

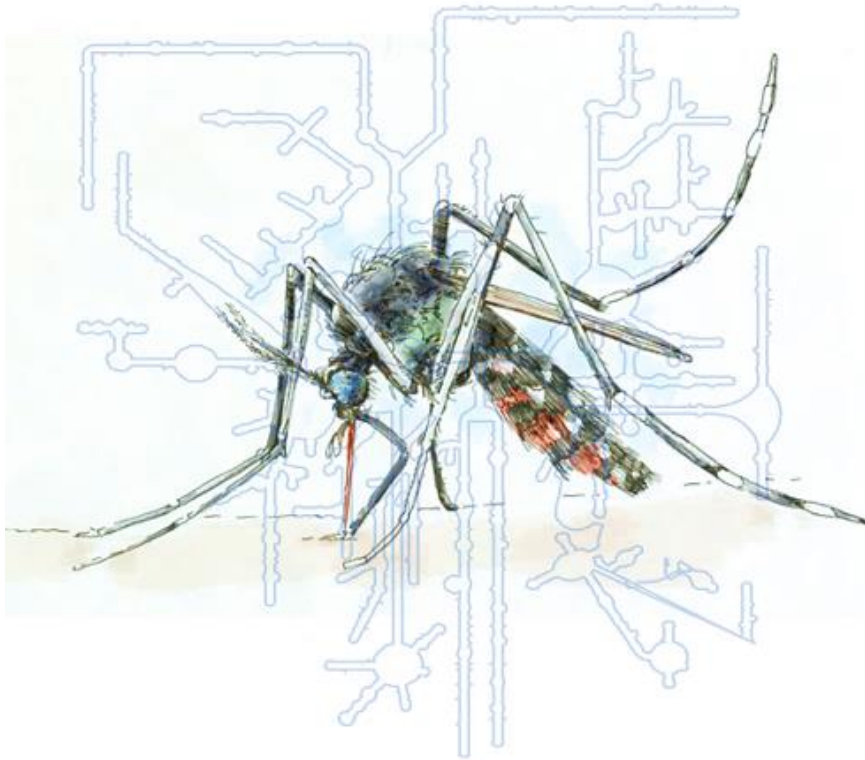


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



LABORATORY
of MOLECULAR BIOLOGY
AND GENOMICS

*Λειτουργική ανάλυση του μακρού
μη-κωδικού RNA, NORMA19, στο ασιατικό
κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΑΤΖΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Θέμα διπλωματικής εργασίας:

«Λειτουργική ανάλυση του μακρού μη-κωδικού RNA, NORMA19, στο ασιατικό κουνούπι τίγρης Aedes albopictus»

Thesis title:

'Functional analysis of a long non-coding RNA, NORMA19, at the asian tiger mosquito, Aedes albopictus '

Βασιλική Κωνσταντίνος Χατζή
Λάρισα 2023

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Φεβρουαρίου 2022 – Νοεμβρίου 2022 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Ματθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της υποψήφιας διδάκτορα κα. Λ. Κατσιαμάνη.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος

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

Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για την εμπιστοσύνη του στην ανάθεση του θέματος της παρούσας πτυχιακής εργασίας, το ενδιαφέρον και τις ουσιώδεις υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, οφείλω ευχαριστίες και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, καθηγητές κ. Αντώνιο Γιακουνή και κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας μου.

Η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την καθοδήγηση και επίβλεψη της Υποψήφιας Διδάκτορα Λευκής Κατσιαμάνη. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την αστείρευτη προθυμία της να με βοηθήσει, αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές και την αδιάκοπη συμπαράσταση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και το ιδιαίτερα φιλικό περιβάλλον στο οποίο μοιραστήκαμε αμέτρητες ώρες γέλιου και χαράς, μετριάζοντας τη λύπη και τα νεύρα με θετική σκέψη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου τη καρδιά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αμέριστη πνευματική και υλική στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την άνοδο των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS), τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNAs) έχουν αναδυθεί ως μία εξαιρετικά δημοφιλής τάξη γονιδίων μεταξύ της ερευνητικής κοινότητας, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους και του πλειοτροπικού τρόπου δράσης τους. Τα ολοένα και αυξανόμενα δεδομένα για τον ρυθμιστικό χαρακτήρα τους σε βασικές αναπτυξιακές διεργασίες πολυάριθμων οργανισμών δίνουν το έναυσμα για την λεπτομερέστερη διερεύνηση των lncRNA μεταγράφων στην αναπαραγωγική βιολογία των εντόμων. Ο συνδυασμός της χαμηλής ειδο-ειδικής τους συντήρησης και της υψηλής ιστοειδικότητάς τους καθιστά αυτά τα γονίδια ιδανικά για την ανάπτυξη εναλλακτικών ειδο-ειδικών και οικολογικών μεθόδων πληθυσμιακού ελέγχου.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση, μέσω γονιδιακής σίγησης, της δυναμικής ενός ειδικού για τις ωσθήκες lncRNA μεταγράφου, του *NORMA19*, ως ρυθμιστικός παράγοντας της αναπαραγωγικής ικανότητας του ασιατικού κουνουπιού τίγρης, *Aedes albopictus*. Το συγκεκριμένο είδος κουνουπιού επιλέχθηκε με γνώμονα τη μεγάλη επιδημιολογική και υγειονομική του σημασία ως φορέας αρκετών αναδυόμενων αρμοϊών, καθώς και την πρόσφατη ευρεία εξάπλωσή του στον Ελλαδικό χώρο. Η επιλογή του γονιδίου βασίστηκε στην αύξηση της γονιδιακής του έκφρασης μετά από τη λήψη γεύματος αίματος, η οποία αποτελεί ένδειξη κάποιου πιθανού ρυθμιστικού ρόλου στην αναπαραγωγική βιολογία του κουνουπιού. Για τη σίγηση του *NORMA19*, αξιοποιήθηκε η τεχνολογία RNAi, σε συνδυασμό με τη διαδικασία της μικροένεσης ως μέθοδο χορήγησης δίκλωνων μορίων RNA έναντι του γονιδίου, σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια. Για τη διερεύνηση της επίδρασης της αποσιώπησης, έγινε παρατήρηση της ικανότητας ωσαπόθεσης, του ρυθμού εκκόλαψης των αυγών και της μορφολογίας των ωσθηκών ενός αριθμού βιολογικών αντιγράφων, καθώς και του προφίλ έκφρασης του γονιδίου μετά τη μικροέγχυση.

Εξαιτίας των ενθαρρυντικών, αλλά αμφιβόλου αξιοπιστίας φαινοτυπικών παρατηρήσεων, είναι απαραίτητη η επανάληψη του πειραματικού κύκλου γονιδιακής σίγησης σε έναν μεγαλύτερο πληθυσμό βιολογικών δειγμάτων. Η επιβεβαίωση της δυνητικά θετικής επίδρασης του γονιδίου στην αναπαραγωγική ικανότητα των κουνουπιών μπορεί να αποτελέσει τη βάση επιπρόσθετων πειραματικών προσεγγίσεων που ενδεχομένως αποκρυπτογραφούν την αλληλεπίδραση των lncRNA γονιδίων με το αναπαραγωγικό σύστημα οργανισμών, ανοίγοντας ένα νέο μονοπάτι ειδο-ειδικών προσεγγίσεων πληθυσμιακού ελέγχου.

ABSTRACT

With the rise of next-generation sequencing (NGS) technologies, long non-coding RNAs (lncRNAs) have emerged as an extremely popular class of genes, due to their unique characteristics and pleiotropic mode of action. Increasing evidence for their regulatory nature in key developmental processes of numerous organisms is providing the impetus for further, detailed investigation of lncRNA transcripts in insect reproductive biology. The combination of low conservation among different species and high tissue specificity, renders these genes ideal targets for alternative species-specific and eco-friendly population control.

The purpose of this thesis was to evaluate, through gene silencing, the potential role of an ovary-specific lncRNA transcript, *NORMA19*, as a regulator of reproductive ability in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. This particular mosquito species was chosen due to its great epidemiological and public health significance, being a vector of several emerging arboviruses, in addition to its recent widespread distribution in Greece. The selection of the target-gene was based on its overexpression after blood meal, which is an indication of its potential regulatory role in the mosquito's reproductive biology. *NORMA19* was silenced using the well-known RNAi technology in combination with the microinjection technique as an approach of introducing double-stranded RNA molecules in female adult mosquitoes. To investigate the silencing effect, oviposition capacity, hatching rate and ovarian morphology after RNAi treatment, we observed the phenotype and studied the expression of *NORMA19* in several biological replicates.

In view of the encouraging yet questionable phenotypic observations, it is necessary to repeat the silencing in a larger population and re-evaluate the results. Confirmation of the potentially positive effect of *NORMA19* on mosquito reproductive fitness may form the baseline for additional experimental approaches that potentially unravel the interaction of lncRNA genes with the reproductive system of organisms, thus paving a new pathway in the context of population control.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

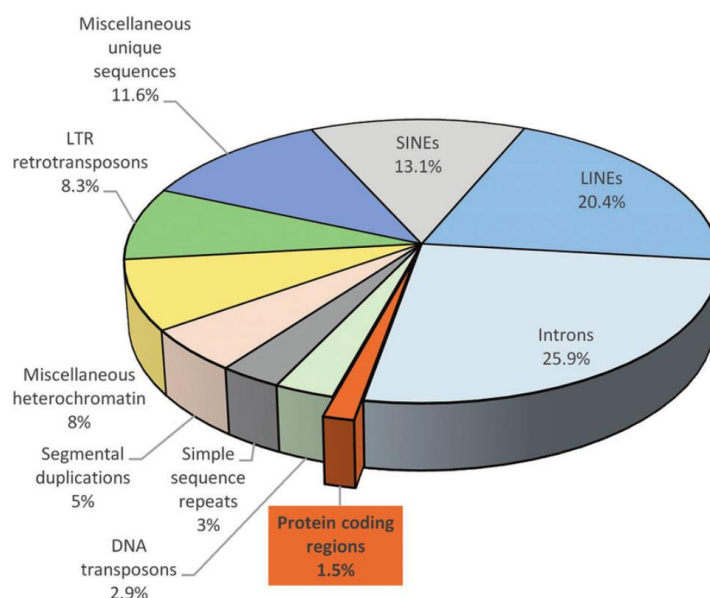
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Μη κωδικά RNAs (non-coding RNAs)	9
1.1.1. Long non coding RNAs.....	10
1.1.2. Ταξινόμηση των lncRNA	11
1.1.3. Ταυτοποίηση των lncRNA.....	12
1.1.4. Μηχανισμοί Δράσης.....	14
1.1.5. Γονιδιωματική και Λειτουργική Συντήρηση των lncRNA	18
1.1.6. Ρόλοι των lncRNA στην αναπαραγωγή των εντόμων	19
1.2. Aedes albopictus	21
1.2.1. Προέλευση και Παγκόσμια Εξάπλωση.....	21
1.2.2. Ρόλος ως φορέας ασθενειών.....	22
1.2.3. Βιολογικός Κύκλος.....	23
1.3. Ανάπτυξη Ωοθηκών - Βιτελλογένεση	25
1.3.1. Αυτογονία.....	25
1.3.2. Μονοπάτι Βιτελλογένεσης	26
1.3.3. Ωρίμανση Ωοθηκών	27
1.4. Μέθοδοι πληθυσμιακού ελέγχου	28
1.4.1. Μηχανισμός παρεμβαλλόμενου RNA	30
1.4.2. Αξιοποίηση των lncRNA στον πληθυσμιακό έλεγχο	35
2. ΣΚΟΠΟΣ	35
3. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ	36
3.1. Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού Ae. albopictus	36
3.2. Απομόνωση RNA (RNA extraction)	36
3.3. Επεξεργασία με DNase (DNase treatment)	37
3.4. Σύνθεση cDNA	37
3.5. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	38
3.6. Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων	38
3.6.1. Σχεδιασμός εκκινητών.....	39
3.6.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση T7 εκκινητών	40
3.6.3. PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR)	41
3.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis)	43
3.8. Ανάκτηση μορίων DNA από γέλη αγαρόζης (Gel extraction)	44
3.9. Παραγωγή του dsRNA	45
3.9.1. In vitro transcription.....	45
3.9.2. Επεξεργασία με DNase (DNase treatment)	46

3.9.3.	Κατακρήμιση dsRNA.....	46
3.10.	Χορήγηση του dsRNA: Μικροένεση.....	47
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
4.1.	Ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου	48
4.1.1.	Έκφραση του NORMA19 σε επίπεδο ιστών.....	48
4.1.2.	Έκφραση του NORMA19 στις ωοθήκες μετά το γεύμα αίματος.....	48
4.2.	Ενίσχυση γονιδίων-στόχων και επιβεβαίωσή της	49
4.2.1.	Ενίσχυση του γονιδίου NORMA19	50
4.2.2.	Ενίσχυση του γονιδίου GFP.....	50
4.3.	Παραγωγή dsRNA έναντι των NORMA19 και GFP	50
4.4.	Μικροένεση των dsRNA και παρατήρηση φαινοτύπου	51
4.4.1.	Μορφολογία ωοθηκών	51
4.4.2.	Ικανότητα ωοαπόθεσης - Ποσοστό εκκόλαψης των αυγών	52
4.5.	Επιβεβαίωση μεταγραφικής σίγησης του NORMA19	54
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μη κωδικά RNAs (non-coding RNAs)

Η ετερογένεια στην αλληλουχία των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων έγινε γνωστή αρκετά νωρίς, με την ανακάλυψη της ετεροχρωματινής, δηλαδή της συμπυκνωμένης δομής του DNA. Προγράμματα χαρτογράφησης του DNA, όπως η κοινοπραξία ENCODE (the Encyclopedia of DNA Elements), αποκάλυψαν ότι από το 90% του ευκαρυωτικού γονιδιώματος που μεταγράφεται σε RNA, μόνο μικρό ποσοστό αντιστοιχεί σε κωδικοποιητικά γονίδια (ENCODE Project Consortium, 2012). Επιπλέον, το συνολικό μεταγράψωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελείται από μια πληθώρα RNA μεταγράφων που διαφέρουν στο μέγεθος, την αφθονία και την ικανότητά τους να παράγουν πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, μόνο το 1,5% του συνολικού μεταγραφόμενου RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την μετάφραση πρωτεϊνών, ενώ το υπόλοιπο αναφέρεται ως μη κωδικοποιητικό RNA (non-coding RNA) (Choudhary *et al.* 2021; Reichetzeder 2021).



Εικόνα 1. Σύνοψη των κύριων συστατικών του ευκαρυωτικού γονιδιώματος (Reichetzeder 2021).

Ειδικότερα, σύμφωνα με τους Hombach και Kretz (2016), τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα ταξινομούνται ως:

- i. Ιδιοσυστάτα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (house-keeping), όπως τα μικρά πυρηνικά (snRNA), τα μεταφορικά (tRNA) και τα ριβοσωμικά (rRNA), τα οποία εκφράζονται συνεχώς, με σκοπό την ομαλή λειτουργία του κυττάρου.
- ii. Ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα που διακρίνονται στα βραχεία, όπως τα υψηλά συντηρημένα siRNAs (μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs), miRNAs (micro RNAs) και piRNAs (Piwi-associated RNAs) που εμπλέκονται στη μεταγραφική και μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση, και τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs).

Μέχρι πολύ πρόσφατα, τα lncRNAs θεωρούνταν αποτέλεσμα «μεταγραφικού θορύβου», χωρίς καμία επίδραση στην γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, χάρη στην άνοδο νέων τεχνολογιών, όπως οι μέθοδοι αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS), τα lncRNAs έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ερευνητική κοινότητα, λόγω των συσσωρευόμενων δεδομένων

του ρυθμιστικού τους χαρακτήρα σε διάφορες βιολογικές διεργασίες σε ζώα και φυτά (Zhang *et al.* 2016; Golicz *et al.* 2018; Choudhary *et al.* 2021).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει τον ρόλο των lncRNA στον έλεγχο διαδικασιών που αφορούν στην αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό (He *et al.* 2021; Lin, 2020; Fatica & Bozzoni, 2013).

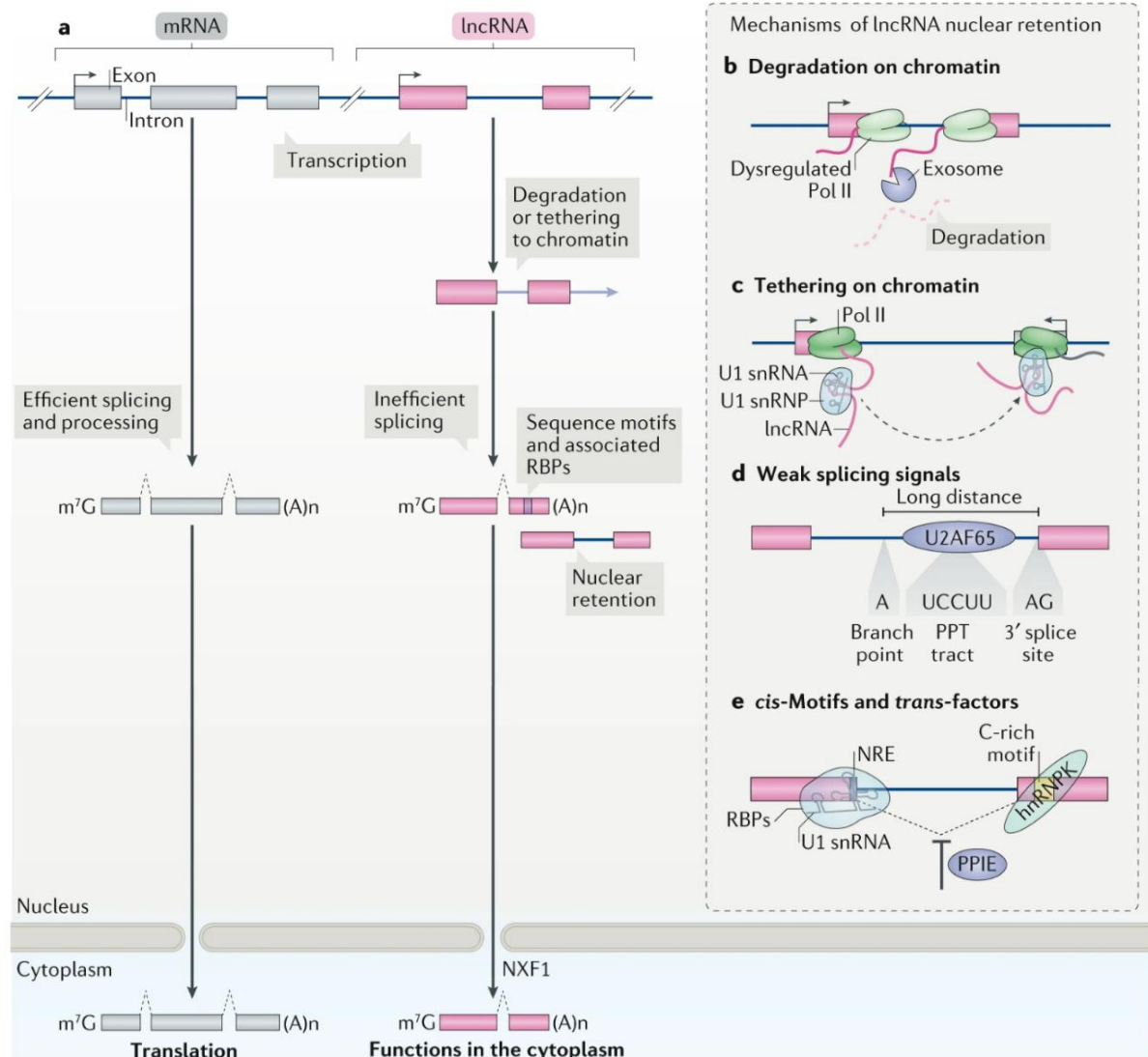
1.1.1. Long non coding RNAs

Τα lncRNAs αποτελούν μια ποικιλόμορφη τάξη μεταγράφων, με μήκος περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια, χωρίς κωδικοποιητική ικανότητα λόγω της έλλειψης αναγνωστικού πλαισίου (ORF). Συνήθως μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II και μπορεί να προέρχονται από οποιαδήποτε αλυσίδα του DNA (Long *et al.* 2017). Σε αντίθεση με τα μικρά RNA, τα lncRNA παρουσιάζουν χαμηλή συντήρηση ανάμεσα στα διαφορετικά είδη, ενώ ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω μιας σειράς διαφορετικών μηχανισμών που δεν έχουν γίνει ακόμα πλήρως κατανοητοί.

Παρόλο που αυτή η ομάδα μεταγράφων δεν κωδικοποιεί για κάποια πρωτεΐνη, μοιράζεται μερικά χαρακτηριστικά με τα κωδικοποιητικά μεταγράφα ως προς την επεξεργασία τους. Πιο συγκεκριμένα, υπόκεινται σε πολυαδενυλίωση, προσθήκη 5' καλύπτρας, καθώς και σε εναλλακτικό μάτισμα (Quinn & Chang 2016). Επιπλέον, η έκφρασή τους μπορεί να μειορρυθμίζεται από miRNAs, με τον ίδιο μηχανισμό όπως των mRNAs (Zheng *et al.* 2014). Από την άλλη, σε αντίθεση με τα mRNAs, πολλά lncRNAs δεν επεξεργάζονται επαρκώς, με αποτέλεσμα να κατακρατούνται στον πυρήνα μέσω διάφορων μηχανισμών. Τα επαρκώς επεξεργασμένα lncRNAs, που μετά τη συρραφή τους μπορεί να περιέχουν ένα ή μερικά εξόνια, μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός ειδικού πυρηνικού παράγοντα (nuclear RNA export factor 1, NXF1).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται η κατακράτηση στον πυρήνα φαίνονται στην Εικόνα 1 (b-e) (Statello *et al.* 2020):

- i. Τα lncRNAs που μεταγράφονται από μια απορρυθμισμένη RNA πολυμεράση II, παραμένουν στη χρωματίνη και αποικοδομούνται από το πυρηνικό εξόσωμα.
- ii. lncRNAs με μοτίβο πρόσδεσης (binding domain) του μικρού πυρηνικού RNA U1 (U1 snRNA) μπορούν να στρατολογήσουν τη μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη U1 (U1 snRNP) και με αυτό να προσδεθούν στην Pol II σε διάφορες γονιδιακές θέσεις.
- iii. Μερικά lncRNAs υπόκεινται σε ανεπαρκές μάτισμα, λόγω δομικών ανωμαλιών, όπως μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ της 3' θέσης συρραφής και του σημείου διακλάδωσης ή βραχεία περιοχή πολυπυριμιδίνης (PPT).
- iv. Cis μοτίβα όπως το nuclear retention element (NRE) U1 snRNA binding site και τα C-rich motifs και trans παράγοντες όπως το U1 snRNP και η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη K (hnRNPK) αντίστοιχα, αλληλεπιδρούν με στόχο τη κατακράτηση του lncRNA στον πυρήνα.



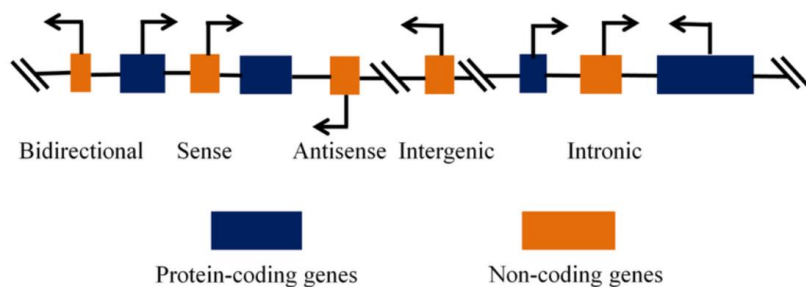
Εικόνα 2. α) Βιογένεση των lncRNA. β-ε) Μηχανισμοί κατακράτησης των lncRNA στον πυρήνα. (Statello et al. 2020)

1.1.2. Ταξινόμηση των lncRNA

Αν και τα lncRNAs δεν έχουν μεγάλη δομική και μηχανιστική ομοιότητα μεταξύ τους, η ταξινόμησή τους μπορεί να γίνει με βάση την προέλευσή τους πάνω στο γονιδίωμα (Wang et al. 2015). Ανάλογα με τον γονιδιακό τόπο από τον οποίο μεταγράφονται, τα lncRNAs ταξινομούνται ως:

- i. Νοηματικά (sense): Τα lncRNAs που μεταγράφονται από την ίδια αλυσίδα με τα κωδικοποιητικά γονίδια και επίσης, μπορεί να περιλαμβάνουν πολλά εξόνια και ιντρόνια.
- ii. Αντινοηματικά (antisense): Τα lncRNAs που μεταγράφονται από την αντίθετη αλυσίδα από τα γονίδια που κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη και μπορεί να περιλαμβάνουν πολλά εξόνια και ιντρόνια.
- iii. Αποκλίνοντα ή Αμφίδρομα (divergent/bidirectional): Τα lncRNAs που βρίσκονται 1kb ανοδικά μιας περιοχής υποκινητή κωδικοποιητικού γονιδίου, αλλά μεταγράφονται από την αντίθετη αλυσίδα.

- iv. Ιντρονικά (intronic) Τα lncRNAs που εντοπίζονται εξ' ολοκλήρου σε ιντρονικές περιοχές γονιδίου που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη.
- v. Διαγονιδιακά (intergenic): Τα lncRNAs που εντοπίζονται μεταξύ κωδικοποιητικών γονιδίων.



Εικόνα 3. Ταξινόμηση των lncRNAs με βάση τον γονιδιακό τους τόπο (Wang *et al.*, 2015).

Επιπλέον, τα lncRNAs μπορεί να μεταγράφονται από περιοχές ενισχυτή, γνωστά ως eRNAs. Τα eRNAs αποτελούν μια τάξη cis-acting lncRNAs, με μη πολύ-αδενυλιωμένα μετάγραφα μονής ή διπλής κατεύθυνσης (1D-eRNAs και 2D-eRNAs), τα οποία εξαιτίας του υψηλού βαθμού ιστοειδικότητας, αφθονίας και σταθερότητας, θεωρούνται τεχνικά ως ξεχωριστή κατηγορία ncRNAs στη πλειοψηφία των βάσεων δεδομένων (Spurlock *et al.* 2016; Morlando *et al.* 2015; Li *et al.* 2019).

1.1.3. Ταυτοποίηση των lncRNA

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ανακαλύφθηκε ένα από τα πλέον γνωστά και καλά μελετημένα lncRNAs, το λεγόμενο *Xist* (X-inactive-specific transcript), το οποίο κατευθύνει την αδρανοποίηση του ενός χρωμοσώματος X για την αντιστάθμιση δόσης στα θηλαστικά (Brown *et al.* 1992). Τα χρόνια που ακολούθησαν, η μαζική χρήση μεγάλης κλίμακας αλληλούχησης cDNA οδήγησε στην ανίχνευση μεγάλου αριθμού lncRNA που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση ή αποσιώπηση γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *HOTAIR* στον άνθρωπο που εμπλέκεται στη διαδικασία διαμόρφωσης της χρωματίνης μέσω αλληλεπίδρασης με την απομεθυλάση των ιστονών LSD1, με απώτερο στόχο την αποσιώπηση του γονιδίου HOXD (Rinn *et al.* 2007).

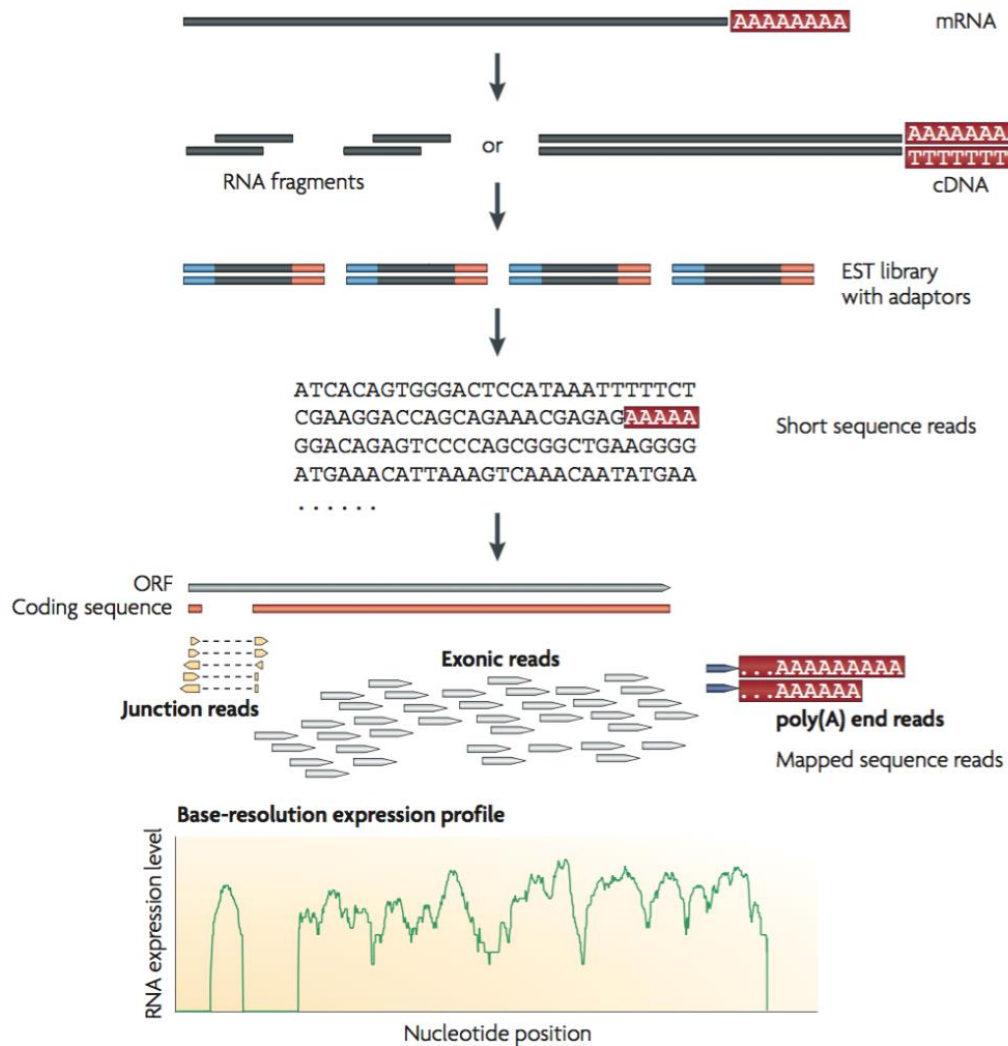
Η ταυτοποίηση των lncRNA απαιτεί την ανίχνευση επιπέδων μεταγραφής από γονιδιωματικές περιοχές που δεν περιέχουν ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Ωστόσο, τα σχετικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης και η ετερογένεια των τρόπων δράσης τους, καθιστά τη μελέτη των lncRNA αρκετά δύσκολη (Li *et al.* 2019). Για τον σκοπό αυτόν, αναπτύχθηκε και αξιοποιήθηκε μια σειρά τεχνολογιών, όπως οι μικροσυστοιχίες Tiling, η ανάλυση SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) και η ανάλυση CAGE (Cap Analysis of Gene Expression). Μία επιπρόσθετη μεθοδολογία ταυτοποίησης lncRNA αποτελεί η τεχνική ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης ακολουθούμενη από DNA αλληλούχηση (CHIP seq) που επιτρέπει τον έμμεσο εντοπισμό άγνωστων lncRNA, μέσω ανάλυσης των τροποποιήσεων των ιστονών που χαρακτηρίζουν γονιδιωματικές περιοχές ενεργής μεταγραφής (Fatica & Bozzoni, 2013).

Οι προηγούμενες γονιδιωματικές μελέτες που βασίστηκαν στις ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (ESTs), την πλήρη αλληλούχηση cDNA και τις μικροσυστοιχίες tiling οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων ισχυρότερων μεθοδολογιών όπως η αλληλούχηση RNA (RNA seq) για τη de novo ανακάλυψη και ανάλυση της έκφρασης των lncRNA (Li *et al.* 2019). Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεταγραφομικής ανάλυσης μέσω RNA seq, σε σχέση με άλλες μεθόδους, είναι η ικανότητά της να εντοπίζει μετάγραφα χωρίς να είναι απαραίτητη η αντιστοίχιση με

προϋπάρχουσες γονιδιωματικές αλληλουχίες. Εξαιτίας αυτού, η RNA seq προτιμάται για τη μελέτη οργανισμών μη-μοντέλων οι οποίοι διαθέτουν γονιδιωματικές αλληλουχίες που δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα (Wang *et al.* 2009).

Η ομοιότητα της δομής ενός lncRNA με τα mRNA, λόγω της 5' καλύπτρας και της 3' πολυαδενυλιωμένης ουράς (poly(A)), βοηθά την αλληλούχησή τους με τυποποιημένα πρωτόκολλα RNA seq. Τα τελευταία χρόνια, χάρη στην αξιοποίηση τεχνολογιών εις βάθος αλληλούχησης RNA στην χαρτογράφηση μεταγραφωμάτων, έχουν ταυτοποιηθεί πολυάριθμα lncRNAs σε διάφορους ιστούς και συνθήκες των ευκαρυωτικών συστημάτων. Μέχρι πρόσφατα, η πιο κοινή μέθοδος αλληλούχησης χρησιμοποιούσε εμπλουτισμό με oligo(dT) που υβριδίζουν στις poly(A) ουρές των RNA, τις οποίες διαθέτει η πλειοψηφία των lncRNA, με σκοπό τη δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών και την αλληλούχηση υψηλής απόδοσης. Η αλληλούχηση RNA πραγματοποιείται κυρίως μέσω της τεχνολογίας Illumina, μέσω της οποίας παράγονται αναγνώσεις (reads) της τάξης των δεσκατομμυρίων, ενώ για τη ευθυγράμμιση και την συναρμολόγηση του μεταγραφώματος αξιοποιούνται κυρίως τα βιοπληροφορικά εργαλεία TopHat22 και Cufflinks23 (Ulitsky 2016; Li *et al.* 2019). Αφού το μεταγράφημα συναρμολογηθεί, τα δεδομένα μεταφράζονται ποσοτικά σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης και ακολουθεί η επιλογή και η ενίσχυση των μεταγράφων που πληρούν τα κριτήρια των lncRNA, δηλαδή την απουσία του κωδικοποιητικού δυναμικού και το μεγαλύτερο των 200nt μήκος. Οι συστηματικές προσπάθειες αλληλούχησης των lncRNA έχουν συμβάλει στην δημιουργία αρκετών βάσεων δεδομένων lncRNA, όπως οι PLAR, NecsuLea *et al.* και PhyloNONCODE (Fatica & Bozzoni, 2013).

Τέλος, η συγκριτική ανάλυση των γονιδίων αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη των λειτουργιών των lncRNA, όπως έχει υπάρξει για άλλα μη κωδικά RNA και πρωτεΐνες. Η προσέγγιση αυτή απαιτεί όχι μόνο τις ομάδες γονιδίων ή γονιδιωμάτων που συγκρίνονται, αλλά και ειδικούς αλγορίθμους που ταυτοποιούν και αξιολογούν την ομοιότητα. Ωστόσο, η εφαρμογή συγκριτικής γονιδιωματικής στα lncRNAs έχει αποδειχθεί αρκετά δύσκολη, με αποτέλεσμα μόνο μερικά lncRNAs να έχουν εντοπιστεί σε είδη εκτός του ανθρώπου και του ποντικού με αυτή τη μέθοδο (Ulitsky, 2016).



Εικόνα 4. Τυπικό πείραμα RNA sequencing (Wang et al. 2009). Τα mRNAs μετατρέπονται σε βιβλιοθήκη cDNA τμημάτων, στα άκρα των οποίων προστίθενται ειδικοί προσαρμογείς. Μέσω αλληλούχησης υψηλής απόδοσης, από κάθε cDNA προκύπτει μια μικρή αλληλουχία (short reads), οι οποίες στοιχίζονται με γονιδίωμα αναφοράς ή μεταγράψωμα και ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες που χρησιμοποιούνται για τη κατασκευή ενός προφίλ έκφρασης.

1.1.4. Μηχανισμοί Δράσης

Η ομάδα των lncRNA συνίσταται από ένα ρεπερτόριο μεταγράφων με ποικίλους σημαντικούς ρόλους στη φυσιολογία των ιστών και τη κυτταρική λειτουργία. Παρότι η άνοδος των νέων τεχνολογιών έριξε φως σε πολυάριθμα μέλη αυτής της κατηγορίας, οι μηχανισμοί δράσης των περισσότερων lncRNA παραμένουν άγνωστοι.

Ωστόσο, εξαιτίας του καταιγισμού πειραματικών τεχνικών με σκοπό τη μελέτη των λειτουργιών των lncRNA, έχουν συσσωρευτεί πολλαπλά δεδομένα που αποδεικνύουν την εμπλοκή τους στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε όλα τα επίπεδα ελέγχου της (Morlando et al. 2015).

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των lncRNA αποτελεί μια καλή αρχική ένδειξη των πιθανών τρόπων δράσης τους. Τα πυρηνικά lncRNAs εμπλέκονται στη γονιδιακή ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο, αλλά και μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ενώ τα κυτταροπλασματικά lncRNAs σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Salehi et al. 2017; Hombach & Kretz 2016).

- i. **Επίπεδο χρωματίνης:** Ο κύριος τρόπος με τον οποίο τα lncRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο χρωματίνης είναι μέσω της δράσης τους ως μόρια-οδηγοί, τα οποία αλληλεπιδρούν και στρατολογούν ειδικά σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης σε συγκεκριμένους γονιδιακούς στόχους. Τα σύμπλοκα αυτά αναδιαμορφώνουν τη δομή των ιστονών, κυρίως μέσω μεθυλίσεων. Με τον τρόπο αυτό, η ανοιχτή δομή της χρωματίνης, η ευχρωματίνη, μετατρέπεται σε μια συμπυκνωμένη και μη προσβάσιμη από ένζυμα δομή, την ετεροχρωματίνη.

Ο πιο έντονα μελετημένος και καλύτερα χαρακτηρισμένος μηχανισμός αυτής της κατηγορίας είναι το γονίδιο *Xist* που εμπλέκεται στην απενεργοποίηση του ενός από τα δύο Χ χρωμοσώματα στα θηλυκά άτομα των θηλαστικών. Το γονίδιο *Xist* κωδικοποιείται από το γενετικό τόπο *Xic*, το λεγόμενο κέντρο απενεργοποίησης του Χ. Το *Xist* εκφράζεται έντονα μόνο από το ανενεργό Χ χρωμόσωμα προερχόμενο από το ένα γονέα και στη συνέχεια, δρα *in cis* επικαλύπτοντας το χρωμόσωμα Χ και δημιουργώντας το λεγόμενο «σύννεφο *Xist*» που επιφέρει τη γονιδιακή σίγηση. Αυτό το επιτυγχάνει έμμεσα, στρατολογώντας άλλους παράγοντες που συμπυκνώνουν τη χρωματίνη, όπως το Polycomb repressive complex 2 (PRC2). Το PRC2 προσθέτει τρι-μεθυλικές ομάδες στη λυσίνη 27 της ιστόνης H3, τροποποίηση συνδεδεμένη με τη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (Wang & Chang 2011; Kung *et al.* 2013).

Παράλληλα, με τον ίδιο μηχανισμό, τα lncRNAs φαίνεται να εμπλέκονται και στον επιγενετικό έλεγχο των γονιδίων, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας πολλαπλούς γονιδιακούς τόπους ταυτόχρονα, μέσω τροποποίησης της προσβασιμότητας στην χρωματίνη. Δρώντας ως οδηγοί (*guides*) για σύμπλοκα επαναμοντελοποίησης της χρωματίνης, όπως το PRC2, ένας μεγάλος αριθμός lncRNAs στοχεύει γονιδιωματικές περιοχές στον πυρήνα με σκοπό τη κληρονόμηση των σχεδίων γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, το lncRNA *HOTAIR* που μεταγράφεται από τη γονιδιακή περιοχή HOXC, δρα *in trans* στην περιοχή HOXD, ως οδηγός για το σύμπλοκο PRC2, με αποτέλεσμα τη μεσολαβούμενη από το PRC2 μεταγραφική σίγηση αυτής γονιδιακής περιοχής (Hombach & Kretz 2016). Η μεσολαβούμενη από lncRNA γονιδιακή σίγηση μέσω τροποποίησης της χρωματίνης έχει παρατηρηθεί ότι συνδέεται όχι μόνο με την ομαλή λειτουργία των κυττάρων και του οργανισμού, αλλά και με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η ανάπτυξη καρκίνου και η σχιζοφρένεια (Taniue & Akimitsu 2021; Morlando *et al.* 2015; Mishra & Kumar 2021).

Τέλος, έχουν καταγραφεί πυρηνικά lncRNAs που συμβάλλουν πιο έμμεσα στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, μέσω μηχανισμών διατήρησης της αρχιτεκτονικής του πυρήνα. Τέτοια lncRNAs είναι και αυτά που συμμετέχουν στον σχηματισμό πυρηνικών δομών μεταξύ των χρωμοσωμάτων και εμπλέκονται στα μονοπάτια πολυδυναμίας των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, το συνδεδεμένο με το Χ lncRNA *Firre* (functional intergenic repeating RNA element), μαζί με τη πυρηνική πρωτεΐνη hnRNP-U, δημιουργούν μεταξύ των χρωμοσωμάτων δομές σκαλωσιάς (*scaffold*) για την διευκόλυνση των μεταξύ τους *trans* αλληλεπιδράσεων (Hombach & Kretz 2016; Kopp & Mendell, 2018).

- ii. **Μεταγραφικό επίπεδο:** Ο αυστηρός μεταγραφικός έλεγχος στον οποίο υπόκεινται τα γονίδια των lncRNA αποτελεί μια ισχυρή υπόδειξη του δυναμικού χαρακτήρα τους ως μοριακά σήματα του κυττάρου. Η ιστο-ειδικότητα, καθώς και η ειδικότητα στον χρόνο μεταγραφής, προσδίδει στα lncRNAs την ικανότητα να ενσωματώνουν αναπτυξιακά

σήματα και να ανταποκρίνονται στα διάφορα ερεθίσματα, ρυθμίζοντας άμεσα την διαδικασία της μεταγραφής.

Ο έλεγχος των lncRNA σε μεταγραφικό επίπεδο ασκείται κυρίως μέσω της δράσης τους ως οδηγοί (guides) ή δολώματα (decoys) μεταγραφικών παραγόντων, επηρεάζοντας τον κυτταρικό τους εντοπισμό, ή ακόμη, μέσω ανταγωνισμού για την διαθεσιμότητα των θέσεων σύνδεσης συνενεργοποιητών ή συγκαταστολέων (Kung *et al.* 2013). Χαρακτηριστική περίπτωση lncRNA με ρόλο δολώματος είναι το μετάγραφο *PANDA* που απομακρύνει τον μεταγραφικό παράγοντα των θηλαστικών NF- κ B από τα προ-αποπτωτικά γονίδια – στόχους του. Η σύλληψη του NF- κ B οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των προ-αποπτωτικών γονιδίων και επομένως, στη σύλληψη του κυτταρικού κύκλου και το έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης (Wang & Chang 2016).

Ακόμη, είναι πλέον γνωστό ότι αρκετά lncRNAs έχουν την δυνατότητα να δρουν τα ίδια ως άμεσοι ρυθμιστές της μεταγραφής, αναλαμβάνοντας τον ρόλο μεταγραφικών συμπαραγόντων με διεγερτική ή κατασταλτική δράση. Σε αυτή τη κατηγορία εμπίπτει και ένας μεγάλος αριθμός lncRNAs που ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα σε περιοχές ενισχυτών. Το επαγόμενο από την πρωτεΐνη p53 lncRNA *LED* ενεργοποιεί τους ελεγχόμενους από την p53 ενισχυτές, με σκοπό τη μεταγραφή των eRNAs. Τα eRNAs είναι ικανά να σχηματίζουν βρόγχους DNA ώστε να φέρουν σε εγγύτητα περιοχές ενισχυτών με τους κοντινούς υποκινητές, διευκολύνοντας έτσι την ενίσχυση της μεταγραφής (Hombach & Kretz 2016).

Τέλος, έχει βρεθεί ότι τα lncRNAs μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα και με το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης II, αναστέλλοντας τη μεταγραφή. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η μεσολαβούμενη από lncRNA μεταγραφική καταστολή του γονιδίου διϋδροφολική αναγωγή (DHFR) στα ανθρώπινα αδρανή κύτταρα. Το γονίδιο DHFR ελέγχεται από δύο εναλλακτικούς υποκινητές: τον καθοδικό ισχυρό υποκινητή, ο οποίος είναι υπεύθυνος για το 99% της μεταγραφής, και τον ανοδικό ασθενή υποκινητή που μεταγράφει το υπεύθυνο lncRNA. Το τελευταίο, αφού παραχθεί, αναστέλλει τον σχηματισμό του προ-εναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής (PIC) πάνω στον ισχυρό υποκινητή του γονιδίου DHFR, οδηγώντας στην μεταγραφική αποσιώπησή του (Schnell *et al.* 2004). Οι μηχανισμοί με τους οποίους έχει προταθεί ότι συμβαίνει αυτό, περιλαμβάνουν την άμεση πρόσδεση του lncRNA στον βασικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIIB, αποτρέποντας την συμμετοχή του στο προεναρκτήριο σύμπλοκο, καθώς και την αλληλεπίδραση του lncRNA με την περιοχή του υποκινητή, οδηγώντας στην αποσύνθεση του προεναρκτήριου συμπλόκου (Martianov *et al.* 2007).

- iii. **Μετα-μεταγραφικό επίπεδο:** Ο μεσολαβούμενος από lncRNA έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης δεν περιορίζεται στη μεταγραφή, αλλά επεκτείνεται και στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο, γεγονός που οφείλεται εν μέρει στην ικανότητα των lncRNA να εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Ειδικότερα, έχουν ταυτοποιηθεί lncRNAs με δράσεις μετα-μεταγραφικής ρύθμισης των mRNAs, στο επίπεδο της επεξεργασίας και της σταθερότητάς τους, καθώς και της πρόσβασης από miRNAs.

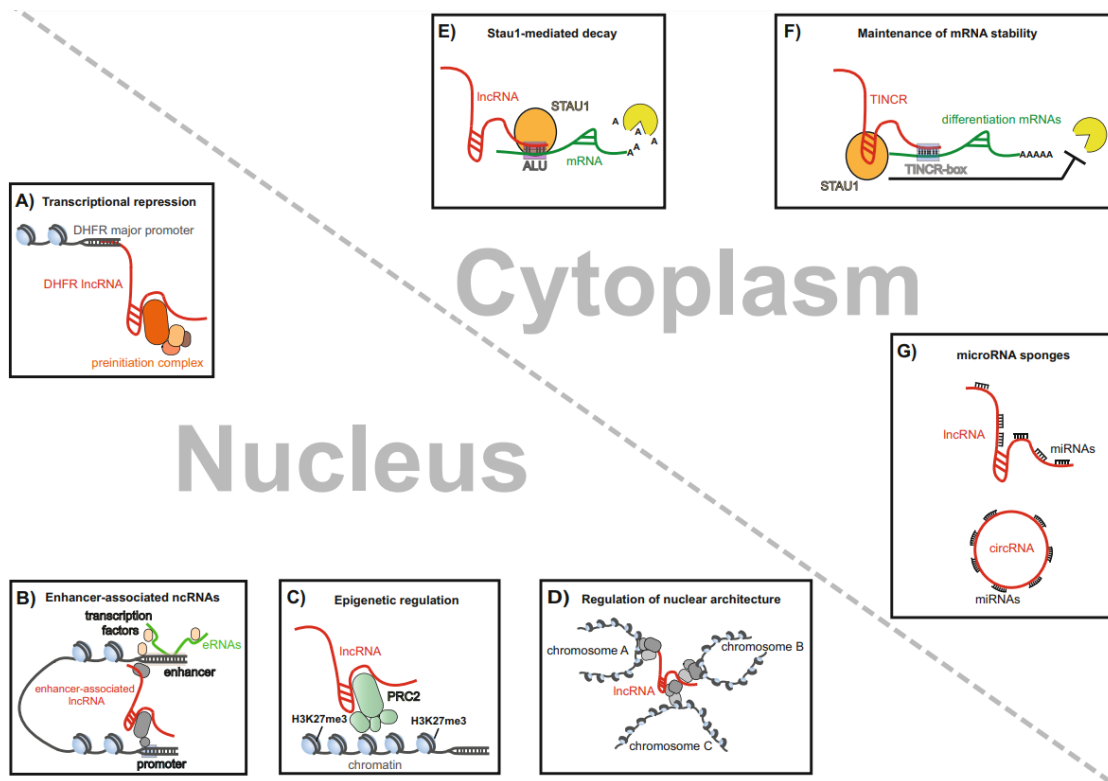
Όσον αφορά στην μετα-μεταγραφική επεξεργασία των mRNA, πολλές είναι οι περιπτώσεις lncRNA ικανών να αλληλεπιδράσουν με παράγοντες ματίσματος (splicing factors), επηρεάζοντας έτσι τη διαδικασία της εναλλακτικής συρραφής. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το lncRNA *MALAT1* (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), το

οποίο έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου και επηρεάζει την συρραφή πολλών mRNA, λειτουργώντας ως δόλωμα για διάφορους παράγοντες συρραφής (Bernard *et al.* 2010). Μέσω αυτού του μηχανισμού, μεταφέρει τους παράγοντες συρραφής σε ένα διαμέρισμα το οποίο καλείται nuclear speckles, όπου αποθηκεύονται και υπόκεινται σε φωσφορυλίωση, αποτρέποντάς τους να συμμετέχουν στον σχηματισμό της μηχανής της συρραφής (spliceosome).

Άλλη μια απρόβλεπτη λειτουργία των lncRNA ανακαλύφθηκε με τη ταυτοποίηση των μεταγράφων που αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα STAU1 (dsRNA-binding protein Staufen-1), με σκοπό την αποικοδόμηση mRNA, μέσω μιας διαδικασίας που λέγεται μεσολαβούμενη από Staufen-1 αποδόμηση των mRNA (Schoenberg D. & Maquat L. 2012). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη στόχευση από τον STAU1 είναι η ύπαρξη δίκλωνων περιοχών στην δευτεροταγή δομή του mRNA-στόχου, όπου λειτουργούν ως θέσεις πρόσδεσης για τον STAU1. Σε μερικές περιπτώσεις, τέτοιες θέσεις δημιουργούνται από lncRNAs που περιέχουν επαναλήψεις στοιχείων ALU. Ατελές ζευγάρισμα βάσεων μεταξύ των στοιχείων ALU και περιοχών του mRNA-στόχου, οδηγεί σε αποικοδόμηση του μεταγράφου από τον STAU1.

Η αλληλεπίδραση STAU1 και lncRNA δεν αφορά μόνο στην αποικοδόμηση των mRNA, αλλά και στην διατήρηση της σταθερότητάς τους. Αυτό συμβαίνει στη περίπτωση του lncRNA *TINCR* που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα υψηλά διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων της ανθρώπινης επιδερμίδας και είναι απαραίτητο για την επαγωγή βασικών γονιδίων κυτταρικής διαφοροποίησης (Hombach & Kretz 2013). Το *TINCR* αλληλεπιδρά με τον παράγοντα STAU1, καθώς και με μια σειρά mRNAs, με τα οποία μοιράζονται επαναλήψεις ενός κοινού μοτίβου 25 νουκλεοτιδίων, το *TINCR* box, μέσω του οποίου υβριδοποιούνται. Όπως και στην περίπτωση της μεσολαβούμενης από STAU1 αποδόμησης, το *TINCR* δρα ως μόριο οδηγός των mRNA και μαζί με τον παράγοντα STAU1 προκαλούν την αύξηση της σταθερότητάς τους. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό, παραμένει αδιευκρίνιστος.

Τέλος, ένας ιδιαίτερα σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που ασκούν τα lncRNA σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, αποτελεί η αλληλεπίδραση τους με τα μετάγραφα miRNA. Δρώντας ως «μοριακά σφουγγάρια», υβριδοποιούνται με τα miRNA μέσω συμπληρωματικών αλληλουχιών στην 3'UTR περιοχή και ρυθμίζουν την αφθονία και δράση τους. Για τον λόγο αυτόν, τα lncRNA αυτή της κατηγορίας αναφέρονται συχνά ως ενδογενώς ανταγωνιστικά RNAs (ceRNAs) και παρεμβαίνουν στη διαδικασία αποικοδόμησης των mRNA μεσολαβούμενης από miRNA, απομακρύνοντάς τα από τους στόχους τους (Kung *et al.* 2013). Στην ομάδα αυτή εντάσσονται μέλη και μιας πρόσφατα ανακαλυφθείσας τάξης κυκλικών RNA, τα circRNAs, μετάγραφα με τη μορφή κλειστής συνεχόμενης λούπας που προκύπτουν από μονοπάτι εναλλακτικής συρραφής και έχει βρεθεί ότι λειτουργούν ως «σφουγγάρια» των miRNAs (Hombach & Kretz 2013).



Εικόνα 5. Διάφοροι μηχανισμοί δράσης των lncRNAs. Τα πυρηνικά lncRNAs μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή αποτρέποντας τον σχηματισμό του προ-εναρκτήριου συμπλόκου (A), δρώντας ως ενισχυτές (eRNAs) (B), στρατολογώντας σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματινής (C) ή επηρεάζοντας τη χωρική διαμόρφωση των χρωμοσωμάτων (D). Τα κυτταροπλασματικά lncRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των mRNAs μέσω ελέγχου της μετάφρασης (E), της σταθερότητας των μεταγράφων (F), ή της πρόσδεσης με τα microRNAs (G). (Hombach & Kretz 2016).

1.1.5. Γονιδιωματική και Λειτουργική Συντήρηση των lncRNA

Η χαμηλή συντήρηση των lncRNA μεταγράφων σε επίπεδο αλληλουχίας καθιστά εξαιρετικά απαιτητική την ταυτοποίηση ορθόλογων γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών, και ειδικότερα, των εξελικτικά απομακρυσμένων. Στον αντίποδα, η απρόσμενη ομοιότητα των τρόπων δράσης των lncRNA υποστηρίζει την ιδέα της συντήρησης σε λειτουργικό επίπεδο και ενισχύει τη προσπάθεια χαρακτηρισμού των lncRNA μέσω συγκριτικής ανάλυσης.

Σε αντίθεση με τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και δέχονται μεγάλη εξελικτική πίεση για τη διατήρηση των αναγνωστικών τους πλαισίων, τα lncRNAs δεν φαίνεται να εξαρτώνται από την αλληλουχία τους για την άσκηση της λειτουργία τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία εξέλιξη και τον εκφυλισμό της αλληλουχίας τους. Εξαιτίας λοιπόν, της αδυναμίας εύρεσης ομολογίας σε επίπεδο DNA, γεννάται η ανάγκη εναλλακτικών προσεγγίσεων για τη ταυτοποίηση ορθόλογων lncRNA σε διαφορετικούς οργανισμούς.

Μία από αυτές είναι η αξιοποίηση της συνταινίας, της τοπολογικής συντήρησης των γειτονικών γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών. Η συνταινική συντήρηση της περιοχής που περικλείει τη γονιδιωματική περιοχή του lncRNA αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη της ορθολογίας του. Ωστόσο, το ποσοστό σφάλματος αυξάνεται σημαντικά σε απομακρυσμένα εξελικτικά είδη, καθώς η ανάλυση της συνταινίας βασίζεται στην παρουσία ορθόλογων γονιδίων, ενώ σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να αποτελέσει μοναδικό κριτήριο της ορθολογίας (Camillieri-Robles *et al.* 2022) Παρ' όλα αυτά, ο απροσδόκητα υψηλός αριθμός συνταινικών lncRNA που βρέθηκε σε μύγες *Drosophila* και ποντικούς αυξάνει τη πιθανότητα πολλά από αυτά να είναι όντως ορθόλογα, ανοίγοντας τον δρόμο για περαιτέρω μελέτες (Young *et al.* 2012).

Αν και σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής δεν παρατηρείται κάποια συντήρηση κατά μήκος ολόκληρης της αλληλουχίας, τα lncRNAs περιλαμβάνουν συχνά μικρότερες περιοχές ομολογίας μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Πιο συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι πρόκειται για λειτουργικά στοιχεία απαραίτητα για την δράση τους, όπως μοτίβα πρόσδεσης πρωτεϊνών ή miRNA. Επιπλέον, σε συνδυασμό με την παρουσία των ομόλογων λειτουργικών στοιχείων, οι αξιοσημείωτα συντηρημένες δευτεροταγείς δομές των lncRNA πιστεύεται ότι καθορίζουν και τη συντήρηση των μεταγράφων σε λειτουργικό επίπεδο. Ωστόσο, τα διαθέσιμα εργαλεία πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής δεν είναι ακόμα ικανά να προσδιορίσουν με ακρίβεια την αναδίπλωση των περισσότερων lncRNA στον χώρο (Graf & Kretz 2020).

1.1.6. Ρόλοι των lncRNA στην αναπαραγωγή των εντόμων

Η μεταγραφομική ανάλυση είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την παρακολούθηση του πληθυσμού των RNA στα κύτταρα και παρέχει μία ολοκληρωμένη εικόνα όλων των μεταγράφων σε μία δεδομένη χρονική στιγμή, κύτταρο ή ιστό. Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερες μελέτες μεταγραφομικής αποδεικνύουν τη συστηματικά υψηλή έκφραση lncRNA γονιδίων στα αναπαραγωγικά όργανα ζωικών και φυτικών οργανισμών, με υψηλή εξειδίκευση σε επίπεδο κυττάρου και ιστού.

Η εγγενής αναπαραγωγή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει υψηλού ρυθμού κυτταρικές διαιρέσεις και κυτταρική εξειδίκευση. Τα αναπτυξιακά πρότυπα που καθορίζουν το πεπρωμένο των κυττάρων απαιτούν υψηλή οργάνωση της γονιδιακής έκφρασης ως απόκριση σε ενδογενή ή εξωγενή σήματα. Πολλοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την πρόσβαση στο DNA, την παραγωγή και την επεξεργασία του RNA, καθώς και τη σύνθεση και τροποποίηση των πρωτεϊνών, συγκλίνουν σε τούτη τη διαφορική έκφραση. Οι ρόλοι των lncRNA ως άριστοι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και οργάνωσης της χρωματίνης, τα καθιστούν ιδανικούς παράγοντες για τον συντονισμό μοριακών διεργασιών που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική βιολογία των οργανισμών.

Ορισμένες από τις καλύτερα μελετημένες περιπτώσεις εμπλοκής των lncRNA στην αναπαραγωγή αφορούν στα lncRNA διάφορων ειδών των εντόμων. Όπως και στην περίπτωση άλλων ειδικών για τα έντομα μονοπατιών, παραδείγματος χάριν ο καθορισμός φύλου, το έντομο μοντέλο *Drosophila melanogaster* άνοιξε τον δρόμο για την μελέτη των lncRNAs και των ρόλων που αυτά επιτελούν στα έντομα. Το 2014, το ερευνητικό σχέδιο modENCODE ταυτοποίησε χιλιάδες lncRNAs, μέσω εξονυχιστικής εξέτασης του μεταγραφώματος των φρουτόμυγων, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα μη κωδικά μετάγραφα αποτελούν ουσιαστικά συστατικά στην ρύθμιση της αναπαραγωγής (Brown *et al.* 2014). Λίγα χρόνια μετά, μελέτες αποσιώπησης γονιδίων επιβεβαίωσαν τον ρόλο των lncRNA στη σπερματογένεση και στην γονιμότητα των αρσενικών μυγών (Maeda *et al.* 2018), ενώ ταυτοποιήθηκαν αρκετά ειδικά για τους όρχεις lncRNA απαραίτητα για τη συμπύκνωση της χρωματίνης και τον διαχωρισμό των σπερματίδων κατά την ανάπτυξη των γονάδων (Vedelek *et al.* 2018). Επιπλέον, η ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης RNA seq 27 δειγμάτων της *D. melanogaster* έδειξε ότι πολυάριθμα lncRNAs είναι ιδιαίτερα αυξορρυθμιζόμενα στο όψιμο εμβρυικό στάδιο και στο στάδιο της λάρβας, υποδεικνύοντας ότι τα lncRNAs μπορεί να εμπλέκονται στη διαδικασία της μεταμόρφωσης (Chen *et al.* 2016).

Ένα άλλο έντομο μοντέλο που έριξε φως στη σχέση των lncRNA με την αναπαραγωγή είναι ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori*. Το lncRNA *Bmds-AS1is* βρέθηκε ότι υπερεκφράζεται στα αναπαραγωγικά όργανα του αρσενικού *B. mori*, ρυθμίζοντας την εναλλακτική συρραφή του πρόδρομου mRNA *doublesex* (*Bmdsx*) που εμπλέκεται στον φυλο-καθορισμό (Zheng *et al.*

2019). Το υψηλά συντηρημένο γονίδιο *doublesex*, στη πλειοψηφία των εντόμων που έχει μελετηθεί έως σήμερα, είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μεταγράφων για φυλο-ειδικές πρωτεΐνες, οι οποίες τελικά καθορίζουν τον φυλετικό διμορφισμό στα έντομα.

Η δράση και εξειδίκευση των lncRNA στην αναπαραγωγή έχει καταγραφεί και σε έντομα μη-μοντέλα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα εξειδικευμένα για τις ωοθήκες ιντρονικά lncRNA *Incov1* και *Incov2* στις μέλισσες *Apis mellifera*. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση του *Incov1* στις ωοθήκες των εργατριών μελισσών είναι υπεύθυνη για την υπανάπτυξή τους, ενώ η υπερέκφραση του *Incov2* στις ωοθήκες των βασιλισσών μελισσών για την διατήρηση των αναπτυσσόμενων γονάδων (Humann *et al.* 2013; Choudhary *et al.* 2021). Άλλα lncRNAs εντόμων αυτής της κατηγορίας είναι αυτά που έχουν συσχετιστεί με την αναπαραγωγική ικανότητα του παρασίτου *Nilaparvata lugens* (Xiao *et al.* 2015).

Πλέον, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς την μελέτη των lncRNA παρουσιάζουν πολυάριθμα είδη κουνουπιών, εξαιτίας του υψηλού βαθμού διάχυτης μεταγραφής (pervasive transcription) των μη κωδικών RNA που παρατηρείται σε αυτούς τους οργανισμούς. Η διάχυτη μεταγραφή αναφέρεται στην παραγωγή μεταγράφων από τις περισσότερες περιοχές του γονιδιώματος, συμπεριλαμβανομένων αυτών που αποτυγχάνουν στην μεταγραφή λειτουργικών μη κωδικών RNA (Jensen *et al.* 2013).

Ειδικότερα, μια πρόσφατη συλλογή δεδομένων από την ανάλυση του αναπτυξιακού μεταγραφώματος του *Aedes aegypti* οδήγησε στην ταυτοποίηση 4.689 καινούριων lncRNA, εκ των οποίων μια πολυμελής υποομάδα εμφανίζει στοιχεία μητρικής κληρονομησης και πρώιμης εμβρυϊκής έκφρασης (Azlan *et al.* 2019). Υψηλή μεταγραφή γονιδίων lncRNA βρέθηκε επίσης, στις ωοθήκες κουνουπιών μετά από γεύμα αίματος, η οποία διαρκεί μέχρι και τις 12 ώρες εμβρυϊκής ανάπτυξης. Αυτό το στενό παράθυρο έκφρασης συσχετίστηκε με τη μετάβαση από τη μητρική στη ζυγωτική φάση της εμβρυϊκής ανάπτυξης, κατά την οποία η ανάπτυξη εμπίπτει στον αποκλειστικό έλεγχο του ζυγωτικού γονιδιώματος και όχι του μητρικού (Akbari *et al.* 2013). Δεδομένου ότι κατά τη πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη δεν έχει ενεργοποιηθεί ακόμα η μεταγραφή του ζυγωτικού γονιδιώματος, γεννάται η υπόθεση ότι τα εκφραζόμενα lncRNAs έχουν μητρική προέλευση. Γι' αυτό, σε αυτά τα lncRNA έχει αποδοθεί η ρύθμιση βασικών βιοσυνθετικών μονοπατιών, ο καθορισμός του κυτταρικού πεπρωμένου και η εγκαθίδρυση αναπτυξιακών μοτίβων, ενώ στα lncRNA του όψιμου εμβρυϊκού σταδίου και των σταδίων της λάρβας και της πούπας έχει αποδοθεί ως πιθανός ρόλος η ρύθμιση της οργανογένεσης.

Επιπλέον, δεδομένα που υποστηρίζουν τη στενή σχέση των lncRNA με την φυλετική αναπαραγωγή των κουνουπιών προέρχονται από μεταγραφωμικές μελέτες και σε άλλα είδη, όπως το είδος *Culex quinquefasciatus* και *Aedes albopictus*. Όσον αφορά στο είδος *C. quinquefasciatus*, η υψηλή έκφραση lncRNA που παρατηρήθηκε κατά τη προγευματική κατάσταση στα ενήλικα θηλυκά κουνούπια υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανών ρόλων των lncRNA στην απόκτηση και επεξεργασία του γεύματος αίματος (Azlan *et al.* 2021). Η φυσιολογική αυτή διεργασία είναι πρωτίστης σημασίας για την αναπαραγωγή και την ωρίμανση των αυγών των κουνουπιών, όχι μόνο του είδους *C. quinquefasciatus*, αλλά γενικότερα, όλων των ενήλικων θηλυκών κουνουπιών.

Τα πρώτα πειράματα αλληλούχησης του RNA (RNA seq) στο κουνούπι *Aedes albopictus* αποσκοπούσαν στον εντοπισμό διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ μολυσμένων και μη κουνουπιών με τους ιούς dengue και chikungunya (Tsujiimoto *et al.* 2017). Ωστόσο, πολύ σύντομα, η πιθανή συσχέτιση κωδικών και μη κωδικών μεταγράφων με την αναπαραγωγική βιολογία του *Ae. albopictus* ξεκίνησε να κεντρίζει το ενδιαφέρον μεγάλου μέρους της ερευνητικής κοινότητας. Το 2019 οι Xu *et al.* έφεραν στο φως το σύνολο των διαφορικά

εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κουνουπιών, μελέτη που οδήγησε στην ταυτοποίηση 2.632 νέων lncRNAs, εκ των οποίων ένα μικρό ποσοστό φάνηκε να εκφράζεται με φυλο-ειδικά μοτίβα έκφρασης (Xu *et al.* 2019). Η επακόλουθη λειτουργική ανάλυση, μέσω γονιδιακής σίγησης γονιδίων μη κωδικών μεταγράφων, οδήγησε σε μειωμένο ρυθμό εκκόλαψης των αυγών, αποδεικνύοντας τον ρόλο των lncRNA στην αναπαραγωγική ικανότητα του *Ae. albopictus*.

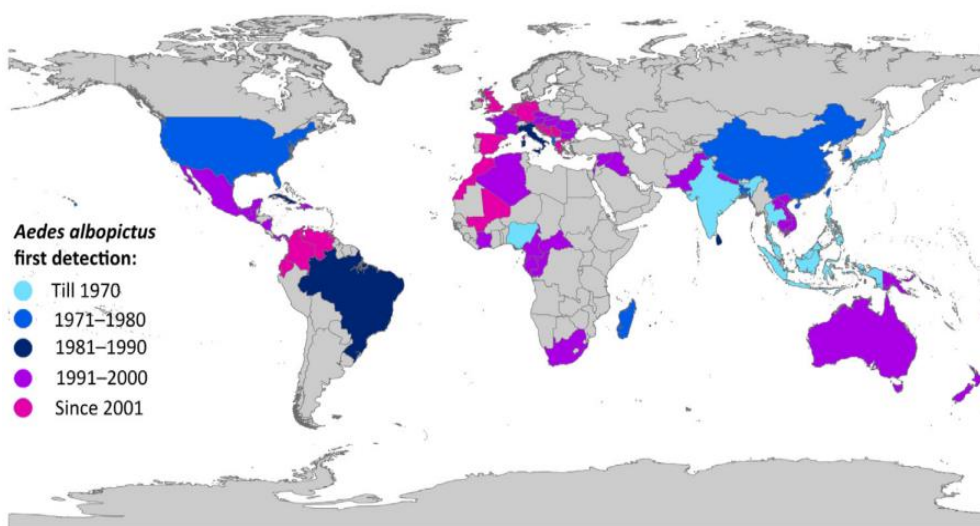
Μια πιο πρόσφατη έρευνα από τους Gamez *et al.* (2020) ανέλυσε και παρουσίασε το ολοκληρωμένο μεταγράφομα του *Ae. albopictus* με βάση τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του κύκλου ζωής του κουνουπιού. Η εξειδίκευση στη μεταγραφή γονιδίων δεν περιορίζεται μόνο στο φυλετικό επίπεδο, όπως ήταν ήδη γνωστό, αλλά επεκτείνεται σε μεγάλο βαθμό και στον άξονα του χρόνου. Ενώ η έκφραση πολλών γονιδίων εμφανίζεται καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής, τα επίπεδα έκφρασης μιας πολυάριθμης ομάδας γονιδίων διαφοροποιούνται στις διάφορες χρονικές στιγμές του. Από την λίστα των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων που προέκυψε, ιδιαίτερη σημασία είχαν τα γονίδια των οποίων η έκφραση αυξανόταν στις ωοθήκες των θηλυκών ατόμων μετά από γεύμα αίματος, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι διαδραματίζουν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθηκών και τελικά, την απόθεση των αυγών. Το σύνολο αυτών των γονιδίων συνίσταται κυρίως από γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, καθώς και από ένα πλήθος μη κωδικών γονιδίων και συγκεκριμένα lncRNA, ένα εκ των οποίων αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

1.2. *Aedes albopictus*

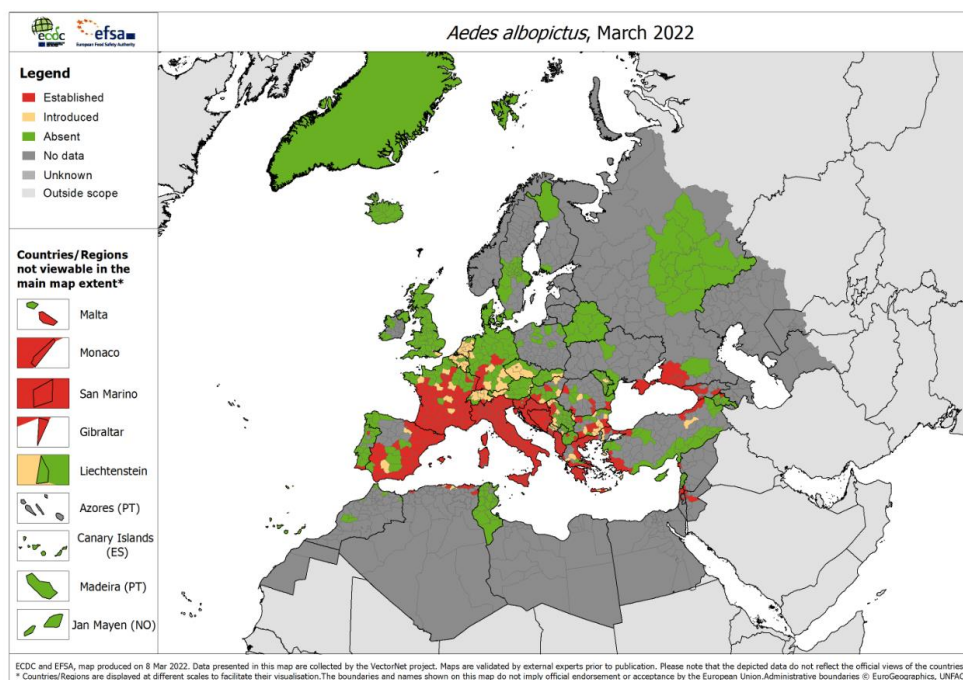
Το κουνούπι *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894), γνωστό και ως Ασιατικό κουνούπι τίγρης εξαιτίας της χαρακτηριστικής λευκής ρίγας στον θώρακα, την κοιλιά και τα πόδια, είναι ένα δίπτερο έντομο της οικογένειας Culicidae που μαζί με το συγγενές *Aedes aegypti* ανήκει στο γένος *Aedes*. Λόγω της ευρείας εξάπλωσής του και της ικανότητας μετάδοσης συγκεκριμένων επιδημικών ασθενειών, θεωρείται ως ένα από τα περισσότερο χωροκατακτητικά είδη κουνουπιών με μεγάλη υγειονομική σημασία. Πρόκειται για ένα ζωόφιλο είδος, με ιδιαίτερα υψηλή προτίμηση των θηλυκών κουνουπιών στο γεύμα ανθρώπινου αίματος που τα καθιστά παγκόσμια απειλή για την δημόσια υγεία (Benelli *et al.* 2020).

1.2.1. Προέλευση και Παγκόσμια Εξάπλωση

Το *Ae. albopictus* κατάγεται από τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας. Εντούτοις, τις τελευταίες δύο δεκαετίες, το είδος αυτό έχει εισβάλει σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο, μέσω της μεταφοράς εμπορευμάτων και των αυξανόμενων διεθνών ταξιδιών. Οι πρώτες καταγραφές του *Ae. albopictus* στην Ευρώπη ήταν το 1979 στην Αλβανία και το 1990 στην Ιταλία. Μέχρι σήμερα, το είδος έχει εγκατασταθεί σε περισσότερες από 20 Ευρωπαϊκές χώρες, ενώ το βεληνεκές του εξακολουθεί να διευρύνεται (Oliviera *et al.* 2021). Στη Ελλάδα το Ασιατικό κουνούπι τίγρης εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Κέρκυρα και την Ηγουμενίτσα μετά από δειγματοληψίες κουνουπιών που διεξήχθησαν σε περιοχές των νομών Κερκύρας και Θεσπρωτίας τα έτη 2003 και 2004. Έκτοτε, έχει εντοπιστεί σε περιοχές της Αττικής, της Πελοποννήσου, αλλά και σε περιοχές της Θεσσαλίας, της Στερεάς Ελλάδας, της Ηπείρου, της Κρήτης, μέχρι την Κεντρική Μακεδονία και Θράκη (Badieritakis *et al.* 2017). Η ευρεία εξάπλωση του *Ae. albopictus* οφείλεται στον συνδυασμό της ανθεκτικότητας των αυγών του σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και ξηρασίας, και της ικανότητας αναπαραγωγής και απόθεσης των αυγών σε ενδιαίτημα ποικίλων μικροκλιματικών συνθηκών (Cui *et al.* 2021).



Εικόνα 6. Παγκόσμια κατανομή του *Ae. albopictus* (Benelli et al. 2020).



Εικόνα 7. Κατανομή του *Aedes albopictus* κατά την καταγραφή το Μάρτιο του 2022 στην Ευρώπη. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Mosquito maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2022.

1.2.2. Ρόλος ως φορέας ασθενειών

Το *Ae. albopictus* θεωρείται ένα κλασικό ομορτοουνιστικό είδος κουνουπιού που τείνει να τρέφεται σε εξωτερικό χώρο κατά τις πολύ πρωινές και απογευματινές ώρες. Εκτός από ανθρώπους, τσιμπάει με ευκολία διαφόρων ειδών θηλαστικά, ενώ έχει βρεθεί ότι συχνά τρέφεται και με αίμα πτηνών, ερπετών και αμφιβίων (Fikrig & Harrington 2021; Pereira-Dos-Santos et al. 2020). Η χαμηλή εξειδίκευση ως προς τη προέλευση του γεύματος αίματος, καθώς και η ομορτοουνιστική διατροφική συμπεριφορά του κουνουπιού, αυξάνουν τη πιθανότητα επαφής μεταξύ του φορέα και διαφορετικών ζωικών οργανισμών, και επομένως, την μεταφορά παθογόνων μεταξύ των ειδών. Ειδικότερα, εμφανίζει μεγάλη προτίμηση στο ανθρώπινο αίμα, μία συμπεριφορά που το καθιστά άμεσο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

Οι αρμποϊοί (arboviruses = arthropod-borne viruses), δηλαδή οι ιοί που μεταδίδονται μέσω των αιματοφάγων αρthropopόδων, συγκαταλέγονται μεταξύ των σημαντικότερων αναδυόμενων μολυσματικών ασθενειών παγκοσμίως. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι το κουνούπι *Ae. albopictus* αποτελεί ικανό φορέα 24 ειδών αρμποϊών, αλλά και διαφόρων νηματωδών παρασίτων του γένους *Dirofilaria*. Παρά την ύπαρξη 7 από αυτών των ιών στην Ευρώπη, η πρώτη καταγραφή μόλυνσης από αρμποϊό μεταδιδόμενη από το *Ae. albopictus* έγινε τον Αύγουστο του 2007 στην Ιταλία, με την έξαρση του ιού Chikungunya (CHIKV) (Scholte & Schaffner 2007). Άλλοι σημαντικοί ιοί τους οποίους μπορεί να μεταδώσει το κουνούπι τίγρης είναι ο ιός του Δάγκειου πυρετού (DENV), του κίτρινου πυρετού (YFV), και του ιού Ζίκα. Ο ιός του Δάγκειου πυρετού είναι ο πιο διαδεδομένος αρμποϊός διεθνώς, με 390 εκατομμύρια ετήσια κρούσματα. Ωστόσο η διασπορά του αποδίδεται κυρίως στο κουνούπι *Ae. aegypti* και λιγότερο στο *Ae. albopictus*. Από την άλλη, ενώ ο ιός του κίτρινου πυρετού και ο ιός Ζίκα που μεταδίδονται κυρίως από το *Ae. albopictus* έχουν λιγότερα ετήσια κρούσματα από τον Δάγκειο πυρετό, και οι δύο ευθύνονται για ολέθριες εξάρσεις επιδημίας σε ενδημικές περιοχές, θέτοντας σε κίνδυνο δισεκατομμύρια ανθρώπων (Parry *et al.* 2021). Επιπλέον, το κουνούπι τίγρης έχει συσχετιστεί με τη μετάδοση και άλλων μολυσματικών ιών, μεταξύ των οποίων βρίσκονται 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) (Pereira-Dos-Santos *et al.* 2020).

Η περίπτωση του *Ae. albopictus* αποτελεί ένα σαφές παράδειγμα οργανισμού με πολύ επιτυχημένη εξάπλωση και μεγάλη επιδημιολογική σημασία που υπογραμμίζει την ανάγκη του πληθυσμιακού ελέγχου του κουνουπιού, με σκοπό τη μείωση των ποσοστών εμφάνισης νέων κρουσμάτων και επιδημιών.

1.2.3. Βιολογικός Κύκλος

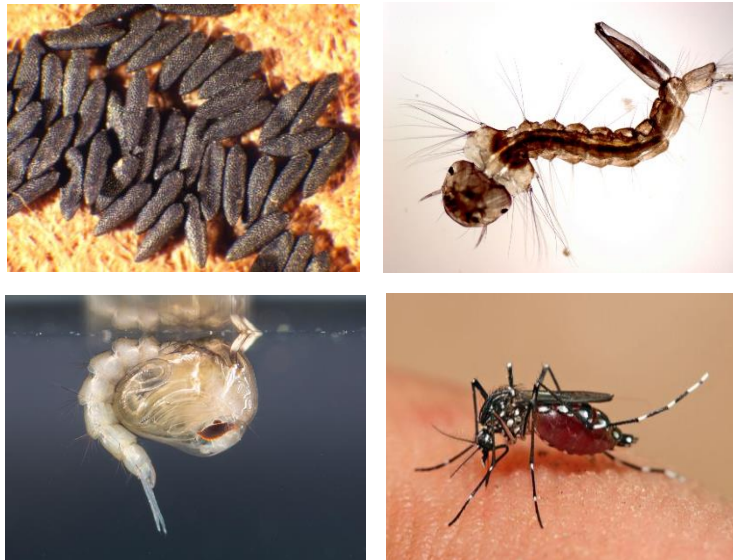
Τα κουνούπια του γένους *Aedes* έχουν έναν σύνθετο κύκλο ζωής με τέσσερα διακριτά αναπτυξιακά στάδια που χαρακτηρίζονται από δραματικές αλλαγές στη μορφολογία, τη λειτουργία και το ενδιαίτημα του οργανισμού. Η συνεχής μεταμόρφωση την οποία υφίσταται το κουνούπι *Aedes* το εντάσσει στη κατηγορία των ολομετάβολων εντόμων (OECD 2018). Ο χρόνος ανάπτυξης του εξαρτάται άμεσα από τη παρουσία νερού και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, με τα ενήλικα κουνούπια να αναδύονται από τα αυγά μέσα σε μερικές μέρες έως και μερικές εβδομάδες (Rogers 2019).

- i. **Αυγό (egg):** Μετά την άντληση αίματος και το ζευγάρωμα με αρσενικά κουνούπια, τα ενήλικα θηλυκά κουνούπια αποθέτουν τα αυγά τους (50-120 σε κάθε ωοαπόθεση) σε τοιχώματα εστιών νερού ή σε αντικείμενα μερικώς βυθισμένα στο νερό, πάνω από την επιφάνεια του νερού (Nimmo; Ngoagouni *et al.* 2015). Οι προνύμφες αναπτύσσονται σε μικρές φυσικές ή τεχνητές συλλογές νερού όπως κοιλότητες δένδρων ή βράχων, μικρά δοχεία που συγκρατούν νερό, βαρέλια, παλιά ελαστικά αυτοκινήτων, ανθοδοχεία κ.α. Κάθε γόνιμο αυγό έχει μαύρο χρώμα και οβάλ κελύφος να το περικλείει, προσδίδοντάς του αντοχή στη ξηρασία για μήνες (Luz *et al.* 2008).



Εικόνα 8. Παραδείγματα σημείων ωσαπόθεσης του *Ae. albopictus* (Ngoagouni et al. 2015).

- ii. **Προνύμφη (larva):** Μετά από μερικές μέρες (συνήθως 3-4), γίνεται η εκκόλαψη και η έκδυση (hatching) του επόμενου σταδίου, αυτού της προνύμφης. Η προνύμφη ζει στο νερό, χρησιμοποιώντας το οξυγόνο της ατμόσφαιρας στην επιφάνεια, και τρέφεται με μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια, διάτομα και άλγη) και άλλα οργανικά σωματίδια (Zettel & Kaufman 2009). Το αναπτυξιακό αυτό στάδιο διακρίνεται σε τέσσερις περιόδους (L1-L4), κατά τις οποίες η προνύμφη ολοένα και αυξάνεται σε μέγεθος. Η συνολική χρονική διάρκεια του σταδίου προνύμφης εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών, με συνήθη χρόνο εξέλιξης τις 5-10 ημέρες (Nimmo; Lopez et al. 2019). Στο τέλος της ανάπτυξης της 4^{ης} περιόδου οι προνύμφες εκδύονται και περνούν στο νυμφικό στάδιο.
- iii. **Νύμφη (pupa):** Όπως και οι προνύμφες, έτσι και οι νύμφες είναι υδρόβιες, αλλά αρκετά πιο ελαφρές, ώστε να αναδύονται στην επιφάνεια, με σκοπό τη λήψη οξυγόνου μέσω των αναπνευστικών τους σωληναρίων. Η νύμφη σταματά να τρέφεται, ενώ παραμένει σε αυτό το στάδιο για λίγες μέρες (συνήθως τρεις), κατά το οποίο ολοκληρώνονται οι διαδικασίες μεταμόρφωσης για τη μετατροπή της σε ενήλικο κουνούπι (Nimmo).
- iv. **Ενήλικο κουνούπι (adult):** Με το άνοιγμα της θωρακικής κοιλότητας της νύμφης, ξεπροβάλλει σταδιακά το ενήλικο άτομο, το οποίο αρχικά στέκεται στην επιφάνεια του νερού. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, το προσδόκιμο ζωής, καθώς και οι τροφικές απαιτήσεις των ενηλίκων κουνουπιών διαφέρουν ανάλογα με το φύλο. Τα θηλυκά κουνούπια είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος με πιο κοντές και αραιές κεραίες και μπορούν να ζήσουν έως και δύο μήνες, σε αντίθεση με τα αρσενικά που ζουν μερικές μέρες. Επιπλέον, τα στοματικά μόρια του αρσενικού είναι ατελώς ανεπτυγμένα και κατάλληλα μόνο για πρόσληψη νέктar, ενώ αντίθετα, στα θηλυκά είναι κατάλληλα για τη τομή του δέρματος και την άντληση του αίματος (Zettel & Kaufman 2009). Η άντληση αίματος από τα θηλυκά κουνούπια συμβαίνει πριν ή μετά το ζευγάρωμα, με σκοπό την απόκτηση των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων για την ωρίμανση και την απόθεση των αυγών (Lopez et al. 2019).



Εικόνα 9. Τα αναπτυξιακά στάδια των κουνουπιών *Aedes*: Αυγό, Προνύμφη, Νύμφη, Ενήλικο κουνούπι.

1.3. Ανάπτυξη Ωοθηκών - Βιτελλογένεση

Τα περισσότερα κουνούπια, συμπεριλαμβανομένου και του *Ae. albopictus*, παράγουν και αποθέτουν τα αυγά τους μόνο μετά από άντληση αίματος. Η παραγωγή των αυγών από τα θηλυκά κουνούπια διακρίνεται στην ωογένεση, κατά την οποία παράγονται τα ανώριμα ωοκύτταρα στις ωοθήκες πριν το γεύμα αίματος και τη βιτελλογένεση, κατά την οποία συμβαίνει η μαζική σύνθεση και έκκριση των πρόδρομων πρωτεϊνών της λεκίθου (yolk protein precursors, YPP) από το λιπώδες σώμα (fat body) στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα (Attardo *et al.* 2005). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η ωρίμαση των ωοθηκών, η οποία ακολουθείται από την ωορρηξία, τη γονιμοποίηση, την ωοαπόθεση και τελικά, την εμβρυογένεση (Allman *et al.* 2020). Η κατανόηση της αναπαραγωγικής βιολογίας των κουνουπιών είναι ουσιαστική για την ανακάλυψη νέων μεθόδων περιορισμού της μετάδοσης ασθενειών, εξαιτίας της στενής σύνδεσής της με την ικανότητα των κουνουπιών να μεταφέρουν παθογόνα, μέσω της άντλησης αίματος.

1.3.1. Αυτογονία

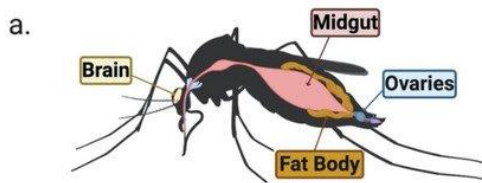
Τα διάφορα είδη κουνουπιών διακρίνονται ως προς την ανάγκη τους για λήψη αίματος, με σκοπό την έναρξη της ανάπτυξης των αυγών τους. Τα κουνούπια τα οποία είναι ικανά να ξεκινήσουν τον πρώτο γονοτροπικό τους κύκλο χωρίς γεύμα αίματος, χαρακτηρίζονται ως «αυτογενή». Τα κουνούπια αυτά χρησιμοποιούν ως πηγή θρεπτικών τα συστατικά που συσσωρεύονται κατά το στάδιο της προνύμφης και μεταβιβάζονται στο λιπώδες σώμα των ενήλικων ατόμων (Ahmed 2012). Αντίθετα, το *Ae. albopictus*, όπως και τα περισσότερα κουνούπια, καλείται «μη αυτογενές» (Attardo *et al.* 2005). Τα μη αυτογενή θηλυκά, έχοντας μικρότερη διαθεσιμότητα θρεπτικών, αναπληρώνουν το έλλειμμα μέσω επαναλαμβανόμενων λήψεων αίματος, που αποσκοπούν όχι μόνο στην αναπαραγωγή, αλλά στην κάλυψη των ενεργειακών τους δαπανών (Dittmer *et al.* 2019).

Η «αυτογονία» μπορεί να λειτουργεί ως υποχρεωτική ή επικουρική μέθοδος αναπαραγωγής, αναλόγως με το είδος του κουνουπιού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι, αρκετά κουνούπια, όπως τα *Aedes atropalpus*, αποθέτουν την πρώτη γενιά αυγών τους αυτογενώς, και στη συνέχεια αντλούν αίμα για τις επόμενες ωοαποθέσεις (Day *et al.* 2021).

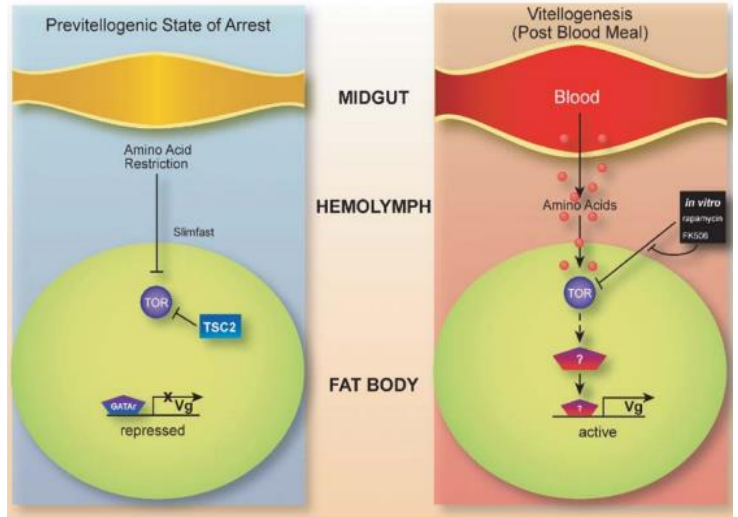
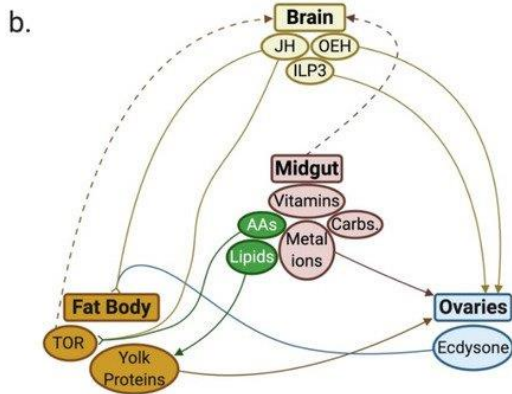
1.3.2. Μονοπάτι Βιτελλογένεσης

Η πέψη του αίματος από τα μη αυτογενή κουνούπια εκκινεί έναν καταρράκτη σηματοδοτικών γεγονότων μεταξύ των διαφορετικών ιστών των κουνουπιών, με αποτέλεσμα την έκκριση ορμονών, όπως η νεανική ορμόνη (Juvenile Hormone, JH), η στεροειδής ορμόνη εκδυσόνη (ecdysone) και τα ινσουλινόμορφα πεπτίδια (ILPs). Μία από τις σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες υπό τον έλεγχο αυτών των ορμονών είναι η βιτελλογένεση, η οποία διακρίνεται σε τρία στάδια (Attardo *et al.* 2005; Allman *et al.* 2020):

- i. **Προβιτελλογενής Περίοδος:** Αποτελεί την φάση προετοιμασίας του λιπώδους σώματος για τη μαζική σύνθεση των πρόδρομων πρωτεϊνών της λεκίθου (YPP). Το λιπώδες σώμα είναι ένας ιστός με ποικίλους ρόλους στο μεταβολισμό και την πρωτεϊνοσύνθεση των εντόμων και οι λειτουργικές αλλαγές του ρυθμίζονται ορμονικά (Dittmer *et al.* 2019). Οι μετατροπές που υφίσταται για να γίνει δεκτικό σε σήματα που επάγουν τη βιτελλογένεση θεωρείται ότι ελέγχονται αυστηρά από την νεανική ορμόνη III (JH), η οποία εκκρίνεται από τον εγκέφαλο και κορυφώνεται αμέσως μετά την απελευθέρωση του ενηλίκου, συντονίζοντας την ωρίμανση πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους σώματος (Gulia-Nuss *et al.* 2015). Αφού το λιπώδες σώμα γίνει δεκτικό, το κουνούπι εισέρχεται σε μια προσωρινή φάση ανάπαυσης, κατά την οποία η γονιδιακή έκφραση των YPP καταστέλλεται. Η άρση του σταδίου αυτού πραγματοποιείται με το γεύμα αίματος που επάγει τη συνθετική φάση της βιτελλογένεσης (Attardo *et al.* 2005; Raikhel *et al.* 2002).
- ii. **Συνθετική φάση Βιτελλογένεσης:** Η έναρξη της συνθετικής φάσης χαρακτηρίζεται από την απότομη μείωση των επιπέδων της JH, εξαιτίας της ανεσταλμένης παραγωγής της και της αυξημένης δραστηριότητας ενζύμων που την αποικοδομούν (Attardo *et al.* 2005). Παράλληλα, το γεύμα αίματος διεγείρει ειδικά νευροεκκριτικά κύτταρα του εγκεφάλου που εκκρίνουν ινσουλινόμορφα πεπτίδια (ILPs), καθώς και τη πεπτιδική εκδυσιοτροπική ορμόνη των ωοθηκών (ovarian ecdysiotropic hormone, OEH). Ακολουθώς, το ινσουλινόμορφο πεπτίδιο 3 (ILP3) και η OEH προσδέονται σε υποδοχείς της επιφάνειας των ωοθυλακικών κυττάρων, διεγείροντας με τη σειρά τους την έκκριση της στεροειδούς εκδυσόνης. Μετά τη υδροξυλίωσή της σε 20E, δρα συνεργιστικά με την αυξημένη συγκέντρωση αμινοξέων από τον μεταβολισμό του αίματος στο λιπώδες σώμα, ρυθμίζοντας την παραγωγή των YPP, όπως η βιτελλογενίνη (Vg) και η λιποφορίνη (Lp), που συσσωρεύονται στις ωοθήκες μέσω της αιμολέμφου (Allman *et al.* 2020; Valzania *et al.* 2019).
- iii. **Φάση τερματισμού:** Αποτελεί τη λήξη του γοναδοτροφικού κύκλου, κατά την οποία η αναστολή στη σύνθεση των YPP συνδέεται με την πτώση στη συγκέντρωση της 20E. Στις 36 ώρες περίπου μετά το γεύμα αίματος, το λιπώδες σώμα επιστρέφει στην αρχική κατάσταση αποθήκευσης θρεπτικών και μεταβολισμού, ωστόσο ένας νέος κύκλος βιτελλογένεσης αρχίζει (Attardo *et al.* 2005).



Εικόνα 10. Α. Τα όργανα του κουνουπιού που εμπλέκονται στη πέψη του γέυματος αίματος και τη παραγωγή των αυγών. Β. Τα επαγόμενα από το γέυμα αίματος διατροφικά και ορμονικά σήματα. JH: juvenile hormone, OEH: ovary ecdysteroidogenic hormone, ILP3: insulin-like peptide 3, TOR: target of rapamycin, AAs: amino acids, Carbs.: carbohydrates (Allman et al. 2020)

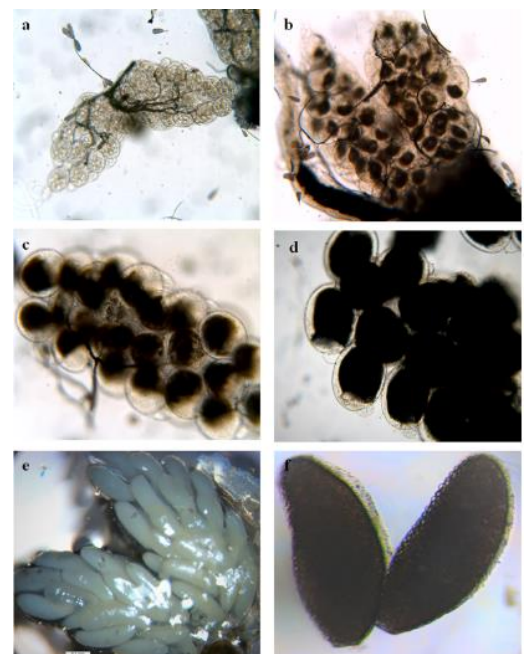


Εικόνα 11. Προτεινόμενο μοντέλο γονιδιακής ενεργοποίησης της βιτελλογενίνης (Vg) από το λιπώδες σώμα μετά το γέυμα αίματος. Κατά τη φάση ανάπαυσης, η έλλειψη επαρκών αμινοξέων περιορίζει την ενεργοποίηση της κινάσης TOR, επιτρέποντας στον μεταγραφικό παράγοντα GATA να καταστείλει την γονιδιακή έκφραση (Attardo et al 2005).

1.3.3. Ωρίμανση Ωοθηκών

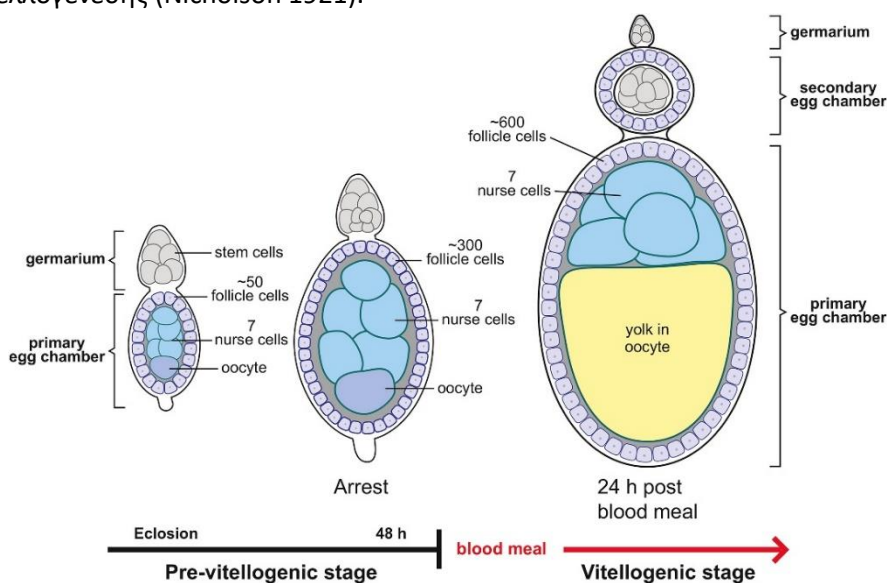
Το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών ενήλικων κουνουπιών συνίσταται από δυο συμμετρικά διαταγμένες ωοθήκες, τοποθετημένες παράλληλα με τη περιοχή του πέμπτου και έκτου κοιλιακού τμήματος (Parks & Larsen 1965). Σε κάθε ωοθήκη υπάρχουν περίπου 75 ovarioles, το καθένα από τα οποία περιλαμβάνει ένα ωκύτταρο (oocyte) και επτά τροφικά κύτταρα (nurse cells), και γι'αυτό χαρακτηρίζονται ως πολυτροφικά και μεριστικού τύπου (Raikhel 1992). Το ωκύτταρο και τα τροφικά κύτταρα περιβάλλονται από μια στοιβάδα σωματικών ωοθυλακικών κυττάρων που αποτελούν το ωοθυλάκιο (follicle). Τα πρωτογενή ωοθυλάκια, καθώς και το germarium συνιστούν τον θάλαμο του αυγού (egg chamber)(Valzania et al. 2019).

Τις πρώτες δύο μέρες μετά την εκκόλαψη των ενηλίκων κάθε ovariole διπλασιάζεται σε μέγεθος ως απόκριση στη JH III. Έπειτα, η ανάπτυξη του ovariole αναστέλλεται, ωστόσο αντληθεί αίμα. Μετά το γέυμα αίματος, οι ωοθήκες αναπτύσσονται συγχρονισμένα καθ'όλη την διάρκεια ωρίμανσης των αυγών. Κατά τη συνθετική φάση της βιτελλογένεσης, κάθε ovariole ή πρωτογενής θάλαμος συσσωρεύει πρωτεΐνες της λεκίθου και αναπτύσσεται σε



Εικόνα 12. Μορφολογία των ωοθηκών κουνουπιών του γένους Aedes πριν και διάφορες χρονικές στιγμές μετά το γέυμα αίματος. α. NBF β. 18h PBF γ. 24h PBF δ. 48h PBF ε. 72h PBF ς. Ωριμο αυγό στις 72h PBF. (Yadav et al. 2019)

ώριμο αυγό, ενώ σχηματίζεται και ένας δευτερογενής θάλαμος αυγού έτοιμος για τον επόμενο κύκλο βιτελλογένεσης (Nicholson 1921).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση των ovarioles της ωοθήκης κατά τη προβιτελλογενή περίοδο και τη βιτελλογένεση. (Valzania et al. 2019)

1.4. Μέθοδοι πληθυσμιακού ελέγχου

Ο έλεγχος του πληθυσμού των κουνουπιών *Aedes* αποτελεί επιτακτική ανάγκη για την αντιμετώπιση της εξάπλωσης των μεταδιδόμενων λοιμογόνων παραγόντων. Παρά τη ραγδαία εξέλιξη στους τομείς της βιολογίας, της γενετικής και της οικολογίας των κουνουπιών, ο πληθυσμιακός τους έλεγχος παραμένει ακόμα ένα αδιευκρίνιστο πεδίο, λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών μεθόδων για την ολιστική διαχείριση του πληθυσμού.

Οι πρώτες προσπάθειες πληθυσμιακού ελέγχου σημειώθηκαν στις αρχές του 1990 στη Νότια Αμερική, με την συστηματική χρήση χημικών εντομοκτόνων σε δεξαμενές νερού για την απομάκρυνση των κουνουπιών *Ae. aegypti*. Ωστόσο, μέσα σε μια δεκαετία ο πληθυσμός των κουνουπιών επέστρεψε στα αρχικά του επίπεδα και πολύ σύντομα, τα κουνούπια ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στη δράση εντομοκτόνων, όπως το malathion (Zettel & Kaufman, 2009). Από τότε, έχουν εγκαθιδρυθεί πολυάριθμα προγράμματα εντομολογικής και επιδημιολογικής επιτήρησης που συνέβαλαν στον σχεδιασμό ενός φάσματος τεχνολογιών καταπολέμησης των κουνουπιών, βασιζόμενες σε χημικές, βιολογικές και γενετικές μεθόδους (Faraji & Unlu, 2016).

i. Χημικά Εντομοκτόνα

Η χρήση χημικών εντομοκτόνων έχει καθιερωθεί ως το πιο διαδεδομένο εργαλείο καταπολέμησης των κουνουπιών. Οι εντομοκτόνες ουσίες ασκούν τη βιοκτόνο δράση τους στο στάδιο της προνύμφης ή του ενήλικου κουνουπιού και η εφαρμογή τους γίνεται μέσω ψεκάσμου ή ειδικών δικτύων εμποτισμένων με αυτές. Τα περισσότερα εντομοκτόνα ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών, όπως τα fenthion και malathion που δρουν ως νευροτοξίνες. Άλλες σημαντικές κατηγορίες εντομοκτόνων είναι τα καρβαμιδικά, τα οργανοχλωριωμένα και τα πυρεθροειδή, τα οποία διακρίνονται για την υψηλή δραστηριότητά τους (Ndiath 2019). Εντούτοις, τα εντομοκτόνα αποτελούν μια βραχυπρόθεσμη και μη βιώσιμη λύση, λόγω της περιβαλλοντικής ρύπανσης που προκαλούν και της αυξανόμενης απευαισθητοποίησης των κουνουπιών σε αυτά. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετά είδη κουνουπιών τείνουν να αποφεύγουν την φυσική επαφή με τα εντομοκτόνα, ενώ ορισμένοι πληθυσμοί

αναπτύσσουν ανθεκτικότητα μέσω μεταβολικής αποτοξικοποίησης, μετά από την επί σειρά γενεών έκθεση σε μια εντομοκτόνο ουσία (Jones *et al.* 2021). Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται στο αυξημένο ποσοστό επιβίωσης των ανθεκτικών κουνουπιών έναντι των ευπαθών και επομένως, στη μεταβίβαση των πολυμορφισμών που ευνοούν την αυξημένη ανοχή στους απογόνους (Liu 2015). Επιπλέον, πολλές εντομοκτόνες ουσίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή εκλεκτικότητα και ευρύ φάσμα εντομοτοξικής δράσης, με αποτέλεσμα τη θανάτωση ωφέλιμων οργανισμών-μη στόχων που διαβιούν στο ίδιο ενδιαίτημα. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η εκδήλωση τοξικότητας των πυρεθροειδών στη μέλισσα *A. mellifera*, έντομο υψηλής οικολογικής και οικονομικής σημασίας (Piccolomini *et al.* 2018).

ii. Διαχείριση του περιβάλλοντος αναπαραγωγής

Οι ενέργειες διαχείρισης των κουνουπιών δεν αφορούν μόνο στους δημόσιους χώρους, όπου πραγματοποιούνται εντατικοί ψεκασμοί, αλλά και τους ιδιωτικούς, όπου οι μικροεστίες ανάπτυξης είναι ποικίλες. Μια από τις πιο απλές και οικονομικές μεθόδους για την τοπική μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών, είναι ο περιορισμός οποιασδήποτε συλλογής νερού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εστία αναπαραγωγής. Ο καθαρισμός πισινών, η απομάκρυνση ελαστικών αυτοκινήτου και η ανανέωση επιφανειών νερού μειώνουν σημαντικά τον αριθμό των πιθανών σημείων ωοαπόθεσης των κουνουπιών (Zettel & Kaufman, 2009).

iii. Βιολογικές μέθοδοι

Οι βιολογικές μέθοδοι ελέγχου αξιοποιούν μια ποικιλία υδάτινων θηρευτών, παρασίτων ή παθογόνων για τη στόχευση του πληθυσμού των κουνουπιών με μη χημικά και πιο φιλικά προς το περιβάλλον μέσα. Τον ρόλο θηρευτών αναλαμβάνουν άλλα έντομα ή σπονδυλωτά, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το ψάρι *Gambusia affinis* που τρέφεται με τις προνύμφες και τις νύμφες των κουνουπιών *Aedes* (Faraji & Unlu, 2016). Επιπλέον, οι νηματώδεις της οικογένειας *Mermithidae*, τα παράσιτα μικροσπορίδια και διάφοροι παθογόνοι ιοί των κουνουπιών αποτελούν χρήσιμα εργαλεία πληθυσμιακού ελέγχου σε οριοθετημένες εστίες ανάπτυξης. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των βιολογικών μεθόδων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από άλλους βιοτικούς και μη παράγοντες, όπως η βιωσιμότητα των θηρευτών, η διαθεσιμότητα εναλλακτικών διατροφικών πηγών και η εκλεκτικότητα των παθογόνων για τον φορέα. Η συντήρηση ενός πληθυσμού θηρευτών δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο καταπολέμηση των κουνουπιών, εξαιτίας της ετερογένειας και της παροδικότητας των εστιών ανάπτυξής τους.

iv. Γενετικές μέθοδοι

Η ανεπάρκεια των χημικών εντομοκτόνων και βιοκτόνων ως προς την πλήρη καταπολέμηση των κουνουπιών οδήγησε στον σχεδιασμό εναλλακτικών τεχνολογιών που βασίζονται στην γενετική μηχανική. Το πλεονέκτημα τέτοιων μεθόδων αποτελεί η υψηλή ειδο-ειδικότητα στη στόχευση, μέσω της εισαγωγής ενός κληρονομήσιμου φαινοτύπου στους οργανισμούς-στόχους. Εξέχουσα θέση μεταξύ των τεχνολογιών αυτής της κατηγορίας κατέχουν η τεχνική ασύμβατου εντόμου (Incompatible Insect Technique, IIT), η τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) και η απελευθέρωση εντόμων με επικρατές θνησιγόνο αλληλόμορφο (Release of Insects carrying Dominant Lethal, RIDL). Η τεχνική IIT εκμεταλλεύεται το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Wolbachia*, το οποίο αφού μολύνει αρσενικά κουνούπια στο εργαστήριο, προκαλεί πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο λόγω κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας (cytoplasmic incompatibility, CI) μετά το ζευγάρωμα με θηλυκά αγρίου τύπου στη φύση (Hu *et al.* 2021). Παρόμοια προσέγγιση υιοθετεί και η κλασική SIT, η οποία στηρίζεται στην μαζική εκτροφή και απελευθέρωση στερημένων μέσω ακτινοβολήσης με ραδιενέργεια αρσενικών κουνουπιών, και την επακόλουθη σύζευξή τους με θηλυκά αγρίου τύπου (Faraji & Unlu, 2016). Η τεχνική SIT μπορεί να ενισχυθεί επιπλέον με την ενσωμάτωση της πιο πρόσφατα εισαχθείσας

RIDL, κατά την οποία τα αρσενικά κουνούπια χρησιμοποιούνται ως μεταφορείς επικρατών θνησιγόνων γονιδίων υπό τον έλεγχο ειδικού για τα θηλυκά υποκινητή στον φυσικό πληθυσμό. Η μέθοδος αυτή παρέχει ευελιξία ως προς τον χρονικό έλεγχο της έκφρασης του εισαγόμενου γονιδίου, με σκοπό τον περιορισμό της δράσης του μόνο στο ζυγωτό και όχι στα αρσενικά κουνούπια που το φέρουν (Alrhey 2014).

Η επιτυχία αυτών των μεθόδων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αρμοστικότητα των απελευθερωμένων αρσενικών κουνουπιών, δηλαδή τον ανταγωνισμό τους με τα αρσενικά αγρίου τύπου για την ανεύρεση και το ζευγάρωμα με τα θηλυκά. Ωστόσο, η προτίμηση των θηλυκών για τα αρσενικά του φυσικού πληθυσμού, ασκεί επιλεκτική πίεση που ευνοεί την απόρριψη των τροποποιημένων αρσενικών (Agusto *et al.* 2012). Ακόμη, πολλές από τις γενετικές μεθόδους προκαλούν μείωση της βιωσιμότητας των αρσενικών κουνουπιών λόγω αλλιωμένου φαινοτύπου και διαταραγμένης φυσιολογικής ανάπτυξης (Sasmita *et al.* 2019). Τέλος, οι υπάρχουσες τεχνολογίες ελέγχου του πληθυσμού των κουνουπιών εμφανίζουν έναν σημαντικό βαθμό δυσκολίας κατά την εφαρμογή τους και κυρίως, στη μαζική εκτροφή, τον διαχωρισμό αρσενικών και θηλυκών κουνουπιών και τη συστηματική απελευθέρωση των τροποποιημένων αρσενικών (Faraji & Unlu, 2016). Νέες εναλλακτικές μέθοδοι που παραλείπουν ορισμένους από τους παραπάνω περιορισμούς περιλαμβάνουν τον μηχανισμό παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference, RNAi), έναν μηχανισμό γονιδιακής σίγησης που προσφέρει το πλεονέκτημα υψηλής εξειδίκευσης, χαμηλού κόστους και εύκολης και ευέλικτης εφαρμογής.

1.4.1. Μηχανισμός παρεμβαλλόμενου RNA

Το 1998, οι Andrew Fire και Craig Mello δημοσίευσαν την ταυτοποίηση των δίκλωνων RNA ως παράγοντες που προκαλούν τη μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (post-transcriptional gene silencing, PTGS) στον *Caenorhabditis elegans*, φαινόμενο το οποίο ονόμασαν παρεμβολή RNA (RNA interference, RNAi) (Fire *et al.* 1998). Ο μηχανισμός του παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference, RNAi) αποτελεί ένα υψηλά συντηρημένο μονοπάτι που ανακαλύφθηκε αρχικά στα φυτά και αργότερα βρέθηκε σε έναν μεγάλο αριθμό ευκαρυωτικών οργανισμών, καταδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο των μη κωδικών RNA στη γονιδιακή ρύθμιση. Σύντομα, το μονοπάτι RNAi κατέστη ένα από τα πιο εύχρηστα και ευρέως διαδεδομένα εργαλεία βιολογικής έρευνας και γενετικής, επιτρέποντας την καταστολή οποιοδήποτε γονιδίου με γνωστή αλληλουχία (Lam *et al.* 2015).

1.4.1.1. Φυσιολογικός ρόλος

Το RNAi συνιστά μια φυσιολογική κυτταρική διεργασία με την οποία επιτυγχάνεται σίγηση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω αποικοδόμησης του mRNA ή καταστολής της μετάφρασης. Το μονοπάτι της σίγησης RNAi αναγνωρίστηκε αρχικά ως μηχανισμός εγγενούς άμυνας του οργανισμού που προστατεύει τα κύτταρα είτε από εξωγενή δίκλινα μόρια RNA ιών, είτε από ενδογενή δίκλινα μόρια RNA που προκύπτουν από μεταθετά στοιχεία ή αλληλουχίες με ανάστροφες επαναλήψεις και προκαλούν αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος (Meister & Tuschl 2004). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως το RNAi διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον συντονισμό αναπτυξιακών διεργασιών, μέσω της μεθυλίωσης του DNA και της συμπύκνωσης της χρωματίνης, όπως συμβαίνει σε ποικίλους φυτικούς οργανισμούς (Baulcombe 2004).

1.4.1.2. Μηχανισμός δράσης

Το μονοπάτι RNAi πυροδοτείται από οποιαδήποτε μορφή δίκλωνου RNA, όπως το dsRNA (double strand RNA), τα siRNA (small interfering RNA), τα miRNA (microRNA), τα shRNA (short hairpin RNA) και τα piRNA (piwi-interacting RNAs), τα οποία κατηγοριοποιούνται με βάση τη προέλευση και την εξειδίκευση στα ένζυμα επεξεργασίας και τις πρωτεΐνες Αργοναύτη (Adeyinka *et al.* 2020).

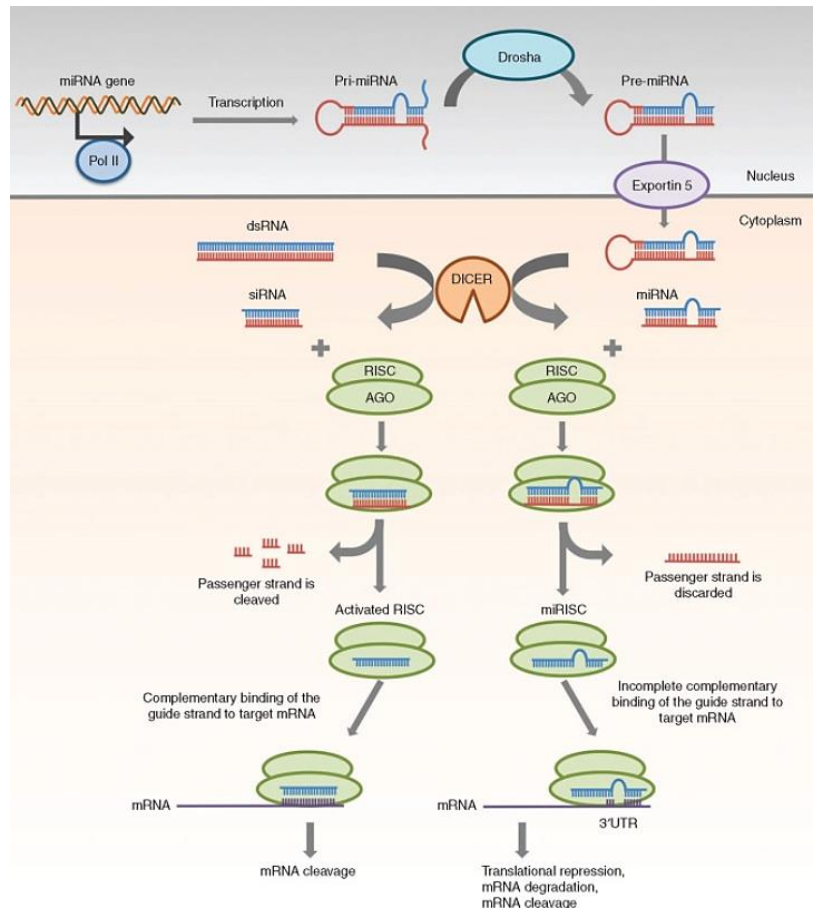
Η ωρίμανση των μικρών RNA πραγματοποιείται σταδιακά από ειδικές RNases-τύπου III, τις Droscha και Dicer (Meister & Tuschl 2004). Η Droscha εξειδικεύεται στην επεξεργασία των miRNA, τα οποία μεταγράφονται ως μεγάλα αρχικά μετάγραφα RNA αποκαλούμενα pri-miRNA. Τα pri-miRNA με τις χαρακτηριστικές δίκλωνες δομές φουρκέτας μετατρέπονται από τη Droscha σε πρόδρομα θραύσματα, 70 περίπου νουκλεοτιδίων, τα pre-miRNA, τα οποία μετά την έξοδο τους από τον πυρήνα μέσω της εξπορτίνης 5, υφίστανται την, κοινή με τα siRNA, επεξεργασία από την Dicer. Πιο συγκεκριμένα, η Dicer κόβει σε μικρότερα δίκλιωνα τμήματα 21-24bp με 3' προεξέχοντα άκρα δύο νουκλεοτιδίων και τα pre-miRNA, αλλά και το εξωγενές dsRNA μετά την είσοδο και την αναγνώρισή του από το κύτταρο (Lam *et al.* 2015). Αρκετοί οργανισμοί περιέχουν πολλαπλά γονίδια Dicer, που εξειδικεύονται στην ωρίμανση διαφορετικής προέλευσης δίκλωνων τμημάτων RNA (Meister & Tuschl 2004).

Στη συνέχεια, τα τεμαχισμένα miRNA και siRNA αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούν το επαγόμενο από RNA σύμπλοκο αποσιώπησης RISC (RNA-induced silencing complex). Ο κλώνος των μικρών δίκλωνων τμημάτων που ενσωματώνεται στο ενεργοποιημένο RISC καλείται κλώνος-οδηγός (guide strand), ενώ ο άλλος λέγεται κλώνος-επιβάτης (passenger strand) και απομακρύνεται. Η πρωτεΐνη Αργοναύτης (AGO), η καταλυτική επικράτεια RNase H-like του RISC, είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση μορίων μονόκλωνου RNA με αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας του κλώνου-οδηγού των siRNA (Cooper *et al.* 2018). Από την άλλη, ο κλώνος-οδηγός των miRNA κατευθύνει το σύμπλοκο RISC σε μόρια mRNA με τα οποία είναι συμπληρωματικό, όπου η πρόσδεση του miRISC επάγει την αποδόμησή τους (εάν η συμπληρωματικότητα με το mRNA-στόχο είναι πλήρης) ή την καταστολή της μετάφρασης (εάν η συμπληρωματικότητα είναι μερική). Σε κάθε περίπτωση, το 5' άκρο του κλώνου-οδηγού μεσολαβεί τη πρόσδεσή του στη θέση στόχο του mRNA, ενώ το 3' άκρο σταθεροποιεί σε ευνοϊκή στερεοδιάταξη το σύμπλοκο RISC πάνω στο mRNA (Meister & Tuschl 2004).

Η παρεμβολή RNAi χρησιμοποιείται ευρύτατα ως εργαστηριακό εργαλείο για τη στοχευμένη σίγηση γονιδίων, με την εισαγωγή εξωγενούς δίκλωνου RNA (dsRNA) ως επαγωγέας του μονοπατιού. Το εξωγενές dsRNA σχεδιάζεται ώστε να είναι πλήρως συμπληρωματικό με μια περιοχή του γονιδίου ενδιαφέροντος, ώστε να αποφευχθεί η δράση του συμπλόκου RISC σε περιοχές μη στόχους, εξασφαλίζοντας την ειδικότητα της μεθόδου.

Σε μερικούς οργανισμούς, η μεταγραφική σίγηση που επάγεται από τον μηχανισμό RNAi παρατηρείται σε ιστούς μακριά από το σημείο χορήγησης του dsRNA. Η διακυτταρική εξάπλωση του σήματος της παρεμβολής RNA σε ιστούς διαφορετικούς του σημείου επαγωγής αναφέρεται ως συστημικό RNAi (systemic RNAi) (Zhu & Palli 2020). Το συστημικό RNAi είναι επιθυμητό λόγω της υψηλότερης μεταγραφικής καταστολής του γονιδίου στόχου και άρα, ενός πιθανώς εντονότερου φαινοτύπου. Στον νηματώδη *C. elegans*, η εξάπλωση του σήματος RNAi μεσολαβείται από ειδικά κανάλια-μεταφορείς, τα λεγόμενα SID (systemic RNA interference-defective), τα οποία μεταφέρουν το dsRNA διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα γειτονικών κυττάρων (Cooper *et al.* 2018). Στη συνέχεια, ο αριθμός των siRNA που προκύπτουν από τη διακυτταρική μεταφορά πολλαπλασιάζεται από μία ειδική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP). Παρά τη ταυτοποίηση

ορθόλογων πρωτεϊνών SID στα έντομα, δεν έχει βρεθεί να διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη συστημική μεταφορά του RNAi (Adeyinka *et al.* 2020). Επιπλέον, όλα τα γονιδιώματα των εντόμων στερούνται των γονιδίων των RdRP και επομένως, της ικανότητας για συστημική ενίσχυση του RNAi (Cooper *et al.* 2018).



Εικόνα 14. Βιοσύνθεση των siRNA και miRNA στο μονοπάτι γονιδιακής σίγησης RNAi. (Lam *et al.* 2015)

1.4.1.3. Μέθοδοι χορήγησης του dsRNA

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της τεχνολογίας RNAi σε πειράματα γονιδιακής σίγησης στα έντομα αποτελεί η επιλογή του κατάλληλου τρόπου χορήγησης του δίκλωνου RNA. Καθεμία από τις έως τώρα δοκιμασμένες μεθόδους εισαγωγής διακρίνεται από ορισμένα πλεονεκτήματα και περιορισμούς που εξαρτώνται από το είδος του οργανισμού-στόχου. Η ύπαρξη ενζύμων αποικοδόμησης του dsRNA, το ποσοστό αποτελεσματικότητας της κυτταρικής πρόσληψης, καθώς και η έκφραση των συστατικών του μηχανισμού του RNAi είναι παράγοντες που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα του πειράματος (Santos-Ortega & Flynt 2022). Η χορήγηση του dsRNA στα έντομα πραγματοποιείται κατά κόρον μέσω της μικροένεσης, του διαποτισμού (soaking) και της εφαρμογής μέσω της τροφής. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, οι βασικές αυτές μέθοδοι έχουν βελτιωθεί σημαντικά με την ενσωμάτωση σύγχρονων τεχνολογιών, όπως η εισαγωγή dsRNA μέσω κατιονικών λιποσωμάτων και νανοσωματιδίων, καθώς και η μεσολαβούμενη απο συμβιώτες ή φυτά χορήγησή του (Zhu & Palli 2020).

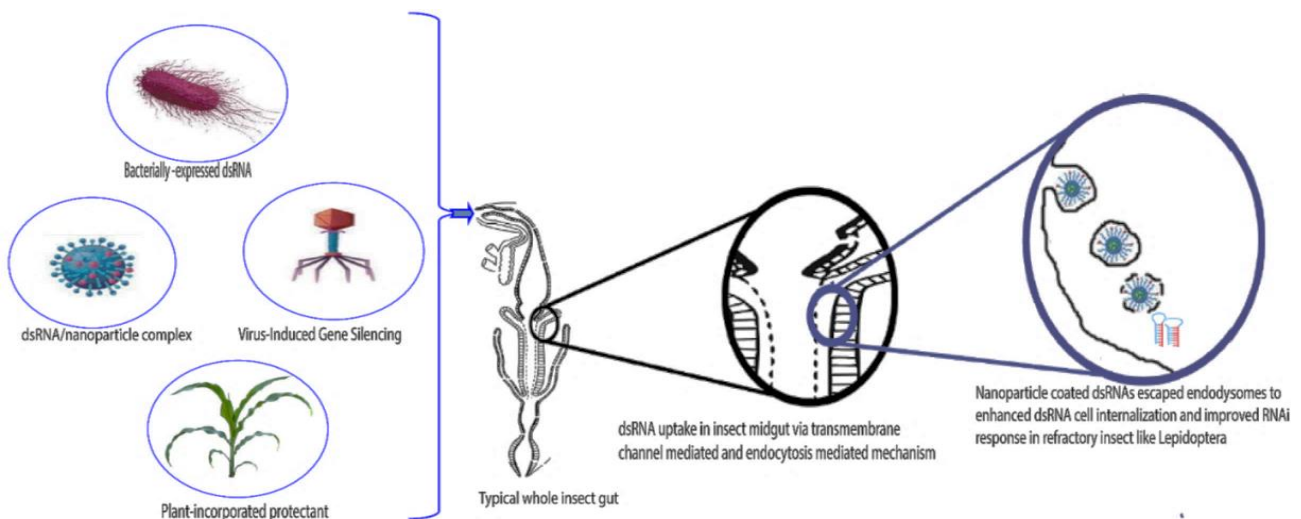
Ο διαποτισμός του οργανισμού σε διάλυμα που περιέχει το dsRNA αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο επαγωγής του RNAi, κυρίως λόγω της εύκολης εφαρμογής του. Η χορήγηση του dsRNA με διαποτισμό έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό πειραμάτων γονιδιακής σίγησης στη *D.*

melanogaster και στον *C. elegans* με υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Ωστόσο, η επαγωγή του RNAi από dsRNA που εισάγεται μέσω του διαποτισμού πραγματοποιείται με μικρότερη ένταση σε σύγκριση με την μέθοδο της μικροένεσης (Ghosh *et al.* 2018). Ο διαποτισμός έχει εφαρμοστεί επίσης, σε πειράματα γονιδιακής σίγησης κουνουπιών, όπως το *Ae. aegypti* και το *C. pipiens*, όπου η αφυδάτωση των προνυμφών πριν τον διαποτισμό αύξησε σημαντικά το επίπεδο καταστολής της γονιδιακής έκφρασης (Arshad *et al.* 2021).

Η ανακάλυψη της μεθόδου χορήγησης dsRNA μέσω της τροφής πραγματοποιήθηκε στον *C. elegans*, ο οποίος τρεφόμενος με βακτήρια *E.coli* που εκφράζουν το dsRNA παρουσίασε κατεσταλμένη έκφραση των γονιδίων-στόχων (Fire *et al.* 1998). Η επαγωγή του RNAi μέσω της σίτισης γίνεται με την προσθήκη στο μέσο διατροφής είτε dsRNA που συντίθενται *in vitro* με κατάλληλους εκκινητές και τη χρήση της T7 πολυμεράσης, είτε μικροοργανισμών και φυτών που τα εκφράζουν (Zhu & Palli 2020). Οι οργανισμοί που τροποποιούνται με την απαραίτητη γενετική πληροφορία για την έκφραση των dsRNA περιλαμβάνουν βακτήρια, μύκητες, μικροάλγες και φυτά, καθώς και απενεργοποιημένους ιούς (Silver *et al.* 2021). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου λήψης των dsRNA μέσω της τροφής είναι σημαντικά υψηλή σε διάφορα είδη κολεοπτέρων και μικρών εντόμων όπως οι αφίδες (aphids), ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και σε πειράματα γονιδιακής σίγησης κουνουπιών, όπως του *A. stephensi* με τη χρήση μικροάλγης και του *Ae. aegypti* με τη χρήση διατροφικού μέσου εμπλουτισμένου με dsRNA (Arshad *et al.* 2021). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για όλα τα είδη των εντόμων, καθώς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη πεπτική οδό του οργανισμού και συγκεκριμένα, την αποικοδόμηση των dsRNA από ειδικές ριβονουκλεάσες (Zhu & Palli 2020).

Η χρήση νανοσωματιδίων και κατιονικών λιποσωμάτων προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραπάνω μεθόδους, συμπεριλαμβανομένων της προστασίας των dsRNA από αποικοδόμηση, της αυξημένης σταθερότητας των δίκλωνων RNA κατά την εισαγωγή τους στα κύτταρα και της φυγής τους από τα ενδοσώματα (Adeyinka *et al.* 2020; Zhu & Palli

2020). Η χιτίνη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων, εξαιτίας του χαμηλού κόστους, της βιοαποικοδόμησής τους και της ύπαρξης ως φυσικά συστατικά του εξωσκελετού των αρθροπόδων.



Εικόνα 15. Μέθοδοι χορήγησης dsRNA στη πεπτική οδό του εντόμου. Η ενσωμάτωση των dsRNA σε συμπλέγματα με νανοσωματίδια αποτρέπει την παγίδευσή τους σε ενδοσώματα. (Adeyinka *et al.* 2020)

1.4.1.4. Μέθοδος Μικροένεσης

Η μικροένεση εισήχθη από τους Fire και Mello το 1998, ως τρόπος χορήγησης του dsRNA στον *C. elegans* (Fire *et al.* 1998). Σήμερα, αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο *in vivo* χορήγησης dsRNA σε μια πληθώρα οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων πολλών ειδών εντόμων, στα οποία μία ορισμένη ποσότητα dsRNA κατάλληλης συγκέντρωσης ενίεται απευθείας στο αυγό, την προνύμφη ή το σώμα του ενήλικου ατόμου (Zhu & Palli 2020). Η μικροένεση στις προνύμφες γίνεται συνήθως ραχιαία, ανάμεσα ή μέσα στους δακτυλίους, ενώ στα ενήλικα άτομα στον ιστό κάτω από τα φτερά (Yu *et al.* 2012). Τα πρώτα επιτυχημένα πειράματα μικροένεσης σε έντομα πραγματοποιήθηκαν σε έμβρυα *D. melanogaster* το



Εικόνα 16. Μικροένεση στον θώρακα ενήλικου κουνουπιού *A. gambiae*. (NIAID 2017)

1998 από τους Kennerdell και Carthew, με την σίγηση των γονιδίων *frizzled* και *frizzled2* μέσω της επαγωγής του μονοπατιού RNAi (Kennerdell & Carthew 1998). Από τότε, η μέθοδος της μικροένεσης έχει εφαρμοστεί για τη στόχευση γονιδίων σε διάφορα είδη εντόμων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η μέλισσα *A. mellifera*, το κόκκινο σκαθάρι *T. castaneum*, η ακρίδα *L. migratoria* και η κατσαρίδα *B. germanica* (Farooqui *et al.* 2003; Lu *et al.* 2012; Li *et al.* 2015; Huang & Lee 2011). Όσον αφορά στα πειράματα γονιδιακής σίγησης στα κουνούπια, η μικροένεση χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την χορήγηση dsRNA σε ενήλικα κουνούπια *A. gambiae* για τη στόχευση του γονιδίου της *Defencin* και έκτοτε, έχει εφαρμοστεί σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια των κουνουπιών του γένους *Aedes*, *Armigeres* και *Culex* (Blandin *et al.* 2002; Whyard *et al.* 2015; Tsao *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2013; Kumar & Puttaraju 2012).

Η υψηλή αποδοτικότητα της μεθόδου οφείλεται κυρίως στον ακριβή έλεγχο της χορηγούμενης ποσότητας του ενέσιμου παράγοντα, καθώς και στην εύκολη και άμεση εφαρμογή της στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις μεθόδους του διαποτισμού και της χορήγησης μέσω τροφής, η απευθείας μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων στον ιστό-στόχο ή την αιμολέμφο παρακάμπτει ορισμένους φυσιολογικούς φραγμούς του εντόμου, όπως το εξωτερικό περίβλημα ή το επιθήλιο του εντέρου, μειώνοντας το φαινόμενο της αποικοδόμησης του dsRNA στην εντερική κοιλότητα και επάγοντας ισχυρότερη συστηματική απόκριση (Yu *et al.* 2012; Sanscrainte *et al.* 2018).

Από την άλλη, η μέθοδος της μικροένεσης είναι μια χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί ευαίσθητους χειρισμούς, βελτιστοποίηση και εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. Παράγοντες όπως η επιλογή της κατάλληλης βελόνας, η ιδανική ποσότητα και συγκέντρωση του dsRNA, καθώς και η πίεση και το σημείο της ένεσης ποικίλουν σημαντικά για τα διάφορα είδη και στάδια ανάπτυξης των οργανισμών και μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και το ποσοστό επιβίωσης των εντόμων (Yu *et al.* 2012; Kumar & Puttaraju 2012). Για παράδειγμα, η μικροένεση στα κουνούπια πραγματοποιείται συνήθως με βελόνα διαμέτρου ~150μm με σπασμένο άκρο, ενώ στις μύγες με βελόνα διαμέτρου ~250μm. Η χρήση της τελευταίας για τη μικροένεση κουνουπιών προκαλεί βλάβες στους ιστούς και ενδεχομένως, θνησιμότητα, λόγω του μικρότερου μεγέθους τους (Sanscrainte *et al.* 2018). Εντούτοις, παρά τις δυσκολίες της μεθόδου, η μικροένεση ενδείκνυται ως ένα από τα αποτελεσματικότερα εργαλεία επαγωγής του RNAi, που αξιοποιείται κατά κόρον στη στόχευση γονιδίων-στόχων των υπό μελέτη οργανισμών.

1.4.2. Αξιοποίηση των lncRNA στον πληθυσμιακό έλεγχο

Την ανάγκη για μια νέα και ασφαλή μέθοδο καταπολέμησης εντόμων υγειονομικού και αγροτικού ενδιαφέροντος δύναται να ικανοποιήσει η τεχνολογία του παρεμβαλλόμενου RNA ως μια οικολογική και οικονομική στρατηγική με υψηλή ειδο-ειδικότητα ως προς τον οργανισμό-στόχο. Όσον αφορά στη χρήση του στα κουνούπια, ο μηχανισμός του RNAi έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη μελέτη της λειτουργίας γονιδίων, ενώ η δυναμική του ως εναλλακτική μέθοδος πληθυσμιακού ελέγχου αρχίζει να αποκτά ευρείες διαστάσεις (Lopez *et al.* 2019; Balakrishna *et al.* 2017).

Η εξειδίκευση ως προς το είδος του οργανισμού-στόχου κατά την καταπολέμηση των εντόμων εξασφαλίζεται με την επιλογή κατάλληλων, εμπλεκόμενων σε βασικές διεργασίες του οργανισμού, γονιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά χαμηλή συντήρηση μεταξύ συγγενικών ειδών. Η υψηλή ειδο-ειδικότητα των μακρών μη κωδικών μεταγράφων (lncRNAs), καθώς και η συστηματικά υψηλή έκφρασή τους στα αναπαραγωγικά όργανα των εντόμων τα καθιστούν ιδανικά υποψήφια γονίδια προς μελέτη του ρόλου τους και αξιοποίησή τους στα πλαίσια του πληθυσμιακού ελέγχου.

Τέλος, η διαλεύκανση της επίδρασης των lncRNA στην αναπαραγωγική βιολογία των εντόμων αναμένεται να συμβάλει όχι μόνο στην ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης οργανισμών-στόχων, αλλά και γενικά, στην αναθεώρηση των μηχανισμών δράσης της ποικιλόμορφης αυτής τάξης μορίων κατά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου μακρών μη κωδικών RNA μεταγράφων (lncRNA) στην αναπαραγωγική βιολογία των εντόμων. Για την αξιολόγηση της ρυθμιστικής τους λειτουργίας, ταυτοποιήθηκε και στοχεύθηκε, μέσω της τεχνολογίας RNAi, ένα ειδικό για τις ωοθήκες lncRNA του ασιατικού κουνουπιού τίγρης, *Aedes albopictus*. Το συγκεκριμένο είδος κουνουπιού επιλέχθηκε εξαιτίας της μεγάλης επιδημιολογικής και υγειονομικής του σημασίας, καθώς και της ευρείας εξάπλωσής του στην Ελλάδα. Όσον αφορά στο γονίδιο-στόχο, η επιλογή βασίστηκε στην εργασία των Gamez *et al.* (2020), στην οποία παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το ολοκληρωμένο μεταγράφημα του *Ae. albopictus* στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού. Από τη προκύπτουσα λίστα των μεταγραφόμενων γονιδίων, διακρίθηκαν τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα τα οποία υπερεκφράζονται μετά από το γεύμα αίματος στις ωοθήκες των θηλυκών κουνουπιών και ονομάστηκαν *NORMA* (*Non-coding RNAs in Mosquito Ovaries*). Ένα από τα γονίδια αυτά αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας και ονομάστηκε *NORMA19*. Μετά την επίτευξη και την επιβεβαίωση της αποσιώπησής του, εξετάστηκαν το ποσοστό ωοαπόθεσης, ο ρυθμός εκκόλαψης των αυγών και η μορφολογία των ωοθηκών των θηλυκών κουνουπιών, με απώτερο στόχο την διερεύνηση του πιθανού ρυθμιστικού του ρόλου στην αναπαραγωγική ικανότητα του κουνουπιού.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

3.1. Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού *Ae. albopictus*

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κουνούπια από τον εργαστηριακό πληθυσμό *Ae. albopictus* του στελέχους Foshan που προέρχεται από αγρίου τύπου κουνούπια της νοτιοανατολικής Κίνας και διατηρείται στο εργαστήριο Μοριακής βιολογίας και Γονιδιωματικής από το 2022.

Όλα τα κουνούπια, συμπεριλαμβανομένων των προνυμφών και των νυμφών, εκτρέφονται στο εντομοτροφείο υπό τις συνθήκες των 25° C, σχετικής υγρασίας 60-70% και κύκλου φωτοπεριόδου 14:10 h (φωτός/σκοταδιού). Για την εκκόλαψη των αυγών και τη δημιουργία κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος για την ανάπτυξη των προνυμφών χρησιμοποιείται διάλυμα θρεπτικού υποστρώματος (nutrient broth) που αποτελείται από πεπτόνη (15g/L), D+ γλυκόζη (1g/L), χλωριούχο νάτριο (6g/L) και εκχύλισμα μαγιάς (3g/L). Για την εκτροφή των προνυμφών χρησιμοποιείται θρυμματισμένη ξηρά γατοτροφή, ενώ για των ενηλίκων διάλυμα σακχαρόζης 10% και αίμα εθελοντών για την ωρίμανση των ωοθηκών των θηλυκών κουνουπιών.

3.2. Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Η απομόνωση του RNA από τους διάφορους ιστούς του κουνουπιού αποσκοπεί στην ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων-στόχων, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) που θα συζητηθεί παρακάτω. Για τον σκοπό αυτό, είναι αναγκαία η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έγκειται στην πλήρη απενεργοποίηση των ενδογενών ριβονουκλεασών που μπορούν να αποικοδομήσουν το RNA. Για τον λόγο αυτόν, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο EXTRAzol (μίγμα φαινόλης και άλλων συστατικών) που αναστέλλει τη δράση των RNασών και διατηρεί ακέραιο το RNA κατά τη λύση.

Υλικά: EXTRAzol / χλωροφόρμιο / ισοπροπανόλη / γλυκογόνο 10mg/ml / 70 % ice cold EtOH / ddH₂O / pestles

Μέθοδος:

1. Ομογενοποίηση των ιστών πέντε βιολογικών δειγμάτων (pool) με την χρήση ειδικών εμβόλων (pestles) και τη προσθήκη EXTRAzol μέχρι τελικού όγκου 100μl (για το ξέπλυμα των pestle), σε ξεχωριστά tubes τύπου erpendorf 1.5ml για το κάθε είδος ιστού.
2. Vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT) για 5'.
3. Συμπλήρωση ddH₂O μέχρι τα 150μl και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10'.
4. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα erpendorf και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο (150μl) και γρήγορη ανάδευση για 15'' μέχρι την δημιουργία γαλακτώματος.
5. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 15' (δημιουργία τριών φάσεων: η άνω υδατική φάση με το RNA, η μεσόφαση με το DNA και κάτω οργανική φάση με τις πρωτεΐνες).
6. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέα erpendorf και προσθήκη 0.5X ισοπροπανόλης (100μl) και 1μl γλυκογόνου για τη κατακρήμνιση του RNA υπό τη μορφή ιζήματος.
7. Καταβύθιση στους -80°C για 1h και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10-30'.
8. Απόρριψη του υπερκειμένου και πλύση με 500μl αιθανόλη 75%.
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10', αφαίρεση αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος μέχρι τη πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης (3-5').

10. Επαναδιάλυση σε 11μl ζεστού ddH₂O και μέτρηση συγκέντρωσης RNA στο φασματοφωτόμετρο Quawell.
11. Διατήρηση δειγμάτων στους -80°C για μακροχρόνια αποθήκευση ή στους -20°C για σύντομη αποθήκευση.

3.3. Επεξεργασία με DNase (DNase treatment)

Η επεξεργασία με την DNase, ένζυμο που υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μορίων DNA, πραγματοποιείται με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DNA κατά την απομόνωση του RNA. Για να επιτευχθεί πλήρως η αντίδραση, συνίσταται 1μl DNase για έως και 8μg νουκλεϊκών οξέων σε τελικό όγκο αντίδρασης 30μl.

Υλικά: Απομονωμένο RNA / Turbo DNase I (2U/ul) / 10x TURBO DNase Buffer / RNaseOUT αναστολέας ριβονουκλεασών (40U/ul) / Ammonium acetate 7,5M / Φαινόλη / χλωροφόρμιο / γλυκογόνο 10mg/ml / 100 % ice cold EtOH / 70 % ice cold EtOH / ddH₂O

Μέθοδος:

1. Υπολογισμός κατάλληλης ποσότητας απομονωμένου RNA, με βάση την συγκέντρωσή του στο Quawell, έτσι ώστε να υπάρχουν 8μg RNA συνολικά στο κάθε δείγμα.
2. Προετοιμασία του master mix για 30μl τελικού όγκου μιας αντίδρασης: 3μl 10x buffer, 1μl DNase I, 0.5μl RNase out και συμπλήρωση με ddH₂O ανάλογα με τον όγκο των δειγμάτων μέχρι τα 30μl.
3. Προσθήκη του master mix στο κάθε δείγμα, σύντομο vortex και απευθείας τοποθέτηση στο υδατόλουτρο στους 37° για 1h.
4. Μεταφορά στον πάγο και προσθήκη 135μl Ammonium acetate 7,5M και 235μl ddH₂O.
5. Προσθήκη 400μl φαινόλη/χλωροφόρμιο και γρήγορη ανάδευση μέχρι τη δημιουργία γαλακτώματος.
6. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10' και προσεκτική μεταφορά του υπερκειμένου, ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση, σε νέα erpendorf.
7. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιο, γρήγορη ανάδευση μέχρι την δημιουργία γαλακτώματος και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10'.
8. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf, προσθήκη 2,5X του όγκου 100 % ice cold EtOH και 5μl γλυκογόνου για τη κατακρήμνιση του RNA υπό τη μορφή ιζήματος και τοποθέτηση στους -80°C για τουλάχιστον 1h.
9. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C σε 12000g για 30', απόρριψη υπερκειμένου και πλύση με 500μl 70% ice cold EtOH.
10. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10' και προσεκτική αφαίρεση υπερκειμένου ώστε να μην διαταραχθεί η πελέτα.
11. Στέγνωμα σε RT για 10'
12. Επαναδιάλυση σε 11μl ζεστού ddH₂O, έντονο vortex, spin down και μέτρηση συγκέντρωσης RNA στο φασματοφωτόμετρο Quawell.
13. Διατήρηση δειγμάτων στους -80°C.

3.4. Σύνθεση cDNA

Το απομονωμένο RNA μπορεί να μετατραπεί σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής που μεσολαβείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (*Reverse Transcriptase*). Για την αντίδραση αυτή είναι απαραίτητο κατάλληλο ζεύγος εκκινητών ανάλογα με τον στόχο του πειράματος (random hexamers, gene specific,

oligo-dT). Στην προκειμένη, χρησιμοποιήθηκαν oligo-dT που προσδένονται στις poly-A ουρές όχι μόνο των ώριμων μεταγράφων mRNA, αλλά και των ώριμων lncRNA.

Υλικά: Απομονωμένο RNA / oligo-dT primers 50mM / 10mM dNTPs / RNaseOUT αναστολέας ριβονουκλεασών (40U/ul) / 5x Buffer MMLV-RT / DTT 100mM / MMLV-RT (200U/ul) / ddH₂O

Μέθοδος:

1. Υπολογισμός 1000ng RNA με βάση τη συγκέντρωση στο Quawell από κάθε δείγμα και επαναδιάλυση σε 10μl ddH₂O.
2. Προσθήκη, σε κάθε αραιωμένο δείγμα, 1μl oligo-dT primers 50mM και 1μl dNTPs 10mM και τοποθέτηση για 5' στους 65°C και για 10' στον πάγο.
3. Προετοιμασία του mix της αντίδρασης τελικού όγκου 20μl. Για κάθε δείγμα: 4 μl buffer 5x, 2 μl DTT (100 mM), 0,5μl Rnase out (40U/μl), 1 μl MMLV-RT (200u/μl), 0.5μl ddH₂O.
4. Vortex, spin και προσθήκη 8μl από το mix σε κάθε δείγμα.
5. Επώαση στους 37°C για 2h και προσθήκη 380μl ddH₂O.
6. Αποθήκευση στους -20°C ή χρησιμοποίηση 4μl ανά δείγμα για qPCR.

3.5. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA αποτελεί μια απλή και γρήγορη διαδικασία που αποσκοπεί στη δημιουργία ενός DNA εκμαγείου για την ενίσχυση γονιδίων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για την απενεργοποίηση ενζύμων που μπορεί να αποικοδομήσουν το DNA, χρησιμοποιείται ο χηλικός παράγοντας EDTA, αλλά και η Proteinase K που αποδομεί τις πρωτεΐνες των δειγμάτων.

Υλικά: Tris-HCl 10mM pH 8.2 / EDTA 1mM / NaCl 25mM / Proteinase K 20mg/ml / ddH₂O / pestles

Μέθοδος:

1. Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (squishing buffer) με τελικό όγκο 1.5ml σε θερμοκρασία δωματίου: Tris-HCl 10mM pH 8.2, EDTA 1mM, NaCl 25mM και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι τελικού όγκου.
2. Προσθήκη 200μg Proteinase K για κάθε ml τελικού όγκου (300μg ή 15μl Proteinase K 20mg/ml).
3. Ομογενοποίηση των βιολογικών δειγμάτων με την χρήση των pestles και τη προσθήκη ποσότητας 50μl squishing buffer σε κάθε δείγμα.
4. Επώαση στους 37°C για 30' και απευθείας τοποθέτηση στους 95°C για 1-2' για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.
5. Αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C ή χρησιμοποίηση 2μl ανά δείγμα για PCR.

3.6. Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων

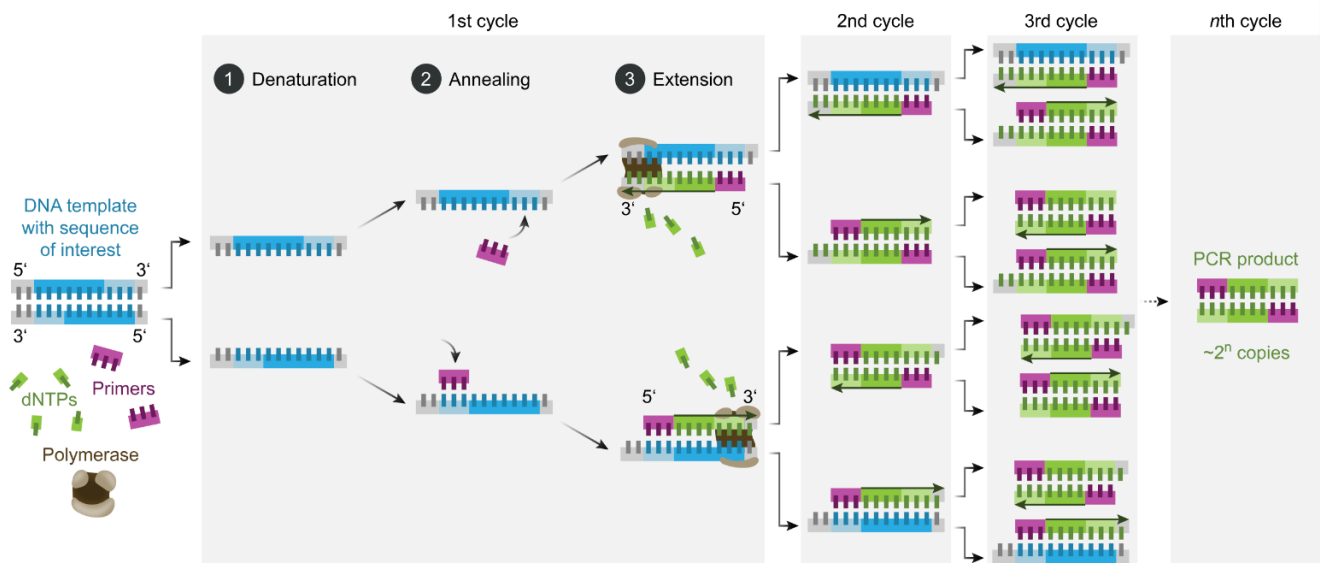
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί το προϊόν συγχώνευσης επαναλαμβανόμενων κύκλων σύνθεσης DNA και της δράσης μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, με σκοπό την γρήγορη ενίσχυση στοχευμένων αλληλουχιών DNA in vitro. Η εργαστηριακή αυτή μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή πολυάριθμων αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με τη βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), αποτελούμενων από 18-24 νουκλεοτίδια και συμπληρωματικών προς τα γνωστά άκρα της αλληλουχίας-στόχου. Η θερμοανθεκτική DNA

πολυμεράση (Taq polymerase από το βακτήριο *Thermus aquaticus*) αναγνωρίζει τους εκκινητές και εκκινεί τη σύνθεση των νέων αλυσίδων του DNA, χρησιμοποιώντας την συμπληρωματική τους αλυσίδα ως εκμαγείο.

Μια τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών βασικών σταδίων:

- I. **Αποδιάταξη του DNA-στόχου (denaturation):** Διαχωρισμός των δύο αλυσίδων της DNA μήτρας, με αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-95°C για 30 sec.
- II. **Υβριδισμός των εκκινητών (annealing):** Οι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των άκρων του αποδιαταγμένου DNA-στόχου, σε θερμοκρασία ($T_{\text{annealing}}, T_a$) περίπου 5°C χαμηλότερη από το σημείο τήξης τους (T_{melting}, T_m), συνήθως μεταξύ 55-65°C για 1 min.
- III. **Επιμήκυνση (extension):** Η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση εκκινεί τη σύνθεση των νέων αλυσίδων του DNA-στόχου, επιμηκώνοντας τους εκκινητές, σε θερμοκρασία περίπου 72°C για 30-60 sec.

Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων της αντίδρασης κυμαίνεται μεταξύ 30 και 40, ενώ ο υπολογισμός των τελικών παραγόμενων αντιγράφων προκύπτει από τον τύπο 2^n , όπου n ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων κύκλων. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται στους θερμικούς κυκλοποιητές, ειδικές εργαστηριακές συσκευές που ρυθμίζουν τη θερμοκρασία σε κυκλικά προγράμματα. Στα προγράμματα αυτά γίνεται η προσθήκη δύο επιπρόσθετων σταδίων, της αρχικής θέρμανσης των δειγμάτων στους 95°C και της τελικής επιμήκυνσης του προϊόντος στους 72°C.



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών σταδίων των επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιδράσεων της PCR. (Enzoklop CC-BY-SA-4.0)

3.6.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των κατάλληλων ζευγών εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου, μέσω της συμβατικής PCR και της PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR), πραγματοποιήθηκε με την χρήση των βιοπληροφορικών εργαλείων IDSeq της διαδικτυακής πλατφόρμας E-RNAi και PrimerQuest Tool της Integrated DNA Technologies (IDT) αντίστοιχα.

Ειδικότερα, το εργαλείο IDSeq αξιοποιήθηκε για τον σχεδιασμό ζεύγους εκκινητών, στο 5' άκρο των οποίων εντοπίζεται αλληλουχία 20 νουκλεοτιδίων του υποκινητή του βακτηριοφάγου T7 (taatacgaactcactataggg). Με την βοήθεια αυτών των εκκινητών, ενσωματώθηκε η παραπάνω

αλληλουχία στο προϊόν της συμβατικής PCR, με σκοπό την επακόλουθη παραγωγή μορίων δίκλωνου RNA με τη διαδικασία της *in vitro* μεταγραφής.

Όσον αφορά στον έλεγχο των εκκινητών ως προς την ομολογία και την ειδική πρόσδεση με την αλληλουχία-στόχο, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο primer blast της NCBI, ώστε να αποφευχθούν τα παραπροϊόντα κατά την ενίσχυση του γονιδίου. Τέλος, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των εκκινητών, αξιοποιήθηκε το OligoAnalyzer tool της IDT, το οποίο εξετάζει την δυνατότητα (ΔG) σχηματισμού ομοδιμερών και ετεροδιμερών δομών και την T_m ($^{\circ}C$) για τον σχηματισμό διατάξεων φουρκέτας (hairpins), εξαιτίας ενδομοριακής συμπληρωματικότητας. Σε κάθε περίπτωση, η T_m στην οποία δημιουργούνται hairpin πρέπει να είναι σημαντικά μικρότερη από την T_m των εκκινητών και το ΔG κάθε πιθανής δομής μεταξύ των εκκινητών να είναι μεγαλύτερο του -9.

Τα ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν ύστερα από την αξιολόγηση των ιδιοτήτων τους, καθώς και το μέγεθος του προϊόντος κάθε αντίδρασης (amplicon) παρουσιάζονται στον πίνακα.

Gene	Loc109407279: NW_021839020.1
Transcript length	765 bp
qPCR-Forward Primer	GACCCTATTGTGCCATCGAAT
qPCR-Reverse Primer	GTTGAGACATCGAATTGCAAGC
qPCR-amplicon/length	84 bp
T7-Forward Primer	taatacgactcactatagggTGTGCCACCGGAATTAT
T7-Reverse Primer	taatacgactcactatagggGAATAGGTAAGTACTACCCGCCA
T7-amplicon/length (without T7 tags)	370 bp

Base	Sequence
1	GATCGCCGTTATTGCTAAAAGACCCATTTGTGTCCATCGAATGGGTTTCGATGCAATGTCATCATCAGCC
71	CAGTTACTATATTTGCTTGCAATTCGATGTCTCAACATTATTATTAGATTTTAGTTAAAAGCCGTGTG
141	CCACCGCGAATTATCTCCTGACTTTTAACTTGTTTAACTACTATGCAAAAATAAAAAGTGTGAGTATTAA
211	ACATTTTCTGACGTACCATCGCGATGGTGTGATAGAATTGGATATCATCGTGATATTTCTCATATCATATC
281	TCTTTCAGACCAATCTCAAGGTGCCAATCCCTTAGACACATTTCTGTCTATCATCGTTCTCTAAAGGC
351	ATCATAATGGAGCTACCTCATTATATTTCCAATTCCTAAACTGCGCGCCAAACTAGGCAACATTTCTGGAG
421	TGAAATCTGTTGAGGCTCTGCAAGTGTGGTTTATAGAAGTAGCACAGATGAACGTGAAATTAGTGGCGGG
491	TGAGTACCTATTTCTGGATGATGTTCTTCAAATCTGACTGTGTCTCATGTTACTCCACTACCCATAGATGG
561	AACGGCCGATCAGGAGAAAATTTAGCCGCTGCCAAAGCTGTTGCTCGGGAAATACCGCATTCCGGAAGACT
631	TATGTACAAATAGATGAGATAGAATATAACCAAGATATATGAAAAGCGTGATGTGATGGGGTATGTGTA
701	CCATCGAAATAAGCCATTATAACAAGAACGAATGAAATGTTTATCCTTTAAAAGTTTACTTG

Εικόνα 18. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου NORMA19. Με πράσινο και κόκκινο χρώμα απεικονίζονται ο forward και ο reverse εκκινητής της συμβατικής PCR αντίστοιχα, ενώ με μπλε και πορτοκαλί χρώμα ο forward και ο reverse εκκινητής της qPCR.

3.6.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση T7 εκκινητών

Εκτός των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, τα βασικά συστατικά μιας συμβατικής PCR περιλαμβάνουν το DNA εκμαγείο (DNA template), την θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (Buffer) κατάλληλης συγκέντρωσης $MgCl_2$, απαραίτητο για την δράση της DNA πολυμεράσης, μίγμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) και αποστειρωμένο H_2O .

Για την ενίσχυση του γονιδίου μέσω συμβατικής PCR, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της KAPA Taq πολυμεράσης της εταιρίας KAPA Biosystems. Ο όγκος κάθε αντιδραστήριου προσαρμόστηκε σε αντίδραση τελικού όγκου 20μl, με βάση τον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος / αντίδραση
DNA template	-	(5-40 ng/μl)	0.5μl
KAPA Taq Buffer	10X	1X	2μl
Forward primer	10μM	0.4μM	0.6μl
Reverse primer	10μM	0.4μM	0.6μl
dNTPs mix	10mM / each	0.2mM / each	0,4μl
ddH₂O	-	-	15.8μl
KAPA Taq polymerase	5U/μl	0.5U	0.1

Για έναν μεγάλο αριθμό αντιδράσεων ενίσχυσης του ίδιου γονιδίου, δημιουργείται mix όλων των αντιδραστηρίων, εκτός του DNA template και του αρνητικού μάρτυρα, στο οποίο η Taq πολυμεράση προστίθεται τελευταία, ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη δραστηριότητά της. Τα στάδια του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζονται παρακάτω.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη DNA στόχου	95°C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	T _m - 5°C*	30 sec	35
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	1 min	
Τελικά επιμήκυνση	72°C	5 min	1
Συντήρηση	4°C	∞	

*Η θερμοκρασία υβριδισμού (T_a) των εκκινητών για την κλωνοποίηση του γονιδίου *NORMA19* ρυθμίστηκε στους 66.5°C, ενώ για την ενίσχυση του γονιδίου *GFP* που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς ρυθμίστηκε στους 61°C.

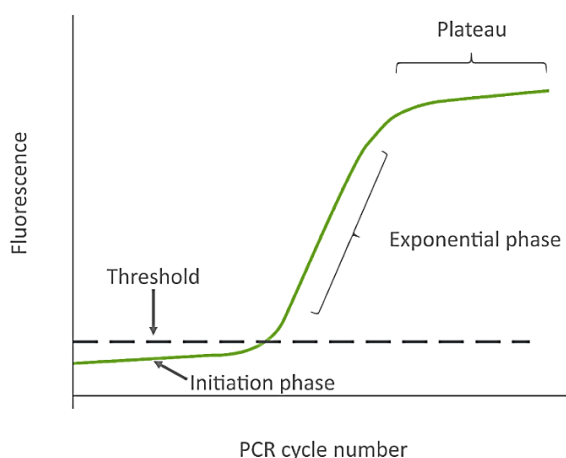
Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C για μελλοντική χρήση ή να ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση του επιθυμητής αλληλουχίας και στη συνέχεια, να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση της in vitro μεταγραφής.

3.6.3. PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή ποσοτική PCR (qPCR) αποτελεί μια μοριακή τεχνική ενίσχυσης και ποσοτικοποίησης μορίων DNA ή cDNA σε πραγματικό χρόνο, μέσω της ανίχνευσης φθορισμού μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης. Αυτό γίνεται εφικτό με την χρήση ειδικών φθορίζοντων χημικών ουσιών, όπως η SYBR Green I, οι οποίες παρεμβάλλονται μη ειδικά στη δίκλωνη έλικα του DNA και συσχετίζουν την συγκέντρωση του ενισχυμένου προϊόντος με την ένταση του φθορισμού.

Σε αντίθεση με την συμβατική PCR, η ποσοτική PCR παρέχει το πλεονέκτημα του καθορισμού του αρχικού αριθμού αντιγράφων της μήτρας DNA με υψηλή ευαισθησία. Η αρχική συγκέντρωση του DNA εκμαγείου είναι αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού του κύκλου της αντίδρασης C_T (threshold), στον οποίο το προϊόν ξεπερνά τα όρια ανίχνευσης του φθορισμού

(threshold ή κατώφλι). Το κατώφλι φθορισμού C_T σηματοδοτεί την αρχή της εκθετικής φάσης της ενίσχυσης (exponential phase), κατά την οποία το PCR προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, έως ότου καταναλωθούν τα συστατικά της αντίδρασης και αρχίσει η φάση του πλατό (plateau), κατά την οποία η ενίσχυση επιβραδύνεται.



Εικόνα 19. Τυπικό γράφημα ενίσχυσης της qPCR. (GoldBio, PCR overview)

Για να ελεγχθεί η πιθανότητα ενίσχυσης μη ειδικών προϊόντων, το τέλος της αντίδρασης qPCR ακολουθεί το στάδιο της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης, κατά την οποία τα δίκλινα μόρια θερμαίνονται σταδιακά μέχρι την αποδιάταξή τους. Οι προκύπτουσες καμπύλες τήξης (melting curves) προσδιορίζουν τη θερμοκρασία τήξης του κάθε προϊόντος ενίσχυσης, η οποία ισούται με την θερμοκρασία στην οποία ο ρυθμός μεταβολής του φθορισμού λαμβάνει τη μέγιστη τιμή και είναι χαρακτηριστική της αλληλουχίας του μορίου. Ως αποτέλεσμα, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του σήματος φθορισμού των μορίων-στόχων από αυτό των παρα-προϊόντων. Επιπλέον, για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεων χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας (Non Template Control, NTC) που περιέχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός του DNA εκμαγείου.

Η real-time PCR αξιοποιείται κατά κόρον στην ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων μέσω της ενίσχυσης cDNA. Για την κανονικοποίηση των δειγμάτων κατά τη μελέτη μεταβολών στα επίπεδα έκφρασης χρησιμοποιείται κάποιο γονίδιο αναφοράς, του οποίου η έκφραση παραμένει αμετάβλητη μεταξύ των συνθηκών του πειράματος. Τα γονίδια αυτά αναφέρονται ως ιδιοσυστάτα (house-keeping) και πρόκειται συνήθως για γονίδια του κυτταροσκελετού και του μεταβολισμού, όπως το *Rps17* που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Για τη μελέτη των αλλαγών γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου-στόχου, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου σε δείγματα cDNA από ιστούς ωθηκών πριν και μετά το γεύμα αίματος (σε 6 διαφορετικά χρονικά σημεία), καθώς και από ιστούς του θώρακα, του μεσεντέρου, των μαλιγγειανών σωληναρίων και του κεφαλιού των θηλυκών κουνουπιών. Η real-time PCR διεξήχθη σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή της εταιρίας Bio-Rad, ενώ η επακόλουθη ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε SYBR mix της εταιρίας KAPA Biosystems που περιέχει χρωστική SYBR green, DNA πολυμεράση, dNTPs και ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης $MgCl_2$. Ο υπολογισμός των απαραίτητων όγκων των συστατικών έγινε με τη βοήθεια του εργαλείου Master mix calculator του Bio-Rad CFX Manager σύμφωνα με τα παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος / αντίδραση
SYBR mix	2X	1X	7.5μl
Forward primer	10μM	0.2	0.3μl
Reverse primer	10μM	0.2	0.3μl
Template	-	-	4μl
ddH ₂ O	-	-	2.9μl
Total Volume			15μl

Η προσθήκη του cDNA γίνεται ξεχωριστά, ενώ για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια δημιουργείται κατάλληλο mix. Οι συνθήκες του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	15 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	10 sec	40
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C	20 sec	
Καμπύλη αποδιάταξης	60°C	5 sec	1

Για την εκτίμηση της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού T_a των εκκινητών του γονιδίου-στόχου (60°C) πραγματοποιήθηκε μία επιπρόσθετη αντίδραση PCR, γνωστή ως gradient PCR. Μέσω της gradient PCR, είναι δυνατή η επανάληψη της αντίδρασης ενίσχυσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού, με την εφαρμογή μίας θερμικής διαβάθμισης στο πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή, βάσει των θερμοκρασιών τήξης των qPCR εκκινητών (T_m). Κατ' αυτόν τον τρόπο, επιλέγεται η θερμοκρασία T_a στην οποία εξαλείφεται ο μεταγραφικός «θόρυβος», δηλαδή η ύπαρξη πολλαπλών κορυφών στο διάγραμμα των κορυφών τήξης (melt peak) της αντίδρασης, η οποία μπορεί να οφείλεται στην παρουσία παραπροϊόντων ή διμερών δομών των εκκινητών.

Αναφορικά με την ενίσχυση του γονιδίου *NORMA19*, η θερμοκρασία τήξης των qPCR εκκινητών ισούται με 63° C. Με βάση αυτή τη θερμοκρασία, εξετάστηκαν οι θερμοκρασίες 58 έως 62° C για την ενίσχυση του γονιδίου σε δείγματα cDNA ιστών ωοθηκών πριν και μετά το γεύμα αίματος. Από αυτές, επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 60° C ως η βέλτιστη T_a , εξαιτίας της ελαχιστοποίησης του μεταγραφικού «θορύβου», με την έλλειψη ωστόσο, μίας μοναδικής εμφανούς κορυφής που υποδηλώνει την δημιουργία πιθανών διμερών δομών των εκκινητών.

3.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδο οπτικοποίησης και απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στην «μετανάστευση» φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος, υπό την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση της ηλεκτροστατικής δύναμης προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου, με ταχύτητα ανάλογη του φορτίου και της μάζας τους, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να γίνεται κυρίως με βάση το μέγεθος.

Η επιλογή του υποστρώματος ηλεκτροφόρησης νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από το μέγεθος των διαχωριζόμενων τμημάτων. Για τον διαχωρισμό μορίων μεγαλύτερων των 100bp χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης, ενώ για μικρότερα τμήματα χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται μέσω της χρώσης με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μια φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του νουκλεϊκού οξέος και ανιχνεύεται υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Τέλος, ο προσδιορισμός του μεγέθους και της ποσότητας των διαχωριζόμενων τμημάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός μάρτυρα μοριακών βαρών (ladder), του οποίου οι ζώνες, γνωστού μοριακού μεγέθους και συγκέντρωσης, μπορούν να συγκριθούν με τις ζώνες των προς ανάλυση δειγμάτων.

Υλικά: Αγαρόζη / TBE 0.5x / loading dye 6x / ladder 100bp Enzyquest

Μέθοδος:

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης:

1. Ανάμειξη κατάλληλης ποσότητας αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (0.5x) σε κωνική φιάλη, για την επιθυμητή πυκνότητα του πηκτώματος, ανάλογα με το μέγεθος των διαχωριζόμενων μορίων.
2. Θέρμανση του μείγματος μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης και ψύξη της κωνικής φιάλης υπό συνεχή ανάδευση.
3. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 3-4μl/100ml πηκτώματος και σύντομη ανακίνηση για τη διαλυτοποίησή του.
4. Μεταφορά του διαλύματος σε ειδικό στεγανοποιημένο εκμαγείο με την προσαρμογή «χτενακίων» για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων.
5. Αναμονή μέχρι την στερεοποίηση του πηκτώματος (20-30'), αφαίρεση των «χτενακίων» και τοποθέτηση στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με παράλληλη προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE έως ότου καλυφθεί η επιφάνειά του.

Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Προσθήκη της χρωστικής φόρτωσης (loading dye 6x) στα προς ανάλυση δείγματα, ανάδευση και φόρτωση των δειγμάτων και του DNA ladder 100bp (4μl) στις ειδικές θέσεις υποδοχής του πηκτώματος.
2. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 120V (20-30') για ηλεκτροφόρηση DNA μορίων και 90V (10-15') για ηλεκτροφόρηση RNA μορίων.
3. Μετά τον τερματισμό της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV και παρατήρηση των μορίων ως φθορίζουσες ζώνες.

3.8. Ανάκτηση μορίων DNA από γέλη αγαρόζης (Gel extraction)

Η ανάκτηση μορίων DNA από γέλη αγαρόζης (gel extraction) επιτρέπει τον καθαρισμό και την απομόνωση των διαχωρισμένων τμημάτων, με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία και μελέτη τους, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Τα ειδικά kit αντιδράσεων ανάκτησης μορίων από πήκτωμα αγαρόζης, όπως το *NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit* της Macherey-Nagel, διαθέτουν πρωτόκολλα με τα ίδια βασικά στάδια: τήξη του πηκτώματος σε διάλυμα με ισοθειοκυανική γουανιδίνη, σύνδεση του DNA σε ειδική μεμβράνη υπό την επίδραση χαοτροπικών αλάτων και έκλυση του DNA με την προσθήκη ddH₂O ή ειδικού διαλύματος έκλυσης (elution buffer).

Υλικά: NT1 buffer / NT3 buffer / ddH₂O / Gel and PCR clean-up column & collection tube

Μέθοδος:

1. Εκτομή της ζώνης του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA, ύστερα από παρατήρηση με έκθεση σε ακτινοβολία UV, και τοποθέτηση σε tube τύπου erpendorf.
2. Υπολογισμός καθαρού βάρους της απομονωμένης ζώνης και προσθήκη 200μl διαλύματος Buffer NT1 ανά 100mg πηκτώματος.
3. Επώαση στους 50°C για 5-10' έως την πλήρη τήξη του πηκτώματος με συστηματική ανάδευση (vortex) ανά 2-3'.
4. Μεταφορά έως και 700μl του διαλύματος πηκτώματος/NT1 σε ειδική στήλη απομόνωσης (NucleoSpin Gel and PCR clean-up column) προσαρμοσμένη σε σωλήνα συλλογής (collection tube) και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1'.
*Επανάληψη του σταδίου στην περίπτωση περίσσειας διαλύματος.
5. Απόρριψη του εκλούσματος, προσθήκη 700μl διαλύματος Buffer NT3 (αναδιαλυμένο σε αιθανόλη) στη στήλη και φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1'.
6. Απόρριψη του προϊόντος έκλυσης και επανάληψη του βήματος 5.
7. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 5' και στέγνωμα της στήλης στους 70°C για 5', με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης.
8. Μεταφορά της στήλης σε νέο tube, προσθήκη 20-30μl ζεστού ddH₂O και επώαση για 5' σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1' για την έκλυση του DNA.
10. Απομάκρυνση της στήλης και αποθήκευση του DNA στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.9. Παραγωγή του dsRNA

Με τη μέθοδο της in vitro μεταγραφής (in vitro transcription) επιτυγχάνεται η κατευθυνόμενη από ένα εκμαγείο σύνθεση δίκλωνων μορίων RNA, εκτός των ορίων ενός κυτταρικού περιβάλλοντος. Η μεταγραφή πραγματοποιείται μέσω της δράσης μιας ειδικής RNA πολυμεράσης που αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες ενός υποκινητή βακτηριοφάγου, όπως ο T7 βακτηριοφάγος. Οι αλληλουχίες του υποκινητή τοποθετούνται, με την βοήθεια κατάλληλων PCR εκκινητών, ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου στο DNA εκμαγείο και αποτελούν το σημείο πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης, ώστε να αρχίσει η μεταγραφή.

3.9.1. In vitro transcription

Για την in vitro μεταγραφή της αλληλουχίας-στόχου έγινε χρήση της T7 RNA πολυμεράσης της εταιρίας Thermo fisher, καθώς και του αναστολέα ριβονουκλεασών RNaseOUT. Ως DNA εκμαγείο, χρησιμοποιήθηκε PCR προϊόν με τις φαγικές T7 αλληλουχίες στα 5' άκρα του. Για την μέγιστη απόδοση της αντίδρασης, συνιστάται 1.5μl T7 RNA πολυμεράσης (30U) για τη μεταγραφή 1μg PCR προϊόντος, σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl.

Υλικά: T7 RNA polymerase (30U/ul) / RNaseOUT αναστολέας ριβονουκλεασών (40U/ul) / PCR προϊόν / ATP/CTP/GTP/UTP mix (10mM each) / 5x transcription buffer / ddH₂O

Μέθοδος:

1. Απόψυξη των αντιδραστηρίων στον πάγο και καλή ανάδευση του DNA εκμαγείου και του transcription buffer.
2. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίων σε tube τύπου erpendorf, σύμφωνα με τους αναγραφόμενους όγκους αντιδραστηρίων ανά αντίδραση, στον παρακάτω πίνακα.

Όλοι οι χειρισμοί γίνονται στον πάγκο, σε θερμοκρασία δωματίου καθώς η σπερμιδίνη που περιέχεται στο buffer μπορεί να συγκατακρημνιστεί με το DNA).

3. Ήπια ανάδευση και επώαση στους 37°C για 2h.

Αντιδραστήριο	Όγκος/αντίδραση
5x Transcription buffer	10μl
ATP/GTP/CTP/UTP Mix, 10 mM each	10μl
Template DNA (PCR προϊόν)	1μg
RNaseOUT	1.25μl (40u)
T7 RNA polymerase	1.5μl (30u)
ddH ₂ O	Έως τα 50μl

3.9.2. Επεξεργασία με DNase (DNase treatment)

Για την πλήρη απομάκρυνση του DNA εκμαγείου, γίνεται επώαση του δείγματος με κατάλληλη ποσότητα του ενζύμου DNase I (2μl) στους 37°C για 15'. Για την επακόλουθη απενεργοποίηση των ενζύμων και τον τερματισμό της αντίδρασης, προστίθενται 2μl του χηλικού παράγοντα EDTA 50mM και το δείγμα επωάζεται στους 65°C για 10'.

Υλικά: Turbo DNase I (2U/ul) / EDTA 50mM pH 8.0

3.9.3. Κατακρήμνιση dsRNA

Η κατακρήμνιση του dsRNA αποτελεί το τελικό στάδιο πριν την απομόνωση του μεταγραφόμενου RNA και γίνεται με σκοπό την απομάκρυνση ρυθμιστικών διαλυμάτων, ενζύμων και περισσευούμενων αντιδραστηρίων.

Υλικά: Φαινόλη / χλωροφόρμιο / γλυκογόνο 10mg/ml / Sodium acetate 5mM / 100 % ice cold EtOH / 70 % ice cold EtOH / ddH₂O

Μέθοδος:

1. Προσθήκη στο δείγμα 150μl ddH₂O, 200μl φαινόλη/χλωροφόρμιο και γρήγορη ανάδευση μέχρι τη δημιουργία γαλακτώματος.
2. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10' και προσεκτική μεταφορά του υπερκειμένου, ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση, σε νέα erpendorf.
3. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου, γρήγορη ανάδευση μέχρι την δημιουργία γαλακτώματος και φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10'.
4. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα erpendorf, προσθήκη 2,5X του όγκου 100 % ice cold EtOH, 0.1X sodium acetate 5mM και 1μl γλυκογόνου για τη κατακρήμνιση του dsRNA υπό τη μορφή ιζήματος και τοποθέτηση στους -80°C για τουλάχιστον 1h.
5. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C σε 12000g για 30', απόρριψη υπερκειμένου και πλύση με 500μl 70% ice cold EtOH.
6. Φυγοκέντρηση στους 4°C σε 12000g για 10' και προσεκτική αφαίρεση υπερκειμένου ώστε να μην διαταραχθεί η πελέτα.
7. Στέγνωμα σε RT για 10-15'
8. Επαναδιάλυση σε 30μl ζεστού ddH₂O, έντονο vortex, spin down και μέτρηση της συγκέντρωσής του στο φασματοφωτόμετρο Quawell.
9. Διατήρηση δειγμάτων στους -80°C.

3.10. Χορήγηση του dsRNA: Μικροένεση

Η μέθοδος της μικροένεσης αξιοποιήθηκε για την χορήγηση κατάλληλων δίκλωνων μορίων RNA σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια, για την επαγωγή του μονοπατιού RNAi.

Υλικά: Γυάλινη βελόνα / Nanoject II / mineral oil / parafilm / dsRNA / 70% αιθανόλη

Μέθοδος:

1. Αναισθητοποίηση κουνουπιών μέσω της τοποθέτησης τους στο ψυγείο για 5' και στη συνέχεια, σε τριβλίο εκτεθειμένο σε πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της μικροένεσης.
2. Συναρμολόγηση και καθαρισμός της συσκευής μικροένεσης με 70% αιθανόλη.
3. Προετοιμασία της βελόνας με προσεκτικό σπάσιμο του άκρου της και γέμισμα με mineral oil.
4. Εισαγωγή βελόνας στη συσκευή μικροένεσης και γέμισμα με κατάλληλη ποσότητα dsRNA τοποθετημένο σε κομμάτι parafilm κάτω από το μικροσκόπιο.
5. Ρύθμιση συσκευής για την μικροένεση 64.4nl dsRNA ανά έγχυση.
6. Μικροένεση κουνουπιών με προσεκτική διάτρηση της επιδερμίδας τους, σε εύκολα προσεγγίσιμους ιστούς όπως ο θώρακας.
7. Τοποθέτηση κουνουπιών που έχουν υποβληθεί σε μικροένεση σε ξεχωριστό δοχείο και χορήγηση ζαχαρόνευρου.
8. Καθαρισμός και αποσυναρμολόγηση συσκευής μικροένεσης.
9. Παροχή γεύματος αίματος σε θηλυκά κουνούπια 24 ώρες μετά την χορήγηση του dsRNA.



Εικόνα 20. Συσκευή μικροένεσης.

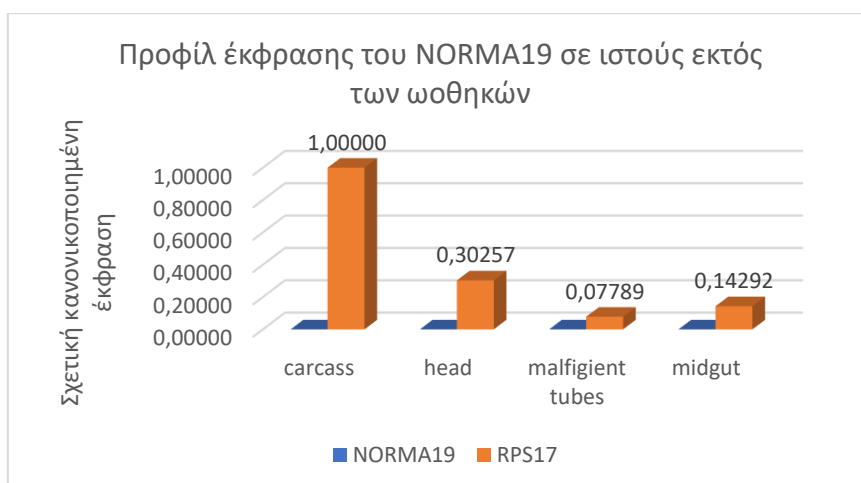
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χορήγησης των δίκλωνων μορίων RNA στα ενήλικα θηλυκά κουνούπια, ήταν απαραίτητη η μελέτη του προφίλ έκφρασης του γονιδίου-στόχου σε κουνούπια που δεν υπέστησαν κανένα είδος πειραματικής παρέμβασης (εν συντομία untreated). Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου σε δείγματα cDNA που δημιουργήθηκαν από ιστούς ενήλικων θηλυκών κουνουπιών, πριν και μετά το γεύμα αίματος, για τη μελέτη του γονιδίου *NORMA19*.

4.1.1. Έκφραση του *NORMA19* σε επίπεδο ιστών

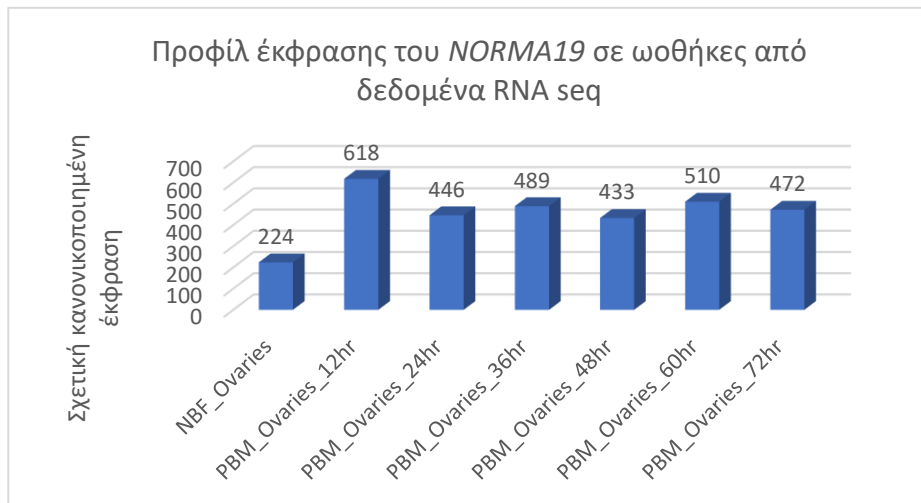
Σύμφωνα με την δημοσίευση των Gamez *et al.* (2020), το *NORMA19* αποτελεί ένα ιστοειδικό μη κωδικό γονίδιο, του οποίου η έκφραση περιορίζεται στους ιστούς των ωθηκών θηλυκών κουνουπιών. Για την επιβεβαίωση της ιστοειδικότητας του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε real-time PCR σε δείγματα ιστών του κεφαλιού (head), του μεσεντέρου (midgut), των μαλιγγειανών σωληναρίων (malfigient tubes) και του θώρακα (carcass) θηλυκών κουνουπιών, στα οποία η έκφραση του γονιδίου απουσιάζει. Ως γονίδιο αναφοράς (house-keeping) χρησιμοποιήθηκε το ριβοσωμικό γονίδιο *RPS17*.



Γράφημα 1. Σύγκριση επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *NORMA19* και του housekeeping *RPS17* σε ιστούς του θώρακα, του κεφαλιού, των μαλιγγειανών σωληναρίων και του μεσεντέρου.

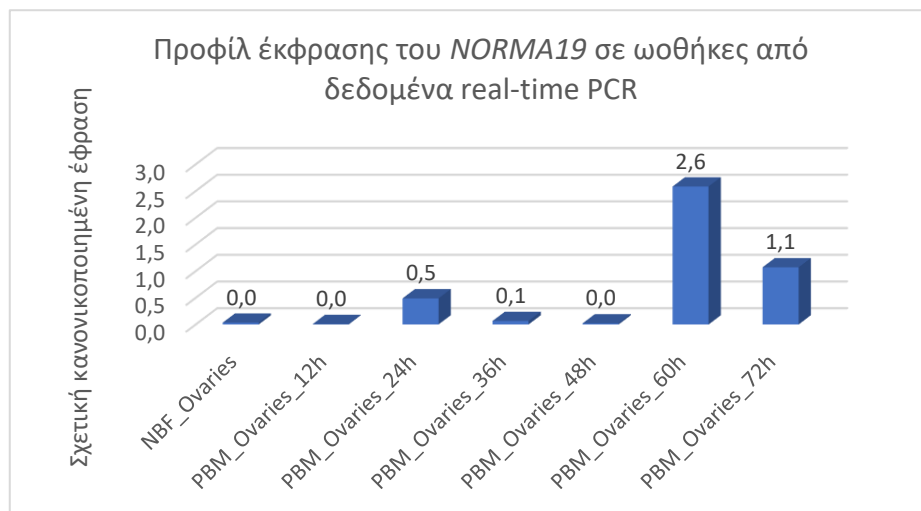
4.1.2. Έκφραση του *NORMA19* στις ωθήκες μετά το γεύμα αίματος

Από τα διαθέσιμα RNA seq δεδομένα της αναπτυξιακής μεταγραφικής ανάλυσης των Gamez *et al.* (2020), δημιουργήθηκε ένα προτεινόμενο προφίλ έκφρασης του γονιδίου *NORMA19* στις ωθήκες (ovaries) πριν (Non Blood Fed, NBF) και μετά το γεύμα αίματος (Post Blood Meal, PBM), και ειδικότερα, σε έξι διαφορετικές χρονικές στιγμές μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των ωθηκών στις 72h PBM. Σύμφωνα με αυτό, όπως φαίνεται στο Γράφημα 2, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NORMA19* λαμβάνουν τη μέγιστη τιμή τους στις 12h PBM.



Γράφημα 2. Βιβλιογραφικά δεδομένα RNA seq της έκφρασης του *NORMA19* σε ωθήκες πριν και σε 6 διαφορετικά time points μετά το γεύμα αίματος.

Για να επιβεβαιωθεί αυτό το προφίλ έκφρασης, πραγματοποιήθηκε real-time PCR σε δείγματα ωθηκών ενήλικων θηλυκών κουνουπιών στα ίδια χρονικά σημεία πριν και μετά το γεύμα αίματος, ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση του προτύπου αυξομείωσης των επιπέδων έκφρασης. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 3, το προφίλ έκφρασης διέφερε σημαντικά από εκείνο που προκύπτει από τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Σύμφωνα με τα δεδομένα της qPCR, η έκφραση του *NORMA19* απουσιάζει στις 12h PBM, ενώ λαμβάνει τα υψηλότερα επίπεδα στις 60h PBM. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την σταθερή έκφραση του ριβοσωμικού γονιδίου *RPS17* στις διαφορετικές χρονικές στιγμές.



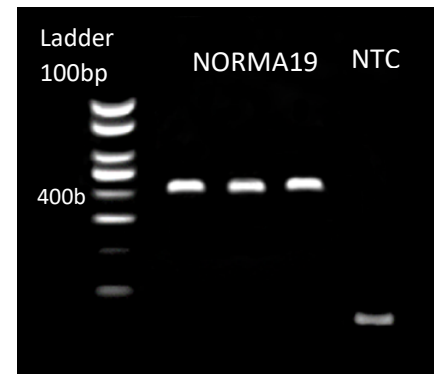
Γράφημα 3. Σχετική κανονικοποιημένη έκφραση του *NORMA19* σε ωθήκες πριν και σε 6 διαφορετικά time points μετά το γεύμα αίματος από δεδομένα real-time PCR.

4.2. Ενίσχυση γονιδίων-στόχων και επιβεβαίωσή της

Η ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης PCR με τους T7 εκκινητές, σύμφωνα με τις συνθήκες που παρουσιάζονται στην υποενότητα 3.6.2.. Εκτός του γονιδίου *NORMA19*, επιλέχθηκε και ενισχύθηκε το γονίδιο *GFP*, το οποίο αξιοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς, λόγω της απουσίας του στο γονιδίωμα του κουνουπιού *Ae. albopictus* και άρα, της αδυναμίας στόχευσής του, ώστε να εξακριβωθεί η αξιοπιστία του φαινοτύπου ύστερα από τη χορήγηση dsRNA.

4.2.1. Ενίσχυση του γονιδίου *NORMA19*

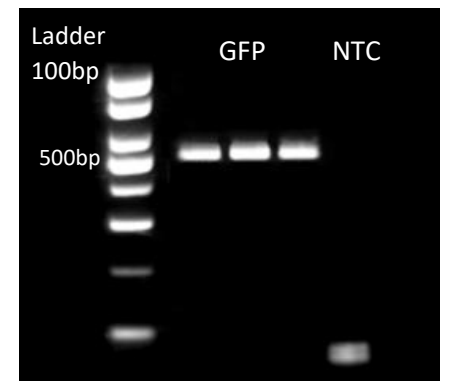
Η ενίσχυση του γονιδίου *NORMA19* έγινε μέσω τριών αντιδράσεων PCR και με τη χρήση των T7 εκκινητών που παρουσιάζονται στην υποενότητα 3.6.1.. Ως DNA εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA ενήλικων κουνουπιών, εξαιτίας της συμπληρωματικότητας μέρους του T7 reverse εκκινητή με αλληλουχία του δεύτερου ιντρονίου του γονιδίου. Για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης, το προϊόν κάθε αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, έπειτα από προσθήκη 4μl loading dye. Η προσθήκη 4μl από τον DNA ladder 100bp στην πρώτη θέση του πηκτώματος αποκάλυψε το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος της PCR, δηλαδή τα 410bp (370bp του amplicon του γονιδίου και 40bp της αλληλουχίας των T7 άκρων). Στην τελευταία θέση του πηκτώματος, έγινε προσθήκη του αρνητικού δείγματος control (NTC).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος με τη χρήση των T7 εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου *NORMA19*.

4.2.2. Ενίσχυση του γονιδίου *GFP*

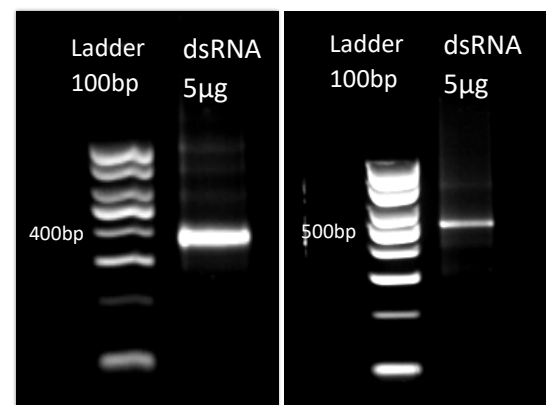
Η ενίσχυση του γονιδίου *GFP* επετεύχθη επίσης, μέσω τριών αντιδράσεων PCR και με τη χρήση των παρακάτω T7 εκκινητών: taatacgactcactatagggCCGCCAGTGTGCTGGAA (Forward) και taatacgactcactatagggGATATCTGCAGAATTCGCC (Reverse). Λόγω της απουσίας του από το *Ae. albopictus*, ως εκμαγείο της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος πλασμιδιακός φορέας που τον εκφράζει. Το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης αποτελεί 540bp (500bp του amplicon του γονιδίου και 40bp των T7 άκρων). Στην Εικόνα 22, παρουσιάζονται οι ζώνες ηλεκτροφόρησης του επιθυμητού προϊόντος, καθώς και του αρνητικού δείγματος control (NTC) στην πέμπτη θέση του πηκτώματος αγαρόζης 1.5%. Η στόχευση του γονιδίου *GFP*, το οποίο φυσιολογικά δεν υπάρχει στο γονιδίωμα των κουνουπιών, θα μας χρησιμεύσει ως treatment control για την ενεργοποίηση του μονοπατιού του RNAi.



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος με τη χρήση των T7 εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου *GFP*.

4.2.3. Παραγωγή dsRNA έναντι των *NORMA19* και *GFP*

Οι επιθυμητές ζώνες των προϊόντων ενίσχυσης των γονιδίων *NORMA19* και *GFP* απομονώθηκαν με τη βοήθεια του *NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit* και οι συγκεντρώσεις τους προσδιορίστηκαν μέσω του φασματοφωτομέτρου Quawell ως εξής: 176.3ng/μl και 188ng/μl αντίστοιχα. Από τα δείγματα αυτά και μέσω της διαδικασίας της in vitro μεταγραφής, παρήχθησαν δίκλιωνα RNA μόρια έναντι των γονιδίων *NORMA19* και *GFP*. Οι μετρημένες στο Quawell συγκεντρώσεις των μη αραιωμένων δειγμάτων dsRNA έναντι των *NORMA19* και *GFP* ήταν 6.9μg/μl και 10.1μg/μl αντίστοιχα. Στις Εικόνες 23-24, φαίνονται οι ζώνες ηλεκτροφόρησης των αραιωμένων δειγμάτων dsRNA (5μg/μl), κοντά στις 370 και 500 βάσεις, όπως αναμέναμε.



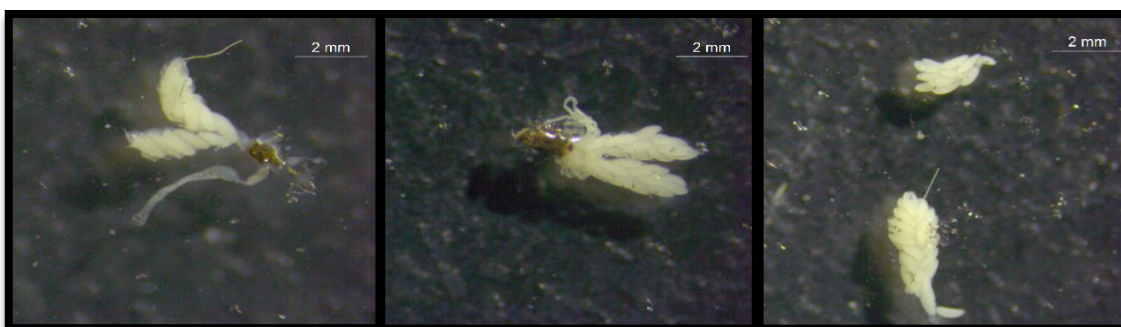
Εικόνες 23-24. Ηλεκτροφόρηση των αραιωμένων dsRNA (5μg/μl) έναντι του *NORMA19* και *GFP* αντίστοιχα, σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%.

4.3. Μικροένεση των dsRNA και παρατήρηση φαινοτύπου

Η χορήγηση των παραγόμενων μορίων dsRNA πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της μικροένεσης στον θώρακα ενήλικων θηλυκών κουνουπιών. Ο όγκος μικροέγχυσης ισούταν με 64,4nl dsRNA συγκέντρωσης 5μg/μl. Στη διαδικασία υποβλήθηκαν δύο διακριτές ομάδες κουνουπιών, στις οποίες έγινε μικροένεση του dsRNA έναντι των γονιδίων *NORMA19* και *GFP*, αντίστοιχα, ενώ για την σύγκριση των αποτελεσμάτων αξιοποιήθηκε και μία τρίτη ομάδα untreated κουνουπιών ανεπτυγμένων στις ίδιες συνθήκες, ως control group για τον έλεγχο της επίδρασης της διαδικασίας της μικροένεσης. Από τα επιζώντα κουνούπια, προέκυψαν περίπου 30 βιολογικά αντίγραφα για κάθε ομάδα, στα οποία χορηγήθηκε γεύμα αίματος. Για την μελέτη της επίδρασης της γονιδιακής σίγησης του *NORMA19*, παρατηρήθηκε η μορφολογία των ωοθηκών ορισμένων βιολογικών αντιγράφων κάθε ομάδας στις 60h PBM (Post Blood Meal), καθώς και η ικανότητα ωοαπόθεσης και το ποσοστό εκκόλαψης των εναπομεινάντων κουνουπιών.

4.3.1. Μορφολογία ωοθηκών

Δεδομένου ότι η έκφραση του *NORMA19* κορυφώνεται στις 60h PBM στα κουνούπια του πειραματικού πληθυσμού, η συγκεκριμένη χρονική στιγμή επιλέχθηκε για την αφαίρεση και παρατήρηση των ωοθηκών των μισών βιολογικών αντιγράφων κάθε ομάδας κουνουπιών, ώστε να εξεταστεί η πιθανή επίδραση της γονιδιακής σίγησης στην ανάπτυξή τους.



Εικόνες 23-27. Ωοθήκες untreated κουνουπιών στις 60h PBM.



Εικόνες 28-30. Ωοθήκες κουνουπιών χορηγημένων με dsRNA έναντι του *NORMA19* στις 60h PBM.



Εικόνες 31-33. Ωοθήκες κουνουπιών χορηγημένων με dsRNA έναντι του *GFP* στις 60h PBM.

Στις Εικόνες 25-33, παρουσιάζονται ενδεικτικά οι ωθήκες τριών βιολογικών αντιγράφων untreated κουνουπιών και κουνουπιών που χορηγήθηκαν με dsRNA έναντι του *NORMA19* (*anti-N19 treated*) και του *GFP* (*anti-GFP treated*) αντίστοιχα, των οποίων η μορφολογία φαίνεται να μην διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων. Οι ωθήκες αυτές στη συνέχεια, υποβλήθηκαν στη διαδικασία της απομόνωσης RNA που παρουσιάζεται στην υποενότητα 3.2, με απώτερο στόχο την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *NORMA19* μέσω της real-time PCR για την επιβεβαίωση της μεταγραφικής του σίγησης.

4.3.2. Ικανότητα ωαπόθεσης - Ποσοστό εκκόλαψης των αυγών

Για την περαιτέρω διερεύνηση του φαινοτύπου των κουνουπιών που υποβλήθηκαν σε μικροένωση dsRNA έναντι του *NORMA19*, εξετάστηκε επίσης, η ικανότητα απόθεσης των αυγών (ικανότητα ωαπόθεσης) μετά τη πλήρη ανάπτυξη των ωθηκών, καθώς και το ποσοστό της εκκόλαψής τους. Για το σκοπό αυτό, τα εναπομείναντα 15 βιολογικά αντίγραφα κάθε ομάδας κουνουπιών (*anti-N19 treated*, *anti-GFP treated* και *Untreated*) τοποθετήθηκαν στις 72h PBM σε ξεχωριστά δοχεία με κομμάτι διηθητικού χαρτιού, το οποίο διατηρούσε το απαραίτητο ποσοστό υγρασίας, λόγω της επαφής του με υγροποιημένο βαμβάκι στην κάτω πλευρά. Τα δοχεία διατηρήθηκαν σε σκοτεινό περιβάλλον για 24h και έπειτα, ακολούθησε η καταμέτρηση των αυγών. Στη συνέχεια, τα κομμάτια διηθητικού χαρτιού με τα εναποτεθειμένα αυγά κάθε βιολογικού αντιγράφου τοποθετήθηκαν εκ νέου σε ξεχωριστά δοχεία με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος θρεπτικού υποστρώματος και ξηράς γατοτροφής, με σκοπό την εκτίμηση του ρυθμού εκκόλαψης των αυγών. Ύστερα από 24h, πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των εκκολλαπτόμενων αυγών. Ο αριθμός των εναποτεθειμένων αυγών και ο αριθμός των αναδύομενων προνυμφών των βιολογικών αντιγράφων κάθε ομάδας παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

anti-N19 treated			anti-GFP treated			Untreated		
Βιολογικό αντίγραφο	Αριθμός αυγών	Αριθμός προνυμφών	Βιολογικό αντίγραφο	Αριθμός αυγών	Αριθμός προνυμφών	Βιολογικό αντίγραφο	Αριθμός αυγών	Αριθμός προνυμφών
1	33	10	1	0		1	0	
2	4	0	2	23	0	2	22	22
3	18	0	3	21	0	3	40	24
4	13	0	4	0		4	17	0
5	64	26	5	3		5	55	17
6	48	3	6	0		6	34	18
7	8	0	7	82	0	7	39	15
8	58	5	8	2	0	8	49	33
9	28	0	9	4	1	9	54	10
10	63	11	10	0		10	47	14
11	0		11	17	0	11	60	7
12	0		12	0		12	47	2
13	0		13	64	56	13	16	11
14	0		14	0		14	61	20
15	0		15	38	21	15	0	

Οι ωθήκες των κουνουπιών με μηδενικό αριθμό εναποτιθέμενων αυγών αφαιρέθηκαν και παρατηρήθηκαν υπό το μικροσκόπιο, ώστε να εξεταστεί η μορφολογία των ωοθυλακίων τους. Ως επί το πλείστον, οι ωθήκες διέθεταν φυσιολογική διαμόρφωση, με εξαίρεση ενός untreated και ενός anti-GFP treated κουνουπιού, των οποίων οι ωθήκες δεν είχαν αναπτυχθεί πλήρως, όπως φαίνεται στις εικόνες 34-35.

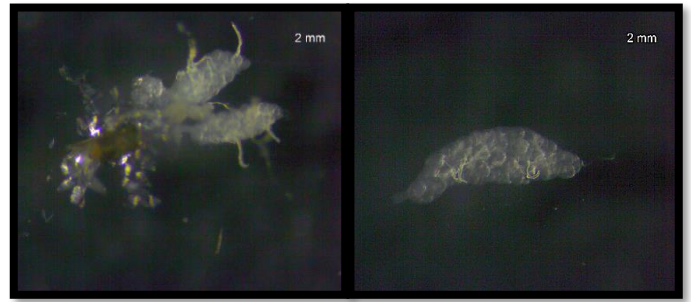
Το ποσοστό εκκόλαψης των αυγών (hatching rate) υπολογίστηκε ως ο συνολικός αριθμός των αναδυόμενων προνυμφών προς τον συνολικό αριθμό εναποτεθειμένων αυγών κάθε ομάδας κουνουπιών:

$$\text{hatching rate} = \frac{\text{Αναδυόμενες προνύμφες}}{\text{Εναποτεθειμένα αυγά}} \times 100\%$$

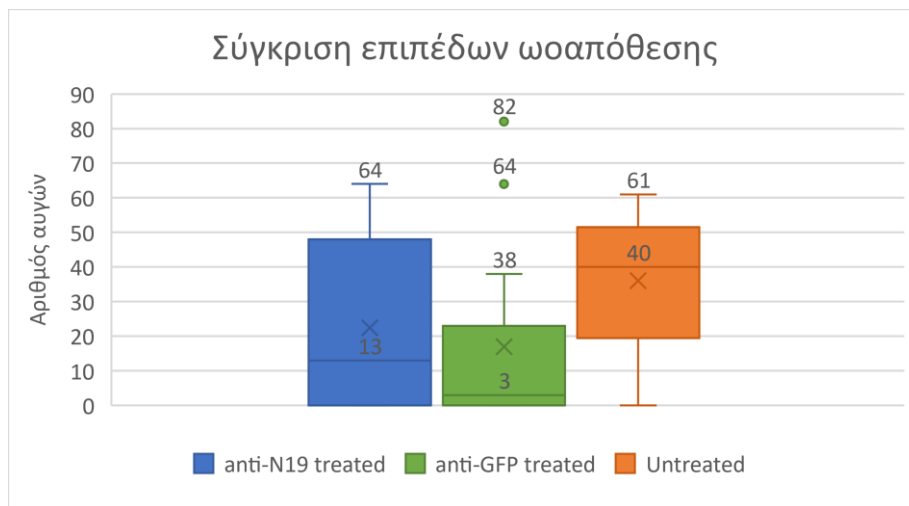
Σύμφωνα με αυτό, το ποσοστό εκκόλαψης για κάθε ομάδα κουνουπιών ισούται με:

16.3% για τα anti-N19 treated, 30.7% για τα anti-GFP treated και 35.6% για τα untreated κουνούπια.

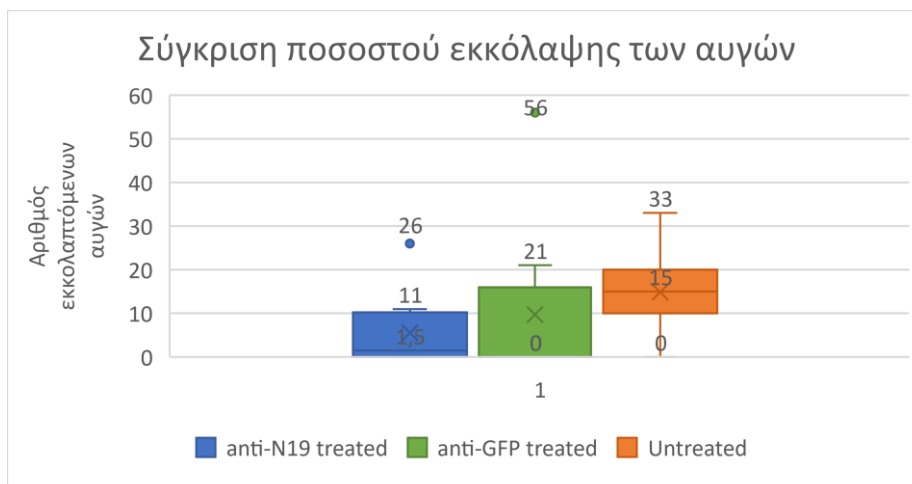
Στα παρακάτω γραφήματα, αποτυπώνεται η σύγκριση των επιπέδων ωοαπόθεσης και του ποσοστού εκκόλαψης των αυγών μεταξύ των anti-N19 treated, των anti-GFP treated και των untreated κουνουπιών.



Εικόνες 24-35. Ωοθήκες anti-GFP treated κουνουπιού και untreated κουνουπιού αντίστοιχα, με μηδενικά επίπεδα ωοαπόθεσης.



Γράφημα 4. Διάγραμμα διασποράς των εναποτιθέμενων αυγών κάθε ομάδας βιολογικών αντιγράφων, στο οποίο αναγράφονται οι μέσες και οι ακραίες τιμές.



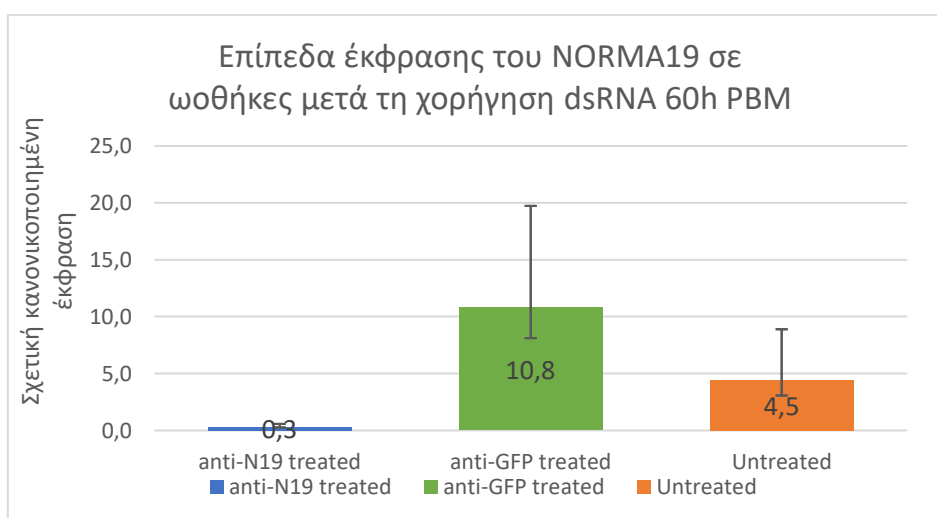
Γράφημα 5. Διάγραμμα διασποράς των αναδυόμενων προνυμφών κάθε ομάδας βιολογικών αντιγράφων, στο οποίο αναγράφονται οι μέσες και οι ακραίες τιμές.

4.4. Επιβεβαίωση μεταγραφικής σίγησης του *NORMA19*

Για την επιβεβαίωση της μεταγραφικής σίγησης του γονιδίου *NORMA19* μετά τη χορήγηση μορίων dsRNA έναντι αυτού, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA, σύνθεση cDNA και real-time PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Στην διαδικασία υποβλήθηκαν ιστοί ωθηκών anti-N19 treated, anti-GFP treated και untreated κουνουπιών, οι οποίοι αφαιρέθηκαν και παρατηρήθηκαν 60h μετά το γεύμα αίματος (Ενότητα 4.4.1.). Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή επιλέχθηκε με γνώμονα το προφίλ έκφρασης του *NORMA19*, όπως αυτό αποτυπώνεται από τα δεδομένα real-time PCR που διεξήχθη σε δείγματα ωθηκών ενήλικων θηλυκών κουνουπιών (Ενότητα 4.1.2.), σύμφωνα με το οποίο το γονίδιο λαμβάνει τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης στις 60h PBM.

Στο Γράφημα 6, παρουσιάζονται τα μέσα σχετικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NORMA19* που προέκυψαν από 13 anti-N19 treated βιολογικά αντίγραφα, 11 anti-GFP treated βιολογικά αντίγραφα και 10 untreated βιολογικά αντίγραφα, όπου οι δύο τελευταίες ομάδες αξιοποιήθηκαν ως control group. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την σταθερή έκφραση του ριβοσωμικού γονιδίου *RPS17* στις 60h PBM.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της real-time PCR, η μέση έκφραση του γονιδίου *NORMA19* στις anti-N19 treated ωθήκες είναι σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη μέση έκφραση των untreated ωθηκών, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό γονιδιακής σίγησης υπολογίστηκε ως 93,3%, αρκετά μεγαλύτερο από αυτό που αναμενόταν. Επιπλέον, τα προκύπτοντα μέσα επίπεδα έκφρασης του *NORMA19* δεν θα έπρεπε να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των anti-GFP treated και untreated ωθηκών, καθώς η χορήγηση του dsRNA έναντι του *GFP* δεν δύναται να προκαλέσει γονιδιακή σίγηση. Εντούτοις, η μέση έκφραση του γονιδίου *NORMA19* στις anti-GFP treated ωθήκες είναι διπλάσια της μέσης έκφρασης των untreated ωθηκών, γεγονός που θέτει υπό αμφισβήτηση την αποδοτικότητα της πειραματικής μεθόδου και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η σύγκριση του παραπάνω ποσοστού σίγησης του *NORMA19* με το αντίστοιχο ποσοστό στις anti-GFP ωθήκες έναντι των untreated ωθηκών δεν έχει νόημα εξαιτίας των τύπων έκφρασης. Στο γράφημα παρουσιάζεται ακόμη, η απόκλιση από τις μέσες τιμές γονιδιακής έκφρασης.



Γράφημα 6. Σύγκριση επιπέδων έκφρασης του *NORMA19* 60h PBM σε ιστούς ωθηκών μετά τη χορήγηση dsRNA έναντι του *NORMA19* (anti-N19 treated) και του *GFP* (anti-GFP treated), καθώς και σε ιστούς untreated ωθηκών. Τα error bars αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα απόκλισης από τις μέσες τιμές.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η περίπτωση του *Aedes albopictus* αντιπροσωπεύει ένα από παράδειγμα μιας ταχείας και επιτυχημένης εισβολής, καθοδηγούμενης από υψηλές πιέσεις εξάπλωσης και ευρεία γενετική ποικιλότητα. Λόγω της επιδημιολογικής του σημασίας, αλλά και της ιδιότητάς του ως χωροκατακτητικό είδος, το ασιατικό κουνούπι τίγρης καθιστά αναγκαία την αύξηση της διαθέσιμης πληροφορίας σχετικά με την αναπαραγωγική βιολογία του, η οποία μπορεί δυνητικά να εξυπηρετήσει τον σχεδιασμό εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον και πιο αποτελεσματικών μεθόδων πληθυσμιακού ελέγχου. Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην μελέτη μίας ιδιαίτερης τάξης γονιδίων, η οποία επιλέχθηκε εξαιτίας των συσσωρευόμενων δεδομένων για τον ρυθμιστικό τους χαρακτήρα σε διάφορες βιολογικές διεργασίες της αναπαραγωγής, του μεταβολισμού και της αύξησης πολυάριθμων οργανισμών. Την τάξη αυτή συνιστούν τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs), τα οποία προσφέρουν το πλεονέκτημα της εξαιρετικά χαμηλής συντήρησης, ακόμα και μεταξύ συγγενικών ειδών, αποτελώντας έτσι ιδανικά υποψήφια γονίδια-στόχους για την δημιουργία ειδο-ειδικών μεθόδων καταπολέμησης του πληθυσμού.

Η επιλογή του γονιδίου που αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας βασίστηκε στη δημοσίευση των Gamez *et al.* (2020), η οποία παρέχει το πλήρες μεταγράφημα του *Ae. albopictus* στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του κύκλου ζωής του κουνουπιού. Από τη λίστα των γονιδίων που προέκυψε από μεταγραφομικά δεδομένα RNA seq, διακρίθηκαν τα μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα, των οποίων η έκφραση εξειδικεύεται αποκλειστικά στις ωοθήκες των θηλυκών κουνουπιών και αυξάνεται διακριτά μετά το γεύμα αίματος. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας, τους αποδόθηκε το όνομα *NORMA* (*Non-coding RNAs in Mosquito Ovaries*). Ένα από τα γονίδια αυτά αποτέλεσε το γονίδιο στόχο του κύκλου πειραμάτων που διεξήχθη, το οποίο ονομάστηκε *NORMA19*. Ο κωδικός του εν λόγω γονιδίου στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων NCBI, βάσει του πιο πρόσφατου assembly (Aalbo_primary.1), είναι ο XR_002129586.2. Με πρότυπο αυτό το assembly, σχεδιάστηκαν κατάλληλα ζεύγη εκκινητών, με σκοπό την αποτελεσματική ενίσχυση του γονιδίου και την απουσία παραπροϊόντων ενίσχυσης.

Για την ανάλυση του προφίλ έκφρασης του *NORMA19* πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου σε δείγματα ιστών ωοθηκών ενήλικων θηλυκών κουνουπιών πριν (NBF) και σε έξι χρονικές στιγμές, ανά 12h, μετά το γεύμα αίματος (PBM), μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των ωοθηκών στις 72h PBM. Σύμφωνα με τα προκύπτοντα δεδομένα της qPCR, η έκφραση του *NORMA19* απουσιάζει πριν το γεύμα αίματος και έως τις 24h PBM, ενώ στις 60h PBM αυξάνεται απότομα, λαμβάνοντας τα υψηλότερα επίπεδά της. Αυτή η απότομη αύξηση της γονιδιακής έκφρασης στις 60h μετά το γεύμα αίματος αποτελεί μία πιθανή ένδειξη κάποιου ρυθμιστικού ρόλου του γονιδίου στην αναπαραγωγική ικανότητα του κουνουπιού και ειδικότερα, της δυνητικά στενής σχέσης της γονιδιακής του ρύθμισης με το γεύμα αίματος. PCR πραγματικού χρόνου διεξήχθη και σε cDNA ιστών του θώρακα, των μαλπιγγειανών σωληναρίων, του μεσεντέρου και της κεφαλής ενήλικων θηλυκών κουνουπιών, στους οποίους η έκφραση του *NORMA19* φάνηκε να απουσιάζει, επιβεβαιώνοντας την ιστο-ειδική έκφραση του γονιδίου.

Για την διαλεύκανση του πιθανού ρυθμιστικού ρόλου του γονιδίου, επιστρατεύτηκε η μέθοδος της γονιδιακής σίγησης μέσω επαγωγής της παρεμβολής RNA. Για την επίτευξή της, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για το γονίδιο *NORMA19* με προσαρμοσμένες T7 αλληλουχίες στα άκρα τους, με σκοπό την επακόλουθη αναγνώρισή τους από την T7 πολυμεράση στον προϊόν ενίσχυσης της PCR και τη σύνθεση ενός δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA). Μετά την μικροένεση του dsRNA έναντι του *NORMA19* σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια

(anti-N19 treated) και την επαγωγή του μονοπατιού RNAi στα κύτταρα των ωοθηκών, έγινε χορήγηση γεύματος αίματος και στη συνέχεια, παρατήρηση του φαινοτύπου. Λόγω της αυξημένης έκφρασης του *NORMA19* στις 60h PBM, η συγκεκριμένη χρονική στιγμή επιλέχθηκε για την αφαίρεση και εξέταση της μορφολογίας των ωοθηκών σε έναν ορισμένο αριθμό βιολογικών αντιγράφων, ενώ στις 72h PBM, εξετάστηκαν η ικανότητα ωοαπόθεσης και ο ρυθμός εκκόλαψης των αυγών των υπόλοιπων επιζώντων της μικροένεσης κουνουπιών. Παράλληλα, για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, αξιοποιήθηκαν ως control δύο διαφορετικές ομάδες βιολογικών αντιγράφων, ανεπτυγμένων στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες με τα anti-N19 treated κουνούπια, από τις οποίες η μία χορηγήθηκε με dsRNA έναντι του γονιδίου αναφοράς GFP (anti-GFP treated), ενώ η δεύτερη δεν υπέστη κανένα είδος πειραματικής παρέμβασης (untreated).

Αναφορικά με τη μορφολογία των ωοθηκών στις 60h PBM, ο φαινότυπος δεν παρουσίασε κάποια ιδιαίτερη διαφοροποίηση μεταξύ των τριών ομάδων βιολογικών αντιγράφων, καθώς οι ωοθήκες διέθεταν παρόμοιο μέγεθος, χρωματισμό και ποσοστό διαφάνειας, τα οποία αντιστοιχούν σε ισοδύναμο στάδιο ανάπτυξης. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην απουσία κάποιου ρυθμιστικού ρόλου του γονιδίου *NORMA19* και άρα, της επίδρασης της σίγησής του στην μορφολογική ανάπτυξη των ωοθηκών, είτε στη χορήγηση ανεπαρκούς ποσότητας dsRNA στα κύτταρα των ωοθηκών (64,4nl διαλύματος 5μg/μl), με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η υπέρβαση της ουδού δόσης-απόκρισης (αποκαλούμενη ως dose-effect) ως προς τη σίγηση του γονιδίου, στην περίπτωση που η ουδός αυτή υπάρχει.

Όσον αφορά στην ικανότητα ωοαπόθεσης των κουνουπιών στις 72h PBM, μετά την πλήρη ανάπτυξη των ωοθηκών, έγινε σύγκριση του αριθμού των αυγών ανά θηλυκό κουνούπι μεταξύ 15 βιολογικών αντιγράφων κάθε ομάδας. Σε αντίθεση με τη μορφολογία των ωοθηκών, υπήρξε εξαιρετικά μεγάλη διακύμανση μεταξύ των συλλεγμένων δεδομένων, καθώς οι μέσες τιμές του αριθμού των αυγών ανά βιολογικό δείγμα ήταν 13, 3 και 40 για τα anti-N19 treated, anti-GFP treated και untreated κουνούπια, αντίστοιχα. Ακολούθως, τα ίδια αυγά εξετάστηκαν ως προς το ποσοστό εκκόλαψιμότητας, το οποίο ορίστηκε ως ο συνολικός αριθμός αναδυόμενων προνυμφών προς τον συνολικό αριθμό αποτιθέμενων αυγών κάθε ομάδας κουνουπιών. Βάσει αυτού, το ποσοστό εκκόλαψης προέκυψε ως 16,3% για τα anti-N19 treated, 30,7% για τα anti-GFP treated και 35,6% για τα untreated κουνούπια. Τα αρχικά αποτελέσματα του ποσοστού εκκόλαψης στα anti-NORMA19 έντομα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των treated εντόμων και των δύο control group. Ωστόσο, η διαφοροποίηση στην ικανότητα ωοαπόθεσης μεταξύ των anti-GFP treated και των untreated κουνουπιών καθιστά αμφισβητήσιμη την αξιοπιστία τους.

Η επεξήγηση της ποικιλομορφίας των φαινοτυπικών γνωρισμάτων και ειδικότερα, της ικανότητας ωοαπόθεσης και του ποσοστού εκκόλαψης, μπορεί να πραγματοποιηθεί με γνώμονα δύο άξονες. Πρώτον, δεδομένου ότι η ίδια η διαδικασία της μικροένεσης ενέχει αστάθμητους παράγοντες που ενδεχομένως επιδρούν στην ακεραιότητα των ιστών, την ισότιμη κατανομή του dsRNA και το ποσοστό επαγωγής της παρεμβολής RNA, η σίγηση του γονιδίου-στόχου αναμένεται να πραγματοποιείται σε διαφορετικά επίπεδα στα κύτταρα των ωοθηκών των διάφορων βιολογικών δειγμάτων. Σε αυτό μπορεί να οφείλεται η μεγάλη διακύμανση του αριθμού των αποτιθέμενων αυγών και των αναδυόμενων προνυμφών μεταξύ των βιολογικών αντιγράφων των anti-N19 treated κουνουπιών. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η φαινοτυπική διακύμανση μεταξύ των βιολογικών αντιγράφων αυτής της ομάδας, μπορεί να αποδίδεται στη χορήγηση ανεπαρκούς ποσότητας του διαλύματος dsRNA, με αποτέλεσμα οι απώλειες ποσότητας, λόγω της άνισης κατανομής του dsRNA στα κύτταρα των ωοθηκών, να οδηγούν στην επαγωγή του μονοπατιού RNAi σε μερικά μόνο από αυτά.

Δεύτερον, η προκύπτουσα διαφορά στην εκκολαψιμότητα των αυγών μεταξύ των anti-NORMA19 κουνουπιών και των κουνουπιών των δύο control ομάδων, σε συνδυασμό με τη φυσιολογική μορφολογία των ωοθηκών και στις τρεις ομάδες βιολογικών αντιγράφων, μπορεί να υποδεικνύει ότι ενώ το *NORMA19* εκφράζεται στα κύτταρα των ωοθηκών κατά τη πορεία ανάπτυξής τους, εκτελεί πιθανώς τη λειτουργία του στη ζυγωτική κυτταρική σειρά (maternal deposition), ρυθμίζοντας τη μετάβαση από το αυγό στο ζυγωτό ή την πρώιμη εμβρυογένεση. Έτσι, παρόλο που η γονιδιακή σίγηση δεν επιφέρει κάποια μεταβολή στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων, η απουσία της δράσης του *NORMA19* σε κάποιο πρώιμο εμβρυϊκό αναπτυξιακό στάδιο δύναται να καθυστερήσει ή ακόμη, να αναστείλει την εκκόλαψη των αναπτυσσόμενων αυγών. Δεδομένων των παρατηρούμενων φαινοτύπων, σε συνδυασμό με την πλειοτροπική δράση των lncRNA μεταγράφων, η υπόθεση αυτή αποτελεί έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση.

Σε κάθε περίπτωση, εξαιτίας του μικρού αριθμού κουνουπιών που απεβίωσαν μετά τη μικροένεση, είτε λόγω λανθασμένων χειρισμών είτε λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών, ο αριθμός των εξεταζόμενων βιολογικών δειγμάτων ήταν αρκετά μικρός ώστε να είναι απόλυτα ενδεικτικός του φαινοτύπου. Για τον λόγο αυτό, είναι αναγκαίος ένας νέος κύκλος πειραμάτων με περισσότερα βιολογικά αντίγραφα, με σκοπό την εξακρίβωση της φαινοτυπικής επίδρασης της γονιδιακής σίγησης του *NORMA19*. Τέλος, η αξιοσημείωτα μειωμένη ικανότητα ωοαπόθεσης (ή και επιβίωσης) των αυγών της ομάδας των anti-GFP treated κουνουπιών αποδίδεται πιθανότατα στις εργαστηριακές περιβαλλοντικές συνθήκες της περιόδου εκτροφής τους, χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο της επίδρασης της διαδικασίας της μικροένεσης στην ικανότητα ωοαπόθεσης των κουνουπιών.

Η ανάγκη επανάληψης της πειραματικής διαδικασίας υποστηρίζεται και από το παρατηρούμενο προφίλ έκφρασης του *NORMA19* στις ωοθήκες που αφαιρέθηκαν στις 60h PBM μετά τη χορήγηση του dsRNA. Από την PCR πραγματικού χρόνου, η οποία διεξήχθη ύστερα από εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA ιστών ωοθηκών και των τριών ομάδων βιολογικών αντιγράφων, προέκυψαν αμφιλεγόμενα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, ενώ η μέση έκφραση του γονιδίου *NORMA19* στις anti-N19 treated ωοθήκες ήταν αρκετά χαμηλότερη από την αντίστοιχη μέση έκφραση στις untreated ωοθήκες, όπως ήταν αναμενόμενο λόγω γονιδιακής σίγησης, η μέση έκφραση του ίδιου γονιδίου στις anti-GFP treated ωοθήκες αντίθετα, υπερέβαινε σε εξαιρετικά μεγάλο βαθμό την αντίστοιχη μέση έκφραση των untreated ωοθηκών. Δεδομένου ότι δεν υπήρχε κάποιο τεχνικό λάθος στην διεξαγωγή της qPCR, καθώς τα C_T μεταξύ των technical replicates δεν απείχαν μεταξύ τους παραπάνω από μισό κύκλο, η διαφοροποίηση μεταξύ των anti-GFP treated και untreated ωοθηκών υποδηλώνει κάποιον πιθανό λανθασμένο χειρισμό στην διαδικασία δημιουργίας των δειγμάτων που υποβίβασε την ποιότητά τους. Επιπλέον, σε συνδυασμό με την παρουσία μεταγραφικού «θορύβου» λόγω της δημιουργίας διμερών δομών των qPCR εκκινήτων, είναι αναγκαίος και ο επανέλεγχος της ποιότητας και της ποσότητας cDNA σε αυτά, καθώς μπορεί να αποδειχτούν ακατάλληλοι για την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου.

Ένας νέος κύκλος πειραμάτων γονιδιακής σίγησης σε μεγαλύτερο πληθυσμό βιολογικών δειγμάτων αναμένεται να διαλευκάνει τις αιτίες των παραπάνω φαινοτυπικών παρατηρήσεων και να αποκρυπτογραφήσει το δυναμικό του lncRNA γονιδίου *NORMA19* ως ρυθμιστικό παράγοντα στην αναπαραγωγική βιολογία του κουνουπιού *Ae. albopictus*. Μία δυναμικά θετική έκβαση αυτού του νέου πειραματικού κύκλου ως προς την επίδραση του γονιδίου στην ικανότητα ωοαπόθεσης ή την εκκόλαψη και ανάπτυξη των αυγών, θα μπορούσε να αποτελέσει βάση για την εξέταση της συνδυαστικής δράσης της γονιδιακής σίγησης περισσότερων *NORMA* γονιδίων, καθώς και της πλήρους σίγησης (knock-out) των γονιδίων αυτών, προς αναζήτηση

πιο εντυπωσιακών φαινοτυπικών επιδράσεων. Τέλος, η μελέτη των πιθανών τρόπων δράσης των εν λόγω lncRNA γονιδίων, ενδεχομένως μέσω της εξέτασης υποψήφιων γονιδίων στόχων, θα ωφελούσε μια ευρύτερη κοινότητα ερευνητών, οι οποίοι εξειδικεύονται στην εξιχνίαση της στενής αλληλεπίδρασης της ιδιαίτερης αυτής τάξης γονιδίων με το αναπαραγωγικό σύστημα πολυάριθμων οργανισμών και την αξιοποίηση της σε σύγχρονες, ειδο-ειδικές, εντομολογικές προσεγγίσεις.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adeyinka OS, Riaz S, Toufiq N, Yousaf I, Bhatti MU, Batcho A, Olajide AA, Nasir IA, Tabassum B. Advances in exogenous RNA delivery techniques for RNAi-mediated pest control. *Mol Biol Rep.* 2020 Aug;47(8):6309-6319. doi: 10.1007/s11033-020-05666-2. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32696345.
- Agusto FB, Bewick S, Parshad RD. Mosquito management in the face of natural selection. *Math Biosci.* 2012 Sep;239(1):154-68. doi: 10.1016/j.mbs.2012.05.001. Epub 2012 May 19. PMID: 22617381.
- Ahmed AM. Mosquito autogeny in *Aedes caspius* (Diptera: Culicidae): alterations of larval nourishments reservation upon bacterial infection. *Insect Sci.* 2013 Aug;20(4):472-84. doi: 10.1111/j.1744-7917.2012.01544.x. Epub 2012 Sep 4. PMID: 23955943.
- Akbari OS, Antoshechkin I, Amrhein H, Williams B, Diloreto R, Sandler J, Hay BA. The developmental transcriptome of the mosquito *Aedes aegypti*, an invasive species and major arbovirus vector. *G3 (Bethesda).* 2013 Sep 4;3(9):1493-509. doi: 10.1534/g3.113.006742. PMID: 23833213; PMCID: PMC3755910.
- Allman MJ, Fraser JE, Ritchie SA, Joubert DA, Simmons CP, Flores HA. *Wolbachia's* Deleterious Impact on *Aedes aegypti* Egg Development: The Potential Role of Nutritional Parasitism. *Insects.* 2020 Oct 27;11(11):735. doi: 10.3390/insects11110735. PMID: 33120915; PMCID: PMC7692218.
- Alphey L. Genetic control of mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 2014;59:205-24. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162002. Epub 2013 Oct 18. PMID: 24160434.
- Arshad F, Sharma A, Lu C, Gulia-Nuss M. RNAi by Soaking *Aedes aegypti* Pupae in dsRNA. *Insects.* 2021 Jul 13;12(7):634. doi: 10.3390/insects12070634. PMID: 34357293; PMCID: PMC8307132.
- Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005 Jul;35(7):661-75. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.02.013. Epub 2005 Mar 28. PMID: 15894184.
- Azlan A, Halim MA, Mohamad F, Azzam G. Identification and characterization of long noncoding RNAs and their association with acquisition of blood meal in *Culex quinquefasciatus*. *Insect Sci.* 2021 Aug;28(4):917-928. doi: 10.1111/1744-7917.12847. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32621332.
- Azlan A, Obeidat SM, Yunus MA, Azzam G. Systematic identification and characterization of *Aedes aegypti* long noncoding RNAs (lncRNAs). *Sci Rep.* 2019 Aug 21;9(1):12147. doi: 10.1038/s41598-019-47506-9. PMID: 31434910; PMCID: PMC6704130.
- Badieritakis E, Papachristos D, Latinopoulos D, Stefopoulou A, Kolimenakis A, Bithas K, Patsoula E, Beleri S, Maselou D, Balatsos G, Michaelakis A. *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitol Res.* 2018 Feb;117(2):453-460. doi: 10.1007/s00436-017-5721-6. Epub 2017 Dec 23. PMID: 29275504.
- Balakrishna Pillai A, Nagarajan U, Mitra A, Krishnan U, Rajendran S, Hoti SL, Mishra RK. RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Mol Biol.* 2017 Apr;26(2):127-139. doi: 10.1111/imb.12282. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27991710.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):356-63. doi: 10.1038/nature02874. PMID: 15372043.
- Benelli G, Wilke ABB, Beier JC. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito). *Trends Parasitol.* 2020 Nov;36(11):942-943. doi: 10.1016/j.pt.2020.01.001. Epub 2020 Feb 6. PMID: 32037135.

- Bernard D, Prasanth KV, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z, Zhang MQ, Sedel F, Jourden L, Couplier F, Triller A, Spector DL, Bessis A. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *EMBO J*. 2010 Sep 15;29(18):3082-93. doi: 10.1038/emboj.2010.199. Epub 2010 Aug 20. PMID: 20729808; PMCID: PMC2944070.
- Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA. Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep*. 2002 Sep;3(9):852-6. doi: 10.1093/embo-reports/kvf180. Epub 2002 Aug 16. PMID: 12189180; PMCID: PMC1084233.
- Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*. 1992 Oct 30;71(3):527-42. doi: 10.1016/0092-8674(92)90520-m. PMID: 1423611.
- Brown JB, Boley N, Eisman R, May GE, Stoiber MH, Duff MO, Booth BW, Wen J, Park S, Suzuki AM, Wan KH, Yu C, Zhang D, Carlson JW, Cherbas L, Eads BD, Miller D, Mockaitis K, Roberts J, Davis CA, Frise E, Hammonds AS, Olson S, Shenker S, Sturgill D, Samsonova AA, Weiszmann R, Robinson G, Hernandez J, Andrews J, Bickel PJ, Carninci P, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Lai EC, Oliver B, Perrimon N, Graveley BR, Celniker SE. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome. *Nature*. 2014 Aug 28;512(7515):393-9. doi: 10.1038/nature12962. PMID: 24670639; PMCID: PMC4152413.
- Camilleri-Robles C, Amador R, Klein CC, Guigó R, Corominas M, Ruiz-Romero M. Genomic and functional conservation of lncRNAs: lessons from flies. *Mamm Genome*. 2022 Jun;33(2):328-342. doi: 10.1007/s00335-021-09939-4. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35098341; PMCID: PMC9114055.
- Chen MJ, Chen LK, Lai YS, Lin YY, Wu DC, Tung YA, Liu KY, Shih HT, Chen YJ, Lin YL, Ma LT, Huang JL, Wu PC, Hong MY, Chu FH, Wu JT, Li WH, Chen CY. Integrating RNA-seq and ChIP-seq data to characterize long non-coding RNAs in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*. 2016 Mar 11;17:220. doi: 10.1186/s12864-016-2457-0. PMID: 26969372; PMCID: PMC4787191.
- Choudhary C, Sharma S, Meghwanshi KK, Patel S, Mehta P, Shukla N, Do DN, Rajpurohit S, Suravajhala P, Shukla JN. Long Non-Coding RNAs in Insects. *Animals (Basel)*. 2021 Apr 14;11(4):1118. doi: 10.3390/ani11041118. PMID: 33919662; PMCID: PMC8069800.
- Cooper AM, Silver K, Zhang J, Park Y, Zhu KY. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci*. 2019 Jan;75(1):18-28. doi: 10.1002/ps.5126. Epub 2018 Aug 13. PMID: 29931761.
- Cui G, Zhong S, Zheng T, Li Z, Zhang X, Li C, Hemming-Schroeder E, Zhou G, Li Y. *Aedes albopictus* life table: environment, food, and age dependence survivorship and reproduction in a tropical area. *Parasit Vectors*. 2021 Nov 7;14(1):568. doi: 10.1186/s13071-021-05081-x. PMID: 34743753; PMCID: PMC8573987.
- Day CA, Armstrong EG, Byrd BD. Population Growth Rates of *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae) Are Depressed at Lower Temperatures Where *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) Are Naturally Abundant in Rock Pools. *J Med Entomol*. 2021 Jan 12;58(1):493-497. doi: 10.1093/jme/tjaa183. PMID: 32865211.
- Dittmer J, Alafndi A, Gabrieli P. Fat body-specific vitellogenin expression regulates host-seeking behaviour in the mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS Biol*. 2019 May 9;17(5):e3000238. doi: 10.1371/journal.pbio.3000238. PMID: 31071075; PMCID: PMC6508604.
- Faraji A, Unlu I. The Eye of the Tiger, the Thrill of the Fight: Effective Larval and Adult Control Measures Against the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in North America. *J Med Entomol*. 2016 Sep;53(5):1029-47. doi: 10.1093/jme/tjw096. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27354440.
- Farooqui T, Robinson K, Vaessin H, Smith BH. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5370-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-12-05370.2003. PMID: 12832563; PMCID: PMC6741157.
- Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet*. 2014 Jan;15(1):7-21. doi: 10.1038/nrg3606. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24296535.
- Fikrig K, Harrington LC. Understanding and interpreting mosquito blood feeding studies: the case of *Aedes albopictus*. *Trends Parasitol*. 2021 Nov;37(11):959-975. doi: 10.1016/j.pt.2021.07.013. Epub 2021 Sep 6. PMID: 34497032.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11. doi: 10.1038/35888. PMID: 9486653.

- Gamez S, Antoshechkin I, Mendez-Sanchez SC, Akbari OS. The Developmental Transcriptome of *Aedes albopictus*, a Major Worldwide Human Disease Vector. *G3 (Bethesda)*. 2020 Mar 5;10(3):1051-1062. doi: 10.1534/g3.119.401006. PMID: 31964684; PMCID: PMC7056973.
- Ghosh SKB, Hunter WB, Park AL, Gundersen-Rindal DE. Double-stranded RNA Oral Delivery Methods to Induce RNA Interference in Phloem and Plant-sap-feeding Hemipteran Insects. *J Vis Exp*. 2018 May 4;(135):57390. doi: 10.3791/57390. PMID: 29782023; PMCID: PMC6101104.
- Golicz AA, Bhalla PL, Singh MB. lncRNAs in Plant and Animal Sexual Reproduction. *Trends Plant Sci*. 2018 Mar;23(3):195-205. doi: 10.1016/j.tplants.2017.12.009. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29395831.
- Graf J, Kretz M. From structure to function: Route to understanding lncRNA mechanism. *Bioessays*. 2020 Dec;42(12):e2000027. doi: 10.1002/bies.202000027. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33164244.
- Gulia-Nuss M, Elliot A, Brown MR, Strand MR. Multiple factors contribute to anautogenous reproduction by the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 2015 Nov;82:8-16. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.08.001. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26255841; PMCID: PMC4630150.
- He C, Wang K, Gao Y, Wang C, Li L, Liao Y, Hu K, Liang M. Roles of Noncoding RNA in Reproduction. *Front Genet*. 2021 Dec 9;12:777510. doi: 10.3389/fgene.2021.777510. PMID: 34956326; PMCID: PMC8695933.
- Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol*. 2016;937:3-17. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1. PMID: 27573892.
- Hombach S, Kretz M. The non-coding skin: exploring the roles of long non-coding RNAs in epidermal homeostasis and disease. *Bioessays*. 2013 Dec;35(12):1093-100. doi: 10.1002/bies.201300068. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24115003.
- Hu L, Yang C, Hui Y, Yu J. Mosquito Control Based on Pesticides and Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia*. *Bull Math Biol*. 2021 Apr 13;83(5):58. doi: 10.1007/s11538-021-00881-9. PMID: 33847843; PMCID: PMC8043933.
- Huang JH, Lee HJ. RNA interference unveils functions of the hypertrehalosemic hormone on cyclic fluctuation of hemolymph trehalose and oviposition in the virgin female *Blattella germanica*. *J Insect Physiol*. 2011 Jul;57(7):858-64. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.012. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21439292.
- Humann FC, Tiberio GJ, Hartfelder K. Sequence and expression characteristics of long noncoding RNAs in honey bee caste development--potential novel regulators for transgressive ovary size. *PLoS One*. 2013 Oct 31;8(10):e78915. doi: 10.1371/journal.pone.0078915. PMID: 24205350; PMCID: PMC3814967.
- Jensen TH, Jacquier A, Libri D. Dealing with pervasive transcription. *Mol Cell*. 2013 Nov 21;52(4):473-84. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.032. PMID: 24267449.
- Jones RT, Ant TH, Cameron MM, Logan JG. 2021 Novel control strategies for mosquito-borne diseases. *Phil. Trans. R. Soc. B* 376: 20190802. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0802>
- Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):1017-26. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81725-0. PMID: 9875855.
- Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018 Jan 25;172(3):393-407. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.011. PMID: 29373828; PMCID: PMC5978744.
- Kumar SS, Puttaraju HP. Improved microinjection technique for mosquito vectors. *Indian J Med Res*. 2012 Dec;136(6):971-8. PMID: 23391792; PMCID: PMC3612326.
- Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*. 2013 Mar;193(3):651-69. doi: 10.1534/genetics.112.146704. PMID: 23463798; PMCID: PMC3583990.
- Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 15;4(9):e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23. PMID: 26372022; PMCID: PMC4877448.
- Li D, Zhang J, Wang Y, Liu X, Ma E, Sun Y, Li S, Zhu KY, Zhang J. Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: molecular characteristics and functional differentiation. *Insect Biochem Mol Biol*. 2015 Mar;58:46-54. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.01.004. Epub 2015 Jan 24. PMID: 25623241.
- LI M, XIAO H, He K, LI F. Progress and prospects of noncoding RNAs in insects. *Journal of Integrative Agriculture*. 2019. 18. 729-747. 10.1016/S2095-3119(18)61976-8.
- Lin YH. Crosstalk of lncRNA and Cellular Metabolism and Their Regulatory Mechanism in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 22;21(8):2947. doi: 10.3390/ijms21082947. PMID: 32331347; PMCID: PMC7215767.

- Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol.* 2015 Jan 7;60:537-59. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020828. PMID: 25564745.
- Long Y, Wang X, Youmans DT, Cech TR. How do lncRNAs regulate transcription?. *Sci Adv.* 2017;3(9):eaao2110. Published 2017 Sep 27. doi:10.1126/sciadv.aao2110
- Lopez SBG, Guimarães-Ribeiro V, Rodriguez JVG, Dorand FAPS, Salles TS, Sá-Guimarães TE, Alvarenga ESL, Melo ACA, Almeida RV, Moreira MF. RNAi-based bioinsecticide for *Aedes* mosquito control. *Sci Rep.* 2019 Mar 11;9(1):4038. doi: 10.1038/s41598-019-39666-5. PMID: 30858430; PMCID: PMC6411920.
- Lu Y, Park Y, Gao X, Zhang X, Yao J, Pang YP, Jiang H, Zhu KY. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. *Sci Rep.* 2012;2:288. doi: 10.1038/srep00288. Epub 2012 Feb 27. PMID: 22371826; PMCID: PMC3286809.
- Luz C, Tai MH, Santos AH, Silva HH. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Mar;103(2):214-5. doi: 10.1590/s0074-02762008000200016. PMID: 18425277.
- Maeda RK, Sitnik JL, Frei Y, Prince E, Gligorov D, Wolfner MF, Karch F. The lncRNA male-specific abdominal plays a critical role in *Drosophila* accessory gland development and male fertility. *PLoS Genet.* 2018 Jul 16;14(7):e1007519. doi: 10.1371/journal.pgen.1007519. PMID: 30011265; PMCID: PMC6067764.
- Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A. Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature.* 2007 Feb 8;445(7128):666-70. doi: 10.1038/nature05519. Epub 2007 Jan 21. PMID: 17237763.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):343-9. doi: 10.1038/nature02873. PMID: 15372041.
- Mishra P, Kumar S. Association of lncRNA with regulatory molecular factors in brain and their role in the pathophysiology of schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2021 Jun;36(5):849-858. doi: 10.1007/s11011-021-00692-w. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33608830.
- Morlando M, Ballarino M, Fatica A. Long Non-Coding RNAs: New Players in Hematopoiesis and Leukemia. *Front Med (Lausanne).* 2015 Apr 14;2:23. doi: 10.3389/fmed.2015.00023. PMID: 25927065; PMCID: PMC4396502.
- Ndiath MO. Insecticides and Insecticide Resistance. *Methods Mol Biol.* 2019;2013:287-304. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9_18. PMID: 31267507.
- Ngoagouni C, Kamgang B, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasit Vectors.* 2015 Mar 31;8:191. doi: 10.1186/s13071-015-0808-3. PMID: 25885461; PMCID: PMC4381565.
- Nicholson AJ. Memoirs: The Development of the Ovary and Ovarian Egg of a Mosquito, *Anopheles maculipennis*, Meig. *J Cell Sci* 1 August 1921; s2-65 (259): 395–448. doi:
- Nimmo D. (n.d.). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Life cycle, biology and distribution. *Oxford Insect Technologies*. Retrieved from: http://www.genewatch.org/uploads/f03c6d66a9b354535738483c1c3d49e4/appen_4__doc_4.pdf
- OECD, *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 8: OECD Consensus Document of the Biology of Mosquito Aedes aegypti*, Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, OECD Publishing, 2018 Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264302235-en>.
- Oliveira S, Rocha J, Sousa CA. *et al.* Wide and increasing suitability for *Aedes albopictus* in Europe is congruent across distribution models. *Sci Rep* 11, 9916 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89096-5>
- Parks JJ & Larsen JR. *A Morphological Study of the Female Reproductive System and Follicular Development in the Mosquito Aedes aegypti* (*L Trans Am Microsc Soc.* 1965 Jan;84:88-98. PMID: 14269883.
- Parry R, James ME, Asgari S. Uncovering the Worldwide Diversity and Evolution of the Virome of the Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Microorganisms.* 2021;9(8):1653. Published 2021 Aug 3. doi:10.3390/microorganisms9081653
- Pereira-Dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, Paupy C. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses?. *Pathogens.* 2020;9(4):266. Published 2020 Apr 7. doi:10.3390/pathogens9040266

- Piccolomini AM, Whiten SR, Flenniken ML, O'Neill KM, Peterson RKD. Acute Toxicity of Permethrin, Deltamethrin, and Etofenprox to the Alfalfa Leafcutting Bee. *J Econ Entomol*. 2018 May 28;111(3):1001-1005. doi: 10.1093/jee/toy014. PMID: 29444244.
- Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*. 2016 Jan;17(1):47-62. doi: 10.1038/nrg.2015.10. PMID: 26666209.
- Raikhel AS. Vitellogenesis in Mosquitoes. *Advances in Disease Vector Research*. 1992. 1–39. doi:10.1007/978-1-4612-2910-0_1
- Reichetzeder C. Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. *Eur J Clin Nutr* 75, 1710–1722 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00905-6>
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129(7):1311-1323. doi:10.1016/j.cell.2007.05.022
- Rogers K. "Aedes". *Encyclopedia Britannica*, 19 Jul. 2019, <https://www.britannica.com/animal/Aedes>. Accessed 8 June 2022.
- Salehi S, Taheri MN, Azarpira N, Zare A, Behzad-Behbahani A. State of the art technologies to explore long non-coding RNAs in cancer. *J Cell Mol Med*. 2017 Dec;21(12):3120-3140. doi: 10.1111/jcmm.13238. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28631377; PMCID: PMC5706582.
- Sanscrainte ND, Waits CM, Geden CJ, Estep AS, Becnel JJ. Reproducible dsRNA Microinjection and Oviposition Bioassay in Mosquitoes and House Flies. *J Vis Exp*. 2018 Nov 8;(141). doi: 10.3791/58650. PMID: 30474641.
- Santos-Ortega Y, Flynt A. Double-Strand RNA (dsRNA) Delivery Methods in Insects: *Diaphorina citri*. *Methods Mol Biol*. 2022;2360:253-277. doi: 10.1007/978-1-0716-1633-8_19. PMID: 34495520; PMCID: PMC8959005.
- Sasmita HI, Tu WC, Bong LJ, Neoh KB. Effects of larval diets and temperature regimes on life history traits, energy reserves and temperature tolerance of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): optimizing rearing techniques for the sterile insect programmes. *Parasit Vectors*. 2019 Dec 10;12(1):578. doi: 10.1186/s13071-019-3830-z. PMID: 31823817; PMCID: PMC6905064.
- Schnell JR, HJ Dyson, and PE Wright, 2004 Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 119–140.
- Schoenberg D, Maquat L. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* 13, 246–259 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Scholte EJ & Schaffner F. 14. Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. In book: *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. 2007 Jan; doi.org/10.3920/978-90-8686-626-7
- Silver K, Cooper AM, Zhu KY. Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci*. 2021 Jun;77(6):2645-2658. doi: 10.1002/ps.6277. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33440063.
- Spurlock CF 3rd, Crooke PS 3rd, Aune TM. Biogenesis and Transcriptional Regulation of Long Noncoding RNAs in the Human Immune System. *J Immunol*. 2016 Dec 15;197(12):4509-4517. doi: 10.4049/jimmunol.1600970. PMID: 27913643; PMCID: PMC5140008.
- Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Feb;22(2):96-118. doi: 10.1038/s41580-020-00315-9. Epub 2020 Dec 22. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Jan 8;: PMID: 33353982; PMCID: PMC7754182.
- Taniue K, Akimitsu N. The Functions and Unique Features of LncRNAs in Cancer Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 10;22(2):632. doi: 10.3390/ijms22020632. PMID: 33435206; PMCID: PMC7826647
- Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998 Oct 29;395(6705):854. doi: 10.1038/27579. PMID: 9804418.
- Tsao IY, Lin US, Christensen BM, Chen CC. *Armigeres subalbatus* prophenoloxidase III: Cloning, characterization and potential role in morphogenesis. *Insect Biochem Mol Biol*. 2009 Feb;39(2):96-104. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.10.007. Epub 2008 Nov 1. PMID: 19013240.
- Tsujimoto H, Hanley KA, Sundararajan A, Devitt NP, Schilkey FD, Hansen IA. Dengue virus serotype 2 infection alters midgut and carcass gene expression in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One*. 2017 Feb 2;12(2):e0171345. doi: 10.1371/journal.pone.0171345. Erratum in: *PLoS One*. 2018 Jan 25;13(1):e0192128. PMID: 28152011; PMCID: PMC5289563.

- Ulitsky I. Evolution to the rescue: using comparative genomics to understand long non-coding RNAs. *Nat Rev Genet.* 2016 Oct;17(10):601-14. doi: 10.1038/nrg.2016.85. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27573374.
- Valzania L, Mattee MT, Strand MR, Brown MR. Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. *Dev Biol.* 2019 Oct 1;454(1):85-95. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.05.011. Epub 2019 May 30. PMID: 31153832; PMCID: PMC6717557.
- Vedelek V, Bodai L, Grézal G, Kovács B, Boros IM, Laurinyecz B, Sinka R. Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome. *BMC Genomics.* 2018 Sep 24;19(1):697. doi: 10.1186/s12864-018-5085-z. PMID: 30249207; PMCID: PMC6154878.
- Wang J, Song YX, Ma B, et al. Regulatory Roles of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):19886-19919. Published 2015 Aug 21. doi:10.3390/ijms160819886
- Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 2011 Sep 16;43(6):904-14. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.018. PMID: 21925379; PMCID: PMC3199020.
- Wang Y, Chang J, Liu X, et al. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY).* 2016;8(11):2915-2926. doi:10.18632/aging.101100
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63. doi:10.1038/nrg2484
- Whyard S, Erdelyan CN, Partridge AL, Singh AD, Beebe NW, Capina R. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasit Vectors.* 2015 Feb 12;8:96. doi: 10.1186/s13071-015-0716-6. PMID: 25880645; PMCID: PMC4331333.
- Xiao H, Yuan Z, Guo D, Hou B, Yin C, Zhang W, Li F. Genome-wide identification of long noncoding RNA genes and their potential association with fecundity and virulence in rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *BMC Genomics.* 2015 Oct 5;16:749. doi: 10.1186/s12864-015-1953-y. PMID: 26437919; PMCID: PMC4594746.
- Xu Y, Dong Y, Xu Y, Lai Z, Jin B, Hao Y, Gao Y, Sun Y, Chen XG, Gu J. Differentiation of Long Non-Coding RNA and mRNA Expression Profiles in Male and Female *Aedes albopictus*. *Front Genet.* 2019 Oct 14;10:975. doi: 10.3389/fgene.2019.00975. PMID: 31681418; PMCID: PMC6802003.
- Yadav K, Dhiman S, Acharya B, Ghorpade RR, Sukumaran D (2019) Pyriproxyfen treated surface exposure exhibits reproductive disruption in dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 13(11): e0007842. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007842>
- Young RS, Marques AC, Tibbit C, Haerty W, Bassett AR, Liu J-L, Ponting CP (2012) Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol Evol* 4:427-442. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs020>
- Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J, Cappelle K, Caccia S, Huvenne H, Smaghe G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Sci.* 2013 Feb;20(1):4-14. doi: 10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x. Epub 2012 Jul 5. PMID: 23955821.
- Zettel C, Kaufman P. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension. 2009 Feb. <https://edis.ifas.ufl.edu> for the currently supported version of this publication.
- Zhang D, Xiong M, Xu C, Xiang P, Zhong X. (2016) Long Noncoding RNAs: An Overview. In: Feng Y., Zhang L. (eds) Long Non-Coding RNAs. *Methods in Molecular Biology*, vol 1402. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3378-5_22
- Zheng GX, Do BT, Webster DE, Khavari PA, Chang HY. Dicer-microRNA-Myc circuit promotes transcription of hundreds of long noncoding RNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Jul;21(7):585-90. doi: 10.1038/nsmb.2842. Epub 2014 Jun 15. PMID: 24929436; PMCID: PMC5509563.
- Zheng ZZ, Sun X, Zhang B, Pu J, Jiang ZY, Li M, Fan YJ, Xu YZ. Alternative splicing regulation of doublesex gene by RNA-binding proteins in the silkworm *Bombyx mori*. *RNA Biol.* 2019 Jun;16(6):809-820. doi: 10.1080/15476286.2019.1590177. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30836863; PMCID: PMC6546364.
- Zhu F, Xu P, Barbosa RM, Choo YM, Leal WS. RNAi-based demonstration of direct link between specific odorant receptors and mosquito oviposition behavior. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013 Oct;43(10):916-23. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.07.008. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23911547; PMCID: PMC3800558.
- Zhu KY, Palli SR. Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annu Rev Entomol.* 2020 Jan 7;65:293-311. doi: 10.1146/annurev-ento-011019-025224. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31610134.