

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΝΟΣ lncRNA
ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΤΟΥ
ΚΟΥΝΟΥΠΙΟΥ ΤΙΓΡΗ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΘΗ ΧΑΛΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

Θέμα διπλωματικής εργασίας

«Μελέτη της επίδρασης ενός lncRNA στην ανάπτυξη των
ωοθηκών του κουνουπιού τίγρη»

«Investigation of the effect of a lncRNA on the ovaries'
development in tiger mosquito»

Ανθή Χαλού

Λάρισα 2020

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την ακαδημαϊκή χρονιά 2020 σε χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων τους μήνες Μάιο και Ιούνιο, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του καθηγητή κ. Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου και του υποψήφιου διδάκτορα κ. Αλέξανδρου Μπελαβίλα.

Τριμελής Επιτροπή

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας – Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Να ευχαριστήσω την μητέρα μου για το σχέδιο του κουνουπιού *Aedes albopictus* που εμφανίζεται στο εξώφυλλο της διπλωματικής εργασίας.*

Περίληψη

Το ασιατικό κουνούπι τίγρης ή *Aedes albopictus* αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία, καθώς είναι ένας από τους επιβεβαιωμένους φορείς αρμποϊών όπως αυτοί του Δάγκειου Πυρετού, του Chikungunya και του Δυτικού Νείλου. Εξαιτίας της φυσιολογικής και οικολογικής του πλαστικότητας, ο αριθμός του συνολικού πληθυσμού ολοένα και αυξάνεται. Η βασική στρατηγική αντιμετώπισης είναι τα χημικά εντομοκτόνα, ωστόσο, η πρόοδος της Μοριακής Βιολογίας και της Γονιδιωματικής έχει συστήσει μια σειρά οικολογικών και αποτελεσματικών τεχνολογιών για τον πληθυσμιακό έλεγχο, όπως η τεχνολογία σίγησης γονιδίων μέσω του μηχανισμού παρεμβολόμενου RNA (RNA interference). Η στοχευμένη σίγηση γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και την ανάπτυξη του εντόμου πιθανώς να οδηγήσει σε διατάραξη του φυσιολογικού φαινοτύπου και σε παρεμπόδιση αυτών των λειτουργιών.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αξιοποίηση της τεχνολογίας RNAi για την σίγηση ενός γονιδίου μη κωδικοποιητικού RNA (lncRNA), του Norma2, και η διερεύνηση της επίδρασης αυτής της σίγησης στο έντομο. Αυτό το γονίδιο επιλέχθηκε, διότι εντοπίζεται αποκλειστικά στο υπό μελέτη είδος και υπερεκφράζεται στις ωοθήκες μετά το γεύμα αίματος, δρώντας ενδεχομένως ρυθμιστικά στην ανάπτυξη των ωοθηκών ή τη διαδικασία της ωοαπόθεσης, καθιστώντας το έτσι ιδανικό στόχο για τη διατάραξη της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς του *Ae. albopictus*. Το πειραματικό πλάνο συμπεριλάμβανε την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA, τα οποία στόχευαν το παραπάνω γονίδιο και την χορήγηση τους σε θηλυκά κουνούπια μέσω μικροέγχυσης. Ακολούθως, παρατηρήθηκε ο φαινότυπος τόσο της ανάπτυξης των ωοθηκών όσο και της ωοαπόθεσης και απομονώθηκαν δείγματα ωοθηκών για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του Norma2. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η ιστοειδική έκφραση του γονιδίου και προσδιορίστηκε το προφίλ έκφρασής του.

Παρά το γεγονός ότι η παρατήρηση των φαινοτύπων και η μελέτη των επιπέδων έκφρασης έγιναν σε μικρή ομάδα ατόμων και ίσως χρειάζεται να επαναληφθούν κάποια πειράματα, τα αποτελέσματα παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η επιβεβαίωση της ιστοειδικής δράσης του γονιδίου-στόχου και η παρατήρηση διατάραξης του φυσιολογικού φαινοτύπου σε μερικές περιπτώσεις, υποδηλώνουν μια ενδεχόμενη ρυθμιστική δράση του γονιδίου στην έκφραση άλλων βασικών γονιδίων, υπεύθυνων για τη διαμόρφωση των ωοθηκών ή την ωοαπόθεση.

Abstract

The Asian tiger mosquito or *Aedes albopictus* poses a serious threat to public health, as it is one of the main vectors of arboviruses such as Dengue Fever, Chikungunya and West Nile. Due to its physiological and ecological plasticity, its population is constantly increasing throughout the globe. Advances in Molecular Biology and Genomics have introduced a number of ecological and effective population control technologies, in order to replace chemical insecticides, which are the current control tools. Gene silencing technology through the RNA interference mechanism is a very promising alternative as targeted silencing of genes that play an important role in insect survival and development is likely to disrupt the normal phenotype and inhibit these functions.

The purpose of this thesis was to knock-down a long non-coding RNA (lncRNA) gene, Norma2, through RNAi, and investigate the effect of this silencing on the insect. This gene was chosen due to its species-specificity and overexpression in the ovaries after a blood meal, possibly acting as a regulator of ovarian development or the oviposition process and making it the ideal target for disrupting *Ae. albopictus* reproductive behavior. The experimental plan involved the production of double-stranded RNA molecules, which targeted the above gene and their administration to female mosquitoes by microinjection. Subsequently, the phenotype of both ovarian development and oviposition was observed and ovarian samples were isolated to study Norma2 expression levels. At the same time, the tissue-specific expression of the gene was confirmed and its expression profile was determined.

Although the observation of phenotypes and the study of expression levels were applied in a small group of individuals and some experiments may need to be repeated, the results were particularly interesting. Confirmation of the tissue-specific activity of the target gene and observation of normal phenotype's disruption, in some cases, suggest a possible regulatory effect of the gene on the expression of other key genes responsible for ovarian formation or oviposition.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	7
1.1. <i>Aedes albopictus</i>	7
1.1.1. Προέλευση & Εξάπλωση	7
1.1.2. Φορέας ασθενειών	8
1.1.3. Βιολογικός κύκλος	9
1.2. Ανάπτυξη των ωοθηκών – Βιτελλογένεση	11
1.2.1. Αυτογονία	12
1.2.2. Ο κύκλος της βιτελλογένεσης	12
1.2.3. Μορφολογία	14
1.3. Τρόποι αντιμετώπισης	16
1.3.1. Μηχανισμός RNAi	19
1.3.1.1. Φυσιολογικός ρόλος	19
1.3.1.2. Μηχανισμός δράσης	20
1.4. Long non-coding RNAs	22
1.4.1. Εισαγωγικά στοιχεία	23
1.4.2. Ταυτοποίηση lncRNAs	24
1.4.3. Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης	24
1.4.4. lncRNAs στα έντομα	26
1.5. Αξιοποίηση του RNAi στον έλεγχο του πληθυσμού εντόμων	28
1.5.1. Τρόποι εισαγωγής του dsRNA	28
1.5.1.1. Η μέθοδος της μικροένεσης	31
2. Σκοπός	33
3. Μέθοδοι & Υλικά	34
3.1. Συνθήκες εκτροφής του εργαστηριακού πληθυσμού <i>Ae. albopictus</i>	34
3.2. Μέθοδοι χειρισμού νουκλεϊκών οξέων	34
3.2.1. Απομόνωση RNA (RNA extraction) από το κουνούπι <i>Aedes albopictus</i>	34
3.2.2. Επώαση με DNase (DNase treatment)	35
3.2.3. Σύνθεση cDNA	37
3.2.4. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis)	38
3.2.5. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)	39

3.3. Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων	40
3.3.1. Σχεδιασμός εκκινητών	40
3.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	42
3.3.2.1. PCR με τη χρήση T7 εκκινητών	44
3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	44
3.4. Μέθοδοι παραγωγής dsRNA	46
3.4.1. <i>In Vitro</i> Transcription	46
3.4.2. Επώαση με DNase & κατακρήμνιση dsRNA	46
3.5. Μέθοδος χορήγησης dsRNA: Μικροενέσεις	47
4. Αποτελέσματα	48
4.1. Ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου και επιβεβαίωση της ενίσχυσης.....	48
4.2. Παραγωγή dsRNA και ηλεκτροφόρηση τους.....	49
4.3. Ενίσχυση τμήματος GFP και παραγωγή dsRNA	49
4.4. Χορήγηση των dsRNAs (Norma2 & GFP) και παρατήρηση φαινοτύπου	50
4.5. Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης qPCR	52
4.6. Ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου	53
4.6.1. Σε επίπεδο ιστών (ovaries & carcass).....	53
4.6.2. Στις ωοθήκες.....	54
4.7. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μετά τη χορήγηση dsRNA.....	55
4.8. Διερεύνηση της ικανότητας απόθεσης αυγών	56
5. Συζήτηση	59
6. Βιβλιογραφία	62

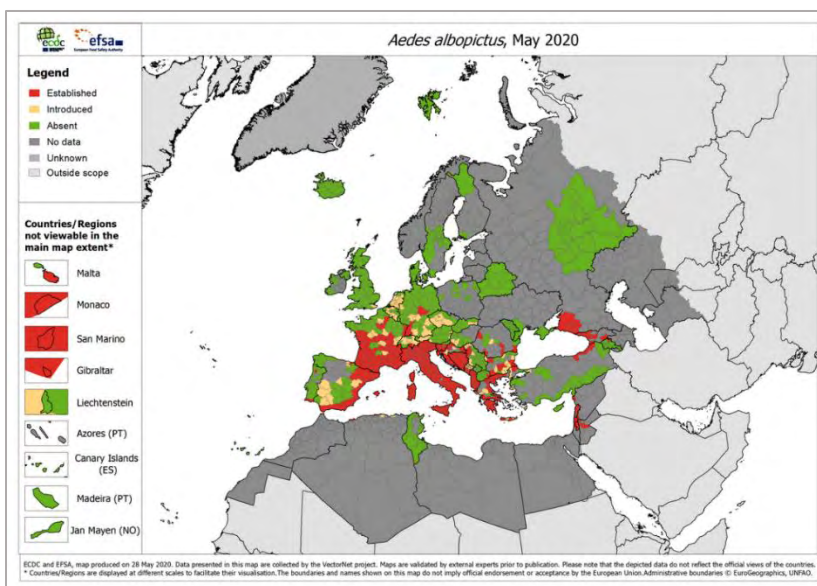
1. Εισαγωγή

1.1. *Aedes albopictus*

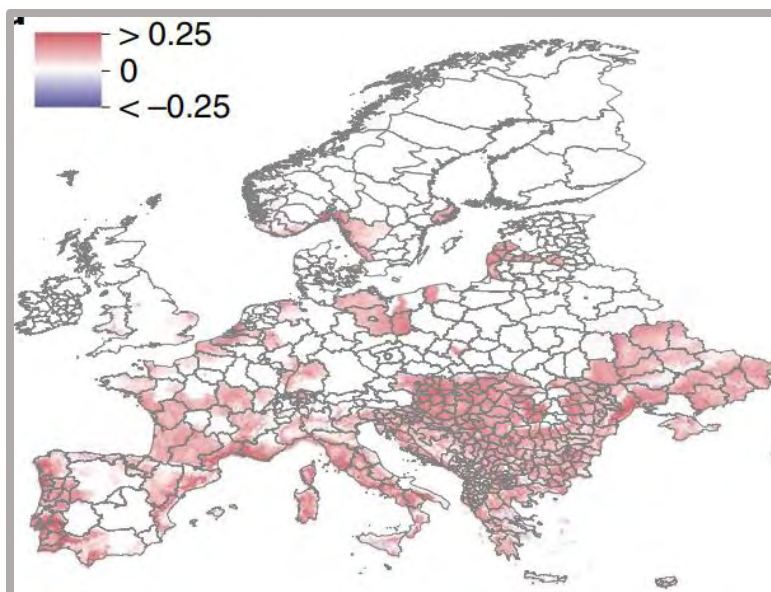
Το κουνούπι *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), επίσης γνωστό και ως Ασιατικό κουνούπι τίγρης (λόγω των χαρακτηριστικών ριγών που παραπέμπουν στη τίγρη), είναι δίπτερο έντομο που ανήκει στην οικογένεια των *Culicidae* και πιο συγκεκριμένα στο γένος *Aedes*, μαζί με το κουνούπι *Aedes aegypti*. Αν και τα ενήλικα κουνούπια συνήθως τρέφονται με το νέκταρ των λουλουδιών, τα θηλυκά τρέφονται επιπλέον με αίμα από διάφορα ζώα, κυρίως θηλαστικά, καθιστώντας τα ικανά να μεταφέρουν και να μεταδώσουν ασθένειες (Wu et al., 2019).

1.1.1. Προέλευση & Εξάπλωση

Το συγκεκριμένο κουνούπι προέρχεται από τις τροπικές περιοχές της Νοτιοανατολικής Ασίας, αλλά πλέον έχει εξαπλωθεί σε 28 χώρες, με αποτέλεσμα να εντοπίζεται σε όλες τις ηπείρους εκτός της Ανταρκτικής (Kauffman et al., 2017). Όσον αφορά την Ευρώπη, το κουνούπι πρωτοεμφανίστηκε στην Αλβανία το 1979 και αργότερα το 1990 στην Ιταλία. Οι πρώτες καταγραφές στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκαν το 2003 στη Θεσπρωτία και στην Κέρκυρα, ενώ, από τότε, το *Ae. albopictus* επεκτάθηκε σε πολλούς νομούς (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005; Badieritakis et al., 2017). Η παγκόσμια εξάπλωσή του, που λαμβάνει μέρος τις τελευταίες δεκαετίες, οφείλεται κυρίως στο παγκόσμιο εμπόριο, στον τουρισμό, αλλά και στην ικανότητα του εντόμου να προσαρμόζεται και να αναπαράγεται σε ποικίλα περιβάλλοντα, δεδομένα που θα εξηγηθούν παρακάτω (Cunze et al., 2016). Σύμφωνα με τους Kraemer et al. (2019), ακόμη και υπό τις δεδομένες κλιματικές συνθήκες και την πυκνότητα του ανθρωπίνου πληθυσμού ανά ήπειρο, το *Ae. albopictus* θα συνεχίζει να εξαπλώνεται τις επόμενες δεκαετίες σε παγκόσμιο επίπεδο, γεμίζοντας κατάλληλα ενδιαιτήματα που μέχρι τότε ήταν ανεκμετάλλευτα και συνεχίζοντας να αποτελεί απειλή της δημόσιας υγείας. Στις παρακάτω εικόνες (1 και 2) παρουσιάζονται η τωρινή κατάσταση εξάπλωσης του κουνουπιού, όπως καταγράφηκε τον Μάιο του 2020 (Εικόνα 1) και η προβλεπόμενη κατάσταση εξάπλωσης μέχρι το 2050, σύμφωνα με ένα μέσο σενάριο εξέλιξης του κλίματος (RCP 6.0) (Εικόνα 2) σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Η επέκταση του *Aedes albopictus* σε όλο το ευρωπαϊκό έδαφος είναι διακριτή και τελικά θα καταφέρει να εξαπλωθεί σε περιοχές της Γερμανίας, της Γαλλίας, αλλά και πολλών βαλκανικών χωρών που στον πρώτο χάρτη είναι με πράσινο χρώμα και το κουνούπι απουσιάζει προς το παρόν απ' αυτές.



Εικόνα 1. Κατανομή του *Aedes albopictus* κατά την καταγραφή το Μάιο του 2020 (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-may-2020>)



Εικόνα 2. Προβλεπόμενη επέκταση του *Aedes albopictus* στην Ευρώπη μεταξύ 2020 και 2050 υπό το σενάριο μεσαίου κλίματος RCP 6.0, δηλαδή στην περίπτωση που οι εκπομπές αερίων κορυφώνονται το 2080 (Kraemer et al., 2019)

1.1.2. Φορέας ασθeneιών

Το *Aedes albopictus* τείνει να τρέφεται σε εξωτερικό χώρο καιτσιμπάει κυρίως πολύ νωρίς το πρωί και αργά το απόγευμα, αν και έχουν καταγραφεί διάφορες εξαιρέσεις σε αυτόν το πρότυπο, αναλόγως την εποχή, την περιοχή, την διαθεσιμότητα σε ξενιστές και το ανθρώπινο περιβάλλον. Επίσης, διαθέτοντας αυτή την ελαστικότητα ως προς την επιλογή της τροφής του, το κουνούπι τρέφεται με το αίμα πολλών διαφορετικών ζώων. Παρότι προτιμούν το αίμα των θηλαστικών, τα κουνούπια μπορούν να τραφούν με το αίμα διαφόρων σπονδυλωτών, θερμόαιμων και ψυχρόαιμων, περιλαμβάνοντας πουλιά, αμφίβια και ερπετά. Όλη αυτή η ελαστικότητα και το μεγάλος εύρος επιλογών οδηγεί στη βασική επίπτωση, τη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών τόσο μεταξύ ζώων όσο και μεταξύ ζώων και ανθρώπων (Paupy et al., 2009).

Πιο συγκεκριμένα, το κουνούπι μπορεί να μεταδώσει αρμποϊούς (arboviruses = arthropod-borne viruses), δηλαδή ιούς που μεταδίδονται μέσω των αρthropόδων. Έχει δειχθεί από εργαστηριακές μελέτες ότι το κουνούπι έχει την ικανότητα να μεταδώσει τουλάχιστον 26 αρμποϊούς από 5 διαφορετικές οικογένειες (Paupy et al., 2009; Bonizzoni et al., 2013). Σημαντικότεροι εξ αυτών είναι ο ιός του Δάγκειου πυρετού (DENV), του κίτρινου πυρετού (YFV), του chikungunya (CHIKV) και του ιού Zika. Επιπλέον, άλλοι σημαντικοί ιοί όπως ο ιός ανατολικής εγκεφαλίτιδας ιπποειδών (EEEV), ο ιός La Crosse (LACV), ο ιός εγκεφαλίτιδας ιπποειδών της Βενεζουέλας (VEEV), ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) και ο ιαπωνικός ιός της εγκεφαλίτιδας (JEV) έχουν συσχετιστεί με το κουνούπι αυτό (Paupy et al., 2009). Αν και το *Aedes albopictus* δεν θεωρείται τόσο αποτελεσματικός φορέας του δάγκειου πυρετού όσο το *Aedes aegypti*, αποτέλεσε αποκλειστικό ή επικρατή φορέα σε πρόσφατες εκδηλώσεις του δάγκειου πυρετού στη Χαβάη, στη κεντρική Αφρική και τη Νότια Ασία, αλλά και στην Ευρώπη για πρώτη φορά (Paupy et al., 2009; Bonizzoni et al., 2013). Σύμφωνα με τους Bonizzoni et al. (2013), φυλογενετικές αναλύσεις αυτών των

εξάρσεων του δάγκειου πυρετού, οδήγησε στην παρατήρηση ύπαρξης συγκεκριμένης μετάλλαξης που επέτρεψε την αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού του ιού και μετάδοσης σε άλλους οργανισμούς.

Αυτή η δυναμική ως προς την ικανότητα μετάδοσης του ιού για το κουνούπι *Ae. albopictus*, σε συνδυασμό με την μεγάλη ποικιλία αρμοπιδίων που υπάρχει και μπορεί να μεταφέρει, μόνο ανησυχία μπορεί να προκαλέσει και τονίζει τη σημασία ελέγχου των πληθυσμών του εντόμου (Bonizzoni et al, 2013).

1.1.3. Βιολογικός κύκλος

Ο κύκλος ζωής των κουνουπιών *Aedes* χαρακτηρίζεται από σημαντικές αλλαγές τόσο στο σχήμα και τη λειτουργία του οργανισμού όσο και στο περιβάλλον που αναπτύσσονται και επιβιώνουν. Η συνεχής μεταμόρφωση που υφίσταται το κουνούπι *Aedes* το καθιστά ένα ολομετάβολο έντομο (Kauffmann et al., 2017). Αποτελείται από τέσσερα διακριτά αναπτυξιακά στάδια:

- i. **Αυγό (Egg).** Παράγονται από τα θηλυκά άτομα έπειτα από το ζευγάρωμα τους με ένα αρσενικό άτομο και την άντληση αίματος. Επιπρόσθετα, τα θηλυκά άτομα τείνουν να αποθέτουν τα αυγά τους (50-120 τη φορά) σε επιφάνειες κοντά σε νερό, δηλαδή σε διάφορα φυσικά ή τεχνητά δοχεία όπως σε κορμούς μπαμπού και σε λιμνάζοντα, πεταμένα λάστιχα αυτοκινήτων (Εικόνες 4 και 5 αντίστοιχα) (Gao et al., 2019; Paury et al., 2009). Τα γόνιμα αυγά είναι μαύρα, οβάλ και με μέσο μήκος 0,5 mm. Μετά από μερικές μέρες και αφού το νερό έχει καλύψει τα αυγά, γίνεται η εκκόλαψη και η έκδυση (hatching) του επόμενου σταδίου, αυτού της προνύμφης (Lopez et al., 2019).



Εικόνες 3 και 4. Παραδείγματα τοποθεσιών ιδανικών για απόθεση αυγών από το *Aedes albopictus*: α) κομμένα μπαμπού, β) λάστιχα αυτοκινήτων

- i. **Προνύμφη (Larva).** Χωρίζεται σε τέσσερα επιμέρους στάδια (L1-L4), λόγω της συνεχούς ανάπτυξης του οργανισμού κατά το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι προνύμφες λαμβάνουν οξυγόνο από την ατμόσφαιρα στην επιφάνεια του νερού ενώ αξιοποιούν τους μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια, διάτομα και άλγη) που βρίσκονται στο νερό για τροφή. Ολόκληρη η διαδικασία του σταδίου της προνύμφης ιδανικά διαρκεί περίπου επτά ημέρες, αλλά δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και η χαμηλή θερμοκρασία, μπορούν να τη καθυστερήσουν (Lopez et al., 2019; Nimmo; Rios & Maruniak, 2011).

- ii. **Νύμφη (Pupa).** Προκύπτει έπειτα από την ολοκλήρωση του τελευταίου σταδίου ανάπτυξης της προνύμφης (L4). Το κουνούπι παραμένει μέσα στο νερό αλλά καθώς είναι πιο ελαφρύ, αναδύεται στην επιφάνεια, όπου ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνει οξυγόνο μέσω των αναπνευστικών του σωληναρίων. Δεν τρέφεται πλέον αλλά παρουσιάζει κινητικότητα. Στο στάδιο της νύμφης, ύψιστης σημασίας είναι η εκτέλεση των τελικών επιπέδων μεταμόρφωσης του οργανισμού, η μετατροπή από ανώριμο σε ώριμο, ενήλικο κουνούπι. Όργανα που πρωταγωνιστούσαν κατά το προνυμφικό στάδιο απομακρύνονται ή αντικαθίστανται με άλλα όργανα, σημαντικά για το στάδιο των ενηλίκων. Έδη απ' αυτό το στάδιο, φαίνεται το αυξημένο μέγεθος των θηλυκών ατόμων σε σύγκριση με αυτό των αρσενικών. Με τον κατά μήκος διαχωρισμό της θωρακικής κοιλότητας, ξεπροβάλλει σταδιακά το ενήλικο άτομο, το οποίο μπορεί να σταθεί στην επιφάνεια του νερού. Η διαδικασία μετατροπής του οργανισμού από νύμφη σε ενήλικο διαρκεί περίπου τρεις ημέρες, εξαρτάται όμως από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και του νερού (Lopez et al., 2019; Full Scope Pest Control, 2020; Kauffmann et al., 2017; Nimmo).
- iii. **Ενήλικο άτομο (Adult).** Πρόκειται για το τελικό στάδιο του βιολογικού κύκλου του κουνουπιού, όπου και είναι εξαιρετικά διακριτές οι διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα. Αρχικά, ένα τυπικό θηλυκό κουνούπι είναι 20% μεγαλύτερο σε μέγεθος από ένα τυπικό αρσενικό. Αυτή η διαφορά στο μέγεθος βασίζεται, στο ότι τα αρσενικά εμφανίζουν ταχύτερη ανάπτυξη, με αποτέλεσμα σε έναν πληθυσμό να εκκολάπτονται πρώτα πολλά περισσότερα αρσενικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται πρωτανδρία, είναι χαρακτηριστικό για πολλά έντομα και φυτά και ευνοεί την πιθανότητα των αρσενικών ατόμων να ζευγαρώσουν ενώ μειώνει τον προ-αναπαραγωγικό χρόνο των θηλυκών (Bellini et al., 2018). Επίσης, οι κεραίες των αρσενικών είναι μεγαλύτερες, αποτελούνται από ίνες και ενεργοποιούνται από τον ήχο που δημιουργούν οι κινήσεις των φτερών των θηλυκών ατόμων. Μ' αυτόν τον τρόπο προσελκύονται από τα θηλυκά και πραγματοποιείται το ζευγάρωμα. Τα θηλυκά κουνούπια, στη συνέχεια, πρέπει να καταναλώσουν αίμα και να αποκτήσουν τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ωρίμανση και την απόθεση των αυγών. Ο πολύ σημαντικότερος ρόλος των θηλυκών είναι και ο λόγος που ζούνε για τουλάχιστον έναν με δύο μήνες, ενώ τα αρσενικά, αφού ζευγαρώσουν, ζούνε για μερικές ακόμη ημέρες (Lopez et al., 2019; Nimmo; Full Scope Pest Control, 2020).

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αναπτυξιακών σταδίων και ο βιολογικός κύκλος του *Ae. albopictus* παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (5-9):



Εικόνα 5. Το χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα του αυγού



Εικόνα 6. Προνύμφες



Εικόνα 7. Νύμφη



Εικόνα 9. Ενήλικο θηλυκό



Εικόνα 8. Η απελευθέρωση του ενήλικου



1.2. Ανάπτυξη των ωοθηκών – Βιτελλογένεση

Η διατήρηση και η διασπορά των ασθενειών που προκαλούνται από αρθρόποδα και πιο συγκεκριμένα από τα κουνούπια, βασίζονται στην υψηλή ικανότητα αναπαραγωγής των πληθυσμών, καθώς και στην άντληση αίματος εκ μέρους των θηλυκών ατόμων. Ακολούθως, ο αναπαραγωγικός κύκλος στηρίζεται στην διαδικασία της βιτελλογένεσης, κατά την οποία συμβαίνει η μαζική σύνθεση και έκκριση πρόδρομων πρωτεϊνών της λεκίθου (yolk protein precursors, YPP) στο fat body και η επακόλουθη συσσώρευσή τους κατά την ανάπτυξη των ωοκυττάρων (Attardo et al., 2005; Raikhel, 1992). Το τελικό αποτέλεσμα που είναι η πλήρης διαμόρφωση των ωοθηκών και, στη συνέχεια, η απόθεση των αυγών, αποτελούν σημεία μεγάλου ερευνητικού ενδιαφέροντος και ως προς την παρατήρησή τους, αλλά και ως προς την στόχευση αυτών των σταδίων με στόχο την καταστολή δημιουργίας βιώσιμων απογόνων.

1.2.1. Αυτογονία

Αρχικά, τα διαφορετικά είδη εντόμων ποικίλουν όσον αφορά την ανάγκη λήψης αίματος για την ανάπτυξη των αυγών τους (Attardo et al., 2005). Ο όρος «αυτογενής» αναφέρεται στα έντομα που έχουν την ικανότητα να ξεκινήσουν τον πρώτο τους γονοτροφικό κύκλο, λαμβάνοντας τα αναγκαία θρεπτικά δια της τροφής τους, χωρίς την ανάγκη γεύματος αίματος. Αντιθέτως, τα κουνούπια που χρειάζονται αίμα για την έναρξη της ωογένεσης χαρακτηρίζονται «μη αυτογενής» (Santos et al., 2002; Attardo et al., 2005; Mori et al., 2008). Επιπλέον υπάρχουν και κουνούπια που την πρώτη φορά παράγουν και αποθέτουν αυγά χωρίς τη λήψη αίματος, αλλά για επιπρόσθετες παραγωγές στρέφονται σε γεύμα αίματος (Gulia-Nuss et al., 2015).

Όσον αφορά το κουνούπι *Aedes albopictus*, έχει αναφερθεί πως παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό αυτογονίας (Mori et al., 2008). Ειδικότερα, ο δείκτης αυτογονίας (autogeny index), δηλαδή ο αριθμός των αυγών που αποτίθενται προς τον συνολικό αριθμό των θηλυκών ατόμων, ανέρχεται περίπου στα 0.3–3.0 μεταξύ πληθυσμών που υπάρχουν στη φύση (Mori et al., 2008). Επίσης, μια παρατήρηση που έγινε, αφορούσε την παρόμοια μάζα κάποιων αυτογενών που εμφανίστηκαν λόγω των κατάλληλων συνθηκών με μη αυτογενή κουνούπια, αλλά και ότι τα αυτογενή περιείχαν υψηλότερες ποσότητες πρωτεϊνών και λιπιδίων για μεταβολική διάσπαση. Τα μη αυτογενή θηλυκά κουνούπια, διαθέτοντας χαμηλότερες ποσότητες θρεπτικών, επαναλαμβάνουν λήψεις αίματος και κατ' επέκταση θρεπτικών, τα οποία δεν τα επενδύουν στην αναπαραγωγή, αλλά στην σωματική τους ενέργεια (Mori et al., 2008; Dittmer et al., 2019).

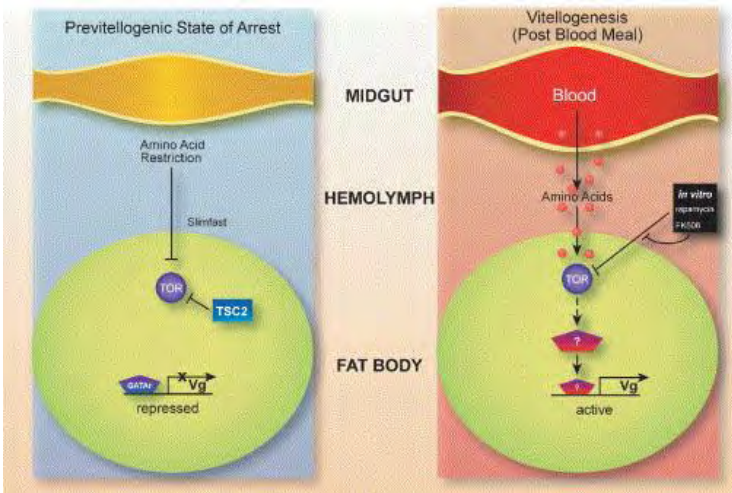
1.2.2. Ο κύκλος της βιτελλογένεσης

Ο κύκλος της βιτελλογένεσης μπορεί να διακριθεί σε 3 στάδια (Raikhel et al., 2002; Attardo et al., 2005):

- i. Η προβιτελλογενής περίοδος, η φάση κατά την οποία γίνεται η προετοιμασία για την έντονη σύνθεση πρόδρομων πρωτεϊνών της λεκίθου (YPP) στο λιπόσωμα (Raikhel et al., 2002). Το λιπόσωμα είναι ένας ιστός που από τη στιγμή που θα ξεκινήσει η μετατροπή του ατόμου από νύμφη σε ενήλικο, υφίσταται αλλαγές για να γίνει δεκτικό σε σήματα που αφορούν τη βιτελλογένεση (Attardo et al., 2005). Χαρακτηριστικό ρόλο κατά την διαδικασία αυτή διαδραματίζει η νεανική ορμόνη III (juvenile hormone, JH), η οποία εκκρίνεται από τον εγκέφαλο μετά την απελευθέρωση του ενηλικού και συντονίζει την ωρίμανση πολλών ιστών, μεταξύ αυτών και του λιποσώματος και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Raikhel et al., 2002; Shaw et al., 2016; Attardo et al., 2005). Τα επίπεδα της JH αυξάνονται και κορυφώνονται τις 2 πρώτες ημέρες της ενήλικης ζωής και 60 ώρες μετά την απελευθέρωση του ενηλικού, το κουνούπι εισέρχεται σε μία φάση ανάπαυσης, ωστόσο γίνεται το πρώτο γεύμα αίματος (Raikhel et al., 2002; Clifton & Noriega, 2012). Η έλλειψη αμινοξέων στην αιμολέμφο πριν το γεύμα αίματος, εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου της βιτελλογενίνης (Vitellogenin, Vg) στο λιπόσωμα (Attardo et al., 2005) (Εικόνα 10).
- ii. Η συνθετική φάση του βιτελλογενούς κύκλου, η οποία ξεκινάει με το γεύμα αίματος και μια απότομη μείωση στα επίπεδα της JH (Clifton & Noriega, 2012; Attardo et al., 2005). Είκοσι ώρες μετά το γεύμα αίματος και αφού έχει σταλεί σήμα από το μεσέντερο για την απόκτηση αίματος, εκκρίνεται από τον εγκέφαλο η εκδυσιοτροπική ορμόνη των

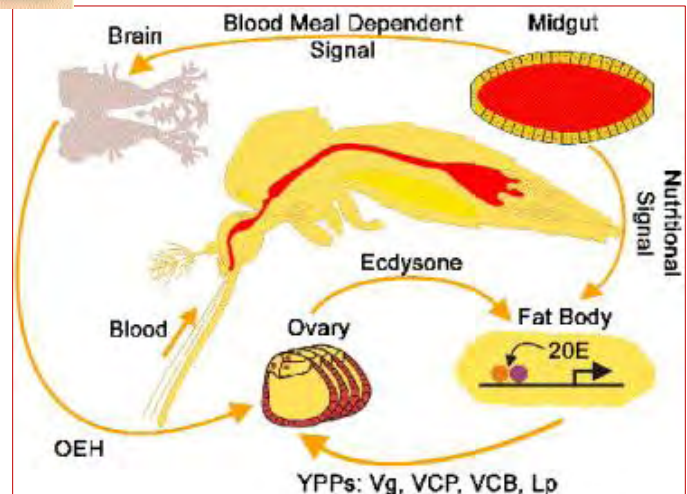
ωοθηκών (ovarian ecdysiotropic hormone, ΟΕΗ), ωθώντας τις ωοθήκες να εκκρίνουν την στεροειδή ορμόνη εκδυσόνη, η οποία ακολούθως υδροξυλιώνεται σε 20Ε (20-hydroxyecdysone) (Shaw et al., 2016; Attardo et al., 2005). Έτσι, ενεργοποιείται η μεταγραφή των ΥΡΡ, όπως η βιτελλογενίνη και η λιποφορίνη, οι οποίες οδηγούνται μέσω της αιμολέμφου στις ωοθήκες (Shaw et al., 2016). Παράλληλα, η παραγωγή ΥΡΡ ενεργοποιείται επιπλέον από τα επίπεδα εξωκυτταρικών αμινοξέων που προκύπτουν από τον μεταβολισμό του αίματος (Shaw et al., 2016). Η βιτελλογενίνη, μαζί με άλλα προ-ένζυμα (53-kDa vitellogenic carboxypeptidase, VCP & 44-kDa cathepsin B-like protease, VCB), φαίνεται να συντίθεται αποκλειστικά στο λιπόσωμα με τα επίπεδα της να κορυφώνονται 24 ώρες μετά το γεύμα του αίματος (Raikhel et al., 2002; Attardo et al., 2005). Σχηματικό διάγραμμα ολόκληρης της διαδικασίας παρουσιάζεται στην εικόνα 11.

- iii. Η φάση τερματισμού, όπου η σύνθεση των ΥΡΡ στο λιπόσωμα καταστέλλεται, κυρίως λόγω της μείωσης των επιπέδων του 20Ε κατά το τέλος του γονοτροφικού κύκλου (Raikhel et al., 2002; Attardo et al., 2005). Το 20Ε φαίνεται να αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της βιτελλογένεσης, αλλά μόνο του δεν αρκεί για να ενεργοποιήσει τη διαδικασία της βιτελλογένεσης (Attardo et al., 2005). Μετά το γεύμα αίματος, χρειάζονται 2-3 μέρες, συνήθως 72 ώρες για πλήρως ώριμα αυγά που είναι έτοιμα για απόθεση (Shaw et al., 2016)



Εικόνα 10. Σχήμα για την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της βιτελλογενίνης (Vg) στο λιπόσωμα μετά από γεύμα αίματος. Στην φάση ανάπαυσης το σηματοδοτικό μονοπάτι TOR καταστέλλεται και ένας μεταγραφικός παράγοντας (GATAr) εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου Vg (Attardo et al., 2005).

Εικόνα 11. Σχηματικό διάγραμμα ενεργοποίησης της βιτελλογένεσης μετά από γεύμα αίματος σε μη αυτογενή κουνούπια (Attardo et al., 2005).



1.2.3. Μορφολογία

Τα θηλυκά κουνούπια διαθέτουν δυο συμμετρικά διατεταγμένες ωοθήκες που βρίσκονται παράλληλα με τον πεπτικό σωλήνα στην περιοχή της κοιλίας, και συγκεκριμένα στο τέταρτο με έκτο τμήμα της (Roth & Porter, 1964). Οι ωοθήκες των κουνουπιών χαρακτηρίζονται μεριστικού τύπου, καθώς περιέχουν και ωκύτταρα (oocytes) και τροφικά κύτταρα (nurse cells). Επίσης, είναι και πολυτροφικές επειδή ομάδες τροφικών κυττάρων περικλείονται με ένα ωκύτταρο σε κάθε ωοθυλάκιο (ovarian follicle) (Greif, 2016). Και κατ' αυτόν τον τρόπο, διαμορφώνεται ο θάλαμος του ωαρίου (egg chamber) (Slack, 2013). Η κάθε ωοθήκη περιλαμβάνει περίπου 100 οvariogles που αποτελούνται από πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια και ένα germaium (Isoe et al., 2019).

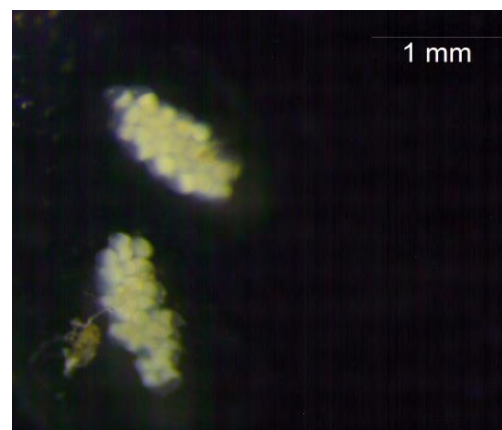
Το κέλυφος των αυγών παίζει σπουδαίο ρόλο κατά την εμβρυική ανάπτυξη ως προστατευτικό κάλυμμα (Isoe et al., 2019). Παράγεται από διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών όπως δομικές πρωτεΐνες, ένζυμα, πρωτεΐνες δέσμησης οσμών και άλλες άγνωστης λειτουργίας. Αυτά τα δομικά συστατικά εκκρίνονται κυρίως από ένα μονό στρώμα ωοθυλακικών επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν τα ωκύτταρα (Isoe et al., 2019).

Η άντληση αίματος διαδραματίζει αδιαμφισβήτητα σημαντικό ρόλο στην ολική διαμόρφωση των ωοθηκών, καθώς όχι μόνο παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, αλλά προωθεί την ανάπτυξη συγκεκριμένων δομών που διαφορετικά, δηλαδή χωρίς το γεύμα αίματος, δεν δημιουργούνται ή είναι πολύ πιο υποανάπτυκτες. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη μικρολαχνών γειτονικά των επιθηλιακών κυττάρων και η δημιουργία «κενών» και κυστιδίων που φαίνεται να συμμετέχουν στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών με σκοπό την διαμόρφωση της λεκίθου (Greif, 2016).

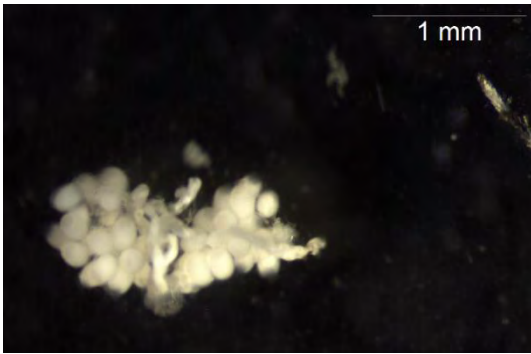
Ανάλογα με την διατροφική κατάσταση και σύμφωνα με τα 3 αναπτυξιακά στάδια του κύκλου της βιτελλογένεσης, μια παρτίδα αυγών είναι έτοιμη να προχωρήσει σε απόθεση μετά από συνολικά 72 ώρες (Clifton & Noriega, 2012). Στις παρακάτω εικόνες (12-17) παρουσιάζεται η πορεία ανάπτυξης των ωοθηκών στο *Aedes albopictus* σύμφωνα με 6 διαφορετικά time points (12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h) από την στιγμή που τα θηλυκά άτομα έφαγαν αίμα και με την προϋπόθεση ότι πριν την άντληση αίματος είχαν ζευγαρώσει με αρσενικά άτομα.



Εικόνα 12. Ωοθήκη 12h μετά το γεύμα του αίματος



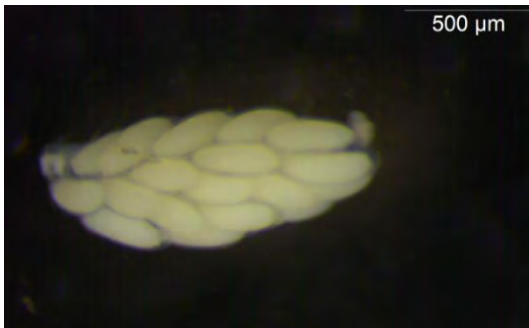
Εικόνα 13. Οι ωοθήκες 24h μετά το γεύμα αίματος



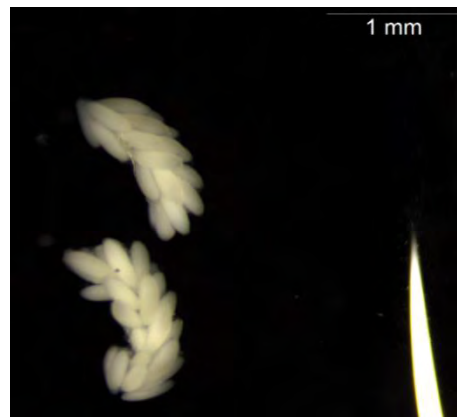
Εικόνα 14. Οι ωοθήκες **36h** μετά το γεύμα αίματος



Εικόνα 15. Ωοθήκη **48h** μετά το γεύμα αίματος



Εικόνα 16. Ωοθήκη **60h** μετά το γεύμα αίματος

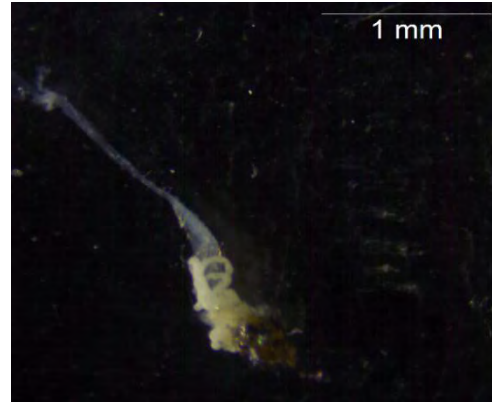


Εικόνα 17. Οι ωοθήκες **72h** μετά το γεύμα αίματος

Η εικόνα 17 αντιπροσωπεύει και την τελική διαμόρφωση των ωοθηκών. Τα αυγά έχουν αποκτήσει το κατάλληλο μέγεθος, έχουν ολοκληρώσει τον οβάλ σχηματισμό τους και χαρακτηρίζονται από το συμπαγές λευκό χρώμα τους. Δύο επιπλέον περιπτώσεις είναι, πρώτον, το θηλυκό να μην έχει ζευγαρώσει καθόλου με αρσενικό, αλλά να έχει τραφεί με αίμα και, δεύτερον, το θηλυκό να μην έχει φάει αίμα. Στην πρώτη περίπτωση, όπως φαίνεται και στην εικόνα 18, θα δημιουργηθούν αυγά, αλλά δεν θα δώσουν βιώσιμους απογόνους. Στη δεύτερη περίπτωση, όπως φαίνεται και στην εικόνα 19, δεν θα δημιουργηθούν αυγά, διότι όπως προαναφέρθηκε τα *Aedes albopictus* δεν είναι αυτογενή και χρειάζονται το αίμα. Παρ' όλα αυτά θα υπάρχει κάποιο στοιχειώδες λίπωμα, μια πολύ πρώιμη μορφή των ωοθηκών. Και με τις δύο αυτές περιπτώσεις, τονίζεται για ακόμη μία φορά ο ρόλος του αίματος ως προς την παροχή των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων και την ανάπτυξη συγκεκριμένων δομών για την τελική διαμόρφωση των ωοθηκών.



Εικόνα 18. Οι ωοθήκες 72h μετά το γεύμα αίματος από θηλυκό που δεν έχει ζευγαρώσει



Εικόνα 19. Οι ωοθήκες θηλυκού που έχει ζευγαρώσει αλλά δεν έχει φάει αίμα

Όλες οι εικόνες της εξής ενότητας (Εικόνες 12-19) αποκτήθηκαν από το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής.

1.3. Τρόποι αντιμετώπισης

Αρχικά, να τονιστεί πως δεν έχουν αναπτυχθεί αρκετά αποτελεσματικά εμβόλια ή φάρμακα ενάντια στους κύριους αρμοπιούς που μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών *Aedes*, αυτούς του δάγκειου πυρετού (DENV), του chikungunya (CHIKV) και του Zika. Επομένως, για να επιτευχθεί η παρεμπόδιση και ο έλεγχος της μετάδοσης αυτών των ιών, τα μέτρα έχουν στραφεί προς τον έλεγχο του πληθυσμού των φορέων (Paury et al., 2009). Γι' αυτό και είναι τόσο σημαντική η κατανόηση και η παρατήρηση των χαρακτηριστικών και των λειτουργιών των κουνουπιών *Aedes* και ειδικότερα του *Aedes albopictus*. Ακριβώς επειδή τα *Ae. albopictus* δεν ευδοκούν σε περιοχές πλημμυρών, βάλτων και στάσιμων νερών που συνήθως προτιμούν τα περισσότερα κουνούπια, αλλά σε φυσικά ή τεχνητά δοχεία, τα οποία βρίσκονται παντού, συχνά κρυμμένα, εύκολα μετακινήσιμα και όχι σε ανοιχτό περιβάλλον, η ανάγκη για νέα, αποτελεσματικά μέτρα αντιμετώπισης είναι μεγάλη (Faraji & Unlu, 2016).

Χημικά εντομοκτόνα

Τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως κατά το στάδιο είτε της προνύμφης είτε του ενήλικου λόγω του αποτελεσματικού πληθυσμιακού ελέγχου των κουνουπιών. Η εφαρμογή τους γίνεται με ψεκασμό σε εξωτερικό ή εσωτερικό χώρο ή με δίχτυα που έχουν εμποτιστεί με το χημικό εντομοκτόνο. Συγκεκριμένα, το Διχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο (DDT), από τα πιο γνωστά εντομοκτόνα, αξιοποιήθηκε τις προηγούμενες δεκαετίες και εξασφάλισε την εξάλειψη του *Ae. aegypti* σε 19 χώρες (Weeratunga et al., 2017). Επιπλέον κατηγορίες χημικών εντομοκτόνων αποτελούν τα πυρεθροειδή και οι οργανοφωσφορικές ενώσεις, όπως τα fenthion και malathion, που δρουν ως νευροτοξίνες. Ένα εντομοκτόνο δεν χρειάζεται απαραίτητα να σκοτώσει το έντομο για να σταθεί εμπόδιο στη μετάδοση του παθογόνου. Αυτό πετυχαίνει μια καινούρια σειρά εντομοκτόνων, οι ρυθμιστές ανάπτυξης (insect growth regulators-IGRs), οι οποίοι στοχεύουν τις προνύμφες και επηρεάζουν την ανάπτυξη, την ωρίμανση και την επιβίωση του κουνουπιού με ένα λιγότερο τοξικό προς τον άνθρωπο τρόπο και περισσότερο φιλικό προς το περιβάλλον. Παραδείγματα τέτοιων ρυθμιστών είναι το Methoprene και το Pyriproxyfen, με το τελευταίο να

παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά τοξικότητας ενάντια στο *Ae. albopictus* (Cuervo-Parra et al., 2016; Khan et al., 2016; Shaw et al., 2018).

Τα χημικά εντομοκτόνα, αν και έχουν καθιερωθεί ως ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο, προκαλούν τοξικότητα μη ειδικά με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο πληθυσμός και άλλων οργανισμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μέλισσα, ένα έντομο μεγάλης οικολογικής και οικονομικής σημασίας, της οποίας ο πληθυσμός πλήττεται από μια μεγάλη κατηγορία εντομοκτόνων όπως τα πυρεθροειδή και εμφανίζει αισθητή μείωση σε περιοχές που ψεκάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, τα εντομοκτόνα μπορούν να επηρεάσουν το αναπαραγωγικό, το νευρικό ή το ανοσοποιητικό σύστημα των μελισσών, καθώς και τη διαδικασία της εργασίας τους. Υπάρχουν κι άλλα αρθρόποδα που πλήττονται όπως τα ζυγόπτερα και τα καρκινοειδή, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις διατάραξης σπονδυλωτών όπως το ψάρι, ο βάτραχος και το ποντίκι. Συνολικά, τα χημικά εντομοκτόνα είναι βλαβερά για το περιβάλλον και προκαλούν διατάραξη του οικοσυστήματος με αισθητές συνέπειες (Mužinić & Želježić, 2018).

Επιπρόσθετα, εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό αποτελεσματικότητας με την πάροδο του χρόνου και δεν μπορούν να εμποδίσουν εκδηλώσεις των ασθενειών σε διάφορες περιοχές μακροχρόνια. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αλόγιστη και υπερβολική χρήση και εφαρμογή των χημικών εντομοκτόνων, που έχει ως συνέπεια την δημιουργία μεταλλάξεων στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των χημικών ενώσεων και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας μεταξύ των πληθυσμών των κουνουπιών (Shaw et al., 2018). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2019), η ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα αναφέρεται σε μεταβολές που καθιστούν ένα έντομο ικανό να ανεχτεί ή να ξεπεράσει τις επιδράσεις ενός ή πολλών εντομοκτόνων. Επιπλέον μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος ως προς τα υλικά, τον εξοπλισμό και την εργασία (Cuervo-Parra et al., 2016).

Τα όχι και τόσο ιδανικά χαρακτηριστικά των χημικών εντομοκτόνων, έστρεψαν τους επιστήμονες σε πιο βιολογικές μεθόδους, δηλαδή στη χρήση βακτηρίων, όπως του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) κατά της προνύμφης. Ειδικότερα, το βακτήριο εκκρίνει τοξικές για το κουνούπι πρωτεΐνες που αφού απορροφηθούν από την προνύμφη, θα οδηγηθούν στο στομάχι και θα προκαλέσουν διατάραξη των κυτταρικών μεμβρανών, κυτταρικό θάνατο και πείνα μέχρι θανάτου. Επίσης, αυτή η στρατηγική είναι ειδο-ειδική και δεν εμφανίζει εκτός-στόχου επιδράσεις (Cuervo-Parra et al., 2016; Weeratunga et al., 2017). Αν και βιολογική μέθοδος, θεωρείται χημικό εντομοκτόνο, διότι και σκοτώνει το έντομο και πρόκειται για τοξίνες ενάντια στο κουνούπι, αλλά στην συγκεκριμένη περίπτωση, δεν έχει παρέμβει ο άνθρωπος στην σύνθεσή του.

Ρύθμιση του περιβάλλοντος αναπαραγωγής

Η συγκεκριμένη προσέγγιση βασίζεται στη μείωση τοποθεσιών πιθανών για αναπαραγωγή και απόθεση αυγών και χαρακτηρίζεται από ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως την εμπλοκή της κοινότητας, τον συντονισμό των συστημάτων δημόσιας υγείας, την κατάλληλη εκπαίδευση και την λήψη δραστηκών μέτρων με παραπάνω προσοχή και καθαρισμό επιφανειών από νερά. Παρ' όλα αυτά η προτίμηση των κουνουπιών *Aedes* για περιοχές αστικές και ημι-αστικές, καθιστούν το έργο αυτό αρκετά δύσκολο (Weeratunga et al., 2017).

Αξιοποίηση βιολογικών, μη χημικών παραγόντων

Αυτή η στρατηγική θεωρείται πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση για τον έλεγχο των πληθυσμών των κουνουπιών, αποτρέποντας την χρήση των βλαβερών και τοξικών συνθετικών χημικών εντομοκτόνων. Από τεχνικής άποψης, πραγματοποιούνται επικαλύψεις με λάδι που έχει απομονωθεί από σκόρδο ή κανέλα και παγιδεύσεις φορέων, κυρίως κατά το στάδιο των προνυμφών. Επιπρόσθετα, επιτυχής έχει αναδειχθεί η αξιοποίηση άλλων εντόμων και σπονδυλωτών, όπως αμφίβια, ψάρια και νυχτερίδες ως προς τον έλεγχο του πληθυσμού. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των ψαριών που καταναλώνουν προνύμφες και νύμφες, όπως τα *Gambusia affini* που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πυκνότητας τέτοιων μορφών σε υδάτινες περιοχές και κατ' επέκταση την μείωση και τον έλεγχο του πληθυσμού (Cuervo-Parra et al., 2016; Weeratunga et al., 2017).

Μέθοδοι αντικατάστασης πληθυσμού

Το βακτήριο *Wolbachia* χρησιμοποιείται για την ρύθμιση του πληθυσμού των κουνουπιών *Aedes*, και όχι μόνο, λόγω της υψηλής ασφάλειας για το υπόλοιπο περιβάλλον. Το συγκεκριμένο υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό βακτήριο συνήθως μολύνει με φυσικό τρόπο πολλά έντομα, συμπεριλαμβανομένων και των κουνουπιών *Aedes albopictus*, αλλά όχι των *Aedes aegypti* και κληρονομείται στους απογόνους με οριζόντια μεταφορά από τη μητέρα που έχει μολυνθεί. Ωστόσο, συνήθως η μόλυνση από διαφορετικές σειρές *Wolbachia* συμβαίνει μέσω μικροένεσης κατά το εμβρυϊκό στάδιο (Bonizzoni et al., 2013). Η επίδραση που έχει στο κουνούπι μπορεί να είναι από στειρότητα μέχρι ενεργοποίηση των φραγμών ενάντια στο παθογόνο μέσα στον φορέα-ξενιστή, αναλόγως το γένος του βακτηρίου. Η στρατηγική αντικατάστασης του πληθυσμού βασίζεται στην ικανότητα του *Wolbachia* να εισβάλλει και να αντικαθιστά τον πληθυσμό που στοχεύεται με ένα πληθυσμό που δεν μπορεί να μεταδώσει τον ιό (Hoffmann et al., 2011). Αυτό έχει αναδειχθεί με επιτυχία στην περίπτωση του *Aedes albopictus* και του ιού του δάγκειου πυρετού (DENV) (Ahmad et al., 2016).

Μέθοδοι βασισμένες στη γενετική

Η πολυπλοκότητα των κουνουπιών σαν οργανισμοί-φορείς, η αναξιοπιστία των χημικών εντομοκτόνων και η ανάγκη για τον συντονισμό διαφόρων τεχνικών και αρμόδιων οργανισμών για την καταπολέμηση και τον έλεγχο των πληθυσμών των κουνουπιών, οδήγησε στην μελέτη και την αξιοποίηση της γενετικής εις βάρος των κουνουπιών. Μία από τις τεχνικές είναι αυτή του ασύμβατου εντόμου (Incompatible Insect Technique, IIT), όπου μετά την ανάπτυξη κουνουπιών μολυσμένων με *Wolbachia* στο εργαστήριο, απελευθερώνονται μόνο τα αρσενικά στη φύση που όταν ζευγαρώσουν με θηλυκά αγρίου τύπου, δεν θα προκύψουν απόγονοι, λόγω κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (Cytoplasmic Incompatibility, CI) (Weeratunga et al., 2017). Μία άλλη γνωστή τεχνική είναι η τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT), κατά την οποία αρσενικά έχουν στειρωθεί στο εργαστήριο μέσω είτε ραδιενέργειας είτε γενετικής τροποποίησης και απελευθερώνονται στη φύση για να ζευγαρώσουν με θηλυκά αγρίου τύπου και να μην προκύψουν απόγονοι, με συνέπεια την μείωση του πληθυσμού (Faraji & Unlu, 2016; Kauffman et al., 2017). Μια άλλη, παρόμοια προσέγγιση περιλαμβάνει την απελευθέρωση στη φύση ατόμων που διαθέτουν επικρατές θνησιγόνο αλληλόμορφο (Release of Insects carrying

Dominant Lethal, RIDL) (Weeratunga et al., 2017). Επιπρόσθετα, αξιοποιείται και το σύστημα CRISPR/Cas9 με στόχο την αλλαγή ή απομάκρυνση γονιδίων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την αναπαραγωγή (Kandul et al., 2019).

Όλες αυτές οι βασισμένες στη γενετική προσεγγίσεις θεωρείται πως παρουσιάζουν υψηλή ειδοειδικότητα, αφού η μεταφορά των τροποποιημένων στοιχείων κληρονομείται μέσω ζευγαρώματος (Alrhey et al., 2013). Ωστόσο, υπάρχουν και διάφορα μειονεκτήματα που αφορούν την αλλοίωση της φυσικής κατάστασης των ατόμων, τη δημιουργία ανησυχίας για εφαρμογή τους και οι εκτός-στόχου επιδράσεις (όπως στην περίπτωση του συστήματος CRISPR/Cas9) και το υψηλό κόστος λόγω της συνεχούς ανανέωσης (Kandul et al., 2019; Faraji & Unlu, 2016; World Mosquito Program, 2020). Μία μέθοδος που φαίνεται να υπερτερεί συγκριτικά με τις προαναφερθείσες και να εφαρμόζεται συχνότερα στα έντομα είναι ο μηχανισμός παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference, RNAi) ο οποίος προσφέρει υψηλή εξειδίκευση, χαμηλό κόστος και μεγαλύτερη ευκολία ως προς την εφαρμογή, χωρίς να διαταράσσεται ούτε η φυσική κατάσταση των κουνουπιών ούτε το περιβάλλον στο οποίο διαμένουν (Scott et al., 2013). Ο μηχανισμός RNAi αξιοποιήθηκε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής και θα αναλυθεί διεξοδικά στην συνέχεια της ενότητας.

1.3.1. Μηχανισμός RNAi

Ο μηχανισμός RNAi αποτελεί ένα μονοπάτι σίγησης γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ανακαλύφθηκε στα φυτά το 1990 και μελετήθηκε εκτενώς στον οργανισμό-μοντέλο *Ceanorhabditis elegans* από τους Andrew Z. Fire και Craig C. Mello το 1998 (Sen & Blau, 2006). Οι ερευνητές αυτοί απέδειξαν ότι η διαδικασία της γονιδιακής σίγησης δεν βασίζεται μόνο είτε στο σημαίνον είτε στο αντισημαίνον RNA, αλλά ενεργοποιείται από την παρουσία και των δύο κλώνων μορίων RNA (dsRNA) (Fire et al., 1998). Επίσης, υποστήριξαν ότι ο μηχανισμός RNAi αποτελεί μια μετα-μεταγραφική διαδικασία κατά την οποία το δίκλωνο RNA ενός γονιδίου αποσταθεροποιεί με κάποιον τρόπο το αντίστοιχο mRNA του (Tropp, 2014). Αυτή η εξειδικευμένη ως προς την αλληλουχία σίγηση ενός γονιδίου-στόχου, χρησιμοποιείται εκτενώς στην έρευνα με στόχο την ανακάλυψη της λειτουργίας των γονιδίων-στόχων (Mamta & Rajam, 2017) ως ένα εργαλείο *αντίστροφης γενετικής ανάλυσης*. Επιπλέον, αξιοποιείται για την ανάπτυξη εξειδικευμένων ειδοειδικών προσεγγίσεων γονιδιακής σίγησης με σκοπό τη χρήση σε τεχνολογίες καταπολέμησης επιβλαβών οργανισμών, όπως είναι τα κουνούπια.

1.3.1.1. Φυσιολογικός ρόλος

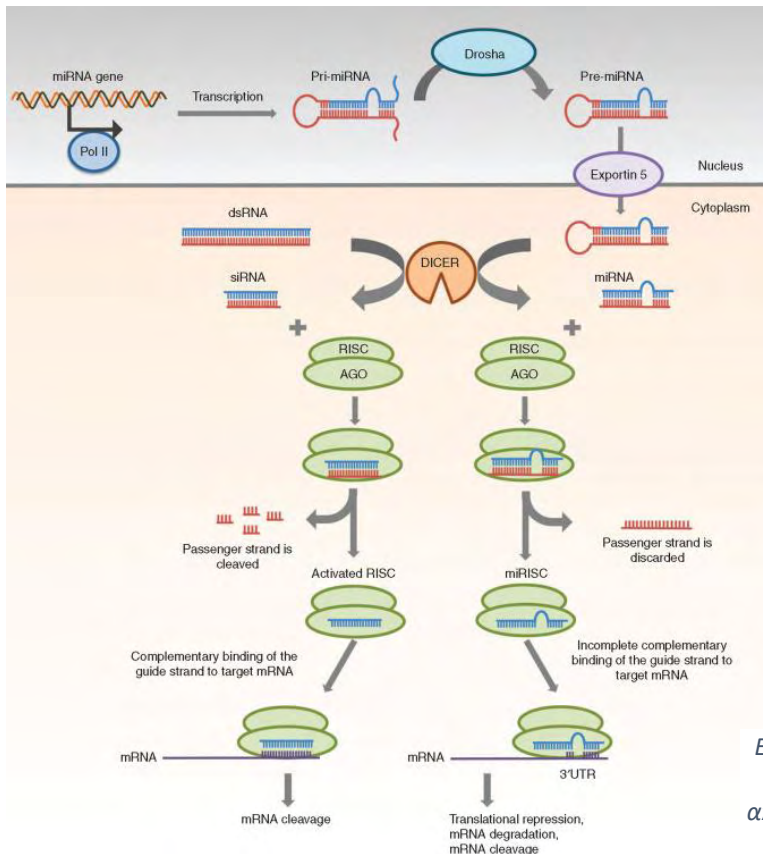
Φυσιολογικά, ο ρόλος του RNAi μέσα στο κύτταρο είναι να το προστατεύει είτε από εξωγενή δίκλινα μόρια RNA που προέρχονται από ιούς (κυρίως στα φυτά) είτε από ενδογενή δίκλινα μόρια RNA που προκύπτουν από μεταθετά στοιχεία, αλληλουχίες με ανάστροφες επαναλήψεις ή μετάγραφα και προκαλούν αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος (Agrawal et al., 2003). Επιπρόσθετα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση και οργάνωση των αναπτυξιακών διεργασιών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (post-transcriptional level, PTGS) είτε μέσω της αναστολής της μετάφρασης του mRNA είτε μέσω της αποικοδόμησης του mRNA (Abdurakhmonov, 2016).

1.3.1.2. Μηχανισμός δράσης

Αρχικά, οποιαδήποτε μορφή dsRNA μπορεί να ενεργοποιήσει τη διαδικασία του RNAi, όπως μακρά dsRNAs, microRNAs (miRNAs), βραχέα παρεμβαλλόμενα RNAs (small interfering RNAs, siRNAs), short hairpin RNAs (shRNA) και άλλες διάφορες τροποποιημένες μορφές. Όπως προαναφέρθηκε, το dsRNA μπορεί να είναι εξωγενές και να προέρχεται είτε από ιικό RNA γονιδίωμα, ένεση συνθετικών dsRNAs ή χρήση του *Agrobacterium* στην περίπτωση των φυτών. Επίσης, μπορεί να προέρχεται από ενδογενή γονίδια που κωδικοποιούν πρόδρομα μόρια miRNA ή άλλα μακρά dsRNA μόρια (Agrawal et al., 2003; Abdurakhmonov, 2016).

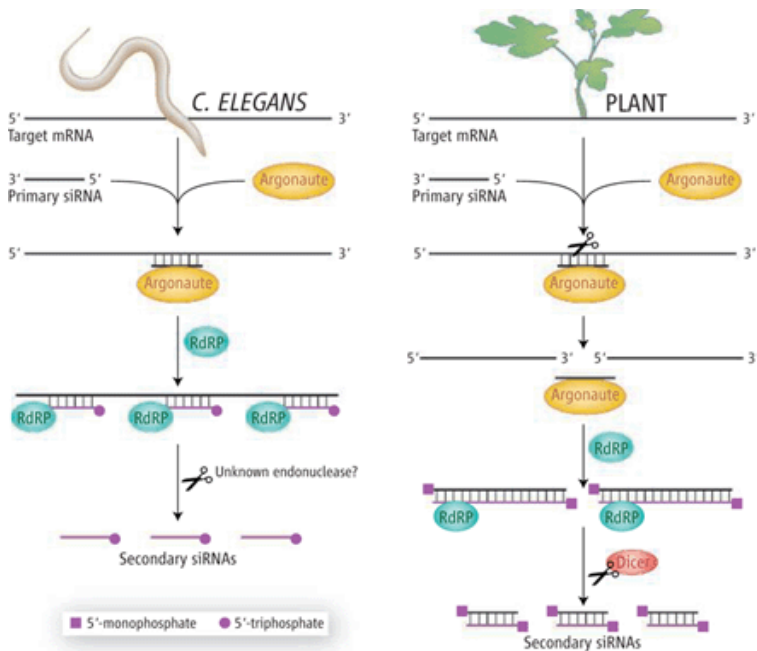
Κατά την είσοδο του dsRNA στο κύτταρο και την αναγνώρισή του, τα δίκλινα μόρια RNA (dsRNAs) επεξεργάζονται και κόβονται σε μικρότερα δίκλινα τμήματα των 20-25 bp με 3' προεξέχοντα άκρα μήκους δύο νουκλεοτιδίων και μια φωσφορική ομάδα στα 5' άκρα τους από το ένζυμο RNase III Dicer (Dcr) που δρα ως ενδονουκλεάση (Scott et al., 2013). Αναλόγως τον οργανισμό, συμμετέχουν διαφορετικές πρωτεΐνες-τελεστές, όπως η RDE-4 (νηματώδη) και η R2D2 (έντομα), που βοηθούν τη σύνδεση της Dicer στο δίκλινο μόριο και την δραστηριότητα της (Abdurakhmonov, 2016). Μετά απ' αυτήν την επεξεργασία και την δημιουργία των μικρών δίκλιων τμημάτων, ο ένας κλώνος θα είναι ο κλώνος-επιβάτης (passenger strand) που θα απομακρυνθεί, ενώ ο άλλος κλώνος θα είναι ο κλώνος-οδηγός (guide strand) που θα ενσωματωθεί στο ενεργοποιημένο πλέον επαγόμενο από RNA πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC) (Tropp, 2014). Το RISC διαθέτει ενζυματική δραστηριότητα και η καταλυτική του περιοχή περιλαμβάνει μια RNase H-like επικράτεια μιας πρωτεΐνης Αργοναύτη (Argonaute, AGO), η οποία διασπά μόρια μονόκλωνου RNA που έχουν αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία του κλώνου-οδηγού (Scott et al., 2013; Olson & Blair, 2015; Mamta & Rajam, 2017). Στο σημείο αυτό να υπογραμμιστεί πως το 5' άκρο του κλώνου-οδηγού αντιστοιχίζει και συνδέει το mRNA-στόχο, ενώ το 3' άκρο το τακτοποιεί με φυσικό τρόπο στην πιο ευνοϊκή θέση για διάσπαση του συμπλέγματος RISC (Abdurakhmonov, 2016). Οι πρωτεΐνες Dicer και Argonaute αποτελούν απαραίτητα συστατικά για την εκτέλεση του μηχανισμού αυτού με τους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως φυτά και ζώα, να διαθέτουν αυτές και κατ' επέκταση το μηχανισμό RNAi (Scott et al., 2013).

Τα μικρά τμήματα 20-25 bp που προκύπτουν μετά από την επεξεργασία της Dicer χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα: i) microRNAs (miRNAs), τα οποία προέρχονται από ενδογενή μετάγραφα και παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ii) βραχέα παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα οποία προκύπτουν από μόρια dsRNA και λειτουργούν ως άμυνα έναντι σε ιούς και μεταθετά στοιχεία (Scott et al., 2013). Η ερευνητική χρήση του RNAi αξιοποιεί κυρίως το μονοπάτι των siRNAs για την μελέτη της ικανότητας των κυττάρων να αποικοδομούν ένα μονόκλωνο RNA με ταυτόσημη αλληλουχία με αυτήν του χορηγούμενου dsRNA (Scott et al., 2013). Το μονοπάτι γονιδιακής σίγησης RNAi παρουσιάζεται στη εικόνα 20.



Εικόνα 20. Παρουσίαση του μονοπατιού RNAi από την βιοσύνθεση των siRNA και miRNA μέχρι το τελικό αποτέλεσμα: διάσπαση ή αποικοδόμηση του mRNA και καταστολή της μετάφρασης (Lam et al., 2015)

Σε μερικά είδη, έχει παρατηρηθεί ότι ενώ ο μηχανισμός RNAi ξεκινάει από μία συγκεκριμένη θέση και η ποσότητα του dsRNA δεν είναι μεγάλη, μπορεί και εξαπλώνεται σε ολόκληρο τον οργανισμό. Αυτήν η εξάπλωση από κύτταρο σε κύτταρο και από ιστό σε ιστό προσφέρει «συστημική» σίγηση, το φαινόμενο πολλαπλασιασμού του μηνύματος αποσιώπησης ονομάζεται «φαινόμενο εξάπλωσης RNAi» (transitive RNAi) και ανακαλύφθηκε από τον Fire και τους συνεργάτες του στον *C. Elegans* (Tropp, 2014; Scott et al., 2013). Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην παρουσία των RNA-εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP), οι οποίες χρησιμοποιώντας ως μήτρα το mRNA-στόχο και χωρίς απαραίτητα την ύπαρξη εκκινητή, συνθέτουν δευτερογενή siRNA (Agrawal et al., 2003; Abdurakhmonov, 2016; Scott et al., 2013). Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η διατήρηση της αποσιώπησης από τη μια γενιά στην επομένη. Εκτός από τα νηματώδη, τα φυτά έχουν, επίσης, τις συγκεκριμένες πολυμεράσες, αν και με μικρές διαφορές ως προς τον τρόπο παραγωγής των δευτερογενών siRNAs (Εικόνα 21) (Tropp, 2014). Τα έντομα και τα σπονδυλωτά δεν διαθέτουν τις RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες και θεωρητικά δεν μπορούν να εμφανίσουν μεταβατική RNAi, εκτός από κάποιες εξαιρέσεις που θα αναφερθούν παρακάτω (Umbach & Cullen, 2015; Scott et al., 2013; Mamta & Rajam, 2017; Watson et al., 2007).



Εικόνα 21. Παραγωγή δευτερογενών siRNA μέσω RdRP εξαρτώμενης μεταγραφής του RNA που έχει στοχευθεί από ένα πρωτογενές siRNA ή miRNA στο *C. elegans* και στα φυτά (Baulcombe, 2007)

1.4. Long non-coding RNAs

Πρόσφατα και με την αξιοποίηση διαφόρων τεχνολογικών επιτευγμάτων όπως οι μέθοδοι αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) και οι μικροσυστοιχίες, λήφθηκαν στοιχεία που υποδηλώνουν πως η εξέλιξη αναπτυξιακών διαδικασιών που ρυθμίζουν την πολυπλοκότητα του οργανισμού βασίζεται κατά κύριο λόγο στην επέκταση του ρυθμιστικού δυναμικού των μη κωδικοποιητικών τμημάτων του γονιδιώματος (Wang & Chang, 2011). Πιο συγκεκριμένα, μόλις περίπου το 1,5% του γονιδιώματος κωδικοποιείται σε πρωτεΐνες, ενώ πολλά μη κωδικοποιητικά ρυθμιστικά στοιχεία μεταγράφονται σε μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs), φανερώνοντας ένα πιθανό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων βιολογικών διαδικασιών, όπως η ανάπτυξη, η κυτταρική διαφοροποίηση και ο μεταβολισμός (Mercer et al., 2009; Fatica & Bozzoni, 2013; Korp & Mendell, 2018).

Σύμφωνα με τους Ponting et al. (2009), τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:

- Τα ιδιοσυστατικά (housekeeping) μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, όπως ριβοσωμικά (rRNAs), μεταφορικά (tRNAs), μικρά πυρηνικά (snRNAs), τα οποία μεταγράφονται συνεχώς.
- Τα ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που υποδιαιρούνται στα βραχεία όπως τα siRNAs (μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs), miRNAs, piRNAs (Piwi-associated RNAs) που είναι υψηλά συντηρημένα και εμπλέκονται στη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση και στα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (Long non-coding RNAs, lncRNAs) (Wang & Chang, 2011).

Τα long non-coding RNAs (lncRNAs) ή απλώς μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα είναι μια κατηγορία μεταγράφων που μελετάται εκτενώς τα τελευταία χρόνια καθώς προκύπτουν

συνεχώς νέα δεδομένα για τον ρυθμιστικό τους ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες των ευκαρυωτικών οργανισμών.

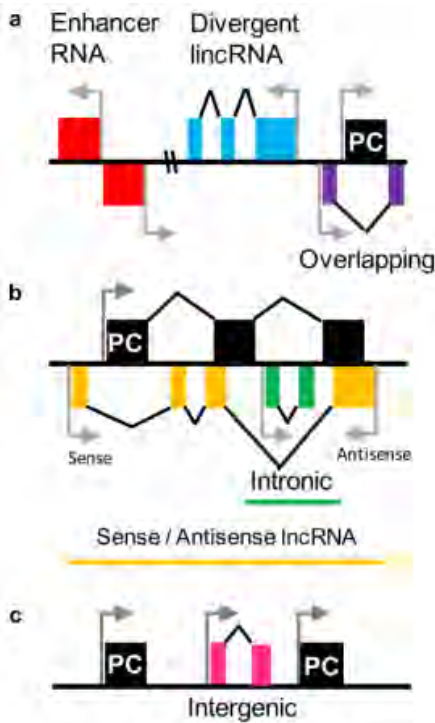
1.4.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Τα lncRNAs αποτελούν μετάγραφα μήκους μεγαλύτερου από 200 νουκλεοτίδια (nt) τα οποία δεν κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη (Kung et al., 2013; Li et al., 2019). Μοιράζονται παρόμοιο μηχανισμό μεταγραφής με τα mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είναι δηλαδή πολυαδενυλιωμένα, διαθέτουν 5' καλύπτρα και υπόκεινται σε μάτισμα (Li et al., 2019). Όπως τα mRNAs, και τα lncRNAs έχει παρατηρηθεί ότι γίνεται να μειο-ρυθμιστούν από miRNA (Zheng et al., 2014). Επίσης, μπορούν να εντοπιστούν σε πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά κλάσματα και συχνά μεταγράφονται από οποιαδήποτε αλυσίδα εντός ενός γενετικού τόπου από όπου γίνεται να προκύψει πρωτεΐνη και δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα (Ponting et al., 2009; Wang & Chang, 2011).

Η κατηγοριοποίηση των lncRNAs γίνεται με κριτήριο τον τρόπο που μεταγράφονται και τη θέση του κάθε lncRNA γονιδίου στο γονιδίωμα, και συγκεκριμένα συγκριτικά με τη θέση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Spurlock et al., 2016). Η ταξινόμηση έχει ως εξής:

1) Αλληλεπικαλυπτόμενα (Overlapping), όταν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη περικλείεται από το ιντρόνιο ενός lncRNA, **2)** Αμφίδρομο (Bidirectional) ή Αποκλίνοντα (Divergent), όταν το lncRNA και το γειτονικό γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη μεταγράφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις, **3)** Ιντρονικό (Intronic), όταν ολόκληρη η αλληλουχία του lncRNA γονιδίου εμπίπτει στο ιντρόνιο ενός γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, **4)** Διαγονιδιακό (Intergenic), όταν μια αλληλουχία lncRNA γονιδίου υπάρχει ως ξεχωριστή μονάδα μεταξύ δύο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και συνήθως ρυθμίζει τα μετάγραφα (mRNA) αυτών, **5)**

νοηματικό (sense) ή **6)** αντινοηματικό (antisense), όταν το lncRNA χαρτογραφείται μεταξύ ενός ή περισσότερων εξωνίων άλλου μεταγράφου και μεταγράφεται προς την ίδια ή την αντίθετη κατεύθυνση αντίστοιχα (Spurlock et al., 2016; Kung et al., 2013; Ponting et al., 2009). Επιπλέον, η μεταγραφή των lncRNAs φαίνεται να ρυθμίζεται από RNAs ενισχυτή (eRNAs), βραχεία μετάγραφα (<2 kb) μονής ή διπλής κατεύθυνσης 1D-eRNAs & 2D-eRNAs, καθώς και από ψευδογονίδια, «λείψανα» γονιδίων που λόγω μεταλλάξεων ή αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης έχασαν το δυναμικό τους να κωδικοποιούν πρωτεΐνες και πλέον παίζουν ρυθμιστικό ρόλο (Spurlock et al., 2016; Kung et al., 2013) (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Κατηγοριοποίηση των lncRNAs με βάση τη θέση τους στο γονιδίωμα. (a) Enhancer RNA (eRNA) / Αποκλίνοντα (Divergent) lncRNA / Αλληλεπικαλυπτόμενο (Overlapping) lncRNA, (b) Ιντρονικό (Intronic) lncRNA / Νοηματικό (sense) & Αντινοηματικό (antisense) lncRNA, (c) Διαγονιδιακό (Intergenic) lncRNA (Spurlock et al., 2016)

1.4.2. Ταυτοποίηση lncRNAs

Ως κατηγορία μεταγράφων, τα lncRNAs εντοπίστηκαν πρώτη φορά στο ποντίκι κατά τη διάρκεια αλληλούχησης μεγάλης κλίμακας βιβλιοθηκών cDNA (Okazaki et al., 2002). Παρ' όλα αυτά, η ετερογένεια ως προς την λειτουργία και τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης, καθιστούν τη μελέτη των lncRNAs μέσω των κλασικών βιολογικών μεθόδων αρκετά δύσκολη, γι' αυτό και απαιτούνται εξελιγμένες τεχνικές και συνδυασμός αυτών (Li et al, 2019). Αρχικά, η ταυτοποίηση των lncRNAs βασίζεται στον εντοπισμό επιπέδων μεταγραφής από γενωμικές περιοχές που δεν έχουν χαρακτηριστεί ως ικανές να κωδικοποιήσουν πρωτεΐνες, όπως περιοχές που δεν διαθέτουν ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Fatica & Bozzoni, 2013). Αυτό επιτυγχάνεται με τεχνικές όπως οι μικροσυστοιχίες Tiling, η ανάλυση SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), η ανάλυση CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) και πιο έμμεσα η τεχνική ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης ακολουθούμενη από DNA αλληλούχηση (CHIP-seq) που ρίχνει φως στην κατανομή πρωτεϊνών ή τροποποιήσεων των ιστονών στο γονιδίωμα, υποδεικνύοντας τα γονίδια lncRNAs λόγω ρυθμιστικού ρόλου (Fatica & Bozzoni, 2013; Li et al., 2019; Kung et al., 2013).

Ωστόσο, μια από τις πιο ισχυρές μεθοδολογίες για την *de novo* ανακάλυψη και ανάλυση της έκφρασης των lncRNAs αποτελεί η αλληλούχηση RNA (RNA seq) (Fatica & Bozzoni, 2013). Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, το ολικό RNA μετατρέπεται σε μια cDNA βιβλιοθήκη που υφίσταται αλληλούχηση υψηλής απόδοσης. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες τεχνολογιών αλληλούχησης αλλά για την αλληλούχηση RNA αξιοποιείται συνήθως η τεχνολογία Illumina (Li et al., 2019). Μία μόνο εκτέλεση της αλληλούχησης παράγει δισεκατομμύρια αναγνώσεις (reads) που στη συνέχεια ευθυγραμμίζονται με ένα γονιδίωμα αναφοράς (Fatica & Bozzoni, 2013). Επομένως, κάθε φορά αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση να είναι διαθέσιμη η γονιδιωματική βιβλιοθήκη του οργανισμού, για τον οποίο πραγματοποιείται το πείραμα. Μετά την ευθυγράμμιση, τα δεδομένα μεταφράζονται ποσοτικά σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μέσω κατάλληλων αλγορίθμων (Fatica & Bozzoni, 2013). Για την συλλογή μόνο των αλληλουχιών των lncRNAs, γίνεται αφαίρεση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθώς και τα μετάγραφα που έχουν μήκος μικρότερο από 200 nt (Kumar et al., 2017). Εντέλει, πραγματοποιείται η εκτίμηση του κωδικοποιητικού δυναμικού των αλληλουχιών που απέμειναν, περιμένοντας να παρατηρηθεί μηδενικό τέτοιο δυναμικό.

Παρ' όλα αυτά, μερικές φορές, μπορεί να γίνει ανακριβής συναρμολόγηση των βραχέων αναγνώσεων (short reads), οδηγώντας σε λανθασμένα συμπεράσματα. Αυτό το μειονέκτημα φαίνεται να ξεπερνάει μια βελτιστοποιημένη προσέγγιση, το RNA Capture Long Seq (CLS) που συνδυάζει τη λήψη στοχευμένου RNA με τεχνολογία αλληλούχησης μακράς ανάγνωσης τρίτης γενιάς. Κατ' αυτόν τον τρόπο, γίνεται να ληφθούν lncRNA γονίδια πλήρους μήκους χωρίς την ανάγκη συναρμολόγησης και να αυξηθεί η ακρίβεια ως προς τον χαρακτηρισμό διαφόρων lncRNAs (Li et al., 2019).

1.4.3. Λειτουργίες και μηχανισμοί δράσης

Σε γενικές γραμμές, τα lncRNAs εμπλέκονται στη δυναμική των χρωμοσωμάτων, στην βιολογία των τελομερών, στην υποκυτταρική δομική οργάνωση και σε πολλές ακόμη διαδικασίες. Επιπλέον το φαινόμενο της «μεταβίβασης» (Transvection), όπου μη κωδικοποιητικές περιοχές επηρεάζουν την έκφραση γειτονικών κωδικοποιητικών περιοχών *in trans*, συμπεριλαμβάνεται στις δράσεις των lncRNAs (Mercer et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, η γονιδιακή ρύθμιση που

πραγματοποιείται από τα lncRNAs εντοπίζεται στο επίπεδο της χρωματίνης, σε μεταγραφικό και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

- I. **Τροποποίηση χρωματίνης:** Το βασικό στοιχείο είναι πως τα συγκεκριμένα μη κωδικοποιητικά RNAs προκαλούν επιγενετικές αλλαγές «στρατολογώντας» σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης σε συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους (Mercer et al., 2009; Kung et al., 2013). Αυτές οι αναδιαμορφώσεις σχετίζονται κυρίως με τη μεθυλίωση ιστονών και την προσβασιμότητα της πολυμεράσης, δύο διαδικασίες που απαιτούν ανοιχτή δομή χρωματίνης (ευχρωματίνη) (Mercer et al., 2009). Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, τα οποία συνήθως έχουν περιοχές πρόσδεσης σε RNA αλλά χαμηλή εξειδίκευση σε αλληλουχίες DNA, είναι σε θέση να προσδιορίσουν την πολύπλοκη σειρά τροποποιήσεων χρωματίνης που συμβαίνουν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, μέσω μηχανισμών συνεργασίας και αλληλεπίδρασης με διάφορα lncRNAs (Mercer et al., 2009).

Στην κατηγορία τροποποίησης της χρωματίνης ανήκει ο πολύ εξειδικευμένος ρόλος της απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος, δηλαδή η αποσιώπηση του ενός από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα από το lncRNA *Xist* (Li et al., 2019; Fatica & Bozzoni, 2013; Ponting et al., 2009; Kung et al., 2013; Mercer et al., 2009). Το *Xist* φαίνεται να παίζει ρόλο και στην διαφοροποίηση και με τη σειρά του ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από άλλα lncRNAs (Fatica & Bozzoni, 2013). Παράλληλα, τα lncRNAs συμμετέχουν και στην διαδικασία του γονιδιακού εντυπώματος, κατά την οποία δύο αλληλόμορφα ενός αυτοσωματικού γονιδίου από τους γονείς μαρκάρονται με φυλοκαθοριστικό τρόπο και μόνο το ένα απ' αυτά (το εντυπωμένο γονίδιο) αποσιωπείται (Li et al., 2019; Fatica & Bozzoni, 2013). Ειδικότερα, οι περιοχές που εντυπώνονται κωδικοποιούν διάφορα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, συμπεριλαμβανομένου και lncRNAs, τα οποία προσδέονται σε τέτοιες περιοχές και εμπλέκονται άμεσα στην σίγαση. Ωστόσο, η σίγαση των χρωμοσωμάτων παρουσιάζει μια διακύμανση στους διάφορους ιστούς. Τα συγκεκριμένα lncRNAs είναι μεγάλα, παραπάνω από 100 kb, και λειτουργούν *in cis* (Fatica & Bozzoni, 2013).

Συνοπτικά, και με βάση διάφορων μελετών, έχει δειχθεί ότι ένα μόνο lncRNA θα μπορούσε να λειτουργήσει με διαφορετικούς μηχανισμούς αναλόγως τον κυτταρικό τύπο, γεγονός που τονίζει την παρουσία είτε διαφορετικών παραγόντων είτε τροποποιήσεων χρωματίνης που επηρεάζουν τις λειτουργίες των lncRNAs σε διαφορετικά κυτταρικά περιβάλλοντα (Fatica & Bozzoni, 2013).

- II. **Μεταγραφική ρύθμιση:** Η μεταγραφή των lncRNAs χαρακτηρίζεται ως «διαδεδομένη» (pervasive transcription), καθώς εμφανίζεται σε όλες τις μορφές της ζωής και δεν οριοθετείται από κωδικοποιητικές περιοχές, αλλά μπορεί να ξεκινήσει από οποιαδήποτε γονιδιωματική περιοχή (Mercer et al., 2009; Kung et al., 2013; Wade & Grainger, 2014). Παράλληλα, τα lncRNAs έχοντας, όπως προαναφέρθηκε, ρυθμιστικό ρόλο συμμετέχουν με διάφορους τρόπους στη διαδικασία της μεταγραφής.

Πιο συγκεκριμένα, οι κοντινοί σε ένα γονίδιο υποκινητές μπορούν να μεταγραφούν σε lncRNA που προσελκύουν και ενσωματώνουν τις λειτουργίες των πρωτεϊνών σύνδεσης στο RNA στη διαδικασία της μεταγραφής, λειτουργώντας ως μεταγραφικοί

συμπαράγοντες με διεγερτική ή κατασταλτική επίδραση (Mercer et al., 2009; Kung et al., 2013; Kopp & Mendell, 2018). Επιπλέον, φαίνεται πως τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες είτε λειτουργώντας ως «δολώματα» για την προσέλκυση αυτών είτε ανταγωνίζοντας τους για την πρόσδεση είτε επηρεάζοντας τον κυτταρικό εντοπισμό αυτών των παραγόντων (Mercer et al., 2009; Kung et al., 2013). Σε συνάρτηση μ' αυτό το στοιχείο, αυτά τα μη κωδικοποιητικά μόρια μπορούν να ρυθμίσουν την δράση της RNA πολυμεράσης (RNAP) II μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της προσβασιμότητας στην RNA πολυμεράση, της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο έναρξης επηρεάζοντας κατ' επέκταση την επιλογή των υποκινητών, καθώς και με βασικά στοιχεία του εξαρτώμενου από την RNAP II μηχανισμού μεταγραφής (Mercer et al., 2009; Kung et al., 2013; Kopp & Mendell, 2018).

III. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση: Τα lncRNAs ως αντινοσηματικά μόρια έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συμπληρωματικές αλληλουχίες και μπορούν και συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική επεξεργασία των mRNAs, συμπεριλαμβανομένης της συναρμολόγησης, της μεταφοράς, της μετάφρασης και της αποδόμησης τους (Mercer et al., 2009). Αυτή η υβριδοποίηση που πραγματοποιείται ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες προκαλεί την στοχοποίηση των νοσηματικών mRNAs από σύμπλοκα πρωτεϊνών-τελεστών με τρόπο ανάλογο με τη στοχοποίηση συγκεκριμένων mRNAs από το RNA πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσίωπησης (RISC) μέσω της δράσης των siRNAs. Τα δίκλινα μόρια RNA που προκύπτουν, μπορούν να υποστούν επεξεργασία για να παραχθούν δευτερογενή siRNA, ενισχύοντας την πιθανότητα πολλά lncRNAs να τροφοδοτούν τα μονοπάτια σίγησης (Mercer et al., 2009). Επιπρόσθετα, ενδέχεται να υφίσταται μηχανισμός που τα αντινοσηματικά μετάγραφα lncRNAs σταθεροποιούν τα νοσηματικά mRNAs μέσω στρατολόγησης σταθεροποιητικών παραγόντων (Kung et al., 2013). Τέλος, τα lncRNAs μπορούν και ρυθμίζουν την αφθονία και την δράση άλλων μεταγράφων, όπως τα miRNAs που προσδένονται σε mRNA-στόχους και οδηγούν σε αποικοδόμησή τους. Αυτά τα lncRNAs χαρακτηρίζονται ως ενδογενώς ανταγωνιστικά RNAs (ceRNAs) και παρεμβαίνουν στην διαδικασία αυτή (Kopp & Mendell, 2018).

Η αυξανόμενη παρουσία μη κωδικοποιητικών μορίων και η λειτουργική τους εξειδίκευση ενισχύουν την θεωρία πως οι εξελιγμένες διαδικασίες ρύθμισης των RNAs αποτέλεσαν θεμελιώδες στοιχείο για τον γενετικό προγραμματισμό των ευκαρυωτών. Οι συνεχείς αναλύσεις και μελέτες ήδη ρίχνουν φως σε διάφορα lncRNA και στην σημασία τους για τον οργανισμό, αλλά υπάρχουν ακόμη διακριτά κενά όσον αφορά την κατανόηση των λειτουργιών και των μηχανισμών δράσης των lncRNAs (Mercer et al., 2009; Kopp & Mendell, 2018).

1.4.4. lncRNAs στα έντομα

Πλέον, τουλάχιστον 72 βάσεις δεδομένων έχουν επικεντρωθεί στον προσδιορισμό των βιολογικών λειτουργιών των lncRNAs στους διάφορους οργανισμούς. Ωστόσο, από τις πληροφορίες και τα δεδομένα lncRNA που έχουν συλλεχθεί και συνεχίζουν να συλλέγονται καθώς πραγματοποιούνται πολλές έρευνες, μόνο ελάχιστα απ' αυτά αφορούν τα έντομα (Legeai & Derrien, 2015). Πιο συγκεκριμένα, τα έντομα που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η *Drosophila melanogaster*, ως οργανισμός-μοντέλο και η *Apis mellifera* (μέλισσα) λόγω ιδιαίτερης κοινωνικής συμπεριφοράς και πολυφαινισμού (δημιουργία διαφορετικών

φαινοτύπων από ένα συγκεκριμένο γονότυπο) (Legeai & Derrien, 2015; Li et al., 2019). Τα lncRNAs που ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, φάνηκε ότι σχετίζονται με βασικές βιολογικές λειτουργίες όπως την ανάπτυξη (παράδειγμα το *bithorax* στη φρουτόμυγα *D. melanogaster*), την συμπεριφορά (*sphinx*, *NB-1* & *gar*, lncRNA γονίδια που επηρεάζουν αντίστοιχα την κατανομή εργασιών για τις μέλισσες και την συμπεριφορά των αρσενικών και τον ύπνο για τις φρουτόμυγες) και την νευρική έκφραση (παράδειγμα το *Kakusei*, lncRNA γονίδιο που συμμετέχει στο μεταβολισμό του RNA στους εγκεφάλους των μελισσών). Ο μηχανισμός δράσης των lncRNAs στα συγκεκριμένα είδη περιλαμβάνει είτε ευρεία *trans*-ρύθμιση με επιγενετικό έλεγχο της οργάνωσης της χρωματίνης είτε με δέσμευση του RNA σε ένα πυρηνικό διαμέρισμα, καθώς και γειτονική *cis*-ρύθμιση συγκεκριμένων mRNA γονιδίων, τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όσο και μετά από κάποιο στρεσογόνο παράγοντα (Legeai & Derrien, 2015; Etebari et al., 2016).

Ο εντοπισμός και ο χαρακτηρισμός γονιδίων lncRNA αποτελεί δύσκολο έργο λόγω έλλειψης συντηρημένου μοτίβου σε σύγκριση με τα κωδικοποιητικά γονίδια, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν αντιστοιχούν σε κάποια λειτουργία. Ειδικότερα, παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς το χρονικό διάστημα και αναπτυξιακό στάδιο που εκφράζονται, γι' αυτό και το χρονικό περιθώριο έκφρασης για τα lncRNA γονίδια είναι πολύ μικρότερο (Satyavathi et al., 2017). Αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση των κουνουπιών. Μια έρευνα καταδεικνύει τη σημασία της δράσης των lncRNAs και συγκεκριμένα στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, τον κύριο φορέα της ελονοσίας, όπου βρέθηκε ότι το 43% των μεταγράφων στο μεσέντερο είναι lncRNAs και το 32% αυτών εμφανίζει ένα ποσοστό ομολογίας με άλλα είδη (Padron et al., 2014; Etebari et al., 2016).

Τα lncRNAs φαίνεται πως συμμετέχουν και σε πιο εξειδικευμένες διαδικασίες στα έντομα, όπως στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα και την άμυνα ενάντια σε ιούς (Li et al., 2019). Όσον αφορά την πρώτη διαδικασία, μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη νυχτοπεταλούδα *Plutella xylostella* και συγκεκριμένα σε πληθυσμούς που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα σε διαφορετικά εντομοκτόνα όπως τα χημικά φιλτρονίλη και χλωροπυριφός και στο βακτήριο *Bacillus thuringiensis* (Bt), εντοπίστηκαν εκατοντάδες lncRNAs που εκφράζονται εξειδικευμένα και διαφοροποιημένα, φανερώνοντας έναν πιθανό ρόλο στη διαδικασία αυτή (Liu et al., 2017). Στη συνέχεια, ο ιός του Δάγκειου πυρετού έχει δείχθει ότι προκαλεί την έκφραση αρκετών lncRNAs στο εσωτερικό του κουνουπιού *Aedes* και αν γίνει knockdown των συγκεκριμένων lncRNAs ενισχύεται ο ιικός πολλαπλασιασμός, συστήνοντας έναν πιθανό ρόλο των lncRNAs στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε ιούς (Etebari et al., 2016).

Όπως προαναφέρθηκε, τα lncRNA γονίδια δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα, χαρακτηριστικό που τα προσδίδει υψηλή εξειδίκευση με το να εμφανίζονται σε ένα συγκεκριμένο είδος, ιστό ή αναπτυξιακό στάδιο. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι φαίνεται να εμπλέκονται σε διάφορες εξειδικευμένες διαδικασίες και λειτουργίες τα καθιστά ιδανικούς στόχους για γονιδιακή σίγηση, χωρίς να υπάρχουν παράπλευροι στόχοι (Sprullock et al., 2016; Ponting et al., 2009). Παρ' όλα αυτά η συνολική γνώση που διατίθεται είναι ακόμη αρκετά περιορισμένη. Γι' αυτό και λαμβάνουν μέρος διάφορες έρευνες για τον εντοπισμό και χαρακτηρισμό νέων υποσχόμενων lncRNAs που με βάση τη λειτουργία τους, θα είναι εφικτή η στόχευση τους μέσω διαφόρων τεχνολογιών με στόχο πάντα τον έλεγχο και την καταπολέμηση του εντόμου (Liu et al., 2019).

Μια πρόσφατη έρευνα από τους Gamez et al. (2020) ανέλυσε και παρουσίασε το ολοκληρωμένο μεταγράμμα του *Ae. albopictus* με βάση τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του κύκλου ζωής του κουνουπιού. Πολλά και διάφορα γονίδια εμφανίζουν έκφραση κατά τη διάρκεια όλου του κύκλου ζωής, αλλά αυτό που παρατηρήθηκε ήταν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης στα διαφορετικά χρονικά σημεία. Επιπρόσθετα, ένας αριθμός γονιδίων παρουσίασε έκφραση αναλόγως το φύλο, δεδομένα που πιθανώς να ξεκαθαρίζουν περισσότερο το «τοπίο» της αναπαραγωγικής βιολογίας των κουνουπιών. Ταυτοποιήθηκαν, πιο συγκεκριμένα, γονίδια των οποίων η έκφραση αυξανόταν στις ωοθήκες των θηλυκών ατόμων μετά από γεύμα αίματος, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως να διαδραματίζουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθηκών και τελικά την απόθεση των αυγών. Το lncRNA που επιλέχθηκε για αυτήν την διπλωματική εργασία ανήκει στην τελευταία κατηγορία, μεταξύ άλλων γονιδίων, lncRNA και κωδικοποιητικών.

1.5. Αξιοποίηση του RNAi στον έλεγχο του πληθυσμού εντόμων

Ο μηχανισμός RNAi, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σίγηση γονιδίων-στόχων. Ο τελικός στόχος ποικίλει και είναι ανάλογος με τον οργανισμό-στόχο. Στην περίπτωση των εντόμων, η τεχνολογία παρεμβαλλόμενου RNA αξιοποιείται τόσο για την καταπολέμηση εντόμων υγειονομικού και αγροτικού ενδιαφέροντος όσο και σε έρευνες σχετικές με την βιολογία του οργανισμού (Lopez et al., 2019). Όσον αφορά τα κουνούπια, στόχος είναι, μέσω της χρήσης του RNAi, η σίγηση γονιδίων υπεύθυνων για σημαντικές αναπτυξιακές διαδικασίες του οργανισμού, έτσι ώστε να προκληθεί στειρότητα ή θνησιμότητα, να ελεγχθεί ο πληθυσμός τους και να αποφευχθεί η μετάδοση των αρμοπιών (Airs & Bartholomay, 2017). Επιπρόσθετα, ενώ μια μέθοδος αντιμετώπισης των κουνουπιών-φορέων είναι η χρήση χημικών εντομοκτόνων, η τεχνολογία RNAi αποτελεί μια πιο οικολογική και πιο αποδοτική μέθοδο, καθώς χαρακτηρίζονται από μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον οργανισμό-στόχο, χωρίς να βλάπτουν άλλους ωφέλιμους οργανισμούς όπως η μέλισσα (Lopez et al., 2019; Airs & Bartholomay, 2017). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η τεχνολογία RNAi συστήνει μια νέα γενιά εντομοκτόνων, η οποία βασίζεται στην εισαγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) και τη σίγηση ενός γονιδίου-στόχου (Lopez et al., 2019; Airs & Bartholomay, 2017).

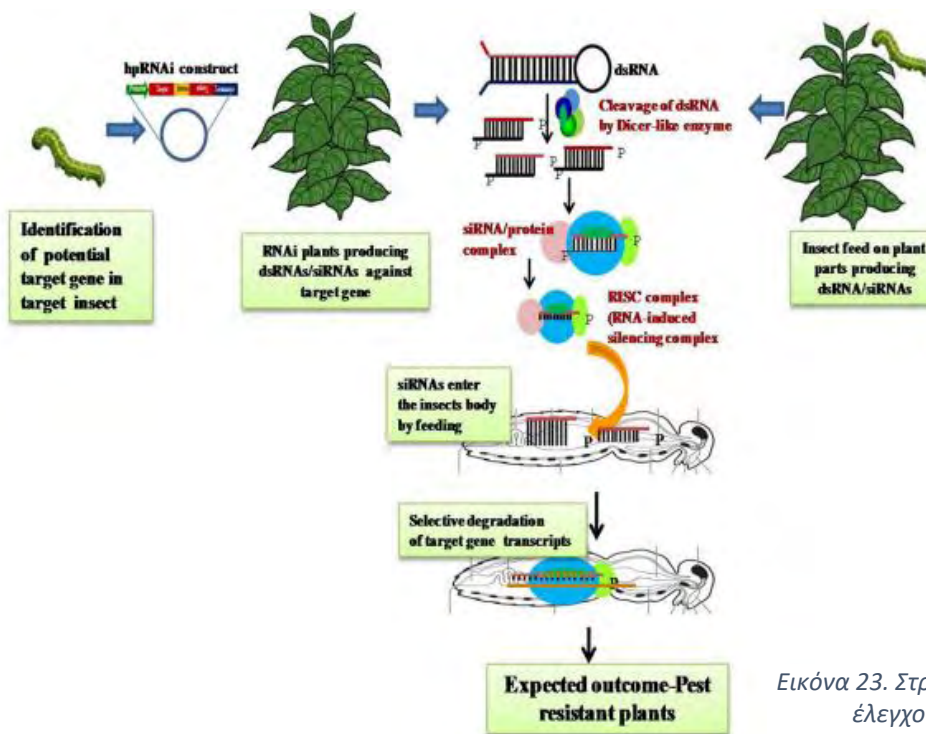
1.5.1. Τρόποι εισαγωγής του dsRNA

Η εισαγωγή αυτών των δίκλωνων μορίων RNA στον οργανισμό προϋποθέτει την παραγωγή τους που γίνεται να πραγματοποιηθεί είτε *in vitro* είτε *in vivo*. Πιο συγκεκριμένα, η *in vitro* παραγωγή dsRNA βασίζεται στην χημική τοποθέτηση βάσεων ή στην χρήση κατάλληλων εκκινητών σε συνδυασμό με τη χρήση της T7 πολυμεράσης. Τα dsRNAs που συντίθεται μέσω αυτής της διαδικασίας μπορούν έπειτα να χορηγηθούν στο έντομο με διαφορετικές μεθόδους, όπως τροφή με φυτά, εμβάπτιση (soaking), νανοσωματίδια (nanoparticles), λιπώματα (liposomes) και μικροένεση (microinjection) (Airs & Bartholomay, 2017; Mamta & Rajam, 2017).

Όσον αφορά την μέθοδο της τροφής με φυτά, αυτή αξιοποιείται στην περίπτωση που στόχοι είναι φυτοφάγα έντομα. Το dsRNA θα εισαχθεί εξωγενώς στο φυτό και θα διαχυθεί κατά μήκος του οργανισμού, με αποτέλεσμα τα έντομα που θα τραφούν με φυτικό ιστό να αποκτήσουν τα δίκλινα μόρια RNA (Mamta & Rajam, 2017; Yu et al., 2012). Στη συνέχεια, η μέθοδος της

εμβάπτισης σχετίζεται με την επώαση κυττάρων ή ιστών σε υδάτινο διάλυμα που περιέχει τα συντιθέμενα dsRNAs, αλλά λόγω της περιορισμένης εφαρμογής της, σπάνια χρησιμοποιείται σε πειράματα (Mamta & Rajam, 2017; Yu et al., 2012). Οι μέθοδοι των νανοσωματιδίων και των λιποσωμάτων σταθεροποιούν πρωτίστως τα μόρια dsRNAs που βρίσκονται στο εσωτερικό τους κατά την εισαγωγή τους στο εσωτερικό του εντόμου, αυξάνοντας έτσι την απόδοση του RNAi. (Mamta & Rajam, 2017; Airs & Bartholomay, 2017; Kollioroulou et al., 2017; Joga et al., 2016; Christiaens et al., 2020). Η μέθοδος της μικροένεσης ήταν και αυτήν που αξιοποιήθηκε για την διεκπεραίωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας και θα αναλυθεί στην επόμενη υποενότητα.

Η *in vivo* παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA βασίζεται σε κάποιον ζωντανό οργανισμό, όπως φυτά, ιούς, βακτήρια και μύκητες. Πιο συγκεκριμένα, οι αρμοιοί που μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών φορέων εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση μεταξύ των διαφόρων ειδών και αποτελούν πλεονέκτημα σε σχέση με άλλα συστήματα μεταφοράς των dsRNAs (Christiaens et al., 2020). Τα φυτά, τα βακτήρια και οι μύκητες μετασηματίζονται με την είσοδο πλασμιδιακού φορέα που έχει την δυνατότητα παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA. Ακολουθεί η κατανάλωση αυτών από το έντομο και η παρουσία των dsRNAs στο στομάχι του (Mamta & Rajam, 2017; Joga et al., 2016). Η διαδικασία που περιλαμβάνει τα μετασηματισμένα φυτά και την κατανάλωση αυτών από τα έντομα-στόχους παρουσιάζεται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23. Στρατηγική RNAi σε φυτικά κύτταρα για τον έλεγχο εντόμων (Mamta & Rajam, 2017)

Τα συστήματα βακτηρίων ξεχωρίζουν συγκριτικά με τα συστήματα των φυτών ή την παραγωγή μορίων dsRNA *in vitro*, διότι είναι χαμηλότερα σε κόστος, ευκολότερη η εφαρμογή τους και μάλιστα είναι δυνατή η χρήση σε μεγάλη κλίμακα μέσω ψεκάσματος (Airs & Bartholomay, 2017; Joga et al., 2016). Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι τα βακτήρια αποτελούν τροφή για τις προνύμφες των κουνουπιών, η εφαρμογή στη φύση γίνεται πιο εύκολη και αποδοτική. Οι μύκητες, με την

σειρά τους, βρίσκονται παντού στη φύση και καταναλώνονται από διάφορα έντομα, οπότε θεωρούνται υποψήφιοι για μετασχηματισμό και μεταφορά δίκλωνων μορίων RNA στο εσωτερικό των εντόμων (Joga et al., 2016). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος εκτός από το ότι είναι μη παθογόνος μικροοργανισμός και οργανισμός-μοντέλο σε πειράματα γενετικής, δεν διαθέτει βασικά συστατικά για την εκτέλεση του RNAi μονοπατιού, καθιστώντας τον ιδανικό για σύνθεση και μεταφορά dsRNA (Duman-Scheel, 2019). Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 24) απεικονίζονται συνοπτικά τα είδη των νουκλεϊκών οξέων και τα μέσα μεταφοράς που χρησιμοποιούνται για την στοχευμένη εκτέλεση του RNAi μηχανισμού.

	1 - RNA	2 - Plasmid	3 - Nanoparticle	4 - Virus	5 - Bacteria	6 - Yeast
A - Delivery Vehicle	None	Transfection 	Transfection Abiotic Biotic 			
B - Nucleic Acid	dsRNA siRNA 	Plasmid 		ssRNA 		

Εικόνα 24. Διάφορα παραδείγματα συστημάτων μεταφοράς των dsRNA για την ενεργοποίηση του μονοπατιού RNAi (Airs & Bartholomay, 2017)

Δυο στοιχεία είναι που χρειάζονται προσοχή και σημασία για ένα επιτυχές RNAi: η επιλογή της αλληλουχίας-στόχου και η μέθοδος μεταφοράς των dsRNAs (Scott et al., 2013). Αναφορικά με το γονίδιο-στόχο, αυτό θα πρέπει να είναι βασικό, απαραίτητο και να εκφράζεται κατά τη διάρκεια των σταδίων ζωής, διαδραματίζοντας κάποιο σημαντικό ρόλο σχετικό με την επιβίωση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή ή την εμβρυογένεση (Airs & Bartholomay, 2017; Yu et al., 2012). Ως συνέπεια, η σίγησή του μέσω του μηχανισμού RNAi θα προκαλέσει μειωμένη απόδοση του εντόμου, στειρότητα ή ακόμη και θνησιμότητα. Ένα χαρακτηριστικό που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι και ο χρόνος ζωής της πρωτεΐνης/mRNA μέσα στον οργανισμό, καθώς μία μεγαλύτερης διάρκειας ζωή οδηγεί σε πιο αδύναμη εφαρμογή του RNAi μηχανισμού (Mamta & Rajam, 2017). Η επιλογή της αλληλουχίας μέσα στο γονίδιο-στόχο πρέπει, επίσης, να γίνει πολύ προσεκτικά, έτσι ώστε να είναι ταυτόσημα τουλάχιστον μερικά siRNAs (21-25 bp) που θα προκύψουν από τα dsRNAs με το mRNA-στόχο του εντόμου. Σε συνάρτηση με αυτό, είναι σημαντικό να υπάρχει αντιστοίχως μια ικανοποιητική απόκλιση αλληλουχιών μεταξύ αυτών των siRNAs και των κωδικοποιητικών γονιδίων οργανισμών που δεν στοχεύονται (Scott et al., 2013; Christiaens et al., 2020).

Στη συνέχεια, η διαδικασία αποτελείται από τη μεταφορά των δίκλωνων μορίων RNA στο εσωτερικό του εντόμου για ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού. Η μέθοδος σε συνδυασμό με την ποσότητα, την δομή και το μήκος των dsRNAs μπορεί να επηρεάσει την απόδοση του μηχανισμού (Yu et al., 2012; Scott et al., 2013; Mamta & Rajam, 2017; Christiaens et al., 2020). Αναφορικά της μεθόδου μεταφοράς των dsRNAs, η επιλογή κάθε φορά γίνεται ανάλογα με τον οργανισμό και τον απώτερο σκοπό, η εφαρμογή στη φύση για άμεση αντιμετώπιση ή έρευνα της βιολογίας του εντόμου στο εργαστήριο. Η ποσότητα όμως του dsRNA φαίνεται πως επηρεάζεται άμεσα από τη βιοχημεία του οργανισμού. Πιο ειδικά, τα έντομα διαθέτουν νουκλεάσες στους σιελόγονους αδένες, στο μεσέντερο και στην αιμολέμφο που μπορούν και αποικοδομούν τα

δίκλινα μόρια RNA (Mamta & Rajam, 2017; Christiaens et al., 2020). Η μέθοδος της τροφής αντιμετωπίζει το εξής πρόβλημα, κάτι που αντιμετωπίζεται αν τελικά η χορήγηση των dsRNAs γίνει μέσω μικροένεσης απευθείας στον ιστό που μας ενδιαφέρει.

Αφού ξεπεραστούν τόσο τα εξωτερικά όσο και τα εσωτερικά εμπόδια, το επόμενο βήμα σχετίζεται με την εσωτερική του dsRNA στο κύτταρο. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς: Sid-like διαμεμβρανικά κανάλια ή ενδοκύτωση που εξαρτάται από την κλαθρίνη. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι αυτός που εμφανίζεται στα περισσότερα έντομα. Η δυνατότητα μεγιστοποίησης του RNAi μηχανισμού απαιτεί την συστημική εξάπλωση του μονοπατιού σε όλο τον οργανισμό, όπως γίνεται στα φυτά και στον *C. elegans*, όμως στα έντομα απουσιάζουν οι απαιτούμενες RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RdRP) και έχει παρατηρηθεί η διαδικασία μόνο σε ένα έντομο (*D. v. virgifera*) (Christiaens et al., 2020; Li et al., 2018; Scott et al., 2013; Mamta & Rajam, 2017; Yu et al., 2012). Τέλος, η παρουσία ιού στο εσωτερικού του εντόμου μπορεί να παρεμβεί στη διαδικασία του RNAi, είτε στρέφοντας την προσοχή του μηχανισμού στην άμυνα κατά του ιού είτε καταστέλλοντας πρωτεΐνες του RNAi μονοπατιού (Christiaens et al., 2020).

1.5.1.1. Η μέθοδος της μικροένεσης

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιούταν ήδη από την ανακάλυψη του RNAi από τους Fire και Mello (1998) στον *C. elegans* ως ένας τρόπος χορήγησης των dsRNA μορίων και εκτίμησης των επιδράσεων του νοηματικού και αντι-νοηματικού RNA, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (Mamta & Rajam, 2017; Scott et al., 2013; Yu et al., 2012). Η πρώτη επιτυχής εφαρμογή μικροένεσης στα έντομα πραγματοποιήθηκε στη *D. melanogaster* το 1998 ενδοκυτταρικά, κατά την οποία έγινε knockdown των γονιδίων *frizzled* και *frizzled 2* (Yu et al., 2012; Scott et al., 2013). Ακολούθως, και σε άλλα έντομα εφαρμόστηκε η τεχνολογία RNAi όπως στη μέλισσα *Apis mellifera* και στο κόκκινο σκαθάρι των αλεύρων *Tribolium castaneum*. Το τελευταίο ξεχωρίζει καθώς εμφανίζει, συγκριτικά με τον οργανισμό-μοντέλο *D. melanogaster*, επαγόμενη συστημική απόκριση RNAi. Το χαρακτηριστικό αυτό αξιοποιήθηκε με σκοπό την έρευνα συστατικών των μονοπατιών ανάπτυξης και μεταμόρφωσης όπως οι πυρηνικοί υποδοχείς, καθώς και την μελέτη γονιδίων που συμμετέχουν στο ίδιο τον RNAi μηχανισμό (Yu et al., 2012; Scott et al., 2013). Από τις πρώτες φορές που χρησιμοποιήθηκε η μικροένεση για την εκτέλεση του RNAi στα κουνούπια ήταν πιο συγκεκριμένα σε ενήλικα κουνούπια *Anopheles gambiae*, φορείς της ελονοσίας (Blandin et al., 2002). Συνολικά, η μέθοδος έχει εφαρμοστεί σε όλα τα στάδια της ζωής πολλών ημί- και ολομετάβολων εντόμων με αποτέλεσμα να έχει δημοσιευτεί μια πληθώρα πρωτοκόλλων που τυποποιούν τη διαδικασία (Scott et al., 2013). Παρ' όλα αυτά, για κάθε οργανισμό υπάρχουν σημεία που χρειάζονται περισσότερη προσοχή και διαφορετικό χειρισμό.

Αυτή καθ' αυτή η μέθοδος χαρακτηρίζεται από κάποια μειονεκτήματα και κάποια πλεονεκτήματα. Όσον αφορά τα μειονεκτήματα, το έργο της μικροένεσης είναι λεπτεπίλεπτο και χρονοβόρο σε σχέση με τις εναλλακτικές μεθόδους, απαιτείται εξειδικευμένο και έμπειρο προσωπικό, καθώς και οπτικοποίηση της διαδικασίας (Mamta & Rajam, 2017; Yu et al., 2012). Επιπρόσθετα, ποικίλοι παράγοντες παίζουν ρόλο για το αν η μέθοδος θα έχει επιτυχία όπως η επιλογή βελόνας, ο βέλτιστος όγκος, το σημείο της ένεσης και οι τρόποι ακινητοποίησης (κρύο, CO₂, προσκόλληση σε ένα υπόστρωμα). Τέτοιες παράμετροι έχουν διαφορετική σημασία ανάλογα με τον οργανισμό και το στάδιο ζωής που θα πραγματοποιηθεί η ένεση (Yu et al., 2012).

Για παράδειγμα, στα κουνούπια χρησιμοποιείται συνήθως η λεπτή βελόνα πάχους ~150μm που δεν αρκεί για χορήγηση σε μύγες, στις οποίες βολεύει η βελόνα πάχους ~250μm που προκαλεί αντίστοιχα εκτεταμένη βλάβη στα μικρότερα κουνούπια. Μια βελόνα με σπασμένη μύτη φαίνεται να λειτουργεί αποδοτικότερα στην περίπτωση των κουνουπιών, αλλά χρειάζεται εξαιρετική προσοχή το πως θα περάσει από την επιδερμίδα χωρίς να προκληθεί βλάβη στους ιστούς και θνησιμότητα (Sanscrainte et al., 2018). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι μικροενέσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε οποιοδήποτε στάδιο του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου, παρατηρήθηκαν σε πειράματα των Samrath και Puttaraju (2012) αυξημένα επίπεδα επιβίωσης κατά τα στάδια του εμβρύου και του ενηλίκου, ενώ μειωμένα επίπεδα επιβίωσης κατά τα στάδια της προνύμφης και νύμφης. Αυτό ίσως να οφείλεται στο υδατινό περιβάλλον ανάπτυξης και στην αυξημένη κινητικότητα κατά τη διάρκεια αυτών των σταδίων. Επομένως, τέτοιες παράμετροι πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν για βελτιστοποίηση των υπαρχόντων πρωτοκόλλων ή και την προτίμηση εναλλακτικών μεθόδων όπως η κατανάλωση μετασχηματισμένων μικροοργανισμών. Τέλος, ένα βασικό μειονέκτημα είναι η αδυναμία εφαρμογής αυτής της μεθόδου στη φύση και σε μεγάλη κλίμακα (Mamta & Rajam, 2017). Η αξιοποίηση της είναι καθαρά για εργαστηριακούς και ερευνητικούς σκοπούς.

Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα, το πιο βασικό είναι η απευθείας μεταφορά των dsRNAs στον ιστό-στόχο ή στην αιμολέμφο, αποφεύγοντας έτσι ενδεχόμενα εμπόδια όπως το εξωτερικό περιβάλλον ή το επιθήλιο του εντέρου που ίσως να αποτελούν πρόβλημα για τις μεθόδους της τροφής και της εμβάπτισης. Ένα ακόμη πλεονέκτημα αποτελεί το ότι η ποσότητα του εισαγόμενου dsRNA είναι γνωστή σε αντίθεση με τις προηγούμενες μεθόδους (Yu et al., 2012; Scott et al., 2013; Mamta & Rajam, 2017). Επιπλέον, αποτελεί έναν τρόπο για την επαγωγή συστημικού RNAi, καθώς γίνεται παράκαμψη του μεσεντέρου κατά την εισαγωγή νουκλεϊκών οξέων (Sanscrainte et al., 2018). Τέλος, παρότι η διαδικασία της μικροένεσης είναι δύσκολη και με προκλήσεις, μπορεί να αξιοποιηθεί άμεσα στην έρευνα υποψήφιων γονιδίων-στόχων, χωρίς να είναι απαραίτητα ο σχεδιασμός πλασμιδιακών φορέων και ο μετασχηματισμός μικροοργανισμών για τη μέθοδο της τροφής που επίσης εφαρμόζεται συχνά (Samrath και Puttaraju, 2012).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου ενός lncRNA γονιδίου, ενδεχόμενα ρυθμιστικού, στην ανάπτυξη των ωοθηκών και την ωοαπόθεση στο κουνούπι *Aedes albopictus* μέσω της σίγησής του με την εφαρμογή της τεχνολογίας RNAi. Η επιλογή του lncRNA γονιδίου έγινε με βάση RNA seq δεδομένα, στα οποία το γονίδιο υπερεκφραζόταν αποκλειστικά στις ωοθήκες του κουνουπιού έπειτα από το γεύμα αίματος, υποδηλώνοντας τον πιθανό του ρόλο στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του κουνουπιού. Κατασκευάστηκαν δίκλινα μόρια RNA (dsRNAs) για την στόχευση των μεταγράφων του συγκεκριμένου lncRNA γονιδίου και χορηγήθηκαν σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια που έχουν ζευγαρώσει, μέσω μικροένεσης. Στη συνέχεια και αφού κατανάλωσαν αίμα, παρατηρήθηκαν ο φαινότυπος ως προς την ανάπτυξη των ωοθηκών, το ποσοστό απόθεσης των αυγών και τα τελικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα άτομα που είχε εισαχθεί το dsRNA. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας θα διακρίνουν το αν εντέλει το lncRNA γονίδιο που επιλέχθηκε διαδραματίζει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθηκών και στην ωοαπόθεση, έτσι ώστε να αξιοποιηθεί μελλοντικά ως πιθανός στόχος κατά την εφαρμογή βιολογικών εντομοκτόνων.

3. Μέθοδοι & Υλικά

3.1. Συνθήκες εκτροφής του εργαστηριακού πληθυσμού *Ae. albopictus*

Ο εργαστηριακός πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αποτελεί ευγενική προσφορά του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που βρίσκεται στον Βόλο. Πλέον διατηρείται και εκτρέφεται στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Οι συνθήκες επώασης περιλαμβάνουν:

- i. θερμοκρασία στους 26°C
- ii. σχετική υγρασία 60%
- iii. κύκλος φωτός/σκοταδιού σε 14/10 ώρες αντίστοιχα

Οι συνθήκες εκτροφής περιλαμβάνουν:

- i. Για τις προνύμφες, θρυμματισμένη ξηρά γατοτροφή
- ii. Για τα ενήλικα άτομα, υδατικό διάλυμα σακχαρόζης 10% (ζαχαρόνερο) και ανθρώπινο αίμα (για την παραγωγή αυγών)

Η διαβίωση των κουνουπιών γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένα κλουβιά, τα οποία αποτελούνται και από δίχτυ που διευκολύνει σε περίπτωση ανάγκης για κατανάλωση αίματος. Κάθε τόσο, γίνεται συλλογή αυγών για ανανέωση του εργαστηριακού πληθυσμού. Τα αυγά αποτίθενται σε διηθητικό χαρτί, το οποίο αποθηκεύεται σε διαφάνεια παρουσία υγρασίας έως 3 μήνες. Η μετέπειτα χρησιμοποίησή τους για την παραγωγή νέων κουνουπιών απαιτεί μόνο την παρουσία νερού.

3.2. Μέθοδοι χειρισμού νουκλεϊκών οξέων

3.2.1. Απομόνωση RNA (RNA extraction) από το κουνούπι *Aedes albopictus*

Η απομόνωση του ολικού RNA είναι απαραίτητη διαδικασία έτσι ώστε να παραχθεί στη συνέχεια cDNA που θα χρησιμοποιηθεί στη Real-time PCR για καθορισμό των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-στόχου.

Υλικά

- ✓ Extrazol
- ✓ Ο απομονωμένος ιστός
- ✓ BCP
- ✓ Γλυκογόνο 10mg/ml
- ✓ Ισοπροπανόλη
- ✓ 70% αιθανόλη
- ✓ Pestles

Μέθοδος

- 1) Μεταφορά των tubes που περιέχουν το δείγμα (ιστό) και 20 µL Extrazol στον πάγο. Μόλις ξεπαγώσουν, πραγματοποιείται ένα spin-down για καθίζηση πιθανών υπολειμμάτων που είχαν μείνει στα τοιχώματα
- 2) Χρήση διαφορετικού pestle σε κάθε tube και ομογενοποίηση του δείγματος
- 3) Προσθήκη Extrazol μέχρι τα 200µL και παράλληλο ξέπλυμα του pestle
- 4) Καλό Vortex
- 5) Επώαση σε RT ή στον πάγο για το λιγότερο 5' (για να δράσει το αντιδραστήριο και να απελευθερωθεί το RNA)
- 6) Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 10' και καθαρισμός των pestles με βούρτσα νερό, αιθανόλη και απεσταγμένο νερό
- 7) Λήψη υπερκειμένου και μεταφορά σε καινούριο tube πολύ προσεκτικά. Σε περίπτωση που φύγει μαζί με το υπερκείμενο και το ίζημα, γίνεται επανάληψη της φυγοκέντρησης
- 8) Προσθήκη 0,1X BCP, δηλαδή 0,1X200 µl=20 µl σε κάθε tube και καλό ανακάτεμα για το λιγότερο 15'' έως ότου δημιουργηθεί γαλάκτωμα.
- 9) Επώαση σε RT για 2-15'
- 10) Φυγοκέντρηση στους 4°C, 14.000rpm, 15'
- 11) Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο tube
- 12) Προσθήκη 0,5µL glycogen και ακολούθως 0,5X ισοπροπανόλη (100 µl)
- 13) Επώαση σε RT για 10'
- 14) Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 15'
- 15) Παρατήρηση ιζήματος, αφαίρεση υπερκειμένου και πλύση με 200µl EtOH 70%
- 16) Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 10'
- 17) Αφαίρεση της μεγαλύτερης ποσότητας αιθανόλης με γρήγορο άδειασμα του tube και λήξη υγρού με πιπέττα
- 18) Εξάτμιση υπολειμμάτων αιθανόλης με επώαση των tubes σε συνθήκες δωματίου για 15-20' με ανοιχτά καπάκια ή για 5' στους 55°C.
- 19) Αναδιάλυση του ιζήματος σε 23µl H₂O
- 20) Μέτρηση συγκέντρωσης διαλύματος στο φασματοφωτόμετρο Quawell

3.2.2. Επώαση με DNase (DNase treatment)

Η διαδικασία λαμβάνει μέρος ώστε να κατακερματιστούν όλα τα μόρια DNA που μπορεί να υπάρχουν κατά την απομόνωση RNA που πραγματοποιήθηκε. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης μιας δεσοξυριβονουκλεάσης, ενός ενζύμου που υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στα μόρια του DNA.

Για την επιτυχία της αντίδρασης συνιστάται η χρήση 1 µl DNase για ποσότητα 10 µg νουκλεϊκών οξέων. Αν η ποσότητα των νουκλεϊκών οξέων είναι μεγάλη (πάνω από 10000 ng), τότε πρέπει να γίνει αραιώση στα 10000 ng.

Υλικά

- ✓ Το απομονωμένο RNA

- ✓ Turbo DNase I (NEB)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) ενζύμου DNase I (10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.6 σε θερμοκρασία 25°C)
- ✓ Ammonium acetate 7,5M
- ✓ Φαινόλη/χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)
- ✓ 100 % ice cold EtOH
- ✓ 70 % ice cold EtOH
- ✓ Αποστειρωμένο ddH₂O

Μέθοδος

- 1) Δημιουργία Master mix: 10x buffer & DNase – σύντομο vortex στο buffer. Για 50μL αντίδρασης χρειάζονται 5μL 10x buffer , 1μL DNase I και 14 μl ddH₂O για κάθε δείγμα
Προσοχή : η ποσότητα του RNA που θα μπει στην αντίδραση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 μg συνολικά.
- 2) Πυετάρισμα κατάλληλης ποσότητας από το RNA με βάση την συγκέντρωση του nanodrop έτσι ώστε να υπάρχουν 10 μg συνολικά και προσθήκη νερού μέχρι τα 30 μl.
- 3) Προσθήκη 20 μL master mix σε κάθε δείγμα, προσέχοντας να μην ακουμπήσει το χέρι το RNA στο tube. Κάθε tube που έχει ένζυμο τοποθετείται ανάποδα για να ξεχωρίζει απ' όσα δεν έχουν το ένζυμο.
- 4) Ακολουθεί vortex για 3" και μια πολύ σύντομη φυγοκέντρηση (λόγω του ότι περιέχουν γλυκερόλη μέσα, να αναμιχθεί με το νερό). Μετά **απευθείας** υδατόλουτρο στους 37° για 1 h.
- 5) Μετά το υδατόλουτρο, διατηρούνται στον πάγο και προστίθενται 130 μl Ammonium Acetate (7,5M → 2,5M) και 220 μl ddH₂O (WFI) για τελικό όγκο 400 μl.
- 6) Προσθήκη 400 μl φαινόλη/χλωροφόρμιο, σε κάθε δείγμα (δημιουργείται γαλάκτωμα) και vortex για 30"-1' (πρέπει να γίνει καλά η ανάμειξη, πριν γίνει ο διαχωρισμός των φάσεων).
- 7) Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm, 10 min, 4°C.
- 8) Αφαίρεση 400 μl, τα πρώτα 200 μl με 200αρα πιπέτα και **με πολύ προσοχή από το υπερκείμενο για να μην διαταραχθεί η μεσόφαση** και μεταφορά σε άδειο tube – το οποίο έχει αφεθεί στον πάγο πριν ανοιχτό.
- 9) Προσθήκη 2,5X του όγκου 100 % ice cold EtOH, ανακίνηση 4-5 φορές για να γίνει καλή ανάμειξη και τοποθέτηση στους -80°C τουλάχιστον για 1 h (τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε αυτό το στάδιο για εβδομάδες). Έχει γίνει προσθήκη και 0,5 μl γλυκογόνου για διάκριση του pellet.
- 10) Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 40 min, 14.000 rpm, 4°C. Αφαίρεση με πολύ προσοχή όλου του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα.
- 11) Προσθήκη 500 μl 70 % ice cold EtOH (παρασκευασμένη με WFI) και ανακίνηση μόνο, όχι vortex, γιατί θα διαταραχθεί η πελέτα.
- 12) Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 10 min, 4°C.
- 13) Αφαίρεση με πολύ προσοχή του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα, πετώντας την περισσότερη αιθανόλη στο waste και όση μένει στα τοιχώματα φεύγει χτυπώντας ελαφρά το tube σε χαρτί

- 14) Spin down για απόσπαση όσης αιθανόλης έχει μείνει με την 10άρα πιπέτα προσεκτικά και γνωρίζοντας μετά τη φυγοκέντρηση που βρίσκεται το pellet
- 15) 20 min στον πάγκο και σκεπασμένα
- 16) Επαναδιάλυση με WFI στα 11 μl και τοποθέτηση των δειγμάτων στους 65°C για 5' για να επαναδιαλυθούν.
- 17) Έντονο vortex για 1 min, spin-down και ξανά vortex
- 18) Μέτρηση συγκέντρωσης διαλύματος με το φασματοφωτόμετρο Quawell
- 19) Αποθήκευση τα δείγματα στους -80°C

3.2.3. Σύνθεση cDNA

Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί με διαφορετικούς εκκινητές (random hexamers, gene specific, oligo-dT), ανάλογα με το στόχο του πειράματος. Στην προκειμένη χρησιμοποιήσαμε oligo-dT προκειμένου να μετατρέψουμε σε cDNA μόνο τα ώριμα mRNA μετάγραφα. Οι oligo-dT primers προσδένονται στις poly-A ουρές των μεταγράφων.

Υλικά

- ✓ Ολικό RNA του επιθυμητού ιστού
- ✓ Oligo dT εκκινητές (νουκλεοτιδική αλληλουχία με 15 βάσεις θυμίνης) 50mM
- ✓ dNTPs (10 mM κάθε NTP)
- ✓ Buffer ενζύμου (5X)
- ✓ DTT (100 mM)
- ✓ RNaseOUT αναστολέας ριβονουκλεασών (40U/μl)
- ✓ Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (MMLV-RT, 200u/μl)
- ✓ Απεσταγμένο νερό ddH₂O

Μέθοδος

- 1) Υπολογισμός από κάθε δείγμα 1000ng RNA (στο nanodrop). Σε περίπτωση που οι ποσότητες είναι μικρότερες, προσθέτω λιγότερα ng (π.χ. 300) από κάθε δείγμα υπολογίζοντας κάθε φορά τον όγκο για το κάθε δείγμα. Προσθήκη νερού μέχρι τελικό όγκο 10 μl.
- 2) Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προσθήκη 1 μl από 50mM oligo-dT primers και 1μl από 10mM dNTPs (παγωμένα και τα δύο, αποφυγή Vortex, καλύτερα πιπετάρισμα ή ανακίνηση).
- 3) Ακολουθεί vortex, υδατόλουτρο στους 65°C για 5' και αμέσως μετά στον πάγκο για 10'.
- 4) Ετοιμασία του mix της αντίδρασης με τελικό όγκο 20μl. Για κάθε δείγμα προσθέτω 4 μl buffer 5x (παγωμένο), 2 μl DTT (100 mM, παγωμένο), 1 μl Rnase out (40U/μl), 1 μl MMLV-RT (200u/μl, στο coolbox)
- 5) Vortex, spin-down και προσθήκη 8 μl σε κάθε δείγμα από το mix.
- 6) Υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες
- 7) Μετά τις 2 ώρες προσθήκη 180 μl ddH₂O (WFI) και αποθήκευση στους -20°C.

3.2.4. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων που βασίζεται στον διαχωρισμό των φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα νουκλεϊκά οξέα ως αρνητικά φορτισμένα μόρια κινούνται από τον αρνητικά φορτισμένο πόλο (κάθοδος) προς τον θετικά φορτισμένο πόλο (άνοδος) μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Η ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των δειγμάτων επιτυγχάνεται με τη σύγκριση των ζωνών των δειγμάτων με αυτές του μάρτυρα (ladder) γνωστού μοριακού μεγέθους (bp) και συγκέντρωσης (ng/μl), ενώ η οπτικοποίηση στηρίζεται στη χρήση φθορίζοντων ουσιών, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και την εξέταση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV.

Υλικά

- ✓ Αγαρόζη (AgaPure Agarose LE, Canvax Biotech)
- ✓ Δείγματα νουκλεϊκών οξέων
- ✓ Μάρτυρας νουκλεοτιδικών βάσεων (100 bp Minotech Ladder)
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X
- ✓ Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Loading Buffer) 10X
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- ✓ Ογκομετρικός σωλήνας
- ✓ Κωνική φιάλη

Μέθοδος

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης:

- 1) Υπολογισμός και ζύγισμα των απαραίτητων γραμμαρίων αγαρόζης, ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πηκτώματος..
- 2) Υπολογισμός απαραίτητου όγκου αραιωμένου διαλύματος TBE (0,5X), του οποίου η ανάκτηση γίνεται με ογκομετρικό σωλήνα.
- 3) Προσθήκη σε μια κωνική φιάλη της αγαρόζης και του διαλύματος TBE που υπολογίστηκαν προηγουμένως.
- 4) Προσθήκη EtBr σε συγκέντρωση 3-4μL/100mL πηκτώματος αφού το διάλυμα αποκτήσει θερμοκρασία περίπου 40-50°C.
- 5) Ανάδευση και τοποθέτηση στο κατάλληλο στεγανοποιημένο καλούπι που περιέχει και τα «χτενάκια» που θα δημιουργήσουν τα «πηγαδάκια» για την φόρτωση των δειγμάτων.

Για την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης:

- 6) Αφού το διάλυμα στερεοποιηθεί, αφαίρεση των «χτενακίων» και το μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή ηλεκτροφόρησης.

- 7) Πλήρης κάλυψη του πηκτώματος (ιδίως τα «πηγαδάκια») με το διάλυμα TBE 0,5X που περιέχεται στη συσκευή
- 8) Προσθήκη του loading buffer στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα (συνήθως αντιστοιχούν 5 µl loading buffer σε 50 µl δείγματος) και καλή ανάδευση.
- 9) Με τη χρήση πιπέτας, φόρτωση των δειγμάτων και του μάρτυρα (ladder) στα «πηγαδάκια».
- 10) Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης (90-120V) για τη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου και τον διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων.
- 11) Μετά από περίπου 30 λεπτά, μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) για την παρατήρηση των ζωνών.

Σημειώσεις:

- i. Όλες οι διαδικασίες γίνονται σε ξεχωριστό δωμάτιο με δικό του εξοπλισμό και με ιδιαίτερη προσοχή λόγω της μεταλλαξιογόνου και τερατογόνου δράσης του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).
- ii. Σε περίπτωση ηλεκτροφόρησης RNA, χρησιμοποιείται αποστειρωμένο TBE 0,5X και loading dye purple 6X της Biolabs.

3.2.5. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Τα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν γίνεται στη συνέχεια να απομονωθούν από το πήκτωμα αγαρόζης με βάση το NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit της Macherey-Nagel και το πρωτόκολλο που διατίθεται.

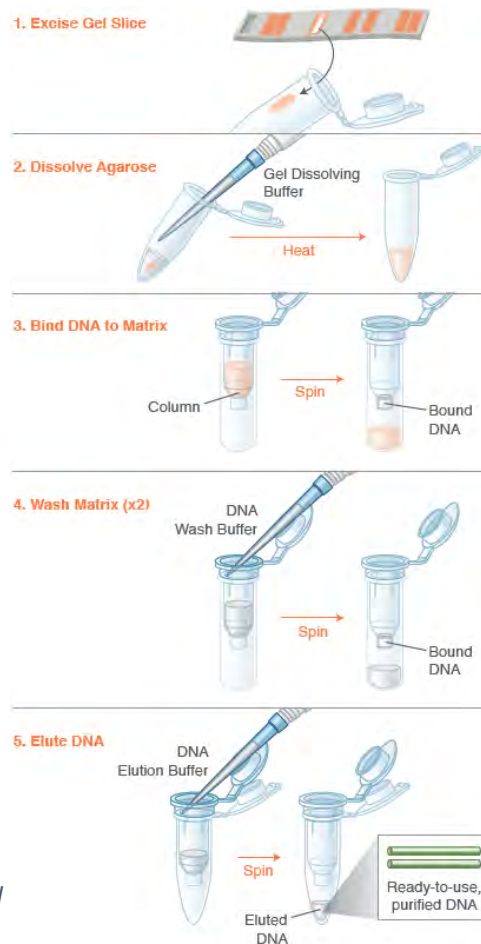
Υλικά

- ✓ NT1 Buffer
- ✓ NT3 Buffer
- ✓ Elution Buffer
- ✓ ddH₂O

Μέθοδος

- 1) Αφαίρεση με νυστέρι του σημείου στο πήκτωμα αγαρόζης που παρατηρήθηκε η επιθυμητή ζώνη, όπου και βρίσκεται το DNA προς απομόνωση
- 2) Μεταφορά του κομματιού του πηκτώματος σε ένα erpendorf των 1,5 ml και ζύγισμα αυτού (αφού έχει μηδενιστεί ο ζυγός με ένα άδειο erpendorf των 1,5 ml).
- 3) Προσθήκη 200 µl NT1 Buffer για 0,1 gr πήκτωμα, οπότε ανάλογα με το βάρος του κάθε πηκτώματος, γίνεται υπολογισμός της ποσότητας (µl) του διαλύματος που θα προστεθεί.
- 4) Μετά την προσθήκη του NT1 buffer, επώαση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C για 15-20 λεπτά με ανάδευση στο vortex κάθε 5 λεπτά.

- 5) Τοποθέτηση μιας στήλης απομόνωσης DNA σε ένα νέο σωλήνα συλλογής errendorf των 2 ml και μεταφορά σε αυτή έως 700 μl του διαλύματος πηκτώματος αгарόζης – NT1 και φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- 6) Αφαίρεση της στήλης για απομάκρυνση του εκλούσματος και τοποθέτηση ξανά πίσω στο errendorf των 2 ml. Επανάληψη της διαδικασίας σε περίπτωση που το δείγμα είναι παραπάνω από 700 μl.
- 7) Προσθήκη 700 μl NT3 buffer στη στήλη-errendorf και φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό
- 8) Αφαίρεση της στήλης για απομάκρυνση του εκλούσματος και τοποθέτηση ξανά πίσω στο errendorf των 2 ml.
- 9) Επανάληψη των βημάτων 8 και 9.
- 10) Φυγοκέντρηση του δείγματος σε στεγνή στήλη στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.
- 11) Μεταφορά της στήλης σε νέο errendorf των 1,5 ml και προσθήκη 20-30 μl από είτε elution buffer είτε ddH₂O, ανάλογα με την συνέχεια του πειράματος (αν η συνέχεια περιλαμβάνει *in vitro* πείραμα, γίνεται προσθήκη ddH₂O), και αφού έχει γίνει θέρμανση σε υδατόλουτρο.
- 12) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 13) Φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.
- 14) Αφαίρεση στήλης και αποθήκευση του errendorf, το οποίο περιέχει πλέον το επιθυμητό και καθαρό DNA, στους -20°C για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 25. Πρωτόκολλο του Monarch® DNA Gel Extraction Kit της New England Biolabs Ltd.

3.3. Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

3.3.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Για την ενίσχυση του γονιδίου, σχεδιάστηκαν εκκινητές τόσο για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) όσο και για τη συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη βοήθεια διαφόρων βιοπληροφορικών εργαλείων. Συγκεκριμένα, για την συμβατική PCR σχεδιάστηκαν εκκινητές που περιλάμβαναν πέρα από την αλληλουχία του γονιδίου-στόχος και με μια αλληλουχία 20 nt του φαγικού υποκινητή T7 στο 5' άκρο (taatacgactcactataggg) με τη βοήθεια του εργαλείου IDSeq της ιστοσελίδας E-RNAi. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν και επιλέχθηκαν για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) και την ενεργοποίηση του μηχανισμού RNAi. Για την qPCR, ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίστηκε στο PrimerQuest Tool της Integrated DNA Technologies. Επίσης, αξιοποιήθηκε το Primer blast του NCBI για την επιβεβαίωση της ειδικής πρόσδεσης των

εκκινητών στην αλληλουχία στόχος και την αποφυγή ενίσχυσης παραπροϊόντων. Τέλος, το OligoAnalyzer Tool της Intergrated DNA Technologies χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση και σύγκριση της αξιοπιστίας αυτών των εκκινητών, καθώς υπολογίζει το ΔG για τον σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών και την T_m (°C) για τον σχηματισμό διατάξεων (hairpins) εξαιτίας της ενδομοριακής συμπληρωματικότητας. Ιδανικά θέλουμε το ΔG να είναι περισσότερο από -9 και η T_m μικρότερη από την T_m των εκκινητών. Στην περίπτωση, όμως, των εκκινητών με T7 άκρα επειδή πρόκειται για μεγάλους εκκινητές είναι αναμενόμενο να παρουσιάζουν αρκετά μειωμένο ΔG στα ομο- και ετεροδιμερή. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εντέλει, τόσο για qPCR όσο και PCR, ήταν κι αυτοί που εμφάνισαν τα καλύτερα χαρακτηριστικά και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, μαζί με το μήκος των amplicons που προκύπτουν σε κάθε περίπτωση. Στις εικόνες 26 και 27 απεικονίζονται τα ζεύγη εκκινητών πάνω στην αλληλουχία για κάθε περίπτωση.

Πίνακας 1. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου

Gene	C6/36: XR_002129994.1 / Aalbo_1: XR_003898997.1
Transcript length	1088 bp
qPCR-Forward Primer	CTGCGACCTGGAATTGAAGA
qPCR-Reverse Primer	CGGTGCTCGAAACCTTTACTA
qPCR-amplicon/length	130 bp
T7-Forward Primer	taatacgactcactatagggCCTTTTGCAAGAGTGGAAACG
T7-Reverse Primer	taatacgactcactatagggAAAGGGTCTCTTCAGGGGAA
T7-amplicon/length (without T7 tags)	355 bp

Base	Sequence
1	TTTTCTTATTTAATAAATTTGTTATTAACTATTGATCTCAAGCAAAATTTATGGTTAAAGAGAAATAAAAACAAGAGGTCCACAACCTTTGAACTGAAACCAT
101	GAAATTGATCTATACGAACCTAAACAGAAATGGATATCACCAAAAGAAATCGAATTTCTTATTTCTCCTGCACATCCCTATTACCCCAATTTGCCACCAACCA
201	TAACGCACCACACATCGACACCCACTGTTCGGTGTGTTGTAAGACGCCCTCCGACGACGACGAAGCCGACTACCGTCCGACGACGACGAAGCCGGCGACGAC
301	GACGCCAAGGTACAACAACCGCTGATGATCGTTCGATCAGCCTCTAATAGTGAACCTCCATGATAATTGAGTGAAGTGAAGTATCGGGCCGGTGTCCACGGT
401	TAGTGTGACCCCTCGTGGACTTGTGGAGTGAAAATCGACCCGTGTGACCCTTTTGCAAGAGTGGAAACGAGAGTTTGCCGGTGTGCTACGGTGTGGCCCGG
501	TTGGCCCGACACGGAAGAATTTCAAGCCCTGGGACGAAGCGTTCGCCGGTGTGCTACAGTGTGGCCCGGTTCGCCGCTAAAGACGCTGGCCGCTGCAACCCAG
601	GAGTAGAAGAATTTCCCTCTGAAGAAACCATTTCAAGAAAGCGTTGCCGGTGTGCTACGGTTCGCCCGGAGTGGCCCGGTACGGAAGAGATTCAAAACCC
701	TGTGACGAAGCGTTGCCGGTGTGCTACAGTGTGGCCCGGTTCGCCGCTAAAGACGCTGGGAGCTGCGACCTGGAATTTGAAGATTTTCCCTCGAAGAGACC
801	CTTTGCAAGAGCGTTCGGTGAAGCGAGTGGCCCGCCCGGAAGCATTCGTTTCTTCGTTTCAGCTGCTAGTAAAGGTTTCGAGCACCGACGCCACGA
901	TGCCGCCCTGTTCGGGTGCGAATGTGCTGCCACGCACGGAGGTGCCGCCATTGCTGAGGAGGATCCCTCATGTACAAACTAAAGGTGTGTAATTTATTT
1001	TCCATACTTTCCCTTTTCCCTCATGCCACTATGTAAAACGTGAAATGCCAAACTAATTAATCGAATAATGTAACTAGAAATTTTAA

Εικόνα 26. Η αλληλουχία του γονιδίου. Για την qPCR, με πράσινο χρώμα τονίζεται ο forward εκκινητής, ενώ με κόκκινο ο reverse.

Base	Sequence
1	TTTTCTTATTTAATAATTTGTTATTAACTATTGATCTCAAGCAAAATTTATGGTTAAAGAGAAAATAAAAAACAAGAAGGTCACAACTTTGAACTGAAACCAT
101	GAAATTGATCTATACGAACATAACAGAAATGGATATCACCAAAAGAAATCGAATTTCTTATTTCTCCTGCACATCCCTATTACCCCAATTTGCCACCAACCA
201	TAACGCACCACCACATCGACACCCACTGTCGGTGTGTTGTAAGACGCCCTCCGACGACGACGAAGCCGACTACCGTTCGACGACGACGAAGCCGGCGACGAC
301	GACGCCAAGGTACAAAACCGCTGATGATCGTTTCGATCAGCCTCTAATAGTGAACCTCCATGATAAATGAGTGAGTGAGGTATCGGGCGGTGCTCCACGGT
401	TAGTGTGACCCCTCGTGGACTTGTGGAGTGAAAAATCGACCCGCTGTGACCCCTTTTGCAAGAGTGGAACGGAGTTTGCCGGTGTGCTACGGTGTGGCCCGG
501	TTGGCCCGACACGGAAGAAATTTCAAGCCCTGGGACGAAGCGTCCCGGTGTGCTACAGTGTGGCCCGGTTCGCGCTAAAGACGCTGGGCGCTGCAACCAG
601	GAGTAGAAGAATTTTCCCTCTGAAGAAACCAATTCGAAGAAGCGTTGCCGGTGTGCTACGGTTCGCGCCGAGTGGCCCGGTACGGAAGAGATTCAAAACC
701	TGTGACGAAGCGTTGCCGGTGTGCTACAGTGTGGCCCGGTTCGCGCTAAAGACGCTGGGAGCTGCGACCTGGAATTGAAGAATTTTCCCTGAAGAGACC
801	CTTTCGAAGAAGCGTTCGTCGGTGAGCGGAGTGGCCCGCCCGGAAGCATTCGTTTCTTCGTTTCAGCTGC TAGTAAAGGTTTCGAGCACCG ACGCCACGA
901	TGCCGCCCTGTTCGGGTGCGAATGTGCTGCCACGCACGGAGGTGCCCCATTGCTGAGGAGGATCCCTCATGTACAAACTAAAGGTGTGTAATTTATTT
1001	TCCATACTTTCTTTTCCCTCATGCCACTATGTAAGAAAGCGTGAATGCCAAACTAATTAATCGAATAATGTAACCTAGAAATTTTAA

Εικόνα 27. Η αλληλουχία του γονιδίου. Για την PCR, με πράσινο χρώμα τονίζεται ο forward εκκινητής, ενώ με κόκκινο ο reverse (χωρίς τα T7 άκρα).

3.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή αλλιώς PCR αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική της Μοριακής Βιολογίας με σκοπό την ενίσχυση συγκεκριμένων και στοχευμένων αλληλουχιών DNA *in vitro* και τη χρήση τους σε μετέπειτα διαδικασίες. Η PCR ουσιαστικά μιμείται την διαδικασία της αντιγραφής του DNA και οδηγεί στην παραγωγή πολυάριθμων (χιλιάδων ή εκατομμυρίων) αντιγράφων της στοχευμένης αλληλουχίας DNA (π.χ. ενός γονιδίου) σε ελάχιστο χρόνο, ακόμη και αν η αρχική ποσότητα του DNA είναι τόσο μικρή όσο ένα μόριο DNA. Οποιαδήποτε αλληλουχία μπορεί να ενισχυθεί αν είναι γνωστή η νουκλεοτιδική σύσταση στις ακραίες περιοχές της περιοχής που μας ενδιαφέρει. Με βάση αυτό και προκειμένου να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η PCR σχεδιάζονται και χρησιμοποιούνται οι λεγόμενοι εκκινητές (primers), οι οποίοι οριοθετούν την περιοχή που θα ενισχυθεί και εκκινούν τη διαδικασία σύνθεσης του DNA. Στην προηγούμενη υποενότητα έγινε περιγραφή του σχεδιασμού και της επιλογής των εκκινητών και συγκεκριμένα για εκκινητές με T7 άκρα. Έκτος από τους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, άλλα συστατικά της PCR είναι το γενετικό υλικό/αλληλουχία-στόχος, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq), ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂), μείγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδικών βάσεων (dNTPs) και αποστειρωμένο H₂O.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά:

- I. Αποδιάταξη: Διαχωρισμός των δύο αλυσίδων DNA με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95°C για περίπου 30 sec έως 1 min.
- II. Υβριδισμός εκκινητών: Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA-μήτρα με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για περίπου 30 sec έως 1 min.
- III. Επιμήκυνση: Για τη βέλτιστη δράση της Taq πολυμεράσης, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και συντίθεται η νέα αλυσίδα. Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα τρία αυτά στάδια επαναλαμβάνονται αρκετές φορές, συνήθως 30-40 κύκλους, μέχρι να παραχθεί αρκετή ποσότητα από την επιθυμητή αλληλουχία DNA. Η αντίδραση PCR

πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές, οι οποίοι φέρουν μια ειδική θερμαινόμενη πλάκα για την γρήγορη και ακριβή εναλλαγή των θερμοκρασιών. Στο πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή, προστίθενται δύο επιπλέον στάδια: μία αρχική θέρμανση στους 95°C και μία τελική επιμήκυνση του προϊόντος στους 72°C.

Υλικά

- ✓ Μήτρα DNA
- ✓ Εκκινητές (Forward & Reverse)
- ✓ KAPA Taq Πολυμεράση
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου KAPA Buffer (10X)
- ✓ Mix dNTPs
- ✓ MgCl₂
- ✓ ddH₂O

Μέθοδος

Μετά τον υπολογισμό των απαραίτητων ποσοτήτων, τα υλικά προστίθενται σε ειδικά για PCR σωληνάκια. Για τελικό όγκο αντίδρασης 50 µl, οι ποσότητες έχουν ως εξής:

Πίνακας 1. Οι όγκοι και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων μιας αντίδρασης PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (µl)/ Αντίδραση
Μήτρα DNA (cDNA 50h PBM)			4 µl
Forward εκκινητής	10 µM	0,4 µM	2 µl
Reverse εκκινητής	10 µM	0,4 µM	2 µl
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	10X	1X	5 µl
Mix dNTPs	10 mM/νουκλεοτίδιο	0,2 mM/νουκλεοτίδιο	1 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	1 µl
ddH ₂ O			37,2 µl
KAPA Taq πολυμεράση	5 U/µl	0,5 U	0,3 µl
Τελικός όγκος			50 µl

Συνήθως και αναλόγως τον αριθμό των αντιδράσεων για κάθε ζευγάρι εκκινητών, δημιουργείται ένα mix το οποίο περιλαμβάνει τις κατάλληλες ποσότητες όλων των αντιδραστηρίων εκτός από το DNA. Στο mix αυτό, το απεσταγμένο νερό συμπληρώνει μέχρι τον ζητούμενο όγκο (46 µl) και η Taq πολυμεράση προστίθεται τελευταία, διότι είναι σημαντικό να διατηρείται στους -20°C και έτσι να εξασφαλίζεται η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια γίνεται να διατηρούνται στον πάγο κατά την εκτέλεση του πειράματος και χρειάζεται να γίνει ένα vortex πριν χρησιμοποιηθούν.

3.3.2.1. PCR με τη χρήση T7 εκκινητών

Η διαδικασία της PCR κυρίως όσον αφορά τους χρόνους και τις θερμοκρασίες περιγράφηκε παραπάνω. Ωστόσο, η χρήση εκκινητών με T7 άκρα κατά την εκτέλεση της διπλωματικής εργασίας απαιτεί διαφορετικό πρόγραμμα στον θερμικό κυκλοποιητή. Αναφέρθηκε ότι τα T7 άκρα προστίθενται με σκοπό την τελική παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA. Αυτό θα επιτευχθεί σε επόμενο στάδιο μέσω της δράσης της T7 RNA πολυμεράσης και της διαδικασίας της *in vitro* μεταγραφής. Για να προσδεθεί η T7 RNA πολυμεράση στο προϊόν της PCR και να ξεκινήσει τη σύνθεση του RNA, αναγνωρίζει συγκεκριμένες περιοχές, τα T7 άκρα, που αποτελούν περιοχές του υποκινητή της T7 πολυμεράσης. Αυτή η περιοχή του υποκινητή πρέπει να βρίσκεται ανοδικά της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου για να λειτουργήσει η T7 πολυμεράση. Επομένως, τα T7 άκρα πρέπει κατά τη διαδικασία της PCR να ενσωματωθούν στα τμήματα DNA που θα έχουν ενισχυθεί. Τα στάδια της PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2. Στάδια της PCR με T7 εκκινητών

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη DNA	95°C	1 min	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	30 sec	10
Υβριδισμός εκκινητών	40°C	30 sec	
Σύνθεση DNA	72°C	30 sec	
Αποδιάταξη DNA	95°C	30 sec	35
Υβριδισμός εκκινητών	54°C	30 sec	
Σύνθεση DNA	72°C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	30 sec	1

Το προϊόν από την αντίδραση της PCR στη συνέχεια μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C, να ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης για επιβεβαίωση της ενίσχυσης και να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής.

3.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού (Real-time PCR) ή ποσοτική PCR (qPCR) αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης και οπτικοποίησης μορίων DNA και cDNA κατά την ενίσχυση τους, σε πραγματικό χρόνο, χαρακτηριστικά που δεν διαθέτει η συμβατική PCR. Η οπτικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια φθορίζουσών ουσιών που προσδέονται στο δίκλωνο DNA, όπως SYBR Green I (μη εξειδικευμένη πρόσδεση). Η qPCR αξιοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου σε σύγκριση με δείγματα-control, πριν και μετά το γεύμα αίματος και σε διαφορετικούς ιστούς (ovaries & carcass).

Υλικά

- ✓ DNA/cDNA
- ✓ Εκκινητές (Forward & Reverse)
- ✓ KAPA SYBR Mix (2X)
- ✓ ddH₂O

Μέθοδος

Μετά τον υπολογισμό των απαραίτητων ποσοτήτων, τα υλικά προστίθενται σε ειδικά για qPCR σωληνάκια. Για τελικό όγκο αντίδρασης 15 μl, οι ποσότητες έχουν ως εξής:

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια της qPCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)/Αντίδραση	Συγκέντρωση
cDNA	4 μl	
qPCR Forward εκκινητής (10 μM)	0,45 μl	0,3 μM
qPCR Reverse εκκινητής (10 μM)	0,45 μl	0,3 μM
SYBR Mix (2X)	7,5 μl	1X
ddH ₂ O	2,6 μl	
Τελικός όγκος	15 μl	

Το SYBR mix περιέχει dNTPs, MgCl₂ και τη DNA πολυμεράση. Η διαδικασία προσθήκης των αντιδραστηρίων στα tubes πρέπει να γίνεται σε πολύ καθαρό εργαστηριακό πάγκο και πολύ προσεκτικά για αποφυγή επιμολύνσεων. Η προσθήκη του cDNA γίνεται ξεχωριστά από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, για τα οποία συνήθως δημιουργείται ένα mix. Επιπρόσθετα για κάθε δείγμα cDNA που χρησιμοποιείται και για κάθε αντίδραση, πραγματοποιείται ενίσχυση και κάποιου ιδιοσυστατου γονιδίου (housekeeping gene) όχι μόνο για την εξασφάλιση της ποιότητας των αντιδραστηρίων αλλά και για τη μετέπειτα κανονικοποίηση στη μελέτη των επιπέδων έκφρασης. Παραδείγματα housekeeping γονιδίων που χρησιμοποιούνται στα έντομα και ειδικότερα στο *A. albopictus* είναι τα Rps17, Rpl32, Actin, α-tubulin και GAPDH (Dzaki & Azzam, 2018).

Σε πολλές περιπτώσεις, πριν την εφαρμογή της qPCR για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης κάποιου γονιδίου-στόχου, πραγματοποιείται η gradient qPCR κατά την οποία αξιοποιείται η δυνατότητα θερμικής διαβάθμισης της συσκευής (όπως της εταιρείας Biorad) την ίδια χρονική στιγμή για εκτίμηση της αποδοτικότερης θερμοκρασίας υβριδισμού (T_a) των εκκινητών και βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης qPCR. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με την qPCR, δεν χρειάζεται housekeeping γονίδιο για κανονικοποίηση και η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας υβριδισμού γίνεται με βάση το που συμβαίνει η καλύτερη ενίσχυση του γονιδίου-στόχου.

3.4. Μέθοδοι παραγωγής dsRNA

3.4.1. *In Vitro* Transcription

Για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA μέσω της *in vitro* μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το T7 MEGAscript kit και ως template το προϊόν της αντίδρασης PCR με τους T7 εκκινητές που περιγράφηκε στην υποενότητα 3.3.2.1. Η παρουσία των T7 περιοχών που ουσιαστικά αποτελούν τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης καθιστούν εφικτή τη πρόσδεση της πολυμεράσης και τη σύνθεση του RNA.

Υλικά

- ✓ Μίξ ριβονουκλεοτιδίων (A/G/C/UTP)
- ✓ Προϊόν PCR με T7 άκρα
- ✓ Reaction Buffer (10X)
- ✓ Enzyme mix
- ✓ Nuclease free H₂O

Μέθοδος

Τα αντιδραστήρια προστίθενται με βάση τις ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 5, γίνεται μια ήπια ανάδευση με τη χρήση πιπέτας και ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 16 ώρες για την πραγματοποίηση της μεταγραφής *in vitro*.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και ποσότητες τους για την *in vitro* μεταγραφή

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
Μίξ ριβονουκλεοτιδίων (A/G/C/UTP)	8 μl (2 μl το κάθε ριβονουκλεοτίδιο)
Προϊόν PCR με T7 άκρα	8 μl
Reaction Buffer (10X)	2 μl
Enzyme mix	2 μl
Nuclease free H ₂ O	Μέχρι τα 20 μl
Τελικός όγκος	20 μl

3.4.2. Επώαση με DNase & κατακρήμνιση dsRNA

Η επώαση με DNase γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση του template DNA και η κατακρήμνιση του dsRNA γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση των ρυθμιστικών διαλυμάτων, των ενζύμων και αντιδραστηρίων και την τελική απομόνωση του RNA.

Υλικά

- ✓ 2U/μl TURBO DNase της MEGAscript
- ✓ Ammonium acetate (7,5M)

- ✓ Διάλυμα φαινόλης/χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)
- ✓ Παγωμένη αιθανόλη 70%
- ✓ Παγωμένη αιθανόλη 100%
- ✓ ddH₂O

Μέθοδος

Τα βήματα για την εκτέλεση αυτής της μεθόδου είναι τα ίδια με αυτά της υποενότητας 3.2.2. με τη διαφορά ότι στα 20 μl αντίδρασης *in vitro* μεταγραφής προστίθενται 1 μl διάλυμα TURBO DNase και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 λεπτά. Επίσης, το διάλυμα μετά την προσθήκη του ddH₂O (115 μl) και του Ammonium acetate (15 μl) έχει όγκο 150 μl, καθορίζοντας τους όγκους των υπόλοιπων αντιδραστηρίων.

3.5. Μέθοδος χορήγησης dsRNA: Μικροενέσεις

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η χορήγηση των μορίων dsRNA που προέκυψαν με την εφαρμογή των προηγούμενων μεθόδων στα ενήλικα κουνούπια έγινε μέσω μικροενέσεων.

Μέθοδος

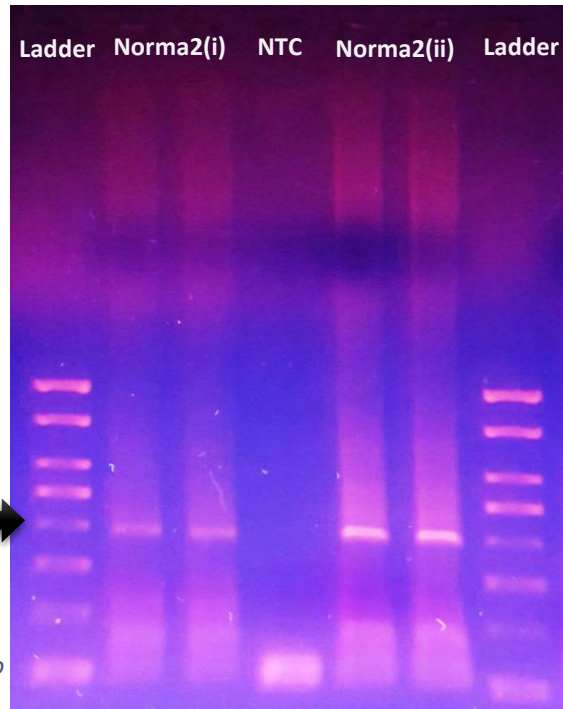
- 1) Προετοιμασία κουνουπιών: Τοποθέτηση τους σε μικρά δοχεία και αναισθητοποίηση είτε διατηρώντας τα σε ψυγείο στους 4°C για αρκετή ώρα είτε εκθέτοντας σε CO₂ για ελάχιστο χρονικό διάστημα.
- 2) Πριν την χρήση του εξοπλισμού, γίνεται καθαρισμός με 70% αιθανόλη.
- 3) Γίνεται συναρμολόγηση της συσκευής της μικροέγχυσης και τοποθέτηση μιας γυάλινης βελόνας στο τέλος της συσκευής, της οποίας η άκρη πρέπει να σπάσει κάτω από το μικροσκόπιο.
- 4) Γέμισμα της βελόνας με mineral oil με πολύ προσοχή, μέχρι να στάξει από την άκρη.
- 5) Εισαγωγή της γεμάτης με mineral oil βελόνας στην συσκευή.
- 6) Σε κομμάτι parafilm κάτω από το μικροσκόπιο τοποθετούνται 3-4 μl του dsRNA.
- 7) Καθαρισμός του λαδιού από την άκρη της βελόνας και κρατώντας τη με κάθετη κλίση γίνεται άντληση του dsRNA (Stop πριν γεμίσει πλήρως για αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων).
- 8) 10-15 κουνούπια τοποθετούνται σε μία επιφάνεια κάτω από το μικροσκόπιο, απ' όπου εξέρχεται CO₂ για να παραμείνουν αναίσθητα (ρυθμιστής του CO₂: 2.5-3.0).
- 9) Η ένεση γίνεται με διάτρηση της επιδερμίδας και συγκεκριμένα είτε μεταξύ του θώρακα και πρώτου κοιλιακού τμήματος είτε στο μεσαίο τμήμα του θώρακα και έκχυση συγκεκριμένης ποσότητας dsRNA (nl) με την χρήση του NANOJECT II.
- 10) Κάθε κουνούπι που υφίσταται ένεση, επιστρέφει στο δοχείο.
- 11) Μετά το πέρας της διαδικασίας της μικροέγχυσης, γίνεται απενεργοποίηση των συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν και καθαρισμός τόσο αυτών όσο και του πάγκου.

4. Αποτελέσματα

4.1. Ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου και επιβεβαίωση της ενίσχυσης

Το γονίδιο-στόχος επιλέχθηκε, όπως προαναφέρθηκε, λόγω του προφίλ έκφρασης που εμφανίζει στις ωσθήκες πριν και μετά το γεύμα αίματος και ονομάστηκε Norma2 (**NO**n-coding **R**na in **M**osquito **ov**Aries). Η ενίσχυση της αλληλουχίας του Norma 2 έγινε με την χρήση εκκινητών με T7 άκρα που παρουσιάζονται στην υποενότητα 3.3.1. και την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επί 2 φορές και με όγκο αντίδρασης 50 μl. Ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε cDNA θηλυκού ατόμου 50h μετά το γεύμα αίματος. Για να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το πήκτωμα διέθετε 7 θέσεις φορτώματος δειγμάτων: 2 ακραίες για το 100 bp Minotech μάρτυρα, 4 θέσεις για το ενισχυμένο προϊόν και ενδιάμεσα μία θέση για το αρνητικό δείγμα control (NTC), που περιείχε όλα τα συστατικά για την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου εκτός από το cDNA. Στα 50 μl όγκου αντίδρασης προστέθηκαν 5 μl loading buffer και το δείγμα φορτώθηκε σε 2 θέσεις επί 2 φορές, με τον όγκο κάθε πηγαδιού να αντιστοιχεί σε 28 μl. Από το αρνητικό control φορτώθηκαν 15 μl, ενώ από τον μάρτυρα 4 μl. Το amplicon της PCR, χωρίς τα T7 άκρα έχει μήκος 355 bp αλλά με τα T7 άκρα προστίθενται 40 bp. Στην εικόνα 28 φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, όπου διακρίνεται η ζώνη στα 395 bp, ελάχιστα χαμηλότερα από τη ζώνη των 400 bp του μάρτυρα.

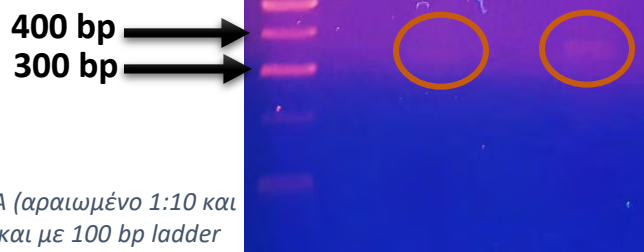
Ακολούθησε απομόνωση και των τεσσάρων ζωνών που εντοπίστηκαν στα 395 bp από το πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο του Gel extraction και τη χρήση του kit της εταιρείας Macherey-Nagel.



Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση της PCR για το γονίδιο-στόχο με τη χρήση T7 εκκινητών σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Απεικονίζονται ο 100 bp ladder, οι επαναλήψεις του ενισχυμένου γονιδίου-στόχου και το αρνητικό δείγμα control.

4.2. Παραγωγή dsRNA και ηλεκτροφόρηση τους

Μετά την απομόνωση του DNA μέσω του Gel extraction, μετρήθηκε η συγκέντρωση του στο φασματοφωτόμετρο Quawell, η οποία ήταν 14 ng/μl και η μάζα του υπολογίστηκε στα 112 ng, τα οποία επαρκούσαν για την συνέχιση του πειράματος. Η συνέχεια του πειράματος περιλάμβανε την παραγωγή dsRNA με *in vitro* μεταγραφή, την επώαση με DNase και την κατακρήμνιση του (Πρωτόκολλα στην υποενότητα 3.4). Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία των T7 άκρων που αποτελούν περιοχές του υποκινητή για την δράση της T7 RNA πολυμεράσης και στους δύο κλώνους οδηγεί αρχικά στην παραγωγή μονόκλωνων RNA. Αυτά, έπειτα, υβριδίζονται με τα συμπληρωματικά τους και σχηματίζουν τα δίκλινα μόρια RNA (dsRNAs). Για τον κατακερματισμό των μορίων DNA που απέμειναν μετά την *in vitro* μεταγραφή πραγματοποιήθηκε επώαση με DNase και για την απομάκρυνση των ενζύμων, των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των αντιδραστηρίων έγινε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμνιση των dsRNAs. Το διάλυμα των dsRNAs για το γονίδιο Norma2 αραιώθηκε 1:10 σε νέο tube με σκοπό την χρήση του στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA μέσω του φασματοφωτομέτρου Quawell. Η συγκέντρωση του μη αραιωμένου διαλύματος των dsRNAs προσδιορίστηκε στα 10,16 μg/μl. Πριν την αποθήκευση της υπόλοιπης ποσότητας του διαλύματος των dsRNAs στους -80°C, έγινε ηλεκτροφόρηση 2 μg και 5 μg του διαλύματος αντίστοιχα σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp ladder της Minotech για την επιβεβαίωση παραγωγής των κατάλληλων dsRNAs. Το μήκος των dsRNAs αναμένεται να ανέρχεται στα 355 bp και οι ζώνες που προέκυψαν το επιβεβαιώνουν αυτό, κυρίως στην περίπτωση του μη αραιωμένου διαλύματος και βρίσκονται ενδιάμεσα των 300 και 400 bp. Παρ' όλα αυτά είναι αρκετά αγνές (Εικόνα 29).



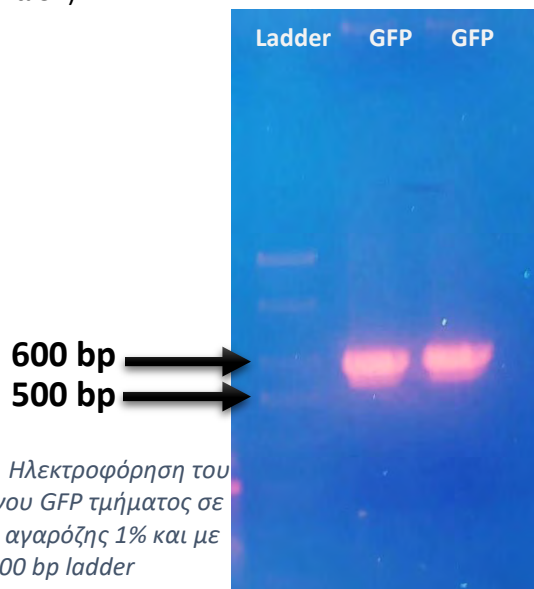
Εικόνα 29. Ηλεκτροφόρηση dsRNA (αραιωμένο 1:10 και μη) σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και με 100 bp ladder

4.3. Ενίσχυση τμήματος GFP και παραγωγή dsRNA

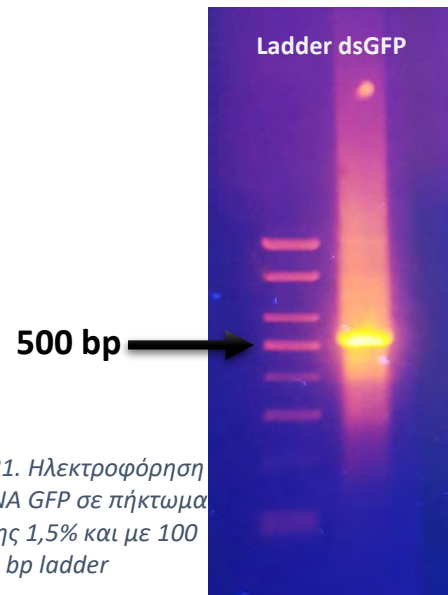
Παράλληλα με την παραγωγή των δίκλωνων μορίων RNA για τη στόχευση του γονιδίου Norma2, εξελίχθηκε η διαδικασία παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA για το γονίδιο του GFP. Το γονίδιο του GFP δεν υπάρχει στα κουνούπια, επομένως δεν μπορεί να στοχευθεί από τα dsRNA, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως control για την εκτίμηση της αξιοπιστίας για τη διαδικασία της χορήγησης των dsRNA, καθώς και για να συγκριθούν τα αποτελέσματα μετά την χορήγηση. Το τμήμα GFP που χρησιμοποιήθηκε, ενισχύθηκε μέσω PCR από τον πλασμιδιακό φορέα Pub-nls-EGFP και με τη χρήση των εξής T7 εκκινητών: taatacgaactcactatagggCCGCCAGTGTGCTGGAA (Forward) & taatacgaactcactatagggGATATCTGCAGAATTCCGCC (Reverse). Μετά την ενίσχυση,

πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με 100 bp ladder της Minotech και αναμενόταν ζώνη στα 540 bp (Εικόνα 30).

Ακολούθησε απομόνωση των δύο ζωνών με τη μέθοδο του Gel extraction και μέτρηση της συγκέντρωσης στο φασματοφωτόμετρο Quawell, η οποία προσδιορίστηκε στα 106,5 ng/μl. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος της *in vitro* μεταγραφής για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA για το GFP γονίδιο, η επώαση με DNase για κατακερματισμό των μορίων DNA και η κατακρήμνιση των dsRNAs. Τελικά, μετρήθηκε η συγκέντρωση των dsRNAs στο φασματοφωτόμετρο Quawell, η οποία βρέθηκε ίση με 7,535 μg/μl και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% με 100 bp ladder της Minotech. Το δείγμα «έτρεξε» κατ' αυτόν τον τρόπο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης των dsRNA GFP, αλλά είναι διακριτή και έντονη η ζώνη στα 500 bp, επιβεβαιώνοντας ότι τα μόρια dsRNA έχουν το επιθυμητό μήκος (Εικόνα 31).



Εικόνα 30. Ηλεκτροφόρηση του ενισχυμένου GFP τμήματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και με 100 bp ladder

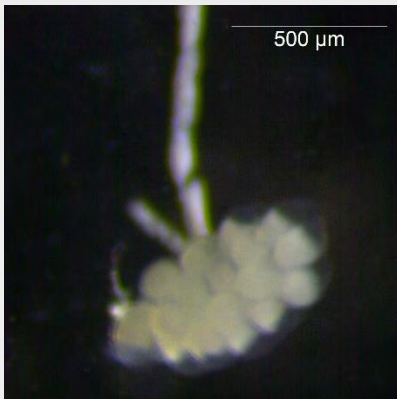


Εικόνα 31. Ηλεκτροφόρηση του dsRNA GFP σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και με 100 bp ladder

4.4. Χορήγηση των dsRNAs (Norma2 & GFP) και παρατήρηση φαινοτύπου

Ακολούθως, τα δίκλινα μόρια RNA που στοχεύουν τα γονίδια Norma2 και GFP αντίστοιχα μέσω του RNAi μηχανισμού χορηγήθηκαν σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια. Αυτό είχε ως απώτερο σκοπό την παρατήρηση των ωθηκών ώστε να εκτιμηθεί κατά πόσο η σίγηση του γονιδίου έχει κάποια επίδραση την ανάπτυξη τους. Η χορήγηση έγινε μέσω μικροενέσεων (Πρωτόκολλο 3.5.) σε ομάδες θηλυκών ατόμων. Το διάλυμα των dsRNAs που χορηγήθηκε είχε συγκέντρωση 5 μg/μl και η ποσότητα έκχυσης για κάθε έντομο αντιστοιχούσε σε 138 nl. Μετά τη μικροένεση χορηγήθηκε αίμα στα άτομα που επιβίωσαν και παρατηρήθηκαν ανατομικά οι ωθήκες τους κάτω από το μικροσκόπιο 48 και 72 ώρες μετά το γεύμα αίματος. Επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα χρονικά σημεία, διότι με βάση τις πληροφορίες που παρείχε η βιβλιογραφία, τότε είναι αρκετά υψηλά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου στις ωθήκες. Συνολικά και με βάση τα άτομα που επιβίωσαν της μικροένεσης για το γονίδιο Norma2, παρατηρήθηκαν τρία άτομα στις 48h PBM και άλλα τρία άτομα στις 72h PBM. Ενώ, για το γονίδιο GFP που αποτελούσε το control,

εξετάστηκαν δύο άτομα, ένα στις 48h και ένα στις 72h PBM. Οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 32-39):



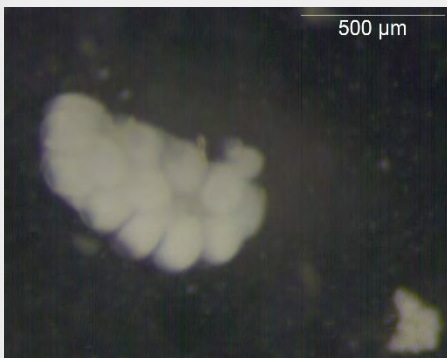
Εικόνα 32. Οι ωοθήκες 48h PBM



Εικόνα 33. Οι ωοθήκες 72h PBM

Ωοθήκες με χορηγημένο το dsRNA για το GFP (**Control**)

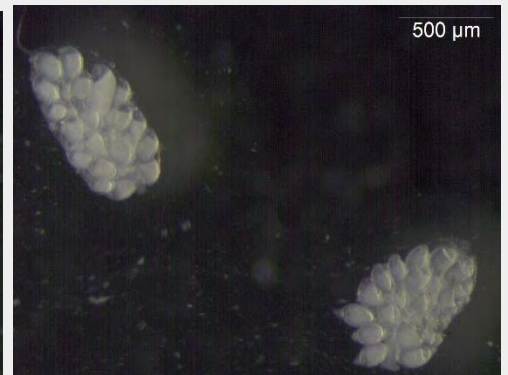
Ωοθήκες με χορηγημένο το dsRNA για το Norma2 **48h PBM**



Εικόνα 34. Μη φυσιολογικός φαινότυπος:
Μικρότερο μέγεθος (άτομο 1)



Εικόνα 35. Φυσιολογικός φαινότυπος
(άτομο 2)

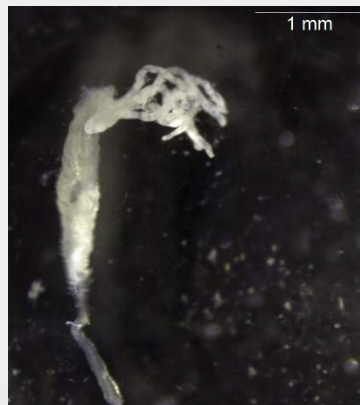


Εικόνα 36. Μη φυσιολογικός φαινότυπος:
Πιο διαφανείς ωοθήκες (άτομο 3)

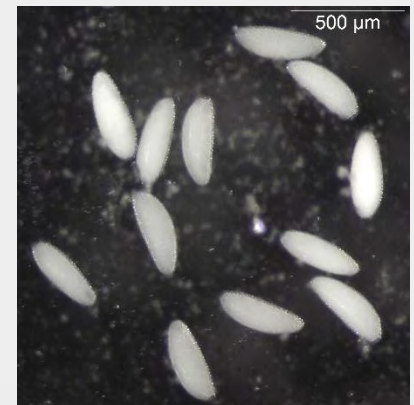
Ωοθήκες με χορηγημένο το dsRNA για το Norma2 **72h PBM**



Εικόνα 37. Μη φυσιολογικός φαινότυπος:
Ελαφρώς πιο διαφανείς ωοθήκες (άτομο 1)



Εικόνα 38. Μη φυσιολογικός φαινότυπος:
Υποανάπτυκτες



Εικόνα 39. Φυσιολογικός φαινότυπος (άτομο 3)

Από τα άτομα των οποίων ο φαινότυπος παρατηρήθηκε, απομονώθηκαν τα RNA:

- Από τις ωθήκες και το υπόλοιπο σώμα (carcass) του ατόμου στο οποίο χορηγήθηκαν dsRNA μόρια που στόχευαν το GFP γονίδιο και παρατηρήθηκε ο φαινότυπος 72h PBM (Εικόνα 33) (**Control**)
- Από τις ωθήκες του ατόμου 1 στο οποίο χορηγήθηκαν dsRNA μόρια που στόχευαν το Norma2 και παρατηρήθηκε ο φαινότυπος 72h PBM (Εικόνα 37)
- Από τα carcasses και των τριών ατόμων στα οποία χορηγήθηκαν dsRNA μόρια που στόχευαν το Norma2 και παρατηρήθηκε ο φαινότυπος 72h PBM

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε για να αναλυθούν τα επίπεδα έκφρασης του Norma2 και να επιβεβαιωθεί η σίγησή του μετά την χορήγηση των dsRNA μορίων και την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού. Η ανάλυση της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR ή qPCR). Η διαδικασία ξεκίνησε με μεταφορά των ωθηκών και των carcasses σε διαφορετικά tubes (συνολικά τέσσερα) που περιείχαν Extrazol της εταιρείας DNA-GDAŃSK και ομογενοποίηση τους. Ακολούθησε επώαση με DNase για τον κατακερματισμό των μορίων DNA και τη διατήρηση μόνο των μορίων RNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του cDNA, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν Oligo dT εκκινητές που στοχεύουν μόνο τα ώριμα μετάγραφα μέσω της πολύ(A) ουράς τους. Περισσότερες λεπτομέρειες για τις παραπάνω διαδικασίες στα πρωτόκολλα των υποενοτήτων 3.2.1., 3.2.2. και 3.2.3. αντίστοιχα.

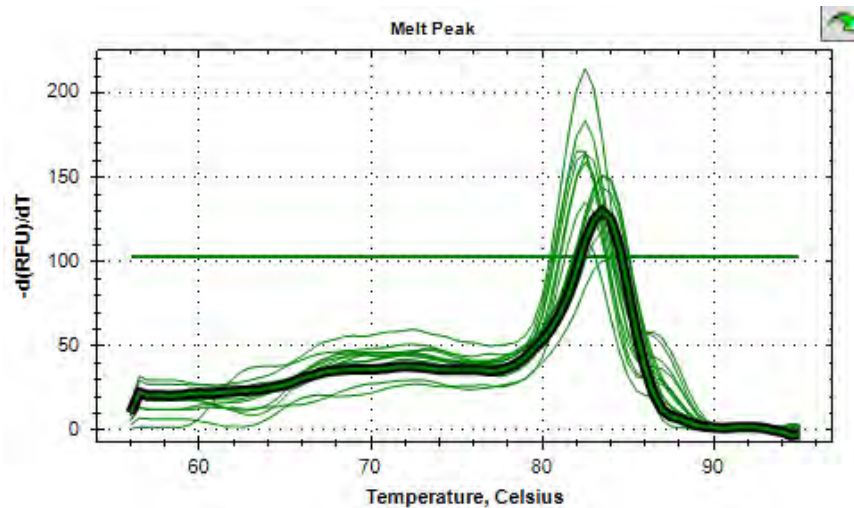
4.5. Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης qPCR

Απαραίτητο βήμα για την παραγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων από την Real-Time qPCR είναι η εδραίωση των βέλτιστων συνθηκών ενίσχυσης του κάθε στόχου. Οι συνθήκες αυτές επηρεάζονται άμεσα από τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Μια ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος είναι η θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing Temperature, T_a) των εκκινητών, διότι ο καθορισμός της επιτυγχάνει την καλύτερη ενίσχυση του γονιδίου-στόχου. Μια αρχική προσέγγιση της T_a γίνεται με βάση το T_m (Melting Temperature) των εκκινητών που είναι γνωστό κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών. Συνήθως, η T_a είναι 3-5°C χαμηλότερη από τη T_m . Ωστόσο, ο σαφής καθορισμός της πιο αποδοτικής T_a πραγματοποιείται εμπειρικά επαναλαμβάνοντας την αντίδραση σε διαφορετικές θερμοκρασίες, μια διαδικασία που ονομάζεται gradient qPCR και βασίζεται σε συσκευή που διαθέτει τη δυνατότητα θερμικής διαβάθμισης (όπως της εταιρείας Biorad που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο). Στην περίπτωση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του Norma2 γονιδίου (Πίνακας 1), το T_m ισούταν με 61°C. Επομένως, για την εκτίμηση των εκκινητών και την εξασφάλιση της αξιοπιστίας της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκε gradient qPCR με τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (56-59°C) σε δύο διαφορετικά δείγματα cDNA, τα carcasses στα οποία έγινε σίγηση του Norma2 και σε φυσιολογικές ωθήκες από άτομα που έχουν ζευγαρώσει και απομονώθηκαν 72h PBM. Για κάθε θερμοκρασία από τα δύο δείγματα υπήρχαν technical replicates και η τοποθέτηση τους στις στήλες της συσκευής έγινε με βάση τη θερμική διαβάθμιση που

Εικόνα 40. Η διαβάθμιση θερμοκρασίας στις στήλες της συσκευής Biorad για τη gradient qPCR. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις στήλες D,E,F,H

Gradient	
Step	
A	61,0
B	60,7
C	60,2
D	59,2
E	58,0
F	57,0
G	56,3
H	56,0
Range	
	5,0

εφαρμόζεται και παρουσιάζεται στην εικόνα 40. Αφού ολοκληρωθεί η gradient qPCR, για την επιλογή της καλύτερης θερμοκρασίας υβριδισμού (T_a) λαμβάνεται υπόψιν, αρχικά, το Cq (quantification cycle). Όσο χαμηλότερο είναι, τόσο μεγαλύτερη είναι η έκφραση του γονιδίου-στόχου στο δείγμα, και τόσο πιο αποδοτικά δρουν οι εκκινητές στην συγκεκριμένη T_a . Παρ' όλα αυτά, στη συγκεκριμένη gradient qPCR, τα δείγματα με το χαμηλότερο Cq εμφάνιζαν επίσης αρκετό «θόρυβο» στο Melt Peak και όχι μια ξεκάθαρη κορυφή. Οπότε, ως βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού επιλέχθηκαν οι 57°C όπου και το Cq ήταν σχετικά χαμηλό και υπήρχε μια ξεκάθαρη και μοναδική κορυφή στο Melt Peak (Εικόνα 41).

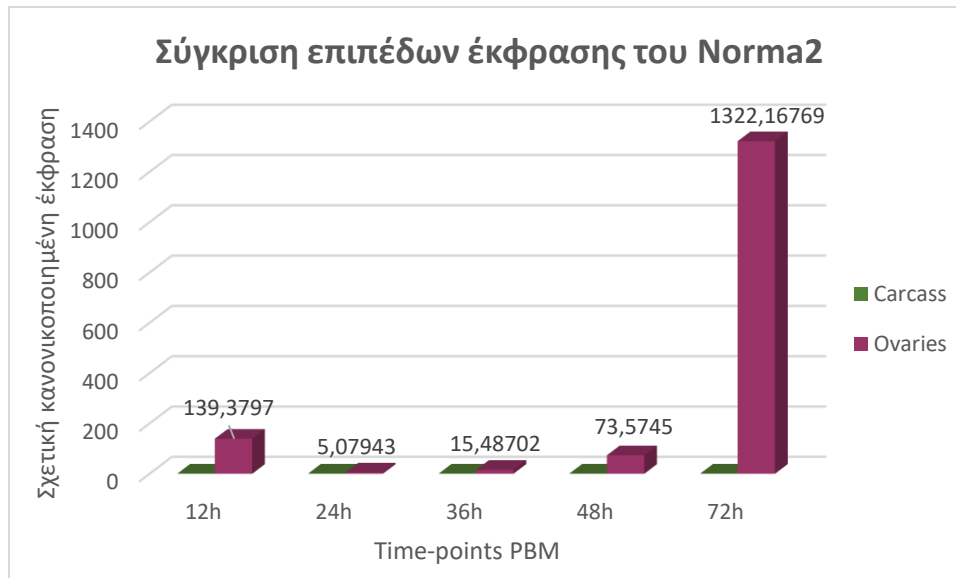


Εικόνα 41. Το Melt Peak της αντίδρασης με τονισμένο αυτό του δείγματος carcass στους 57°C. Είναι φανερή η ξεκάθαρη κορυφή σε σύγκριση με τους "θορύβους" των υπολοίπων θερμοκρασιών και στα δύο είδη δειγμάτων

4.6. Ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου

4.6.1. Σε επίπεδο ιστών (ovaries & carcass)

Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά μεταξύ των ωοθηκών και του υπολοίπου σώματος του κουνουπιού (carcass), γεγονός που φανερώνει την ιστοειδικότητα του γονιδίου. Γι' αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε qPCR με δείγματα ovaries και carcasses από πέντε διαφορετικά time-points μετά το γεύμα αίματος (PBM): 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η πολύ πιο αυξημένη έκφραση του Norma2 στις ωοθήκες σε σύγκριση με το carcass κατά την περίοδο της ολοκληρωτικής ανάπτυξης των ωοθηκών (72h). Η θερμοκρασία T_a ορίστηκε στους 57°C, αφού αυτή καθορίστηκε ως βέλτιστη από την gradient qPCR και η κανονικοποίηση έγινε με το housekeeping γονίδιο Rps17. Είναι φανερό, με βάση το γράφημα που προέκυψε από τα αποτελέσματα της qPCR, αυτήν η μεγάλη διαφορά στην έκφραση, επιβεβαιώνοντας την ιστοειδική δράση του γονιδίου.

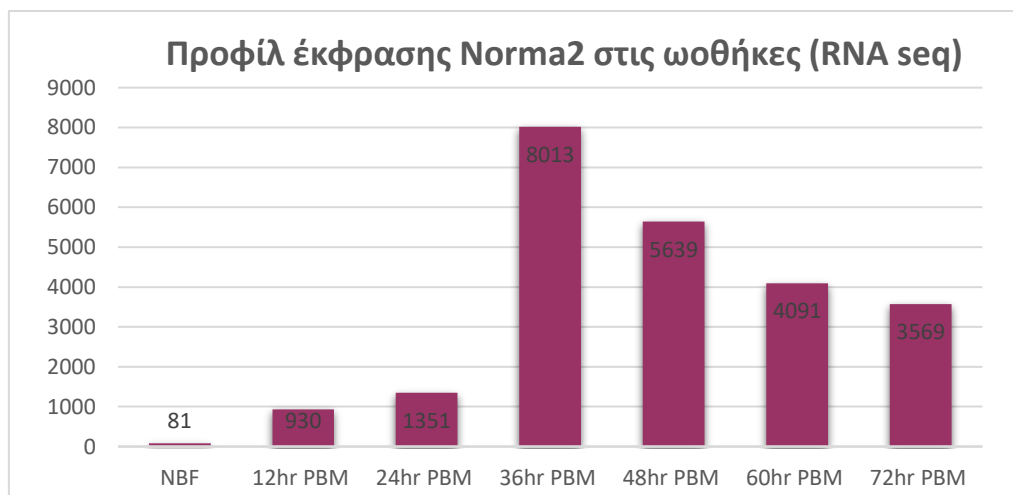


Γράφημα 1. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του Norma2 μεταξύ ωοθηκών και carcass σε διαφορετικά time points. Για κάθε time-point, το carcass έχει οριστεί ως control και απεικονίζονται οι αντίστοιχες τιμές έκφρασης στις ωοθήκες.

Ωστόσο, να τονιστεί πως η συγκεκριμένη qPCR εμφάνισε ένα όχι και τόσο καλό Melt Peak, καθώς και για τα δείγματα των carcasses όσο και των ovaries υπήρχε αρκετός «θόρυβος» με διαφορές στις θερμοκρασίες τήξης μεταξύ των technical replicates, ιδιαίτερα στα δείγματα των ovaries. Διαφορές, επίσης, εμφάνισε και το housekeeping γονίδιο, το Rps17.

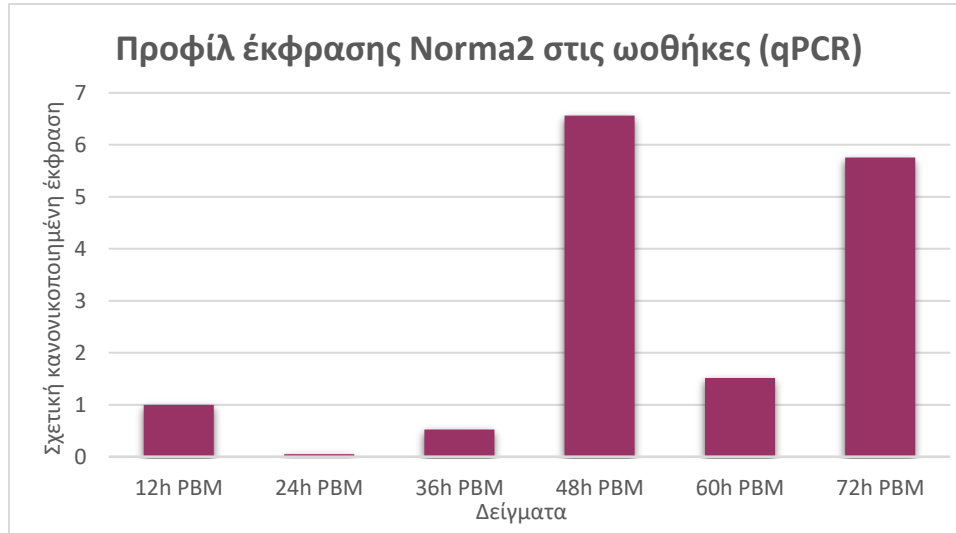
4.6.2. Στις ωοθήκες

Για την αύξηση των επιπέδων έκφρασης στις ωοθήκες μετά το γεύμα αίματος, τα RNA seq δεδομένα της βιβλιογραφίας, ήδη παρουσίασαν ένα προφίλ έκφρασης σε συνάρτηση με τα χρονικά σημεία μετά το γεύμα του αίματος, μέχρι την ολοκληρωμένη ανάπτυξη των ωοθηκών. Το προφίλ έκφρασης αποτυπώνεται στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 2):



Γράφημα 2. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου στις ωοθήκες πριν (NBF_ovaries) και μετά (PBM_ovaries) το γεύμα αίματος με βάση τη βιβλιογραφία (RNA seq δεδομένα)

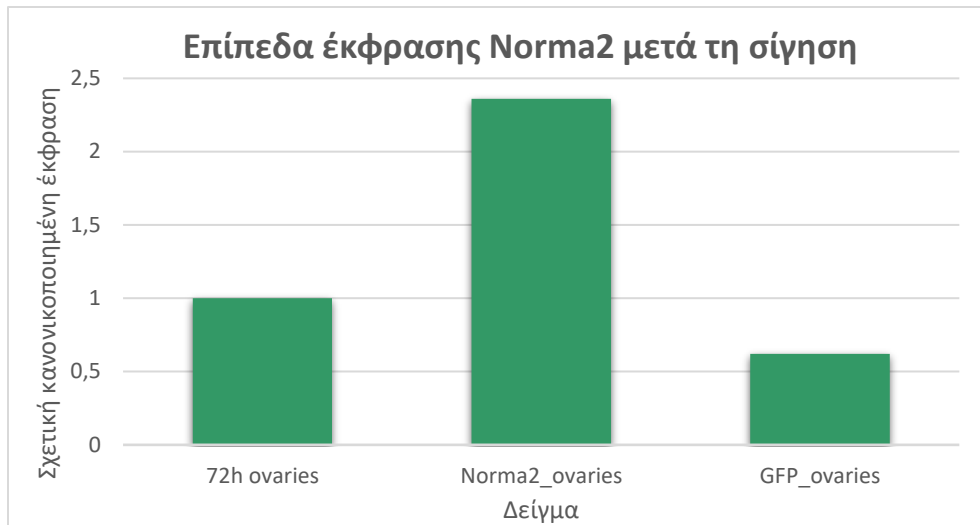
Για την επιβεβαίωση αυτού του προφίλ έκφρασης και το αν στις 36h και 48h, ειδικά στις 36h, εντοπίζεται η περισσότερη έκφραση του γονιδίου-στόχου, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη qPCR. Με την προηγούμενη qPCR (Υποενότητα 4.6.1.) παρατηρήθηκε ήδη ένα μοτίβο, αλλά απουσίαζε το δείγμα των 60h PBM και η διαδικασία επαναλήφθηκε με τα ίδια δείγματα, ενώ αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε το Rpl32 housekeeping γονίδιο για την κανονικοποίηση και η θερμοκρασία T_a αυξήθηκε στους 61°C. Το γράφημα 3 βασίζεται στα αποτελέσματα της qPCR και εμφανίζει ένα διαφορετικό προφίλ έκφρασης από αυτό του Γραφήματος 2.



Γράφημα 3. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου στις ωοθήκες μετά το γεύμα αίματος (διαφορετικά χρονικά σημεία) με βάση τα αποτελέσματα της qPCR και ως control το δείγμα των 12h PBM

4.7. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μετά τη χορήγηση dsRNA

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε qPCR για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του Norma2 στα δείγματα που απομονώθηκαν και συγκεκριμένα: στις ωοθήκες που έγινε σίγηση του GFP, στις ωοθήκες που έγινε σίγηση του Norma2 (72h), σε φυσιολογικές ωοθήκες 72h (control) και σε δύο αντίγραφα ωοθηκών ατόμων που δεν είχαν καταναλώσει αίμα. Τα γονίδια-στόχοι και για τα 5 δείγματα στην αντίδραση ήταν το Norma2, το Norma1 και το ριβοσωμικό Rps17 για την κανονικοποίηση και κάθε φορά χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές με θερμοκρασία T_a στους 57°C. Το Norma1 είναι κι αυτό lncRNA γονίδιο που εμφανίζει παρόμοιο προφίλ έκφρασης με το Norma2 και χρησιμοποιήθηκε για εκτίμηση της ποιότητας των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη έκφρασης του Norma2 στο δείγμα που έγινε σίγηση (Norma2_ovaries) σε σύγκριση με τα δείγματα που είχαν φυσιολογική έκφραση του γονιδίου (72h ovaries & GFP_ovaries). Στο γράφημα 4 παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης για τα τρία δείγματα. Με βάση τα υπόλοιπα τρία δείγματα, η τελική διαμόρφωση του γραφήματος είναι παράδοξη, καθώς θα αναμέναμε η έκφραση του γονιδίου-στόχου να είναι χαμηλότερη σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα στα οποία το γονίδιο εκφράζεται φυσιολογικά. Παράλληλα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων του Norma1 εμφάνισε υψηλή έκφραση σε σχεδόν ίδια επίπεδα, όπως αναμενόταν.

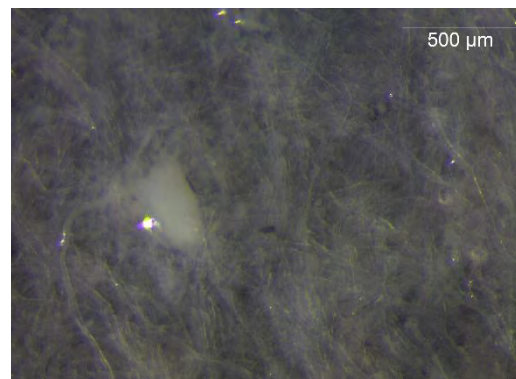


Γράφημα 4. Τα επίπεδα έκφρασης του Norma2 στο δείγμα των 72h ωοθηκών (72h ovaries) που ορίστηκε ως control, των ωοθηκών όπου έχει γίνει σίγηση του γονιδίου (Norma2_ovaries) και των 72h ωοθηκών που έγινε σίγηση του GFP (GFP_ovaries)

4.8. Διερεύνηση της ικανότητας απόθεσης αυγών

Εκτός από την διαμόρφωση και την ανάπτυξη των ωοθηκών, σε άτομα που έγινε χορήγηση με dsRNA μόρια με στόχο το Norma2, έγινε μελέτη και παρατήρηση της ικανότητας των θηλυκών ατόμων να αποθέσουν τα αυγά τους μετά την πλήρη ανάπτυξη των ωοθηκών, δηλαδή μετά από 72h. Πιο συγκεκριμένα, θηλυκά άτομα που είχαν ζευγαρώσει και είχε γίνει η μικροένεση, τοποθετήθηκαν, 72h μετά την κατανάλωση αίματος, το κάθε ένα ξεχωριστά σε σκοτεινό περιβάλλον για να αποθέσουν τα αυγά τους. Η ωοαπόθεση έγινε πάνω σε κομμάτι διηθητικού χαρτιού το οποίο διατηρούσε υγρασία λόγω του βρεγμένου βαμβακιού που υπήρχε στην κάτω πλευρά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε, παράλληλα, και για άτομα που τους είχε γίνει χορήγηση dsRNA με στόχο το GFP και αποτελούσαν τα control. Συνολικά, η διάρκεια της ωοαπόθεσης κράτησε μιάμιση ώρα και στη συνέχεια τα κομμάτια του διηθητικού χαρτιού παρατηρήθηκαν κάτω από το μικροσκόπιο.

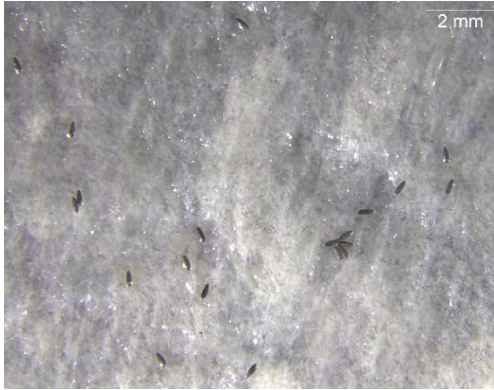
Όσον αφορά τα άτομα-control (GFP), από τα τέσσερα άτομα που αφέθηκαν για ωοαπόθεση, τα τρία άφησαν αυγά. Συνολικά τα αυγά ανέρχονταν στα 55 με τα 35 να ήταν φυσιολογικά και τα 20 σπασμένα ή ατελώς διαμορφωμένα, ενώ για το άτομο που δεν άφησε αυγά, έγινε ανατομική παρατήρηση κάτω από το μικροσκόπιο και διαπιστώθηκε πως διέθετε φυσιολογικές ωοθήκες. Χαρακτηριστικά, στην εικόνα 42, απεικονίζεται σπασμένο αυγό ατόμου-control.



Εικόνα 42. Ένα από τα σπασμένα αυγά που άφησε άτομο-control (dsGFP)

Όσον αφορά τα άτομα που έγινε σίγηση του Norma2, από τα τέσσερα που αφέθηκαν για ωοαπόθεση, τα δύο αποθέσαν αυγά. Συνολικά ο αριθμός των αυγών ήταν 49, εκ των οποίων τα

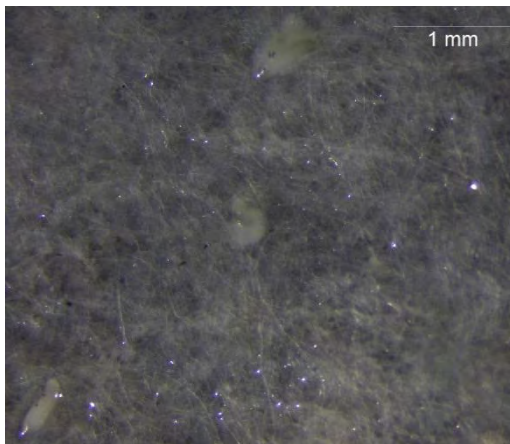
38 ήταν φυσιολογικά και τα 11 σπασμένα, ενώ τα υπόλοιπα δύο άτομα παρατηρήθηκαν σε ανατομικό επίπεδο και διέθεταν φυσιολογικές ωοθήκες. Στις εικόνες 43 και 44 απεικονίζονται φυσιολογικά αυγά που άφησε το ίδιο άτομο, στην εικόνα 45 απεικονίζονται σπασμένα αυγά που αφέθηκαν από το δεύτερο άτομο ενώ στην εικόνα 46 φαίνεται μία φυσιολογική ωοθήκη ενός εκ των δύο ατόμων που δεν άφησαν αυγά.



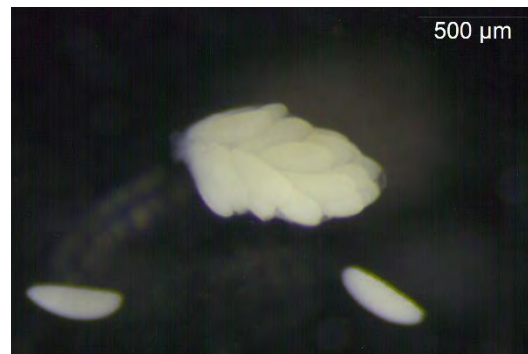
Εικόνα 43. Απόθεση φυσιολογικών αυγών από άτομο_Norma2



Εικόνα 44. Απόθεση φυσιολογικών αυγών από άτομο_Norma2 σε μεγέθυνση

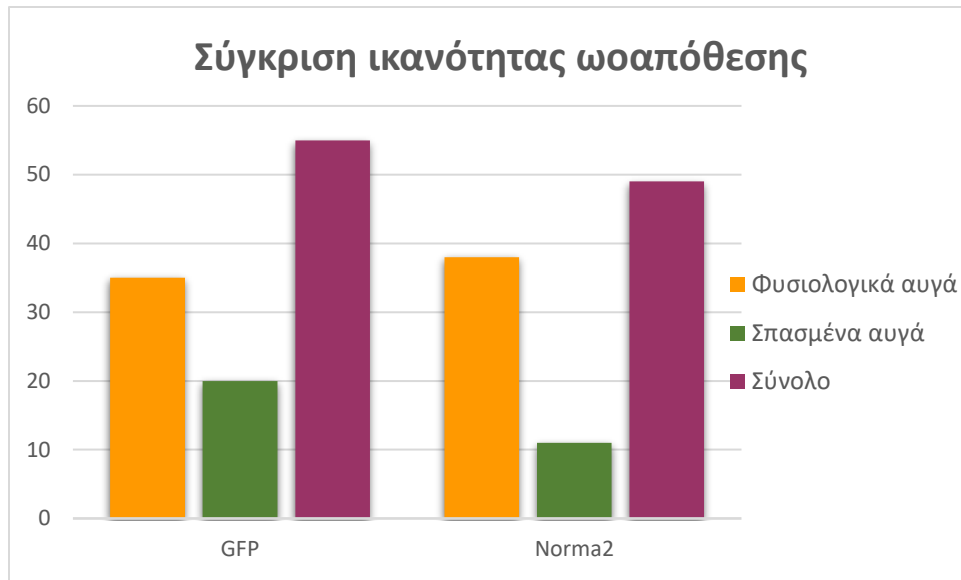


Εικόνα 45. Απόθεση σπασμένων αυγών από άτομο_Norma2



Εικόνα 46. Φυσιολογική ωοθήκη ατόμου_Norma2 που δεν απόθεσε αυγά

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 5) απεικονίζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα από την παρατήρηση του φαινοτύπου της ωοαπόθεσης μεταξύ των GFP (control) και των Norma2 ατόμων. Ο άξονας γ αντιστοιχεί στον αριθμό των αυγών, ενώ στον άξονα x έχουν ομαδοποιηθεί οι περιπτώσεις καταμέτρησης (φυσιολογικά αυγά, σπασμένα αυγά και το σύνολο των αυγών) με διαφορετικά χρώματα ανά ομάδα ατόμων (GFP & Norma2). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο αυξημένος αριθμός σπασμένων αυγών στην περίπτωση ατόμων GFP που αποτελεί το control.



Γράφημα 5. Μελέτη της ικανότητας ωοαπόθεσης μεταξύ ατόμων GFP και Norma2 (3 και 2 άτομων αντίστοιχα), παρουσιάζοντας τον αριθμό των φυσιολογικών αυγών, των σπασμένων και το σύνολο.

5. Συζήτηση

Η πορεία αύξησης του πληθυσμού του *Aedes albopictus* οδηγεί σε όλο και περισσότερες επιδημίες αρμοπιών με εκατομμύρια κρούσματα κάθε χρόνο σε παγκόσμια κλίμακα. Γι' αυτό αποτελεί ύψιστης ανάγκης η ανακάλυψη και εφαρμογή αποτελεσματικότερων μεθόδων περιορισμού του πληθυσμού των κουνουπιών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η στόχευση και η διατάραξη της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς των κουνουπιών ειδικότερα αυτής των θηλυκών ατόμων. Αυτός ήταν και ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν μικροενέσεις για τη χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA με στόχο τη RNAi σίγηση ενός lncRNA γονιδίου (Norma2) που με βάση αναλύσεις μεταγραφομικής ενδεχομένως να διαδραμάτιζε κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθηκών και την απόθεση αυγών.

Η επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου έγινε από μια συλλογή lncRNA γονιδίων από δεδομένα RNA seq (Gamez et al., 2020), τα οποία παρουσίαζαν ένα συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης: μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις ωοθήκες πριν το γεύμα του αίματος τα οποία αυξάνονταν διακριτά μετά το γεύμα του αίματος. Τα δεδομένα αυτά στηρίχθηκαν στο assembly `capu_80X_arrow2.2` και στο γονιδίωμα C6/36 και ο κωδικός του γονιδίου-στόχου στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων NCBI με βάση το συγκεκριμένο assembly είναι ο XR_002129994.1. Παρ' όλα αυτά, στο NCBI πλέον εντοπίζεται με τον κωδικό XR_003898997.1, καθώς έγινε προσθήκη νέου assembly (Aalbo_primary.1). Σχεδιάστηκαν εκκινητές για PCR και qPCR με τέτοιο τρόπο ώστε να πληρούν όλες τις προϋποθέσεις για την ενίσχυση αυτής και μόνο της αλληλουχίας. Αρχικά, η ενίσχυση του γονιδίου μέσω PCR έγινε σε δείγμα cDNA θηλυκού ατόμου 50h PBM. Αυτό το χρονικό σημείο θεωρήθηκε κατάλληλο, καθώς η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου είναι αρκετά αισθητή τότε, με βάση τα RNA seq δεδομένα. Μετά την PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για να επιβεβαιωθεί ότι ενισχύθηκε η κατάλληλη αλληλουχία.

Στην περίπτωση των εκκινητών για τη PCR, υπήρχαν T7 περιοχές στα 5' άκρα του κάθε εκκινητή. Αυτά τα T7 άκρα, μετά την ενσωμάτωση τους στο ενισχυμένο προϊόν, λειτουργούν ως περιοχές υποκινητή για την T7 RNA πολυμεράση, εκκινώντας τη διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής και παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA). Το κατάλληλο μήκος αυτών επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για το γονίδιο GFP, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως control για την εκτίμηση της ποιότητας της μεθόδου χορήγησης των dsRNA μορίων σε θηλυκά κουνούπια και την σύγκριση των αποτελεσμάτων μετά τη σίγηση του Norma2. Επομένως, πραγματοποιήθηκε χορήγηση των dsRNA μορίων και 48h και 72h μετά το γεύμα αίματος παρατηρήθηκε ο φαινότυπος ατόμων ως προς την ανάπτυξη των ωοθηκών.

Σε γενικές γραμμές, ο φαινότυπος στα άτομα που έγινε σίγηση του Norma2 που παρατηρήθηκαν δεν παρουσίασε κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο. Παρ' όλα αυτά, στα τέσσερα από τα έξι άτομα είχε διαταραχθεί ο φυσιολογικός φαινότυπος των αντίστοιχων χρονικών σημείων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν: πιο διαφανείς ωοθήκες (δύο άτομα), τελείως υποανάπτυκτες ωοθήκες και μικρότερου μεγέθους. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την εξήγηση της ποικιλίας αυτής των φαινοτύπων. Αρχικά, η δράση των dsRNA μορίων αποτελεί κομμάτι του RNAi μηχανισμού που προκαλεί σίγηση του γονιδίου-στόχου. Επειδή, επομένως, πρόκειται για σίγηση και όχι αποκοπή του γονιδίου, είναι λογικό, αναλόγως το άτομο και την κατανομή των dsRNA, να

διαφέρουν οι φαινότυποι. Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται και στην άνιση και μη στοχευμένη κατανομή των dsRNA μορίων, αλλά και στην χαμηλή ποσότητα του διαλύματος dsRNA που χορηγήθηκε (138 nl). Τελικά, ενώ τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, ο αριθμός των ατόμων που μελετήθηκαν ήταν μικρός, καθώς πολλά άτομα απεβίωσαν μετά τη μικροένεση. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται είτε στην τεχνική προσέγγιση της χορήγησης των dsRNA είτε στο ιξώδες του διαλύματος dsRNA που χορηγήθηκε με βάση τη συγκέντρωση του (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Στη συνέχεια, για επιβεβαίωση της σίγησης του Norma2 χρειαζόταν να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση του με τη βοήθεια της qPCR. Γ' αυτό το λόγο απομονώθηκε το RNA δείγματος ελάχιστα πιο διαφανών ωθηκών 72h, των carcasses 72h και των ωθηκών GFP 72h (control) και έγινε σύνθεση cDNA. Παρ' όλα αυτά, πριν την εφαρμογή της qPCR, ήταν σημαντικό να γίνει εκτίμηση της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού T_a των εκκινητών μέσω gradient qPCR. Με βάση το T_m των qPCR εκκινητών, εξετάστηκαν τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες και η επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας (57°C) βασίστηκε στο Melt Peak και στην ύπαρξη καθαρής και μοναδικής κορυφής. Ο πολύς «θόρυβος», δηλαδή η έλλειψη μιας ξεκάθαρης κορυφής, που υπήρχε στα περισσότερα δείγματα, οδηγούσε στην υποψία δημιουργίας διμερών ή παραπροϊόντων. Αυτό το χαρακτηριστικό παρουσιαζόταν στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οδηγώντας σε μια αρχική αμφισβήτηση της ποιότητας των εκκινητών.

Η qPCR που πραγματοποιήθηκε, ακολούθως, για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου-στόχου βασίστηκε σε τρία δείγματα (72h ovaries, Norma2_ovaries & GFP_ovaries). Τα αποτελέσματα που αναμένονταν ήταν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στις φυσιολογικές ωθήκες των 72h και στις ωθήκες που έγινε σίγηση του GFP και μειωμένα επίπεδα έκφρασης στις ωθήκες που έγινε σίγηση του Norma2. Αντίθετα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των GFP & 72h ωθηκών ήταν παρόμοια, τα επίπεδα έκφρασης στις ωθήκες Norma2 ήταν αυξημένα. Αυτό με μία πρώτη ματιά σημαίνει ότι δεν πραγματοποιήθηκε σίγηση του γονιδίου-στόχου. Στη ίδια αντίδραση στοχεύθηκε και ένα άλλο lncRNA γονίδιο (Norma1) για την εκτίμηση της ποιότητας των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων. Με βάση τα αποτελέσματα σχετικά με το Norma1, η ποιότητα των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων ήταν ικανοποιητική. Επιπρόσθετα, τα Cq μεταξύ των technical replicates δεν απείχαν παραπάνω από 0,5 κύκλους, τονίζοντας ότι από τεχνικής άποψης, δεν υπήρχε κάποιο λάθος. Οπότε, ένα ενδεχόμενο είναι στο δείγμα όντως να μην έγινε σίγηση του γονιδίου λόγω μειωμένης ποσότητας των dsRNA ή αδυναμία δράσης αυτών και ο φαινότυπος των ελαφρώς πιο διαφανών ωθηκών να οφείλεται είτε στη βιολογία του ατόμου είτε στην επίδραση του διαλύματος (PBS) που διατηρούνται οι ωθήκες κατά την παρατήρησή τους κάτω από το μικροσκόπιο. Ένα δεύτερο ενδεχόμενο είναι οι εκκινητές να μην είναι εντέλει κατάλληλοι για την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου και λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή δημιουργία διμερών ή παραπροϊόντων σε συνδυασμό με δείγματα αμφίβολης ποιότητας να έδωσαν λανθασμένα αποτελέσματα.

Δύο επιπλέον qPCR έγιναν στα πλαίσια μελέτης του προφίλ έκφρασης του γονιδίου Norma2 για επιβεβαίωση αυτού που προέκυπτε από τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η πρώτη qPCR που βασίστηκε σε δείγματα ωθηκών και carcasses πέντε χρονικών σημείων μετά το γεύμα αίματος, φανέρωσε τη μεγάλη διαφορά έκφρασης του γονιδίου μεταξύ των διαφορετικών ιστών και επιβεβαίωσε την ιστοειδική δράση του γονιδίου, τονίζοντας τη φύση του ως lncRNA γονίδιο. Η δεύτερη qPCR πραγματοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του Norma2 στις ωθήκες από έξι διαφορετικά χρονικά σημεία μετά το γεύμα αίματος και τα αποτελέσματα δεν

ταυτίστηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας. Με βάση τη βιβλιογραφία, η μεγαλύτερη αύξηση του γονιδίου εντοπίζεται στις 36h και 48h, ενώ με βάση τα αποτελέσματα της qPCR, εντοπίζεται στις 48h και 72h. Οι 48h ίσως να αποτελούν το καταλληλότερο χρονικό σημείο για τη διερεύνηση της έκφρασης του Norma2 και την προσπάθεια σίγησης του.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και μελέτη της ικανότητας ωοαπόθεσης, εκτός της ανάπτυξης ωοθηκών. Η σύγκριση έγινε μεταξύ τεσσάρων ατόμων-control GFP και τεσσάρων ατόμων που σιγήθηκε το Norma2. Ενδιαφέρον παρουσίασε η αδυναμία απόθεσης αυγών από δύο άτομα Norma2 και η απόθεση σπασμένων αυγών από το τρίτο άτομο, υποδηλώνοντας έναν ενδεχόμενο ρυθμιστικό ρόλο του γονιδίου στη διαδικασία της ωοαπόθεσης. Ωστόσο, παράδοξο ήταν το γεγονός ότι τα άτομα-control άφησαν υψηλό αριθμό σπασμένων αυγών και η σύγκριση της ωοαπόθεσης μεταξύ των ομάδων ίσως να μην είναι ενδεικτική της κατάστασης. Ο μεγάλος αριθμός σπασμένων αυγών κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην επίδραση του διαλύματος των dsRNA στη βιολογία του οργανισμού, αν και δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να σχετίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες εκείνων των ημερών. Ανεξαρτήτως αυτού του γεγονότος, συγκρίνοντας τα σύνολα των αυγών που αφέθηκαν, υπήρχε μια μικρή μείωση στον αριθμό των ατόμων Norma2.

Συμπερασματικά, με τη σίγηση και τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου Norma2 προέκυψαν κάποια ενδιαφέροντα αποτελέσματα, υποδηλώνοντας ότι το lncRNA γονίδιο Norma2 ίσως θα μπορούσε να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθηκών ή περισσότερο στην ωοαπόθεση, μέσω της ρύθμισης άλλων σημαντικών γονιδίων. Αρχικά, όσον αφορά τους φαινοτύπους τόσο ως προς την ανάπτυξη όσο και ως προς την ικανότητα ωοαπόθεσης, είναι απαραίτητη η επανάληψη αυτών των πειραματικών διαδικασιών σε μεγαλύτερο πληθυσμό, έτσι ώστε να αποκτηθεί μια ευρύτερη και πιο ενδεικτική εικόνα από την επίδραση που έχει τελικά η σίγηση του γονιδίου-στόχου και κατ' επέκταση από το ρόλο του. Παράλληλα, οι εκκινήτες για τη qPCR ίσως χρειάζεται να επανασχεδιαστούν με σκοπό την απαλοιφή «θορύβου» στο Melt Peak και τη χρήση τους σε δείγματα που θα έχουν απομονωθεί εκ νέου. Αυτά τα δείγματα θα μπορούσαν να αφορούν ωοθήκες ατόμων που τους έχει γίνει σίγηση του Norma2 και απομόνωση 48h μετά το γεύμα αίματος για μια πιο αξιόπιστη σύγκριση των επιπέδων έκφρασής του. Εφόσον και αν προκύψουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, τότε θα μπορούσε να μελετηθεί η αλλαγή της μεθόδου χορήγησης σε κάποια που θα μπορεί να εφαρμοστεί με υψηλότερη απόδοση και στη φύση όπως η χορήγηση μέσω τροφής και κατανάλωσης βακτηρίων ή μυκήτων, καθώς η μέθοδος των μικροενέσεων είναι καθαρά για το εργαστήριο. Γενικά, η αναπαραγωγική συμπεριφορά των θηλυκών κουνουπιών αποτελεί έναν ενδιαφέρον στόχο με προοπτικές όσον αφορά την παρεμπόδιση βασικών διαδικασιών όπως η ανάπτυξη των ωοθηκών και η ωοαπόθεση με τελικό στόχο τη μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών.

6. Βιβλιογραφία

- Abdurakhmonov, I. Y. (2016). RNA Interference – A Hallmark of Cellular Function and Gene Manipulation. *RNA Interference*. doi:10.5772/62038
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.657-685.2003>
- Ahmad, N. A., Vythilingam, I., Lim, Y. A. L., Zabari, N. Z. A. M., & Lee, H. L. (2016). Detection of Wolbachia in *Aedes albopictus* and Their Effects on Chikungunya Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 148–156. doi:10.4269/ajtmh.16-0516
- Airs, P. M., & Bartholomay, L. C. (2017). *RNA Interference for Mosquito and Mosquito-Borne Disease Control*. *Insects*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/insects8010004>
- Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Neira Oviedo, M., Lacroix, R., Matzen, K., & Beech, C. (2013). Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and global health*, 107(4), 170–179. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000095>
- Attardo, GM., Hansen, IA., Raikhel, AS. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7), 661-675. doi:10.1016/j.ibmb.2005.02.013
- Badieritakis, E., Papachristos, D., Latinopoulos, D., Stefopoulou, A., Kolimenakis, A., Bithas, K., Patsoula, E., Beleri, S., Maselou, D., Balatsos, G., Michaelakis, A. (2018). *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitology Research*, 117, 453–460 <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5721-6>
- Baulcombe, D. C. (2007). MOLECULAR BIOLOGY: Amplified Silencing. *Science*, 315(5809), 199–200. doi:10.1126/science.1138030
- Bellini, R., Puggioli, A., Balestrino, F., Carrieri, M., Urbanelli, S. (2018). Exploring protandry and pupal size selection for *Aedes albopictus* sex separation. *Parasites Vectors* 11 (Suppl 2), 650, 65-71. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3213-x>
- Blandin, S., Moita, L. F., Köcher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C., & Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO reports*, 3(9), 852–856. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf180>
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., & James, A. A. (2013). The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in parasitology*, 29(9), 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M., & Smagghe, G. (2020). Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Frontiers in plant science*, 11, 451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00451>
- Clifton, M. E., & Noriega, F. G. (2012). The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7), 1007–1019. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.005

- Cuervo-Parra, J. A., Cortés, T. R. and Ramirez-Lepe, M. (2016, March 2). Mosquito-Borne Diseases, Pesticides Used for Mosquito Control, and Development of Resistance to Insecticides, Insecticides Resistance, *IntechOpen*, DOI: 10.5772/61510. Available from: <https://www.intechopen.com/books/insecticides-resistance/mosquito-borne-diseases-pesticides-used-for-mosquito-control-and-development-of-resistance-to-insect>
- Cunze, S., Koch, L.K., Kochmann, J., Klimpel, S. (2016). *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* - two invasive mosquito species with different temperature niches in Europe. *Parasites Vectors* 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1853-2>
- Dittmer, J., Alafndi, A., & Gabrieli, P. (2019). Fat body-specific vitellogenin expression regulates host-seeking behaviour in the mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS biology*, 17(5), e3000238. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000238>
- Duman-Scheel, M. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. *Current Drug Targets*, 20. doi:10.2174/1389450120666181126123538
- Dzaki, N., Azzam, G. (2018). Assessment of *Aedes albopictus* reference genes for quantitative PCR at different stages of development. *PLoS ONE*, 13(3): e0194664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194664>
- Etebari K, Asad S, Zhang G, Asgari S (2016) Identification of *Aedes aegypti* Long Intergenic Non-coding RNAs and Their Association with Wolbachia and Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(10): e0005069. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005069>
- European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. (2020). *Mosquito maps* [internet]. Stockholm: ECDC. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>
- Faraji, A., & Unlu, I. (2016). The Eye of the Tiger, the Thrill of the Fight: Effective Larval and Adult Control Measures Against the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in North America. *Journal of Medical Entomology*, 53(5), 1029–1047. doi:10.1093/jme/tjw096
- Fatica, A., & Bozzoni, I. (2013). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 15(1), 7–21. doi:10.1038/nrg3606
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. doi:10.1038/35888
- Full Scope Pest Control. (2020, March 31). *Mosquito Life Cycle*. Retrieved from: <https://fullscopepestcontrol.com/mosquito-life-cycle/>
- Gabrieli, P., Smidler, A. & Catteruccia, F. (2014). Engineering the control of mosquito borne infectious diseases. *Genome Biology*, 15, 535. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0535-7>
- Gamez, S., Antoshechkin, I., Mendez-Sanchez, S. C., & Akbari, O. S. (2020). The Developmental Transcriptome of *Aedes albopictus*, a Major Worldwide Human Disease Vector. *G3 (Bethesda, Md.)*, 10(3), 1051–1062. <https://doi.org/10.1534/g3.119.401006>
- Gao, Q., Cao, H., Fan, J., Zhang, Z., Jin, S., Su, F., Leng, P., & Xiong, C. (2019). Field evaluation of Mosquito-trap, Ovitrap and a CO₂-light trap for *Aedes albopictus* sampling in Shanghai, China. *PeerJ*, 7, e8031. <https://doi.org/10.7717/peerj.8031>

- Greif, M. (2016). Studies on ovaries of mosquitoes using light and scanning microscopy. *International Journal of Mosquito Research*, 3(3), 47-50. Retrieved from: <http://www.dipterajournal.com/archives/2016/3/3/A/3-1-9>
- Gulia-Nuss, M., Elliot, A., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2015). Multiple factors contribute to anautogenous reproduction by the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of insect physiology*, 82, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.08.001>
- Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., ... O'Neill, S. L. (2011). Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361), 454–457. doi:10.1038/nature10356
- Isoe, J., Koch, L. E., Isoe, Y. E., Rascón, A. A., Jr, Brown, H. E., Massani, B. B., & Miesfeld, R. L. (2019). Identification and characterization of a mosquito-specific eggshell organizing factor in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS biology*, 17(1), e3000068. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000068>
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Frontiers in physiology*, 7, 553. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>
- Kandul, N.P., Liu, J., Sanchez C., H.M. et al. (2019). Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. *Nature Communications*, 10, 84. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07964-7>
- Kauffman E. B., Kramer L.D. (2017). Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control. *The Journal of Infectious Diseases* 216(10), 976-990. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix405>
- Khan, G. Z., Khan, I., Khan, I. A., Alamzeb, Salman, M., & Ullah, K. (2016). Evaluation of different formulations of IGRs against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(6), 485–491. doi:10.1016/j.apjtb.2016.04.008
- Kolliopoulou, A., Kontogiannatos, D., & Swevers, L. (2020). The Use of Engineered Plant Viruses in a Trans-Kingdom Silencing Strategy Against Their Insect Vectors. *Frontiers in plant science*, 11, 917. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00917>
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*, 172(3), 393–407. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Kraemer, M.U.G., Reiner, R.C., Brady, O.J. et al. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology*, 4, 854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
- Kumar, D., Hu, X., Guo, R., Xue, R., Cao, G., & Gong, C. (2017). Long Noncoding RNA: Disclosing New Horizon in the Molecular World of Insects. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology*, 85–102. doi:10.1007/978-3-319-61343-7_5
- Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y., & Leung, S. W. S. (2015). siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e252. doi:10.1038/mtna.2015.23
- Legeai, F., Derrien, T. Identification of long non-coding RNAs in insects genomes. (2015) *Current Opinion in Insect Science*, 7, 37 - 44. Doi: 10.1016/j.cois.2015.01.003ff

- Li, H., Bowling, A. J., Gandra, P., Rangasamy, M., Pence, H. E., McEwan, R. E., ... Narva, K. E. (2018). Systemic RNAi in western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, does not involve transitive pathways. *Insect Science*, *25*, 45–56. doi: 10.1111/1744-7917.12382
- LI, M., XIAO, H., HE, K., & LI, F. (2019). Progress and prospects of noncoding RNAs in insects. *Journal of Integrative Agriculture*, *18*(4), 729–747. doi:10.1016/s2095-3119(18)61976-8
- Liu, F., Guo, D., Yuan, Z., Chen, C., & Xiao, H. (2017). Genome-wide identification of long non-coding RNA genes and their association with insecticide resistance and metamorphosis in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Scientific Reports*, *7*(1). doi:10.1038/s41598-017-16057-2
- Lopez, S., Guimarães-Ribeiro, V., Rodriguez, J., Dorand, F., Salles, T. S., Sá-Guimarães, T. E., Alvarenga, E., Melo, A., Almeida, R. V., & Moreira, M. F. (2019). RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Scientific reports*, *9*(1), 4038. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39666-5>
- Mamta, B., & Rajam, M. V. (2017). RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, *23*(3), 487–501. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0443-x>
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics*, *10*(3), 155–159. doi:10.1038/nrg252
- Mori, A., Romero-Severson, J., Black, W. C., 4th, & Severson, D. W. (2008). Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). *Heredity*, *101*(1), 75–82. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.32>
- Mužinić, V., & Želježić, D. (2018). Non-target toxicity of novel insecticides. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, *69*(2), 86–102. doi:10.2478/aiht-2018-69-3111
- Nimmo, D. (n.d.). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Life cycle, biology and distribution. *Oxford Insect Technologies*. Retrieved from: http://www.genewatch.org/uploads/f03c6d66a9b354535738483c1c3d49e4/appen_4__doc_4.pdf
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H., Yamanaka, I., Kiyosawa, H., Yagi, K., Tomaru, Y., Hasegawa, Y., Nogami, A., Schönbach, C., Gojobori, T., Baldarelli, R., Hill, D. P., ... RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, *420*(6915), 563–573. <https://doi.org/10.1038/nature01266>
- Olson, K. E., & Blair, C. D. (2015). Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. *Current opinion in virology*, *15*, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.001>
- Padrón, A., Molina-Cruz, A., Quinones, M., Ribeiro, J. M., Ramphul, U., Rodrigues, J., Shen, K., Haile, A., Ramirez, J. L., & Barillas-Mury, C. (2014). In depth annotation of the *Anopheles gambiae* mosquito midgut transcriptome. *BMC genomics*, *15*(1), 636. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-636>
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, *11*(14-15), 1177–1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.00

- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629–641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006
- Raikhel, A. S., Kokoza, V. A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.-F., Li, C., ... Attardo, G. (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1275–1286. doi:10.1016/s0965-1748(02)00090-5
- Raikhel, AS., Dhadialla, TS. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 217-251. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.001245
- Rios, L., Maruniak, JE. (2011). Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) (Insecta: Diptera: Culicidae). Publication No. EENY-319. University of Florida Institute of Food and Agricultural Services and Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Gainesville. Available at http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/asian_tiger.htm
- ROTH, T. F., & PORTER, K. R. (1964). YOLK PROTEIN UPTAKE IN THE OOCYTE OF THE MOSQUITO AEDES AEGYPTI. L. *The Journal of cell biology*, 20(2), 313–332. <https://doi.org/10.1083/jcb.20.2.313>
- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G., Vakalis, NC. (2005) Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin* 19, 10–11
- Sampath K. S., & Puttaraju, H. P. (2012). Improvised microinjection technique for mosquito vectors. *The Indian journal of medical research*, 136(6), 971–978.
- Sanscrainte, N. D., Waits, C. M., Geden, C. J., Estep, A. S., & Becnel, J. J. (2018). Reproducible dsRNA Microinjection and Oviposition Bioassay in Mosquitoes and House Flies. *Journal of Visualized Experiments*, (141). doi:10.3791/58650
- Santos, SR., Taylor, DJ., Kinzie, RA. 3rd, Hidaka, M., Sakai, K., Coffroth, MA. (2002) Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(2), 97-111. doi:10.1016/S1055-7903(02)00010-6
- Satyavathi, V., Ghosh, R., & Subramanian, S. (2017). Long Non-Coding RNAs Regulating Immunity in Insects. *Non-coding RNA*, 3(1), 14. <https://doi.org/10.3390/ncrna3010014>
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., ... Douglas, A. E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 59(12), 1212–1221. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.08.014
- Sen, G. L., & Blau, H. M. (2006). A brief history of RNAi: the silence of the genes. *The FASEB Journal*, 20(9), 1293–1299. doi:10.1096/fj.06-6014rev
- Shaw, W. R., & Catteruccia, F. (2019). Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature microbiology*, 4(1), 20–34. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0214-7>
- Shaw, W. R., Attardo, G. M., Aksoy, S., & Catteruccia, F. (2015). A comparative analysis of reproductive biology of insect vectors of human disease. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 142–148. doi:10.1016/j.cois.2015.05.001
- Skuse F. A. A. (1894) [1895] The banded mosquito of Bengal. *Indian Museum Notes*, 3(5),20

- Slack, J.M.W. (2013). *Essential Developmental Biology* (3rd Edition). West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons
- Spurlock, C. F., Crooke, P. S., & Aune, T. M. (2016). Biogenesis and Transcriptional Regulation of Long Noncoding RNAs in the Human Immune System. *The Journal of Immunology*, *197*(12), 4509–4517. doi:10.4049/jimmunol.1600970
- Tropp, B.E. (2014). *Principles of Molecular Biology* (First edition). JONES & BARTLETT LEARNING
- Umbach, J. L., & Cullen, B. R. (2009). The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & development*, *23*(10), 1151–1164. <https://doi.org/10.1101/gad.1793309>
- Wade, J. T., & Grainger, D. C. (2014). Pervasive transcription: illuminating the dark matter of bacterial transcriptomes. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(9), 647–653. doi:10.1038/nrmicro3316
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*, *43*(6), 904–914. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.018
- Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M., Witkowski, J.A. (2007). *Recombinant DNA, Genes and Genome-A Short Course* (Third edition). New York, United States: W. H. Freeman and Company
- Weeratunga, P., Rodrigo, C., Fernando, S. D., & Rajapakse, S. (2017). Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2017*(8), CD012759. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012759>
- World Health Organization (WHO). (2019, February 19). *Q&A on the Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors*. Retrieved from: https://www.who.int/malaria/media/insecticide_resistance_management_qa/en/
- World Mosquito Program (n.d.). *How our method compares*. Retrieved from: <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/learn/how-our-method-compares>
- Wu, P., Yu, X., Wang, P., Cheng, G. (2019). Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *21* (e1), 1–6. <https://doi.org/10.1017/erm.2018.6>
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., ... Smagghe, G. (2012). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, *20*(1), 4–14. doi:10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x
- Zheng, G. X., Do, B. T., Webster, D. E., Khavari, P. A., & Chang, H. Y. (2014). Dicer-microRNA-Myc circuit promotes transcription of hundreds of long noncoding RNAs. *Nature structural & molecular biology*, *21*(7), 585–590. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2842>

ΕΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα 4: Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, *11*(14-15), 1177–1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.00

- Εικόνα 5: Purdue University. Medical Entomology. Retrieved from:
<https://extension.entm.purdue.edu/publichealth/insects/mosquito.html>
- Εικόνα 6: Zettel, C., Kaufman, P. *Featured creatures: Aedes aegypti*. University of Florida. Retrieved from: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm
- Εικόνα 7: <https://www.shutterstock.com/video/clip-10582703-asian-tiger-mosquito-aedes-albopictus-larvae-pupae>
- Εικόνα 8: <https://www.flickr.com/photos/mantodea/16550382584/in/photostream/>
- Εικόνα 9: National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. *Mosquito life cycle*. Retrieved from: <https://www.cdc.gov/dengue/resources/factsheets/mosquitolifecyclefinal.pdf>
- Εικόνα 10: <https://mosquito-plus.com/austin-area-pests/15b-aedes-albopictus-on-water/#attachment/0/>
- Εικόνα 25: Monarch® DNA Gel Extraction Kit Protocol. Retrieved from:
<https://www.neb.com/products/t1020-monarch-dna-gel-extraction-kit#Product%20Information>