



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διπλωματική εργασία
**Μελέτη της ρύθμισης μίας Chitin-Binding
πρωτεΐνης στο κουνούπι *Aedes albopictus***

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής
Τσακίρογλου Φωτεινή
Λάρισα 2019

Θέμα διπλωματικής εργασίας

<< Μελέτη της ρύθμισης μίας Chitin-binding πρωτεΐνης στο κουνούπι *Aedes albopictus* >>

<< Investigating the regulation of a Chitin-Binding protein in *Aedes albopictus* mosquito >>

Τσακίρογλου Φωτεινή
Λάρισα 2020

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2019 - Φεβρουαρίου 2020 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μαθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και του κ. Α. Μπελαβίλα, υποψήφιου διδάκτορα.

Τριμελής Επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής

Μούτου Αικατερίνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Ματθιόπουλο και τον κύριο Γιακουνή που με δέχθηκαν στο εργαστήριο και από την αρχή έως το τέλος ήταν εκεί, σε κάθε προσπάθεια, σε κάθε επιτυχία (και αποτυχία), σε κάθε συζήτηση. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Αικατερίνη Μούτου που δέχθηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς μου επιτροπής.

Ένα ζεστό και χαμογελαστό ευχαριστώ στις κυρίες του εργαστηρίου: Αντωνία, Κωνσταντίνα και Μαριλένα που με διαφορετικό χαρακτήρα η κάθε μία, προσφέρουν ανιδιοτελώς τις γνώσεις και το χρόνο τους με την καλύτερη διάθεση.

Συνεχίζοντας τις ευχαριστίες σε υψηλότερα επίπεδα, ευχαριστώ το Λευτέρη (όπου και να βρίσκεσαι τώρα) για το χρόνο που αφιέρωσε καθώς και τον Αλέξανδρο, χωρίς τη βοήθεια του οποίου δε θα είχα φτάσει ως το τέλος αυτού του κύκλου. Ξεχωριστοί σίγουρα, αλλά με πολλή ηγετική υπομονή, εργατικότητα, έμπνευση και διορατικότητα.

Ακόμα, ένα τεράστιο ευχαριστώ σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου (και του "δίπλα"), για όλες τις εύθυμες ημέρες που περάσαμε μαζί, για όλα τα πρωϊνά που γίνονταν απογεύματα και τις ώρες επώασης που μοιραστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που με στήριξαν αυτά τα χρόνια, οικογένεια και φίλους.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφιερώνεται σε όσους/όσα αμέλησα κατά την εκπόνηση και συγγραφή της.

Περίληψη

Το κουνούπι *A. albopictus* αποτελεί επιβεβαιωμένο φορέα επικίνδυνων ιών όπως αυτοί του Δάγκειου πυρετού και Chikungunya. Τις τελευταίες δεκαετίες, το έντομο έχει εντοπιστεί σε περιοχές όλων των ηπείρων λόγω της απόθεσης αυγών σε αντικείμενα κοινής χρήσης (λ.χ. λάστιχα αυτοκινήτων) που εμπορεύονται σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς και της ικανότητας διάπαυσης των αυγών. Επιπλέον, με το πέρασμα του χρόνου το κουνούπι φαίνεται να προσαρμόζεται στο ανθρώπινο περιβάλλον, καθιστώντας αναγκαία την εύρεση αποτελεσματικών μεθόδων περιορισμού των ασθενειών που μεταδίδονται με το τσίμπημά του. Ως αποτέλεσμα, κρίνεται απαραίτητος ο πληθυσμιακός έλεγχος για την προστασία της δημόσιας υγείας. Οι μέχρι τώρα μέθοδοι περιλαμβάνουν προληπτικές και πρακτικές εφαρμογές στο πεδίο.

Η παρεμβολή RNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο της μοριακής βιολογίας, το οποίο αφορά την στοχευμένη γονιδιακή σίγηση. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που επιτελούν σημαντικές λειτουργίες για την ανάπτυξη και επιβίωση μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογικό φαινότυπο, όπως για παράδειγμα τη θνησιμότητα του εντόμου.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εστίασαμε σε γονίδια που αλληλεπιδρούν με τη χιτίνη, μία ένωση που συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, τόσο ως δομικό συστατικό απαραίτητων ιστών του εντόμου, όσο και στην άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Πραγματοποιήθηκε σίγηση ενός γονιδίου (*Chitin-BP*) του οποίου η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη ενδεχομένως εμπλέκεται στη δέσμευση της χιτίνης και το σχηματισμό της περιτροφικής μεμβράνης. Στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της σίγησης του γονιδίου στη φυσιολογική ανάπτυξη του εντόμου. Η διαδικασία περιελάμβανε την κατασκευή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) *in vivo*, σε κύτταρα *E. coli*, που στόχευαν το παραπάνω γονίδιο. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σίγηση ενός δεύτερου γονιδίου (*Inc5*), το οποίο πιθανώς ρυθμίζει τη μεταγραφή του πρώτου. Το dsRNA χορηγήθηκε στις προνύμφες μέσω της σίτισης τους με μετασηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* με δυνατότητα παραγωγής των αντίστοιχων μορίων.

Η κλωνοποίηση τμήματος του γονιδίου *Chitin-BP* στον πλασμιδιακό φορέα L4440 και ο μετασηματισμός των βακτηριακών κυττάρων υλοποιήθηκε επιτυχώς. Ακολούθησε σύνθεση των δίκλωνων μορίων RNA *in vivo* και για τα δύο γονίδια με παράλληλη αξιοποίηση βακτηριακών καλλιεργειών με άδειο φορέα ως συνθήκη ελέγχου (Control). Η σίτιση των προνυμφών με *E. coli* διήρκεσε 12 ημέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιούνταν καταμέτρηση των εντόμων που απεβίωναν. Ο πληθυσμός που υπέστη γονιδιακή σίγηση του *Chitin-BP* εμφάνισε ελάχιστα υψηλότερη θνησιμότητα σε σχέση με τους άλλους δύο και δεν παρατηρήθηκε διαφορετικός μορφολογικός φαινότυπος με γυμνό μάτι.

Abstract

The *A. albopictus* mosquito is a verified vector of Dengue and Chikungunya viruses. Over the last few decades, the mosquito has been successfully expanded around the world due to its ability to lay eggs on intercontinental traded goods (e.g. car tires) and egg's ability to enter a diapause. Over time, the mosquito seems to adjust to the human environment; therefore, finding effective methods to control its expansion and thus reduce the diseases it transmits is necessary. Insect population control approaches should be applied for the protection of public health. Up until now, approaches include precautionary and field strategies.

RNA interference is a powerful molecular biology tool that causes targeted gene suppression. Reduced expression of genes that are important for the development and survival of this species may lead to an abnormal phenotype, such as insect mortality.

In this thesis, we focused on genes which interact with chitin, a molecule that participates in diverse functions, such as structural component of insect's tissues or providing defense against pathogens. Silencing of a Chitin-binding protein (*Chitin-BP*) was achieved. This protein probably binds chitin and contributes to the formation of the peritrophic matrix. The aim of this study was to investigate the effect of silencing Chitin-BP to the insect's development. At first, double stranded RNA (dsRNA) molecules which target *Chitin-BP* were produced *in vivo*, using *E. coli* cells. Subsequently, a second gene, *Inc5*, was silenced, in order to clarify whether it may be involved in the transcriptional regulation of *Chitin-BP*. To introduce the dsRNA into the insects, larvae were fed with recombinant bacterial cells producing the corresponding dsRNA.

Cloning of *Chitin-BP* gene into L4440 plasmid vector and the transformation of *E. coli* cells were successfully completed. The experimental process continued with the *in vivo* production of dsRNA molecules for both genes and the simultaneous usage of bacterial culture with an empty plasmid vector as reference condition (Control). Larval feeding with transformed *E. coli* lasted for 12 days, while dead insects were counted. The *Chitin-BP* gene silenced population had slightly higher mortality rates with respect to the others, and no different phenotype was observed with naked eye.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	9
1.1 <i>Aedes albopictus</i>	9
1.1.1 Βιολογικός κύκλος	10
1.1.2 Συμμετοχή στη μετάδοση ασθενειών	11
1.2 Έλεγχος πληθυσμού <i>Aedes albopictus</i>	11
1.2.1 Χημικά εντομοκτόνα	11
1.2.2 Μοριακές μέθοδοι	12
1.3 Μηχανισμός σίγησης γονιδίων - RNAi	13
1.3.1 Μηχανισμός RNAi στα έντομα	14
1.4 Ο ρόλος της χιτίνης στο έντομο	15
1.4.1 Εξωσκελετός.....	15
1.4.2 Περιτροφική μεμβράνη	16
1.4.2.1 Πρωτεΐνες της Περιτροφικής Μεμβράνης (PMPs).....	17
1.5 Χημική δομή της χιτίνης.....	18
1.6 Μεταβολικό μονοπάτι της χιτίνης.....	18
1.7 Κατηγορίες γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με χιτίνη	20
2. Σκοπός.....	24
3. Μέθοδοι & Υλικά	25
3.1 Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού <i>Aedes albopictus</i>	25
3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)	25
3.3 Colony PCR	26
3.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis).....	27
3.5 Επεξεργασία πλασμιδίου-φορέα L4440	28
3.5.1 Γραμμοποίηση πλασμιδίου.....	29
3.5.2 Προσθήκη T-άκρων	29
3.6 Αντίδραση λιγάσης - Σύνδεση μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)	30
3.7 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με χρήση kit.....	30
3.8 Πρωτόκολλο παρασκευής δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> για ηλεκτροδιάτρηση	31
3.9 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.....	32
3.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	33
3.10.1 Απομόνωση με αλκαλική λύση	33
3.10.2 Απομόνωση με χρήση kit	34
3.11 Πέψη ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού.....	35
3.12 Σίτιση προνυμφών με dsRNA	36
4. Αποτελέσματα.....	37
4.1 Ενίσχυση επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου	37

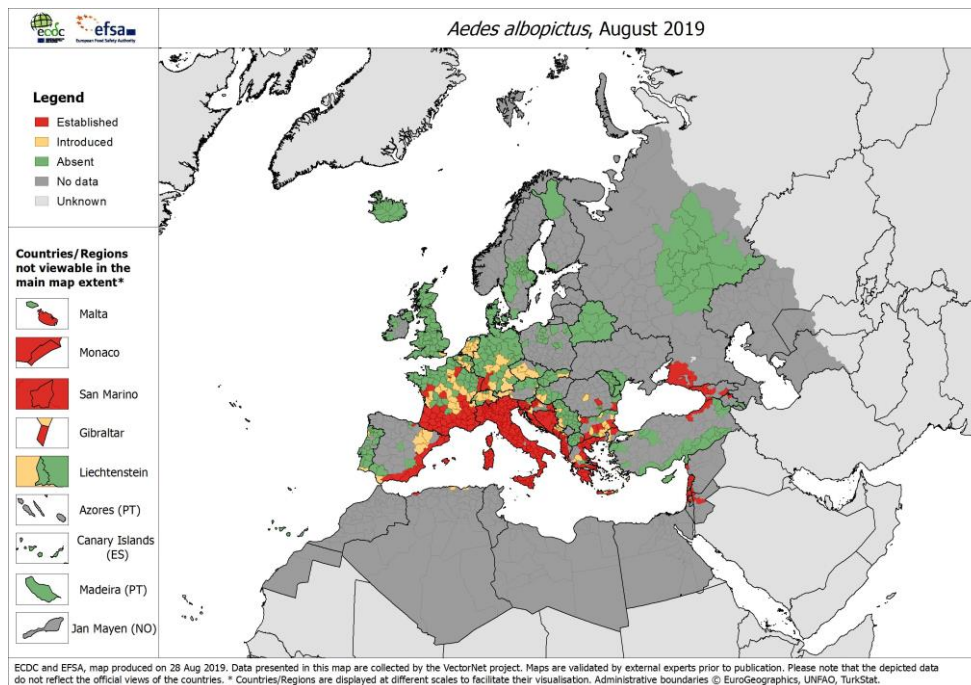
4.2	Επιβεβαίωση ενίσχυσης τμήματος <i>Chitin-BP</i>	37
4.3	Επεξεργασία πλασμιδίου L4440	38
4.4	Χειρισμός κυττάρων <i>E. coli</i>	38
4.4.1	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων HT115 <i>E. coli</i>	38
4.4.2	Μετασηματισμός κυττάρων HT115 <i>E. coli</i> με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	39
4.5	Έλεγχος μετασηματισμένου κλώνου HT115 <i>E. coli</i>	39
4.5.1	Επιβεβαίωση θετικού κλώνου με colony PCR.....	39
4.5.2	Επιβεβαίωση θετικού κλώνου με ένζυμο περιορισμού.....	40
4.5.3	Αλληλούχιση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου.....	42
4.6	Σίτιση προνυμφών με dsRNA	43
5.	Συζήτηση	45
6.	Πίνακας Ορολογίας - Συντμήσεις	49
7.	Βιβλιογραφία	52

1. Εισαγωγή

1.1 *Aedes albopictus*

Το κουνούπι *Aedes albopictus* ανήκει στο γένος *Aedes* και προέρχεται από τα δάση της Νοτιοανατολικής Ασίας. Εικάζεται πως το έντομο αρχικά τρεφόταν με αίμα άγριων ζώων, ενώ στη συνέχεια προσαρμόστηκε σε περιβάλλοντα με εναλλακτικές πηγές αίματος, όπως οικόσιτα ζώα και άνθρωποι. Το κουνούπι αυτό προτιμά να τσιμπάει τις πρωινές ώρες και αργά το μεσημέρι, ενώ έχουν παρατηρηθεί αρκετές εξαιρέσεις ανάλογα με την εποχή, την τοποθεσία και τη φύση του ανθρώπινου περιβάλλοντος. Η προτίμηση του *A. albopictus* να τσιμπά ανθρώπους ή άλλα ζώα φαίνεται να επηρεάζεται από την γεωγραφική προέλευση του πληθυσμού, όμως σε περιβάλλον με και τις δύο επιλογές, προτιμούν τον άνθρωπο (Paupy et al., 2009).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους και οι πρώτες χώρες της Ευρώπης στις οποίες εμφανίστηκε είναι η Αλβανία (1979) και η Ιταλία (1990).



Εικόνα_1: Χάρτης εντοπισμού του *Aedes albopictus* στην Ευρώπη. Καταγραφή τον Αύγουστο 2019.

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/images/map-Aedes-albopictus-distribution-August-2019.png>

Η επιτυχής εξάπλωσή του οφείλεται στην απόθεση αυγών σε πληθώρα ενδιαιτημάτων και το διεθνές δίκτυο εμπορίου. Τα θηλυκά κουνούπια αποθέτουν τα αυγά σε στάσιμα ύδατα καθώς και σε επιφάνειες που μπορούν να αποθηκεύσουν νερό, όπως λάστιχα αυτοκινήτων και κορμοί δέντρων μπαμπού. Τα αυγά είναι ανθεκτικά σε χαμηλές θερμοκρασίες, μπορούν να διατηρηθούν σε ξηρές συνθήκες και παρατεταμένες περιόδους έξω από το νερό. Κατά συνέπεια, η απόθεσή τους σε είδη που εμπορεύονται σε παγκόσμια κλίμακα, τους δίνει τη δυνατότητα να εκκολαφθούν και να αποικίσουν νέες τοποθεσίες, δεδομένου ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών. Το παγκόσμιο δίκτυο μεταφοράς λάστιχων αυτοκινήτων είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος εισαγωγής και διάδοσης του *A. albopictus* στην Ευρώπη, ενώ η εγχώρια διανομή τους διευκολύνει την εγκατάσταση του πληθυσμού (με επισκόπηση Medlock et al., 2012).

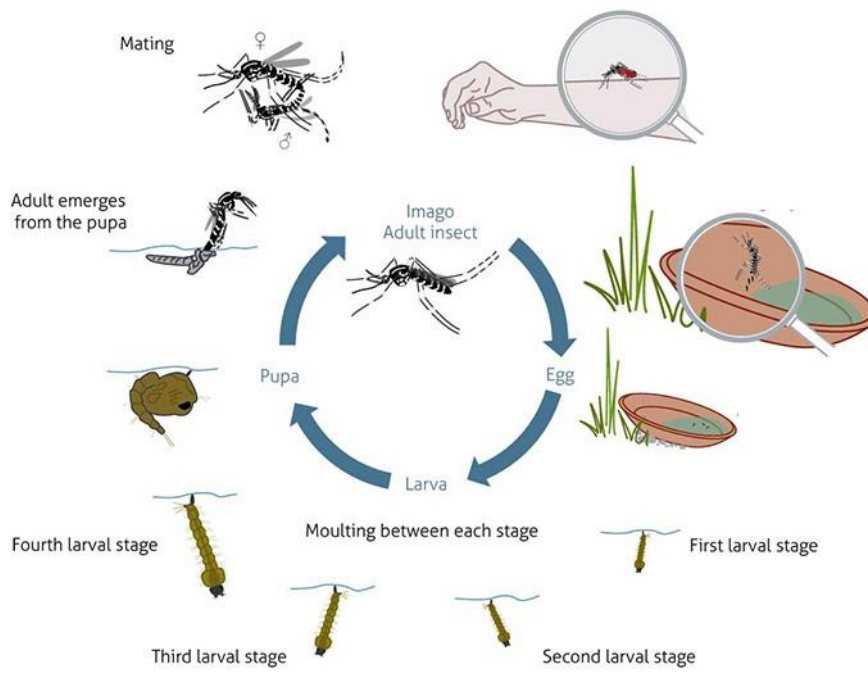
Ακολουθούν κάποιες ενδεικτικές τοποθεσίες απόθεσης αυγών του *A. albopictus*.



Εικόνες_2-5 (Από αριστερά προς δεξιά):
 2. Δίσκος συλλογής νερού από γλάστρα
 3. Αναλώσιμο δοχείο
 4. Λάστιχα αυτοκινήτων
 5. Bamboο
 (Bonizzoni et al.,2013)

5.1.1 Βιολογικός κύκλος

Τα έντομα που ανήκουν στο γένος *Aedes* είναι ολομετάβολα έντομα. Ο κύκλος ζωής του εντόμου αποτελείται από τέσσερα στάδια: αυγό, προνύμφη (larva, L1-4), νύμφη (pupa) και ενήλικο. Τα αυγά είναι ανθεκτικά σε κάποιο βαθμό ξηρασίας, με αυτά του *A. aegypti* να είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα αυγά του *A. albopictus* (Kauffman et al., 2017). Όταν το αυγό βρίσκεται σε υδάτινο και ευνοϊκό περιβάλλον μετά από κάποιες ώρες προκύπτει από αυτό η προνύμφη. Το στάδιο της προνύμφης περιλαμβάνει τέσσερα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια που χρονικά διαρκούν περίπου μία εβδομάδα. Στη συνέχεια η νύμφη υφίσταται μεταμόρφωση που οδηγεί στο ενήλικο έντομο, το οποίο αφού ωριμάσει έχει την αναπαραγωγική ικανότητα. Τα ενήλικα άτομα τρέφονται με νέκταρ ανθέων, ενώ τα θηλυκά μόνο καταναλώνουν αίμα για την παραγωγή των αυγών. Κατ'αυτόν τον τρόπο συμμετέχουν στη μετάδοση ασθενειών (Lopez et al., 2019).



© Biogents, I. Schliep

Εικόνα_6: Βιολογικός κύκλος στο γένος *Aedes*. Παρουσιάζονται τα στάδια του εντόμου από την απόθεση του αυγού έως και τη σύζευξη των ενήλικων ατόμων.

<https://sea.biogents.com/life-cycle-aedes-mosquitoes/>

5.1.2 Συμμετοχή στη μετάδοση ασθενειών

Η ικανότητα του εντόμου να τρέφεται από αίμα διαφορετικών ειδών ζώων αφενός του δίνει τη δυνατότητα να επιβιώνει σε διαφορετικά περιβάλλοντα, αφετέρου το καθιστά “γέφυρα” μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών μεταξύ των ζώων, αλλά και από τα ζώα στους ανθρώπους (Paupy et al., 2009).

Το κουνούπι *Aedes albopictus* είναι γνωστός φορέας του ιού chikungunya (CHIKV) και του ιού του δάγκειου πυρετού (DENV) (με επισκόπηση Medlock et al., 2012). Όσον αφορά τον ιό chikungunya, το κουνούπι τίγρης ήταν ο πρωτεύων φορέας που συμμετείχε σε κρούσματα αυτού στο νησί Ρεουνιόν (Réunion) τη χρονική περίοδο 2005-2007 (με επισκόπηση Pialoux et al., 2007), στην Ιταλία το 2007 (Rezza et al., 2007) και στη Γαλλία το 2010 (Gould et al., 2010). Όσον αφορά τον δεύτερο ιό, προκάλεσε κρούσματα στο νησί Ρεουνιόν το διάστημα 1977 - 1978 (Coulanges et al., 1979) και 2004 (με επισκόπηση Medlock et al., 2012), στη Χαβάη το 2001 - 2002 (Effer et al., 2005), στο Μαυρίκιο τον Ιούνιο το 2009 (Ramchurn et al., 2009), στη Γαλλία και την Κροατία το 2010 (La Ruche et al., 2010).

Πέρα από τους ιούς που έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι φορέας, εργαστηριακές μελέτες στο *A. albopictus* έχουν δείξει την δυνατότητα μετάδοσης κι άλλων ασθενειών. Μερικές από αυτές είναι ο ιός ανατολικής εγκεφαλίτιδας ιπποειδών (EEEV), ο ιός La Crosse (LACV), ο ιός εγκεφαλίτιδας ιπποειδών της Βενεζουέλας (VEEV), ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) και ο ιαπωνικός ιός της εγκεφαλίτιδας (JEV) (με επισκόπηση Medlock et al., 2012).

Η εμφάνιση ιών που μεταδίδονται από αρθρόποδα (arthropod-borne virus - arbovirus), και κατά συνέπεια μέσω του *A. albopictus*, σε μία περιοχή εξαρτάται από τρεις παράγοντες. Πρώτον, από τον αναμενόμενο αριθμό ιικών μολύνσεων ανά άτομο, ανά φορέα του ιού και ανά ημέρα, που θα οφείλεται στο *A. albopictus*, δεδομένου ότι κάθε θηλυκό έντομο που τσιμπά τον φορέα του ιού προσβάλλεται από αυτόν και είναι ικανό να τον μεταδώσει. Δεύτερον, από το βαθμό ευαισθησίας του *A. albopictus* σε διαφορετικούς ιούς ή στελέχη αυτών που μεταδίδονται από αρθρόποδα και τρίτον, από τον αριθμό τέτοιων ιών ή φορείς τους που βρίσκονται στη συγκεκριμένη περιοχή. Συμπερασματικά, η πιθανότητα εμφάνισης ενός arbovirus είναι αποτέλεσμα ταυτόχρονης παρουσίας του ιού, κουνουπιών ικανών να τον μεταδώσουν, ανθρώπων και αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Paupy et al., 2009).

1.2 Έλεγχος πληθυσμού *Aedes albopictus*

Ο έλεγχος του πληθυσμού κρίνεται απαραίτητος για τον περιορισμό διάδοσης ασθενειών όπως αυτών που προκαλούν οι ιοί chikungunya και του δάγκειου πυρετού. Περιλαμβάνει πληθώρα μεθόδων όπως μείωση επιφανειών με στάσιμα ύδατα, ενημέρωση των πολιτών για τη δημόσια υγεία, χρήση χημικών εντομοκτόνων και μοριακές μέθοδοι.

Η ενημέρωση των πολιτών για τον κίνδυνο που διατρέχουν σε περίπτωση επαφής με κουνούπια-φορείς ασθενειών είναι σημαντική καθώς και η προτροπή τους στη μείωση επιφανειών με στάσιμα ύδατα στο σπίτι ή αυλές. Επιπλέον, η χρήση απωθητικών εντόμων και η κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία μπορεί να μειώσει τη μετάδοση ασθενειών (Medlock et al., 2012).

1.2.1 Χημικά εντομοκτόνα

Διάφορες χημικές ενώσεις χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο προνυμφών και ενήλικων κουνουπιών. Ρυθμιστές της ανάπτυξης (π.χ. methoprene - χημικό ανάλογο της νεανικής ορμόνης) και το οργανοφωσφορικό temephos, το οποίο έχει χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, προστίθενται σε τοποθεσίες αναπαραγωγής κουνουπιών με σκοπό τη μείωση των προνυμφών. Τα

πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα για ενήλικα είναι τα πυρεθροειδή λόγω της χαμηλής τοξικότητας που έχουν στα θηλαστικά και της άμεσης αποτελεσματικότητάς τους στα κουνούπια.

Όμως, η αυξημένη χρήση τους για τον έλεγχο παρασίτων σε αγροτικές σοδειές, για έλεγχο πληθυσμών *A. albopictus* και άλλων κουνουπιών έχει οδηγήσει σε επιλογή πληθυσμών με αυξημένη αντίσταση. Αν και ακόμα δεν αποτελεί πρόβλημα μείζοντος σημασίας, έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα σε χημικά που στοχεύουν προνύμφες σε πληθυσμούς της Ασίας (Κίνα, Πακιστάν, Μαλαισία, Ταϊλάνδη), Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, Ευρώπης (Ιταλία και Ελλάδα). Συνολικά, η εδραίωση της ανθεκτικότητας μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στις στρατηγικές ελέγχου πληθυσμών (με επισκόπηση [Medlock et al., 2012](#), [Bonizzoni et al., 2013](#)).

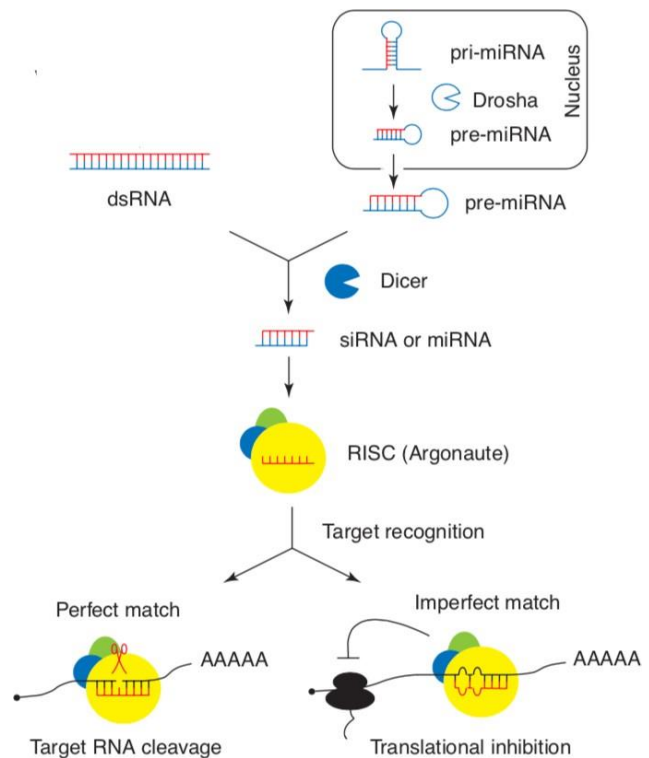
Τέλος, δεν πρέπει να λησμονείται πως η χρήση χημικών εντομοκτόνων επηρεάζει και άλλους οργανισμούς. Κάποια έντομα είναι χρήσιμα για την επικονίαση φυτών και άλλα για την προστασία των φυτών από επιβλαβή έντομα. Μελέτες που αφορούν την επίδραση ενός εντομοκτόνου (ρυθμιστή της ανάπτυξης του εντόμου, *Novaluron*) σε οργανισμούς μη-στόχους, *Bombus terrestris* ([Mommaerts V. et al., 2006](#)) και *Bombyx mori* δείχνουν πως η χρήση του επιφέρει μειωμένη εκκόλαψη προνυμφών και μη φυσιολογική ανάπτυξή τους. Επιπλέον, επηρεάζει την έκδυση, την ωοαπόθεση, το προσδόκιμο ζωής και την επιβίωση αυγών εντόμων, τα οποία έχουν το έχουν καταναλώσει. Οι συγκεκριμένες μέλισσες (*Bombus terrestris*) αποτελούν σημαντικούς επικονιαστές αγριολούλουδων και καλλιεργειών θερμοκηπίου, όμως παρουσιάζουν μείωση του πληθυσμού τους λόγω της χρήσης εντομοκτόνων ([Mommaerts V. et al., 2006](#)). Κατά συνέπεια, η χρήση τους απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί διατάραξη του οικοσυστήματος καθώς και η επίδρασή τους πρέπει να ελέγχεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια διαφορετικών οργανισμών (με επισκόπηση [Santorum et al., 2019](#)). Επομένως κρίνεται απαραίτητη η εύρεση νέων και ασφαλών μεθόδων, περισσότερο εξειδικευμένων που δεν επηρεάζουν άλλους οργανισμούς.

1.2.2 Μοριακές μέθοδοι

Οι κύριες μοριακές μέθοδοι που αποσκοπούν στον έλεγχο του πληθυσμού είναι δύο και στοχεύουν είτε στη μείωσή του είτε στην αντικατάστασή του από γενετικά τροποποιημένα έντομα με μειωμένη ικανότητα μετάδοσης ιών. Μέχρι στιγμής, μεγαλύτερη πρόοδος έχει σημειωθεί στις στρατηγικές μείωσης του πληθυσμού. Αυτές περιλαμβάνουν την παραγωγή γενετικά τροποποιημένων κουνουπιών με αδυναμία πτήσης, χρήση χημικών που οδηγούν στη στειρώση, γ-ακτινοβολία που προκαλεί τυχαίες μεταλλάξεις (*Sterile insect technique, SIT*) ή χρήση του μηχανισμού της παρεμβολής RNA (*RNA Interference, RNAi*). Οι πρώτες τρεις τεχνικές έχουν τελικό στόχο την στειρότητα των κουνουπιών, τα οποία στη συνέχεια απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η πρώτη απελευθέρωση στειρών αρσενικών *A. albopictus* μέσω ακτινοβολίας πραγματοποιήθηκε το 2005 με 2009 σε αστικές περιοχές και προάστια της Ιταλίας και οδήγησε σε μείωση του τοπικού πληθυσμού (με επισκόπηση [Bonizzoni et al., 2013](#)). Ο μηχανισμός δράσης της παρεμβολής RNA αναλύεται στην επόμενη ενότητα, καθώς και η χρήση του για τον έλεγχο πληθυσμών.

1.3 Μηχανισμός σίγησης γονιδίων - RNAi

Η παρεμβολή RNA (RNA interference) αφορά στην αποσιώπηση των γονιδίων που προκαλεί το δίκλωνο RNA και αποτελεί έναν εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό των περισσότερων ευκαρυωτών κατά τον οποίο ένα εξωγενές δίκλωνο RNA (dsRNA), συμπληρωματικό με γνωστό mRNA, εισάγεται σε ένα κύτταρο για να καταστρέψει το συγκεκριμένο mRNA, με συνέπεια την ελάττωση ή την πλήρη κατάργηση της γονιδιακής έκφρασης. Η καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου με RNAi (gene knockdown) είναι στοχευμένη και αφορά τη μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου με το τελευταίο να διατηρείται ανέπαφο (Tropp, 2014). Σε αυτή την περίπτωση ο στόχος της σίγησης είναι η μελέτη της λειτουργίας του γονιδίου (Pillai et al, 2016). Η γονιδιακή σίγηση λαμβάνει χώρα είτε μέσω καταστολής της μεταγραφής (Transcriptional gene silencing, TGS) είτε ενεργοποιώντας μία διαδικασία αποδόμησης που βασίζεται στην ομολογία του mRNA (Post transcriptional gene silencing, PTGS) (Tomari and Zamore, 2005; Vaucheret, 2006; Agarwal and Mangrauthia, 2013).



Εικόνα 7: Συνοπτικός σχηματικός μηχανισμός βιοσύνθεσης miRNA, κατακερματισμός μορίων RNA από την Dicer και δράση μικρών RNA τμημάτων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (van Rij, R. P., & Andino, R., 2006).

Ο μηχανισμός περιλαμβάνει μία διαδικασία κατά την οποία ενδογενή ή εξωγενή δίκλινα μόρια RNA εισέρχονται στα κύτταρα. Τα ενδογενή μόρια προέρχονται από μετάγραφα γονιδίων (miRNA genes), ψευδογονίδια, ανάστροφες επαναλήψεις, δομές θηλιάς-βρόγχου. Αντίθετα, τα εξωγενή μόρια είναι εργαστηριακά παρασκευασμένα dsRNA ή ιικό RNA (Kim et al., 2009). Η είσοδος τους στο κύτταρο επάγει την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού του κυττάρου, ο οποίος αποτελείται από τρία βασικά βήματα. Αρχικά, τα μόρια RNA, microRNAs και dsRNAs, κατακερματίζονται σε μικρότερα δίκλινα τμήματα (μήκους 20-25 νουκλεοτιδίων) με τη δράση μίας ριβονουκλεάσης (RNase III) γνωστή ως Dicer (Scott et al., 2013). Στη συνέχεια, από τα δίκλινα τμήματα, ο ένας κλώνος συνδέεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC) και το οδηγεί στην αλληλουχία - στόχο που είναι συμπληρωματική με αυτόν. Βάσει του βαθμού συμπληρωματικότητας μεταξύ του κλώνου RNA και του μεταγράφου-στόχου και της πρωτεΐνης Αργοναύτη που βρίσκεται στο σύμπλοκο, η αλληλεπίδραση του RISC με το μετάγραφο mRNA μπορεί να έχει διαφορετικά αποτελέσματα: να επηρεάσει είτε την πρωτεϊνική σύνθεση είτε την σταθερότητα του μεταγράφου (Siomi, 2009)

1.3.1 Μηχανισμός RNAi στα έντομα

Ο κύριος ανοσοποιητικός μηχανισμός έναντι των ιών στα έντομα είναι η μεταγραφική σίγηση γονιδίων. Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται όταν δίκλινα μόρια RNA, προϊόντα του πολλαπλασιασμού του ιού, αναγνωρίζονται στο κυτταρόπλασμα και πέπτονται σε μικρότερα τμήματα από την Dicer (Vogel et al, 2019). Ο κερματισμός ιικών RNA στόχων πραγματοποιείται από μία πρωτεΐνη Αργοναύτη του συμπλόκου RISC με οδηγό ένα μονόκλινο τμήμα RNA. Μελέτη κατά την οποία έγινε σίγηση του μονοπατιού της παρεμβολής RNA στο *T. castaneum* και ταυτόχρονη μόλυνση του εντόμου με τον ιό του Δάγκειου πυρετού (οροτύπου 2-DENV2) έδειξε αύξηση την ιϊκής αντιγραφής, υποδεικνύοντας το ρόλο του μονοπατιού στην προστασία από ιούς (Lee et al., 2019).

Το μονοπάτι της γονιδιακής σίγησης αποτελείται από δύο ομάδες παραγόντων: Η πρώτη περιλαμβάνει την Dicer, τους παράγοντες που συνδέονται στο RNA και τις πρωτεΐνες Αργοναύτες, ενώ η δεύτερη από τους μηχανισμούς ενίσχυσης του dsRNA και της μετακίνησής του σε άλλα κύτταρα ή ιστούς (Katoch et al., 2013). Τα φυτά και οι νηματώδεις διαθέτουν μία RNA-εξαρτώμενη-RNA πολυμεράση (RdRP), η οποία διευκολύνει την ενδοκυττάρια ενίσχυση του σήματος, όμως δεν έχει επιβεβαιωθεί κάποιο ομόλογο του σε γονιδίωμα εντόμου μέχρι στιγμής. Συνεπώς, δεν είναι γνωστός ο τρόπος συντήρησης του dsRNA στα κύτταρα εντόμων (Scott et al., 2013).

Η σίγηση γονιδίων μέσω της παρεμβολής RNA είναι μία αρκετά υποσχόμενη μέθοδος για τη διαχείριση εντόμων που καταστρέφουν γεωργικές καλλιέργειες ή είναι φορείς ιών επικίνδυνων για την υγεία. Ιδιαίτερα όταν οι στρατηγικές ελέγχου πληθυσμών εντόμων που χρησιμοποιούνται σήμερα, που στηρίζονται ως επί το πλείστον σε χημικά εντομοκτόνα, έχουν μεγάλη επιβάρυνση στο περιβάλλον και συνήθως είναι αδύνατον να αφήσουν αλώβητους πολλούς οργανισμούς μη-στόχους. Σε αντιδιαστολή, στο βαθμό που γονιδιωματικές αναλύσεις μας παρέχουν λεπτομερή γνώση των γονιδίων ενός οργανισμού, είναι πλέον δυνατόν η γονιδιακή σίγηση να στοχεύσει μοναδικά γονίδια ενός οργανισμού στόχου και έτσι να καταστεί η πλέον ειδο-ειδική μέθοδος καταπολέμησης του οργανισμού αυτού. Όμως, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου διαφέρει μεταξύ των τάξεων εντόμων και εξαρτάται από παράγοντες όπως η εισαγωγή του δίκλινου μορίου στα κύτταρα, η πέψη του από στομαχικές νουκλεάσες, η επιλογή γονιδίου-στόχου και μήκος δίκλινου μορίου.

Οι κύριες μέθοδοι εισαγωγής dsRNA στα κύτταρα εντόμων είναι με μικροενέσεις (microinjections), μέσω της τροφής (feeding), μέσω εμβάπτισης (soaking) και διαγονιδιακών φυτών (σε περίπτωση φυτοφάγων εντόμων) (Katoch et al., 2013). Οι μικροενέσεις έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ημιμετάβολων και ολομετάβολων εντόμων με την ύψιστη αποτελεσματικότητα γονιδιακής σίγησης (Pillai et al, 2016). Η εισαγωγή μέσω της τροφής είναι λιγότερο επεμβατική μέθοδος και πιο εύκολα εφαρμόσιμη στο πεδίο (Scott et al., 2013). Επιπλέον, τα δίκλινα μόρια μπορούν να επικαλυφθούν με νανοσωματίδια (nanoparticles), διευκολύνοντας τη μεταφορά τους διαμέσου της περιτροφικής μεμβράνης του στομάχου (Kunte et al., 2019). Η παρουσία νουκλεασών, ενζύμων που διασπούν νουκλεϊκά οξέα, στον πεπτικό σωλήνα προστατεύει τον οργανισμό από την εισβολή ιών, αλλά μειώνει την αποτελεσματικότητα της απόκρισης (Vogel et al, 2019).

Η επιλογή του γονιδίου-στόχου πρέπει να γίνει με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους. Απαραίτητη είναι η επιλογή γονιδίων που θα υπάρχουν ειδικά στους οργανισμούς-στόχους και επιτελούν σημαντικές λειτουργίες. Γονίδια που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία (house-keeping genes), που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες, συντηρημένα σύμπλοκα όπως πρωτεασώματα και γονίδια που ανήκουν σε συντηρημένη υπερ-οικογένεια δεν αποτελούν παράδειγμα στόχων, διότι θα επηρεάσουν άλλους μη επιβλαβείς οργανισμούς (Kola et al., 2015).

Το ελάχιστο μήκος δίκλινου RNA που απαιτείται για να επιτευχθεί η μέγιστη γονιδιακή σίγηση διαφέρει μεταξύ των ειδών εντόμων. Στην πλειονότητα πειραμάτων όπου η εισαγωγή του

dsRNA πραγματοποιούνται μέσω τροφής χρησιμοποιούνται αλληλουχίες μεταξύ 50 και 500 ζεύγη βάσεων. Μεγάλου μεγέθους, μη τροποποιημένα μόρια dsRNA επιτελούν πιο αποτελεσματική γονιδιακή σίγηση έναντι τμημάτων siRNA που παρασκευάστηκαν in vitro (Mamta et al., 2016) .

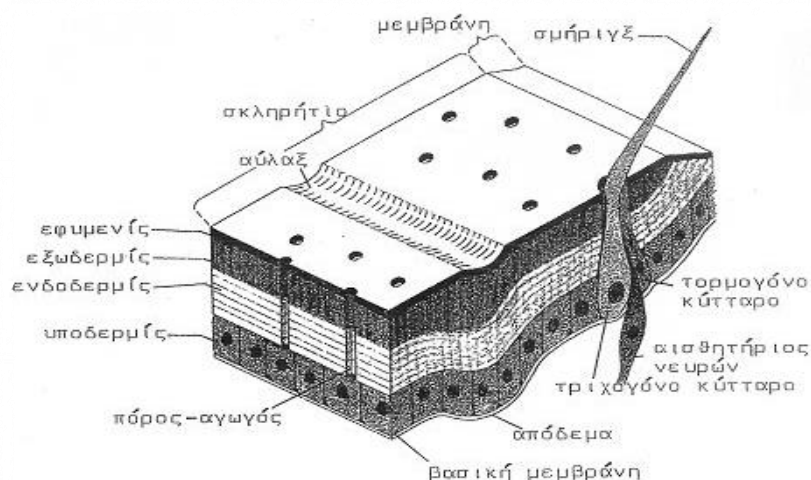
1.4 Ο ρόλος της χιτίνης στο έντομο

Οι δομές που περιέχουν χιτίνη είναι απαραίτητες για τη φυσιολογία του εντόμου. Η χιτίνη αποτελεί συστατικό του εξωσκελετού και της περιτροφικής μεμβράνης, ιστών που προσφέρουν στήριξη και προστασία. Περισσότερες πληροφορίες περί της δομής και βιοσύνθεση της χιτίνης αναπτύσσονται στη συνέχεια (1.5). Ο σχηματισμός και η διατήρηση της δομής τους ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη του εντόμου. Λόγω της σημαντικότητας αυτών των τμημάτων μελετώνται μηχανισμοί που διαταράσσουν τη βιοσύνθεση ή αποδόμησή τους, ως πιθανοί μελλοντικοί στόχοι για τον έλεγχο του πληθυσμού.

1.4.1 Εξωσκελετός

Το γένος *Aedes* ανήκει στο φύλο των Αρθρόποδων, το οποίο χαρακτηρίζεται από τον εξωσκελετό, σώμα που αποτελείται από μεταμερή και αρθρωτά εξαρτήματα (πόδια, κεραίες). Αποτελείται από διαφορετικής σύστασης στρώματα, τη βασική μεμβράνη, την υποδερμίδα και τη δερμίδα (Liu X., Zhang J. et al., 2019). Η πιο εσωτερική δομή, η βασική μεμβράνη είναι μία ακυτταρική μεμβράνη που επικαλύπτει την υποδερμίδα και διαχωρίζει τον σκελετό από την αιμολέμφο και τα εσωτερικά όργανα (Τζανακάκης, 1995). Η υποδερμίδα είναι κυρίως ένα στρώμα κυττάρων, η πυκνότητα και σχήμα του οποίου διαφοροποιείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εντόμου. Τα κύτταρα της υποδερμίδας εκκρίνουν συστατικά της δερμίδας καθώς και ένζυμα που συμμετέχουν στη διαμόρφωσή της στις χρονικές στιγμές της έκδυσης. Η δερμίδα αντίστοιχα περιλαμβάνει 2 στρώματα, το επιδερμάτιο και το ινώδες δερμάτιο, εκ των οποίων μόνο το δεύτερο περιέχει χιτίνη. Σε αυτό το στρώμα ανήκει η εξωδερμίδα, που είναι σκληρή και άκαμπτη δομή, και η ενδοδερμίδα που αποτελείται από πρωτεΐνες και χιτίνη.

Ο εξωσκελετός είναι μία δομή των Αρθρόποδων με πολλές λειτουργίες. Περιβάλλει και στηρίζει το σώμα του εντόμου, προσφέρει θέσεις πρόσδεσης των μυών επιτρέποντας την κίνηση και πτήση. Επιπλέον, προστατεύει τα έντομα από μηχανική καταπόνηση, αφυδάτωση και παθογόνους μικροοργανισμούς (Liu X., Zhang J. et al., 2019).

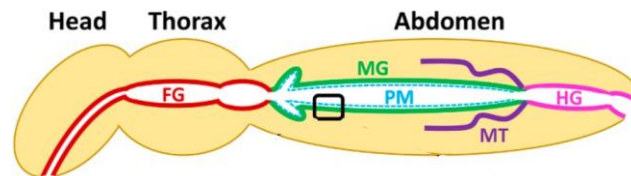


Εικόνα_8: Διαγραμματική απεικόνιση τομής σωματικού περιβλήματος εντόμων (Σημειώσεις μαθήματος “Φυσιολογία εντόμων”, τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, σελ. 1,2).

1.4.2 Περιτροφική μεμβράνη

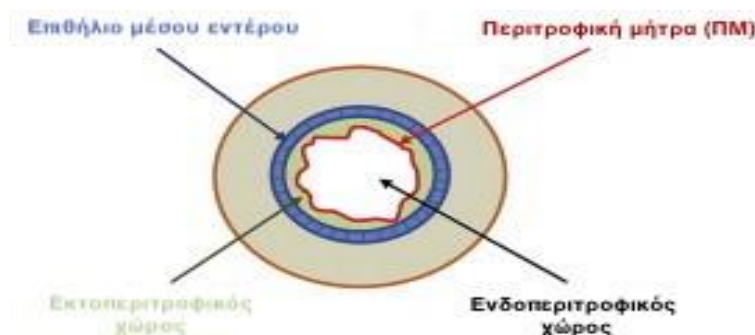
Σε πολλά αρθρόποδα, όπως τα έντομα, ο τροφικός σωλήνας χωρίζεται σε τρία τμήματα με διαφοροποιημένες λειτουργίες, το πρόσθιο, μέσο και οπίσθιο έντερο, τα οποία σχηματίζονται από επιθηλιακά κύτταρα. Η πέψη των τροφών λαμβάνει χώρα στο μεσέντερο, όπου τα κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν τα κατάλληλα ένζυμα. Το 1762 ο Pierre Lyonet παρατήρησε μία μεμβράνη που περιβάλλει την τροφή στο μέσο έντερο του κόσσου (*Cossus cossus*), η οποία ονομάστηκε το 1890 “περιτροφική μεμβράνη” από τον Édouard-Gérard Balbiani (Liu X., Zhang J. et al., 2019).

Η περιτροφική μεμβράνη (ΠΜ) ή περιτροφική μήτρα (Peritrophic matrix) είναι ένα εξωκυτταρικό, ημιδιαπερατό στρώμα που περιβάλλει το μεσέντερο των περισσότερων εντόμων. Στα είδη που περιέχουν ΠΜ, αυτή δεν παράγεται σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Για παράδειγμα, οι προνύμφες πολλών Λεπιδόπτερον εμφανίζουν ΠΜ, ενώ στα ενήλικα άτομα δεν παρατηρείται. Αντίθετα, σε άλλα είδη, η ΠΜ εντοπίζεται σε όλα τα στάδια, ενώ μπορεί να βρεθεί ακόμα και σε αυτό της νύμφης (Lehane M. J., 1997). Είναι μία δυναμική δομή η οποία αποτελείται από ινίδια χιτίνης συνδεδεμένα με πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες. Η μεμβράνη συνεχώς βιοσυντίθεται, συναρμολογείται και αποσυντίθεται ως απόκριση στην τροφή και την ανάπτυξη. Οι αλυσίδες χιτίνης συντίθενται από διάφορα ένζυμα και οργανώνονται σε επίπεδα, στα οποία οι εμπλεκόμενες πρωτεΐνες φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και φυσιολογικής δραστηριότητας (Liu X., Cooper A. et al., 2019, Muthukrishnan et al., 2019, Lehane).



Εικόνα_9: Διαγραμματική απεικόνιση τροφικού αγωγού. Ο τροφικός αγωγός αποτελείται από το πρόσθιο (Foregut, FG), μέσο (Midgut, MG) και οπίσθιο (Hindgut, HG) έντερο. Η περιτροφική μεμβράνη (PM) περιβάλλει το μέσο έντερο (Liu X., Cooper A. et al., 2019).

Η ΠΜ συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες των αρθρόποδων. Συμβάλλει στην πρώτη άμυνα εναντίον μικροοργανισμών όπως ιοί, βακτήρια και άλλα παθογόνα και ως προστασία των επιθηλιακών κυττάρων από μηχανική καταπόνηση. Ακόμα, διαχωρίζει τον αυλό του μεσέντερου σε διαφορετικά διαμερίσματα, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και πέψη. Σχηματίζεται έτσι ο ενδοπεριτροφικός χώρος (η κοιλότητα που περιέχει την εισαχθείσα τροφή) και ο εκτοπεριτροφικός χώρος (η έκταση μεταξύ της περιτροφικής μεμβράνης και του επιθηλίου) αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της απορρόφησης θρεπτικών ουσιών και της επαναχρησιμοποίησης των υδρολυτικών ενζύμων. Ακόμα, η ΠΜ λειτουργεί ως βιοχημικός φραγμός, διότι συμβάλλει στην αδρανοποίηση τοξινών που έχουν εισαχθεί μέσω της τροφής (με επισκόπηση Liu X., Cooper A. et al., 2019).



Εικόνα_10: Σχηματική απεικόνιση περιτροφικής μεμβράνης σε σχέση με το επιθήλιο μέσου εντέρου εντόμου (Kelkenberg et al., 2015).

Επειδή η ΠΜ είναι μία ακυτταρική μορφή, το μέγεθος και οι ηλεκτροστατικές ιδιότητες των πόρων της επηρεάζουν το είδος μορίων που μπορούν να τη διαπεράσουν. Μελέτες έχουν δείξει πως το μέγεθος των πόρων της ΠΜ διαφέρει ανάλογα με το είδος και την τάξη κάθε οργανισμού. Επίσης, η ΠΜ δεν εμφανίζει τον ίδιο βαθμό διαπερατότητας σε όλο της το μήκος. Στο *T. castaneum* αναφέρεται πως η διαπερατότητα μειώνεται από το πρόσθιο μέρος, το οποίο διαπερνούν δεξτράνες 40nm, προς το οπίσθιο, το οποίο διαπερνούν μόρια διαμέτρου 1-2nm. Όσον αφορά τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, κατιονικές ενώσεις φαίνεται να περνούν την ΠΜ πιο αποτελεσματικά από ανιονικές, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες που την περιβάλλουν (Denecke et al., 2018).

Παρόλο που υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση ως προς τη δομή των περιτροφικών μεμβρανών, αυτές κατηγοριοποιούνται κυρίως σε δύο τύπους. Ο τύπος 1 (Type I) εκκρίνεται από το σύνολο των επιθηλιακών κυττάρων του μέσου εντέρου, ενώ ο τύπος 2 (Type II) σχηματίζεται από μία ομάδα εξειδικευμένων κυττάρων της καρδιακής βαλβίδας, μεταξύ του πρόσθιου και μέσου εντέρου (Liu X., Cooper A. et al., 2019).

Οι τύποι περιτροφικής μεμβράνης συντίθεται σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια ανάλογα με το είδος του εντόμου (Tellam R. L., 1996). Στα αιματοφάγα έντομα εντοπίζονται διαφορές στον χρονικό σχηματισμό των τύπων ΠΜ. Τα ενήλικα κουνούπια δεν έχουν ΠΜ πριν την κατανάλωση αίματος. Ο τύπος 1 παράγεται στα ενήλικα θηλυκά κουνούπια ως απόκριση μετά την κατανάλωση αίματος και περιβάλλει πλήρως το γεύμα (Dinglasan R. et al., 2009). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο *Aedes aegypti* με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξε πως η ΠΜ αρχίζει να σχηματίζεται 4 με 8 ώρες μετά το γεύμα (Perrone J. & Spielman A., 1988). Ο τύπος 2 συντίθεται διαρκώς και ανεξάρτητα από την κατανάλωση γεύματος σε όλα τα προνυμφικά στάδια (Dinglasan R. et al., 2009). Αντίθετα, ο τύπος 1 στα μη-αιματοφάγα έντομα (λ.χ. στις προνύμφες λεπιδόπτερων) συντίθεται διαρκώς (Shao et al., 2001).

1.4.2.1 Πρωτεΐνες της Περιτροφικής Μεμβράνης (PMPs)

Η περιτροφική μεμβράνη αποτελείται από ινίδια χιτίνης και ειδικές πρωτεΐνες της περιτροφικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένου των ασπόδυλων στομαχικών μουκινών. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ως πρωτεΐνες Περιτροφικής Μεμβράνης (Peritrophic Matrix proteins, PMPs) (Kelkenberg et al., 2015).

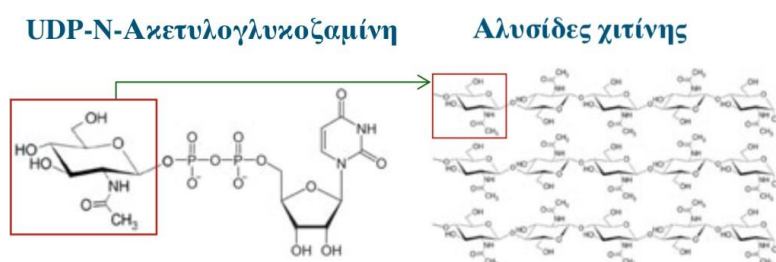
Αυτές δεσμεύονται ισχυρά στα ινίδια χιτίνης, χάρη στην παρουσία μοναδικών ή πολλαπλών επικρατειών που δεσμεύουν τη χιτίνη (Chitin Binding Domain, CBD μοτίβα), οι οποίες ονομάζονται περιτροφίνη Α, Β ή C. Η επικράτεια “περιτροφίνη-Α” είναι η κυρίαρχη στα αρθρόποδα, εναλλακτικά ονομάζεται CBD2 και έχει βρεθεί σε πολλές PMPs (Liu X., Zhang J. et al., 2019). Ακόμα, έχει προταθεί πως ο αριθμός επικρατειών δέσμευσης χιτίνης επηρεάζει την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τα ινίδια ή κάλυψης των άκρων τους (Kelkenberg et al., 2015).

Επιπλέον, είναι πιθανή η συμμετοχή των PMPs στο σχηματισμό της διαπερατότητας της Περιτροφικής Μεμβράνης. Δεν είναι βέβαιο αν οι PMPs επηρεάζουν άμεσα το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης ή έμμεσα μέσω της σύνδεσής τους με άλλες πρωτεΐνες. (Muthukrishnan et al., 2019).

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε 2 διαστάσεις από Τύπου 1 περιτροφική μεμβράνη έδειξε πως τα είδη κουνουπιών *A. aegypti* και *A. gambiae* (αιματοφάγα έντομα) διαθέτουν περίπου 20-40 πρωτεΐνες, ενώ μαύρες μύγες *S. vittatum* περιέχουν μόνο 2. Παρ’όλα αυτά, δεν πρέπει να λησμονείται πως ο αριθμός των πρωτεϊνών δύναται να είναι υποεκτιμημένος, καθώς επεξεργασία της περιτροφικής μεμβράνης με πιο ισχυρές χημικές ενώσεις μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή περισσότερων πρωτεϊνών (Shao et al., 2001).

1.5 Χημική δομή της χιτίνης

Η χιτίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο πολυμερές στη φύση, μετά την κυτταρίνη (Liu X., Zhang J. et al., 2019). Όσον αφορά τη χημική δομή της χιτίνης, είναι ένα γραμμικό πολυμερές πολυσακχαριδίων αποτελούμενο από μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης ενωμένες με 1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα πολυμερή χιτίνης σχηματίζουν νανοϊνίδια με τη βοήθεια πρωτεϊνών. Τα ινίδια αυτά αποτελούνται είτε από παράλληλες αλυσίδες (β-χιτίνη), από αντιπαράλληλες αλυσίδες (α-χιτίνη), είτε από συνδυασμό αυτών (γ-χιτίνη). Η πλειοψηφία των ινιδίων στον εξωσκελετό αποτελείται από α-χιτίνη, ενώ στο μέσο έντερο από β-χιτίνη. Εκεί, τα ινίδια ενώνονται μεταξύ τους με Πρωτεΐνες της Περιτροφικής Μεμβράνης σχηματίζοντας μικροϊνίδια και δίνουν μορφή στη δομή που περιβάλλει το μεσέντερο (με επισκόπηση Liu X., Cooper A. et al., 2019).



Εικόνα_11: Χημική δομή της χιτίνης και ένωση των μονομερών προς σχηματισμό αλυσίδων (Liu X.,Zhang J. et al., 2019).

1.6 Μεταβολικό μονοπάτι της χιτίνης

Το μεταβολικό μονοπάτι της χιτίνης λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και περιλαμβάνει τις αντιδράσεις σύνθεσης, τροποποίησης και καταβολισμού της.

Στη σύνθεση του μορίου συμμετέχουν τουλάχιστον 8 ένζυμα που μετατρέπουν την τρεχαλόζη σε πολυμερή χιτίνης. Αρχικά, η τρεχαλόζη διασπάται σε β-D-γλυκόζη από την τρεχαλάση (TRE) και υφίσταται φωσφορυλίωση από την εξοκινάση (HXK). Μετά τη δράση του ενζύμου ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (GPI), στο προϊόν 6-φωσφορική φρουκτόζη προστίθεται μία αμινομάδα από την αμινοτρανσεράση γλουταμίνης:6-φωσφορικής φρουκτόζης (GFAT). Η 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη που σχηματίζεται ακετυλιώνεται από την N-ακετυλοτρανσεράση της 6-φωσφορικής γλυκοζαμίνης (GNA). Στη συνέχεια, η 6-φωσφορική-N-ακετυλογλυκοζαμίνη μετατρέπεται σε 1-φωσφορική-N-ακετυλογλυκοζαμίνη με τη δράση της μούτάσης της φωσφοακετυλ(ο)γλυκοζαμίνης (PAGM) και ενεργοποιείται από την πυροφωσφοριλάση της UDP-N-Ακετυλογλυκοζαμίνης (UAP). Η τελική ένωση, η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη πολυμερίζεται από το ένζυμο συνθάση της χιτίνης (CHS). Στα έντομα όπου η σύνθεση έχει μελετηθεί εκτεταμένα, έχει βρεθεί ότι υπάρχει εξειδίκευση του ενζύμου που συμμετέχει στο σχηματισμό του εξωσκελετού ή της περιτροφικής μεμβράνης. Η ισομορφή CHS-A εντοπίζεται στον εξωσκελετό, ενώ η ισομορφή CHS-B στο μέσο έντερο.

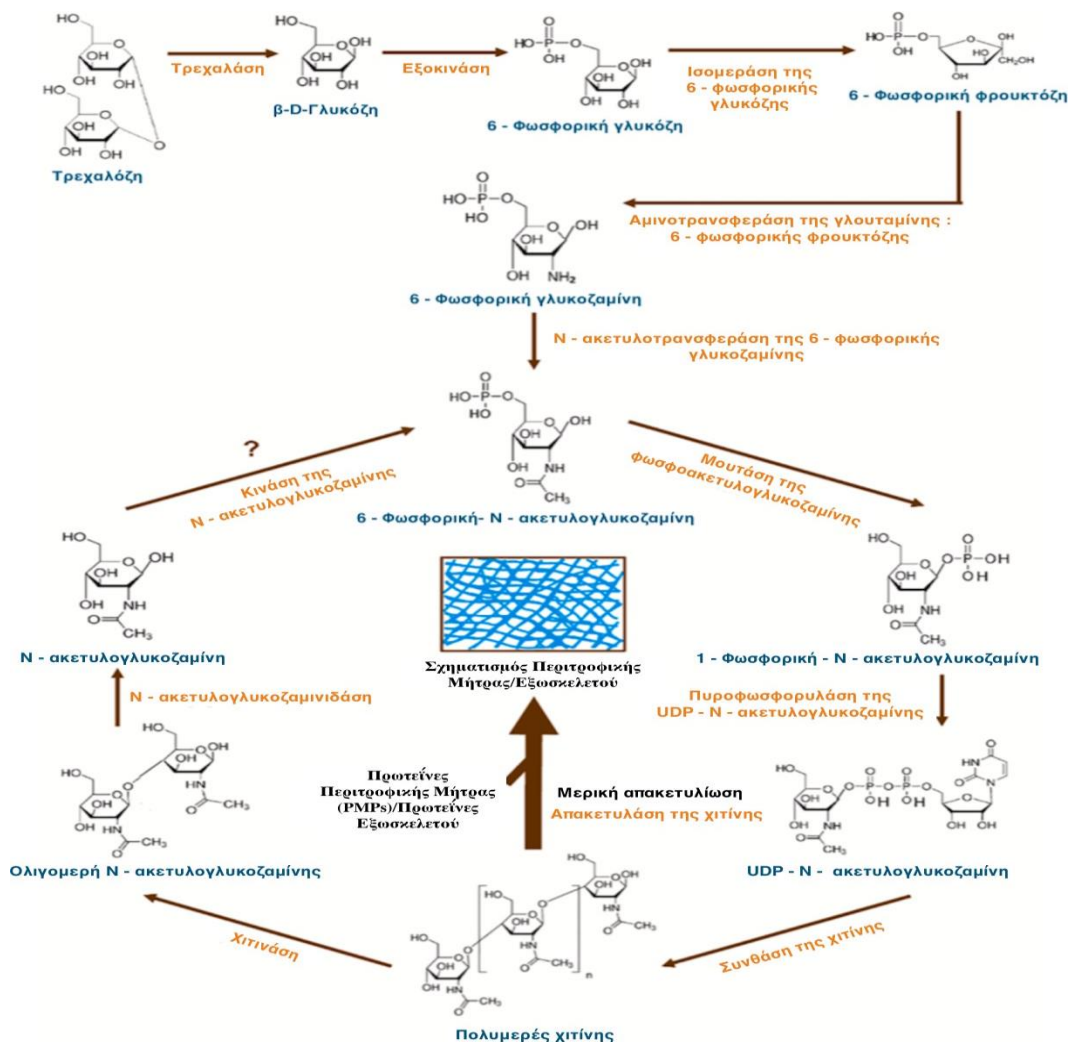
Στη συνέχεια, ακολουθεί τροποποίηση των πολυμερών χιτίνης από την απακετυλάση της χιτίνης (CDA), η οποία μετατρέπει κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης σε κατάλοιπα γλυκοζαμίνης. Είναι πιθανό πως η μερική απακετυλίωση: 1) Καθιστά τις δομές χιτίνης πιο ανθεκτικές στην υδρόλυση από ενδοχιτινάσες, 2) παρέχει αμινομάδες για σύνδεση με πρωτεΐνες και 3) δημιουργεί ειδικές θέσεις σύνδεσης για πρωτεΐνες (με επισκόπηση Liu X.,Cooper A. et al., 2019).

Τα τροποποιημένα αυτά μόρια αλληλεπιδρούν με είτε πρωτεΐνες της Περιτροφικής Μembrάνης (στο μέσο έντερο) είτε με πρωτεΐνες του εξωσκελετού. Η σύνδεση με διαφορετικές πρωτεΐνες είναι αυτή που τελικά προσδίδει ξεχωριστές χημικές ιδιότητες στη χιτίνη μεταξύ των δύο αυτών διαμερισμάτων. Η χιτίνη στον εξωσκελετό σχηματίζει μία άκαμπτη και υδρόφοβη δομή, ενώ στην περιτροφική μεμβράνη δημιουργείται μία ενυδατωμένη δομή, εύκαμπτη και διαπερατή από διαλυμένες ουσίες μικρού μοριακού βάρους και νερό. (Muthukrishnan et al., 2019)

Ο καταβολισμός των δομών που περιλαμβάνου χιτίνη συμβαίνει κατά την έκδυση. Πρώτα δρουν ειδικές πρωτεάσες, οι οποίες καθιστούν προσβάσιμες σε άλλα ένζυμα τις αλυσίδες χιτίνης. Οι αλυσίδες καταβολίζονται από χιτινάσες (CHT).

Τα ολιγοσακχαρίδια χιτίνης που προκύπτουν πέπτονται σε μονομερή από το ένζυμο N-ακετυλογλυκοσιδάση (NAG). Κάποια από αυτά απομακρύνονται ως απόβλητα και κάποια πιθανόν ανακυκλώνονται (με επισκόπηση Liu X., Cooper A. et al., 2019).

Το μονοπάτι ανακύκλωσης της N-ακετυλογλυκοζαμίνης έχει χαρακτηριστεί στον οργανισμό *E. coli* και ένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν είναι η κινάση της N-ακετυλογλυκοζαμίνης, που καταλύει τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) στην N-ακετυλογλυκοζαμίνη. Μέχρι στιγμής, δεν είναι γνωστό αν υπάρχει αντίστοιχος μηχανισμός ανακύκλωσης στα έντομα. Αν το ένζυμο υπάρχει, τότε η N-ακετυλογλυκοζαμίνη μπορεί να επανεισαχθεί στο βιοσυνθετικό μονοπάτι (Liu X., Zhang J. et al., 2019).



Εικόνα_12: Σχηματική αναπαράσταση βιοσυνθετικού μονοπατιού της χιτίνης. Με πορτοκαλί χρώμα διακρίνονται τα ένζυμα που συμμετέχουν και με μπλε χρώμα τα ενδιάμεσα μόρια (Liu X., Cooper A. et al., 2019).

1.7 Κατηγορίες γονιδίων–στόχων που σχετίζονται με χιτίνη

Ο σχηματισμός και η ρύθμιση των δομών που περιέχουν χιτίνη περιλαμβάνουν κυρίως δύο κατηγορίες πρωτεϊνών: τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της χιτίνης και δομικές πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτή. Κατά συνέπεια, λόγω της σημαντικότητάς τους στην επιβίωση των εντόμων, αποτελούν λογικούς στόχους σύγχρονων μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού (Tetrau & Wang, 2019).

Η σύνθεση της χιτίνης στα έντομα ρυθμίζεται στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Η σύνθεση, αποδόμηση και ανακύκλωση της περιλαμβάνει κυρίως τέσσερις κατηγορίες πρωτεϊνών: τις συνθάσες χιτίνης, τις απακετυλάσες, τις χιτινάσες και τις N-ακετυλογλυκοσιδάσες. Κάθε κατηγορία αυτών αποτελεί πιθανό στόχο σύγχρονων εντομοκτόνων (Tetrau & Wang, 2019).

Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί δύο γονίδια συνθάσης χιτίνης, με διαφορετική ιστο-ειδική έκφραση. Το γονίδιο *CHS-1* συμμετέχει στη σύνθεση χιτίνης στην υποδερμίδα του εξωσκελετού, ενώ το γονίδιο *CHS-2* στο επιθήλιο του στομάχου, για το σχηματισμό της Περιτροφικής Μεμβράνης. Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα σίγησής τους με ποικίλα αποτελέσματα. Σίγηση του *CHS-1* επέφερε μη φυσιολογική ανάπτυξη του εξωσκελετού και των δομών της τραχείας, επιβραδυσμένη ανάπτυξη και αυξημένη θνησιμότητα (με επισκόπηση Tetrau & Wang, 2019). Σίγηση του *CHS-1* του *T. castaneum* με dsRNA οδήγησε σε διαταραχή και των τριών σταδίων έκδυσης (από προνύμφη ενός σταδίου σε επόμενο, από προνύμφη τελευταίου σταδίου προς νύμφη και από νύμφη σε ενήλικο άτομο) εξαιτίας της μειωμένης σύνθεσης χιτίνης του εξωσκελετού (Liu X.,Zhang J. et al., 2019). Αντίστοιχο πείραμα σίγησης της *CHS-1* στο *A. aegypti* (*AeCS1*) οδήγησε σε μειωμένη ανάπτυξη του εντόμου και αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με έντομα της συνθήκης ελέγχου (Singh et al., 2013). Όσον αφορά το άλλο γονίδιο, σίγηση του *CHS-2* επέφερε αυξημένη διαπερατότητα της περιτροφικής μεμβράνης, επιβραδυσμένη ανάπτυξη και αυξημένη θνησιμότητα, ειδικά κατά την έκδυση από το στάδιο της νύμφης προς το ενήλικο άτομο (με επισκόπηση Tetrau & Wang, 2019). Σίγηση του *CHS-2* του *T. castaneum* οδήγησε σε πλήρη απουσία χιτίνης στην περιτροφική μεμβράνη και διατάραξη της λειτουργίας της. Λόγω της μειωμένης ικανότητας πέψης της τροφής από τα κατάλληλα ένζυμα και λήψης των θρεπτικών ουσιών, οι προνύμφες εμφάνιζαν φαινότυπο ασιτίας με μειωμένο βάρος σώματος και έλλειψη λιπιδίων σε λιπαρά σωματίδια (fat bodies). Επιπλέον, κανένα θηλυκό άτομο που υπέστη σίγηση του *CHS-2* δεν ήταν ικανό να ωοαποθέσει. Το φαινόμενο μπορεί πιθανόν να εξηγηθεί ως αποτέλεσμα της ασιτίας και αδυναμίας λήψης απαραίτητων θρεπτικών ουσιών (Liu X.,Zhang J. et al., 2019).). Αντίθετα, σίγηση της *CHS-2* στο *A. aegypti* (*AeCS2*) δεν ήταν επιβλαβές στην ανάπτυξη των προνυμφών. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στην μειωμένη ή μη επαρκή διαταραχή της δομής της περιτροφικής μεμβράνης από τη σίγηση του γονιδίου ή ότι διατάραξη της ΠΜ δεν είναι ικανή να προκαλέσει θνησιμότητα στις προνύμφες *A. aegypti* (Singh et al., 2013).

Οι απακετυλάσες συμμετέχουν στην τροποποίηση των πολυμερών χιτίνης. Ταξινομούνται σε πέντε (5) κατηγορίες, με βάση αλληλουχικές ομοιότητες και δομικές περιοχές. Με βάση τον ιστο-έντερο και αυτές που δεν εκφράζονται εκεί, συμπεριλαμβανομένου και της υποδερμίδας. Αυτές που ανήκουν στη πρώτη υποκατηγορία πιθανόν συμμετέχουν στην διαμόρφωση της περιτροφικής μεμβράνης. Μεταλλάγματα αυτών που ανήκουν στη δεύτερη υποκατηγορία, που εντοπίζονται κυρίως στον εξωσκελετό και στο τραχειακό σύστημα, οδηγούν σε επιμηκυμένο μη φυσιολογικό τραχειακό σωλήνα σε έμβρυα *D. melanogaster*. Επιπλέον, λειτουργική απώλεια απακετυλασών Serp και Verm στη *D. melanogaster* οδηγεί σε αποδιοργάνωση του

εξωσκελετού της προνύμφης. Στο έντομο *T. castaneum* μειωμένη έκφραση κάποιων απακετυλασών του (*TcCDA1*, *TcCDA2*, *TcCDA5*), που εκφράζονται στον εξωσκελετό, επέφερε δυσκολία στην αποβολή του. Τέλος, μειωρύθμιση απακετυλασών στο περίβλημα του *Nilaparvata lugens* επέφερε το θάνατο (Yu et al., 2016). Οι φυσιολογικές λειτουργίες των απακετυλασών μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών εντόμων, όμως μερικές από αυτές είναι δυνατό να εξεταστούν ως πιθανοί στόχοι (Tetrau & Wang, 2019).

Η στόχευση χιτινασών για τον πληθυσμιακό έλεγχο εντόμων ενδείκνυται για διάφορα είδη με καταστολή γονιδιακής έκφρασης (Tetrau & Wang, 2019). Με βάση φυλογενετικές αναλύσεις και αλληλουχικές ομοιότητες, οι χιτινάσες και πρωτεΐνες που μοιάζουν με αυτές (chitinase-like proteins) ταξινομούνται σε έντεκα ομάδες και διαφέρουν ως προς την οργάνωση των δομικών περιοχών που φέρουν, τον ιστό ή το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο εκφράζονται (Liu X., Cooper A. et al., 2019). Ακόμα, εμφανίζουν διαφορές ως προς την καταλυτική τους ικανότητα και τα υποστρώματα στα οποία δρουν. Συμπερασματικά, συμμετέχουν σε πολλές λειτουργίες, όπως στην έκδυση, στη διοργάνωση του εξωσκελετού και της περιτροφικής μεμβράνης, στην πέψη και άμυνα ή ως αυξητικοί παράγοντες (Muthukrishnan et al., 2019). Στο *T. castaneum* η σίγηση συγκεκριμένων χιτινασών (*TcCHT5*, *TcCHT10*, *TcCHT7*, *TcIDF2*) επηρεάζει την έκδυση και την ανάπτυξη (Liu X., Zhang J. et al., 2019). Καταστολή των χιτινασών της ομάδας V στη *D.melanogaster* είχε ως αποτέλεσμα μη φυσιολογική μορφολογία εξωσκελετού, ελλαττωματική έκδυση στο στάδιο της προνύμφης και ενήλικου ατόμου και θνησιμότητα (Tetrau & Wang, 2019).

Οι N-ακετυλογλυκοσιδάσες στα έντομα καταλύουν την αφαίρεση σακχάρων από ολιγομερή N-ακετυλογλυκοζαμίνης και προκύπτουν μονομερή κατά τον καταβολισμό της χιτίνης (Tetrau 2019). Οι πρωτεΐνες έχουν απομονωθεί από πληθώρα περιοχών, στο ρευστό έκδυσης, στην αιμολέμφο, στον εξωσκελετό και στο στόμαχο (Liu X., Zhang J. et al., 2019). Τα ένζυμα κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες, εκ των οποίων η ομάδα I φαίνεται να έχει ευρύτερη έκφραση και σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της χιτίνης. Σίγηση των ενζύμων της ομάδας I οδηγεί σε ελλαττωματική έκδυση (Tetrau & Wang, 2019). Καταστολή του *TcNAG1* (μέγιστη έκφραση στον εξωσκελετό της νύμφης) με RNAi στο *T. castaneum* οδηγεί σε διακεκομμένη ανάπτυξη και θνησιμότητα από το στάδιο της νύμφης στο ενήλικο άτομο σε ποσοστό 90%, ενώ καταστολή του *TcNAG2* σε μειωμένη θνησιμότητα (Muthukrishnan et al., 2019, Liu X., Zhang J. et al., 2019).

Οι περιοχές που περιέχουν χιτίνη, δηλαδή ο εξωσκελετός και η περιτροφική μεμβράνη, σχηματίζονται με τη βοήθεια δομικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με χιτίνη στον εξωσκελετό ομαδοποιούνται με βάση συγκεκριμένα αλληλουχικά ή αμινοξικά μοτίβα (Zhu et al., 2016). Κάποιες ομάδες τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι Knickkopf (KNK), οι Πρωτεΐνες Εξωσκελετού Ανάλογες με τις Περιτροφίνες (Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins, CPAPs) και οι Πρωτεΐνες Εξωσκελετού με μοτίβα Rebers & Riddiford (Cuticular Protein with R&R Motif, CPRs) (Muthukrishnan et al., 2019).

Οι KNK πρωτεΐνες συμμετέχουν στην οργάνωση χιτινούχων στρωμάτων και τα προστατεύουν από τη δράση χιτινασών (Zhu et al., 2016). Καταστολή του μεταγράφου *TcKnk* στο *T. castaneum* οδήγησε σε θάνατο κατά την έκδυση όλων των αναπτυξιακών σταδίων (από προνύμφη ενός σταδίου σε επόμενο, από προνύμφη τελευταίου σταδίου προς νύμφη και από νύμφη σε ενήλικο άτομο). Ποσοτική χημική ανάλυση έδειξε ότι έντομα που υποβλήθηκαν στην καταστολή του γονιδίου είχαν μειωμένη συνολική ποσότητας χιτίνης (Chaudhari et al., 2011).

Οι CPAPs κατηγοριοποιούνται σε δύο οικογένειες, ανάλογα με το αν περιέχουν μία (CPAP1) ή τρεις (CPAP3) δομικές περιοχές CBD2 (Liu X., Zhang J. et al., 2019). Μεταξύ των πρωτεϊνών

της πρώτης οικογένειας στο *T. castaneum*, μόνο τρεις υποκατηγορίες έχει δειχθεί ότι έχουν απαραίτητη λειτουργία και καταστολή κάθε μίας ξεχωριστά οδηγεί σε θνησιμότητα κατά το στάδιο έκδυσης προς το ενήλικο άτομο, απώλεια δομικής ακεραιότητας του εξωσκελετού ή παύση σε εμβρυικό στάδιο (Muthukrishnan et al., 2019). Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητας σε χιτίνη, τα έντομα απεβίωσαν ή ανέπτυξαν σοβαρές βλάβες στον εξωσκελετό κατά την έκδυση προς την ενήλικη μορφή (Zhu et al., 2016). Αυτές οι τρεις υποκατηγορίες εμφανίζουν την υψηλότερη αλληλουχική συντήρηση στην CBD περιοχή μεταξύ των εντόμων (68-85%) (Muthukrishnan et al., 2019).

Αναφορικά με τις CPR πρωτεΐνες, αυτές ταυτοποιήθηκαν από τους Rebers και Riddiford το 1988 και το χαρακτηριστικό μοτίβο που φέρουν είναι το : G-x(8)-G-x(6)-Y-x(2)-A-x-E-x-G-F-x(7)-P-x-P. Τα σύμβολα ερμηνεύονται ως εξής, G:Γλυκίνη, Y:Τυροσίνη, A:Αλανίνη, E:Γλουταμινικό οξύ, F:Φαινυλαλανίνη, P:Προλίνη, x: οποιοδήποτε αμινοξύ, αριθμός σε παρένθεση: πλήθος αμινοξικών κατάλοιπων. Η πρωτεϊνική οικογένεια περιλαμβάνει τρεις ομάδες, τις RR-1, RR-2 και RR-3. Παραδείγματα πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο έδειξαν μία συσχέτιση προέλευσης των RR-1 από εύκαμπτο μέρος του εξωσκελετού, οι RR-2 από άκαμπτο μέρος του εξωσκελετού, ενώ η χωρική προέλευση των RR-3 δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα σε βάθος (Liu X., Zhang J. et al., 2019, Willis, 2010). Στο *T. castaneum* οι πρωτεΐνες TcCPR27 and TcCPR18 ανήκουν στην οικογένεια RR-2 και εντοπίζονται στο έλυτρο του εντόμου (δομή που έχει υποστεί σκληρωτίνωση και σκούρο χρωματισμό στο οπίσθιο ζεύγος φτερών), στο πρυνότο (ραχιαία σκληρωποιημένη περιοχή του προθώρακα) και στην κοιλιακή περιοχή του εξωσκελετού (Noh et al., 2014). Καταστολή των γονιδίων οδήγησε σε φαινότυπους με δύσμορφα και εξασθενημένα έλυτρα. Πιο συγκεκριμένα, έντομα με καταστολή του *TcCPR27* είχαν μικρότερα, τσαλακωμένα, στρεβλωμένα, θυριδωτά και λιγότερο άκαμπτα έλυτρα σε σχέση με τον πληθυσμό ελέγχου. Τα ενήλικα άτομα δεν μπορούσαν να αναδιπλώσουν φυσιολογικά το οπίσθιο ζεύγος φτερών λόγω του διαφοροποιημένου σχήματος του ελύτρου και απεβίωσαν λόγω αφυδάτωσης περίπου μία εβδομάδα μετά τη μεταμόρφωση σε ενήλικο. Έντομα με καταστολή του *TcCPR18* εμφάνισαν μικρότερου μεγέθους έλυτρα με φυσιολογική μορφολογική δομή. Ταυτόχρονη καταστολή των δύο γονιδίων οδήγησε σε φαινότυπο με πιο έντονα χαρακτηριστικά της καταστολής του *TcCPR27*. Σίγηση των γονιδίων *TcCPR18* και *TcCPR27* ξεχωριστά ή συνδυαστικά δεν επηρέασε τις εκδύσεις του εντόμου (Noh et al., 2014). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των μελετών δείχνουν ότι οι CPR πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη συνολική οργάνωση της χιτίνης στον εξωσκελετό (Muthukrishnan et al., 2019).

Οι δομικές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην περιτροφική μεμβράνη, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, είναι οι PMPs. Οι πρωτεΐνες περιτροφικής μεμβράνης, γνωστές και ως περιτροφίνες, περιέχουν ένα έως δεκατέσσερα CDB μοτίβα και εκφράζονται κυρίως στο μέσο έντερο. Ο ρόλος τους είναι να δημιουργούν δεσμούς μεταξύ των ινιδίων χιτίνης και των CDB μοτίβων ώστε να σχηματιστεί η περιτροφική μεμβράνη (Tetrau & Wang, 2019). Η ΠΜ είναι μία εξωκυτταρική δομή, η οποία περιβάλλει το εντερικό επιθήλιο και εκκρίνεται κατά τα προνυμφικά στάδια (τα άτομα τρέφονται με θρεπτικά από το εξωτερικό τους περιβάλλον) και σε μερικά είδη εντόμων στα ενήλικα άτομα σε απόκριση ερεθίσματος τροφής. Μελέτες που έγιναν στο *T. castaneum* έδειξαν ότι κάποιες PMPs είναι απαραίτητες για την επιβίωση του εντόμου πέρα από τα προνυμφικά στάδια. Σε προνύμφες του εντόμου έγινε σίγηση του *TcPMP3* μέσω dsRNA με θνησιγόνο φαινότυπο κατά την έκδυση προς το στάδιο της νύμφης (Εικ._13c). Οι εκδύσεις μεταξύ των προνυμφικών σταδίων δεν φάνηκε να επηρεάστηκαν. Χορήγηση dsRNA πριν το στάδιο της νύμφης οδήγησε σε αναπτυξιακή παύση, λίγο πιο πριν από την έκδυση προς το ενήλικο άτομο, και θάνατο 4-5 μέρες μετά (Εικ._13d). Σίγηση του *TcPMP5-B* με dsRNA πραγματοποιήθηκε στο

προ-τελευταίο στάδιο της προνύμφης, τα έντομα μεταβήκαν στο τελευταίο στάδιο, όμως έπαψαν να αναπτύσσονται κατά την έκδυση της προνύμφης και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με ατελή ανάπτυξη της νύμφης χωρίς έκδυση(Εικ. _13e). Χορήγηση dsRNA για το *TcPMP5-B* μέσω ένεσης πριν το στάδιο της νύμφης είχε ως αποτέλεσμα αναπτυξιακή παύση κατά την έκδυση προς το ενήλικο και αποτυχία ολοκλήρωσής της (Εικ._13f). Παρατηρήθηκε απόλυση και μερική αποκόλληση του εξωσκελετού της νύμφης, όμως τα έντομα δεν τον απέβαλαν ολοκληρωτικά, παρέμεινε προσκολλημένος στην κοιλιακή περιοχή. Ο ενήλικος εξωσκελετός ήταν εμφανής κάτω από αυτόν της νύμφης (Agrawal et al., 2014).



Εικόνα_13: (a,b) Δείγματα ελέγχου, έγχυση dsRNA που οδηγεί σε φαινότυπο με λευκά μάτια. Φαινότυπος εντόμων μετά από έγχυση dsRNA για τα γονίδια *TcPMP3* και *TcPMP5-B* (Agrawal et al., 2014).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σίγηση μίας Chitin-binding πρωτεΐνης, καθώς επίσης ενός γειτονικού μεταγράφου (lncRNA) με ενδεχόμενο ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση του παραπάνω γονιδίου στο κουνούπι *Aedes albopictus*. Από την επίδραση της σίγησης των δύο γονιδίων θα διαπιστωθεί εάν η πρωτεΐνη συμμετέχει στη δέσμευση της χιτίνης και εάν συμβάλλει στο φυσιολογικό σχηματισμό του μέσου εντέρου του εντόμου. Τα συγκεκριμένα γονίδια επελέγησαν βάσει του προφίλ έκφρασης που εμφανίζουν στα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια (προνύμφης, νύμφης και ενηλίκου) σε συνδυασμό με RNAseq και γονιδιωματικά δεδομένα. Συνεπώς, κατασκευάστηκαν dsRNA μόρια που στοχεύουν τα μετάγραφα των γονιδίων και χορηγήθηκαν μέσω τροφής σε προνύμφες. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα αναδείξουν κατά πόσο τα συγκεκριμένα γονίδια θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως πιθανοί στόχοι για την ανάπτυξη βιολογικών εντομοκτόνων.

3. Μέθοδοι & Υλικά

3.1 Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού *Aedes albopictus*

Ο εργαστηριακός πληθυσμός *Aedes albopictus* που χρησιμοποιήθηκε είναι προσφορά του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και προέρχεται από την περιοχή του Βόλου. Το έντομο διαβιώνει σε ειδικά διαμορφωμένα κλουβιά και για τη θρέψη των ενήλικων ατόμων χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σακχαρόζης 10%. Οι προνύμφες τρέφονται με θρυμματισμένη ξηρά γατοτροφή. Οι συνθήκες του εργαστηρίου είναι σταθερές με θερμοκρασία 26°C, σχετική υγρασία 60% και φωτοπερίοδο (σε ώρες) 14:10 (φως:σκοτάδι).

3.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

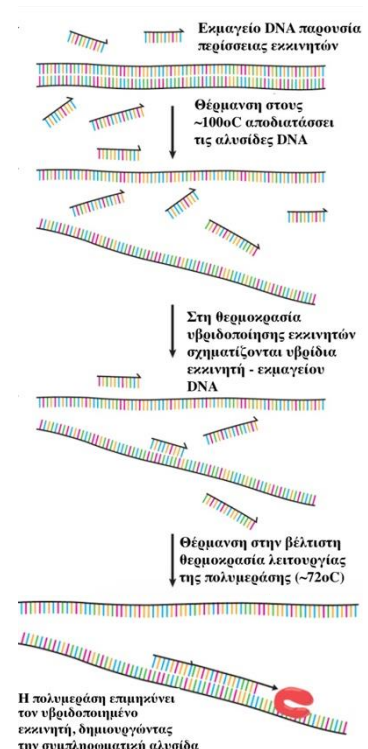
Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μία σημαντική μέθοδο της μοριακής βιολογίας και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό στοχευμένων αλληλουχιών DNA. Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην αντιγραφή του κυταρικού DNA, με κύρια διαφορά τη χρήση μονόκλωνων συνθετικών νουκλεοτιδίων-εκκινητών (primers), συμπληρωματικών των άκρων της επιθυμητής αλληλουχίας.

Η διαδικασία ξεκινά με την θέρμανση του δείγματος στους 95°C και αποδιάταξη των αλυσίδων DNA. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας, ώστε να γίνει ειδική υβριδοποίηση των εκκινητών με τη συμπληρωματική τους αλληλουχία και έπειτα ρύθμισή της στους 72°C, τη βέλτιστη για τη λειτουργία της Taq πολυμεράσης. Τα τρία αυτά στάδια επαναλαμβάνονται με κυκλική σειρά, περί τις 30 - 40 φορές. Πέραν των κύκλων, στο πρόγραμμα του κυκλικού θερμοποιητή προστίθενται ακόμα δύο στάδια, μία αρχική θέρμανση (στους 95°C) και μία τελική επιμήκυνση του προϊόντος (στους 72°C).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα υλικά-αντιδραστήρια. Αυτά είναι η μήτρα DNA, από την οποία πρόκειται να ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα DNA, ένα ζεύγος εκκινητών ειδικά σχεδιασμένο για την αλληλουχία-στόχο (γονίδιο της chitin-binding πρωτεΐνης), μία θερμοανθεκτική πολυμεράση (Taq), ρυθμιστικό διάλυμα και χλωριούχο μαγνήσιο για την βέλτιστη δραστηριότητά της, μείγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδικών βάσεων και αποστειρωμένο H₂O.

Υλικά

- ❖ Μήτρα DNA
- ❖ Εκκινητές (forward, reverse)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X) : KAPA Buffer B
- ❖ dNTPs mix
- ❖ MgCl
- ❖ ddH₂O
- ❖ KAPA Taq Πολυμεράση



Εικόνα_14: Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)(Lewin's Genes XI, 2009).

Μέθοδος

Υπολογισμός των κατάλληλων ποσοτήτων των υλικών, προσθήκη σε δοκιμαστικούς σωλήνες ειδικού μεγέθους για τον θερμικό κυκλοποιητή και διαμόρφωση του κατάλληλου προγράμματος της αντίδρασης που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας_1: Στάδια θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	30 sec	
Υβρισμός εκκινητών	53°C	30 sec	35
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72°C	25 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	1
Συντήρηση	4°C	∞	

Πίνακας_2: Αντιδραστήρια και όγκος ανά αντίδραση για την PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μL)/ Αντίδραση
Μήτρα DNA (cDNA L3-L4)			2μL
Forward εκκινητής	10μM	0,4 μM	1μL
Reverse εκκινητής	10μM	0,4 μM	1μL
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	10X	1X	2,5μL
dNTPs mix	10mM/ νουκλεοτίδιο	0,2 mM/ νουκλεοτίδιο	0,5μL
MgCl ₂	25mM	2mM	0,5μL
ddH ₂ O			17,3μL
KAPA Taq Πολυμεράση	5 U/μL	0,5 U	0,2μL
Τελικός όγκος αντίδρασης			25μL

3.3 Colony PCR

Η colony PCR αποτελεί μία παραλλαγή της τεχνικής PCR. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μετασηματισμένων κλώνων βακτηρίου *E. coli*, οι οποίοι έχουν λάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η ανίχνευση πραγματοποιείται με τον σχεδιασμό και υλοποίηση μίας PCR με τους ίδιους εκκινητές που ενισχύουν το επιθυμητό γονίδιο, αλλά ως μήτρα DNA χρησιμοποιείται ελάχιστη ποσότητα βακτηριακής αποικίας.

Υπάρχουν ελάχιστες διαφορές ως προς το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή. Ο χρόνος της αρχικής αποδιάταξης και οι κύκλοι αυξάνονται ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων της αλληλουχίας στόχου από βακτηριακή αποικία.

Πίνακας_3: Στάδια θερμικού κυκλοποιητή για την colony PCR

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	30 sec	40
Υβρισμός εκκινητών	53°C	30 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72°C	25 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	5 min	1
Συντήρηση	4°C	∞	

Πίνακας_4: Αντιδραστήρια και όγκος ανά αντίδραση για την colony PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μL)/ Αντίδραση
Μήτρα DNA - Βακτηριακή αποικία			
Forward εκκινητής	10μM	0,4 μM	1μL
Reverse εκκινητής	10μM	0,4 μM	1μL
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (KAPA Taq Buffer B)	10X	1X	2,5μL
dNTPs mix	10mM/ νουκλεοτίδιο	0,2 mM/ νουκλεοτίδιο	0,5μL
MgCl ₂	25mM	2mM	0,5μL
ddH ₂ O			19,3μL
KAPA Taq Πολυμεράση	5 U/μL	0,5 U	0,2μL
Τελικός όγκος αντίδρασης			25μL

3.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και απομόνωσης τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος βασίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων σε ηλεκτρικό πεδίο. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια νουκλεϊκών οξέων κινούνται από τον αρνητικά φορτισμένο πόλο (κάθοδος) προς τον θετικά φορτισμένο πόλο (άνοδος). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος επηρεάζει τον διαχωρισμό των τμημάτων: Η χαμηλή συγκέντρωση αγαρόζης δημιουργεί μεγάλους πόρους και διαχωρίζονται καλύτερα μεγάλοι μεγέθους τμήματα. Αντίθετα, υψηλή συγκέντρωση αγαρόζης δημιουργεί μικρούς πόρους και διαχωρίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια μικρού μεγέθους τμήματα. Η ταχύτητα των τμημάτων δια μέσου του πηκτώματος μειώνεται όσο το μέγεθός τους αυξάνεται και είναι ανάλογη της ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου. Τέλος, η οπτικοποίηση των τμημάτων γίνεται με τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων φθορίζοντων ουσιών, όπως βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) και εξέταση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV.

Ακολουθούν τα βήματα για την παρασκευή ενός πηκτώματος αγαρόζης.

Υλικά

- ❖ Διάλυμα TBE 0,5X
- ❖ Αγαρόζη (AgaPure Agarose LE, Canvax Biotech)
- ❖ Βρωμιούχο αιθίδιο
- ❖ Ογκομετρικός σωλήνας
- ❖ Κωνική φιάλη

Μέθοδος

1. Υπολογισμός γραμμαρίων αγαρόζης σύμφωνα με την πυκνότητα του επιθυμητού ηλεκτωματός και ανάκτησή τους με τη χρήση ηλεκτρονικού ζυγού.
2. Υπολογισμός διαλύματος TBE 0,5X, σύμφωνα με τον τελικό όγκο του ηλεκτωματος και ανάκτησή του με χρήση ογκομετρικού σωλήνα.
3. Προσθήκη του διαλύματος TBE 0,5X και της αγαρόζης σε κωνική φιάλη.
4. Θέρμανση του μίγματος μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη.
5. Ανάδευση της κωνικής φιάλης και προσθήκη EtBr σε συγκέντρωση 3-4μL/100mL ηλεκτωματος όταν το διάλυμα έχει θερμοκρασία περίπου 55°C.
6. Ανάδευση ώστε το διάλυμα να ομογενοποιηθεί και απόρριψή του σε κατάλληλο καλούπι.

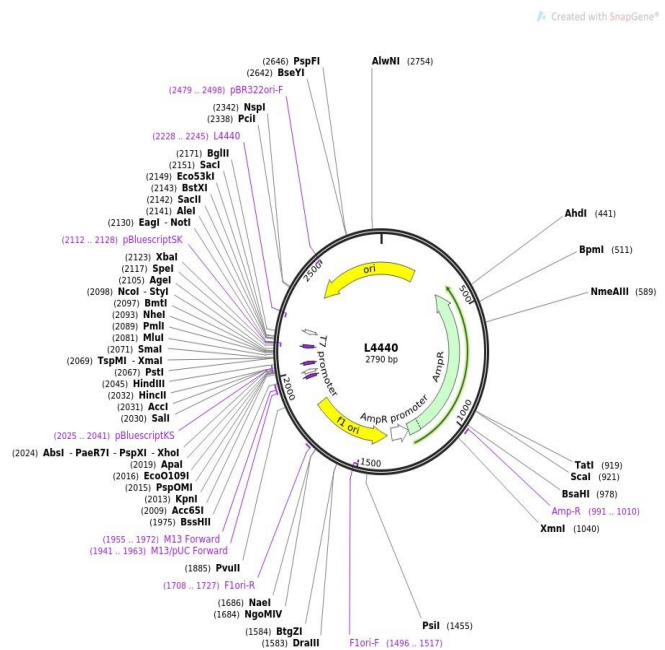
3.5 Επεξεργασία πλασμιδίου-φορέα L4440

Το πλασμίδιο που επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου είναι το L4440. Ο φορέας αρχικά βρίσκεται σε κυκλική μορφή και υφίσταται επεξεργασία προκειμένου να εισαχθεί σε αυτόν το κατάλληλο ένθεμα. Περιέχει περιοχή πολυσυνδέτη, γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (αμπικιλίνη), υποκινητές για την T7 RNA πολυμεράση και θέσεις σύνδεσης για το ανάλογο μεταγραφικού παράγοντα, το IPTG.

Πρώτο βήμα για την κλωνοποίηση του ενθέματος αποτελεί η γραμμοποίηση του κυκλικού φορέα. Η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω πέψης του κυκλικού φορέα με ένα ένζυμο περιορισμού, του οποίου η αλληλουχία αναγνώρισης εντοπίζεται μόνο μία φορά.

Η επιλογή του ενζύμου έγινε με τη χρήση της ηλεκτρονικής πλατφόρμας Addgene (<https://www.addgene.org>) και χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο SmaI.

Δεύτερο βήμα αποτελεί η προσθήκη T-άκρων στο γραμμικό φορέα. Η αντίδραση είναι απαραίτητη, διότι το πλασμίδιο αποκτά μία βάση θυμίνης στα 5' άκρα και κατ'αυτό τον τρόπο γίνονται συμπληρωματικά με τα άκρα του ενθέματος (έχει προστεθεί μία βάση θυμίνης στα 3' άκρα κατά την αντίδραση πολυμεράσης). Έτσι, διασφαλίζεται η εισαγωγή του τμήματος γονιδίου στο φορέα.



Εικόνα_15: Χάρτης πλασμιδίου L4440 (www.addgene.org).

3.5.1 Γραμμοποίηση πλασμιδίου

Υλικά

- ❖ Πλασμίδιο L4440 (2mg, 512ng/μL)
- ❖ Ενζυμο περιορισμού SmaI (20 U/μL) : NEB
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X) : Cut Smart Buffer, NEB
- ❖ ddH₂O

Μέθοδος

Υπολογισμός των κατάλληλων ποσοτήτων των υλικών, προσθήκη σε δοκιμαστικούς σωλήνες ειδικού μεγέθους για τον θερμικό κυκλοποιητή και διαμόρφωση του κατάλληλου προγράμματος της αντίδρασης που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας_5: Αντίδραση πέψης κυκλικού πλασμιδίου L4440 - Γραμμοποίηση

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)/Αντίδραση	Πρόγραμμα
Πλασμίδιο L4440	3,9μL	1 ώρα στους 37°C 20 λεπτά στους 65°C
Ενζυμο περιορισμού - SmaI	1μL	
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	5μL	
ddH ₂ O	40,1μL	
Ντελ	50μL	

3.5.2 Προσθήκη T-άκρων

Υλικά

- ❖ Γραμμικό Πλασμίδιο L4440 (703ng, 28ng/μL)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X) : KAPA Taq Buffer B
- ❖ dTTPs (100 mM) : Gene ON
- ❖ KAPA Taq Πολυμεράση (5 U/μL)
- ❖ ddH₂O

Μέθοδος

1. Υπολογισμός των αντιδραστηρίων και προσθήκη τους σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5mL.
2. Επώαση του σωλήνα σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 72°C για 2 ώρες.

Πίνακας_6: Αντίδραση προσθήκης T- άκρων στο πλασμίδιο L4440

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)/Αντίδραση	Πρόγραμμα
Πλασμίδιο L4440	25,1μL	2 ώρες στους 72°C
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	5μL	
dTTPs	1μL	
KAPA Taq Πολυμεράση	0,6μL	
ddH ₂ O	18,3μL	
Ντελ	50μL	

3.6 Αντίδραση λιγάσης - Σύνδεση μορίων DNA σε πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Κατά την αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται εισαγωγή του επιθυμητού ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. Το ένθεμα βρίσκεται σε περίσσεια, με αναλογία 14:1 ένθεμα προς φορέα. Συνήθως η αντίδραση λαμβάνει χώρα με αναλογία 7:1, όμως σε προηγούμενη προσπάθεια δεν έγινε επιτυχημένη απομόνωση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Στον υπολογισμό των αντιδραστηρίων λήφθηκαν υπόψη τα ζεύγη βάσεων του ενθέματος (381 bp) και του φορέα (2790 bp), η μεταξύ τους αναλογία (14:1) και η ποσότητα φορέα που θα χρησιμοποιηθεί (50ng). Με βάση τον παρακάτω τύπο και τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων, σχεδιάστηκε η αντίδραση λιγάσης.

$$\text{ng ενθέματος} = (\text{ng φορέα}) \times (\text{bp ενθέματος} / \text{bp φορέα}) \times (\text{Μοριακός λόγος ενθέματος:φορέα})$$

Υλικά

- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X) : T4 ligase Buffer, NEB
- ❖ Γραμμικός πλασμιδιακός φορέας (L4440 με T-άκρα, 50ng, 12,8 ng/μL)
- ❖ Ένθεμα (13 ng/μL)
- ❖ T4 Λιγάση (400 U/μL) : NEB
- ❖ ddH₂O

Μέθοδος

Υπολογισμός των κατάλληλων ποσοτήτων των υλικών, προσθήκη σε δοκιμαστικό σωλήνα ειδικού μεγέθους για τον θερμικό κυκλοποιητή και διαμόρφωση του κατάλληλου προγράμματος της αντίδρασης που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας_7: Αντίδραση λιγάσης - Σύνδεση ενθέματος Chitin-BP με φορέα pL4440

Αντιδραστήρια	Ογκος (μL)/Αντίδραση	Πρόγραμμα
Πλασμίδιο L4440 με T-άκρα (φορέας)	3,9μL	16 ώρες στους 16°C 10 λεπτά στους 65°C
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	2μL	
PCR product Chit (ένθεμα)	7,2μL	
T4 Λιγάση	1μL	
ddH ₂ O	5,9μL	
Ντελ	20μL	

3.7 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA με χρήση kit

Μετά την αντίδραση λιγάσης ακολουθεί καθαρισμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται από το διάλυμα τα υπολείμματα προηγούμενων αντιδράσεων. Στοιχεία που περιέχονται σε προηγούμενα βήματα, όπως άλατα και ιόντα των ρυθμιστικών διαλυμάτων ενζύμων, μπορεί να αποτελέσουν εμπόδια σε επόμενες διαδικασίες. Η εισαγωγή του πλασμιδίου στο βακτηριακό κύτταρο μπορεί να επηρεαστεί από τέτοια συστατικά. Ο καθαρισμός πλασμιδιακού DNA έγινε με χρήση kit της εταιρείας Macherey-Nagel (PCR-clean up).

Υλικά

- ❖ Buffers NT1, NT3, AW, A4
- ❖ Στήλη
- ❖ ddH₂O
- ❖ Υδατόλουτρο (65°C)

Μέθοδος

1. Ρύθμιση του συνολικού όγκου της αντίδρασης στα 100μL με προσθήκη H₂O. Ανάμειξη ενός (1) όγκου δείγματος με δύο (2) όγκους διαλύματος NT1.
2. Τοποθέτηση στήλης σε σωλήνα συλλογής (2mL) και μεταφορά του δείγματος. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g . Απομάκρυνση του εκλούσματος. Επανάληψη του βήματος σε περίπτωση που υπάρχει περίσσεια δείγματος.
3. Προσθήκη 700μL Buffer NT3, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g και απομάκρυνση του εκλούσματος. Επανάληψη του βήματος για τη μείωση εναπομεινάντων αλάτων.
4. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g για να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3 και απομάκρυνση του σωλήνα συλλογής.
5. Μεταφορά της στήλης σε σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 mL και προσθήκη 30μL προθερμασμένου ddH₂O (στους 65°C). Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g.

3.8 Πρωτόκολλο παρασκευής δεκτικών κυττάρων *E. coli* για ηλεκτροδιάτρηση

Υλικά

- ❖ Κύτταρα HT115
- ❖ Αποστειρωμένος μικροβιολογικός κρίκος
- ❖ Στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ με τετρακυκλίνη (10μg/mL)
- ❖ Υγρό θρεπτικό LB Άγαρ με τετρακυκλίνη (10μg/mL)
- ❖ Προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10%
- ❖ Αποστειρωμένη κωνική φιάλη 500mL και δοκιμαστικός σωλήνας
- ❖ Σωλήνες τύπου falcon των 50mL και προψυγμένοι σωλήνες τύπου erpendorf 1,5mL
- ❖ ddH₂O

Μέθοδος

1. Ενοφθαλμισμός κυττάρων HT115, που διατηρούνται σε κλάσμα γλυκερόλης στους -80oC με χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου, σε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ με τετρακυκλίνη. Επώαση της καλλιέργειας για 16 ώρες στους 37°C.
2. Προσθήκη υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth 3mL σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα, κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
3. Απομόνωση μοναδιαίας βακτηριακής αποικίας από την στερεή καλλιέργεια HT115 και ενοφθαλμισμός της στο υγρό θρεπτικό μέσο.
4. Επώαση της υγρής καλλιέργειας για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm).
5. Μεταφορά της βακτηριακής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με υγρό LB Broth 300mL.

6. Επώαση στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ του εναιωρήματος να κυμαίνεται μεταξύ 0,4 - 0,6.
7. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνες τύπου falcon των 50mL και διατήρησή τους στον πάγο για περίπου 10 λεπτά, ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C.
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε προψυγμένο αποστειρωμένο ddH₂O προσθέτοντας 50mL ddH₂O ανά falcon.
10. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9.
11. Απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10%, προσθέτοντας 4mL γλυκερόλης ανά falcon και φυγοκέντρηση στις 4.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C.
12. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10%, προσθέτοντας 250μL γλυκερόλης ανά falcon.
13. Διαίρεση του κυτταρικού εναιωρήματος σε κλάσματα των 50μL σε προψυγμένοι σωλήνες τύπου erpendorf 1,5mL , και άμεση ψύξη τους με υγρό άζωτο (snap-freeze).
14. Διατήρηση των κλασμάτων σε θερμοκρασία -80°C.

Σημείωση: Ο όγκος του LB Broth (βήμα 5) καθορίζεται από τον επιθυμητό τελικό αριθμό κυτταρικών κλασμάτων.

3.9 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Ο μετασηματισμός των κυττάρων *E. coli* γίνεται με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται ποσότητα ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και το δείγμα διαπερνάται από παλμό ηλεκτρικού ρεύματος. Σχηματίζονται οπές στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων και εισέρχονται πλασμίδια στο εσωτερικό τους.

Υλικά

- ❖ Δεκτικά κύτταρα HT115 για ηλεκτροδιάτρηση
- ❖ Ανασυνδυασμένος φορέας
- ❖ Υγρό θρεπτικό LB Broth
- ❖ Στερεό θρεπτικό LB άγαρ με τετρακυκλίνη (10μg/mL) και αμπικιλίνη (100μg/mL).

Μέθοδος

1. Ανάκτηση ενός σωλήνα τύπου erpendorf που περιέχει 50μL δεκτικά κύτταρα για ηλεκτροδιάτρηση από τους -80°C και επώασή του σε πάγο για λίγα λεπτά ώστε να αποψυχθεί με ήπιο τρόπο.
2. Προσθήκη 5μL του επιθυμητού πλασμιδίου προς μετασηματισμό των κυττάρων και ήπια ανάδευση.
3. Επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
4. Προσθήκη του κυτταρικού εναιωρήματος σε προψυγμένη κυψελίδα και εισαγωγή της σε μηχανήμα ηλεκτροδιάτρησης. Μετά την επιτυχημένη διαδικασία, γρήγορη προσθήκη 945μL υγρού θρεπτικού LB Broth και ήπια ανάδευση.

5. Μεταφορά του 1mL κυτταρικού εναιωρήματος σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και επώασή του στους 37°C, 160 rpm, για 1 ώρα.
6. Επίστρωση κυττάρων σε τρυβλίο LB άγαρ με κατάλληλα αντιβιοτικά.

Σημείωση: Τα βήματα 2, 4, 5 και 6 πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια προϋποθέτει τον ενοφθαλμισμό αποικίας μετασχηματισμένων βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό υλικό μία μέρα πριν. Το θρεπτικό υλικό περιλαμβάνει δύο αντιβιοτικά, τετρακυκλίνη και αμπικιλίνη. Το στέλεχος κυττάρων *E. coli* που χρησιμοποιείται περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, ενώ το πλασμίδιο L4440 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Η παρουσία και των δύο αντιβιοτικών στο υγρό θρεπτικό υλικό προστατεύει την καλλιέργεια από πιθανή επιμόλυνση. Ο χειρισμός των υγρών θρεπτικών υλικών και βακτηριακών καλλιεργειών πραγματοποιείται σε περιβάλλον παρουσία ανοιχτού φλόγιστρου ή σε ειδικό θάλαμο (Laminar).

3.10.1 Απομόνωση με αλκαλική λύση

Υλικά

- ❖ Υγρό θρεπτικό LB Broth με τετρακυκλίνη (10μg/mL) και αμπικιλίνη (100μg/mL)
- ❖ Σωλήνας falcon χωρητικότητας 50mL και σωλήνας τύπου erpendorf 1,5mL
- ❖ GET (Solution I): 50mM Glucose, 25mM Tris-Cl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)
- ❖ Alkali (Solution II): 0,2N NaOH, 1% SDS
- ❖ CH₃COOK (Solution III): 5M Potassium acetate, glacial acetic acid, water

Μέθοδος

1. Ενοφθαλμισμός μοναδιαίας αποικίας μετασχηματισμένων βακτηρίων σε 3mL καλλιέργεια LB Broth με κατάλληλα αντιβιοτικά. Επώαση της καλλιέργειας για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C με έντονη ανάδευση (210 rpm).
2. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα falcon χωρητικότητας 50mL και φυγοκέντρηση σε 12.000x g για 30 δευτερόλεπτα στους 4°C.
3. Απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης.
4. Αναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 100μL παγωμένου GET (Solution I) και έντονη ανάδευση. Μεταφορά του διαλύματος σε σωλήνα τύπου erpendorf 1,5mL. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη 200μL Alkali (Solution II), ανάδευση με αναστροφή του erpendorf και επώαση για 7 - 8 λεπτά σε πάγο.
6. Προσθήκη 150μL παγωμένου CH₃COOK (Solution III), ανάδευση με αναστροφή του erpendorf και επώαση για 3 - 5 λεπτά σε πάγο.
7. Φυγοκέντρηση σε 12.000x g για 10 λεπτά στους 4°C. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf.
8. Κατακρύμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη ενός όγκου (1 V) ισοπροπανόλης (2-propanol) 100%. Έντονη ανάδευση και επώαση του διαλύματος για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Φυγοκέντρηση σε 12.000x g για 5 λεπτά στους 4°C.
10. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
11. Προσθήκη μισού όγκου (0,5 V) 70% αιθανόλης και ανάδευση. Ανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων με φυγοκέντρηση σε 12.000x g για 2 λεπτά στους 4°C.
12. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
13. Απομάκρυνση υπολοιμάτων αιθανόλης που βρίσκονται στα τοιχώματα του σωλήνα. Επώαση με ανοιχτό καπάκι σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη.
14. Αναδιάλυση των νουκλεϊκών οξέων σε 30μL TE (pH 8.0) που περιέχει 20μg/mL DNase-free RNase A. Εντονη ανάδευση και αποθήκευση στους -20°C.

3.10.2 Απομόνωση με χρήση kit

Ακολουθεί το πρωτόκολλο απομόνωση πλασμιδιακκού DNA με χρήση kit της εταιρείας Macherey-Nagel (NucleoSpin Plasmid protocols - Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*).

Υλικά

- ❖ Υγρό θρεπτικό LB Broth με τετρακυκλίνη (10μg/mL) και αμπικιλίνη (100μg/mL)
- ❖ Σωλήνας falcon χωρητικότητας 50mL και σωλήνας τύπου erpendorf 1,5mL
- ❖ Buffers A1, A2, A3, AW, A4
- ❖ Στήλη
- ❖ ddH₂O
- ❖ Υδατόλουτρο (65°C)

Μέθοδος

1. Ενοφθαλμισμός μοναδιαίας αποικίας μετασηματισμένων βακτηρίων σε 3mL καλλιέργεια LB Broth με κατάλληλα αντιβιοτικά. Επώαση της καλλιέργειας για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C με έντονη ανάδευση (210 rpm).
2. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα falcon χωρητικότητας 50mL και φυγοκέντρηση σε 2.5000x g για 10 λεπτά. Απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης.
3. Προσθήκη 250μL Buffer A1 και αναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος με vortex ή με πιπέτα. Μεταφορά σε σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 mL.
4. Προσθήκη 250μL Buffer A2. Ηπια ανάδευση με αναστροφή του erpendorf 6 - 8 φορές. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 5 λεπτά.
5. Προσθήκη 300250μL Buffer A3. Ανάδευση με αναστροφή του erpendorf 6 - 8 φορές μέχρι το χρώμα του διαλύματος να μετατραπεί από μπλε σε διαφανές.
6. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 11.000x g και θερμοκρασία δωματίου.
7. Τοποθέτηση στήλης σε σωλήνα συλλογής (2mL) και μεταφορά του δείγματος. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g . Απομάκρυνση του εκλούσματος. Επανάληψη του βήματος σε περίπτωση που υπάρχει περίσσεια δείγματος.
8. Προσθήκη 500μL Buffer AW, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.

9. Προσθήκη 600μL Buffer A4, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g και απομάκρυνση του εκλούσματος.
10. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά 11.000x g για να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης και απομάκρυνση του σωλήνα συλλογής.
11. Μεταφορά της στήλης σε σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 mL και προσθήκη 30μL προθερμασμένου ddH₂O (στους 65°C). Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000x g.

3.11 Πέψη ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες 4-8 νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο DNA και πραγματοποιούν πέψη του. Φυσιολογικά παράγονται από βακτήρια, ενώ χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία ως εργαλεία και για την επιβεβαίωση εισαγωγής ενός ενθέματος σε πλασμιδιακό φορέα. Κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, σχηματίζονται διαφορετικά πρότυπα ζωνών σε περίπτωση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου ή μη. Το ένζυμο που επιλέχθηκε είναι το EcoRI, το οποίο όταν συναντά την αλληλουχία 5'-GAATTC-3' κόβει κάθε αλυσίδα μεταξύ των βάσεων G και A με κατεύθυνση 5' προς 3'.

3'-CTTAAG-5'

Υλικά

- ❖ Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X) : Cut Smart Buffer, NEB
- ❖ Ενζυμο περιορισμού EcoRI-HF (20 U/μL) : NEB
- ❖ ddH₂O

Πίνακας_8: Πέψη ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA με EcoRI-HF

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)/ Αντίδραση	Πρόγραμμα
Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο	1μL	1 ώρα στους 37°C 20 λεπτά στους 65°C
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	2,5μL	
Ενζυμο περιορισμού: EcoRI-HF	0,5μL	
H ₂ O	21μL	
Ντελ	25μL	

Μέθοδος

1. Υπολογισμός των αντιδραστηρίων και προσθήκη τους σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5mL.
2. Επώαση του σωλήνα σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 37°C για 1 ώρα και μεταφορά του σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 65°C για 20 λεπτά ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο περιορισμού.

3.12 Σίτιση προνυμφών με dsRNA

Μία μέθοδος εισαγωγής dsRNA σε οργανισμούς είναι η σίτισή τους με βακτήρια που παράγουν dsRNA. Οι προνύμφες κουνουπιών διαβιώνουν σε διαφανή δοχεία που περιέχουν νερό και εκεί προστίθεται τροφή (ξηρή γατοτροφή εμπορίου) και ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίων που παράγουν dsRNA. Κάθε πληθυσμός τρέφεται αποκλειστικά με κοινή ποσότητα γατοτροφής (10mg) ανά δύο ημέρες και καλλιέργεια *E. coli* καθημερινά.

Υλικά

- ❖ Μετασηματισμένα κύτταρα *E. coli*
- ❖ Υγρό θρεπτικό LB Broth με τετρακυκλίνη (10μg/mL) και αμπικιλίνη (100μg/mL)
- ❖ Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες 500mL και δοκιμαστικοί σωλήνες
- ❖ Falcon χωρητικότητας 50mL
- ❖ 0.2mM IPTG
- ❖ Αποστειρωμένο H₂O

Μέθοδος

1. Ενοφθαλμισμός μοναδιαίας αποικίας μετασηματισμένων βακτηρίων σε 3mL καλλιέργεια LB Broth με κατάλληλα αντιβιοτικά. Επώαση της καλλιέργειας για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C με έντονη ανάδευση (210 rpm). Προετοιμάζονται αντίστοιχες καλλιέργειες *E. coli* για τους διαφορετικούς πληθυσμούς προνυμφών.
2. Μεταφορά των καλλιεργειών σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 500mL σε τελικό όγκο 100mL έκαστη.
3. Επώαση των καλλιεργειών σε θερμοκρασία 37°C με έντονη ανάδευση (210 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα να εντάσσεται στο εύρος O.D.= 0.4 - 0.6.
4. Προσθήκη ποσότητας IPTG (200μL) σε κάθε καλλιέργεια, ώστε να έχει τελική συγκέντρωση στο διάλυμα C=0,4mM. Το IPTG ενεργοποιεί τη σύνθεση της T7 πολυμεράσης, η οποία οδηγεί στη μεταγραφή του ενθέματος από 2 κλώνους και παραγωγή dsRNA.
5. Επώαση για 4 ώρες σε θερμοκρασία 37°C με έντονη ανάδευση (210 rpm).
6. Φωτομέτρηση ποσότητας καλλιεργειών προκειμένου να προστεθεί παραπλήσια ποσότητα κυττάρων στους πληθυσμούς προνυμφών.
7. Μεταφορά των καλλιεργειών σε σωλήνες Falcon χωρητικότητας 50mL και φυγοκέντρωσή τους σε 5.000x g για 10 λεπτά.
8. Απόρριψη υπερκείμενης φάσης και αναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 0,5mL αποστειρωμένου H₂O.
9. Ήπια αναδιάλυση των κυττάρων με χρήση vortex.
10. Προσθήκη των βακτηριακών κυττάρων στους αντίστοιχους πληθυσμούς και ανακίνηση.

Επανάληψη των βημάτων για το επιθυμητό χρονικό διάστημα

4. Αποτελέσματα

4.1 Ενίσχυση επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου

Με σκοπό την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές και πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Ο σχεδιασμός και η επιλογή των εκκινητών έγινε με τη βοήθεια βιοπληροφορικών εργαλείων, το NCBI BLAST και το PrimerQuest Tool της Intergrated DNA Technologies. Ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε cDNA από RNA προτύμφης του αναπτυξιακού σταδίου L3-L4 που ανήκει στον εκτρεφόμενο πληθυσμό του εργαστηρίου. Στο ένθεμα προστίθενται μία βάση αδερίνης στα 3' άκρα του με τη χρονική επιμήκυνση του τελευταίου βήματος της PCR. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης.

Base	Sequence
1	GTTGCGGTAAAGTAGCGAATTGGGCGGCCAATGAAAAAGTTCGACTAGAGGTATAAGGTTGATTGAACCGTGTGCATACACAAATCGGATACGATAGGATAG
101	ATAGGCAGCGGAAGAAGACATGTTAGGGTGCAGGTTGGAGTGCGGTAGCCTTCATAAATATGTTCCAAAAGTGCAATTGATGCAGCTGGAATATGTGGC
201	AATGCGACCATTCGAGGCAATTGGTCCGACTGCCGGAAGTTGTGAAATGTGGAGAAAGCAGTACAGTGATCTTCGAGTGTCCAGATCGCAGCTACTTCA
301	ACTCGAAAAATTTGGTGTGCGACTTCGCTATGTACGCAGAATGTGTCGTTGACCTGGAAAGTGAAGTCAATTTTTTGGACAGCAGAGAGTATTGGAATC
401	AACGCCAGGAGTTTTGGTTACGATCGAAACATGTAACCCAGAATCCTTTGGGAGCAAAGTTGCCACATCCAGATTACTGCAATATGTTCTACCAGTGTCT
501	CCTTCTGGCCAAATCTATTTGAGTGCCTGGCCAACTCCTGTTCGTCCAACAGACTTGTTCGAAATGGCCGCAGTTTGTGAAATGTGGTGTATAGCG
601	GAGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGCGAAGATTTCGACCCCAATGTGCGAGAAAATTGCTTCCCAGACAAACGCTGCCCGCTGGATTGTGAACC
701	TGATCTAAACACCAGTGTGCTGCCACCCCAAGTATGTGCGATGCGTTCCCTTCGTTGCAATCGGTTGCGTTGCGCTTGTTCGAAAGAAATGCCGATCGCCCTG
801	TACTGGAGTACGAACTTGGACGATGCGTAGAACGTTACCGATCTGAGTGTACGGAGGTCGAGCGGCCCGCAATGCCCGGACCACGACTGCGTGGATCATC
901	CACAGTGGCCACCAGGACGATCCCAACACCCCATACGCCCTCCACACCCGGACAGATGCGATGCGTACCTGAAATGCCATCAAGGTCAGGCTCAAGCCTGCGT
1001	AGTGAATGCCAGAGGCGCTTGGTACAACTCCGAAACTGAAGTGTGTGACATCGCGGGGATGCACTGTTGGCACAACCTGGCACAACCCGGAGGAACT
1101	GAGGATATAACGACCGACGATACCTCTGATACAACCTCCTGTAACAACCTTATAACTCCTGACACACCTGATACGAGTCCATCACTCCTGAAACGCTCTC
1201	CTATAACTCCTGACACACCTGAAACGACTCCTATCACTCCTGATACGTCCTCCTATAACTCCTGACACACCTGAAACGACTCCTATCACTCCTGATACGTC
1301	TCCTATAACTCCTGACACACCTGAAACGACTCCTATCACTCCTGAAACGTCCTCCTATAACTCCTGACACACCTGATACGTCCTCCTATAACTCCTGACACA
1401	CCTGAAACGACTCCTATCGATCCTGATACGTCCTCCTATAACTCCTGACACACCTCCTGTGACACAGAGCCGCCTCCTATGCCCGATATGTCCTCCTGGTG
1501	TCTGCAACCTGACGACAGATGTCGATTCCTGTCCAGGAGTGAACCCCGTGTATTCGGCAATCCCGACGATTGGCGAATGTTCTACAAATGTAC
1601	CCATGGATTTGGCTGCGAAATGCATGCCCTCCCGGACTGCACTGGAGCAGTGAATGAATCGCTGTGAAATGGCCCATAAATGGTACTGTGCTGCAGGT
1701	GCAAGATTACGTCACGGAGACGGTATTTAGAAAAAGAAATGACATGCAGAGGGTGGTAGGATTCAACGAGCCGATTTTAAATGTGACATAATTTATGGATG
1801	TTGTTTATGGGTATCCGAGGCTACACATTCAAAGTATTACAACCTAAGTACCACCCCAATTTAAATCGA

Εικόνα_16: Ολική αλληλουχία του γονιδίου 1866 ζεύγη βάσεων. Με πράσινο χρώμα σημειώνεται ο forward εκκινητής και με κόκκινο χρώμα ο συμπληρωματικός του reverse εκκινητής. Η αλληλουχία που ενισχύεται έχει μήκος 381 ζεύγη βάσεων.

4.2 Επιβεβαίωση ενίσχυσης τμήματος *Chitin-BP*

Η ηλεκτροφόρηση της προαναφερθείσας PCR πραγματοποιήθηκε σε gel αгарόζης 1% και περιελάμβανε θετικά (Inc7) και αρνητικά (NTC) δείγματα ελέγχου. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η ενίσχυση ενός μη κωδικοποιητικού γονιδίου (Inc7) με ειδικούς εκκινητές και επιβεβαιώνεται ο σωστός χειρισμός των υλικών. Το αρνητικό δείγμα ελέγχου περιελάμβανε όλα τα συστατικά της αντίδρασης για την ενίσχυση τμήματος Chitin-BP εκτός από μήτρα DNA. Στα διαλύματα της αντίδρασης πολυμεράσης (25μL) προστέθηκαν 3μL Loading Buffer (6X) και τελικά ηλεκτροφορήθηκαν 14μL. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκαν 3μL Ladder 100bp Minotech για να επιβεβαιωθεί ότι ενισχύονται τμήματα με το κατάλληλο μήκος.

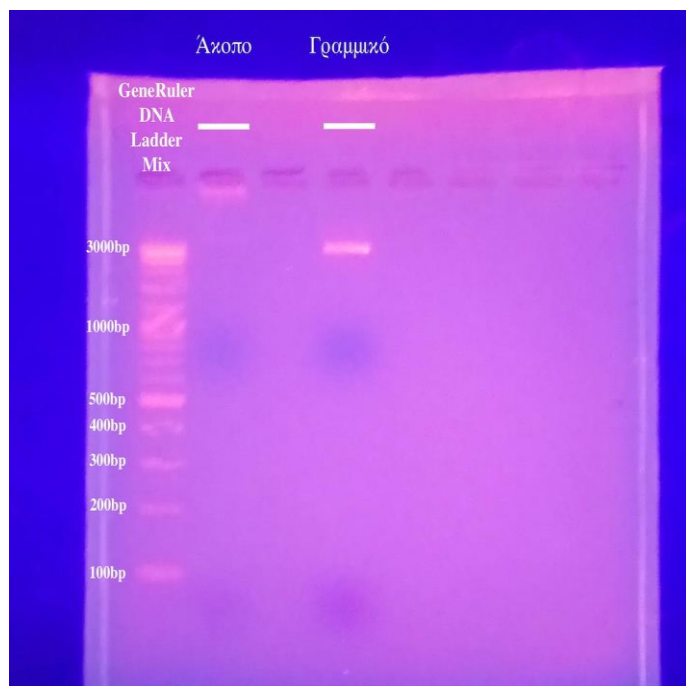


Εικόνα_17: Ηλεκτροφόρηση της PCR σε gel αгарόζης 1%. Στην 1η στήλη ηλεκτροφορήθηκε ο Ladder και δύο τριάδες με σειρά: Αρνητικό δείγμα - NTC, Θετικό δείγμα - Inc7, Chit - Επιθυμητό γονίδιο *Chitin-binding protein*.

Παρατηρούμε ότι η επιθυμητή ζώνη του γονιδίου (381 bp) εμφανίζεται ελάχιστα χαμηλότερα από τη ζώνη 400 bp του Ladder.

4.3 Επεξεργασία πλασμιδίου L4440

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* είναι το L4440. Το πλασμίδιο βρίσκεται σε κυκλική μορφή και προκειμένου να εισαχθεί σε αυτό το τμήμα Chitin-BP, πρέπει να γραμμοποιηθεί. Η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω πέψης του κυκλικού φορέα με το ένζυμο περιορισμού SmaI, του οποίου η αλληλουχία αναγνώρισης εντοπίζεται μόνο μία φορά (Ενότητα 3.5.1). Η ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση ενδεικτικής ποσότητας άκοπου-γραμμικού πλασμιδίου. Τα δείγματα αποτελούνται ως εξής: Άκοπο πλασμίδιο: 2μL κυκλικού L4440 συγκέντρωσης 50ng/μL, 8μL H₂O, 2μL Loading Buffer (6X), γραμμικό πλασμίδιο: 2,5μL γραμμικού L4440 συγκέντρωσης 40ng/μL, 7,5μL H₂O και 2μL Loading Buffer (6X), Ladder: 2μL GeneRuler DNA Ladder Mix της εταιρείας Thermo Scientific.



Εικόνα_18: Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης σε gel αγαρόζης 2%. Θέσεις: 1. GeneRuler DNA Ladder Mix, 2. Άκοπο πλασμίδιο L4440, 3. Κενή, 4η. Γραμμικό πλασμίδιο.

Το πλασμίδιο έχει μήκος 2790 ζεύγη βάσεων. Λόγω της κυκλικής μορφής στην οποία βρίσκεται το πλασμίδιο μπορεί να βρεθεί σε διαφορετικές διαμορφώσεις, χαλαρή κυκλική και υπερελικωμένη με αποτέλεσμα τον σχηματισμό διαφορετικών ζωνών στο πήκτωμα. Στην 4η θέση εμφανίζεται μία διακριτή ζώνη κοντά στη ζώνη των 3000 ζευγών βάσεων του Ladder. Αυτό συμβαίνει διότι μετά τη γραμμοποίηση του πλασμιδίου, αυτό κινείται με μία μοναδική διαμόρφωση στο πήκτωμα.

4.4 Χειρισμός κυττάρων *E. coli*

4.4.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων HT115 *E. coli*

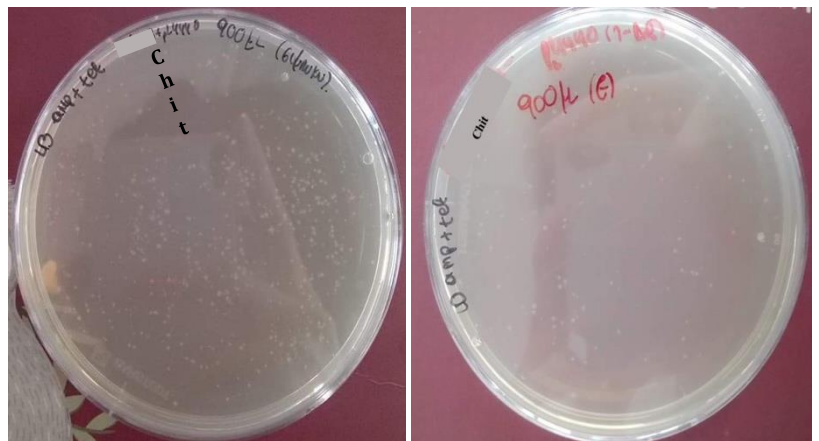
Η παρασκευή των δεκτικών κυττάρων έγινε με βάση το πρωτόκολλο της ενότητας 3.7. Στην αριστερή φωτογραφία απεικονίζεται το τρυβλίο που χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων HT115 με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο σε LB άγαρ μετά το πέρας της επώασης για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα μετασχηματισμού τους. Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός τους με πλασμίδιο ελέγχου μέσω ηλεκτροδιάτρησης και μέτρηση της απόδοσης μετασχηματισμού. Η διαδικασία ήταν επιτυχής, με απόδοση του μετασχηματισμού $1,8 \times 10^8$ και η επίστρωση με το πλασμίδιο ελέγχου απεικονίζεται στη δεξιά φωτογραφία.



Εικόνες_19-20: Τρυβλία LB άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή δεκτικών κυττάρων και ελέγχου τους. Αριστερά: Αρχικός ενοφθαλμισμός κυττάρων HT115 *E.coli*. Δεξιά: Μέτρηση του απόδοσης μετασχηματισμού με πλασμίδιο ελέγχου.

4.4.2 Μετασχηματισμός κυττάρων HT115 *E. coli* με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Μετά την επιτυχή παρασκευή δεκτικών κυττάρων, αυτά μετασχηματίστηκαν με το επιθυμητό πλασμίδιο. Έγινε επίστρωση σε τρυβλία LB άγαρ με αμπικιλίνη και τετρακυκλίνη και επώαση για 16 ώρες στους 37°C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε όσες φορές ήταν απαραίτητες ώστε να αναπτυχθούν μετασχηματισμένες αποικίες. Είναι άξιο να σημειωθεί ότι ήταν δυνατή η ανάπτυξη κλώνων που δεν είχαν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Συνεπώς κρίνεται αναγκαίος ο έλεγχος των αποικιών αρχικά με



Εικόνες_21-22: Μετασχηματισμών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση σε ξεχωριστές χρονικές στιγμές.

colony PCR και έπειτα με πέψη με περιοριστικό ένζυμο. Στις εικόνες παρουσιάζονται 2 προσπάθειες μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση έπειτα από 16ωρη επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Οι διαφορές τους, όσον αφορά τις αναπτυσσόμενες αποικίες, πιθανόν οφείλονται κατά τον χειρισμό των κυττάρων πριν την ηλεκτροδιάτρηση ή κατά την εκτέλεση της μεθόδου και στην επιτυχία της αντίδρασης λιγάσης που είχε προηγηθεί.

4.5 Έλεγχος μετασχηματισμένου κλώνου HT115 *E. coli*

4.5.1 Επιβεβαίωση θετικού κλώνου με colony PCR

Το μετασχηματισμό κυττάρων *E. coli* διαδέχθηκε η αναζήτηση αποικίας που είχε προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο έλεγχος έγινε με τη διαδικασία της colony PCR, το πρωτόκολλο της οποίας αναλύεται στην ενότητα 3.3. Μετά από κάθε απόπειρα μετασχηματισμού, γινόταν επιλογή αποικιών και πραγματοποίηση αντίδρασης πολυμεράσης με μήτρα DNA τμήμα βακτηριακής αποικίας και εκκινητές που ενισχύουν τμήμα του γονιδίου.

Εφόσον χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές με την ενίσχυση του γονιδίου από cDNA, το αναμενόμενο προϊόν της αντίδρασης είχε μήκος 381 ζεύγη βάσεων.

Κατά την προετοιμασία της αντίδρασης πολυμεράσης αποθηκεύονταν, σε ξεχωριστό τρυβλίο LB άγαρ με κατάλληλα αντιβιοτικά, “αντίγραφα” των αποικιών που θα ελέγχονται, ώστε να υπάρχει δείγμα κάθε αποικίας σε περίπτωση ύπαρξης θετικού κλώνου. Στη συνέχεια, το τρυβλίο επωάζονταν για 16 ώρες στους 37°C και από αυτό λαμβάνονταν η αποικία με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο για περαιτέρω μελέτη.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Τα δείγματα αποτελούνται ως εξής: Στις αντιδράσεις πολυμεράσης (25μL) προστέθηκαν 5μL Loading Buffer (6X) και τελικά ηλεκτροφορήθηκαν 15μL. Χρησιμοποιήθηκαν 3μL του Ladder 100bp Minotech.



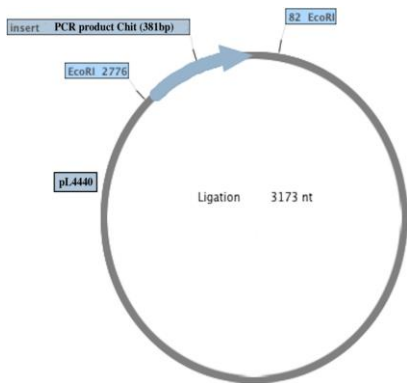
Εικόνα_23: Ηλεκτροφόρηση colony PCR σε gel αγαρόζης 1%.

Θέσεις: 1.-7. και 9.-15.
Δείγματα από βακτηριακές αποικίες (1-7 και 8-14 αντίστοιχα) 8. Ladder.

Οι αποικίες που ελέγχθηκαν στην παρούσα δοκιμασία προέρχονται από το τρυβλίο της Εικόνας_22 στην ενότητα 4.4.2. Σε όλες τις στήλες των δειγμάτων παρατηρούνται ζώνες χαμηλά, γύρω στις 100 βάσεις, οι οποίες αντιστοιχούν στα διμερή των εκκινητών που σχηματίζονται κατά την αντίδραση πολυμεράσης. Επιπλέον, στην 9η στήλη, η οποία αντιπροσωπεύει τον κλώνο της αποικίας 8, εμφανίζεται και μία δεύτερη ζώνη, κοντά στις 400 βάσεις. Η εμφάνιση αυτής της ζώνης υποδεικνύει ότι η αποικία 8 πιθανώς έχει λάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, και φέρει το επιθυμητό ένθεμα (381 ζεύγη βάσεων). Η ένδειξη αυτή είναι αρκετή ώστε να ακολουθήσει περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης αποικίας. Αντίθετα, οι υπόλοιπες στήλες που φέρουν μόνο μία ζώνη, τα διμερή εκκινητών, αντιστοιχούν σε αποικίες που έχουν προσλάβει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, δηλαδή πλασμιδιακό φορέα που έχει επανακυκλοποιηθεί χωρίς το ένθεμα. Η μέθοδος της colony PCR αποτελεί μεν αξιόπιστη μέθοδο, ωστόσο μπορεί να μας παρουσιάσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα ως απόρροια μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών. Για τον παραπάνω λόγο, πραγματοποιείται και έλεγχος των θετικών κλώνων με δεύτερη μέθοδο, αυτή της πέψης με ένζυμο περιορισμού.

4.5.2 Επιβεβαίωση θετικού κλώνου με ένζυμο περιορισμού

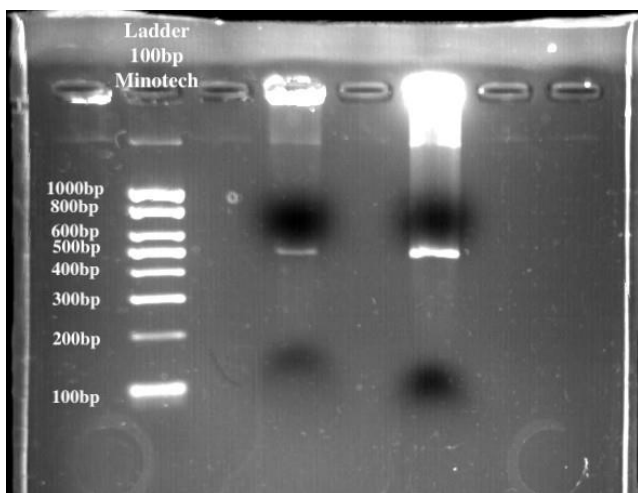
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η επιβεβαίωση του θετικού κλώνου πραγματοποιείται με 2 μεθόδους για μεγαλύτερη αξιοπιστία. Από το τρυβλίο που περιείχε τα αντίγραφα των αποικιών που εξετάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα, χρησιμοποιήθηκε η αποικία 8 για τα επόμενα πειράματα. Η αποικία 8 μεταφέρθηκε σε υγρή καλλιέργεια με κατάλληλα αντιβιοτικά και επώαστηκε για 16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδίου με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.10 και πέψη αυτού με το ένζυμο EcoRI-HF σύμφωνα με τις συνθήκες της ενότητας 3.11.



Η επιλογή του συγκεκριμένου ενζύμου έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Serial Cloner, ώστε να προβλέπονται διαφορετικές ζώνες και διακριτά πρότυπα σε περίπτωση που το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο ή όχι. Πιο αναλυτικά, το ένζυμο πέπτει την αλληλουχία του πλασμιδίου 2 φορές, εκατέρωθεν του ενθέματος, όπως φαίνεται και στην Εικόνα_24.

Εικόνα_24: Σχηματική απεικόνιση ενθέματος που έχει εισαχθεί επιτυχώς στον πλασμιδιακό φορέα και θέση του σε σχέση με ένζυμα περιορισμού.

Η επιτυχία της κλωνοποίησης γίνεται αντιληπτή με το πρότυπο των ζωνών της ηλεκτροφόρησης. Σε περίπτωση που ο φορέας έχει κυκλοποιηθεί χωρίς το ένθεμα, κατά την ηλεκτροφόρηση προκύπτουν 2 ζώνες, μία που αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ των σημείων αναγνώρισης στον φορέα, 96 ζεύγη βάσεων, και η υπόλοιπη αλληλουχία, 2.694 ζεύγη βάσεων. Σε περίπτωση που ο φορέας έχει ανασυνδυαστεί επιτυχώς (3173 ζεύγη βάσεων), προκύπτουν 2 ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση, μία που αντιστοιχεί στο άθροισμα της αλληλουχίας του ενθέματος και της απόστασης μεταξύ των δύο σημείων αναγνώρισης: 479 ζεύγη βάσεων (96bp + 381bp + 2bp = 479bp) και η υπόλοιπη αλληλουχία, 2.694 ζεύγη βάσεων. Μετά την αντίδραση της πέψης ακολούθησε ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αποτελούνται ως εξής: Στις αντιδράσεις πέψης (25μL) προστέθηκαν 5μL Loading Buffer 6X και τελικά ηλεκτροφορήθηκαν 15μL. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 3μL του Ladder 100bp Minotech.

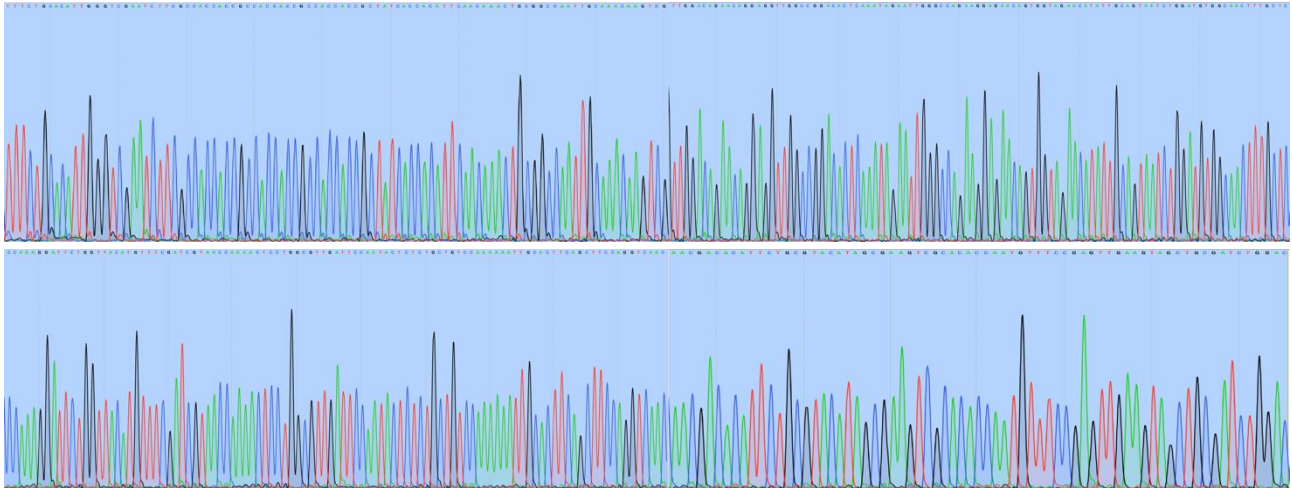


Εικόνα_25: Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πέψης σε gel αγαρόζης 2%. Θέσεις: 1.,3.,5 Κενές, 2. Ladder, 4. και 6. Αντιδράσεις πέψης από 2 απομονώσεις πλασμιδίου υγρής καλλιέργειας της αποικίας 8.

Ο έλεγχος της αποικίας 8 στέφθηκε με επιτυχία, διότι επιβεβαιώθηκε πως το πλασμίδιο ήταν ανασυνδυασμένο. Στις στήλες 4 και 6 αντίστοιχα παρατηρούνται ζώνες κοντά στις 500 βάσεις, γεγονός που αποδεικνύει την εισαγωγή του ενθέματος στο πλασμίδιο. Η υπόλοιπη αλληλουχία του πλασμιδίου (2696 bp) εμφανίζεται στο πήκτωμα αγαρόζης με τη μορφή έντονης φωτεινότητας κοντά στο σημείο εισαγωγής του δείγματος (πηγαδάκι), ανοδικά της υψηλότερης ζώνης του Ladder που αντιστοιχεί στα 1000 ζεύγη βάσεων. Η διαφορά της έντασης της φωτεινότητας μεταξύ των 2 δειγμάτων πιθανότατα οφείλεται στο χειρισμό των δειγμάτων κατά την απομόνωση του πλασμιδίου με αλκαλική λύση (Ενότητα 3.10.1).

4.5.3 Αλληλούχηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Η εισαγωγή του ενθέματος (*Chitin-BP*) στον πλασμιδιακό φορέα ελέγχθηκε σε τελευταίο στάδιο επιβεβαιώθηκε τελικά μέσω της αλληλούχησης του πλασμιδίου με Sanger sequencing. Ο κλώνος του ενθέματος ήταν ο reverse και όπως φαίνεται παρακάτω, το δείγμα είναι αρκετά αξιόπιστο, διότι οι βάσεις στο χρωματογράφημα είναι ευδιάκριτες και μη επικαλυπτόμενες.



Εικόνα_26: Χρωματογράφημα αλληλούχησης ενθέματος. Κάθε βάση εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα: Αδενίνη(A):Πράσινο, Θυμίνη(T):Κόκκινο, Γουανίνη(G):Μαύρο, Κυτοσίνη(C):Μπλε.

Με τη βοήθεια του προγράμματος πολλαπλής στοίχισης Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) έγινε στοίχιση των τμημάτων που ενισχύθηκαν με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το συγκεκριμένο γονίδιο. Η αλληλουχία αναφοράς που προέρχεται από τη βάση δεδομένων NCBI ενισχύθηκε εικονικά (virtual PCR-χρήση του προγράμματος SerialCloner) και έγινε σύγκρισή της με την αλληλουχία ενθέματος από τα δεδομένα αλληλούχησης.

PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	GTCCAGATCGCAGCTACTTCAACTCGGAAACATGGTGTGCGACTTCGCTATGTACGCAG GTCCAGATCGCAGCTACTTCAACTCGGAAACATGGTGTGCGACTTCGCTATGTACGCAG *****	60 60
PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	AATCTGTCCCTTGACCTGGAAGCTGAAGTGCATTTTFTGGACAGCAGAGAGTATTGGAAT AATCTGTCCCTTGACCTGGAAGCTGAAGTGCATTTTFTGGACAGCAGAGAGTATTGGAAT *****	120 120
PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	CAACGCCAGGAGTTTGGTTACGATCGAAACATGTAACCAGAAATCCTTTGGGAGCAAAGT CAACGCCAGGAGTTTGGTTACGATCGAAACATGTAACCAGAAATCCTTTGGGAGCAAAGT *****	180 180
PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	TGCCACATCCAGATTACTGCAATATGTTCTACCACCTGTCTCTCTCTGGCCCAATTCTAT TGCCACATCCAGATTACTGCAATATGTTCTACCACCTGTCTCTCTCTGGCCCAATTCTAT *****	240 240
PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	TTGAGTGCCCGGCCAACCTCCTGTCTGTCCAACACGACTTGTTTGCAATTGGCCGCGAGT TTGAGTGCCCGGCCAACCTCCTGTCTGTCCAACACGACTTGTTTGCAATTGGCCGCGAGT *****	300 300
PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	TTGTTGAATGTGGTGATAGCGGAGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGCGAAG TTGTTGAATGTGGTGATAGCGGAGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGCGGTGGTGGCGAAG *****	360 351
PREDICTED: SequencingProduct:Chitin-BP	ATTCGACCCAAATGTCAGAAA 381 ATTCGACCCAAATGTCAGAAA 372 *****	

Εικόνα_27: Αποτέλεσμα στοίχισης τμήματος του γονιδίου *Chitin-BP* που ενισχύεται εικονικά (PREDICTED) και του ενθέματος που αλληλουχήθηκε (SequencingProduct: Chitin-BP). Με κόκκινα βέλη τονίζονται οι θέσεις των SNPs.

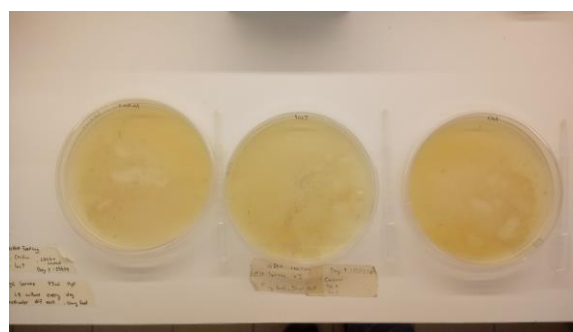
Οι αλληλουχίες που στοιχήθηκαν παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα. Η αλληλουχία αναφοράς είναι κατά 9 ζεύγη βάσεων μεγαλύτερη (381 bp PREDICTED έναντι 372 bp SequencingProduct: Chitin-BP) και εμφανίζονται 2 SNPs (Single-nucleotide Polymorphism) στις θέσεις 248 και 323. Από τα αποτελέσματα του sequencing επιβεβαιώθηκε η εισαγωγή τμήματος *Chitin-BP* στον φορέα και μετά από καλλιέργεια *E. coli* που περιείχε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιήθηκε αποθήκευσή της σε διάλυμα γλυκερόλης 20% και θερμοκρασία -80°C.

4.6 Σίτιση προνυμφών με dsRNA

Η σίτιση των προνυμφών με καλλιέργειες *E. coli* που παράγουν dsRNA διήρκεσε 12 ημέρες. Την ημέρα μηδέν (0) του πειράματος τοποθετήθηκαν αυγά κουνουπιών *A. albopictus* μέσα σε δοχείο με νερό ώστε να προκύψουν προνύμφες πρώτου σταδίου. Την πρώτη ημέρα του πειράματος προστέθηκαν σε κάθε δοχείο 124 προνύμφες. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 3 δοχεία για 3 διαφορετικούς πληθυσμούς, οι οποίοι θα τρέφονταν με ξηρή τροφή ανά δύο ημέρες και με ποσότητα καλλιέργειας μετασχηματισμένων βακτηρίων *E.coli* κάθε ημέρα. Οι 3 καλλιέργειες είχαν προσλάβει 3 διαφορετικά πλασμίδια αντίστοιχα, 1) έναν κενό πλασμιδιακό φορέα L4440, 2) έναν φορέα που θα παρήγαγε dsRNA για το μη κωδικοποιητικό γονίδιο *Inc5* και 3) έναν που θα παρήγαγε dsRNA για το γονίδιο *Chitin-BP*.

Η προσθήκη του παράγοντα IPTG οδηγεί τα βακτηριακά κύτταρα στην παραγωγή dsRNA, το οποίο θα χορηγηθεί στα έντομα μαζί με τα βακτήρια, τα οποία αποτελούν τροφή των προνυμφών. Συνεπώς, τα μόρια dsRNA εισέρχονται στον στόμαχο των εντόμων προκειμένου να απορροφηθούν από αυτό και να οδηγήσουν στη σίγηση των γονιδίων-στόχων.

Κατά τη διάρκεια σίτισης των προνυμφών με βακτηριακές καλλιέργειες, πραγματοποιούνταν ταυτόχρονη συλλογή δειγμάτων και καταμέτρηση των προνυμφών που απεβίωναν. Η δειγματοληψία είχε σκοπό την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε επόμενο χρόνο. Οι στήλες στον παρακάτω πίνακα αντιστοιχούν στους εξής πληθυσμούς: Control:Προνύμφες στις οποίες γινόταν χορήγηση καλλιέργειας βακτηρίων με άδειο φορέα L4440. *dsInc5*:Προνύμφες στις οποίες γινόταν χορήγηση καλλιέργειας βακτηρίων που παρήγαγαν *dsInc5*. *dsChitin-BP*:Προνύμφες στις οποίες γινόταν χορήγηση καλλιέργειας βακτηρίων που παρήγαγαν *dsChitin-BP*.



Εικόνα_27: Δοχεία διαβίωσης προνυμφών *A. albopictus*

Πίνακας_9: Καταμέτρηση προνυμφών-νυμφών κατά τη διάρκεια του πειράματος

	Control	<i>dsInc5</i>	<i>dsChitin-BP</i>
Αρχικές προνύμφες την 1η ημέρα	124	124	124
Συλλογές δειγμάτων	56	56	56
Προνύμφες που απεβίωσαν μέχρι τη 12η ημέρα	19	22	30
Προνύμφες που απεβίωσαν μέχρι τη 15η ημέρα	21	25	33
Προνύμφες που έγιναν νύμφες μέχρι τη 12η ημέρα	18	21	11
Θάνατος προνυμφών λόγω λανθασμένων χειρισμών	-	-	2
Καταμετρηθείσες προνύμφες τη 12η ημέρα	18	16	15
Αναμενόμενες προνύμφες τη 12η ημέρα	31	25	25

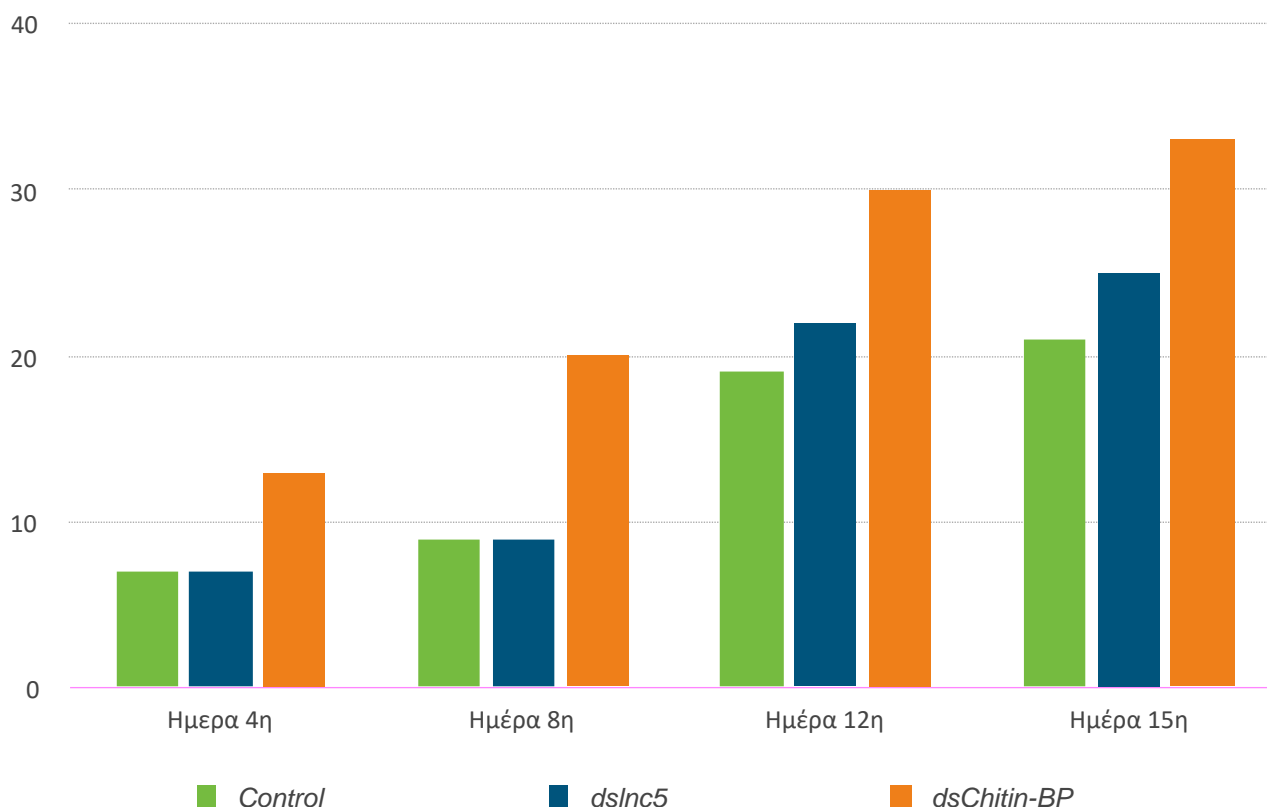
Οι προνύμφες που απεβίωσαν το χρονικό διάστημα σίτισης με dsRNA καταμετρούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και απομακρύνονταν από τα δοχεία των πληθυσμών. Η καταμέτρηση των προνυμφών ξεκίνησε την 4η ημέρα του πειράματος και τελείωσε την 3η ημέρα αφότου σταμάτησε η χορήγηση των βακτηριακών καλλιέργειών. Το διάστημα που μεσολάβησε οι προνύμφες κατανάλωναν το υπόλοιπο της βακτηριακής καλλιέργειας που είχε απομείνει. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται αναλυτικά το σύνολο των προνυμφών που απεβίωσαν, ανά πληθυσμό, από την 4η έως και την 15η ημέρα.

Πίνακας_10: Σύνολο προνυμφών που απεβίωσαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Πληθυσμοί	Ημέρα 4η	Ημέρα 8η	Ημέρα 12η	Ημέρα 15η
Control	7	9	19	21
dsInc5	7	9	22	25
dsChitin-BP	13	20	30	33

Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται και στο παρακάτω γράφημα. Ο άξονας y αντιστοιχεί στον αριθμό των προνυμφών που απεβίωσαν, ενώ στον άξονα x έχουν ομαδοποιηθεί οι 3 πληθυσμοί εντόμων, με διακριτά χρώματα ο καθένας, ανά ημέρα καταμέτρησης.

Γράφημα στηλών_1: Σύνολο προνυμφών που απεβίωσαν κατά τη διάρκεια του πειράματος



5. Συζήτηση

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία απέβλεπε στη μελέτη της δράσης και της ρύθμισης του γονιδίου μίας Chitin-Binding πρωτεΐνης στο κουνούπι *A. albopictus*, η οποία πιθανόν συμμετέχει στην οργάνωση της περιτροφικής μεμβράνης, δομή που περιβάλλει το μέσο έντερο των αιματοφάγων εντόμων. Το μέσο έντερο αποτελεί καλή επιλογή ως στόχος βιολογικών εντομοκτόνων, διότι είναι το κύριο σημείο απορρόφησης της τροφής και διευκολύνεται η εισαγωγή των δίκλωνων μορίων RNA που θα προκαλέσουν τη γονιδιακή σίγηση, εφόσον αυτές χορηγηθούν δια της τροφής. Προκειμένου να διερευνηθεί το γονίδιο *Chitin-BP* ως μελλοντικός στόχος για τον έλεγχο του πληθυσμού *A. albopictus*, πραγματοποιήθηκε σίγηση με dsRNA αυτού και ενός άλλου γονιδίου (*Inc5*) το οποίο ενδέχεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση του πρώτου.

Ενίσχυση τμήματος επιθυμητού γονιδίου

Αρχικό βήμα της διαδικασίας ήταν η ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *Chitin-BP* από cDNA προνυμφών L3-L4 του εργαστηρίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου αναπτυξιακού σταδίου έγινε με δεδομένα ποσοτικής Real-Time PCR, που είχαν προηγηθεί στα πλαίσια του εργαστηρίου, και δείχνουν τη μέγιστη έκφραση σε αυτό το στάδιο. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάσει του γονιδίου με κωδικό XM_029856516.1 της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων NCBI έτσι ώστε να ενισχύεται ιδανικά μία μόνο αλληλουχία. Ακόμα, οι εκκινητές ελέγχθηκαν ως προς τη θερμοκρασία αποδιάταξης (*Tm primer*), την ικανότητά τους να σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και το μήκος του τμήματος που ενισχύουν. Η υπόθεση του μη κωδικοποιητικού γονιδίου (*Inc5*) ως ρυθμιστής της μεταγραφής του *Chitin-BP* στηρίχθηκε επίσης σε μελέτες του εργαστηρίου που είχαν προηγηθεί. Δεδομένα ποσοτικής Real-Time PCR του *Inc5* δείχνουν πως το μέγιστο επίπεδο μεταγράφων εντοπίζεται στο στάδιο της προνύμφης L1-L2, ακριβώς ένα στάδιο πριν το μέγιστο του *Chitin-BP*. Η παρατήρηση των σταδίων με μέγιστα επίπεδα μεταγράφων των δύο γονιδίων, σε συνδυασμό με RNAseq δεδομένα που τοποθετούν τα γονίδια σε απόσταση 6,5kb, αποτέλεσε έναυσμα για τη διερεύνηση αλληλεπίδρασής τους.

Κλωνοποίηση τμήματος γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε εισαγωγή τμήματος του γονιδίου *Chitin-BP* στον πλασμιδιακό φορέα L4440 με σκοπό την παραγωγή dsRNA μορίων. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο L4440, που υπέστη αρχικά πέψη με ένζυμο (*SmaI*), για να μετατραπεί από κυκλικό σε γραμμικό. Εν συνεχεία, στο γραμμικό πλασμίδιο έγινε προσθήκη T-άκρων, γεγονός που θα διευκόλυνε την κλωνοποίηση του τμήματος *Chitin-BP*. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιήθηκε επιτυχώς με περίσσεια ενθέματος προς φορέα, σε αναλογία 14:1. Η αύξηση της αναλογίας ενθέματος:φορέα, σε σχέση με προηγούμενες κλωνοποιήσεις (7:1), έγινε διότι σε στάδια ελέγχου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου δεν υπήρχαν θετικά αποτελέσματα.

Επιβεβαίωση θετικού κλώνου *E. coli*

Απαραίτητο βήμα για την παραγωγή dsRNA μορίων είναι η επιβεβαίωση ύπαρξης βακτηριακής αποικίας που έχει προσλάβει επιτυχώς ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ο έλεγχος των αποικιών *E. coli* πραγματοποιούνταν αρχικά με colony PCR, χρησιμοποιώντας αποικίες που αναπτύσσονταν μετά από ηλεκτροδιάτρηση και ενοφθαλμισμό των κυττάρων σε στερεά τρυβλία LB άγαρ με

κατάλληλα αντιβιοτικά. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις λιγάσης που οδήγησαν μετά από μετασηματισμό κυττάρων, σε έλεγχο περίπου 112 αποικιών. Η επιβεβαίωση του θετικού κλώνου πραγματοποιούνταν σε επόμενο στάδιο με πέψη του πλασμιδίου χρησιμοποιώντας ένζυμο (EcoRI). Από τις αποικίες που ελέγχθηκαν, μόνο μία είχε ανασυνδυαστεί επιτυχώς (Εικόνα_23). Ακολούθησε ανακαλλιέργεια και αποθήκευσή της σε διάλυμα γλυκερόλης για μελλοντική της χρήση.

Αλληλούχηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αφού απομονώθηκε από υγρή καλλιέργεια, υπέστη αλληλούχηση κατά Sanger (Εικόνα_26). Ο κλώνος του πλασμιδίου που αλληλουχήθηκε είναι ο reverse, και αυτό βρέθηκε με την αναζήτηση της αλληλουχίας αναφοράς της βάσης δεδομένων NCBI, του κωδικού και μη κωδικού κλώνου.

Στοιχισμός τμήματος αλληλουχίας *Chitin-BP*

Η αλληλουχία του ενθέματος ανακτήθηκε με την αλληλούχηση του πλασμιδίου-φορέα που το εμπεριείχε. Ακολούθησε σύγκρισή της με την αλληλουχία αναφοράς, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην Εικόνα_27. Η στοιχισμός των τμημάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Clustal Omega και τα δύο τμήματα εμφανίζουν υψηλή ομοιότητα. Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ τους είναι 2 SNPs (248C>T και 323A>T) και μία έλλειψη ενός τμήματος 9 βάσεων (CGGTGGTGG) της αλληλουχίας του ενθέματος. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως η έλλειψη εντοπίζεται σε περιοχή με επαναλήψεις νουκλεοτιδικών βάσεων γουανίνης και θυμίνης. Σε επόμενα βήματα, θα ήταν χρήσιμο να ελεγχθεί αν η συγκεκριμένη αλληλουχία ανήκει σε λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται ή εμφανίζεται ως έλλειψη και σε άλλους πληθυσμούς *A. albopictus*.

Σίτιση προνυμφών με dsRNA

Τελευταίο στάδιο της παρούσης εργασίας ήταν η σίτιση προνυμφών με dsRNA. Η μέθοδος προσθήκης μετασηματισμένων καλλιεργειών *E. coli*, που παράγουν dsRNA έναντι συνθασών χιτίνης, στα δοχεία διαβίωσης προνυμφών *A. aegypti* προκάλεσε αυξημένη θνησιμότητα σύμφωνα με τους ερευνητές Lopez et. al (2019). Χρησιμοποιώντας στοιχεία αυτής της μεθόδου σχεδιάστηκε η εισαγωγή δίκλωνων μορίων RNA που θα προκαλέσουν γονιδιακή σίγηση και η παρατήρηση της συμπεριφοράς των πληθυσμών. Προετοιμάστηκαν 3 πληθυσμοί, με αρχικό πληθυσμό 124 προνύμφες 1ου σταδίου ο καθένας. Σε κάθε πληθυσμό γινόταν χορήγηση βακτηριακής καλλιέργειας *E. coli* με διαφορετικό ένθεμα πλασμιδίου. Στον πληθυσμό που θα αναφέρεται ως "Control" χορηγούνταν καλλιέργεια με κενό φορέα L4440, στον πληθυσμό "dsInc5" βακτήρια που παρήγαγαν dsRNA για τμήμα του μη κωδικοποιητικού γονιδίου Inc5 και στον πληθυσμό "dsChitin-BP" βακτήρια που παρήγαγαν dsRNA για τμήμα του γονιδίου *Chitin-BP*.

Κάθε πληθυσμός εξεταζόταν μεμονωμένα και σε σύγκριση με τους υπολοίπους. Η χορήγηση βακτηρίων με άδειο φορέα έγινε με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης των βακτηριακών κυττάρων σε γενικότερο επίπεδο. Εάν προκληθεί υψηλή θνησιμότητα σε αυτό το δείγμα, τότε πολύ πιθανόν τα τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη προκαλούν τοξικότητα στις προνύμφες ανεξάρτητα της γονιδιακής σίγησης. Σε αυτή την περίπτωση, λογική θα ήταν η επανάληψη του πειράματος με προσθήκη λιγότερης ποσότητας κυττάρων ή αναζήτηση διαφορετικών στελεχών βακτηρίων. Η

χορήγηση καλλιέργειας με *dsChitin-BP* στόχευε στην γονιδιακή σίγηση του *Chitin-BP*, και κατά συνέπεια μείωση της παραχθείσας πρωτεΐνης. Εφόσον η πρωτεΐνη μπορεί να συμμετέχει στο φυσιολογικό σχηματισμό της περιτροφικής μεμβράνης, αναμενόμενη θα ήταν η διαταραχή της δομής ή της λειτουργίας της, ή αναπτυξιακή παύση κατ'αντιστοιχία των πειραμάτων των ερευνητών Agrawal et al. (2014) στο *T. castaneum*. Γεγονός είναι ότι στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε σίγηση ενός μόνο γονιδίου που πιθανώς συμμετέχει στο σχηματισμό της περιτροφικής μεμβράνης, ενώ μπορεί να υπάρχουν πολλά άλλα εμπλεκόμενα. Η σίγηση ενός εξ αυτών ίσως δεν είναι ικανή να προσφέρει έναν ξεκάθαρο διαφορετικό φαινότυπο, διότι η απώλειά του εξισορροπείται από τη δράση άλλων γονιδίων ή απαιτείται σίγηση περισσότερων του ενός.

Η χορήγηση καλλιέργειας με *dsInc5* πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση του *Inc5* ως ρυθμιστής της μεταγραφής του *Chitin-BP*. Ως μακρά μη-κωδικοποιητικά μόρια RNA (long noncoding RNAs – lncRNAs) χαρακτηρίζονται τα μόρια RNA μεγαλύτερα των 200 νουκλεοτιδικών βάσεων που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά μπορούν να υφίστανται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως πολυαδενυλίωση, προσθήκη 5' καλύπτρας ή μάτισμα (με επισκόπηση Azlan et. Al., 2019). Μερικές από τις λειτουργίες που τους έχουν αποδώσει είναι η ρύθμιση μεταγραφής, επιγενετικών και μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων (με επισκόπηση Gomes et al., 2013). Το *Inc5*, είναι πιθανό να ρυθμίζει το *Chitin-BP*, όμως δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής πειραματικά δεδομένα που το επαληθεύουν.

Η σίτιση προνυμφών με dsRNA πραγματοποιήθηκε για ένα χρονικό διάστημα 12 ημερών. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα_9, καταμετρήθηκαν οι προνύμφες την 1η ημέρα, το σύνολο αυτών που απεβίωσαν μέχρι τη 12η ημέρα, όσες πέρασαν στο αναπτυξιακό στάδιο της νύμφης μέχρι τη 12η ημέρα και αυτές που είχαν απομείνει. Ανά δύο ημέρες πραγματοποιούνταν δειγματοληψία ατόμων (συνολικά 56 άτομα/πληθυσμό), από τα οποία θα γινόταν ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα διάφορα προνυμφικά στάδια και της νύμφης σε επόμενο στάδιο. Ακόμα, λόγω λανθασμένων χειρισμών επήλθε θάνατος σε 2 προνύμφες του πληθυσμού *dsChitin-BP*. Εφόσον μέχρι τη 12η ημέρα ήταν γνωστά για κάθε πληθυσμό τα άτομα που είχαν επιβιώσει, είχαν πεθάνει ή περάσει στο στάδιο της νύμφης, έγινε μία προσπάθεια ομαδοποίησής τους. Από την ομαδοποίηση αυτή, προέκυψε πως θα έπρεπε να επιβιώνουν περισσότερα άτομα από αυτά που μετρήθηκαν (Πληθυσμός Control 18 άτομα έναντι 31, πληθυσμός *dsInc5* 16 προνύμφες έναντι 25 και πληθυσμός *dsChitin-BP* 15 έναντι 25). Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως και στους τρεις πληθυσμούς υπήρχε απόκλιση, με την μικρότερη να είναι 9 άτομα στον πληθυσμό *dsInc5* και τη μεγαλύτερη στον πληθυσμό Control, με 13 άτομα. Η διαφορά μεταξύ των αναμενόμενων και των παρατηρούμενων ατόμων μπορεί να ερμηνευτεί ως αδυναμία της ακριβούς καταμέτρησης αποθανόντων προνυμφών μέχρι την 4η ημέρα λόγω του μικρού τους μεγέθους και ημιδιάφανου σώματος. Επιπλέον, στα αρχικά στάδια μέχρι την 4η ημέρα ήταν δύσκολη η διάκριση ενός εκδύματος και ενός κουφαριού με γυμνό μάτι. Η διαφορά αυτή δεν λήφθηκε υπόψη στο σύνολο των ατόμων που απεβίωσαν και μετρήθηκαν μεμονωμένα, όμως είναι πολύ πιθανό να ανήκουν εκεί.

Η τελευταία καταμέτρηση των αποθανόντων προνυμφών έγινε 3 ημέρες μετά την τελευταία σίτιση με βακτήρια, την 15η ημέρα. Συνολικά από τον πληθυσμό Control πέθαναν 21 προνύμφες, από τον πληθυσμό *dsInc5* 25 προνύμφες και από τον πληθυσμό *dsChitin-BP* 33. Ο πληθυσμός με τα λιγότερα άτομα που απεβίωσαν είναι αυτός του Control, έπεται ο πληθυσμός *dsInc5* και τελευταίος ο πληθυσμός *dsChitin-BP*. Αναμενόμενο ήταν στον πληθυσμό που δε συνέβαινε γονιδιακή σίγηση να υπάρχουν λιγότερες απώλειες ατόμων, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και ο πληθυσμός στον οποίο συνέβαινε γονιδιακή σίγηση της *Chitin-BP* να εμφανίζει το μεγαλύτερο αριθμό αποθανόντων προνυμφών. Ο θάνατος των ατόμων εικάζεται ότι προέρχεται αποκλειστικά

από την μειωμένη παραγωγή της Chitin-BP, και όχι από εξωτερικούς παράγοντες. Από τη στόχευση μίας πρωτεΐνης της περιτροφικής μεμβράνης δεν προέκυψε 100% θνησιμότητα των ατόμων και για να επιτευχθεί η μέγιστη θνησιμότητα θα πρέπει να στοχευθούν ταυτόχρονα περισσότερες πρωτεΐνες της συγκεκριμένης δομής ή και ρυθμιστές τους. Όσον αφορά τον πληθυσμό *dsInc5*, αυτός εμφανίζει ένα σύνολο 25 αποθανόντων ατόμων και αριθμητικά βρίσκεται πιο κοντά στα άτομα που απεβίωσαν από τον πληθυσμό Control.

Με σκοπό αυτά τα αποτελέσματα να θεωρούνται αξιόπιστα, πρέπει να ακολουθήσει στατιστική ανάλυση της θνησιμότητας των πληθυσμών. Η στατιστική σημαντικότητα κρίνεται απαραίτητη ώστε να επαληθεύεται η πιστότητα και τα αποτελέσματα να μην οφείλονται σε τυχαία γεγονότα. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να είναι επαναλήψιμα και να πραγματοποιηθεί το πείραμα χρησιμοποιώντας περισσότερα αρχικά άτομα ανά πληθυσμό. Σημαντική είναι η εξάλειψη χειρισμών που μπορούν να διαφοροποιήσουν τη συμπεριφορά των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών. Επειδή η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια σύγκρισης της θνησιμότητας, ενώ τα γραφήματα παρουσιάζουν μία αυξημένη τάση για τον πληθυσμό *dsChitin-BP*, αυτή δεν αγγίζει τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.

Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η παρεμβολή RNA είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο πληθυσμών εντόμων και πολλές μελέτες βασίζονται σε αυτήν για τη σύνθεση νέας γενιάς βιολογικών εντομοκτόνων. Η εύρεση γονιδίων ειδικών για τους εκάστοτε οργανισμούς αποτελεί το πρώτο βήμα προς την επίτευξη του σκοπού αυτού. Τα γονίδια που εμπλέκονται στον σχηματισμό και τη ρύθμιση των δομών που περιέχουν χιτίνη (εξωσκελετός και περιτροφική μεμβράνη) επελέγησαν ως πιθανοί στόχοι, διότι επιτελούν σημαντικές λειτουργίες και είναι απαραίτητα για την επιβίωση του εντόμου. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αποτελεί μία πρώτη προσπάθεια σίγησης της γονιδιακής έκφρασης μίας πρωτεΐνης που συνδέεται με χιτίνη, με ποικίλα αποτελέσματα. Σε επόμενο στάδιο, θα πραγματοποιηθεί ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Inc5* και *Chitin-BP* στα διάφορα προνυμφικά στάδια και της νύμφης. Εφόσον παρατηρηθεί με Real-Time PCR πως η σίγηση του *Inc5* οδηγεί σε πτώση της έκφρασης του *Chitin-BP*, αυτό θα αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη ρύθμισης του *Chitin-BP* από το *Inc5*. Ακόμα, μέσα στο ευρύτερο πλαίσιο αυτού του εγχειρήματος περιλαμβάνεται ανάκτηση του μέσου εντέρου και άλλων τμημάτων του σώματος προνυμφών του εργαστηρίου με σκοπό την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων- στόχων σε άλλους ιστούς ή τη δημιουργία των προφίλ έκφρασης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Επιπλέον, θα γίνουν προσπάθειες πολλαπλής σίγησης γονιδίων της περιτροφικής μεμβράνης ή ρυθμιστών τους με σκοπό την εύρεση ενός συνδυασμού που οδηγεί σε θνησιμότητα του εντόμου. Τελικό στάδιο, αποτελεί η εύρεση της βέλτιστης μεθόδου εισαγωγής του δίκλωνου μορίου στον οργανισμό, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο πεδίο ως βιολογικό εντομοκτόνο του *A. albopictus* χωρίς τον κίνδυνο θνησιμότητας άλλων χρήσιμων ή μη επιβλαβών εντόμων και οργανισμών εν γένει.

6. Πίνακας Ορολογίας - Συντμήσεις

Πίνακας Ορολογίας

Ελληνικός όρος	Ξενόγλωσσος όρος
Παρεμβολή RNA	RNA Interference
Πρωτεΐνη που δεσμεύει τη χιτίνη	Chitin-Binding protein
Δίκλωνο μόριο RNA	Double-stranded RNA molecule
Νήσος Ρεουνιόν	Réunion
Μικροενέσεις	Microinjections
Μέσω τροφής, σίτιση	Feeding
Μέσω εμβάπτισης	Soaking
Γονίδια που συντηρούν την κυτταρική λειτουργία	House-keeping genes
Περιτροφική μεμβράνη	Peritrophic matrix
Πρόσθιο έντερο	Foregut
Μέσο έντερο	Midgut
Οπίσθιο έντερο	Hindgut
Πρωτεΐνες Περιτροφικής Μεμβράνης	Peritrophic Matrix proteins
Επικράτειες που δεσμεύουν τη χιτίνη	Chitin Binding Domains
Πρωτεΐνες Εξωσκελετού Ανάλογες με τις Περιτροφίνες	Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins
Πρωτεΐνες Εξωσκελετού με μοτίβα Rebers & Riddiford	Cuticular Protein with R&R Motif
Μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA	Long noncoding RNAs

Συντμήσεις

Συντομογραφία	Ολογράφως
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
RNAi	RNA Interference
Chitin-BP	Chitin-Binding protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>lnc5</i>	long non coding (gene) 5
dsRNA	Double-stranded RNA
CHIKV	Chikungunya virus
DENV	Dengue virus
EEEV	Eastern equine encephalitis
LACV	La Crosse encephalitis
VEEV	Venezuelan equine encephalitis virus
WNV	West Nile virus
JEV	Japanese encephalitis
Arbovirus	Arthropod-borne virus
SIT	Sterile insect technique
TGS	Transcriptional gene silencing
PTGS	Post transcriptional gene silencing
RISC	RNA-induced silencing complex
DENV2	Dengue virus type 2
RdRP	RNA-dependent-RNA-polymerase
ΠΜ	Περιτροφική μεμβράνη/μήτρα
FG	Foregut
MG	Midgut
HG	Hindgut
PMPs	Peritrophic Matrix proteins
CBD	Chitin Binding Domain
KNK	Knickkopf
CPAPs	Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins
CPRs	Cuticular Protein with R&R Motif

Συντομογραφία	Ολογράφως
LncRNA	Long nonconding RNA
Ένζυμα στο μεταβολικό μονοπάτι της χιτίνης	
TRE	Trehalase
HXK	Hexokinase
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase
GFAT	Fructose-6-phosphate aminotransferase
GNA	Glucosamine-6- phosphate N-acetyltransferase
PAGM	Phosphoacetylglucosamine mutase
UAP	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase
CHS2	Chitin synthase 2
CDA	Chitin deacetylase
CHT	Chitinase
NAG	N-acetylglucosaminidase

7. Βιβλιογραφία

- ❖ Agarwal, S., and Mangrauthia, S. K. (2013). Advances, challenges and prospects in small RNA mediated approaches of virus resistance in plants. *J. Genomes Exomes* 2, 43–62. doi: 10.4137/JGE.S11938
- ❖ Agrawal, S., Kelkenberg, M., Begum, K., Steinfeld, L., Williams, C. E., Kramer, K. J., ... Merzendorfer, H. (2014). Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.009>
- ❖ Azlan, A., Obeidat, S. M., Yunus, M. A., & Azzam, G. (2019). Systematic identification and characterization of *Aedes aegypti* long noncoding RNAs (lncRNAs). *Scientific reports*, 9(1), 12147. doi:10.1038/s41598-019-47506-9
- ❖ Balakrishna Pillai, A., Nagarajan, U., Mitra, A., Krishnan, U., Rajendran, S., Hoti, S. L., & Mishra, R. K. (2016). RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Molecular Biology*, 26(2), 127–139. <https://doi.org/10.1111/imb.12282>
- ❖ Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., & James, A. A. (2013). The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29(9), 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
- ❖ Burton F. Tropp (2014), Βασικές αρχές Μοριακής Βιολογίας, Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε
- ❖ Chaudhari, S. S., Arakane, Y., Specht, C. A., Moussian, B., Boyle, D. L., Park, Y., ... Muthukrishnan, S. (2011). Knickkopf protein protects and organizes chitin in the newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17028–17033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112288108>
- ❖ Coulanges P, Clerc Y, Jousset F-X, et al. Dengue a La Réunion: isolement d'une souche a l'Institut Pasteur de Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 1979; 72:205–209
- ❖ Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. (2018). How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>
- ❖ Dinglasan, R. R., Devenport, M., Florens, L., Johnson, J. R., McHugh, C. A., Donnelly-Doman, M., Jacobs-Lorena, M. (2009). The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.010>
- ❖ Effler, P. V., Pang, L., Kitsutani, P., Vorndam, V., Nakata, M., ... Ayers, T. (2005). Dengue Fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5), 742–749. <https://doi.org/10.3201/eid1105.041063>
- ❖ Gomes, A. Q., Nolasco, S., & Soares, H. (2013). Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16010–16039. <https://doi.org/10.3390/ijms140816010>
- ❖ Katoch, R., Sethi, A., Thakur, N., & Murdock, L. L. (2013). RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(4), 847–873. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0399-4>
- ❖ 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. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix405>

- ❖ Kelkenberg, M., Odman-Naresh, J., Muthukrishnan, S., & Merzendorfer, H. (2015). Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.11.005>
- ❖ Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- ❖ Kola, V. S. R., Renuka, P., Madhav, M. S., & Mangrauthia, S. K. (2015). Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Frontiers in Physiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00119>
- ❖ Krebs, J., Lewin, B., Kilpatrick, S. & Goldstein, E. (2014). *Lewin's genes XI*. Burlington, Mass: Jones & Bartlett Learning
- ❖ Kunte, N., McGraw, E., Bell, S., Held, D., & Avila, L. (2019). Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. *Pest Management Science*, 76(1), 26–41. <https://doi.org/10.1002/ps.5588>
- ❖ La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparç-Goffart I, Charlet F, Ollier L, Mantey K, Mollet T, Fournier J P, Torrents R, Leitmeyer K, Hilairet P, Zeller H, Van Bortel W, Dejour-Salamanca D, Grandadam M, Gastellu-Etchegorry M (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.*, 15(39):pii=19676. <https://doi.org/10.2807/ese.15.39.19676-en>
- ❖ Lee, W.-S., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B., & Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites & Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3433-8>
- ❖ Lehane, M. J. (1997). PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 525–550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>
- ❖ Liu, X., Cooper, A. M. W., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2019). Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of Insect Physiology*, 114, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.03.006>
- ❖ Liu, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2019). Chitin in Arthropods: Biosynthesis, Modification, and Metabolism. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 169–207). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_9
- ❖ Lopez, S. B. G., Guimarães-Ribeiro, V., Rodriguez, J. V. G., Dorand, F. A. P.S., Salles, T. S., Sá-Guimarães, T. E., Moreira, M. F. (2019). RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39666-5>
- ❖ Mamta, B., & Rajam, M. V. (2017). RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 487–501. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0443-x>
- ❖ Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Bortel, W. V. (2012). A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(6), 435–447. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0814>
- ❖ Mommaerts, V., Sterk, G., & Smagghe, G. (2006). Hazards and uptake of chitin synthesis inhibitors in bumblebees *Bombus terrestris*. *Pest Management Science*, 62(8), 752–758. <https://doi.org/10.1002/ps.1238>

- ❖ Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., & Yang, Q. (2019). Chitin Organizing and Modifying Enzymes and Proteins Involved In Remodeling of the Insect Cuticle. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 83–114). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_5
- ❖ Noh, M. Y., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., Kanost, M. R., Beeman, R. W., & Arakane, Y. (2014). Two major cuticular proteins are required for assembly of horizontal laminae and vertical pore canals in rigid cuticle of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.07.005>
- ❖ 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. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- ❖ Perrone, J., & Spielman, A. (1988). Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell and Tissue Research*, 252(2). <https://doi.org/10.1007/bf00214391>
- ❖ Pialoux, G., Gaüzère, B.-A., Jauréguiberry, S., & Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(5), 319–327. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70107-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70107-x)
- ❖ Ramchurn, S. K., Moheput, K., & Goorah, S. S. (2009). An analysis of a short-lived outbreak of dengue fever in Mauritius. *Eurosurveillance*, 14(34). <https://doi.org/10.2807/ese.14.34.19314-en>
- ❖ Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M., Majori, G., & Cassone, A. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370(9602), 1840–1846. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61779-6)
- ❖ Santorum, M., Brancalhão, R. M. C., Guimarães, A. T. B., Padovani, C. R., Tettamanti, G., & dos Santos, D. C. (2019). Negative impact of Novaluron on the nontarget insect *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Environmental Pollution*, 249, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.095>
- ❖ 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.08.014>
- ❖ Shao, L., Devenport, M., & Jacobs-Lorena, M. (2001). The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2), 119–125. <https://doi.org/10.1002/arch.1042>
- ❖ Singh, A. D., Wong, S., Ryan, C. P., & Whyard, S. (2013). Oral delivery of double-stranded RNA in larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: implications for pest mosquito control. *Journal of insect science (Online)*, 13, 69. doi: 10.1673/031.013.6901
- ❖ Siomi, H., & Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), 396–404. <https://doi.org/10.1038/nature07754>
- ❖ Tellam, R. L. (1996). The peritrophic matrix. In *Biology of the Insect Midgut* (pp. 86–114). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0_4
- ❖ Tetreau, G., & Wang, P. (2019). Chitinous Structures as Potential Targets for Insect Pest Control. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 273–292). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3_13
- ❖ Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: Machines for RNAi. *Genes and*

Development, 19(5), 517–529. <https://doi.org/10.1101/gad.1284105>

❖ Van Rij, R. P., & Andino, R. (2006). The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.006>

❖ Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* 20, 759–771. doi: 10.1101/gad.1410506

❖ Vogel, E., Santos, D., Mingels, L., Verdonckt, T.-W., & Broeck, J. V. (2019). RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>

❖ Willis, J. H. (2010). Structural cuticular proteins from arthropods: Annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.001>

❖ Yu, R., Liu, W., Li, D., Zhao, X., Ding, G., Zhang, M., ... Zhang, J. (2016). Helicoidal Organization of Chitin in the Cuticle of the Migratory Locust Requires the Function of the Chitin Deacetylase2 Enzyme (LmCDA2). *Journal of Biological Chemistry*, 291(47), 24352–24363. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.720581>

❖ Zhu, K. Y., Merzendorfer, H., Zhang, W., Zhang, J., & Muthukrishnan, S. (2016). Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annual Review of Entomology*, 61(1), 177–196. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023933>

❖ Σημειώσεις μαθήματος “Φυσιολογία εντόμων”, τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, σελ. 1,2

❖ Τζανακάκης, Μ. Ε. (1995) *Εντομολογία*: University Studio Press

❖ Χάρτης πλασμιδίου L4440, (www.addgene.org)