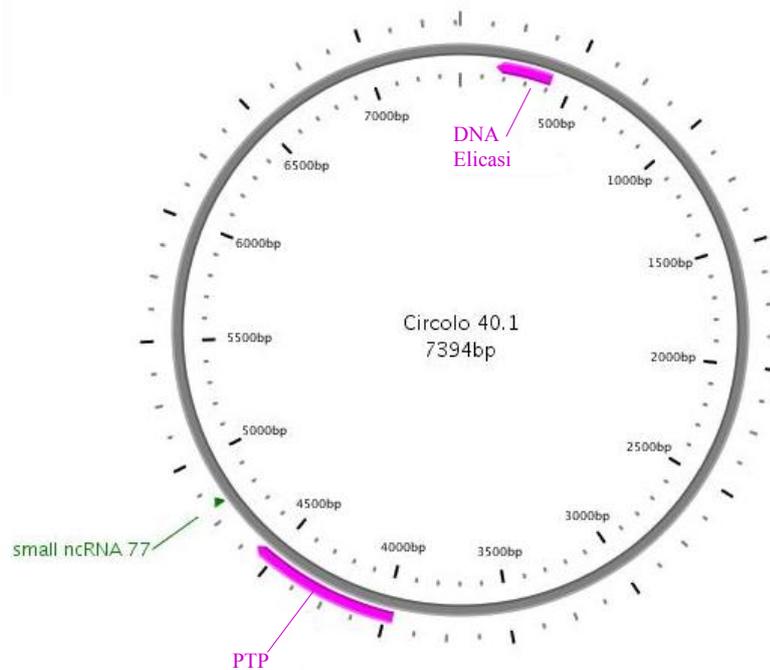


Fig 27. Rappresentazione grafica del circolo 40.1 e rispettivi piccoli ncRNA putativi.

III.5 Identificazione di putativi miRNA

I piccoli RNA non codificanti svolgono ruoli chiave in numerosi processi regolativi come degradazione e inibizione della traduzione di specifici mRNA bersaglio, rimodellamento della struttura della cromatina e silenziamento dei trasposoni.

La classe di piccoli RNA con funzione regolativa più studiata è rappresentata dai microRNA, i quali, a differenza degli altri piccoli RNA non codificanti, hanno origine a partire da un precursore endogeno in grado di formare una caratteristica struttura a “stem-loop” (*Berninger et al., 2007*).

I metodi computazionali rivestono un ruolo fondamentale nell’identificazione di nuovi microRNA. Infatti, la struttura dei precursori, nonché l’alta conservazione a livello evolutivo sono caratteristiche peculiari impiegate nell’identificazione di questa classe di piccoli RNA non codificanti (*Li et al., 2009*).

La sequenza genomica del *TnBV* è stata sottoposta ad analisi computazionale mediante l'ausilio di un particolare strumento bioinformatico, denominato MirEval. Si tratta di un programma che analizza ampie sequenze di DNA (fino a 10.000 pb) alla ricerca di regioni potenzialmente in grado di originare precursori di microRNA (pre-miRNA) (Ritchie *et al.*, 2008). In particolare, MirEval fornisce, per ogni regione genomica individuata, un quadro di informazioni completo in merito alle possibili strutture secondarie formate da tali regioni, alla presenza di strutture a “stem loop” altamente conservate e alla eventuale presenza di raggruppamenti genici da cui potrebbero derivare trascritti primari multicistronici (Bartel, 2004). Inoltre, il programma ricerca in automatico omologie tra le sequenze dei miRNA maturi potenzialmente generati dalle regioni genomiche in esame ed i miRNA noti presenti in miRBase (Ritchie *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il genoma del *TnBV*, l'analisi condotta ha portato all'identificazione, nei diversi circoli, di numerose sequenze che presentano una struttura secondaria caratteristica dei pre-miRNA, ma non sono stati trovati raggruppamenti genici nè sono state identificate omologie con miRNA noti.

La fase successiva di analisi è consistita nel ricercare una possibile corrispondenza fra le sequenze dei 52 piccoli ncRNA putativi identificati nella nostra libreria di cDNA e le regioni del genoma del virus selezionate tramite MirEval.

Su 52 sequenze, 12 sono state allineate con regioni del genoma virale potenzialmente in grado di produrre molecole di RNA con caratteristiche strutturali tipiche dei pre-miRNA.

Delle 12 regioni identificate, 5 sono state ulteriormente selezionate in quanto in grado di originare strutture secondarie stabili, nelle quali le sequenze dei putativi microRNA (che ho chiamato miR-78, miR-97, miR-3, miR-23, miR-104) sono correttamente localizzate nella porzione a doppio filamento della struttura a “stem-loop” e non nella porzione a singolo filamento del “loop” (Fig. 33). Questi 5 putativi miRNA mappano in diversi circoli del genoma virale (80, 139, 140, 34, 154), come mostrato nelle Fig 28, 29, 30, 31 e 32.

III.6 Analisi trascrizionale

Le regioni del genoma del *TnBV* contenenti i potenziali geni per miRNA sono state sottoposte ad analisi trascrizionale.

Esperimenti di infezione controllata precedentemente condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il virus, estratto da *T. nigriceps* ed iniettato in larve di *H. virescens*, riduce drasticamente la capacità di queste larve di montare una adeguata risposta immunitaria di incapsulamento. Questo effetto è stato riscontrato già a 3h dall'infezione virale. Il grado d'inibizione della capacità degli emociti di incapsulare un corpo estraneo aumenta nel tempo e raggiunge il suo picco a 12h dall'infezione virale, per poi decrescere gradualmente ed annullarsi totalmente dopo 72h. Questo andamento temporale riproduce fedelmente quanto osservato in seguito a parassitizzazione (dati non pubblicati).

Nell'ipotesi che i putativi miRNA identificati possano essere coinvolti nell'inibizione della risposta di incapsulamento, le analisi trascrizionali sono state inizialmente condotte su RNA di emociti estratti a 12h dall'evento di parassitizzazione, momento in cui si ha la massima soppressione del sistema immunitario.

Le analisi trascrizionali sono state condotte mediante RT-PCR e a tale scopo sono state disegnate coppie di oligo in grado di amplificare sequenze di circa 150-200 pb, situate a cavallo dei presunti miRNA. Tale valore è stato stabilito in quanto i miRNA maturi sono processati a partire da un trascritto primario (pri-miRNA) che nei virus, considerate le spesso ridotte dimensioni del genoma, hanno dimensioni minime di circa 200 pb (*Umbach e Cullen, 2009*). Quindi, l'ottenimento di un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese, per ogni coppia di oligo utilizzata per le reazioni di RT-PCR, può essere considerata una buona indicazione dell'esistenza di un pri-miRNA per ciascun putativo miRNA analizzato.

Per effettuare la retrotrascrizione dell'RNA (**Fig 23-24**) sono stati separatamente utilizzati due diversi tipi di primers, oligo dT ed esameri pd(N)₆. L'efficienza delle reazioni di PCR effettuate utilizzando come

templato le due diverse popolazioni di cDNA è stata paragonabile, per cui i successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando soltanto gli esameri.

Per escludere la presenza di residui di DNA genomico nella preparazione di RNA è stato allestito un campione contenente tutti i componenti della reazione di retrotrascrizione eccetto l'enzima e tale campione è stato processato assieme agli altri nelle reazioni di PCR (-RT).

Inoltre, in ogni esperimento di PCR sono stati inclusi un controllo negativo privo di DNA stampo (-), che è servito a provare l'assenza di contaminazioni durante il processo di assemblaggio delle reazioni, ed un controllo positivo contenente come stampo il DNA genomico del *TnBV*(+).

I dati ottenuti indicano che le regioni in cui mappano i putativi miR78, miR104, miR97, miR23 sono attivamente trascritte negli emociti di individui parassitizzati (**Fig 34**). Non è stata invece ottenuta evidenza dell'esistenza di un precursore per il miR3, almeno con la specifica coppia di oligo utilizzati.

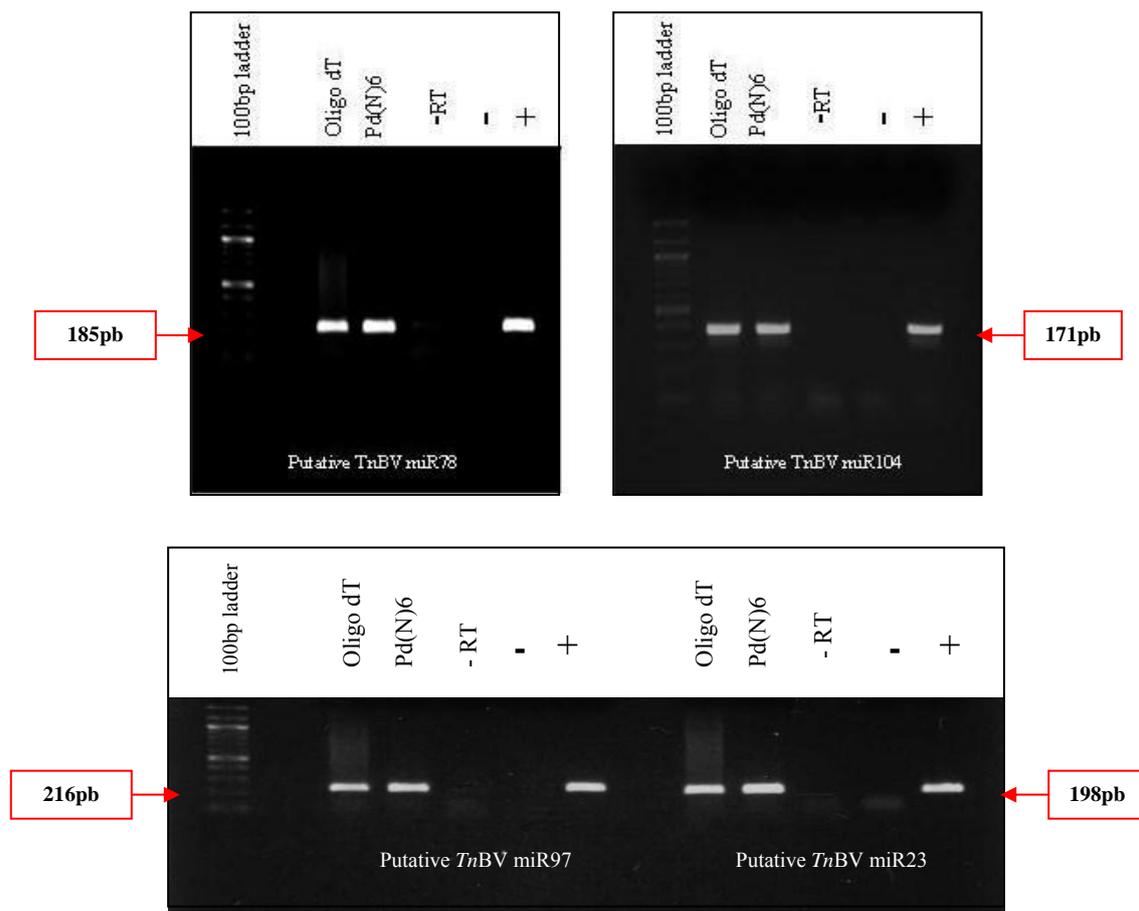


Fig 34. Profilo trascrizionale dei putativi pri-miR-78, pri-miR-104, miR-97 e miR-23 a 12h dalla parassitizzazione.

Considerando che l'attività immunosoppressiva del *TnBV* ha inizio già a 3h dall'infezione virale, l'attività trascrizionale delle regioni genomiche selezionate è stata valutata anche ad un tempo intermedio di 6h.

Si è così dimostrato che le regioni genomiche del *TnBV* situate a cavallo dei putativi miR78, miR104, miR97, miR23 sono trascritte negli emociti larvali già a 6 ora dalla parassitizzazione (**Fig 35**)

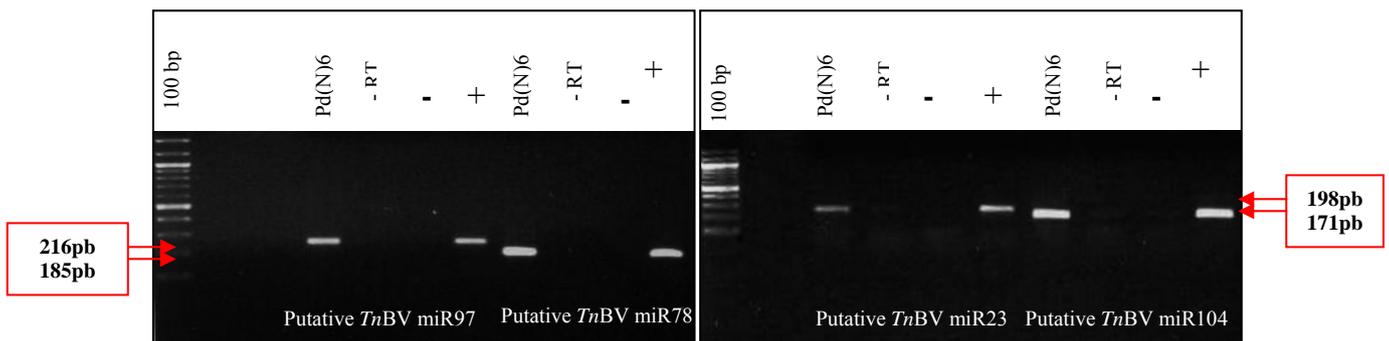


Fig 35. Profilo trascrizionale dei putativi miR-97, miR-78, miR-23 e miR-104 a 6h dalla parassitizzazione

A questo punto è stato tracciato un profilo trascrizionale anche per quelle regioni genomiche del *TnBV* nelle quali sono state mappate altre sequenze di putativi piccoli RNA non codificanti derivanti della libreria di cDNA.

Gli esperimenti di RT-PCR sono stati condotti utilizzando RNA da emociti di larve a 12h dalla parassitizzazione. Tutte le regioni genomiche prese in considerazione sono risultate trascritte (**Fig 36**).

Considerando gli esiti positivi ottenuti nella stragrande maggioranza degli esperimenti di RT-PCR fin qui condotti, il passo successivo è stato valutare la capacità trascrizionale di regioni del genoma del *TnBV* scelte in maniera casuale fra quelle prive di geni codificanti per proteine o putativi ncRNA. I risultati ottenuti ed in parte riportati nella **Fig 37** dimostrano che, a 12h dalla parassitizzazione, anche queste regioni genomiche vengono trascritte. Complessivamente, dunque, le analisi trascrizionali condotte indicano che negli emociti di larve di *H.virescens* parassitizzate da *T. nigriceps* un'ampia porzione della regione non codificante del genoma del *TnBV* è pervasa da un'intensa attività trascrizionale.

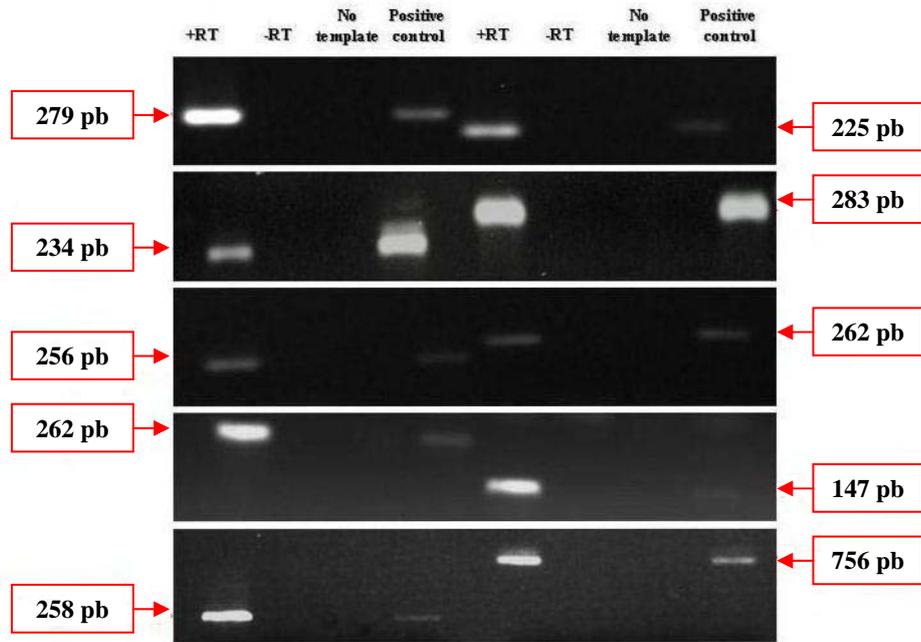


Fig 36. Profilo trascrizionale di regioni del genoma del *TnBV* da cui hanno origine putativi piccoli ncRNA.

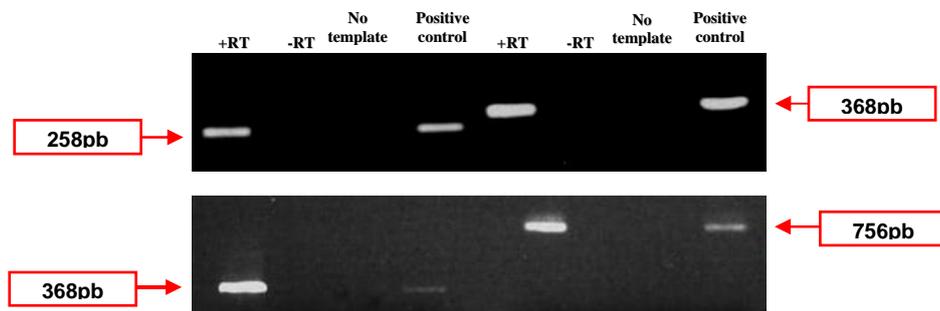


Fig 37. Profilo trascrizionale di alcune regioni del genoma del *TnBV* non contenenti geni predetti

IV. DISCUSSIONE

Il lavoro sperimentale svolto durante il Corso di Dottorato ha permesso di generare una collezione di sequenze in cui è rappresentata l'intera popolazione di piccoli RNA non codificanti degli emociti di larve di *H.virescens* parassitizzate da *T.nigriceps*. Tale collezione deve in primo luogo includere sequenze di RNA non codificanti prodotti da geni di *H. virescens*. Ed infatti, pur non essendo questo lo specifico obiettivo del mio progetto di Dottorato, ho identificato due specie di microRNA, miR-184 e miR-970, già note in altri organismi, ma non ancora descritte in *H. virescens*.

Inizialmente scoperto in *Drosophila melanogaster*, il miR-970 è stato rinvenuto nei genomi di vari insetti ed in particolare *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*. Nulla però si sa circa la sua funzione biologica (*Griffiths-Jones et al, 2010; Skalsky et al, 2010; Ruby et al., 2007; Stark et al., 2007*).

Molto di più è invece noto in merito al miR-184, che è altamente conservato sia negli insetti che nei mammiferi. In *Drosophila melanogaster*, il miR-184 è espresso in tutti gli stadi di sviluppo dell'insetto (*Ping Li et al., 2011*). Tuttavia, analisi funzionali hanno evidenziato un importante ruolo di questo miRNA nella regolazione dello sviluppo della linea germinale femminile e dell'embriogenesi precoce (*Iovino et al., 2009*). Nell'uomo, il miR-184 è stato associato ad alcune patologie, come la SSC (Squamous Cell Carcinoma of Tongue), dove è coinvolto nella proliferazione delle cellule cancerose e nell'attivazione di fenomeni anti-apoptotici (*Wong et al, 2008*).

Uno studio sistematico delle sequenze presenti nella libreria di cDNA da me generata potrà portare all'identificazione di altre specie di miRNA note in altri insetti/metazoi e conservate in *H. virescens*. Di particolare interesse risulta senz'altro la possibilità di identificare miRNA o altri tipi

di piccoli RNA non codificanti di *H. virescens*, la cui espressione venga indotta/modulata a seguito della parassitizzazione. A questo scopo, una seconda libreria di piccoli RNA, da me già generata a partire da emociti di larve non parassitizzate, verrà sottoposta a sequenziamento ed analisi. Dal confronto con i dati di sequenza già ottenuti per le larve parassitizzate, sarà possibile stilare una lista di piccoli RNA non codificanti, differenzialmente espressi in larve parassitizzate e non.

E' evidente che i componenti di questa lista saranno molecole potenzialmente coinvolte nell'alterazione funzionale degli emociti durante la parassitizzazione.

A prescindere da quelli che potranno essere i futuri sviluppi del mio lavoro, i dati di sequenza ottenuti dalla libreria delle larve parassitizzate mi hanno già permesso di identificare una collezione di piccoli ncRNA prodotti dal *TnBV*, fra cui 5 putativi miRNA.

La selezione di questi possibili candidati è stata effettuata sottoponendo sia le sequenze della libreria sia il genoma del *TnBV*, ad una serie di analisi bioinformatiche.

In particolare, per l'identificazione dei miRNA, sono stati utilizzati metodi computazionali per la predizione di strutture secondarie a "stem-loop", caratteristiche dei precursori dei miRNA maturi.

Analisi trascrizionali sono state condotte allo scopo di valutare se le regioni del genoma del *TnBV*, situate a cavallo dei 5 putativi microRNA identificati, vengono trascritte negli emociti di larve parassitizzate. Inoltre, sono stati tracciati i profili trascrizionali di tutte le regioni intergeniche del *TnBV* contenenti sequenze di putativi piccoli ncRNA situate ad una distanza di almeno 200 basi da geni codificanti per proteine o anche solo putative ORF. Infine, è stata saggiata l'attività trascrizionale di regioni genomiche del *TnBV* prive di geni predetti, siano essi geni codificanti per proteine o putativi piccoli ncRNAs.

Le analisi condotte su questa larga frazione del genoma del *TnBV* indicano che una buona parte delle regioni non codificanti è trascritta negli emociti delle larve parassitizzate. Questo risultato inaspettato solleva diverse questioni riguardanti: 1) il significato funzionale di una trascrizione così generalizzata e 2) la possibile esistenza di meccanismi in grado di discriminare, tra tutte le sequenze trascritte, le molecole di RNA biologicamente attive, permettendo, ad esempio, la loro selettiva traslocazione nucleo-citoplasmatica. Esperimenti condotti sulle differenti frazioni di RNA nucleare e citoplasmatico permetteranno di vagliare questa ipotesi.

E' inoltre necessario allestire opportune prove funzionali con cui saggiare direttamente il ruolo dei ncRNA del *TnBV*, a cominciare dai putativi miRNA, nei processi di regolazione della fisiologia dell'ospite.

Un precedente studio condotto nel nostro laboratorio ha portato all'identificazione di una sequenza del *TnBV*, trascritta negli emociti di larve di *H. virescens* parassitizzate in un RNA non codificante avente come bersaglio un gene dell'ospite implicato nella risposta immunitaria.

Di fatto, questo studio rappresenta un solido argomento a sostegno dell'ipotesi che vede il genoma del *TnBV* impegnato nella produzione di molecole di ncRNA capaci di alterare importanti processi biologici delle larve di *H. virescens* ed in particolare capaci di inibire il sistema immunitario. Esistono però anche altre considerazioni a sostegno di questa ipotesi.

E' ad esempio noto che i microRNA sono dotati di caratteristiche peculiari che rendono particolarmente conveniente per i virus la loro inclusione all'interno dei loro genomi: 1) Possono essere di fatto impiegati nella regolazione di geni specifici dell'ospite al fine di creare un ambiente favorevole per la replicazione virale; 2) sono molecole di piccola taglia: le dimensioni minime richieste affinché un pri-miRNA

sia funzionale sono <200 nt, ideali per le ridotte dimensioni che spesso caratterizzano i genomi virali; 3) l'evoluzione di miRNA complementari a nuovi geni bersaglio può presumibilmente essere portata a compimento più velocemente rispetto all'evoluzione di nuove proteine regolatrici; 4) i miRNA non sono molecole antigeniche (*Umbach e Cullen, 2009*).

Inoltre, i miRNA di origine virale sono spesso coinvolti nell'inibizione di fattori cellulari implicati nella regolazione dell'apoptosi e nella modulazione della risposta immunitaria antivirale, sia innata che acquisita. Infatti, interferendo con l'apoptosi, eludendo la risposta immunitaria dell'ospite e "autoregolando" l'espressione dei propri geni, i virus prolungano la vita delle cellule infette e rendono massimo il loro potenziale di replicazione (*Umbach e Cullen, 2009*).

Un esempio di regolazione dell'apoptosi include PUMA, un fattore pro-apoptotico identificato recentemente come bersaglio del miR-BART5, dell'Herpesvirus EBV. L'inibizione di PUMA ad opera del miRNA inibisce l'istaurarsi di fenomeni di morte cellulare programmata in cellule infettate da EBV (*Choy et al. 2008*).

Inoltre, Stern-Ginossar *et al.* (2007) hanno dimostrato che il citomegalovirus dell'uomo, hCMV, ha sviluppato una specifica strategia di evasione della risposta immunitaria che vede la partecipazione di un miRNA. L'esposizione di cellule ad un'infezione virale induce l'espressione della proteina MICB, capace di attivare le cellule natural killer (NK) responsabili della soppressione delle cellule infette (*Umbach e Cullen, 2009*). Quindi, hCMV inibisce l'espressione di MICB attraverso l'azione combinata di una sua proteina specifica, HCMV UL16, e del microRNA miR-UL112 che ha un sito bersaglio nel 3'UTR del gene codificante per MICB (*Stern-Ginossar et al., 2007*).

Considerando che i PDVs causano lesioni multiple alla risposta immunitaria cellulare ed umorale dell'ospite, risulta plausibile la

partecipazione di putativi miRNA a tali fenomeni. Nel caso dei putativi miRNA identificati nel *TnBV*, esperimenti di interferenza *in vivo* potranno servire a far luce su questo punto. In parallelo, attraverso la ricerca e l'identificazione di potenziali bersagli molecolari fra gli mRNA dell'ospite si potrà incominciare a delineare possibili meccanismi di azione.

Le informazioni derivanti dagli studi funzionali delle regioni non codificanti del genoma del *TnBV* dovranno poi essere integrate con le informazioni relative alle attività biologiche dei prodotti proteici virali.

Nel quadro di una conoscenza sempre più approfondita delle strategie di regolazione dell'ospite messe in atto dal *TnBV* per creare condizioni ottimali per lo sviluppo della progenie del parassitoide si potrà arrivare ad individuare nuove molecole ad azione immunomodulante e svelare potenziali sinergie fra fattori proteici e ncRNA.

BIBLIOGRAFIA

- Acharya, A., Gopinathan, K.P., **2002**. Characterization of late gene expression factors lef- 9 and lef-8 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 8), 2015–2023.
- Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K. and Moller N. P., **2001**. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7117-7136.
- Asgari, S., Hellers, M. & Schmidt, O., **1996**. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. *J. Gen. Virol.* **77**, 2653–2662.
- Asgari S., Schmidt O. & Theopold, U., **1997**. A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. *J. Gen. Virol.* **78**, 3061–3070.
- Asgari S., Theopold U., Wellby C., Schmidt O. **1998**. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3690–95.
- Asgari S, Zareie R, Zhang G, Schmidt O. **2003b**. Isolation and characterization of a novel venom protein from an endoparasitoid, *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 53:92.100.
- Asgari S., **2006**. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 61:146.156.
- Asgari S., Sullivan C.S., **2010**. Role of MicroRNAs as regulator of host-virus interactions. In: *Insect Virology*, 15: 347-365.
- Asgari S. and Rivers D.B., **2011**. Venom Proteins from Endoparasitoid Wasps and Their Role in Host-Parasite Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 56:313–35.

- Askew R.P., Shaw M.R., **1986**. Parasitoid communities: their size, structure and development. See Ref. 155, pp.226-63.
- Bart S., Pfuhl T., Mamiani A., Eheses C., Roemer K., Kremmer E., Jaker C., Hock J., Meister G., Grasser F.A. **2008**. Epstein-Barr virus encoded miRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* 36:666-675.
- Bartel D.P., **2004**. MicroRNA: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*, 116: 281–297.
- Beard, R. L., **1978**. Venom of Braconidae. In *Arthropod Venoms* (S. Bettini ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 773–800.
- Beck M., Theopold U., Schmidt O., **2000**. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens* *Journal of Insect Physiology.* 46:1275–1283.
- 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. *Physiological Entomology* **29 (4)**: 335-343.
- Bergmann, A., Stein, D., Geisler, R., Hagenmaier, S., Schmid, B., Fernandez, N., Schnell, B., and Nusslein-Volhard, C. **1996**. A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 60: 109–123.
- Berninger P., Gaidatzis D., van Nimwegen E., Zavolan M., **2008**. Computational analysis of small RNA cloning data. *Methods* 44: 13–21.
- Bezier A, Annaheim M, Herbinriere J, Wetterwald C, Gyapay G, et al. , **2009**. Polydnviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*, 323: 926–930.
- Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. **2007** Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*;447:799–816.

- Bushati N., Cohen S.M., **2007**. MicroRNA function. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 23, 175-205.
- Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ & Hannon GJ. **2002**. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2733–2742.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, *et al.* **2005**.The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*; 309:1559–1563.
- Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, *et al.* **2006**. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet*;38:626–635.
- Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, *et al.* **2005**.Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*; 308:1149–1154.
- Choi JY, Roh JY, Kang JN, Shim HJ, Woo SD, Jin BR, Li MS, Je YH, **2005**. Genomic segments cloning and analysis of *Cotesia plutellae* polydnavirus using plasmid capture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 487-493.
- Choy EY, Siu KL, Kok KH, Lung RW, Tsang CM, To KF, Kwong DL, Tsao SW, Jin DY. **2008**. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 205: 2551–2560.
- Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, *et al.* **2008**. Stem cell transcriptome profiling via massivescale mRNA sequencing. *Nat Methods*;5:613–619.
- Cônsoli, F.L., Brandt, S.L., Coudron, T.A., Vinson, S.B., **2005**. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*–*Heliothis virescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142B, 181–191.
- Cônsoli F.L., Lewis D., Keeley L., Vinson S.B., **2007**. Characterization of a cDNA encoding a putative chitinase from teratocytes of the endoparasitoid *Toxoneuron nigriceps*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 271–278.

- Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT. **2008**. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science*; 322:1845–1848.
- Cui L., Webb B.A, **1997**. Isolation and characterization of member of cysteine-rich gene family from *Campoletis sonorensis* polydnavirus. *J. Insect Physiol.* 46, 1397-1407.
- Cullen B.R., **2009**. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature.* 457, 421-425.
- Dahlman D. L., Rana R. L., Schepers E. J., Schepers T., DiLuna F. A. and Webb B. A., **2003**. A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. *Insect Molecular Biology* , **12** (5), 527–534.
- 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, D.H., Vinson, S.B., **1986**. Passive evasion by eggs of braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation *in vitro* by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. *J. Insect Physiol.* **32**: 1003-1010.
- de Buron, I. and 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**: 915–930.
- De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B, **2001**. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12590–12595.
- De Gregorio E., Spellman P.T., Tzou P., Rubin G.M. and Lemaitre B. **2002**. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal.* 21,11: 2568±2579.
- Desjardins CA, Gundersen-Rindal DE, Hostetler JB, Tallon LJ, Fadrosh DW, Fuester RW, Pedroni MJ, Haas BJ, Schatz MC, Jones KM, Crabtree J,

- Forberger H, Nene V. **2008**. Comparative genomics of mutualistic viruses of *Glyptapanteles* parasitic wasps. *Genome Biol.* 9, R183.
- Ding S.W., Voinnet O., **2007**. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs, *Cell.* 130(3):413-426.
- Dow, J.A.T., **1986**. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**: 187-328.
- Edeson K.M., Vinson S.B., Stolz D.B., Summer M.D., **1981**. Virus in parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in parasitoid's host. *Scienze.* 211: 582-583.
- Espagne E, Dupuy C, Huguet E, Cattolico L, Provost B, Martins N, Poirie M, Periquet G., Drezen JM, **2004**. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* 306, 286-289.
- 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., 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. of Insect Bioch. and Phy.* 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., **2007**. A γ -Glutamyl Transpeptidase of *Aphidius ervi* induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 456-465.
- Feddersen KS, Schmidt O., **1986**. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. *Experientia.* 42:1278-1280.
- Ferrarese, R., Brivio, M., Congiu, T., Falabella, P., Grimaldi, A., Mastore, M., Perletti, G., Pennacchio, F., Sciacca, L., Tettamanti, G., Valvassori, R., de Eguileor, M., **2005**. Early suppression of immune response in

- Heliothis virescens* larvae by the endophagous parasitoid *Toxoneuron nigriceps*. *Inv. Surv. J.* **2**: 60-68.
- Gruber A., Stettler P., Heiniger P., Schumperli D., Lanzrein B., **1996**. Polydnavirus DNA of the braconid wasp *Chelonus inanitus* is integrated in the wasp's genome and excised only in the later pupal and adult stages of the female. *J. Gen. Virol.* **77**, 2873-2879.
- Gundersen-Rindal DE, Pedroni MJ, **2010**. Larval stage *Lymantria dispar* microRNAs differentially expressed in response to parasitization by *Glyptapanteles flavicoxis* parasitoid. *Archives of Virol.* **155**, 783-787.
- Gupta A., Gartner J.J., Sethupathy P., Hatzigeorgiou A.G., Fraser N.W., **2006**. Antiapoptotic function of microRNA encoded by HSV-1 latency-associated transcript. *Nature.* **442** (7098) 82-85.
- Hayakawa Y, Yazaki K. **1997**. Envelope protein of parasitic wasp symbiont virus, polydnavirus, protects the wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect. *Eur. J. Biochem.* **246**:820–26. Erratum. 1997. *Eur. J. Biochem.* **248**(3):947.
- Hartzer K.L., Zhu K.Y., and Baker J.E., **2005**. Phenoloxidase in Larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Molecular Cloning of the Proenzyme cDNA and Enzyme Activity in Larvae Paralyzed and Parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* **59**:67–79.
- Hilgarth R.S., Webb B.A., **2002**. Characterization of *Campoletis sonorensis* ichnovirus segment I genes as members of the repeat element gene family. *Journal of General Virology.* **83**, 2393-2402.
- Hoffmann, JA, **2003**. The immune response of *Drosophila*. *Nature* **42**, 33–38.
- Hussain M., Talf R.J., Asgari S., **2008**. An insect virus-encoded miRNA regulates viral replication. *J. Virol.* **82**:9164-9170.
- Hussain M., Asgari S., **2010**. Functional analysis of a cellular microRNAs in insect host-ascovirus interaction. *J. Virol.* **85**, 612-620.
- Johnson JM, Edwards S, Shoemaker D, Schadt EE. **2005**. Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments. *Trends Genet*; **21**:93–102.

- Iovino N., Pane A. and Gaul U., **2009**. miR-184 Has Multiple Roles in Drosophila Female Germline Development. *Developmental Cell* 17 (21), 123–133.
- Kang, W., Kurihara, M., Matsumoto, S., **2006**. The BRO proteins of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus are nucleocytoplasmic shuttling proteins that utilize the CRM1-mediated nuclear export pathway. *Virology* 350 (1), 184–191.
- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, *et al.* **2007**. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*; 316:1484–1488.
- Kim, V. N. , **2005**. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells* **19**, 1–15.
- Kim, V. N. , **2004**. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *TRENDS in Cell Biology*. 14:4. 156-159.
- Labrosse C., Carton Y., Dubuffet A., Drezen J.M., Poirie M. **2003**. Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 49:513–22.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T., **2001**. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294,853-858.
- 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., Strand M.R., **2002**. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**: 1295-1309.
- Lee, C. Y., Baehrecke, E.H., **2001**. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Dev. Biol.* **128**: 1443-1455.

- Lee, C. Y., Cooksey, B. A., Baehrecke, E. H., **2002**. Steroid regulation of midgut cell death during *Drosophila* development. *Dev. Biol.* **250**: 101–111.
- Lei, E.P. and Silver, P.A., **2002**. Protein and RNA export from the nucleus. *Dev. Cell* **2**, 261–272.
- Lewis WJ & Vinson SB, **1968**. Egg and larval development of *Cardiochiles nigriceps*. *Annals of the Entomological Society of America*. **61**: 561–565.
- Li X, Webb B A, **1994**. Apparent functional role for a cysteine-rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response. *J. Virol.* **68**, **11**: 7482-7489.
- Li, S., Falabella, P., Giannantonio, S., Fanti, P., Battaglia, D., Digilio, M. C., Völkl, W., Sloggett, j. J., Weisser, W. & Pennacchio, F., **2002**. Pea aphid clonal resistance to the endophagous parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Insect Physiology*, **48**: 971-980.
- 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 P., Peng J., Hu J., Xu Z., Xie W., Yuan L., **2011**. Localized expression pattern of miR-184 in *Drosophila*. *Mol Biol Rep.* **38**:355–358.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E & Sattler M., **2003**. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* **426**, 465–469.
- Loret, S. M., Strand, M. R., **1998**. Follow-up of protein release from *Pseudoplusia includens* hemocytes a first step toward identification of factors mediating encapsulation in insects. *Eur. J. Cell. Biol.* **76**: 146-155.
- Luckhart, S. Webb, B.A., 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. *Developmental and Comparative Immunology* **20**: 1–21.

- Marco A., Hui J.H.L., Ronshaugen M. and Griffiths-Jones S., **2010**. Functional Shifts in Insect microRNA Evolution, *Genome Biol. Evol.* 2:686–696.
- Marris G.C., Weaver R.J., Edwards J.P., **2001**. Endocrine interactions of ectoparasitoid wasps with their hosts; an overview. See Ref. 47, pp. 133–51
- Murphy N., Banks J.C., Whitfield J.B., Austin A.D., 2008. Phylogeny of the parasitic microgastroid subfamilies (Hymenoptera: Braconidae) based on sequence data from seven genes, with an improved time estimate of the origin of the lineage. *Mol Phylogenet Evol.* 47: 378–395.
- Moreau SJM, Dingremont A, Doury G, Giordanengo P. **2002**. Effects of parasitism by *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae) on the development, survival and activity *Drosophila melanogaster* larvae. *J Insect Physiol* 48:337.347.
- Moreau S.J.M., Guillot S., **2005**. Advances and prospects on biosynthesis, structures ad functions of venom protein from parasitic wasps. *Insect Biochem. Mol.* 35, 1209-1223.
- Norton, W.N. and Vinson S.B., **1983**. Correlating the initiation of virus replication with specific pupal developmental phase of an ichneumonid parasitoid. *Cell tissue res.* 231, 387-398.
- Parthasarathy, R., Palli, S. R., **2007**. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mech. Dev.* 124: 23-34.
- Pearl, L. H. and Taylor, W. R., **1987**. A structural model for the retroviral proteases. *Nature* 329: 351-354.
- Pech, L. L., Strand, M. R., **1996**. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J. Cell. Sci.* 109: 2053-2060.
- 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. *Journal of Insect Physiology* 49: 1063-1071.
- 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., **1994b**. 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., **1994a**. 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.
- 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., 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., Fanti, P., Falabella, P., Digilio, M. C., Bisaccia, F., & Tremblay, E., **1999**. Development and nutrition of the braconid

- wasp *Aphidius ervi* in aposymbiotic host aphids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 40: 53-63.
- 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. & Strand, M. R., **2006**. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entom.* 51: 233-258. 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.
- Pfeffer S., Zavalone M., Grasser F.A., Chein M., Russo J.J., Ju J.Y., John B., Enright A.J., Marks D., Sander C., et al., **2005**. Identification of microRNAs of herpesvirus family. *Nat.Metch.* 2, 269-276.
- Piek T, Spanjer W, **1986**. Chemistry and pharmacology of solitary wasp venoms. In: Piek T (ed) *Venoms of the Hymenoptera*. *Academic Press*, London, pp 161–307.
- Poirié M, Carton Y, Dubuffet A., **2009**. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *Comptes rendus - Biologies*, 332 (2-3), pg. 311-320
- Quicke D.L.J., **1997**. *Parasitic Wasp*. Chapman and Hall. Cambridge.
- Quistad GB, Nguyen Q, Bernasconi P, Leisy DJ. 1994. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochem Mol Biol* 24:955.961.
- Richards E.H., Parkinson N.M. **2000**. Venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* adversely affects the morphology, viability, and immune function of hemocytes from larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *J. Invertebr. Pathol.* 76:33–42.

- Ritchie W.Theodule F.X. and Gautheret D.,**2008**. Mireval: a web tool for simple microRNA prediction in genome sequenze. *Genome analysis*. 24(11)1394–1396.
- Ro S, Park C, Young D, Sanders KM & Yan W., **2007**. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 5944–5953.
- 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? *Journal of Insect Physiology* **45**.
- Ruby J.G., Stark A., Johnston W.K., Kellis M., Bartel D.P. and Lai E.C., **2007**. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Research* 17:1850–1864.
- Rappuoli R, Montecucco C., **1997**. Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. *Oxford University Press*, Oxford.
- Salmols M.A., Hu J., Skalsky R.L., Renne R., **2005**. Cloning and identification of microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma associated herpevirus. *J. Virol.* 79: 9301-9305.
- Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S & Shimizu N., **2003**. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82, 323–330.
- Schepers, E. J., Dahlman, D. L , Zhang, D., **1998**. *Microplitis croceipes* teratocytes: in vitro culture and biological activity of teratocyte secreted protein. *Journal of Insect Physiology*. **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.
- Seila AC, Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, *et al.* **2008**. Divergent transcription from active promoters. *Science*; 322:1849–1851.

- Shaw, M. R. & Huddleston, T., **1991**. Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). Handbooks for the Identification of British Insects **7**, 11.
- Shoeman, R. L., Honer, B., Stoller, T. J., Kesselmeier, C., Miedel, M. C., Traub, P. and Graves, M. C., **1990**. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6336-6340.
- Sigova A, Rhind N & Zamore PD. **2004**. A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **18**, 2359–2367.
- Silverman, N. & Maniatis, T., **2001**. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**: 2321-2342.
- Singh, J., Nagaraju, J., **2008**. In silico prediction and characterization of microRNAs from red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Insect Mol. Biol.* **17** (4), 427–436.
- Singh J., Singh C.P., Bhavani A., Nagaraju J., **2010**. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology* **407** : 120–128.
- Skalsky R.L., Vanlandingham D.L., Scholle F., Higgs S., Cullen B.R., **2010**. Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*, *BMC Genomics*, **11**:119.
- Stark A., Kheradpour P., Parts L., Brennecke J., Hodges E., Hannon G.J., and Kellis M., **2007**. Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res.* **17**: 1865-1879.
- Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, et al. **2007**. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* **317**: 376–381.
- Stolz, D. B., Vinson S.B., **1979a**. Viruses and parasitism in insects. *Adv. Virus Res.* **24**, 125-171.

- Stoltz, D. B., **1986**. Interactions between parasitoid-derived products and host insects. *Journal of Insect Physiology* 32.
- 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, New York 1: 167–187.
- Strand, M.R., J.A. Johnson, T. Noda, and B.A. Dover. **1994**. Characterization of monoclonal antibodies generated against components of the venom of *Microplitis demolitor*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26: 123-136.
- Strand, M.R., R.A. Witherell and D. Trudeau. **1997**. Two related *Microplitis demolitor* polydnavirus mRNAs expressed in hemocytes of *Pseudoplusia includens* contain a common cysteine-rich domain. *J. Virol.* 71: 2146-2156.
- Strand M. R., **2008**. The insect cellular immune response. *The Insect Science.* 15, 1-14.
- Sluss, R., **1968**. Behavioral and anatomical responses of the convergent body beetle to parasitism by *Perilitus coccinellae* (Schrank). *Journal of Invertebrate Pathology* 10.
- Taft R.J., Pang K.C., Mercer T.R., Dinger M. and Mattick J.S., **2010**. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol.* 220: 126–139.
- Taft R.J., Pheasant M., Mattick J.S., **2007**. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays.* 29:3, 288–299.
- 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.
- Tanaka K., Matsumoto H., Hayakawa Y., **2002**. Detailed characterization of polydnavirus immunoevasive proteins in an endoparasitoid wasp. *Eur. J. Biochem.* 269:2557–66.
- Tanaka K, Lapointe R, Barney WE, Makkay AM, Stoltz D, Cusson M, Webb BA, **2007**. Shared and species-specific features among ichnovirus genomes. *Virology* 363, 26–35.

- Tang S., Bertke A.S., Patel A., Wang K., Cohen J.I., Krause P.R., **2008**. An acutely and latency expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neuro-virulence factor. *Proc Natl Acad Sci.* 105: 10931-10936.
- Theilman D.A., Summer M.D., **1987**. Physical analysis of *Campoletis sonorensis* virus multipartite genome and identification of a family of tandemly repeated elements. *J. Virol.* 61, 2589-2598.
- Theilman D.A., Summer M.D., **1988**. Identification and comparison of *Campoletis sonorensis* virus transcript expressed from four genomic segments in insect hosts *Campoletis sonorensis* and *Heliothis virescens*. *Virology.* 167, 329-341.
- Theopold U, Li D, Kinuthia W, Schmidt O., **2000**. Protection by immune disguise: a new lesson from a parasitoid wasp. In: Austin AD, Downton M, editors. *The Hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control*. Melbourne: CSIRO. p 23.28.
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M. L., Pennacchio, F., de Eguileor, M., **2007**. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell. Tissue Res.* 330: 345-359.
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Pennacchio, F., de Eguileor M., **2008**. *Toxoneuron nigriceps* parasitization delays midgut replacement in fifth-instar *Heliothis virescens* larvae. *Cell. Tissue Res.* 342: 345–359.
- Tremblay, E., & Calvert, D., **1972**. New cases of polar nuclear utilization in insects. *Annales de la Société Entomologique de France (Nouvelle Serie)* 8.
- Umbach J.L., Kramer M.F., Jurak I., Karnowski H.W., Coen D.M., Culle B.R., **2008**. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 454: 780-783.

- Umbach J.L., Cullen B.R., **2009**. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev.* 23:1151-1164.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology* 29: 1087-1096.
- Ventoso, I., Blanvo, R., Perales, C. and Carrasco, L., 2001. HIV-1 protease cleaves eukariotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12966-12971.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI & Moazed D. **2004**. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672–676.
- Viggiani G., **1997**. *Lotta biologica e integrata nella difesa fitosanitaria*. Liguori Editore, Napoli.
- Vinson, S.B., Pennacchio, F., Cònsoli, F.L., **2001**. The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective. In: Edwards, J.P., Weaver, R.J. (Eds.), *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 187– 206.
- Vinson S.B., Iwantsch G.F., **1980**. Host regulation by insect parasitoids. *Q. Rev. Biol.* 55:143–65.
- Vinson, S.B., **1994**. Parasitoid in vitro rearing: successes and challenges. In: Ochieng'-Odero, J.R.P. (Ed.), *Techniques of Insect Rearing for the Development of Integrated Pest and Vector Management Strategies*. ICIPE Science Press, Nairobi, Kenya, pp. 49–108.
- 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). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **21**.

- Volkoff, A.-N., Ravallec, M., Bossy, J.-P., Cerutti, P., Rocher, J., Cerutti, M. & Devauchelle, G., **1995**. The replication of *Hyposoter dydimator* polydnavirus: cytopathology of the calyx cells in the parasitoid. *Biological Cell* 83, 1±13.
- Volkoff A.N, Rocher J., Duonor-Cerutti M., Webb B.A., Hilgarth R., *et al.* **2002**. Evidence for a conserved polydnavirus gene family: homologs of the *CsIV* repeat element genes from two additional ichnoviruses. *Virology*. 300:316-331.
- Volkoff A.N, Jouan V., Urbach S., Samain S., Bergoin M., Wincker P., Demettre E., Cousserans F., Provost B., Coulibaly F., Legeai F., Bellevue C., Cusson M., Gyapay G., Drezen J.M., **2010**. Analysis of Virion Structural Components Reveals Vestiges of the Ancestral Ichnovirus Genome. *PLoS Pathog* 6(5): e1000923. doi:10.1371/journal.ppat.1000923.
- Webb B.A., Summers M.D., **1992**. Stimulation of PDV replication by 20-hydroxyecdysone. *Experientia*. 48, 1018-1022
- Webb, B. A. Luckhart, S., **1994**. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **26**: 137-163.
- Webb, B. A. Luckhart, S., **1996**. Factors mediating short- and long-term immune suppression in a parasitized insect. *Journal of Insect Physiology* **42**: 33-40.
- Webb B.A., Cui L., **1998**. Relationship between polydnavirus genomes and viral gene expression. *J. Insect Physiol.* **44**: 785-793.
- Webb, B.A., Beckage, N.E., Hayakawa, Y., Krell, P.J., Lanzrein, B., Stoltz, D.B., Strand, M.R. and Summers, M.D., **2000**. Polydnaviridae. In *Virus Taxonomy: the Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.S., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J.,

- Pringle, C.R. and Wickner, R.B., eds), pp. 253–260. Academic Press, San Diego, CA.
- Webb B.A., Strand M.R. **2005**. The biology and genomics of polydnaviruses. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, ed. LI Gilbert, K Iatrou, SS Gill, pp. 323–60. San Diego: Elsevier.
- Whitfield J.B., **2000**. In *The Hymenoptera: Evolution, Biodiversity, and Biological Control*, eds. Austin, A. D. & Downton, M. (CSIRO, Melbourne), pp. 97–105.
- Whitfield, J. B., Asgari, S., 2003. Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. *J. Insect Physiol.* **49**: 397-405.
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I., Diederichs S., **2009**. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell biology.* 11 , 3: 228- 234.
- Wong T.S., Liu X.B., Wong B.Y.H., Ng R.W.M., Yuen A.P.W. and Wei W.I., **2008**. MaturemiR-184 as Potential OncogenicmicroRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*;14(9)May 1.
- Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., Palli, S. R., **2006**. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev. Biol.* **123**: 530-547
- Wyder S., Tschannen A., Hochuli A., Gruber A., Saladin V., **2002**. Characterization of *Chelonus inanitus* polydnavirus segment: sequences and analysis, excision site and demonstration of clustering, *J. Gen. Virol.* 83: 247-256.
- Xu, D., Stoltz, D., **1993**. PDV genome segment families in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *J. Virol.* **67**:1340–49
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L & Zhou MM. **2003**. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468–474.
- Zambon R.A., Vakharia V.N., Wu L.P., **2006**. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Microbiology*, 8(5): 880-889.

- Zhang, D. and Dahlman, D.L., **1989**. *Microplitis croceipes* teratocytes cause developmental arrest of *Heliothis virescens* larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* **12**: 51–61.
- Zhang G, Lu Z-Q, Jiang H, Asgari S. **2004**. Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**:477–83.
- Zhang, D., Dahlman, D.L., Gelman DB, **1992**. Juvenile hormone esterase activity and ecdysteroid titer in *Heliothis virescens* larvae injected with *Microplitis croceipes* teratocytes. *Arch Insect Biochem Physiol.* **20**:231-242.
- Zhang, D., Dahlman, D.L., Järlfors, U.E., Southgate, H.H. and Wiley, S.P. **1994**. Ultrastructure of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Braconidae: Hymenoptera) teratocytes. *Intl J Insect Morph Embryol* **23**: 173–187.
- Zhang G, Schmidt O, Asgari S. **2004**. A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *J. Biol. Chem.* **279**:41580–85
- Zhang G, Schmidt O, Asgari S. **2006**. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Dev. Comp. Immunol.* **30**:756–64.
- Zuker M., **2003**. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**(13): 3406–3415.

