

**Μελέτη της Σίγησης lncRNA Γονιδίων μέσω
της Τεχνολογίας RNAi στην Ωοτοκία του
*Aedes albopictus***



**Σούκια Όλγα
Λάρισα, 2021**

Θέμα Μεταπτυχιακής Διατριβής

*“Μελέτη της Σίγησης lncRNA Γονιδίων μέσω της Τεχνολογίας RNAi στην Ωοτοκία του *Aedes albopictus*.”*

Master Thesis Subject

*“A Study for the silencing of lncRNA Genes through the RNAi Technique on Oviposition of *Aedes albopictus*.”*

Σούκια Όλγα
Λάρισα, 2021

Η μεταπτυχιακή μου διατριβή έλαβε χώρα στο εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημεία και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Λάρισα κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

This Master Thesis took place at the Laboratory of Molecular Biology and Genetics at the Department of Biochemistry and Biotechnology in University of Thessaly (Attardo, Hansen, & Raikhel, 2005) during the Academic Period 2020-2021.

Τριμελής Επιτροπή

- **Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος**
Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και
Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη
Λάρισα
- **Τσουμάνη Κωνσταντίνα**
Συνεργάζουσα Διδάσκων του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας στη Λάρισα
- **Γρηγορίου Μαρία-Ελένη**
Συνεργάζουσα Διδάσκων του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας στη Λάρισα

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο που πίστεψε σε έμένα και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω πάνω σε ένα τόσο σπουδαίο project καθώς επίσης και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Αλέξανδρο Μπελαβίλα-Τροβά για την συνεχή υποστήριξη, την αμέριστη συμπαράσταση και την απόλυτη εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1. Το Ασιατικό Κουνούπι Τίγρης <i>Aedes albopictus</i>	1
1.1.1. Ιστορικά στοιχεία και Εξάπλωση	2
1.1.2. Φυσιολογική Πλαστικότητα	3
1.1.3. Φορέας Ασθενειών	4
1.1.4. Βιολογικός Κύκλος	5
1.1.5. Μορφολογία θηλυκού ατόμου	8
1.2. Βιταλλογένεση	9
1.2.1. Αυτογονία	10
1.3. Τρόποι Αντιμετώπισης	11
1.3.1. Κλασσικοί Μέθοδοι	11
1.3.1.1. Αντιμετώπιση προνυμφών με φυσικά μέσα	11
1.3.1.2. Αντιμετώπιση προνυμφών με χημικά μέσα	12
1.3.1.3. Μηχανικά μέσα αντιμετώπισης τέλειων εντόμων	12
1.3.1.4. Βιολογικά μέσα αντιμετώπισης τέλειων εντόμων	12
1.3.1.5. Υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών	12
1.3.1.6. Χρήση εντομοαπωθητικών σκευασμάτων	13
1.3.2. Σύγχρονοι Μέθοδοι	14
1.3.2.1. Μέθοδοι αντικατάστασης πληθυσμού	14
1.3.2.2. Μέθοδοι βασισμένες στη γενετική	15
1.3.3. Μηχανισμός Αποσιώπησης RNAi	15
1.3.3.1. Μηχανισμός δράσης RNAi	16
1.4. Καθεψίνες	17
1.5. Long-Non Coding RNAs	20
1.5.1. Αναζήτηση lncRNAs στο γονιδίωμα	20
1.5.2. Λειτουργίες των lncRNAs	20
1.5.3. Η εφαρμογή των lncRNAs στα έντομα	21
1.6. Χρήση του μηχανισμού RNAi στον έλεγχο εντόμων	21
1.6.1. Εισαγωγή dsRNA στον οργανισμό-στόχο	22
1.6.2. Μικροέγχυση (Micro-injection)	24
2. Σκοπός της Έρευνας	26
3. Υλικά και Μέθοδοι	27
3.1. Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων	27
3.1.1. RNA Extraction (Απομόνωση RNA)	27
3.1.2. DNase Treatment (Επώαση με DNάση)	28
3.1.3. Synthesize of cDNA (Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA	30
3.1.4. Gel electrophoresis (Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης)	31
3.1.5. Gel extraction(Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης)	33
3.2. Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων	35
3.2.1. Σχεδιασμός εκκινητών	35
3.2.2. PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)	35

3.2.3. Ενσωμάτωση T7εκκινητών	37
3.2.4. qPCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)..	37
3.3. Μέθοδοι παραγωγής dsRNA	38
3.3.1. <i>In vitro</i> Transcription.....	38
3.3.2. Επώαση με DNάση και κατακρήμνιση dsRNA	39
3.4. Χορήγηση dsRNA μέσω μικροέγχυσης.	40
3.5. Συνθήκες εργαστηρίου	41
4. Αποτελέσματα έρευνας.....	42
4.1. Ανάλυση RNAseq δεδομένων.....	42
4.2. Ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων.....	43
4.3. Παραγωγή dsRNA	45
4.4. Ενίσχυση γονιδίου GFP και δημιουργία dsRNA	45
4.5. Εφαρμογή dsRNA και παρατήρηση φαινοτύπου	46
5. Συζήτηση	48
6. Βιβλιογραφία	50
Παράρτημα I.....	54
Παράρτημα II.....	55

1. Εισαγωγή

1.1. Το Ασιατικό Κουνούπι Τίγρης *Aedes albopictus*

Το Ασιατικό κουνούπι Τίγρης, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (γνωστό επίσης με την ονομασία *Stegomyia albopicta*), είναι ένα από τα πιο κοινά και χωροκατακτητικά είδη κουνουπιών. Ανήκει στην οικογένεια των Culicidae, της τάξης των Διπτέρων (Diptera), μαζί με άλλα γνωστά είδη όπως το *Aedes aegypti*, το *Culex ripiens*, το *Aedes cretinus* και το *Anopheles gambiae*. Είναι μικρού μεγέθους κουνούπι (5-6mm) που πάνω στο θώρακα, την κοιλιά και τα πόδια έχει μαύρες και λευκές ρίγες, χαρακτηριστικό που προκαλεί σύγχυση στην αναγνώριση του αφού μοιάζει πολύ με το *Aedes cretinus*. Είναι ένα είδος κουνουπιού που έχει πολλές γενιές μέσα στο ίδιο έτος και τρέφεται κυρίως από θηλαστικά.

Το *Aedes albopictus* κατάγεται από την περιοχή της Νοτιοανατολικής Ασίας. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες όμως έχει εξαπλωθεί σε πολλές περιοχές την εύκρατης Ασίας, στην Ευρώπη, την Βόρεια και Νότια Αμερική, την Αφρική καθώς επίσης και σε περιοχές του Ινδικού και Ειρηνικού ωκεανού. Η εξάπλωση του *Ae. albopictus* αποτελεί το τρίτο παράδειγμα εξάπλωσης ενός φορέα ασθενειών που προκλήθηκε από ανθρώπινες δραστηριότητα μετά το *Aedes aegypti* και το *Culex ripiens* (Lounibos, 2002).

Το *Ae. albopictus* θεωρήθηκε κύριος ή δευτερεύον φορέας διαφόρων ιών, αλλά ιδιαίτερα αυτών που προκαλούν τον Δάγκειο και τον Δάγκειο αιμορραγικό πυρετό (*Dengue virus*, DENV) (Black IV et al., 2002). Η εξάπλωση του Δάγκειου πυρετού στην Ασία αποδίδεται στο *Ae. aegypti*, ενός κουνουπιού που συνδέεται στενά με το *Ae. albopictus*. Το *Ae. aegypti*, το οποίο προέρχεται από την Αφρική και έχει εξαπλωθεί σε όλον τον κόσμο, θεωρείται ο κύριος φορέας του Δάγκειου ιού καθώς και του ιού του Κίτρινου πυρετού (*Yellow fever virus*, YFV) (Gubler, 1998). Για αυτόν τον λόγο και η εξάπλωση αρχικά του *Ae. albopictus* δεν θεωρήθηκε κύριο πρόβλημα δημόσια υγείας, αλλά ως ένα γνώρισμα της παγκοσμιοποίησης. Εντούτοις, με την εξάπλωση του ιού *Chikungunya* (CHIKV) το 2006-2007 στα Νοτιοδυτικά του Ινδικού Ωκεανού, την Ινδία, την Κεντρική Αφρική και την Ιταλία, η άποψη για το πόσο σημαντικός φορέας ασθενειών είναι άλλαξε ριζικά.



Fig.1 Το *Ae. Albopictus* εν' ώρα δράσης.

1.1.1. Ιστορικά στοιχεία και Εξάπλωση

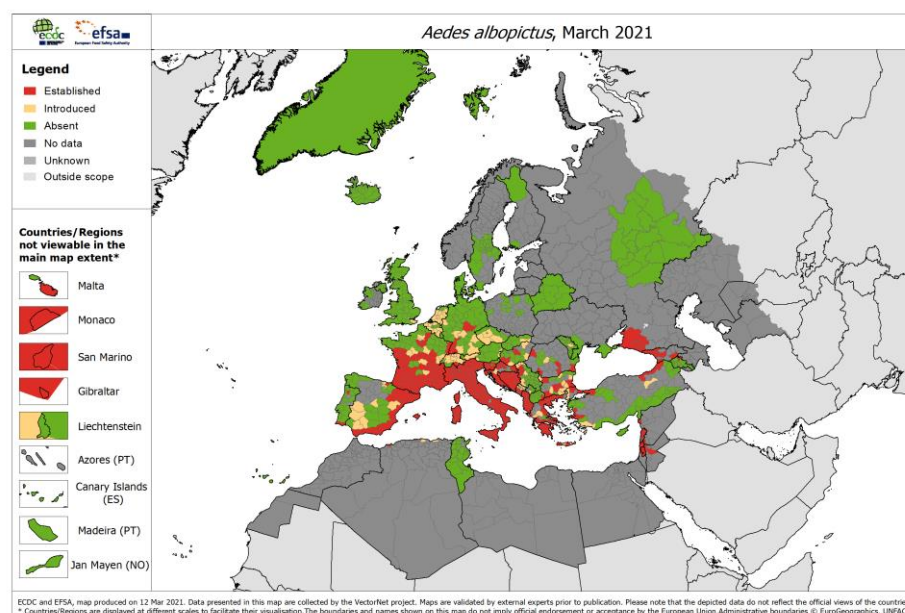
Το *Ae. albopictus* κατάγεται από τα δάση της Νοτιοανατολικής Ασίας, όπου και τρέφονταν με αίμα των ζώων της άγριας πανίδας (τα θηλυκά έντομα). Παρόλα αυτά, το είδος προοδευτικά υιοθέτησε μια διαφορετική πηγή τροφής (κατοικίδια ζώα, άνθρωπος) και ένα διαφορετικό μέρος συλλογής νερού όπου εναποθέτει τα αυγά του (Tabachnick, 1991).

Η ανθρώπινη μετανάστευση προς την Ινδική και την Μαλαϊκή χερσόνησο καθώς και τα νησιά του Ινδικού Ωκεανού, συμπεριλαμβανομένης της Μαδαγασκάρης, πιθανότατα να ευνόησε την πρόωρη εξάπλωση του *Ae. albopictus* σε νέες περιοχές. Αυτή η διάδοση τροφοδοτήθηκε περαιτέρω από την αύξηση του διεθνούς εμπορίου που σημειώθηκε κατά την διάρκεια του 20ού αιώνα. Η σχέση μεταξύ της εξάπλωσης του *Ae. albopictus* και των ανθρώπινων δραστηριοτήτων έχει καταδειχθεί ικανοποιητικά από την διεθνή μεταφορά ελαστικών, η οποία ήταν υπεύθυνη για την εισαγωγή του *Ae. albopictus* στις ΗΠΑ το 1985 (Sprenger, 1987). Ένας ακόμη λόγος για την ραγδαία εξάπλωση του *Ae. albopictus* φαίνεται να είναι η παγκοσμιοποίηση και η κλιματική αλλαγή (Cunze, Koch, Kochmann, & Klimpel, 2016).

Σήμερα, το *Ae. albopictus* έχει εξαπλωθεί σε ορισμένες αμερικανικές χώρες (από τις ΗΠΑ έως την Αργεντινή), πολλά νησιά του Ειρηνικού (π.χ. Χαβάη, Νησιά Σολομώντος και Φίτζι) και στην Αυστραλία. Στην Αφρική εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1989 στη Νότια Αφρική και αργότερα στη Νιγηρία, στο Καμερούν, στην Ισημερινή Γουινέα και στη Γκαμπόν. Η πρώτη αναφορά παρουσίας του είδους στην Ευρώπη ήταν στην Αλβανία το 1979, και έκτοτε εντοπίστηκε σε άλλες χώρες όπως η Βοσνία-Ερζεγοβίνη, η Κροατία, η Ελλάδα, η Γαλλία, η Ιταλία, το Μαυροβούνιο, η Σερβία, η Σλοβενία, η Ισπανία και η Ελβετία (Scholte & Schaffner, 2007).

Οι πρώτες καταγραφές στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκαν το 2003 στη Θεσπρωτία και στην Κέρκυρα, ενώ από τότε το *Ae. albopictus* επεκτάθηκε σε πολλούς νομούς του Ελλαδικού χώρου (Samanidou-Voyadjoglou, Patsoula, Spanakos, & Vakalis, 2005).

Fig.2 Η εξάπλωση του *Ae. albopictus* όπως μετρήθηκε από τον EFSA τον Μάιο του 2021. (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-march-2021>)



Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες το *Ae. albopictus* προβλέπεται να συνεχίσει την εξάπλωση του στην Ευρώπη στις επόμενες δεκαετίες ακόμα και αν οι κλιματικές συνθήκες και η πυκνότητα του ανθρωπίνου πληθυσμού ανά ήπειρο δεν αλλάξει (Kraemer et al., 2019). Στις εικόνες Fig.2 και Fig.3 παρουσιάζεται η τωρινή κατάσταση εξάπλωσης του κουνουπιού, όπως καταγράφηκε τον Μάιο του 2021 από τον EFSA (Fig.2) και η προβλεπόμενη κατάσταση εξάπλωσης μέχρι το 2080, στα διάφορα πιθανά σενάρια εξέλιξης του κλίματος (RCP 2.6, RCP 4.5, RCP 6.0 και RCP 8.5) (Fig.3) σε ευρωπαϊκό επίπεδο.

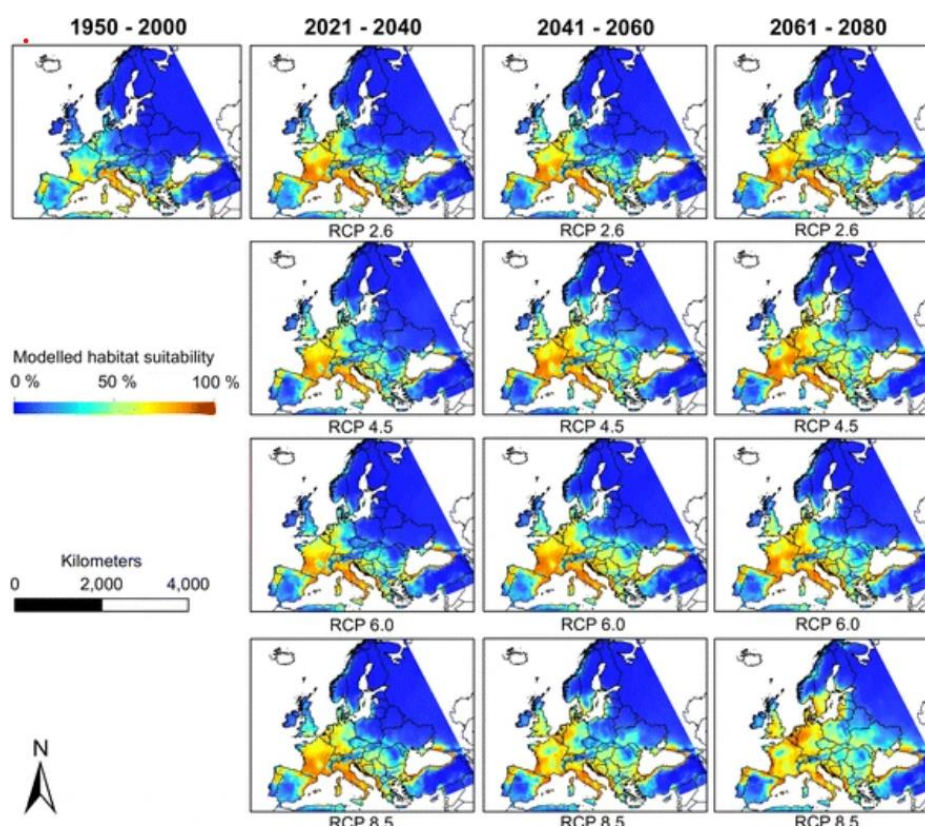


Fig.3 Πρόβλεψη για την εξάπλωση του *Ae. albopictus* έως το 2080 στα διάφορα σενάρια κλιματικής αλλαγής (Cunze et al., 2016).

1.1.2. Φυσιολογική πλαστικότητα

Το *Ae. albopictus* έχει εντοπιστεί σε περιοχές πολύ πιο βόρειες από το *Ae. aegypti*. Μία σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δυο ειδών είναι ότι το *Ae. albopictus* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται στις ψυχρές θερμοκρασίες παραμένοντας αδρανές κατά τη διάρκεια του χειμώνα στις εύκρατες περιοχές. Η κλιματολογική ανάλυση δεδομένων και εργαστηριακών μελετών σε αποικίες από την Ιαπωνία και τις ΗΠΑ έδειξε ότι οι πληθυσμοί του *Ae. albopictus* έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται συνεχώς και να επιβιώνουν σε μέση θερμοκρασία πάνω από 10 ° C στην Ιαπωνία (Kobayashi, Nihei, & Kurihara, 2002) και πάνω από τους -5 ° C για πληθυσμούς που υπάρχουν στις ΗΠΑ (Mitchell, 1995). Σε εύκρατα κλίματα (π.χ. Ευρώπη και ΗΠΑ), τα αυγά μπορούν να εισέλθουν σε αδράνεια όταν η θερμοκρασία μειώνεται κάτω από αυτά τα κατώφλια (Mitchell, 1995; Nawrocki &

Hawley, 1987). Η ικανότητα του *Ae. albopictus* να αντιστέκεται στις κρύες θερμοκρασίες συνδέεται πιθανώς με την ικανότητά του να συνθέτει υψηλή ποσότητα λιπιδίων κρόκου σε κρύες θερμοκρασίες. Η προνυμφιακή λιπογένεση του *Ae. albopictus* βρέθηκε να είναι πολύ πιο αποτελεσματική από εκείνη του *Ae. aegypti* (Briegel & Timmermann, 2001), η οποία εξηγεί εν μέρει την ικανότητα του *Ae. albopictus* να εξαπλώνεται πιο βόρεια.

Το *Ae. albopictus* διαθέτει επίσης και μια ισχυρή οικολογική πλαστικότητα που επιτρέπει την ταχεία προσαρμογή του σε ένα πολύ μεγάλο εύρος ενδιαιτημάτων. Για παράδειγμα, παρόλο που το *Ae. albopictus* προέρχεται από τα ασιατικά δάση, έχει πλέον προσαρμοστεί σε ανθρώπινα περιβάλλοντα και εμφανίζεται κατά προτίμηση σε προαστιακά περιβάλλοντα, ενώ επίσης συναντάται και σε πολύ πυκνοκατοικημένες αστικές περιοχές, όπως είναι η Ρώμη (Ιταλία). Οι περιοχές ανάπτυξη των προνυμφών του *Ae. albopictus* είναι πολύ ευρείες και κυμαίνονται από φυσικές τοποθεσίες (π.χ. κούτσουρα μπαμπού και τρύπες δέντρων) έως και σε τεχνητά δοχεία (π.χ.περιοχές που λιμνάζουν νερά και παλιά κομμάτια αυτοκινήτων) (Hawley, 1988).



Fig.4 Διάφορα τεχνητά και φυσικά μέρη ανάπτυξης του προνυμφιακού και του νυμφιακού σταδίου του *Ae. albopictus*.(π.χ. ελαστικά οχημάτων,κουφάλες δένδρων, τεχνητές και φυσικές μπάρες νερού)

1.1.3. Φορέας ασθενειών

Παρόλο που, πολλές εξαιρέσεις έχουν καταγραφεί ανάλογα με την εποχή, την περιοχή, τη διαθεσιμότητα του ξενιστή και τη φύση του ανθρώπινου περιβάλλοντος, το *Ae. albopictus* είναι κυρίως ένα κουνούπι που προτιμά να

τσιμπάει κατά τη διάρκεια της ημέρας, είτε νωρίς το πρωί (6:00-8:00) είτε αργά το απόγευμα (16:00-18:00).

Το αρσενικό κουνούπι τρέφεται με νέκταρ λουλουδιών ενώ το θηλυκό κουνούπι ψάχνει για τροφή κοντά στο έδαφος και κατά κύριο λόγο τρέφεται με το αίμα διαφόρων θηλαστικών. Ωστόσο, τα θηλυκά μπορούν να τρέφονται και από τις περισσότερες ομάδες σπονδυλωτών ζώων, από ψυχρόαιμα έως θερμόαιμα, συμπεριλαμβανομένων ερπετών, πτηνών και αμφιβίων (Scholte & Schaffner, 2007). Όλη αυτή η πλαστικότητα και το μεγάλο εύρος επιλογών σε τροφή οδηγεί στη βασική επίπτωση, τη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών τόσο μεταξύ ζώων όσο και μεταξύ ζώων και ανθρώπων (Paury, Delatte, Bagny, Corbel, & Fontenille, 2009).

Πιο συγκεκριμένα, το κουνούπι μπορεί να μεταδώσει αρβοϊούς (arboviruses = arthropod-borne viruses), δηλαδή ιούς που μεταδίδονται μέσω των αρthropόδων. Έχει αποδειχθεί ότι αυτό το κουνούπι έχει την ικανότητα να μεταδώσει τουλάχιστον 26 αρβοϊούς (Paury et al., 2009). Σημαντικότεροι εξ αυτών είναι ο ιός του Δάγκειου πυρετού (DENV), ο ιός του κίτρινου πυρετού (YFV), ο ιός chikungunya (CHIKV) και ο ιός Zika, ο ιός της 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) (Paury et al., 2009). Αν και το *Ae. albopictus* δεν θεωρείται τόσο σημαντικός φορέας του Δάγκειου πυρετού (DENV) όσο το *Ae. aegypti*, αποτέλεσε αποκλειστικό ή επικρατή φορέα του ιού σε πρόσφατες εκδηλώσεις του Δάγκειου πυρετού στη Χαβάη, στη κεντρική Αφρική και τη Νότια Ασία, αλλά και στην Ευρώπη (Bonizzoni, Gasperi, Chen, & James, 2013; Paury et al., 2009).

Συμπερασματικά, η ικανότητα του *Ae. albopictus* να μεταδίδει μεγάλη γκάμα αρβοϊών σε συνδυασμό με την τεράστια εξάπλωση του είναι αυτό που προκαλεί μεγαλύτερη ανησυχία στην Διεθνή Κοινότητα και κάνει την σημασία του ελέγχου του πληθυσμού αυτού του εντόμου επιτακτική (Bonizzoni et al., 2013).

1.1.4. Βιολογικός κύκλος

Θα λέγαμε ότι 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 (Kauffman & Kramer, 2017). **Ολομετάβολο** χαρακτηρίζεται ένα έντομο το οποίο σε κάθε στάδιο της ζωής του έχει τελείως διαφορετική μορφή, διαφορετικά όργανα και ακόμα μπορεί να έχει και διαφορετικά μέρη διαβίωσης σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο της ζωής του. Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού *Aedes* ολοκληρώνεται από τέσσερα στάδια ανάπτυξης: το αυγό, τη προνύμφη, τη νύμφη και το ενήλικο έντομο. Τα στάδια της ζωής του *Ae. albopictus* αναλυτικότερα είναι τα εξής:

i. Αυγό (Egg). Τα ωά του *Ae. albopictus* είναι μικρά, επιμήκη με μέσο μήκος στα 0,5mm και συνήθως λευκά κατά την στιγμή της ωοαπόθεσης, ενώ αργότερα γίνονται μελανά. Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους μετά από τη σύζευξή τους με ένα αρσενικό έντομο και αφού πρώτα έχει γίνει άντληση αίματος. Το κάθε

Θηλυκό έντομο μπορεί να ωοαποθέσει από 50-120 αυγά μετά από κάθε σύζευξη και από 350-800 αυγά κατά την διάρκεια της ζωής του.

Ως επί το πλείστον, τα θηλυκά άτομα τείνουν να ωοαποθέτουν τα αυγά τους ένα-ένα χωριστά πάνω σε επιφάνειες υγρές ή κοντά σε περιοχές με υγρασία (Gao et al., 2019). Ακόμα και 30ml νερού είναι αρκετά έτσι ώστε να ωοαποθέσει ένα θηλυκό έντομο *Aedes albopictus*.

Μετά από μερικές μέρες και αφού τα αυγά βρίσκονται σε κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, γίνεται η εκκόλαψη και η έκδυση (hatching) τους σε προνύμφες (Lopez et al., 2019). Κάτι όμως επίσης σημαντικό που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι τα αυγά του *Ae. albopictus* μπορούν να διατηρηθούν σε συνθήκες ξηρασίας ακόμα και 243 ημέρες, κάτι που κάνει την αντιμετώπιση αυτού του είδους ακόμα δυσκολότερη.

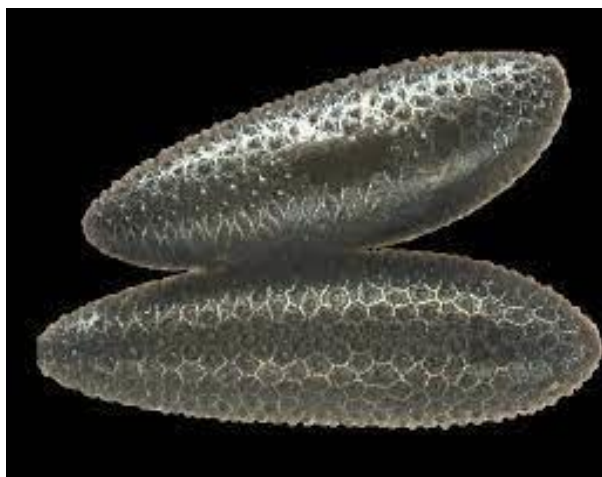


Fig.5 Αυγά του *Aedes albopictus*

ii. **Προνύμφη (Larva).** Ανεξάρτητα από την θέση που έχουν τοποθετηθεί τα αυγά, οι προνύμφες είναι πάντα υδρόβιες. Έχουν την μορφή σκώληκα και διαθέτουν τρία διακριτά τμήματα: Το κεφάλι, τον θώρακα και την κοιλιά. Στην άκρη του κοιλιακού τμήματος η προνύμφη διαθέτει δύο αναπνευστικούς ρύγχους έτσι ώστε να αναπνέει όταν αναβαίνει στην επιφάνεια του νερού. Το στάδιο αυτό χωρίζεται σε τέσσερα επιμέρους στάδια (L1-L4), λόγω της συνεχούς ανάπτυξης του οργανισμού κατά αυτό το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Βασική διατροφή σε αυτό το στάδιο

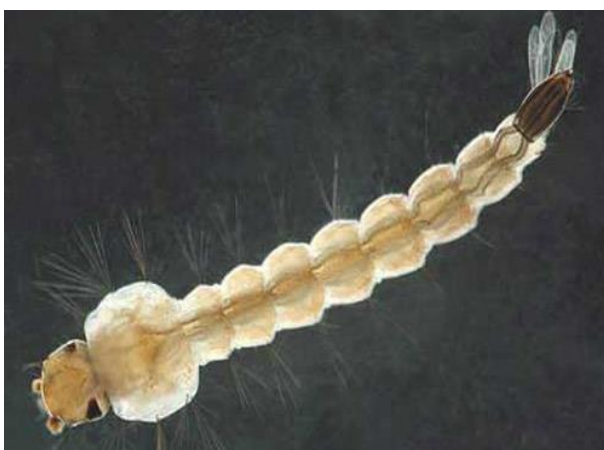


Fig.6 Προνύμφη του *Aedes albopictus*

του εντόμου αποτελούν τα βακτήρια και οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν μέσα στο νερό που διαβιούν. Το στάδιο της προνύμφης ιδανικά διαρκεί περίπου επτά ημέρες, αλλά όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι δυσμενείς, υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή η θερμοκρασία είναι χαμηλή, τότε το στάδιο αυτό μπορεί να καθυστερήσει (Lopez et al., 2019)

iii. **Νύμφη (Pupa).** Μετά το τελευταίο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης (L4) το κουνούπι εκδύεται στο στάδιο της νύμφης. Τα έντομα σε αυτό το στάδιο μοιάζουν με κόμμα και ζουν μόνο μέσα στο νερό. Αποκτούν ένα μελανό ή σκούρο καφέ χρώμα και κινούνται πολύ έντονα. Το ενδιαφέρον είναι ότι σε αυτό το στάδιο το έντομο σταματά να τρέφεται αλλά συνεχίζει να ανεβαίνει τακτικά στην επιφάνεια του νερού για να αναπνέει. Το στάδιο της νύμφης είναι αυτό που το έντομο αρχίζει

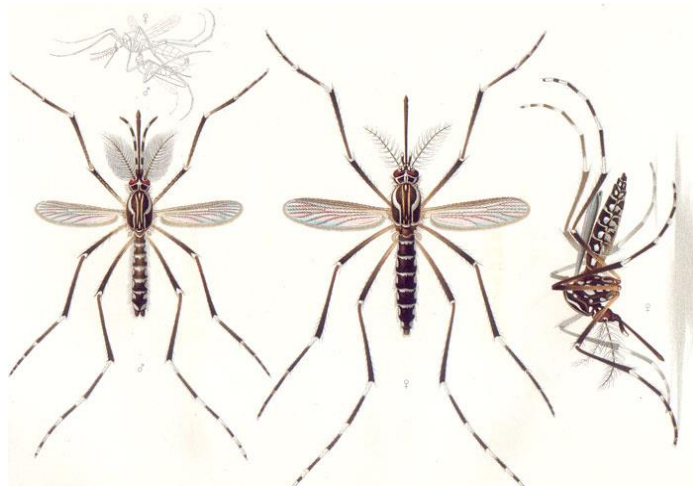
να διαμορφώνει τα τελικά του όργανα και να παίρνει την ενήλικη μορφή του. Ήδη απ' αυτό το στάδιο, είναι διακριτό το αυξημένο μέγεθος των θηλυκών ατόμων σε σύγκριση με αυτό των αρσενικών.

Όταν έρθει η στιγμή της έκδυσης, η θωρακική κοιλότητα του εντόμου σκίζεται και από μέσα του βγαίνει το ενήλικο πλέον έντομο που έχει την ιδιότητα να στέκεται πάνω στην επιφάνεια του νερού. Η διαδικασία μετατροπής του οργανισμού από νύμφη σε ενήλικο διαρκεί περίπου τρεις ημέρες, κάτι που όμως εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και του νερού (Lopez et al., 2019).



Fig.7 Νύμφη του *Aedes albopictus*

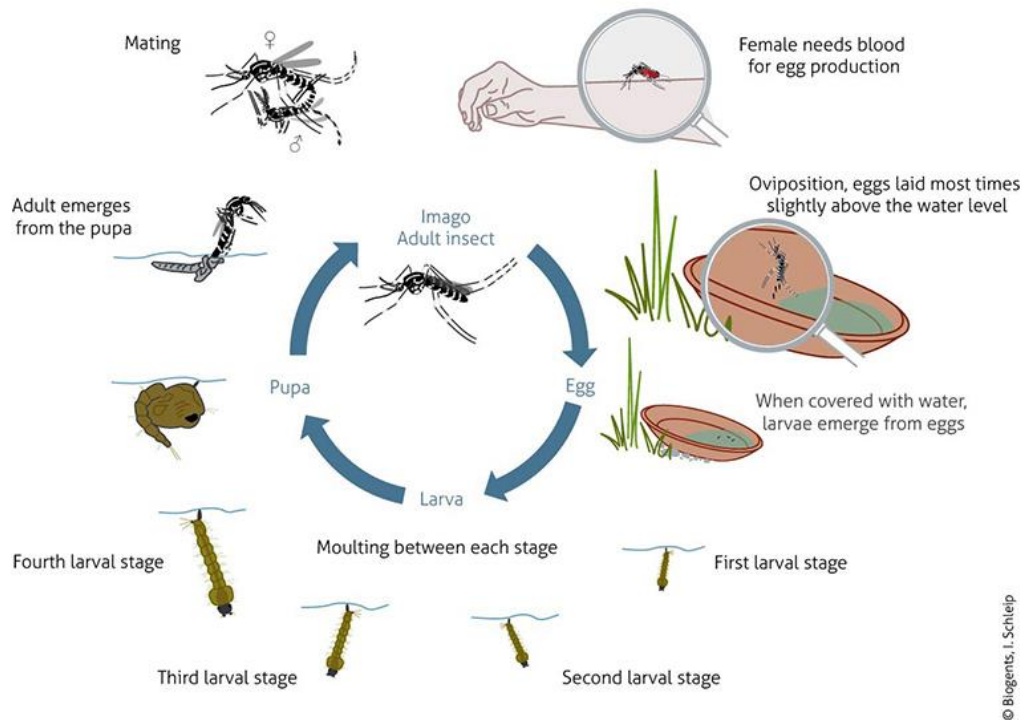
iv. Ενήλικο άτομο (Adult). Τα τέλεια έντομα είναι μικρά με μήκος 3-6 χιλιοστά και μεγάλους σύνθετους οφθαλμούς. Οι κεραίες των αρσενικών είναι πιο πυκνές και μεγάλες σε σύγκριση με αυτές των θηλυκών ατόμων και ενεργοποιούνται από τον ήχο που δημιουργούν οι κινήσεις των φτερών των θηλυκών ατόμων. Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι ότι τα αρσενικά άτομα είναι 20% μικρότερα από τα θηλυκά. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι παρατηρείται το φαινόμενο της **πρωτανδρίας**. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με το ότι τα αρσενικά κουνούπια εκδύονται πρώτα και έτσι δεν λαμβάνουν την ίδια ποσότητα τροφής με τα θηλυκά τα οποία παραμένουν περισσότερες μέρες στο στάδιο της προνύμφης. Η πρωτανδρία όμως έχει λογική στην εντομολογία, διότι ευνοεί την πιθανότητα των



αρσενικών ατόμων να ζευγαρώσουν ενώ μειώνει τον προ-αναπαραγωγικό χρόνο των θηλυκών (Bellini, Puggioli, Balestrino, Carrieri, & Urbanelli, 2018). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η διάρκεια ζωής των θηλυκών εντόμων σε αυτό το στάδιο είναι 1-2 μήνες ενώ των αρσενικών, μετά το ζευγάρωμα, λίγες ακόμα μέρες (Lopez et al., 2019).

Fig.8 Αριστερά το αρσενικό και δεξιά το θηλυκό ενήλικο (κάτοψη και προφίλ) έντομο *Aedes albopictus*

Στο σκίτσο που ακολουθεί μπορούμε να δούμε τον κύκλο ζωής του *Ae. albopictus* και κάποια από τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά.



© Biogenets, I. Schelep

Fig.9 Τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του *Aedes albopictus* ξεκινώντας από αυγό, προνύμφη, 4 στάδια νύμφης και τελικά το ενήλικο στάδιο.

1.1.5. Μορφολογία του θηλυκού ατόμου

Τα θηλυκά έντομα του κουνουπιού *Ae.albopictus* διαθέτουν δυο συμμετρικά διατεταγμένες ωθήκες που βρίσκονται στην κοιλιακή χώρα του σώματος του εντόμου, παράλληλα με τον πεπτικό σωλήνα. Η κάθε ωθήκη περιλαμβάνει περίπου 100 ωάρια που αποτελούνται από πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια και ένα germanium (ζώνη πολλαπλασιασμού) (Isoe et al., 2019). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων και ο σχηματισμός κελύφους στα αυγά καθορίζονται αυστηρά από την λήψη γεύματος αίματος. Η βιταλλογενίνη, η οποία είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται στον κρόκο των αυγών του εντόμου, συσσωρεύεται μόνο μετά από το γεύμα αίματος.

Ανάλογα με την διατροφική κατάσταση του κουνουπιού και το αναπτυξιακό στάδιο του κύκλου της βιταλλογένεσης, μια παρτίδα αυγών μπορεί να είναι έτοιμη για ωοαπόθεση 72 ώρες μετά την λήψη γεύματος αίματος (Clifton & Noriega, 2012). Τα αυγά σε αυτό το στάδιο είναι συμπαγή και έχουν λευκό χρωματισμό. Όταν έρθει η στιγμή της ωοαπόθεσης, από την σπερματοθήκη εξέρχεται σπέρμα το οποίο έχει αποθηκεύσει το θηλυκό έντομο κατά την διάρκεια της σύζευξης και έρχεται σε επαφή με το ωό, το οποίο τελικώς γονιμοποιείται. Αν έχει προηγηθεί γεύμα αίματος τότε τα ωά θα είναι γόνιμα. Αν όμως δεν έχει προηγηθεί σύζευξη ενώ το θηλυκό έντομο έχει λάβει γεύμα αίματος, τότε τα ωά που θα εναποθέσει δεν θα δώσουν βιώσιμους απογόνους.

1.2. Βιταλλογένεση

Όταν ένα θηλυκό έντομο *Ae. albopictus* αντλήσει αίμα από ένας ξενιστή, μια σειρά από γεγονότα λαμβάνουν χώρα σε διάφορους ιστούς του κουνουπιού. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται βιταλλογένεση και εγείρει ουσιαστικά την σύνθεση και έκκριση σε μεγάλη κλίμακα πρόδρομων πρωτεϊνών της λεκίθου του κρόκου (yolk protein precursors, YPP) στο λιπώδες σώμα του εντόμου και την ακόλουθη συσσώρευσή τους από τα ωκύτταρα ενώ αυτά αναπτύσσονται (Attardo et al., 2005). Ως αποτέλεσμα της βιταλλογένεσης έχουμε την πλήρη διαμόρφωση των ωθηκών στα θηλυκά έντομα καθώς και την επερχόμενη ωοαπόθεση.

Το λιπώδες σώμα του εντόμου είναι λειτουργικά ανάλογο με το ήπαρ και τον λιπώδη ιστό των σπονδυλωτών ζώων σε συνδυασμό. Τα τροφοκύτταρα είναι τα λιποκύτταρα του σώματος που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των YPP στα κουνούπια. Τα κύρια γονίδια που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της βιταλλογένεσης είναι η βιταλλογενίνη (Vg), η βιταλλογενής καρβοξυπεπτιδάση (Vcpr), η βιταλλογόνος καθεψίνη Β (Vcb) και η λιποφορίνη (Lp). Από αυτά τα γονίδια, η βιταλλογενίνη (Vg) είναι το πιο εκφρασμένο και σημαντικό.

Η βιταλλογένεση χωρίζεται σε τρία κύρια στάδια: την προβιταλλογενή φάση, την βιταλλογενή φάση και την μεταβιταλλογενή φάση (Attardo et al., 2005):

i. Η προβιταλλογενή φάση είναι αυτή κατά την οποία γίνεται η προετοιμασία για την σύνθεση πρόδρομων πρωτεϊνών της λεκίθου (YPP) στο λιπόσωμα (Raikhel & Dhadialla, 1992). Το λιπόσωμα αλλάζει από την στιγμή που το άτομο από νύμφη μετατραπεί σε ενήλικο και αλλάζει έτσι ώστε να γίνει δεκτικό σε σήματα που αφορούν τη βιταλλογένεση (Attardo et al., 2005).

Σημαντικό ρόλο καθ' όλη την διαδικασία αυτή παίζει η **νεανική ορμόνη III** (juvenile hormone, JH), η οποία εκκρίνεται από τον εγκέφαλο και συντονίζει την ωρίμανση πολλών ιστών, μεταξύ αυτών του λιποσώματος και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Attardo et al., 2005; Raikhel et al., 2002; Shaw, Attardo, Aksoy, & Catteruccia, 2015). Τα επίπεδα της JH αυξάνονται και κορυφώνονται τις 2 πρώτες ημέρες της ενήλικης ζωής, αλλά 60 ώρες μετά την απελευθέρωση του ενήλικου, το κουνούπι εισέρχεται σε μία φάση ανάπαυσης, ωστόσο γίνεται το πρώτο γεύμα αίματος (Clifton & Noriega, 2012; Raikhel et al., 2002). Η έλλειψη αμινοξέων στην αιμολέμφο πριν το γεύμα αίματος, εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου της βιταλλογενίνης (Vg) στο λιπόσωμα (Attardo et al., 2005).

ii. Η βιταλλογενής φάση ξεκινάει με το γεύμα αίματος και στην οποία έχουμε μια απότομη μείωση στα επίπεδα της JH (Attardo et al., 2005; Clifton & Noriega, 2012). 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 ωθηκών (ovarian ecdysiotropic hormone, OEH), ωθώντας έτσι τις ωθήκες να εκκρίνουν την στεροειδή ορμόνη εκδυσόνη, η οποία ακολούθως υδροξυλιώνεται σε 20E (20-hydroxyecdysone) (Attardo et al., 2005; Shaw et al., 2015). Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται η μεταγραφή των YPP, όπως η βιταλλογενίνη και η λιποφορίνη, οι οποίες οδηγούνται μέσω της αιμολέμφου στις ωθήκες (Shaw et al., 2015). Παράλληλα, η παραγωγή YPP ενεργοποιείται επιπλέον από τα επίπεδα εξωκυτταρικών αμινοξέων που προκύπτουν από τον μεταβολισμό του αίματος (Shaw et al., 2015). Η βιταλλογενίνη, 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 (Attardo et al., 2005; Raikhel et al., 2002).

iii. Η μεταβιταλλογενή φάση είναι αυτή κατά την οποία η σύνθεση των ΥΡΡ στο λιπόσωμα καταστέλλεται, κυρίως λόγω της μείωσης των επιπέδων του 20E κατά το τέλος του γονοτροφικού κύκλου (Attardo et al., 2005; Raikhel et al., 2002). Το 20E φαίνεται να αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της βιταλλογένεσης, αλλά μόνο του δεν αρκεί για να ενεργοποιήσει τη διαδικασία της αυτή (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., 2015).

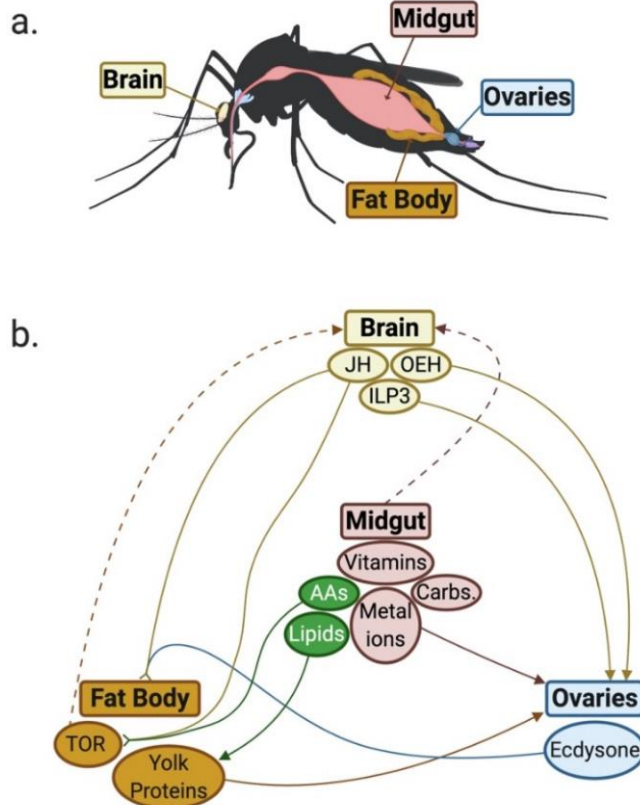


Fig.10 Διάγραμμα απεικόνισης της διαδικασίας της βιτελλογένεσης μετά το γεύμα αίματος σε μη αυτογενή κουνούπια.

1.2.1. Αυτογονία

Όταν μιλάμε για αυτογενή έντομα αναφερόμαστε σε έντομα που έχουν την δυνατότητα να ξεκινήσουν τον γονοτροφικό τους κύκλο χωρίς την ανάγκη απόκτησης των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών μέσω της διατροφής τους και χωρίς την λήψη αίματος (Attardo et al., 2005; Mori, Romero-Severson, Black, & Severson, 2008; Santos et al., 2002). Τα έντομα που δεν μπορούν να ξεκινήσουν τον γονοτροφικό τους κύκλο χωρίς την λήψη γεύματος αίματος ονομάζονται “μη αυτογενή”. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που κουνούπια δεν χρειάζονται το γεύμα αίματος για την πρώτη φορά που θα παράγουν και θα αποθέτουν αυγά, αλλά για τις επόμενες παραγωγές πρέπει απαραίτητως να λάβουν ένα γεύμα αίματος (Gulia-Nuss, Elliot, Brown, & Strand, 2015).

Το *Aedes albopictus* είναι ένα έντομο το οποίο έχει πολύ χαμηλά ποσοστά αυτογονίας (Mori et al., 2008). Τα μη αυτογενή θηλυκά έντομα πρέπει να αντλούν συνεχώς αίμα έτσι ώστε να μπορέσουν να αναπαραχθούν. Αν δεν υπάρχει διαθέσιμη τροφή επενδύουν την ενέργεια που έχουν σε σωματική αντί για αναπαραγωγική (Dittmer, Alafndi, & Gabrieli, 2019; Mori et al., 2008). Το ότι το *Ae. albopictus* είναι ένα **μη αυτογενές** είδος εντόμου το καθιστά αυτόματα πολύ σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία.

1.3. Τρόποι αντιμετώπισης

Το κύριο πρόβλημα που συναντάμε στην αντιμετώπιση των κουνουπιών του γένους *Aedes* είναι ότι δεν έχουν βρεθεί ακόμα κάποια εμβόλια ή ίσως φάρμακα έτσι ώστε να καταπολεμηθούν οι αρμιοϊοί (arboviruses). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης τους αυτή την στιγμή είναι ο έλεγχος του πληθυσμού των κουνουπιών καθώς και η λήψη προστατευτικών μέτρων μετάδοσης των ιών αυτών (Paupy, Delatte, Bagny, Corbel, & Fontenille, 2009). Το γεγονός αυτό καθιστά την γονιδιακή ανάλυση του *Aedes albopictus* μείζονος σημασίας. Μέσω της κατανόησης του γονιδιώματος του κουνουπιού, θα γίνει πιο εύκολη η δημιουργία ειδοειδικών φαρμάκων που θα βοηθήσουν στην μείωση του πληθυσμού τους καθώς και στην μείωση των ασθενειών που μεταδίδουν.

1.3.1. Κλασικοί μέθοδοι

1.3.1.1. Αντιμετώπιση προνυμφών με φυσικά μέσα

Ο πρώτος τρόπος αντιμετώπισης των προνυμφών είναι ο περιορισμός των εστιών ανάπτυξης τους. Η καταστροφή των εστιών βοηθάει στην μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού καθώς και στην μείωση του αριθμού του πληθυσμού τους. Για να εφαρμοστεί σωστά αυτό το μέτρο πρόληψης θα πρέπει να γίνει λεπτομερής ενημέρωση των πολιτών και να υπάρξει επαρκής χρηματοδότηση από την Πολιτεία στους φορείς της τοπικής αυτοδιοίκησης όπως είναι οι Δήμοι και οι Περιφέρειες (Koliopoulos et al., 2008).

Βασικές τεχνικές πρόληψης εκ μέρους της Πολιτείας είναι ο καθαρισμός των ποταμών, των αρδευτικών και αποστραγγιστικών αυλάκων, των ελών και των λιμνών από την βλάστηση που υπάρχει. Εκ μέρους των Πολιτών, οι προληπτικές τεχνικές θα πρέπει να περιλαμβάνουν αποστράγγιση βουλωμένων φρεατίων και αγωγών, κλείσιμο κοιλοτήτων στο έδαφος ή σε δένδρα καθώς και απόσυρση παλιών ελαστικών αυτοκινήτων ή συσκευών στις οποίες λιμνάζουν ύδατα.

Δεύτερος τρόπος αντιμετώπισης των κουνουπιών είναι η χρήση οργανισμών που δρουν ως αρπακτικά σε κάποιο από τα στάδια της ζωής του κουνουπιού. Μέχρι στιγμής τα μόνα παθογόνα που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση των κουνουπιών είναι ο βάκιλος *Bacillus sphaericus* και ο *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Τα σπόρια του βακίλου παράγουν τοξίνες που όταν καταναλωθούν από τις προνύμφες των κουνουπιών προκαλούν προβλήματα στο πεπτικό τους σύστημα. Υπάρχουν στο εμπόριο ετοιμόχρηστα σκευάσματα του βακίλου αλλά έχουν μικρή υπολειμματική δράση και μεγάλο κόστος κάτι που κάνει τους καταναλωτές να μην το προτιμούν ως μέσω καταπολέμησης.

Σημαντικό επίσης είναι να γνωρίζουμε ότι η αντιμετώπιση των προνυμφών μπορεί να γίνει και με την ένταξη διαφόρων ειδών προνυμφοφάγων ψαριών σε φυσικές υδάτινες εστίες όπως το είδος *Gambusia affinis*. Αυτά τα είδη ψαριών κινούνται κοντά στην επιφάνεια του νερού και θηρεύουν εύκολα τις προνύμφες. Για να επιτευχθεί όμως αυτό θα πρέπει να μην υπάρχει πυκνή βλάστηση έτσι ώστε να μην εμποδίζεται η κίνηση του ψαριού (Weeratunga, Rodrigo, Fernando, & Rajapakse, 2017).

1.3.1.2. Αντιμετώπιση προνυμφών με χημικά μέσα

Ένας από τους πιο κλασσικούς τρόπους αντιμετώπισης των προνυμφών είναι με την χρήση Βιοκτόνων - Εντομοκτόνων Υγειονομικής Σημασίας. Κάποια από αυτά έχουν σαν δραστική ουσία το spinosad (ουσία φυσικής προέλευσης), το diflubenzuron (αναστολέας παραγωγής της χιτίνης) και το s-methoprene (μιμητής ορμόνης νεότητας JH). Οι παραπάνω ουσίες είναι εκλεκτικές, δρουν μόνο στο προνυμφιακό στάδιο των κουνουπιών και εφαρμόζονται με ψεκασμό υψηλής πίεσης. Σε περιοχές με μεγάλες εστίες ανάπτυξης κουνουπιών είναι δυνατή και η εφαρμογή βιοκτόνων από αέρος με την χρήση ελικοπτέρων ή αεροπλάνων χαμηλής πτήσης, κάτι που οι ανεπτυγμένες χώρες έχουν περιορίσει ή απαγορεύσει γιατί υπάρχει μεγάλος προβληματισμός για την δημόσια υγεία (Koliopoulos et al., 2008).

1.3.1.3. Μηχανικά μέσα αντιμετώπισης τέλειων εντόμων

Τα μηχανικά μέσα αντιμετώπισης των τέλειων κουνουπιών δεν περιορίζουν τον αριθμό των κουνουπιών αλλά βοηθούν στην προστασία των ανθρώπων και των ζώων που ζουν σε περιοχές με μεγάλο πληθυσμό κουνουπιών. Βασικό παράδειγμα είναι η εφαρμογές ψιλών πλεγμάτων (σήτες) σε εισόδους σπιτιών (πόρτες, παράθυρα, τρύπες) καθώς και η χρήση κουνουπιέρας γύρω από κρεβάτια. Επίσης, μπορεί να γίνει χρήση διαφόρων ηλεκτρικών συσκευών εξόντωσης ή παγίδευσης εντόμων που κυκλοφορούν στο εμπόριο. Αυτές οι συσκευές συνήθως εκλύουν CO₂ ή άλλες χημικές ενώσεις ως προσελκυστικό μέσω ενώ ακόμα μπορεί να διαθέτουν και κάποια πηγή φωτός. Το βασικό μειονέκτημα βεβαίως είναι ότι ενώ αυτά τα μέσα έχουν πολλές εφαρμογές δεν περιορίζουν σημαντικά τον αριθμό των κουνουπιών.

1.3.1.4. Βιολογικά μέσα αντιμετώπισης τέλειων εντόμων

Στην φύση υπάρχουν πολλά ζώα που αποτελούν φυσικό εχθρό των κουνουπιών, από αρπακτικά αρθρόποδα (αράχνες κλπ.) έως αμφίβια (πχ. βάτραχοι), ερπετά (είδη σαυρών), πτηνά (πχ. χελιδόνια) και θηλαστικά (πχ. νυχτερίδες). Δυστυχώς κανένα από τα παραπάνω δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τον μεγάλο όγκο των κουνουπιών σε πρακτικό επίπεδο, κάτι που μας εμποδίζει στο να το χρησιμοποιήσουμε ως μέσω αντιμετώπισης του προβλήματος σε ευρεία κλίμακα. Καλό όμως είναι να το γνωρίζουμε έτσι ώστε σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα για την προστασία αυτών των ειδών (Koliopoulos et al., 2008).

1.3.1.5. Υπολειμματικοί ψεκασμοί επιφανειών

Στα μέσα τις δεκαετίας του 1940 είχε αρχίσει η συστηματική εφαρμογή εντομοκτόνων γενικής χρήσης για την αντιμετώπιση των εχθρών της αγροτικής παραγωγής. Ένα από αυτά ήταν και το Διχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο (DDT).

Το DDT αξιοποιήθηκε τις προηγούμενες δεκαετίες και εξασφάλισε την εξάλειψη του *Ae.aegypti* σε 19 χώρες (Weeratunga et al., 2017). Με την χρήση του πολλοί άνθρωποι σώθηκαν από την ελονοσία και τον τύφο. Η χρήση του DDT όμως εξόντωνε και πολλά είδη πτηνών, θηλαστικών βακτηρίων και ιών. Επίσης, μετά από μελέτες αποδείχθηκε ότι είναι καρκινογόνο και έχει μεγάλη υπολειμματική δράση, κάτι που έκανε αυτό το σκεύασμα να απαγορευτεί σε πολλές χώρες του ανεπτυγμένου κόσμου.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί από τις εταιρίες γεωργικών φαρμάκων βιοκτόνα- εντομοκτόνα υγειονομικής σημασίας των οποίων η εφαρμογή γίνεται σε επιφάνειες. Κατά κύριο λόγο ο ψεκάσμος πρέπει να λαμβάνει χώρα στους τοίχους κτισμάτων, σε πρασινάδες που περιτριγυρίζουν τα κτίσματα αυτά, καθώς επίσης και στον χλοοτάπητα. Βιοκτόνα που έχουν έγκριση για κυκλοφορία στην Ελλάδα είναι όσα περιέχουν σαν δραστική ουσία τις: permethrin, lambda cyhalothrin, tetramethrin, cypermethrin, alphacypermethrin, deltamethrin, cyfluthrin, bifenthrin, bendiocarb, etofenprox (Koliopoulos et al., 2008).



Fig.12 Πυρεθροειδές εντομοκτόνο γενικής χρήσης

1.3.1.6. Χρήση εντομοαπωθητικών σκευασμάτων

Στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφορα σκευάσματα τα οποία διοχετεύουν στον αέρα πτητικές ουσίες που έχουν σαν στόχο την απώθηση των ενήλικων κουνουπιών. Τα σκευάσματα αυτά έχουν σαν κύριο συστατικό τις φυσικές ή συνθετικές πυρεθρίνες και έχουν συνήθως 4 μορφές:

- Α. Καπνογόνες σπείρες (φιδάκια) ή χαρτάκια,
- Β. Ηλεκτροθερμαινόμενα πλακίδια (ταμπλέτες),
- Γ. Υγρά εντομοαπωθητικά χώρου,
- Δ. Εντομοαπωθητικά επαφής.

Οι καπνογόνες σπείρες χρησιμοποιούνται συνήθως σε εξωτερικούς χώρους ενώ τα ηλεκτροθερμαινόμενα πλακίδια και τα υγρά χρησιμοποιούνται κυρίως σε εσωτερικούς χώρους. Η δραστική τους ουσία απελευθερώνεται έπειτα από θέρμανση και η δράση τους διαρκεί όσο η καύση τους, δηλαδή 6-8 ώρες.

Τα εντομοαπωθητικά επαφής εφαρμόζονται απευθείας στο δέρμα ή και πάνω στα ρούχα και σαν στόχο έχουν την απώθηση των κουνουπιών. Ένα επίσης θετικό είναι ότι αυτά τα σκευάσματα απωθούν εκτός από τα κουνούπια και άλλα έντομα όπως τις σκνίπες, τους ψύλλους, τα τσιμπούρια, τις αιμομυζητικές μύγες κ.α. Κυκλοφορούν σε μορφή σπρέι ή βραχιολιού και έχουν σαν βάση ενώσεις όπως το DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide), το icaridin, το IR3535 (Ethyl Butylacetylaminopropionate) καθώς και τα τερπένια Geraniol και Citriodiol (Koliopoulos et al., 2008).

Στην Ελλάδα υπάρχουν πολλές διαφορετικές μάρκες που διοχετεύουν τα σκευάσματα αυτά στο εμπόριο, όμως το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και

Τροφίμων δεν έχει ελέγξει το κατά πόσο η χρήση τους είναι ασφαλής για τον καταναλωτή και έτσι δεν μπορεί να αποτελέσει μια μακροχρόνια λύση στο πρόβλημα της αντιμετώπισης των κουνουπιών.

1.3.2. Σύγχρονοι μέθοδοι

1.3.2.1. Μέθοδοι αντικατάστασης πληθυσμού

Η **τεχνική των στειρών εντόμων** (Sterile Insect Techniques-SIT) χρησιμοποιείται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια σε έντομα που απειλούν την κτηνοτροφία (*Cochliomyia hominivorax*), την αγροτική παραγωγή (μύγα της μεσογείου) και την δημόσια υγεία (μύγα τσε-τσε, κουνούπια). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παραγωγή στο εργαστήριο αρσενικών στειρών εντόμων τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον έτσι ώστε να συζευχθούν με θηλυκά έντομα αγρίου τύπου. Η στειρωση επέρχεται μετά από έκθεση των αρσενικών εντόμων σε ακτινοβολία ή στειρογόνες χημικές ενώσεις κάτι που προκαλεί χρωμοσωμικές αλλοιώσεις ή θανατηφόρες μεταλλάξεις στο σπέρμα τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα θηλυκά που έρχονται σε σύζευξη με τα εν λόγω αρσενικά να γεννούν μη βιώσιμους απογόνους ή να αποβάλλουν. Αν γίνονται κατά τακτά χρονικά διαστήματα απελευθερώσεις τέτοιων εντόμων, σταδιακά ο αριθμός των εντόμων αυτών με τις γενιές θα ελαττωθεί ή ακόμα και θα εξαλειφθεί.

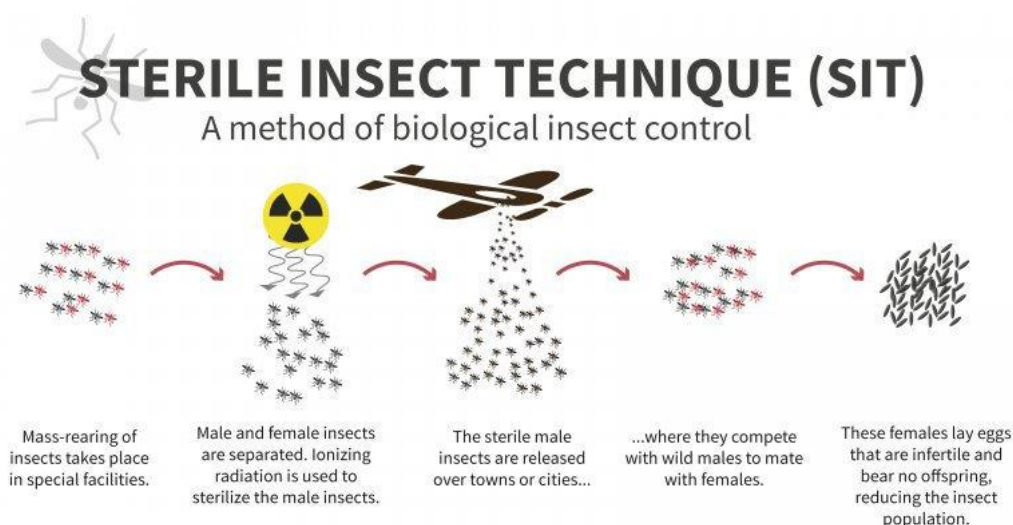


Fig. 14 Διαδικασία στειρώσης με την χρήση ραδιενέργειας (SIT) σε κουνούπια

Το μεγαλύτερο πρόβλημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η στειρωση θα πρέπει να γίνεται έτσι ώστε τα στειρωμένα αρσενικά έντομα να είναι το ίδιο ανταγωνιστικά με τα αρσενικά αγρίου τύπου, να μην τους προκαλείται κάποια βλάβη που έχει να κάνει με την ανάπτυξη, την ικανότητα πτήσης ή την πρόωρη θνησιμότητα τους και έτσι να προτιμώνται από τα θηλυκά αγρίου τύπου (Reisen, 2003). Βέβαια τα τελευταία χρόνια γίνονται πολλές έρευνες πάνω στο θέμα αυτό και έχει βρεθεί ότι η ρύθμιση της ακτινοβολίας μπορεί να προκαλέσει στειρωση στα έντομα χωρίς να επηρεάσει την ανταγωνιστικότητά τους (Bellini et al., 2013).

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης του πληθυσμού των κουνουπιών του γένους *Aedes* είναι με την χρήση του βακτηρίου **Wolbachia**. Το βακτήριο αυτό προσβάλλει με φυσικό τρόπο πολλά είδη εντόμων και κληρονομείται στους απογόνους από την μολυσμένη μητέρα. 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 αποδειχθεί με επιτυχία στην περίπτωση του *Ae. albopictus* και του ιού του Δάγκειου πυρετού (DENV) (Ahmad, Vythilingam, Lim, Zabari, & Lee, 2017).

1.3.2.2. Μέθοδοι βασισμένες στη γενετική

Επειδή όλες οι παραπάνω μέθοδοι δεν είναι αρκετές για να αντιμετωπίσουν επαρκώς το πρόβλημα των κουνουπιών, οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στο να αξιοποιήσουν τεχνικές που είναι βασισμένες στη γενετική.

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).

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). Σύμφωνα με αυτή την τεχνική αρσενικά έντομα ομόζυγα προς ένα θνησιγόνο γονίδιο απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Οι απόγονοι τους θα είναι ετερόζυγοι στο θνησιγόνο γονίδιο και έτσι οι θηλυκοί απόγονοι θα θανατώνονται στο στάδιο της προνύμφης ενώ οι αρσενικοί θα μεταφέρουν το θνησιγόνο γονίδιο στους μισούς θηλυκούς απογόνους.

Τέλος, το σύστημα **CRISPR/Cas9** έχει αξιοποιηθεί με στόχο την αλλαγή ή απομάκρυνση γονιδίων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την αναπαραγωγή των κουνουπιών (Kandul, Liu, Wu, Marshall, & Akbari, 2019). Αυτή όμως η τεχνική έγειρε πολλά βιοηθικά ζητήματα λόγω της αλλοίωσης της φυσικής κατάστασης των ατόμων. Επίσης δεν έχουν εξεταστεί ακόμα οι εκτός-στόχου επιδράσεις που μπορεί να έχει (Faraji & Unlu, 2016; Organization, 2017).

Μία μέθοδος που φαίνεται να υπερτερεί συγκριτικά με τις προαναφερθείσες 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).

1.3.3. Μηχανισμός αποσιώπησης RNAi

Πριν την ανακάλυψη του “παρεμβατικού RNA” (RNAi) ερευνητές που δούλευαν πάνω σε διαγονιδιακά φυτά παρατήρησαν ότι το αντισημιαίνον RNA (antisense RNA) παρεμπόδιζε την γονιδιακή έκφραση στα φυτά αυτά. Το 1998 οι Andrew Z. Fire και Craig C. Mello μελέτησαν μια πρωτεΐνη στον σκώληκα *Ceanorhabditis elegans* και

ανακάλυψαν ότι κάνοντας ενέσεις στους οργανισμούς αυτούς με δίκλωνο RNA (dsRNA), επιτύγχαναν την σίγηση ενός γονιδίου-στόχου. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων ανακάλυψαν ότι οι ενέσεις με δίκλωνο RNA (dsRNA) ήταν 10 φορές πιο αποτελεσματικές από αυτές με το μονόκλωνο RNA (ssRNA). Επίσης απέδειξαν ότι η γονιδιακή σίγηση δεν βασίζεται ούτε στο σημαίνον ούτε στο αντισημαίνον RNA, αλλά ενεργοποιείται από την παρουσία και των δύο κλώνων μορίων RNA (dsRNA) (Fire et al., 1998). Επομένως, από την ανακάλυψη της ως εξειδικευμένη ως προς την αλληλουχία σίγηση ενός γονιδίου-στόχου διαδικασία, χρησιμοποιείται στην έρευνα ως ένα **εργαλείο αντίστροφης γενετικής ανάλυσης** (Mamta & Rajam, 2017). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ελέγχουμε την σωστή λειτουργία ενός διαγονιδίου, δημιουργώντας μεταλλαγές in vitro και εισάγοντας αυτές ξανά στον οργανισμό, παρατηρούμε την όποια αλλαγή στο φαινότυπο μπορεί να υπάρξει.

Καλό είναι να τονιστεί ότι ο ρόλος του RNAi μέσα στο κύτταρο είναι να το προστατεύει από τα εξωγενώς εισερχόμενα δίκλιωνα μόρια RNA που προέρχονται από ιούς (κυρίως στα φυτά) και από τα ενδογενή δίκλιωνα μόρια RNA που προκύπτουν από μεταθετά στοιχεία, αλληλουχίες με ανάστροφες επαναλήψεις ή μεταγράφα και προκαλούν αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος (Agrawal et al., 2003). Επιπλέον, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση και στην οργάνωση των αναπτυξιακών διεργασιών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο είτε μέσω της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης είτε μέσω της αποικοδόμησης του mRNA (Abdurakhmonov, 2016).

1.3.3.1. Μηχανισμός δράσης RNAi

Ο γενικός μηχανισμός δράσης του RNAi λέει ότι όταν η ενδονουκλεάση DICER ανιχνεύσει ένα δίκλωνο μόριο RNA αυτό που κάνει είναι να το τεμαχίσει ώστε να προκύψουν μικρότερα μόρια 19-25 ζευγών βάσεων. Τα μικρά τμήματα αυτά τμήματα που προκύπτουν μετά από την επεξεργασία της DICER χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα: i) microRNAs (miRNAs), τα οποία προέρχονται από ενδογενή μεταγράφα και παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ii) τα βραχέα παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα οποία προκύπτουν από μόρια dsRNA και λειτουργούν ως άμυνα έναντι σε ιούς και μεταθετά στοιχεία (Scott et al., 2013)

Τα μικρότερα αυτά μόρια RNA δεσμεύονται στο σύμπλεγμα πρωτεϊνών RISC (RNA induced Silencing Complex) και χωρίζονται από την νοηματική τους αλληλουχία (Gregory, Chendrimada, Cooch, & Shiekhattar, 2005). Μόλις ανιχνευτεί συμπληρωματική αλληλουχία σε ένα mRNA, αυτό δεσμεύεται στο σύμπλεγμα RISC και το ένζυμο Argonaute2 (καταλυτική RNase συμπλέγματος), κόβει το σχηματισθέν δίκλωνο mRNA κάτι που αποτρέπει την παραγωγή της πρωτεΐνης που αυτό κωδικοποιούσε (Rand, Petersen, Du, & Wang, 2005).

Για την στοχευμένη αποσιώπηση γονιδίου υπάρχουν τρεις κύριες μέθοδοι. Η πρώτη είναι με την άμεση εισαγωγή siRNA μέσα στο κύτταρο μέσω μικροέγχυσης, ηλεκτροδιάτρησης ή αντίδρασης διαμόλυνσης. Η δεύτερη είναι μέσω της κατασκευής ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που όταν εκφραστεί στο κύτταρο θα οδηγήσει στην κωδικοποίηση ενός shRNA και η τρίτη είναι πάλι με εισαγωγή πλασμιδίου που θα κωδικοποιεί ένα shRNA-mir (Moffat & Sabatini, 2006).

Κάτι επίσης σημαντικό που ανακάλυψε ο Fire με τους συνεργάτες του στον οργανισμό *C. elegans* είναι ότι ο ακόμα και αν η ποσότητα dsRNA δεν είναι μεγάλη και ο μηχανισμός RNAi έχει ξεκινήσει από μια συγκεκριμένη θέση, μπορεί να εξαπλωθεί σε ολόκληρο τον οργανισμό. Αυτήν η εξάπλωση από κύτταρο σε κύτταρο και από ιστό σε ιστό προσφέρει « συστημική » σίγηση και το φαινόμενο πολλαπλασιασμού του μηνύματος αποσιώπησης σε αυτή την περίπτωση ονομάζεται « φαινόμενο εξάπλωσης RNAi » (transitive RNAi) (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 (Abdurakhmonov, 2016; Scott et al., 2013). Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η διατήρηση της αποσιώπησης από τη μια γενιά στην επομένη. Τα έντομα και τα σπονδυλωτά δεν διαθέτουν τις RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες και θεωρητικά δεν μπορούν να εμφανίσουν μεταβατική RNAi, εκτός από κάποιες εξαιρέσεις (Mamta & Rajam, 2017; Scott et al., 2013).

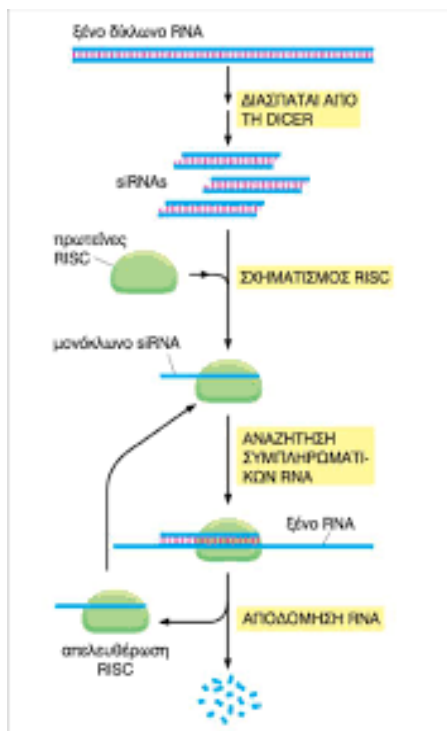


Fig. 16 Ο μηχανισμός RNAi και το μονοπάτι που ακολουθείται μέχρι το τελικό αποτέλεσμα την διάσπαση ή την αποικοδόμηση του mRNA και έτσι την καταστολή της μετάφρασης.

Η αξιοποίηση των νέων τεχνολογιών, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, έδωσε την δυνατότητα στόχευσης κωδικοποιητικών και μη-κωδικοποιητικών γονιδίων που υπάρχουν στα έντομα έτσι ώστε να αξιοποιηθούν στην καταπολέμηση τους. Το βασικότερο στοιχείο που πρέπει να διαθέτουν αυτά τα γονίδια είναι να εμπλέκονται σε κάποια βιολογική λειτουργία (αναπαραγωγή, ανάπτυξη, επιβίωση). Οι καθεψίνες είναι μια ενδιαφέρουσα κατηγορία γονιδίων που δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς όμως φαίνεται να εμπλέκονται σε βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα κουνούπια και θα αναλυθούν στην ενότητα 1.4.

1.4. Καθεψίνες

Οι πρωτεάσες ή πρωτεϊνάσες ή πεπτιδάσες είναι ένζυμα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά που έχουν την δυνατότητα να υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς και ευθύνονται για την πρωτεόλυση. Σύμφωνα με την δομή του ενεργού τους κέντρου διακρίνονται σε σερινοπρωτεάσες (καθεψίνη G), κυστεϊνοπρωτεάσες (καθεψίνη B, καθεψίνη L), ασπαριγινοπρωτεάσες (καθεψίνη D) και μεταλλοπρωτεάσες. Για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, τα λυσοσώματα (που υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα) περιέχουν καθεψίνη, κολλαγονάσες και διάφορες άλλες πεπτιδάσες. Έτσι

λοιπόν οι πρωτεάσες διασπούν τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια. Στον άνθρωπο, οι πρωτεάσες είναι απαραίτητες για την διαίρεση των κυττάρων, την πήξη του αίματος, την λειτουργία του ανοσοποιητικού και διάφορες άλλες ζωτικές διεργασίες.

Η καθεψίνη Β είναι μια πρωτεάση της θειόλης (κυστεΐνης) με δράσεις τόσο ενδοπεπτιδάσης όσο και πεπτιδυλοδιπεπτιδάσης. Λόγω της ευρείας ειδικότητάς της, η καθεψίνη Β παίζει βασικό ρόλο στον ενδοκυτταρικό καταβολισμό πρωτεϊνών στο λυσοσωμικό σύστημα (Bond & Butler, 1987). Η καθεψίνη Β στα θηλαστικών έχει εμπλακεί στην εισβολή, την εξέλιξη και τη μετάσταση όγκων (Poole, Tiltman, Recklies, & Stoker, 1978). Στο αιμοδιψές έντομο, *Rhodnius prolixus*, η καθεψίνη Β είναι το κύριο πρωτεολυτικό ένζυμο του εντέρου (Terra, Ferreira, & Garcia, 1988). Σε οργανισμούς που επίσης καταναλώνουν αίμα για την επιβίωση τους, οι καθεψίνες Β και L είναι πιθανό να εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της αιμοσφαιρίνης του ξενιστή. Σε έντομα και άλλα αρθρόποδα, οι καθεψίνες Β και L συμμετέχουν επίσης σε βασικές αναπτυξιακές διαδικασίες. Στη μύγα της σάρκας, *Sarcophaga peregrina*, τα αιμοκύτταρα παράγουν την εξωκυτταρική μορφή ενός ενζύμου που μοιάζει με καθεψίνη Β που συμμετέχει στην αποσύνθεση του λιπώδους σώματος της προνύμφης κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης (KURATA, SAITO, & NATORI, 1992).

Οι καθεψίνες Β και L έχουν εμπλακεί στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του κρόκου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στα έντομα (Medina & Vallejo, 1989; Yamamoto et al., 1994). Η αποσαφήνιση των αναπτυξιακών μηχανισμών των καθεψινών στα κουνούπια είναι σημαντική επειδή αυτό το έντομο μεταδίδει σοβαρές ασθένειες όπως η ελονοσία, ο δάγκειος πυρετός και πολλές άλλες. Λίγα είναι γνωστά, ωστόσο, για τη διαδικασία αποικοδόμησης της πρωτεΐνης του κρόκου στο έμβρυο κουνουπιών.

Οι Hays & Raikhel ανακάλυψαν μια μοναδική βιταλλογόνο πρωτεΐνη στο κουνούπι *A. aegypti* που μοιάζει σημαντικά με μέλη της οικογένειας καρβοξυπεπτιδάσης της σερίνης (Hays & Raikhel, 1990). Η πρωτεΐνη συντίθεται και εκκρίνεται ως προένζυμο με 53 kDa από το βιταλλογόνο λιπώδη σώμα. Εσωτερικεύεται με την ανάπτυξη ωοκυττάρων και στη συνέχεια αποθηκεύεται στο ωάριο μέχρι την εμβρυογένεση, στο οπότε υφίσταται μείωση μεγέθους στην ενεργή μορφή των 48 kDa. Τα υψηλότερα επίπεδα του ενεργού ενζύμου εμφανίζονται στο στάδιο της μέσης εμβρυογένεσης, μετά την οποία η πρωτεΐνη εξαφανίζεται. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην εμβρυογένεση παράγεται από έναν ιστό έξω από τις ωοθήκες, αποθηκεύεται στα ωάρια και ενεργοποιείται αργότερα στην ανάπτυξη. Αυτό το φαινόμενο δεν ήταν προηγουμένως γνωστό για τα ωοτόκα ζώα. Αντανακλώντας αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά, η πρωτεΐνη ονομάστηκε βιτελογενής καρβοξυπεπτιδάση (VCP) από τους προαναφερθέντες (Deitsch & Raikhel, 1994).

1.5. Long non-coding RNAs

Κατά την τελευταία δεκαετία, στοιχεία από πολυάριθμες γονιδιωματικές πλατφόρμες υψηλής απόδοσης υποδηλώνουν ότι η εξέλιξη των αναπτυξιακών διαδικασιών που ρυθμίζουν την πολυπλοκότητα του οργανισμού οφείλεται κυρίως στην επέκταση του ρυθμιστικού δυναμικού των μη κωδικοποιητικών τμημάτων του γονιδιώματος (Mattick, 2004). Στην πραγματικότητα, το τμήμα του γονιδιώματος

που μεταγράφεται ανέρχεται στο 70%. Από αυτό μόνο το 2% είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών. Επίσης, πολλά μη κωδικοποιητικά ρυθμιστικά στοιχεία μεταγράφονται σε μη κωδικοποιητικό RNA (ncRNA) δηλαδή σε αυτά που ονομάζουμε “housekeeping” RNAs, όπως είναι τα tRNAs, τα rRNAs, τα μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs) και τα snoRNAs (small nucleolar RNAs), τα οποία εκφράζονται και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην βιοσύνθεση πρωτεϊνών (Mercer, Dingler, & Mattick, 2009; Ponting, Oliver, & Reik, 2009).

Ανάλογα με το μέγεθος τους τα ncRNAs υποδιαιρούνται σε δύο ομάδες: τα μικρά ncRNAs (<200nt) και τα μακρά ncRNAs (>200nt). Τα τελευταία χρόνια τα μικρά ncRNAs έλαβαν μεγαλύτερη προσοχή και ειδικά τα miRNAs, τα οποία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο. Ωστόσο έχει γίνει όλο και πιο σαφές ότι το γονιδίωμα των θηλαστικών κωδικοποιεί επίσης πολλά lncRNAs, που ορίζονται ως ενδογενή κυτταρικά RNA με περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια που στερούνται ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) σημαντικού μήκους (λιγότερο από 100 αμινοξέα) (Chen & Carmichael, 2010).

Σε αντίθεση με τα μικρά ncRNA, όπως είναι τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs), τα miRNAs και τα Piwi-associated RNAs (piRNAs) τα οποία διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό και εμπλέκονται στη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική σίγαση γονιδίων μέσω ειδικής ζεύξης βάσεων με τους στόχους τους, τα μακρά ncRNA (lncRNA) είναι ελάχιστα διατηρημένα και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση με διάφορους μηχανισμούς που δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστοί (Faghihi & Wahlestedt, 2009; Mercer et al., 2009).

Από γενετικής άποψης τα lncRNAs κατηγοριοποιούνται με βάση τον τρόπο που μεταγράφονται και τη θέση του κάθε lncRNA γονιδίου στο γονιδίωμα (Sprurlock, Crooke, & Aune, 2016). Οι κατηγορίες είναι οι εξής:

1. Νοηματικό (sense) και αντινοηματικό (antisense) όταν επικαλύπτουν ένα ή περισσότερα εξώνια άλλου μεταγραφήματος στον ίδιο ή στον αντίθετο κλώνο, αντίστοιχα.
2. Αμφίδρομο (bidirectional) όταν το lncRNA και το γειτονικό γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη μεταγράφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις.
3. Ιντρονικό (intronic) όταν το lncRNA προέρχεται από ένα εσώνιο ενός δεύτερου μεταγραφήματος.

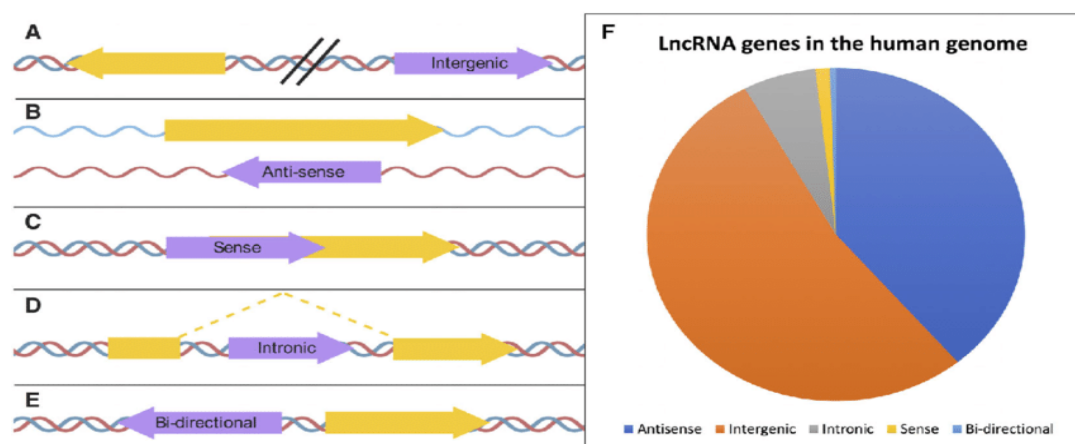


Fig. 17 Οι κατηγορίες lncRNAs και η συχνότητα εμφάνισής τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

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. Αλληλεπικαλυπτόμενο (Overlapping), όταν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη περικλείεται από το ιντρόνιο ενός lncRNA (Ponting et al., 2009).

1.5.1. Αναζήτηση lncRNAs στο γονιδίωμα

Αρχικά θα πρέπει να αναφερθεί ότι πιο κλασσικές μέθοδοι δεν μπορούν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση των lncRNAs γιατί αυτά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης και μεγάλη ετερογένεια ως προς την λειτουργία τους. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην χρήση πιο εξελιγμένων τεχνικών (M.-z. LI, XIAO, Kang, & Fei, 2019).

Η ταυτοποίηση των lncRNAs ουσιαστικά βασίζεται στην ανεύρεση επιπέδων μεταγραφής από περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και δεν έχουν ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Fatica & Bozzoni, 2014). Τεχνικές οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 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 βοηθάει ώστε να γίνει γνωστή η κατανομή πρωτεϊνών ή τροποποίηση των ιστονών στο γονιδίωμα, υποδεικνύοντας τα γονίδια lncRNAs λόγω ρυθμιστικού ρόλου (Fatica & Bozzoni, 2014).

Η πιο κατάλληλη μεθοδολογία όμως είναι η αλληλούχηση RNA (RNA seq) (Fatica & Bozzoni, 2014). Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, το ολικό RNA μετατρέπεται σε μια cDNA βιβλιοθήκη που υφίσταται αλληλούχηση υψηλής απόδοσης με τεχνικές όπως η Illumina (M.-z. LI et al., 2019). Μία μόνο εκτέλεση της αλληλούχησης παράγει δισεκατομμύρια αναγνώσεις (reads) που στη συνέχεια συγκρίνεται με ένα γονιδίωμα αναφοράς (Fatica & Bozzoni, 2014). Απαραίτητη προϋπόθεσή είναι να υπάρχει διαθέσιμη η γονιδιωματική βιβλιοθήκη του οργανισμού, για τον οποίο πραγματοποιείται το πείραμα. Μετά την σύγκριση, τα δεδομένα μεταφράζονται ποσοτικά σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης μέσω κατάλληλων αλγορίθμων (Fatica & Bozzoni, 2014). Αφαιρώντας από τα αποτελέσματα τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθώς και τα μετάγραφα με μήκος μικρότερο των 200 nt, αυτό που μένει είναι οι αλληλουχίες των lncRNA (Kumar et al., 2018). Τελικώς, πραγματοποιείται η εκτίμηση του κωδικοποιητικού δυναμικού των αλληλουχιών που απέμειναν, περιμένοντας να παρατηρηθεί μηδενικό τέτοιο δυναμικό.

1.5.2. Λειτουργίες των lncRNAs

Τα lncRNAs έχουν κυτταροειδή έκφραση και άρα υπόκεινται σε μεγάλο μεταγραφικό έλεγχο. Ανάλογα όμως από το υποκυτταρικό όργανο στο οποίο βρίσκονται εξαρτάται και η λειτουργία τους. Αυτό σημαίνει ότι τα κυτταροπλασματικά lncRNAs εμπλέκονται στις φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου όπως είναι η ενεργοποίηση των T-κυττάρων, η διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος και το κυτταρικό στρες. Αν πάλι τα lncRNAs βρίσκονται στον

πυρήνα του κυττάρου αλληλεπιδρούν με το DNA είτε αλλάζοντας την διαφοροποίηση της χρωματίνης είτε ελκύνοντας διάφορους παράγοντες που οδηγούν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Γενικότερα τα lncRNAs μπορεί να χρησιμεύουν ως μοριακά σήματα, ως δείκτες των λειτουργικά σημαντικών βιολογικών συμβάντων, να διαθέτουν ρυθμιστικές λειτουργίες ή απλώς να είναι υποπροϊόντα μεταγραφής (Mercer et al., 2009). Στις μέρες μας όλο και περισσότεροι ερευνητές και μελετητές προσπαθούν να ανακαλύψουν την σημασία των lncRNAs στους οργανισμούς, όμως ακόμα δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως όλες οι λειτουργίες τους (Kopp & Mendell, 2018).

1.5.3. Η εφαρμογή lncRNAs στα έντομα

Τα τελευταία χρόνια πολλά lncRNAs έχουν ανακαλυφθεί και μελετηθεί από τους επιστήμονες, κυρίως στα έντομα *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Anopheles gambiae* και *Bombyx mori* (L. Li et al., 2014). Τα lncRNAs των παραπάνω που μελετήθηκαν φαίνεται να εμπλέκονται στην αντιγραφή και την μετάφραση, κάτι που μας δίνει να καταλάβουμε πόσο σημαντικό ρόλο παίζουν στις διάφορες βιολογικές λειτουργίες.

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, Ghosh, & Subramanian, 2017). Μια έρευνα που έγινε στο *Anopheles gambiae*, τον κύριο φορέα της ελονοσίας, δείχνει ότι το 43% των μεταγράφων στο μεσέντερο είναι lncRNAs και το 32% αυτών εμφανίζει ένα ποσοστό ομολογίας με άλλα είδη (Padron et al., 2014).

Μελέτη που έγινε πάνω στα κουνούπια *Aedes* για τον ιό του Δάγκειου πυρετού έδειξε ότι ο ιός προκάλεσε την έκφραση αρκετών lncRNAs μέσα στα κουνούπια, στα όποια όταν έγινε knockdown ενισχύθηκε ο ιικός πολλαπλασιασμός, υποδεικνύοντας έτσι κάποια πιθανή σχέση αυτών των lncRNAs στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στους ιούς (Etebari, Asad, Zhang, & Asgari, 2016). Επειδή όμως όπως προαναφέρθηκε τα lncRNAs γονίδια δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένα τους προσδίδει υψηλή εξειδίκευση ως προς το είδος, τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν κάλλιστα για την καταπολέμηση του εντόμου χωρίς να υπάρξουν παράπλευρες απώλειες (Spurlock et al., 2016).

1.6. Χρήση του μηχανισμού RNAi στον έλεγχο εντόμων

Στην ενότητα 1.2.3. αναφέρθηκε ο μηχανισμός του παρεμβαλλόμενου RNA (RNAi) και πως αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σίγηση γονιδίων στόχων. Ανάλογα με τον οργανισμό τα γονίδια-στόχοι διαφέρουν. Στην περίπτωση των εντόμων, ο μηχανισμός RNAi έχει χρησιμοποιηθεί από τους επιστήμονες ως μια νέα προσέγγιση καταπολέμησης εντόμων που απειλούν την αγροτική παραγωγή ή την δημόσια υγεία (Lopez et al., 2019).

Στα κουνούπια η χρήση του RNAi γίνεται έτσι ώστε να στοχευθούν γονίδια που εμπλέκονται κυρίως στην αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου έτσι ώστε με την αξιοποίηση του να μειωθεί ο αριθμός τους μέσω πρόκλησης θνησιμότητας ή στειρότητας (Airs & Bartholomay, 2017). Η τεχνολογία του RNAi λοιπόν θα βοηθήσει στην παραγωγή νέων οικολογικών, αποδοτικών και ειδοειδικών εντομοκτόνων και έτσι δεν θα βλάπτονται άλλα ωφέλιμα έντομα όπως είναι οι μέλισσες παραδείγματος χάρι κάτι που δεν προέβλεπαν οι μέχρι τώρα τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν (Airs & Bartholomay, 2017; Lopez et al., 2019). 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 (Airs & Bartholomay, 2017; Lopez et al., 2019).

1.6.1. Εισαγωγή dsRNA στον οργανισμό-στόχο

Για την εισαγωγή δίκλωνων μορίων RNA μέσα στον οργανισμό-στόχο βασική προϋπόθεση είναι η παραγωγή του *in vitro* ή *in vivo*. Η ***in vitro*** παραγωγή dsRNA γίνεται με χημική τοποθέτηση βάσεων ή χρήση των κατάλληλων εκκινητών και την βοήθεια της T7 πολυμεράσης. Τα dsRNAs που συντίθεται μέσω αυτής της διαδικασίας μπορούν να χορηγηθούν σε έντομα με διαφορετικές μεθόδους, όπως μέσω τροφής με φυτά, μέσω εμβάπτισης (*soaking*), με νανοσωματίδια (*nanoparticles*), με λιποσώματα (*liposomes*) και με μικροεγχύσεις (*microinjection*) (Airs & Bartholomay, 2017; Mamta & Rajam, 2017).

Η μέθοδος της **τροφής με φυτά** είναι χρήσιμη όταν τα έντομα-στόχοι είναι φυτοφάγα. Το dsRNA σε αυτή την περίπτωση τοποθετείται εξωγενώς στα φυτά και αφού διαχυθεί κατά μήκος του, αφήνεται να φαγωθεί από τα έντομα (Mamta & Rajam, 2017). Η μέθοδος της **εμβάπτισης** σχετίζεται με την επώαση κυττάρων ή ιστών σε υδατινό διάλυμα που περιέχει τα συντιθέμενα dsRNAs, αλλά λόγω της περιορισμένης εφαρμογής της στα έντομα, σπάνια χρησιμοποιείται σε πειράματα (Mamta & Rajam, 2017). 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). Η μέθοδος της **μικροέγχυσης** είναι μια πιο διαδεδομένη τεχνική με μεγάλο εύρος εντόμων που μπορεί να αξιοποιηθεί. Η συγκεκριμένη μέθοδος θα αναλυθεί διεξοδικά παρακάτω αφού είναι και η τεχνική που τελικώς επιλέχθηκε για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής.

Η μέθοδος της ***in vivo*** παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA γίνεται με χρήση κάποιου ζωντανού οργανισμού όπως είναι οι ιοί, τα βακτήρια, οι μύκητες και τα φυτά. Με την είσοδο πλασμιδιακού φορέα που έχει την δυνατότητα παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA στα φυτά, στα βακτήρια και στους μύκητες, οι οργανισμοί αυτοί μπορούν να μετασχηματιστούν. Έτσι όταν το έντομο-στόχος καταναλώσει αυτόν τον οργανισμό, το dsRNA καταλήγει στο στομάχι του (Mamta & Rajam, 2017).

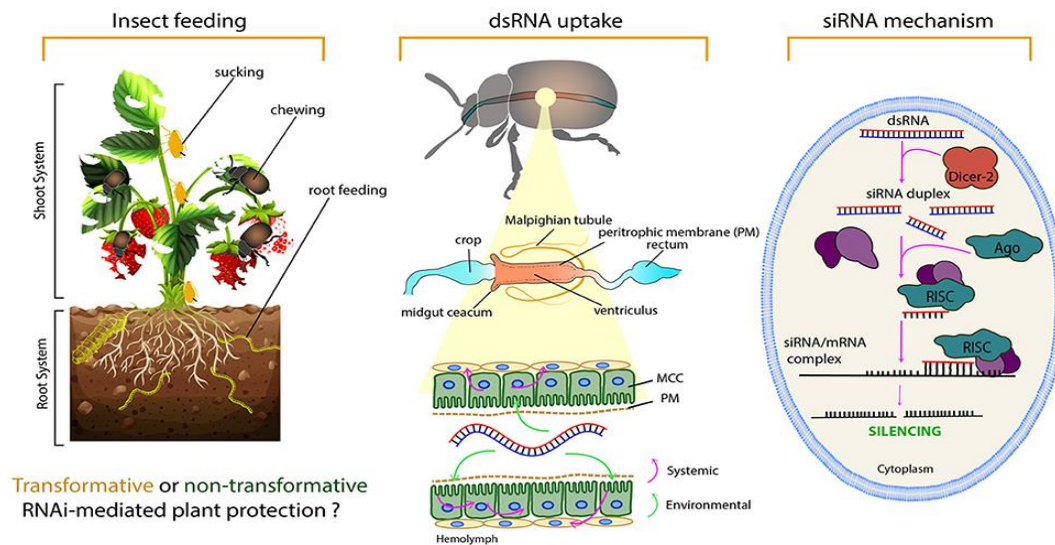


Fig. 18 Στρατηγική RNAi σε φυτικά κύτταρα για τον έλεγχο εντόμων. (Mamta & Rajam, 2017)

Η περίπτωση της χρήσης **βακτηρίων** ξεχωρίζει σε σχέση με την περίπτωση παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA μέσω των φυτών ή της in vitro μεθόδου γιατί η μέθοδος με την χρήση βακτηρίων είναι χαμηλού κόστους και είναι εύκολη στην εφαρμογή της (ακόμα και μέσω ψεκασμού) (Airs & Bartholomay, 2017). Στα κουνούπια, η χρήση των βακτηρίων μπορεί να φανεί πολύ χρήσιμη αφού όπως γνωρίζουμε οι προνύμφες τρέφονται από τα βακτήρια που υπάρχουν μέσα στο νερό.

Η περίπτωση των **μυκήτων** είναι επίσης σημαντική αφού γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πολλά έντομα τα οποία καταναλώνουν μύκητες ως τροφή, κάτι που τους καθιστά κατάλληλο μέσο μετασχηματισμού και μεταφοράς δίκλωνων μορίων RNA μέσα στα έντομα (Joga, Zotti, Smaghe, & Christiaens, 2016). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* δεν διαθέτει βασικά συστατικά για την εκτέλεση του RNAi μονοπατιού, καθιστώντας τον ιδανικό για σύνθεση και μεταφορά dsRNA (Duman-Scheel, 2019).

	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		

Fig.19 Διάφορα παραδείγματα συστημάτων μεταφοράς των dsRNA για την ενεργοποίηση του μονοπατιού RNAi (Airs & Bartholomay, 2017).

Για να είναι επιτυχημένη η τεχνική του RNAi πολύ σημαντική είναι η επιλογή της αλληλουχίας-στόχου και η μέθοδος μεταφοράς των dsRNAs (Scott et al., 2013). Το γονίδιο-στόχος πρέπει να είναι βασικό, να εκφράζεται στο στάδιο ζωής που μας ενδιαφέρει και να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στην

αναπαραγωγή ή στην εμβρυογένεση του οργανισμού-στόχου (Airs & Bartholomay, 2017). Αυτό σημαίνει ότι όταν γίνει σίγηση του γονιδίου αυτού μέσω του μηχανισμού RNAi θα προκληθεί κάποιου είδους στειρότητα, μειωμένη ανάπτυξη ή ακόμα και θνησιμότητα στον οργανισμό-στόχο.

Επιπλέον, σημαντικό είναι ο χρόνος ζωής της πρωτεΐνης/mRNA να μην είναι μεγάλος, γιατί αυτό θα οδηγήσει σε αδυναμία εφαρμογής του μηχανισμού RNAi (Mamta & Rajam, 2017). Η επιλογή της αλληλουχίας μέσα στο γονίδιο-στόχο πρέπει, 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 (Christiaens, Whyard, Vélez, & Smagghé, 2020; Scott et al., 2013).

Όσον αφορά την μεταφορά των μορίων dsRNA στο εσωτερικό του εντόμου, αυτό που πρέπει να γίνει με προσοχή είναι η επιλογή της ποσότητας, της δομής και του μήκους των dsRNAs (Mamta & Rajam, 2017; Scott et al., 2013). Αργότερα πρέπει να επιλεγεί ο σωστός τρόπος μεταφοράς μέσα στον οργανισμό στόχο όπως αυτά προαναφέρθηκαν στην ενότητα 1.4.1. Στα έντομα η χορήγηση των δίκλωνων μορίων RNA μέσω τροφής δεν είναι καλή επιλογή διότι αυτοί οι οργανισμοί έχουν στα όργανα του πεπτικού τους συστήματος νουκλεάσες οι οποίες μπορούν να αποικοδομήσουν τα dsRNAs και έτσι αυτή η μέθοδος να μην είναι το ίδιο αποτελεσματική όσο με την άμεση χορήγησή των dsRNAs μέσω μικροέγχυσης (Christiaens et al., 2020; Mamta & Rajam, 2017).

1.6.2. Μικροέγχυση (Micro-injection)

Η μέθοδος της μικροέγχυσης άρχισε να χρησιμοποιείται από την εποχή που ανακαλύφθηκε και ο μηχανισμός RNAi από τους Fire και Mello (1998) στον οργανισμό *C. elegans* έτσι ώστε να γίνει εκτίμηση των επιδράσεων του νοηματικού και του αντινοηματικού RNA σε αυτόν (Mamta & Rajam, 2017; Scott et al., 2013). Σε ότι αφορά τα έντομα, ο πρώτος οργανισμός που πραγματοποιήθηκε μικροέγχυση ήταν η *D. melanogaster* το 1998 και ακολουθήσε η *Apis mellifera* και το *Tribolium castaneum* (Scott et al., 2013).

Στα κουνούπια η πρώτη εφαρμογή των μικροεγχύσεων έγινε στο *Anopheles gambiae* στο ενήλικο στάδιο της ζωής τους (Blandin et al., 2002). Αργότερα όμως έγινες πολλές έρευνες και σε άλλα στάδια της ζωής του, καθώς επίσης και σε άλλα ημι- και ολομετάβολα έντομα (Scott et al., 2013).

Ο πιο βασικός λόγος για τον οποίο υπερτερεί η μέθοδος της μικροέγχυσης σε σχέση με αυτή της χορήγησης δίκλωνων μορίων RNA μέσω της τροφής είναι διότι τα δίκλινα μόρια μέσω της μικροέγχυσης περνούν απευθείας στην αιμοδόμη χωρίς να παρουσιαστούν εμπόδια από το επιθήλιο του εντέρου. Επίσης η ποσότητα δίκλωνων μορίων που εισάγονται στο έντομο είναι σταθερή και γνωστή, κάτι που δεν μπορούμε να γνωρίζουμε με τις υπόλοιπες μεθόδους. Παρ' όλα αυτά η μέθοδος της μικροέγχυσης είναι μια χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία. Μπορεί να εκτελεστεί μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό που διαθέτει σταθερότητα και λεπτότητα στις κινήσεις του κατά την διάρκεια της διαδικασίας (Mamta & Rajam,

2017). Επιπλέον, το προσωπικό πρέπει να γνωρίζει πως γίνεται η σωστή επιλογή και προετοιμασία της βελόνας, ποιος είναι ο ιδανικός όγκος έγχυσης και ποιο το σημείο στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η ένεση. Αυτοί οι παράμετροι αλλάζουν ανάλογα με τον οργανισμό-στόχο (Yu et al., 2013). Για παράδειγμα, στις μύγες χρησιμοποιείται βελόνα πάχους ~250μm. Αυτή η βελόνα προκαλεί σοβαρές βλάβες στα κουνούπια και για αυτό και επιλέγουμε να κάνουμε χρήση πιο λεπτής βελόνας (~150μm). Ακόμα όμως και αν έχει γίνει χρήση της πιο λεπτής βελόνας στην περίπτωση των κουνουπιών, πρέπει το σπάσιμο της άκρης να γίνει με προσοχή έτσι ώστε να μην προκληθεί ανεπανόρθωτη βλάβη στους ιστούς και κατ' επέκταση να επέλθει ο θάνατος (Sanscrainte, Waits, Geden, Ester, & Becnel, 2018).

Σύμφωνα με τους Sampath και Puttaraju (2012) οι μικροεγχύσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε όλα τα στάδια της ζωής των κουνουπιών, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου στο στάδιο αυτό. Παρόλα αυτά, τα έντομα που ήταν στο στάδιο του εμβρύου ή του ενηλικού είχαν αυξημένα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με αυτά που ήταν στο στάδιο της προνύμφης και της νύμφης. Αυτός λοιπόν είναι ένας παράγοντας που πρέπει να συνυπολογιστεί κατά την διαδικασία σχεδιασμού ενός πειράματος. Κάτι επίσης σημαντικό είναι επίσης ότι η μέθοδος της μικροέγχυσης δεν μπορεί να έχει εφαρμογή στην φύση και έτσι την καθιστά μια μέθοδο που αξιοποιείται καθαρά για εργαστηριακούς σκοπούς (Mamta & Rajam, 2017).

2. Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σίγησης lncRNA γονιδίων μέσω της τεχνολογίας RNAi στην ωτοκία του κουνουπιού *Aedes albopictus*. Η επιλογή του lncRNA του Γονιδίου και της Καθεψίνης έγινε με βάση RNAseq δεδομένα, στα οποία φαίνονται ότι τα γονίδια εκφράζονται αποκλειστικά στις ωοθήκες του *Ae. albopictus* μετά το γεύμα αίματος, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή τους στην αναπαραγωγική ικανότητα του κουνουπιού αυτού. Για την σίγηση των γονιδίων αξιοποιήθηκε η τεχνολογία αποσιώπησης RNAi και για αυτό τον λόγο κατασκευάστηκαν δίκλινα μόρια RNA, έτσι ώστε να στοχευθούν τα μεταγράφα των συγκεκριμένων lncRNAs. Η χορήγηση των δίκλωνων μορίων RNA έγινε μέσω μικροέγχυσης σε ενήλικα θηλυκά έντομα, τα οποία πρωτίστως είχαν ζευγαρώσει. Στα επιζήσαντα από την διαδικασία της μικροέγχυσης δόθηκε γεύμα αίματος και αφέθηκαν να ωτοκήσουν σε συνθήκες απόλυτου σκότους για 72h. Τέλος έγινε καταγραφή της ποιότητας και της ποσότητας των ωών που κάθε ενήλικο έντομο απέθεσε. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας θα διακρίνουν τα εν' λόγω lncRNAs διαδραματίζουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην ωοαπόθεση του εντόμου αυτού, έτσι ώστε να αξιοποιηθούν μελλοντικά στην παραγωγή ειδοειδικών εντομοκτόνων.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

Για να μπορέσουμε να καθορίσουμε τα επίπεδα έκφρασης του κάθε εξεταζόμενου γονιδίου που στοχεύουμε με την τεχνική της Real-Time PCR, χρειάστηκε να απομονώσουμε το ολικό RNA του κουνουπιού *Ae. albopictus* έτσι ώστε να συνθέσουμε συμπληρωματικό DNA (cDNA) το οποίο και θα χρησιμοποιήσουμε για να διαπιστώσουμε την έκφραση αυτή.

3.1.1. RNA Extraction (Απομόνωση RNA)

Δείγματα από τους ιστούς του κουνουπιού *Ae. albopictus* συλλέγονται και τοποθετούνται σε διάλυμα Extrazol με σκοπό την διατήρηση του RNA. Το Extrazol είναι ετοιμόχρηστο προϊόν για την απομόνωση διαφόρων δομών όπως το RNA, DNA και οι πρωτεΐνες από κύτταρα και ιστούς ανθρώπινης, ζωικής, φυτικής και βακτηριακής προέλευσης μέσα σε 1 ώρα. Χωρίζει το βιολογικό δείγμα σε 3 φάσεις. Την υδατική (πάνω) φάση, την οργανική(κάτω) φάση και την μεσόφαση. Το RNA μένει στην υδατική φάση και καθαρίζεται μετά από κατακρήμνιση με ισοπροπυλική αλκοόλη (ισοπροπανόλη).

Στην περίπτωση μας η ποσότητα Extrazol που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογη με το μέγεθος των δειγμάτων και ορίστηκε στα 40μL σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Υλικά

- Tubes 1.5mL
- Ειδικά Pestles
- Απομονωμένος ιστός *Ae. Albopictus* (ovaries)
- Διάλυμα Extrazol
- BCP (1-Bromo-3-chloropropane)
- Γλυκογόνο (Glycogen) 10mg/ml
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη (EtOH) 70%

Μέθοδος

1. Βγάζουμε τα δείγματά μας από τους -80°C και τα τοποθετούμε στον πάγο. Όταν τα δείγματα έχουν ξεπαγώσει, τους κάνουμε spin-down έτσι ώστε να καθαρίσουν τα τοιχώματα των tube από πιθανά υπολείμματα ιστού.
2. Με την χρήση ειδικών αποστειρωμένων pestle ομογενοποιούμε τα δείγματα μας. Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιείτε ένα ξεχωριστό pestle.
3. Προσθέτουμε 160μl Extrazol σε κάθε tube ώστε να καθαρίσουμε το pestle από τυχόν υπολείμματα που μπορεί να έχουν μείνει πάνω του και έτσι ο συνολικός όγκος του κάθε δείγματος να ανέλθει στα 200μl.

4. Κάνουμε καλό Vortex στα δείγματα μας.
5. Αφήνουμε τα δείγματα μας σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min έτσι ώστε να δράσει το Extrazol και να απελευθερωθεί τελικώς το RNA.
6. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα μας στους 4°C, στα 14.000rpm, για 10 min.
7. Στο ενδιάμεσο ξεπλένουμε τα pestles με νερό και την χρήση ειδικής βούρτσας.
8. Μετά την φυγοκέντριση λαμβάνουμε το υπερκείμενο από τα δείγματα με την χρήση ρυθμισμένης πιπέτας στα 200μL και μεταφέρουμε τα δείγματα σε καινούρια tubes με μεγάλη προσοχή.
 - ✓ **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Σε περίπτωση που γίνει λήψη ιζήματος μαζί με το υπερκείμενο, γίνεται επανάληψη της φυγοκέντρισης.
9. Προσθέτουμε 0,1X BCP (στη περίπτωσή μας 0,1X200μL=20μL) σε κάθε tube και ανακατεύουμε έντονα με το χέρι για τουλάχιστον 15 sec έως ότου δημιουργηθεί γαλάκτωμα μέσα στο tube.
10. Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min ώστε να δράσουν τα αντιδραστήρια. Κάθε 5 min ανακατεύουμε με το χέρι τα tubes.
11. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα μας στους 4°C, στα 14.000rpm, για 15 min.
12. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα tubes με την χρήση ρυθμισμένης πιπέτας(~100-120μL).
 - ✓ **Σημείωση:** Σε αυτό το στάδιο στα tubes γράφουμε το όνομα του δείγματος και την ημερομηνία.
13. Προσθέτουμε 2μL glycogen και 1X ισοπροπανόλης (στη περίπτωσή μας 1X120=120μL) σε κάθε δείγμα.
14. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου τα δείγματα για 10 min.
15. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στους 4°C, στα 14.000rpm, για 30 min.
16. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με μια αποφασιστική κίνηση του tube και κάνουμε πλύση με προσθήκη 200μL αιθανόλης (EtOH) 70% σε κάθε δείγμα.
17. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα μας στους 4°C, στα 14.000rpm, για 10 min.
18. Αφαιρούμε την μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης (EtOH) με γρήγορο άδειασμα του tube και με μεγάλη προσοχή προσπαθούμε να κάνουμε λήψη του επιπλέον υγρού με την χρήση μικρής πιπέτας.
19. Αφήνουμε τα δείγματα με ανοιχτά καπάκια(air-dry) πάνω στον πάγκο εργασίας έτσι ώστε να γίνει εξάτμιση των υπολειμμάτων της αιθανόλης σε συνθήκες δωματίου για 15-20 min.
 - ✓ **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου δεν πλησιάζουμε τα δείγματα μας για να μην τα μολύνουμε.
20. Μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης κάνουμε διάλυση του ιζήματος που έχει απομείνει με 26μL ddH₂O.
21. Για την μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλύματος σε RNA κάνουμε χρήση του φασματοφωτόμετρο Quawell στην λειτουργία μέτρησης RNA.

3.1.2. DNase Treatment (Επώαση με DNάση)

Αυτό το στάδιο της επεξεργασίας του RNA είναι πολύ σημαντικό για το πείραμα μας. Με την χρήση μιας δεσοξυριβονουκλεάσης (Turbo DNase I) υδρολύονται οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των μορίων του DNA και έτσι μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα μας δεν θα περιέχουν υπολείμματα DNA.

Υλικά

- Δείγματα που προήλθαν από την διαδικασία απομόνωσης 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)
- Παγωμένη Αιθανόλη 100 % (ice cold EtOH)
- Παγωμένη Αιθανόλη 70 % (ice cold EtOH)
- Αποστειρωμένο ddH₂O

Μέθοδος

1. Παρασκευάζουμε Master mix: 10x buffer & DNase.
2. Για 30μL αντίδρασης, για κάθε δείγμα:
 - 3μL 10x buffer
 - 1μL DNase I
 - 0,5μL RNase out
 - 0,5μL ddH₂O
- ✓ **Προσοχή** : η ποσότητα του RNA που θα μπει στην αντίδραση θα πρέπει να μην υπερβαίνει τα 8μg ή 8.000ng συνολικά.
3. Αν είναι απαραίτητο αραιώνουμε κατάλληλη ποσότητα RNA ανάλογα με την συγκέντρωση που μετρήσαμε στο φασματοφωτόμετρο (Με βάση την ποσότητα που έχουμε αν η συγκέντρωση του RNA είναι μεγαλύτερη από τα 8.000/25 = 320ng/μl θα πρέπει να γίνει διάλυση).
4. Προσθέτουμε 5μl master mix σε κάθε tube, με προσοχή ώστε να μην υπάρξει επαφή του tube με το RNA. Ο όγκος των δειγμάτων πλέον ανέρχεται στα 30μL.
5. Κάνουμε χρήση του vortex για 3 sec και μια σύντομη φυγοκέντριση (έτσι ώστε τα ένζυμα που περιέχονται μέσα στη γλυκερόλη να αναμιχθούν με το νερό).
6. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1 h.
7. Μετά το υδατόλουτρο βάζουμε τα δείγματά μας στον πάγο και προσθέτουμε 135μL Ammonium Acetate 7,5M καθώς και 235μL ddH₂O.
8. Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 400μL Φαινόλης/Χλωροφόρμιου και κάνουμε vortex για 30sec-1min έτσι ώστε να δημιουργηθεί γαλάκτωμα.
9. Φυγοκεντρούμε τα δείγματά μας στα 14.000rpm, για 5min, στους 4°C.
10. Αφαιρούμε με ρυθμισμένη πιπέτα 400μL από το υπερκείμενο υγρό με πολύ προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση και τοποθετούμε το υγρό αυτό σε νέο tube, το οποίο βρίσκεται ανοιχτό πάνω στον πάγο.
11. Προσθέτουμε 2,5X Παγωμένης αιθανόλης 100 % (ice cold EtOH), στην περίπτωση μας 1000μL, και 0,5μL γλυκογόνου (για να γίνει πιο εύκολη η διάκριση του pellet) και ανακινούμε τα δείγματα μας 4-5 φορές το καθένα
12. Τοποθετούμε τα δείγματα μας στους -80°C για τουλάχιστον 1 h.
 - ✓ **Σημείωση**: Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε αυτό το στάδιο για εβδομάδες).

13. Κάνουμε φυγοκέντριση των δειγμάτων για 30 min, στις 14.000 rpm, στους 4°C.
14. Αφαιρούμε με πολύ προσοχή όλο το υπερκείμενο υγρό των tube χωρίς να διαταράξουμε τη πελέτα.
15. Προσθέτουμε 500μL Παγωμένης Αιθανόλης 70 % (ice cold EtOH) σε κάθε tube.
16. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 rpm, για 10 min, στους 4°C.
17. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό αναποδογυρίζοντας το tube χωρίς να διαταράξουμε τη πελέτα και κάνουμε spin down.
18. Αφαιρούμε με την χρήση μικρής πιπέτας των υπολειμμάτων αιθανόλης που μπορεί να υπάρξουν στο tube.
19. Τοποθετούμε τα δείγματα μας πλάγια στον πάγκο με ανοικτό καπάκι ώστε να στεγνώσουν από τα υπολείμματα αιθανόλης για τουλάχιστον 20 min.
20. Προσθέτουμε 11μL αποστειρωμένου ddH₂O και τοποθετούμε τα δείγματα μας στους 65°C για 5 min έτσι ώστε να διαλυθεί η πελέτα.
21. Κάνουμε έντονο vortex στα δείγματα μας για 1 min, spin down και ξανά vortex.
22. Μετράμε την συγκέντρωση των διαλυμάτων μας με το φασματοφωτόμετρο Quawell στην λειτουργία μέτρησης RNA.
23. Αποθηκεύουμε τα δείγματα μας στους -80°C.

3.1.3. Synthesize of cDNA (Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι ένας μηχανισμός στον οποίο το cDNA μπορεί να συντεθεί χρησιμοποιώντας mRNA ή οποιοδήποτε είδος RNA. Προκειμένου να παραχθεί cDNA, πρέπει να παρέχονται ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης και άλλα απαραίτητα συστατικά, ειδικά μήτρα και εκκινητές. Οι εκκινητές είναι οι μικρές ακολουθίες DNA ειδικά σχεδιασμένες για την ενίσχυση των αλληλουχιών στόχων. Οι τυχαίοι εκκινητές και οι εκκινητές oligo dT είναι δύο συνηθισμένοι τύποι εκκινητών που χρησιμοποιούνται στην αντίστροφη μεταγραφή.

cDNA from mRNA

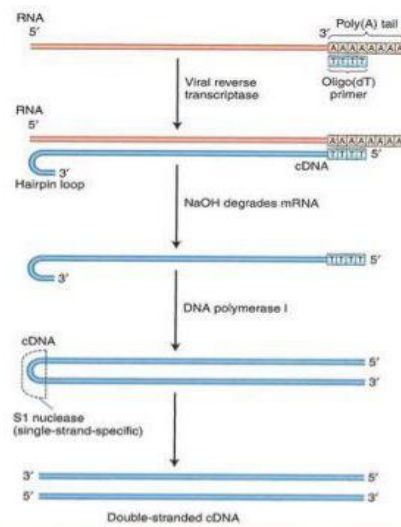


Fig. 20 Διαδικασία σύνθεσης cDNA από mRNA

Στο πείραμα κάναμε χρήση oligo-dT εκκινητών προκειμένου να μετατρέψουμε σε cDNA μόνο τα ώριμα mRNA μεταγράφα. Οι oligo-dT εκκινητές αποτελούνται από ένα μονόκλωνο τμήμα 12-18 δεοξυθυμιδινών έχουν την μορφή 5'-d(TTT TTT TTT TTT TTT TTT)-3' και προσδέονται στις poly-A ουρές των μεταγράφων.

Υλικά

- Ολικό RNA που προήλθε από την διαδικασία RNA extraction και αφού πέρασε από την διαδικασία DNase Treatment.

- Oligo-dT εκκινητές (νουκλεοτιδική αλληλουχία με 15 βάσεις θυμίνης) 50mM
- dNTPs (10 mM για κάθε NTP)
- Buffer ενζύμου (5X)
- DTT (100 mM)-διθειοθρεϊτόλη
- RNase Out- Αναστολέας ριβονουκλεασών (40U/μL).
- Ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (MMLV-RT, 200u/μl)
- Διπλά απεσταγμένο νερό ddH₂O

Μέθοδος

1. Στο πείραμα αυτό το κάθε δείγμα θα πρέπει να έχει συγκέντρωση 100ng/μL σε RNA(Μέτρηση στο Quawell). Όταν η μέτρηση είναι πάνω από την αναφερόμενη, το δείγμα θα πρέπει να αραιωθεί με την προσθήκη ddH₂O (WFI). Ο τελικός όγκος πρέπει να ανέρχεται στα 10μL. Σε περίπτωση που η συγκέντρωση είναι μικρότερη του επιθυμητού, προσθέτουμε ολόκληρο το δείγμα ως έχει.
2. Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 1μL από 50mM oligo-dT primers και 1μL από 10mM dNTPs (Παγωμένα και τα δύο).
3. Κάνουμε ελαφρύ vortex και τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 65°C για 5min.
4. Απευθείας τοποθετούμε τα δείγματα για 10 min στον πάγο.
5. Παράλληλα προετοιμάζουμε το mix της αντίδρασης.
Για κάθε δείγμα υπολογίζουμε:
 - 4μL Παγωμένου buffer 5x,
 - 2μL Παγωμένου DTT (100 mM),
 - 0,5μL RNase Out (40U/μL)
 - 1μL MMLV-RT (200u/μL) και
 - 0,5μL ddH₂O (WFI).
6. Κάνουμε Vortex στο mix της αντίδρασης και spin-down αμέσως μετά.
7. Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 8μL mix έτσι ώστε ο τελικός όγκος του καθενός να ανέρχεται στα 20μL.
8. Αφήνουμε τα δείγματα μας στο υδατόλουτρο στους 37°C για 2h.
9. Προσθέτουμε 180μL ddH₂O (WFI) σε κάθε δείγμα.
10. Αποθηκεύουμε τα δείγματά μας στους -20°C.

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

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται στο πήκτωμα αγαρόζης κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος(τα μόρια μικρότερου μήκους κινούνται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα).

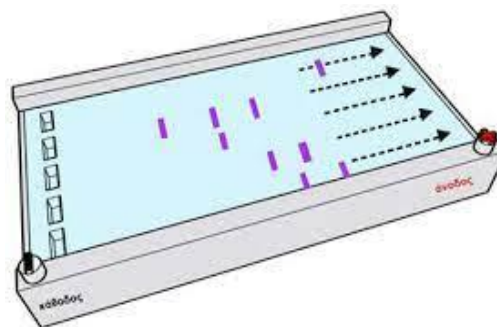


Fig.21 Σκίτσο αναπαράστασης της ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται και για τον ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων DNA σε σχέση με κάποιον μάρτυρα - ladder (ο οποίος περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης), για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και της ποιότητας του DNA και για τη σύγκριση ποσοτήτων δειγμάτων DNA ή RNA μεταξύ τους. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με την οπτική εκτίμηση του φθορισμού που παράγεται από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) κάτω από το υπεριώδες φως (UV)

Υλικά

- Αγαρόζη (AgaPure Agarose LE, Canvax Biotech)
- Ζυγός ακριβείας
- Αλουμινόχαρτο
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)
- Θερμοπροστατευτικό γάντι
- Καλούπι για πήκτωμα αγαρόζης και “κτενάκι”
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml και 1000ml
- Κωνική φιάλη των 250ml
- Δείγματα νουκλεϊκών οξέων
- Μάρτυρας νουκλεοτιδικών βάσεων (100bp Minotech Ladder)
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Gel Loading Dye Purple 6x)
- Πιπέτες και κατάλληλα Tips
- Χειρουργικά γάντια
- Προστατευτικά γυαλιά

Μέθοδος

Προσοχή:

- ✓ Όλες οι διαδικασίες της παρασκευής και ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος αγαρόζης γίνονται σε ειδικό δωμάτιο. Κατά την διάρκεια των διαδικασιών αυτών γίνεται χρήση ξεχωριστού εξοπλισμού και με ιδιαίτερη προσοχή λόγω της μεταλλαξιογόνου και τερατογόνου δράσης του βρωμιούχου αιθιδίου(EtBr).
- ✓ Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών τα γάντια που χρησιμοποιήθηκαν πετιούνται στον κάδο του ειδικού αυτού δωματίου και δεν χρησιμοποιούνται για καμία άλλη χρήση.

Πάνω σε ζυγό ακριβείας τοποθετούμε ένα κομμάτι αλουμινόχαρτου και μηδενίζουμε. Ζυγίζουμε την απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης ανάλογα με την πυκνότητα και τον όγκο που θέλουμε να έχει το πήκτωμα μας. Στα πειράματά μας κατά κύριο λόγο το πήκτωμα ήταν 1% w/v.

1. Με την χρήση ογκομετρικού σωλήνα μετράμε τον όγκο του αραιωμένου διαλύματος TBE (0,5X) του οποίου θα χρειαστούμε.
2. Προετοιμάζουμε το καλούπι στο οποίο το διάλυμά μας θα λάβει το τελικό του σχήμα και προσθέτουμε και ένα “κτενάκι” το οποίο διαλέγουμε ανάλογα με των όγκο των δειγμάτων που θέλουμε να “τρέξουμε”.

3. Σε κωνική φιάλη τοποθετούμε την ζυγισμένη αγαρόζη και προσθέτουμε το ογκομετρημένο διάλυμα TBE 0,5X.
4. Τοποθετούμε την κωνική φιάλη σε φούρνο μικροκυμάτων στην υψηλή θερμοκρασία έως ότι επέλθει βρασμός. Με την χρήση θερμοπροστατευτικού γαντιού αναδεύουμε την κωνική φιάλη. Αν η αγαρόζη έχει διαλυθεί πλήρως συνεχίζουμε στο επόμενο βήμα ειδάλως επαναλαμβάνουμε την διαδικασία.
5. Με την χρήση του θερμοπροστατευτικού γαντιού αναδεύουμε την κωνική φιάλη κάτω από κρύο τρεχούμενο νερό έως ότου η κωνική φιάλη να γίνει ανεκτή στην επαφή με γυμνό χέρι (40-50°C).
6. Αναδεύουμε το μείγμα και στην συνέχεια το τοποθετούμε στο ήδη έτοιμο καλούπι. Αφήνουμε το μείγμα να κρυώσει καλά αφού πρώτα σκάσουμε τυχών φουσκάλες που μπορεί να υπάρχουν στην επιφάνεια του.
7. Όταν το διάλυμα στερεοποιηθεί πλήρως, αφαιρούμε με προσοχή το “κτενάκι” και μεταφέρουμε το πήκτωμα αγαρόζης στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
8. Θα πρέπει το πήκτωμα αγαρόζης να καλύπτεται πλήρως από διάλυμα TBE 0,5X μέσα στην συσκευή για την σωστή διεξαγωγή της διαδικασίας.
9. Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων μας στο πήκτωμα αγαρόζης, προσθέτουμε Gel Loading Dye Purple 6x και αναδεύουμε καλά με την πιπέτα. Σε δείγματα 50μl προσθέτουμε 10μl Gel Loading Dye Purple 6x.
10. Στα κενά που δημιουργήθηκαν από το “κτενάκι” φορτώνουμε τα δείγματά μας καθώς και τον μάρτυρα (ladder) ο οποίος σχετίζεται με το μέγεθος των κομματιών που θέλουμε να αναγνωρίσουμε. Στη περίπτωση μας έγινε χρήση 4μl από το 100bp Ladder της Minotech.
11. Ρυθμίζουμε την ηλεκτρική τάση στο μηχάνημα της ηλεκτροφόρησης από 90-120V ανάλογα με το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων που φορτώσαμε. Η τάση δημιουργεί το κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο στη συσκευή.
12. Μετά από περίπου 30min, μεταφέρουμε το πήκτωμα αγαρόζης σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) για την παρατήρηση των ζωνών.
13. Αν οι ζώνες έχουν “ανοίξει” τότε γίνεται κόψιμο της ταυτοποιημένης ζώνης με την χρήση ειδικού κοπιδιού. Το κομμάτι αυτό τοποθετείτε σε tube για την χρήση του προϊόντος στην επόμενη διαδικασία. Αν οι ζώνες δεν έχουν “ανοίξει” επαρκώς γίνεται επανάληψη του βήματος 13 έως ότου οι ζώνες διαχωριστούν εντελώς.

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

Οι ζώνες που παραλήφθηκαν από την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιέχουν το επιθυμητό DNA και είναι αυτές που χρησιμοποιούμε σε αυτό το βήμα. Στόχο μας είναι να αποβάλουμε τα συστατικά του πηκτώματος αγαρόζης και να παραλάβουμε το καθαρό DNA. Στο πείραμα μας έγινε χρήση του Nucleic acid purification kit της Macherey-Nagel.

Υλικά

- Ζυγός ακριβείας
- NT1 Buffer

- NT3 Buffer
- ddH₂O
- Δοχείο απόρριψης υγρών (waste)
- Eppendorf 2ml και 1,5ml
- Στήλη απομόνωσης DNA(Column)

Μέθοδος

1. Σε ζυγό ακριβείας τοποθετούμε ένα άδειο eppendorf με αυτό που προηγουμένων τοποθετήσαμε τις ζώνες από το πήκτωμα αγαρόζης και μηδενίζουμε.
2. Καταγράφουμε το βάρος του κάθε δείγματός μας χωριστά.
3. Προσθέτουμε 2X NT1 Buffer σε κάθε δείγμα. Αυτό σημαίνει ότι για κάθε 100mg πηκτώματος γίνεται προσθήκη 200μl NT1 Buffer.
4. Τοποθετούμε τα δείγματά μας στο υδατόλουτρο στους 55°C για συνολικά 10-15min ενώ κάθε 2-3min αναδεύουμε τα eppendorf με την χρήση vortex έως ότου διαλυθεί τελείως το κομμάτι gel.
5. Σε eppendorf των 2ml τοποθετούμε μια στήλη απομόνωσης DNA (column) και μεταφέρουμε σε αυτή έως 700μl του διαλύματος.
6. Φυγοκεντρούμε τα δείγματά μας στα 11.000rpm για 1min.
7. Αφαιρούμε την στήλη (column) από το eppendorf και πετάμε το υγρό στο δοχείο απόρριψης υγρών (waste).
8. Τοποθετούμε ξανά την στήλη στο eppendorf των 2ml.
9. Αν κάποιο από τα δείγματά μας ξεπερνά τα 700μl τότε γίνεται τοποθέτηση των πρώτων 700μl στη στήλη (column), γίνεται φυγοκέντρωση και αφού γίνει απομάκρυνση του εκλούσματος από το eppendorf, τοποθετούμε το υπόλοιπο δείγμα και επαναλαμβάνεται η διαδικασία.



Fig 22. Πρωτόκολλο του AccuPrep® Gel Purification Kit της Bioneer

10. Σε κάθε στήλη προσθέτουμε 700μl NT3 buffer.
11. Φυγοκεντρούμε στα 11.000rpm για 1min.
12. Αφαιρούμε την στήλη από το eppendorf και πετάμε το υγρό στο δοχείο απόρριψης υγρών (waste)
13. Τοποθετούμε την στήλη ξανά πίσω στο eppendorf των 2 ml.
14. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 10,11,12 και 13.
15. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα μας ξανά χωρίς την χρήση κάπου buffer στα 11.000rpm για 1min.

16. Μεταφέρουμε τις στήλες σε νέα erpendorf του 1,5ml και προσθέτουμε 15μl ddH₂O, αφού πρώτα έχει γίνει θέρμανση του σε υδατόλουτρο στους 55°C.
17. Αφήνουμε τα δείγματα μας σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
18. Φυγοκεντρούμε στα 11.000rpm για 1min.
19. Αφαιρούμε την στήλη και αποθηκεύουμε τα erpendorf, τα οποία περιέχουν πλέον το επιθυμητό και καθαρό DNA, στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.2. Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

3.2.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Για το πείραμα μας σχεδιάστηκαν εκκινητές για την ενίσχυση των γονιδίων τόσο για την αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) όσο και για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Επειδή όπως προαναφέρθηκε στόχος μας είναι η παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) για την συμβατική PCR σχεδιάστηκαν εκκινητές που περιλάμβαναν πέρα από την αλληλουχία του γονιδίου-στόχος και με μια αλληλουχία 20-22nt του φαγικού υποκινητή T7 στο 5' άκρο (taatacgactcactataggg) με τη βοήθεια του εργαλείου IDSeq της ιστοσελίδας E-RNAi.

Για την qPCR, ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίστηκε στο PrimerQuest™ Tool της εταιρείας Intergrated DNA Technologies ,καθώς και στο Primer-BLAST του National Center for Biotechnology Information NCBI για την επιβεβαίωση της ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών στην αλληλουχία στόχος και την αποφυγή ενίσχυσης παραπροϊόντων.

Τέλος, έγινε χρήση του OligoAnalyzer Tool της Intergrated DNA Technologies για την εκτίμηση και σύγκριση της αξιοπιστίας αυτών των εκκινητών, καθώς μέσω αυτής της πλατφόρμας μπορεί να υπολογιστεί το ΔG για τον σχηματισμό ομοδιμερών και ετεροδιμερών και η Tm(°C) για τον σχηματισμό διατάξεων (hairpins). Ιδανικά θέλουμε το ΔG να είναι περισσότερο από -9 (ΔG > -9) και η Tm μικρότερη κατά 10°C από την Tm των εκκινητών (Tm+10<Primer Tm). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν εντέλει, τόσο για qPCR όσο και PCR, ήταν κι αυτοί που εμφάνισαν τα καλύτερα χαρακτηριστικά και παρουσιάζονται στο παράρτημα 1 στο τέλος της μελέτης.

3.2.2. PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που μιμείται την διαδικασία αντιγραφής του DNA και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνει την in vitro παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA. Οποιαδήποτε περιοχή οποιουδήποτε τμήματος DNA μπορεί να ενισχυθεί αρκεί να είναι γνωστές οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στα δύο άκρα της περιοχής ενδιαφέροντος.

Η τεχνική της PCR βασίζεται στην ικανότητα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA να αποδιατάσσεται και να επανασυντίθεται βάσει της συμπληρωματικότητας των

αζωτούχων βάσεων. Η ενίσχυση του DNA συνήθως γίνεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση I του βακτηρίου *Thermus aquaticus* (Ταq πολυμεράση) το οποίο έχει θερμοανθεκτική ιδιότητα, κάτι που την καθιστά ιδανική για την αντίδραση PCR.

Υλικά

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

Μέθοδος

Ανάλογα με τον αριθμό και το μέγεθος των δειγμάτων που θέλουμε να τρέξουμε στην αντίδραση της PCR, κατασκευάζουμε ένα μείγμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια χωρίς τη μήτρα DNA. Η μήτρα DNA του κάθε δείγματος τοποθετείται σε μικρού μεγέθους tubes που είναι εξειδικευμένα για την χρήση τους στο μηχάνημα της PCR.

Για κάθε δείγμα των 50μl χρειαζόμαστε:

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος (μL)/ Αντίδραση
Μήτρα DNA (cDNA 50h PBM)			4μL
Forward εκκινητής	10μM	0,4μM	2μL
Reverse εκκινητής	10μM	0,4μM	2μL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Ενζύμου	10X	1X	5μL
Mix dNTPs	10mM/νουκλ εοτίδιο	0,2mM/νουκλ εοτίδιο	1μL
MgCl₂	25mM	2mM	1μL
ddH₂O			34,6μL
KAPA Taq Πολυμεράση	5U/μL	0,5U	0,4μL
Τελικός Όγκος			50μL

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

Καλό είναι η Taq πολυμεράση να προστίθεται τελευταία, διότι είναι σημαντικό να διατηρείται στους -20°C για να εξασφαλίζεται η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου. Μετά την τοποθέτηση του μείγματος στα tubes που περιέχουν το DNA καλό θα ήταν να γίνει καλό ανακάτεμα με vortex πριν τα τοποθετήσουμε στο μηχάνημα της PCR.

3.2.3. Ενσωμάτωση T7 εκκινήτων

Επειδή στο πείραμα μας έχουμε σαν στόχο την τελική παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε εκκινήτες με T7 άκρα. Ο λόγος είναι διότι στο επόμενο στάδιο της *in vitro* μεταγραφής η T7 RNA πολυμεράση θα βοηθήσει στην παραγωγή των δίκλωνων μορίων RNA. 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. Επομένως, τα T7 άκρα πρέπει κατά τη διαδικασία της PCR να ενσωματωθούν στα τμήματα DNA που θα έχουν ενισχυθεί.

Τα στάδια, ο χρόνος και οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα μας για την PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

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

Table.2 Στάδια της PCR με T7 εκκινήτες.

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

3.2.4. qPCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου)

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). Η οπτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια φθορίζουσών ουσιών όπως η SYBR Green I (μη εξειδικευμένη πρόσδεση) η οποία δεν έχει κανέναν φθορισμό όταν είναι ελεύθερη, ενώ φθορίζει όταν ενσωματωθεί στην μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA.

Υλικά

- DNA/cDNA
- Εκκινήτες qPCR (Forward & Reverse)
- KAPA SYBR Mix (2X)
- ddH₂O
- Αιθανόλη 70%
- Χειρουργικά γάντια

- Plate qPCR
- Μεμβράνη κάλυψης plate
- Housekeeping γονίδιο

Μέθοδος

Το SYBR mix είναι ένα ετοιμόχρηστο μείγμα που περιέχει dNTPs, MgCl₂ και τη DNA πολυμεράση. Σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας πρέπει ο πάγκος του εργαστηρίου να έχει απολυμανθεί με αιθανόλη 70% και να φοράμε χειρουργικά γάντια για την αποφυγή επιμολύνσεων. Όλα τα αντιδραστήρια έκτος από το cDNA αναμειγνύονται έτσι ώστε να έχουμε ένα mix. Σε κάθε αντίδραση που τρέχουμε πρέπει να πραγματοποιείται ενίσχυση και κάποιου ιδιοσυστατού γονιδίου (housekeeping gene) όχι μόνο για την εξασφάλιση της ποιότητας των αντιδραστηρίων αλλά και για τη μετέπειτα κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης. Παραδείγματα housekeeping γονιδίων που χρησιμοποιούνται στα έντομα και ειδικότερα στο *A. albopictus* είναι τα Rps17, Rp132, Actin, α-tubulin και GAPDH (Dzaki & Azzam, 2018).

Μετά τον υπολογισμό των απαραίτητων ποσοτήτων, τα υλικά προστίθενται σε ειδικά για qPCR plates. Συνήθως για αποφυγή μόλυνσης το mix της αντίδρασης πρώτα τοποθετείται το mix στο plate και έπειτα προσθέτουμε το cDNA. Ακολουθεί επικάλυψη του plate με ειδική μεμβράνη, vortex και spin down.

Για τελικό όγκο αντίδρασης 15 μl, οι ποσότητες έχουν ως εξής:

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

Table.3 Αντιδραστήρια της qPCR.

3.3. Μέθοδοι παραγωγής dsRNA

3.3.1. *In Vitro* Transcription

Για την διαδικασία του *in vitro* transcription χρησιμοποιήθηκε το T7 MEGAscript kit και ως template το προϊόν της αντίδρασης PCR με τους T7 εκκινητές όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.2. Η παρουσία των T7 περιοχών που ουσιαστικά αποτελούν τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης καθιστούν εφικτή τη πρόσδεση της πολυμεράσης και τη σύνθεση του dsRNA.

Υλικά

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

Μέθοδος

Ανάλογα με την συγκέντρωση του DNA που έχουν τα δείγματά μας θα αυξομειωθεί ο όγκος DNA που θα λάβουμε και ο όγκος του νερού που θα συμπληρώσουμε έτσι ώστε να έχουμε τελική μάζα DNA=200ng. Την συγκέντρωση την έχουμε από την μέτρηση του DNA στο Quawell. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια τοποθετούνται στις ποσότητες που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα και ακολουθεί ήπια ανάδευση τους με την χρήση πιπέτας. Τα δείγματα αφήνονται για επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για 16 ώρες.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Mix ριβονουκλεοτιδίων (A/G/C/UTP)	8μl (2μl από το κάθε ριβονουκλεοτίδιο)
Προϊόν PCR με T7 άκρα	8μl
Reaction Buffer (10X)	2μl
Enzyme mix	2μl
Nuclease free H₂O	Συμπλήρωμα μέχρι τα 20μl
Τελικός όγκος	20μl

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

3.3.2. Επώαση με DNάση και κατακρήμιση dsRNA

Η επώαση με DNase γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση του template DNA. Η κατακρήμιση 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)
- Ice cold EtOH 70%
- Ice cold EtOH 100%
- ddH₂O

Μέθοδος

Τα βήματα για την εκτέλεση αυτής της μεθόδου είναι τα ίδια με αυτά της υποενότητας 3.1.2. με τη διαφορά ότι στα 20μl αντίδρασης *in vitro* μεταγραφής προστίθενται 1μl διάλυμα TURBO DNase και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 λεπτά. Επίσης, το διάλυμα μετά την προσθήκη του ddH₂O (115μl) και του Ammonium acetate (15μl) έχει όγκο 150μl, καθορίζοντας τους όγκους των υπόλοιπων αντιδραστηρίων.

3.4. Χορήγηση dsRNA μέσω μικροέγχυσης

Όλες οι παραπάνω τεχνικές έλαβαν μέρος σε αυτή την διπλωματική μελέτη έτσι ώστε να γίνει τελικώς χορήγηση των μορίων dsRNA των γονιδίων-στόχων με την μορφή μικροεγχύσεων σε ενήλικα κουνούπια *Ae. albopictus*.

Μέθοδος

1. Πριν την έναρξη της διαδικασίας των μικροεγχύσεων, τοποθετούμε τα κουνούπια σε μικρά δοχεία και τα αφήνουμε σε ψυχρό περιβάλλον (4°C) έως ότου αναισθητοποιηθούν.
2. Παράλληλα καθαρίζουμε τον πάγκο στον οποίο θα εργαστούμε με αιθανόλη 70%.
3. Διαλέγουμε μια γυάλινη βελόνα και κάτω απο το μικροσκόπιο σπάμε προσεκτικά της άκρη της έτσι ώστε να είναι αρκετά αιχμηρή αλλά μικρης σχετικά διατομής ώστε να μην προκαλέσουμε μεγάλο τραυματισμό στα κουνούπια μας.
4. Γεμίζουμε την βελόνα μας με mineral oil πολύ προσεκτικά έτσι ώστε να μην εισέλθει αέρας εντός της βελόνας. Γεμίζουμε μέχρι να στάξει το έλαιο από την σπασμένη άκρη της βελόνας.
5. Συναρμολογούμε την συσκευή των μικροεγχύσεων βάση των οδηγιών της συσκευασίας και στην άκρη της τοποθετούμε την γυάλινη βελόνα.
6. Με την χρήση πιπέτας τοποθετούμε σε parafilm 3-4μl του dsRNA που θα χρησιμοποιήσουμε.
7. Με την βοήθεια μαλακού χαρτιού καθαρίζουμε ελαφρά την άκρη της βελόνας απο το έλαιο που υπάρχει και κρατώντας την αντλία σε κάθετη κλίση αντλούμε το dsRNA από την επιφάνεια του parafilm. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε η άκρη της βελόνας να είναι πάντα μέσα στο υλικό ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα εντός της βελόνας. Για αυτό και η διαδικασία πρέπει να γίνεται κάτω απο το μικροσκόπιο.
8. Τα αναισθητοποιημένα κουνούπια τοποθετούνται πάνω σε μια πλάκα απο την οποία διοχετεύεται συνεχώς CO₂ ώστε να παραμείνουν αναίσθητα κατά την διάρκεια της διαδικασίας και διαχωρίζονται σε αρσενικά και θηλυκά.
9. Μετά τον διαχωρισμό ακολουθεί η μικροέγχυση του dsRNA στα θηλυκά κουνούπια με την χρήση του NANOJECT II. Η διάτρηση γίνεται είτε μεταξύ του θώρακα και του πρώτου κοιλιακού τμήματος είτε στο μεσαίο τμήμα του θώρακος.

10. Κάθε θηλυκό κουνούπι μετά την διαδικασία μικροέγχυσης τοποθετείται σε ξεχωριστό δοχείο και αφήνεται 72 ώρες σε απόλυτο σκοτάδι ώστε να μπορέσουν να μετρηθούν τα ωά που εναπόθεσε ξεχωριστά.
11. Μετά το πέρας της διαδικασίας της μικροέγχυσης, γίνεται καθαρισμός της συσκευής και του πάγκου εργασίας.

3.5. Συνθήκες εργαστηρίου

Οι συνθήκες του εργαστηρίου στο οποίο έγιναν τα πειράματα ήταν σταθερές και προσπαθούσαν να μιμηθούν το φυσικό περιβάλλον διαβίωσης του κουνουπιού *Ae. albopictus*. Η θερμοκρασία ήταν στους 26°C και η σχετική υγρασία στο 55-65%. Η διάρκεια της ημέρας είχε ρυθμιστεί στις 14h ενώ της νύχτας στις 10h.

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκκόλαψη των ωών και την ανάπτυξη των προνυμφών, μετά την συλλογή του αφήνονταν 3 μέρες για να εξέλθει μέρος του οξυγόνου που υπάρχει φυσιολογικά μέσα του και να “μεστώσει” έτσι ώστε να παρομοιάζεται με στάσιμα νερά. Στο “μεστωμένο” νερό γίνονταν προσθήκη κονιορτοποιημένης ξηράς τροφής για γάτες έτσι ώστε να δημιουργηθούν τα απαραίτητα για την διατροφή των προνυμφών βακτήρια. Τα ενήλικα έντομα τρέφονταν με ζαχαρόνερο 10% για την διατήρησή τους, ενώ σε αυτά που είχαν γίνει μικροεγχύσεις δίνονταν ανθρώπινο αίμα.

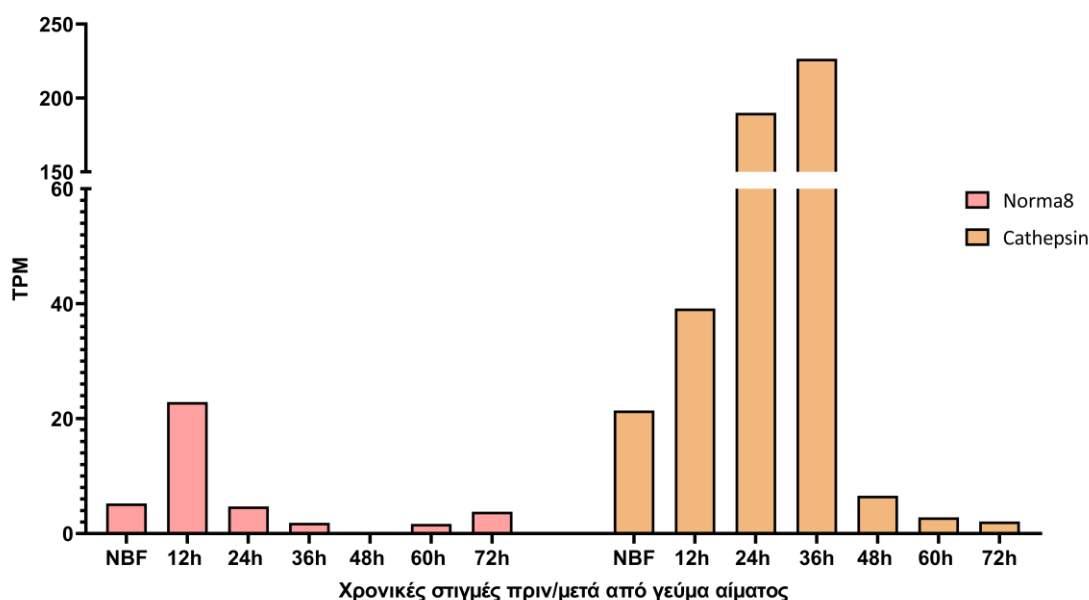
Η διαβίωση των κουνουπιών γίνονταν σε κλουβιά ειδικά για έντομα στα οποία υπήρχε οπή για να διευκολύνεται η εισαγωγή του χεριού σε περίπτωση ταΐσματος.

4. Αποτελέσματα έρευνας

4.1. Ανάλυση RNAseq δεδομένων

Για τον σχεδιασμό της παρούσας διπλωματικής λήφθηκαν υπόψιν τα βιβλιογραφικά δεδομένα που είχαμε από την δημοσίευση με ηλεκτρονική διεύθυνση <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31964684/>. Σε αυτά τα δεδομένα είναι φανερή η διαφορά έκφρασης των γονιδίων-στόχων όταν αναλύουμε τις ωθήκες σε σχέση με αυτές του υπόλοιπου σώματος του κουνουπιού *Ae.albopictus*. Αυτό αποδεικνύει ότι τα γονίδια που επιλέχθηκαν έχουν ιστοειδικότητα.

Το παρακάτω γράφημα (Graph.1) απεικονίζει το προφίλ έκφρασης των γονιδίων Norma8 και Cathe1 στα διάφορα time-points πριν και μετά το γεύμα αίματος (NBF, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h) στις ωθήκες όπως εμφανίζονται στην παραπάνω δημοσίευση. Οι τιμές από τις οποίες δημιουργήθηκε το γράφημα παραθέτονται στο παράρτημα II.

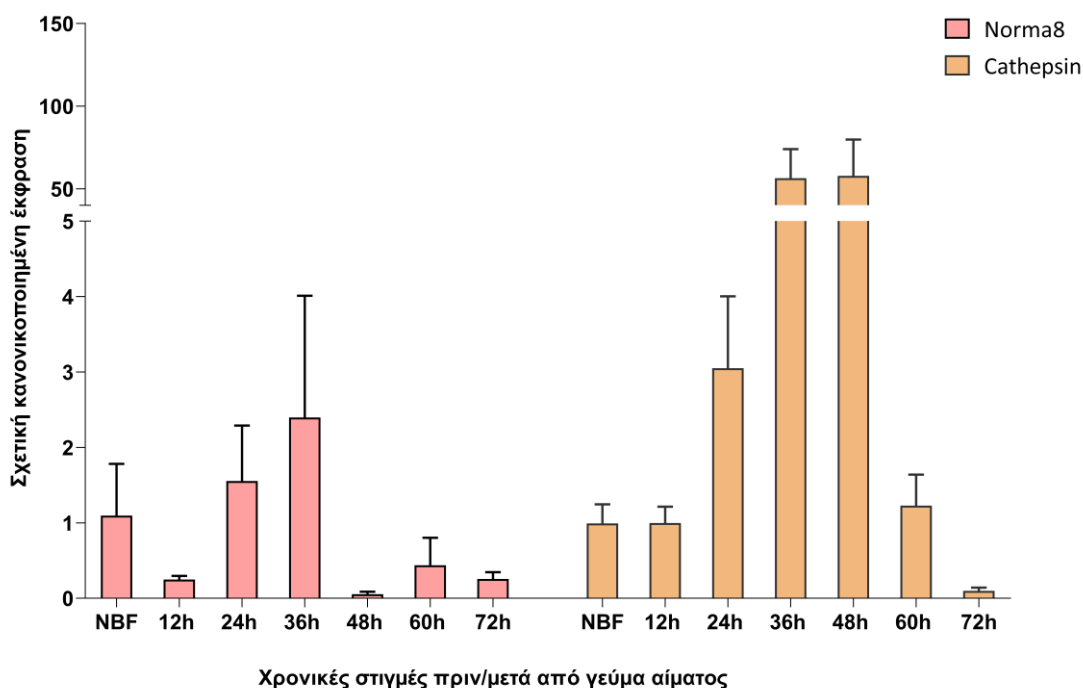


Graph.1 Γράφημα με δεδομένα από δημοσίευση (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31964684/>) που απεικονίζει τα γονίδια Norma8 και Cathe1 στα διάφορα time-points στις ωθήκες του *Ae.albopictus*. Για κάθε time-point έχει οριστεί ως control το NBF(Non-Blood Fed).

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα το Norma8 δείχνει έκφραση στα ovaries των κουνουπιών 12h μετά το γεύμα αίματος, ενώ η Cathe1 υπερεκφράζεται 24h και 36h μετά την λήψη αίματος.

Για να επιβεβαιωθεί το παραπάνω προφίλ έκφρασης στον πληθυσμό του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) με ωθήκες που λήφθηκαν σε 7 διαφορετικά time-points πριν και μετά το γεύμα αίματος (NBF, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h). Ως housekeeping γονίδια χρησιμοποιήθηκαν το RpL32 και το RpS17. Στο γράφημα που ακολουθεί απεικονίζονται τα αποτελέσματα της qPCR (Graph.2). Στην qPCR που

πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο βλέπουμε μεγάλη απόκλιση στα αποτελέσματα και των δυο γονιδίων. Στην ανάλυση που κάναμε παρατηρήθηκε αισθητή έκφραση του Norma8 36h μετά το γεύμα αίματος στις ωθήκες, ενώ η Cathe1 δείχνει υπερέκφραση στις 36h και στις 48h. Οι τιμές από τις οποίες δημιουργήθηκε το γράφημα παραθέτονται στο παράρτημα II.



Graph. 2 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του Norma8 και της Cathe1 στις ωθήκες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές πριν και μετά το γεύμα αίματος

Με βάση αυτά τα δεδομένα προχωρήσαμε σε χρήση του DNA ωθηκών 36h μετά το γεύμα αίματος για όλες τις επόμενες τεχνικές που ακολούθησαν.

4.2. Ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων

Για την έρευνα μας επιλέχθηκε ένα γονίδιο-στόχος το οποίο εκφράζεται στις ωθήκες μετά από το γεύμα αίματος καθώς και μία καθεψίνη που βρίσκεται κοντά σε αυτό το γονίδιο-στόχο. Το εν λόγω γονίδιο ονομάστηκε Norma8 (NON-coding Rna in Mosquito onAries) και η κοντινή σε αυτό καθεψίνη ονομάστηκε Cathe1. Η ενίσχυση της αλληλουχίας του Norma8 και της Cathe1 έγινε με την χρήση εκκινητών με T7 άκρα όπως παρουσιάζονται στην παράγραφο 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 36h μετά το γεύμα αίματος.

Για να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το πήκτωμα διέθετε 6 θέσεις φορτώματος δειγμάτων:

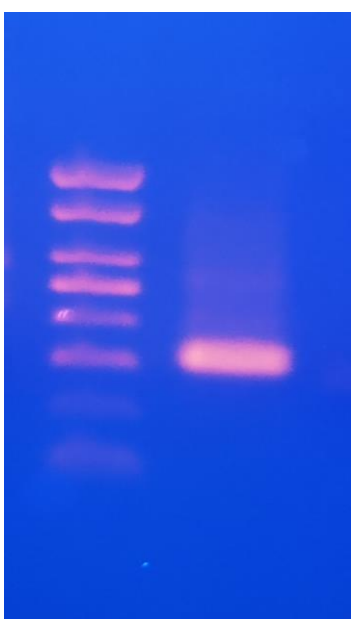
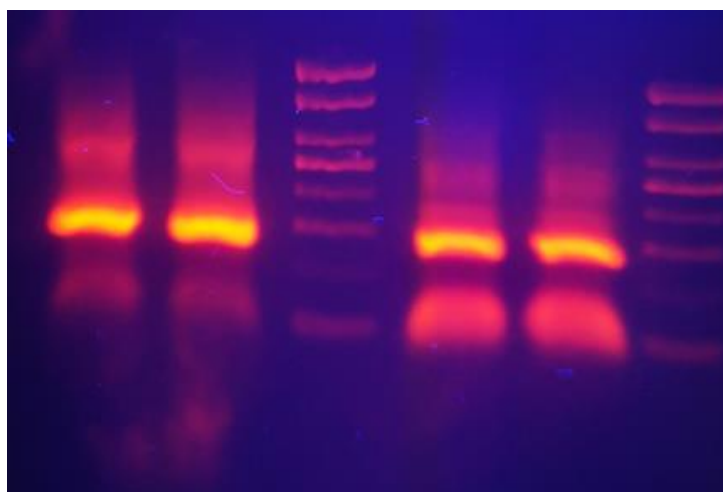
- Τη 1η και τη 2η θέση καταλαμβάνει το γονίδιο-στόχος της Καθεψίνης(Cathe1)

- Στη 3η και την 6η θέση χρησιμοποιήθηκε το Ladder 100 bp DNA της enzyQuest ως μάρτυρας
- Στη 4η θέση έχουμε το για το cDNA θηλυκού ατόμου 36h μετά το γεύμα αίματος και
- Στη 5η θέση το cDNA θηλυκού ατόμου 48h μετά το γεύμα αίματος.

Στα 50μl όγκου αντίδρασης προστέθηκαν 5μl loading buffer (6x Loading Dye) και το δείγμα φορτώθηκε σε 2 θέσεις επί 2 φορές, με τον όγκο κάθε πηγαδιού να αντιστοιχεί σε 28μl. Από τον μάρτυρα φορτώθηκαν 30μl.

Το amplicon της PCR για την *Cathe1*, χωρίς τα T7 άκρα έχει μήκος 247 bp ενώ για το *Norma8* έχει μήκος 288 bp. Με την προσθήκη των T7 εκκινήτων προστίθενται και ακόμα 38 bp σε κάθε amplicon. Στην εικόνα 12 φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης για την *Cathe1*, όπου διακρίνεται η ζώνη γύρω στα 280 bp, ελάχιστα χαμηλότερα από τη ζώνη των 300 bp του μάρτυρα, ενώ στην εικόνα 13 βρίσκεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης για το *Norma8* που δείχνει την ζώνη του γονιδίου λίγο πάνω από την ζώνη των 300bp.

Fig.23 Ηλεκτροφόρηση της PCR για τη Cathe1 με τη χρήση T7 εκκινήτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στο πηγαδάκι 1 και 2 βρίσκεται η Cathe1, στο πηγαδάκι 3 και 6 τοποθετήθηκε ο Ladder 100bp DNA της enzyQuest (Μάρτυρας), στο πηγάδι 4 το cDNA 36h ενώ στο πηγάδι 5 το cDNA 48h στο κουνούπι Aedes albopictus.



Ακολούθησε απομόνωση και των δυο ζωνών που εντοπίστηκαν κοντά στα 300bp από το πήκτωμα αγαρόζης 1% για την *Cathe1* και της μίας ζώνης αντίστοιχα για το *Norma8* με τη μέθοδο του Gel extraction και τη χρήση του kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

Fig.24 Ηλεκτροφόρηση της PCR για το Norma8 με τη χρήση T7 εκκινήτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στο 1ο πηγάδι τοποθετήθηκε ο μάρτυρας (Ladder) 100 bp DNA της enzyQuest ενώ στο 2ο πηγάδι βρίσκεται το γονίδιο-στόχος Norma8.

4.3. Παραγωγή dsRNA

Μετά την απομόνωση του DNA μέσω του Gel extraction, μετρήθηκε η συγκέντρωση του στο φασματοφωτόμετρο Quawell, η οποία ήταν 22.3 ng/μl και η μάζα του υπολογίστηκε στα 312 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 παράγραφο 3.4). Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία των T7 άκρων οδηγούν την T7 πολυμεράση να δράσει και να παράξει αρχικά μονόκλινα RNA, τα οποία αργότερα υβριδίζονται με τα συμπληρωματικά τους και σχηματίζουν δίκλινα μόρια RNA (dsRNAs). Για τον κατακερματισμό των μορίων DNA που απέμειναν μετά την in vitro μεταγραφή έγινε επώασης με DNase και για την απομάκρυνση των ενζύμων, των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των αντιδραστηρίων έγινε χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης.

Το διάλυμα των dsRNAs για την καθεψίνη *Cathe1* και του γονιδίου *Norma8* 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 του dsRNA για την *Cathe1* προσδιορίστηκε στα 5.920ng/μl ενώ για το *Norma8* στα 6.520ng/μl. Για να είναι σωστό το πείραμα μας αποφασίστηκε ότι η τελική συγκέντρωση του κάθε γονιδίου θα πρέπει να είναι 5.000ng/μl για αυτό τον λόγο έγινε χρήση νέου tube στο οποίο έγινε χρήση 8,5μl dsRNA *Cathe1* και 1,5μl H₂O έτσι ώστε σε τελικό όγκο 10μl η συγκέντρωση να είναι 5.000ng/μl. Το ίδιο εφαρμόστηκε και στο *Norma8* το οποίο επίσης αραιώθηκε ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 5.000ng/μl.

Πριν την αποθήκευση της υπόλοιπης ποσότητας του διαλύματος των dsRNAs στους -80oC, έγινε ηλεκτροφόρηση των διαλύματος σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp ladder της Minotech για την επιβεβαίωση παραγωγής των κατάλληλων dsRNAs.

4.4. Ενίσχυση γονιδίου GFP και δημιουργία dsRNA

Για να εκτιμηθεί αν η διαδικασία χορήγησης των dsRNA έγινε σωστά, αποφασίστηκε να γίνει χορήγηση dsRNA του γονιδίου GFP (από τον πλασμιδιακό φορέα Pub-nls-EGFP) στα κουνούπια του πειράματος. Το GFP δεν υπάρχει φυσιολογικά στο γονιδίωμα των κουνουπιών και έτσι δεν μπορεί να στοχευθεί από τα dsRNA. Αυτό το γεγονός το καθιστά κατάλληλο ως δείγμα Control. Το τμήμα GFP που χρησιμοποιήθηκε, ενισχύθηκε μέσω PCR με τη χρήση των εξής T7 εκκινητών:

taatacgactcactatagggCCGCCAGTGTGCTGGAA (Forward)

&

taatacgactcactatagggGATATCTGCAGAATTCGCC (Reverse)

Μετά την διαδικασία ενίσχυσης με χρήση της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με 100 bp ladder της Minotech και αναμενόμενη ζώνη στα 500 bp. Έγινε απομόνωση της ζώνης ενίσχυσης με την

μέθοδο Gel extraction και μετρήθηκε η συγκέντρωση της στο φασματοφωτόμετρο Quawell, η οποία προσδιορίστηκε στα 106,5 ng/μl.

Αφού ακολουθήθηκαν οι μέθοδοι της *in vitro* transcription, της επώασης με DNase και της κατακρήμνιση των dsRNAs, μετρήθηκε η συγκέντρωση των dsRNAs στο φασματοφωτόμετρο Quawell, η οποία βρέθηκε ίση με 7,535μg/μl και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% με 100 bp ladder της Minotech.

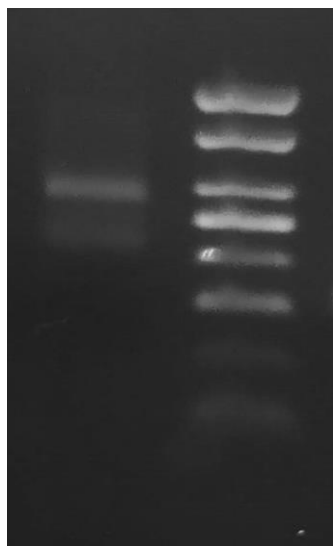


Fig. 25 Ηλεκτροφόρηση της PCR για ενίσχυση του GFP με χρήση T7 εκκινήτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Στο πρώτο πηγαδάκι βρίσκεται το ενισχυμένο GFP ενώ στο δεύτερο βρίσκεται ο μάρτυρας (ladder) 100bp της Minotech.



Fig. 26 Ηλεκτροφόρηση του dsRNA GFP σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στο πρώτο πηγαδάκι βρίσκεται ο μάρτυρας (ladder) 100 bp της Minotech και στο δεύτερο το dsRNA του GFP.

4.5. Εφαρμογή dsRNA και παρατήρηση φαινοτύπου

Τα δίκλινα μόρια RNA που στοχεύουν τα γονίδια Norma8, Cathe1 και GFP αντίστοιχα μέσω του μηχανισμού RNAi χορηγήθηκαν σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια. Σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν η παρατήρηση του φαινοτύπου μέσα από την καταμέτρηση των ωών που κάθε θηλυκό εναπόθεσε. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να εκτιμηθεί κατά πόσο η σίγηση του κάθε γονιδίου έχει κάποια επίπτωση στην αναπαραγωγική ικανότητα του κουνουπιού *Ae. albopictus*.

Η χορήγηση των dsRNA έγινε μέσω μικροεγχύσεων (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. Αμέσως μετά την διαδικασία της μικροέγχυσης χορηγήθηκε αρχικά ζαχαρόνερο έτσι ώστε να ανακάμψουν γρηγορότερα και τις επόμενες μέρες χορηγήθηκε αίμα στα άτομα που επιβίωσαν. Τα θηλυκά έντομα που κατανάλωσαν αίμα τοποθετήθηκαν χωριστά το ένα από το άλλο σε φιαλίδια στα οποία είχε τοποθετηθεί εμποτισμένο με νερό βαμβάκι και από την πάνω πλευρά ένα κομμάτι φίλτρου. Κάθε 24 ώρες επαναλαμβάνονταν η ενυδάτωση των βαμβακιών έτσι ώστε

πάντα να υπάρχει διαθέσιμη υγρασία μέσα στο φιαλίδιο. Τα έντομα αφέθηκαν για 72h σε συνθήκες σκότους και αργότερα καταμετρήθηκαν τα ωά τα οποία το κάθε έντομο εναπόθεσε.

Η καταγραφή των ωών όπου τα έντομα απόθεσαν βοηθάει στο να κατανοήσουμε αν υπάρχει σύνδεσης των γονιδίων που στοχεύθηκαν με την μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας του *Ae.albopictus*.

Έτσι λοιπόν στο πείραμα μας, για την κάθε συνθήκη λάβαμε συνολικά υπόψιν μας 45 ενήλικα θηλυκά έντομα. Έγιναν 4 επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη με έντομα που προέρχονταν από την ίδια μέρα εκκόλαψης κάθε φορά.

Στο παρακάτω γράφημα (Fig) απεικονίζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα από την παρατήρηση του φαινοτύπου της ωοαπόθεσης μεταξύ των Untreated (Control 1), των GFP (Control 2), των Norma8 και των Cathe1 ατόμων. Ο άξονας y αντιστοιχεί στον αριθμό των ωών, ενώ στον άξονα x υπάρχουν οι διάφορες συνθήκες όπως αναφέρθηκαν παραπάνω.

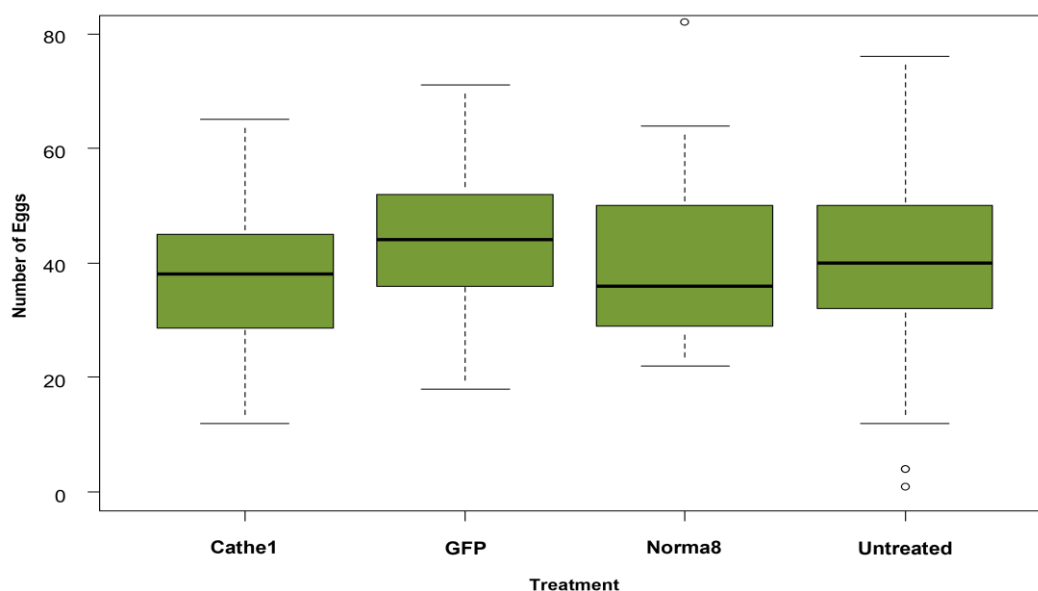


Fig.27 Διάγραμμα παρουσίασης του φαινοτύπου του κάθε γονιδίου ως προς την απόθεση ωών με πρώτη συνθήκη το γονίδιο της Καθειψίνης (Cathe1), δεύτερο το γονίδιο GFP, τρίτο το γονίδιο Norma8 και τελευταία τα Untreated άτομα.

5. Συζήτηση

Η μεγάλη εξάπλωση, η πλαστικότητα στην διατροφή και στον τρόπο διαβίωσης καθώς και η πληθώρα των ωών που μεταδίδει καθιστούν το *Ae. albopictus* έναν πολύ σοβαρό εχθρό του ανθρώπινου είδους. Για αυτό τον λόγο, προτεραιότητα των επιστημόνων σε όλο τον κόσμο είναι η ανακάλυψη αποτελεσματικών μεθόδων καταπολέμησης του χωρίς όμως να επηρεάζονται άλλοι οργανισμοί μη-στόχοι. Βασικός τρόπος καταπολέμησης του είναι μέσω ανακάλυψης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών εντόμων του είδους και η στόχευση τους με γονιδιακές τεχνικές. Οι καθεψίνες είναι επίσης γονίδια που έχουν διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες και για αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ίδιο λόγο. Η παρούσα διπλωματική εργασία αξιοποίησε τον μηχανισμό αποσιώπησης RNAi μετά από χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA με μικροέγχυση σε θηλυκά έντομα. Για την εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα lncRNAs ενός γονιδίου που ονομάστηκε Norma8 και μιας Καθεψίνης που ονομάστηκε Cathe1. Στόχος ήταν η ανακάλυψη της πιθανής εμπλοκής αυτών των γονιδίων στην απόθεση ωών.

Η επιλογή των γονιδίων έγινε από RNAseq δεδομένα (Gamez, Antoshechkin, Mendez-Sanchez, & Akbari, 2020) στα οποία τα γονίδια αυτά έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στις ωοθήκες πριν το γεύμα αίματος και εκφράζονται σε κάποια χρονική στιγμή μετά από αυτό. Τα δεδομένα αυτά στηρίχθηκαν στο assembly canu_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).

Με βάση τα παραπάνω σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την PCR και την qPCR. Αφού πρώτα έγινε qPCR σε δείγματα ωοθηκών που πάρθηκαν σε 7 διαφορετικά χρονικά σημεία πριν και μετά το γεύμα αίματος για την επιβεβαίωση των RNAseq δεδομένων που υπήρχαν, επιλέχθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων στην PCR τα δείγματα από τις ωοθήκες θηλυκών ατόμων 36h μετά το γεύμα αίματος. Επιλέχθηκε αυτό το χρονικό σημείο γιατί και τα 2 γονίδια εκφράζονταν, είτε λιγότερο είτε περισσότερο, σε αυτό. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης της κατάλληλης αλληλουχίας.

Για την PCR επιλέχθηκαν T7 εκκινητές οι οποίοι λειτουργούν σαν υποκινητές για την T7 RNA πολυμεράση, κάτι που πυροδότησε την *in vitro* μεταγραφή και έτσι την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA). Το μέγεθος τους επιβεβαιώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Αυτές οι διαδικασίες έγιναν και για το γονίδιο GFP, το οποίο δεν συναντάται στο γονιδίωμα των κουνουπιών και έτσι λειτούργησε ως δεύτερο Control για να εκτιμηθεί η ποιότητα της μεθόδου χορήγησης των dsRNA μέσω μικροέγχυσης, ενώ σαν πρώτο Control αξιοποιήθηκαν τα κουνούπια που δεν τους είχε γίνει κάποια χορήγηση (Untreated).

Μετά την χορήγηση των dsRNA μέσω μικροέγχυσης παρατηρήθηκε ο φαινότυπος μέσω της καταγραφής των ωών που κάθε ενήλικο απέθεσε. Η καταγραφή έδειξε ότι συγκριτικά με τα Untreated και αυτά που τους είχε γίνει χορήγηση dsRNA GFP, τα Norma 8 και Cathe1 παρουσιάζουν ελαφρώς μειωμένη απόθεση. Σε αυτό το σημείο καλό είναι να αναφερθεί, ότι η περίπτωση απόθεσης λιγότερων ωών λόγω στρες που προκλήθηκε μετά την μικροέγχυση δεν ισχύει διότι ο φαινότυπος των Untreated και αυτών που τους έγινε χορήγηση GFP είναι ο ίδιος.

Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η διαδικασία της εισαγωγής των dsRNA ελάχιστα επηρέασε την απόθεση των ωών. Η ελαφρώς μειωμένη απόθεση σε ότι αφορά τα Norma 8 και Cathe1 μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι πρώτον η προσέγγιση μας ήταν τέτοια ώστε να προκληθεί σίγηση και όχι αποκοπή του γονιδίου κάτι που δικαιολογεί το γιατί δεν παρατηρήθηκε πιο έντονη μείωση της απόθεσης. Δεύτερον, μπορεί να οφείλεται στην άνιση κατανομή των dsRNA μορίων ή στην χαμηλή ποσότητα διαλύματος dsRNA που χορηγήθηκε (138nl). Και τέλος, υπάρχει και η σκέψη ότι τα γονίδια παίζουν κάποιο άλλο βιολογικό ρόλο, όχι όμως τόσο σημαντικό για την αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου.

Συμπερασματικά, από την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Norma8 και Cathe1 προέκυψαν κάποια ενδιαφέροντα αποτελέσματα που υποδηλώνουν ότι τα lncRNAs αυτών των γονιδίων μπορεί να έχουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην αναπαραγωγική ικανότητα του *Ae.albopictus*. Για να γίνει επαλήθευση των παραπάνω, ορθότερο θα ήταν στο μέλλον να πραγματοποιηθεί η τεχνική του knock-out στα γονίδια αυτά έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν πράγματι εμπλέκονται στην αναπαραγωγική ικανότητα του εντόμου, καθώς επίσης να παρατηρηθεί και το hatching rate των ωών που τα εμβολιασμένα ενήλικα απόθεσαν.

Αν μετά από την επιβεβαίωση της καταστολής προκύψουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, θα μπορούσε η μέθοδος να εφαρμοστεί με κάποιον άλλο τρόπο χορήγησης που θα της επιτρέπει να έχει καλύτερη απόδοση σε μεγάλη κλίμακα, όπως είναι η χορήγηση των dsRNA μέσω τροφής και κατανάλωσης βακτηρίων, διότι η μέθοδος των μικροεγχύσεων δεν μπορεί να εφαρμοστεί πρακτικά έξω από τις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου.

6. Βιβλιογραφία

- Attardo, G. M., Hansen, I. A., & Raikhel, A. S. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), 661-675.
- 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(2), 65-71.
- Black IV, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M. a., . . . Beaty, B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of medical research*, 33(4), 379-388.
- 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.
- Briegel, H., & Timmermann, S. E. (2001). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): physiological aspects of development and reproduction. *Journal of medical entomology*, 38(4), 566-571.
- 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.
- 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(1), 1-12.
- 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.
- Gao, Q., Cao, H., Fan, J., Zhang, Z., Jin, S., Su, F., . . . Xiong, C. (2019). Field evaluation of Mosq-ovitrap, ovitrap and a CO₂-light trap for *Aedes albopictus* sampling in Shanghai, China. *PeerJ*, 7, e8031.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 480-496.
- 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.
- Hawley, W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1, 1-39.
- Kauffman, E. B., & Kramer, L. D. (2017). Zika virus mosquito vectors: competence, biology, and vector control. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_10), S976-S990.
- Kobayashi, M., Nihei, N., & Kurihara, T. (2002). Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *Journal of Medical Entomology*, 39(1), 4-11.
- Kraemer, M. U., Reiner, R. C., Brady, O. J., Messina, J. P., Gilbert, M., Pigott, D. M., . . . Marczak, L. B. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature microbiology*, 4(5), 854-863.
- Lopez, S. B. G., Guimarães-Ribeiro, V., Rodriguez, J. V. G., Dorand, F. A., Salles, T. S., Sá-Guimarães, T. E., . . . Moreira, M. F. (2019). RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Lounibos, L. P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, 47(1), 233-266.
- Mitchell, C. (1995). Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *Journal of vector ecology*, 20(1), 44-58.
- Mori, A., Romero-Severson, J., Black, W., & Severson, D. (2008). Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). *Heredity*, 101(1), 75-82.
- Nawrocki, S., & Hawley, W. (1987). Estimation of the northern limits of distribution of *Aedes albopictus* in North America. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 314-317.

- 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.
- Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual review of entomology*, *37*(1), 217-251.
- 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.
- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G., & Vakalis, N. (2005). Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin*, *19*, 10-12.
- Santos, S. R., Taylor, D. J., Kinzie Iii, R. A., Hidaka, M., Sakai, K., & Coffroth, M. A. (2002). Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, *23*(2), 97-111.
- Scholte, E.-J., & Schaffner, F. (2007). 14. Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*, *1*, 241.
- 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.
- Sprenger, P. R. D. (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*, *3*, 494.
- Tabachnick, W. J. (1991). Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. *American Entomologist*, *37*(1), 14-26.
- Abdurakhmonov, I. Y. (2016). RNA Interference—A Hallmark of Cellular Function and Gene Manipulation. *RNA Interference. In-Tech*, 1-18.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*, *67*(4), 657-685.
- Ahmad, N. A., Vythilingam, I., Lim, Y. A., Zabari, N. Z. A. M., & Lee, H. L. (2017). Detection of *Wolbachia* in *Aedes albopictus* and their effects on chikungunya virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *96*(1), 148.
- Airs, P. M., & Bartholomay, L. C. (2017). RNA interference for mosquito and mosquito-borne disease control. *Insects*, *8*(1), 4.
- Bellini, R., Balestrino, F., Medici, A., Gentile, G., Veronesi, R., & Carrieri, M. (2013). Mating competitiveness of *Aedes albopictus* radio-sterilized males in large enclosures exposed to natural conditions. *Journal of medical entomology*, *50*(1), 94-102.
- 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.
- Bond, J. S., & Butler, P. E. (1987). Intracellular proteases. *Annual review of biochemistry*, *56*(1), 333-364.
- Chen, L.-L., & Carmichael, G. G. (2010). Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Current opinion in cell biology*, *22*(3), 357-364.
- 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.
- 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.
- Deitsch, K., & Raikhel, A. (1994). Cloning and analysis of the locus for mosquito vitellogenic carboxypeptidase. *Insect molecular biology*, *2*(4), 205-213.
- Duman-Scheel, M. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) as an interfering RNA expression and delivery system. *Current drug targets*, *20*(9), 942-952.
- Dzaki, N., & Azzam, G. (2018). Assessment of *Aedes albopictus* reference genes for quantitative PCR at different stages of development. *PloS one*, *13*(3), e0194664.
- 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.

- Faghihi, M. A., & Wahlestedt, C. (2009). Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(9), 637-643.
- 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.
- Fatica, A., & Bozzoni, I. (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 15(1), 7-21.
- 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.
- 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: Genes, Genomes, Genetics*, 10(3), 1051-1062.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640.
- Hays, A. R., & Raikhel, A. S. (1990). A novel protein produced by the vitellogenic fat body and accumulated in mosquito oocytes. *Roux's archives of developmental biology*, 199(2), 114-121.
- Hoffmann, A. A., Montgomery, B., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P., Muzzi, F., . . . Dong, Y. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361), 454-457.
- Isoe, J., Koch, L. E., Isoe, Y. E., Rascón Jr, A. A., 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.
- 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.
- Kandul, N. P., Liu, J., Wu, S. L., Marshall, J. M., & Akbari, O. S. (2019). Transforming insect population control with precision guided sterile males with demonstration in flies. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- Koliopoulos, G., Lytra, I., Michaelakis, A., Kioulos, E., Giatropoulos, A., & Emmanuel, N. (2008). Asian tiger mosquito. *First record in Athens. Agriculture crop and animal husbandry*, 9, 68-73.
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell*, 172(3), 393-407.
- Kumar, D., Hu, X., Guo, R., Xue, R., Cao, G., & Gong, C. (2018). Long noncoding RNA: Disclosing new horizon in the molecular world of insects. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology*, 85-102.
- KURATA, S., SAITO, H., & NATORI, S. (1992). Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga peregrina*. *European journal of biochemistry*, 204(2), 911-914.
- Li, L., Eichten, S. R., Shimizu, R., Petsch, K., Yeh, C.-T., Wu, W., . . . Fowler, J. E. (2014). Genome-wide discovery and characterization of maize long non-coding RNAs. *Genome biology*, 15(2), 1-15.
- LI, M.-z., XIAO, H.-m., Kang, H., & Fei, L. (2019). Progress and prospects of noncoding RNAs in insects. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(4), 729-747.
- Lopez, S. B. G., Guimarães-Ribeiro, V., Rodriguez, J. V. G., Dorand, F. A., Salles, T. S., Sá-Guimarães, T. E., . . . Moreira, M. F. (2019). RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Mamta, B., & Rajam, M. (2017). RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 487-501.
- Mattick, J. S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 316-323.
- Medina, M., & Vallejo, C. G. (1989). A serine proteinase in *Drosophila* embryos: yolk localization and developmental activation. *Insect Biochemistry*, 19(7), 687-691.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics*, 10(3), 155-159.
- Moffat, J., & Sabatini, D. M. (2006). Building mammalian signalling pathways with RNAi screens. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(3), 177-187.
- Organization, W. H. (2017). Key points and Q&A: framework for a national plan for monitoring and management of insecticide resistance in malaria vectors (2017): World Health Organization.

- Padron, A., Molina-Cruz, A., Quinones, M., Ribeiro, J. M., Ramphul, U., Rodrigues, J., . . . Barillas-Mury, C. (2014). In depth annotation of the *Anopheles gambiae* mosquito midgut transcriptome. *BMC genomics*, *15*(1), 1-14.
- 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.
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, *136*(4), 629-641.
- Poole, A., Tiltman, K., Recklies, A., & Stoker, T. (1978). Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature*, *273*(5663), 545-547.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, *123*(4), 621-629.
- Reisen, W. K. (2003). Lessons from the past: an overview of studies by the University of Maryland and the University of California, Berkeley. *Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes*, *2*, 25-32.
- 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. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(141), e58650.
- Satyavathi, V., Ghosh, R., & Subramanian, S. (2017). Long non-coding RNAs regulating immunity in insects. *Non-coding RNA*, *3*(1), 14.
- 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.
- 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.
- Terra, W. R., Ferreira, C., & Garcia, E. S. (1988). Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry*, *18*(5), 423-434.
- 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).
- Yamamoto, Y., Takimoto, K., Izumi, S., Toriyama-Sakurai, M., Kageyama, T., & Takahashi, S. Y. (1994). Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biochemistry*, *116*(6), 1330-1335.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., . . . Smagghe, G. (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect science*, *20*(1), 4-14.

Παράρτημα I

Στο παράρτημα αυτό παρουσιάζονται τα στοιχεία των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής.

Gene ID	XR_002129056.1	XM_019678769.1
Prediction		cathepsin M-like
Name	Norma8	Cathepsin
Transcript length	505 bp	414bp
Transcript seq	<p>AATACCCATTTTTATCTTCTCATTGAGCTCAGC AATGGGTGTTTTTACTCTTAATGGGTGAAAA AATAGTTCTCAAAGAATCTAGTCTGTTGGTGAA GCAAAATATTATTTTTCAAAGAATCCCAAGA AGTTTCTGTGAATGTCAGACATAAATTACAGAA ATATCAATGCGACACTACCGGAGAAGCTAACC TCGAAGCTAACTTACGGCTACTGGAACGGCA TTACGCCGATTTTCTACGATTATGGAATACCTAT GCATCCGATAACACCATGGACCGAAACCCATC CAAAATGATTAATGGTACGAGATCCGGCGAA ACTGCCGAGTTGAACGCAGGAGCGAGGGCAG GAGCTGCAGCTGGCTGAGAAGGAACATGTTG AACCTTCTGCTAGTGAACCGGAATAATGAATAT GATTTAGCGAAACATGTAACATTTTATATAATT CAATGGTGATATCAATAAAAAATAAAGTGAAACT GGTGATTTTTAA</p>	<p>ATGACAACGAATGCTTACGCCAGTCAGCGGG TACGTGTCGCTTCAATTCGGACTTGCCATCTG CAACATCAGTGATTGGGGAATATTGCCAAAGA AGGAAGATGCCCTAGCTTTTGCCGTGTGGAAG ATAGGACCAATCCCGTCAGCTTGAACGCGGA ACCGAAATCGTTCAGTTGTACCAGTCGGGCA TTTACGACAGCGCCGATTGTGACAGTTCGAAG CTGAACCACGCCGTGCTGGTGGTGGGTTACAC CCCGCAGTATTGGATCATCAAGAATTGGTGGG GATCGTGGGGTGAGAATGGCTATATGAGGATT GTGCGTGGAAGAATATGTGTGGTATCGCAA CTACGCTGCCTATTGTACCATAAAGTAGGAATA AATTATTGATGCACGTTGGATAGAGAAA</p>
qPCR-F	AGAATCTAGTCTGTTGGTGAAGC	TCCAGTTGTACCAGTCAGGC
qPCR-R	CCGGTAGTGTGCGCATTGATATT	CCACGATCCCCACCAATTC
qPCR- amplicon/length	109	125
qPCR-amplicon/seq	<p>AGAATCTAGTCTGTTGGTGAAGCAAAATATTAT ATTTTTCAAAGAATCCCAAGAAGTTTCTGTGAA TGTCAGACATAAATTACAGAAATATCAATGCGA CACTACCGG</p>	<p>TCCAGTTGTACCAGTCAGGCATTTACGACAGC GCCGATTGTGACAGTTCGAAGCTGAATCACGC CGTGCTCGTGGTGGGTTACACCCCGCAGTATT GGATCATCAAGAATTGGTGGGATCGTGG</p>
T7-F	taatacgactcactataggTCCCAAGAAGTTTCTGTGAATG	taatacgactcactataggGTACGTGTCGCTTCAATTTCG
T7-R	taatacgactcactataggTCCGGTTCCTAGCA GAAGG	taatacgactcactataggTTGATGATCCAATACTGCGG
T7-amplicon/length (v	288	247bp
T7-amplicon/seq	<p>TCCCAAGAAGTTTCTGTGAATGTCAGACATAA ATTACAGAAATATCAATGCGACACTACCGGAG AAGCTAACCTCGAAGCTAACTTACGGCTACTG GAACGGCATTACGCCGATTTTCTACGATTATGG AATACCTATGCATCCGATAACACCATGGACCGA AACCCATCCAAATGATTAATGGTACGAGATC CGGCGAAACTGCCGAGTTGAACGCAGGAGCG AGGGCAGGAGCTGCAGCTGGCTGAGAAGGAA CATGTTGAACCTTCTGCTAGTGAACCGGA</p>	<p>GTACGTGTCGCTTCAATTCGGACTTGCCATCT GCAACATCAGTGATTGGGGAATACTGCCAAAG AAGGAAGATGCCCTAGCTTTTGCCGTGTGGA GATAGGACCAATCCCGTCAGTTTGAACGCGG AGCCAAAATCATTCCAGTTGTACCAGTCAGGCA TTTACGACAGCGCCGATTGTGACAGTTCGAAG CTGAATCACGCCGTGCTCGTGGTGGGTTACAC CCCGCAGTATTGGATCATCAA</p>

Παράρτημα II

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι τιμές από τις οποίες κατασκευάστηκε το Γραφ.1 στην ενότητα 4.1.

Time-point	Norma8	Cathe1
NBF	5,25	21,4
12h	22,87	39,14
24h	4,72	190
36h	1,87	226,52
48h	0,16	6,57
60h	1,67	2,82
72h	3,82	2,12

Στο παρακάτω πίνακα δίνονται αναλυτικά οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για το Γραφ.2 στην ενότητα 4.1.

	Norma8			Cathepsin		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
NBF	0,302113	2,460347	0,524369	0,506781	1,100000	1,367454
12h	0,344643	0,178967	0,220927	0,582516	1,101914	1,309198
24h	1,863981	2,647554	0,149728	1,29591	4,567189	3,289099
36h	5,622434	0,843077	0,724221	75,76777	21,32131	71,99272
48h	0,119083	0,000000	0,037024	18,47929	94,27954	60,60592
60h	0,060149	0,081756	1,166075	0,422268	1,488916	1,773002
72h	0,417513	0,243141	0,108033	0,053163	0,060126	0,182028