



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

«Κατασκευή συνθετικών μικροοργανισμών με ικανότητα γονιδιακής
αποσιώπησης lncRNAs στο *Aedes albopictus*»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΡΗΓΟΡΗΣ ΚΟΣΚΟΡΟΣ-ΑΔΑΜ



ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Κατασκευή συνθετικών μικροοργανισμών με ικανότητα γονιδιακής αποσιώπησης lncRNAs στο *Aedes albopictus*»

«Construction of sythetic microorganisms with gene silencing potential of lncRNAs in *Aedes albopictus*»

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την ακαδημαϊκή χρονιά 2019 κατά την περίοδο Φεβρουαρίου-Ιουνίου, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του καθηγητή κ. Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου και του διδακτορικού ερευνητή κ. Αλέξανδρου Μπελαβίλα.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Τσουμάνη Κωνσταντίνα: Μεταδιδακτορική ερευνήτρια

Περίληψη

Το κουνούπι τίγρης (*Aedes albopictus*) αποτελεί ένα από τα πιο επεκτατικά είδη παγκοσμίως. Με αφητηρία τις τροπικές περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας, ο οργανισμός αυτός κατάφερε μέσα σε λίγες δεκαετίες να αποικίσει κάθε ήπειρο του πλανήτη. Η επεκτατικότητα του συγκεκριμένου κουνουπιού έχει προκαλέσει έντονη ανησυχία ως προς τις επιπτώσεις της στη δημόσια υγεία, καθώς το είδος αυτό είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την εξάπλωση επικίνδυνων ιών, των οποίων αποτελεί φορέα, και έχουν προκαλέσει επιδημίες ακόμη και στο δυτικό κόσμο. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια και εξειδικευμένες θεραπείες για αρκετούς από αυτούς τους επικίνδυνους ιούς, όπως ο ιός του Δάγγειου πυρετού (*Dengue virus*) ή ο ιός χίκουνγκυα (*chikungunya virus*). Η παρούσα εργασία αξιοποιεί μία καινοτόμα προσέγγιση αντιμετώπισης αυτής της σημαντικής, για την δημόσια υγεία, απειλής που είναι η χρήση συνθετικών μικροοργανισμών για την εφαρμογή RNA παρεμβολής (RNAi) στο κουνούπι. Στην παρούσα μελέτη στόχο γονιδιακής σίγησης, μέσω RNAi, αποτέλεσε ένα γονίδιο του κουνουπιού τίγρη, το οποίο κωδικοποιεί για ένα Long non-coding RNA (lncRNA). Τα long non-coding RNA με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα επιτελούν πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες στα έντομα, αρκετές από τις οποίες συνδέονται με τα αναπτυξιακά στάδια του κύκλου ζωής του εντόμου. Επίσης τα lncRNAs εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς την αλληλουχία ανάμεσα στα lncRNAs σε διαφορετικά είδη, ακόμη και στα συγγενικά μεταξύ τους. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο προαναφερθέντα χαρακτηριστικά των lncRNAs καθίσταται σαφές γιατί η χρήση τους ως στόχους γονιδιακής σίγησης είναι αρκετά υποσχόμενη. Στην παρούσα μελέτη, ως στόχος επιλέχθηκε ένα lncRNA, το οποίο υπερεκφράζεται αποκλειστικά στο στάδιο της προνύμφης στο κουνούπι τίγρη, υποδηλώνοντας ενδεχομένως έναν σημαντικό ρόλο για τις αναπτυξιακές διαδικασίες του σταδίου αυτού. Το γονίδιο του lncRNA κλωνοποιήθηκε επιτυχώς σε πλασμιδιακό φορέα και μετασχημάτισε βακτήρια *E.coli* του στελέχους HT115. Τα βακτήρια αρχικά καλλιεργήθηκαν μαζικά και αξιοποιήθηκαν ως “εργοστάσια” παραγωγής dsRNA, ενώ στη συνέχεια χορηγήθηκαν συνεχόμενα σε προνύμφες του κουνουπιού τίγρη. Άνα δύο μέρες πραγματοποιούνταν συλλογές κουνουπιών ενώ παράλληλα καταγράφονταν τα ποσοστά θνησιμότητας αλλά και γενικές παρατηρήσεις μεταξύ των τρυβλίων μαρτύρων αλλά και των τρυβλίων εφαρμογής RNAi. Στις προνύμφες και τις νύμφες που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA και Real-time PCR για την καταγραφή και σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου του lncRNA. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν ενθαρυντικά όσον αφορά τον παρατηρούμενο φαινότυπο, καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη απόθεση αυγών από τα RNAi κουνούπια σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Συνολικά λοιπόν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης καθιστούν ενδιαφέρον την πραγματοποίηση περισσότερων πειραμάτων γονιδιακής σίγησης του συγκεκριμένου lncRNA στόχου και ενδεχομένως χρήσης διαφορετικών μικροοργανισμών για την επαγωγή του RNAi στο *Aedes albopictus*.

Abstract

The tiger mosquito (*Aedes albopictus*) is one of the most invasive species in the world. Its original natural habitat were the tropical areas of south-east Asia, but in the last few decades the species has managed to immigrate all the continents of the planet. However the invasion of the tiger mosquito is a grave threat to public health since it is associated with the spread of dangerous viruses, that are able to use the mosquito as a vector, and epidemics have appeared even in the western world. Unfortunately, available vaccines or specialised treatments to deal with potentially life-threatening infections by some of the most dangerous viruses, such as the *chikungunya virus* and the *Dengue virus*, do not exist. An innovative and effective approach to deal with this important threat to public health, would be the use of synthetic microorganisms for the application of RNAi interference (RNAi) to the tiger mosquito. At the present study, a gene coding for a long non-coding RNA (lncRNA) in the tiger mosquito, was chosen as a target for gene silencing through RNAi. According to the available data, lncRNAs participate in many crucial physiological procedures that take place in insects and also seem to regulate important developmental stages of their life cycle. lncRNAs seem to display low conservation when comparing lncRNA sequences of different species, even relative species. Taking into account the previous two characteristics of lncRNAs, it becomes apparent that they can be quite promising as potential targets for RNAi in the tiger mosquito. At the present study, the lncRNA that was targeted for gene silencing, was shown to be overexpressed exclusively at the larva stage of *Aedes albopictus* by the available data. Because of this fact it was considered that it could be involved in an important developmental procedure, and thus by silencing it we could expect an adverse phenotype at the mosquito population. The lncRNA gene was successfully cloned into the HT115 strain of *E.coli* bacteria. The transformed bacteria were cultivated and used as dsRNA "production factories". As a next step, transformed bacteria filled with dsRNA were introduced to lab grown *Aedes albopictus*' larva. Every two days some of the larva were collected as samples, and during the whole experiment important observations regarding the death rate and more, were written down. RNA extraction and Real-Time PCR were applied to the collected larva so that differences in the gene expression of the lncRNA target could be quantified and compared with the control mosquito population. Our results were encouraging regarding the observed phenotype, since decreased oviposition of the eggs were noted in the RNAi mosquito population when compared to the control population. To conclude, the results of this study open the way for the design and applications of many more RNAi experiments that use this lncRNA gene as target, and to that end many more microorganisms could also be used as vessels for gene silencing in *Aedes albopictus*.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Aedes albopictus	9
1.1.1 Εισαγωγή στο κουνούπι τίγρης	9
1.1.2 Η επιδημιολογική σημασία του <i>Aedes albopictus</i> ως φορέας ιών	11
1.1.3 Εξάπλωση του <i>Aedes albopictus</i>	12
1.1.4 Βιολογικές και χημικές μέθοδοι καταπολέμησης του <i>Ae. albopictus</i>	13
1.2 RNAi	16
1.2.1 Εισαγωγή στο RNAi	16
1.2.2 Μηχανισμοί δράσης του RNAi	16
1.2.3 φυσιολογική σημασία του RNAi	18
1.2.4 Το RNAi ως εργαλείο της μοριακής βιολογίας και εφαρμογές στα έντομα	19
1.2.5 Εφαρμογή του RNAi στα έντομα μέσω συνθετικών μικροοργανισμών	20
1.2.6 Εφαρμογή RNAi με άλλες προσεγγίσεις	22
1.3 Long non-coding RNAs	23
1.3.1 Εισαγωγή στα Long non-coding RNAs	23
1.3.2 Μηχανισμός δράσης των lncRNA	26
1.3.3 Φυσιολογικές λειτουργίες των lncRNA στα έντομα	28
2. Σκοπός	30
3. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ	31
3.1 Εργαστηριακές συνθήκες εκτροφής πληθυσμού <i>Aedes albopictus</i>	32
3.2 Τεχνικές χειρισμού νουκλεϊκών οξέων	32
3.2.1 Απομόνωση RNA από βακτήρια	32
3.2.2 Απομόνωση DNA (DNA extraction) από <i>Aedes albopictus</i>	33
3.2.3 Απομόνωση RNA (RNA extraction) από <i>Aedes albopictus</i>	34
3.2.4 Επεξεργασία RNA με DNase (DNase treatment)	36
3.2.5 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού	36
3.2.6 Ανάκτηση πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες βακτηρίων	37
3.2.7 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού	37
3.2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	39
3.2.9 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)	40
3.3 Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων	40
3.3.1 Σχεδιασμός εκκινητών με OligoAnalyzer Tool και Primer Blast	40

3.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και Colony PCR.....	41
3.3.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	43
3.4	Μέθοδοι κλωνοποίησης DNA	44
3.4.1	Προσθήκη T άκρων σε πλασμίδιο	44
3.4.2	Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμίδιο (ligation)	45
3.4.3	Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για ηλεκτροδιάτρηση	45
3.4.4	Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση	46
3.4.5	Αλληλούχηση κατά Sanger.....	47
3.5	Μέθοδοι παραγωγής dsRNA.....	48
3.5.1	In Vitro Transcription-παραγωγή dsRNA.....	48
3.5.2	Επαγωγή Μεταγραφής γονιδίου σε κύτταρα HT115 με IPTG	49
3.6	Παρωδική αποσιώπηση γονιδίων	50
4.	Αποτελέσματα	51
4.1	Δημιουργία συνθετικού E.coli με ικανότητα επαγωγής RNAi.....	52
4.1.1	Επιλογή γονιδίου-στόχου και δημιουργία ενθέματος.....	52
4.1.2	Δημιουργία του T φορέα (T vector)	53
4.1.3	Αντίδραση λιγάσης και κλωνοποίηση σε βακτήρια.....	54
4.1.4	Εύρεση της επιθυμητής αποικίας και εξακρίβωση με αλληλούχηση	54
4.2	Δημιουργία dsRNA για το γονίδιο Inc7	57
4.3	Εφαρμογή RNAi σε προνύμφες του κουνουπιού τίγρη.....	58
4.3.1	Επαγωγή μεταγραφής του Inc7 από τα μετασχηματισμένα βακτήρια	58
4.3.2	Χορήγηση των συνθετικών βακτηρίων στο κουνούπι και παρατήρηση φαινοτύπου	59
4.3.3	Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με Real-time PCR	61
5.	Συζήτηση.....	63
5.1	Κλωνοποίηση του Inc7	64
5.2	Φαινότυπος κουνουπιών.....	64
5.3	Μελλοντικές προσεγγίσεις	65
6.	Παράρτημα	66
6.1	Μεγέθη προϊόντων ενίσχυσης	67
6.2	Ένζυμα περιορισμού	67
7.	Βιβλιογραφία	68

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Aedes albopictus

1.1.1 Εισαγωγή στο κουνούπι τίγρης

Γενικά χαρακτηριστικά: Το κουνούπι τίγρης (*Aedes albopictus*) προέρχεται από τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα επεμβατικά είδη παγκοσμίως. Φυλογενετικά ανήκει στην οικογένεια των *Culicidae* στην τάξη των δίπτερων [1]. Χαρακτηρίζεται από λευκές ρίγες στην ραχιαία πλευρά του θώρακα. Επίσης λευκές ζώνες με τη μορφή λωρίδων μπορούν να εντοπισθούν στα οπίσθια πόδια του. Η κοιλιακή χώρα έχει συνήθως σκούρο καφέ χρώμα με ή χωρίς άσπρες περιοχές. Ο μέσος όρος του μήκους της κοιλιακής περιοχής είναι 2.63mm των φτερών 2,7mm και της προβοσκίδας 1.88mm. Τα θηλυκά διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά, με ένα τυπικό αρσενικό να διαθέτει το 80% του μεγέθους ενός τυπικού θηλυκού [2].

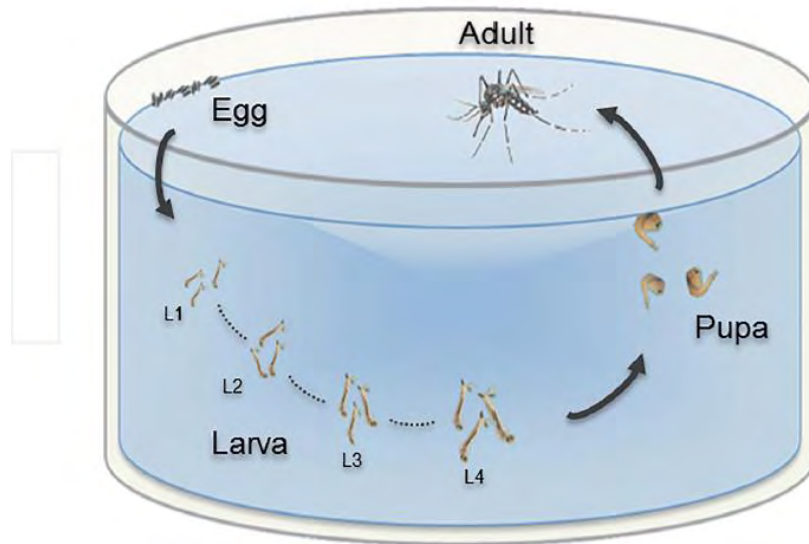


Εικόνα 1 Απεικόνιση του *Aedes albopictus*. Διακρίνονται εμφανώς τα άσπρα στίγματα που το διαφοροποιούν από συγγενικά είδη κουνουπιών [27].

(A)

Κύκλος ζωής: Τα κουνούπια διαθέτουν έναν περίπλοκο κύκλο ζωής με δραματικές αλλαγές στο σχήμα, στη λειτουργία και στο περιβάλλον τους. Διαθέτουν 4 βασικά αναπτυξιακά στάδια: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικο έντομο. Τα αρσενικά και τα θηλυκά κουνούπια τρέφονται με νέκταρ, αλλά τα θηλυκά είναι επίσης προσαρμοσμένα για να προσλαμβάνουν αίμα από σπονδυλωτά ζώα. Το αίμα είναι απαραίτητο στοιχείο για την ωρίμανση των αυγών του γονιμοποιημένου θηλυκού, συνήθως 3-4 μέρες μετά από μια επιτυχημένη πρόσληψη αίματος τα θηλυκά γεννούν 100-200 αυγά. Τα θηλυκά προτιμούν να εναποθέτουν τα αυγά τους σε εσωτερικές και υγρές επιφάνειες που δεν απέχουν πολύ από μια πηγή νερού. Η εμβρυογένεση ολοκληρώνεται συνήθως σε 2-3 ημέρες σε ζεστά κλίματα ενώ μπορεί να διαρκέσει έως και 1 εβδομάδα σε σκοτεινότερα και πιο κρύα περιβάλλοντα [3]. Τα αυγά αφού πραγματοποιηθεί η εναπόθεσή τους από το θηλυκό, μπορούν να επιβιώσουν ακόμη και σε ξερή κατάσταση για παραπάνω από 1 χρόνο, φαίνεται όμως ότι η περιβαλλοντική καταπόνηση επηρεάζει το ποσοστό των αυγών που θα εκκολαφθούν επιτυχώς [4]. Η επαφή με το νερό αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκκόλαψη των αυγών και την απελευθέρωση των προνυμφών στην πηγή νερού. Έτσι ξεκινά η φάση του κύκλου ζωής που διακατέχεται από την ανάπτυξη της προνύμφης στο νερό [5]. Στο στάδιο της προνύμφης το έντομο τρέφεται με διάφορους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο νερό όπως άλγη, διάτομα και βακτήρια. Καθώς τρέφεται με αυτούς τους μικροοργανισμούς μεγαλώνει σε μάζα και όγκο. Το στάδιο της προνύμφης χαρακτηρίζεται από 4 υπο-στάδια, το καθένα από τα οποία

χαρακτηρίζεται από ολοένα και αυξανόμενο μέγεθος (L1,L2,L3,L4). Με την ολοκλήρωση του σταδίου L4 το έντομο μεταμορφώνεται σε νύμφη. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί για την ανάπτυξη μιας προνύμφης σε νύμφη εμφανίζει μεγάλη διακύμανση, από μερικές μέρες έως και αρκετές εβδομάδες ανάλογα με το πόσο ευνοϊκές ή δυσμενείς είναι οι συνθήκες στο περιβάλλον(παραδείγματα δυσμενών συνθηκών αποτελούν η έλλειψη θρεπτικών και οι χαμηλές θερμοκρασίες) [6]. Σε ιδανικές συνθήκες η μεταμόρφωση από προνύμφη σε νύμφη δεν πρέπει να διαρκεί παραπάνω από 5 μέρες. Γενικά τα αρσενικά ωριμάζουν γρηγορότερα από τα θηλυκά γεγονός που δικαιολογεί και τη διαφορά στο μέγεθος μεταξύ τους [7].



Εικόνα 2 Απεικόνιση του κύκλου ζωής των κουνουπιών. Διακρίνονται το στάδιο του αυγού, της προνύμφης και της νύμφης και του ενήλικου [26].

Το στάδιο της νύμφης, αποτελεί το τελευταίο ανώριμο στάδιο των κουνουπιών. Οι νύμφες δεν προσλαμβάνουν τροφή, αλλά είναι κινητικές και δαπανούν σχεδόν όλο το χρόνο τους αναπνέοντας κοντά στην

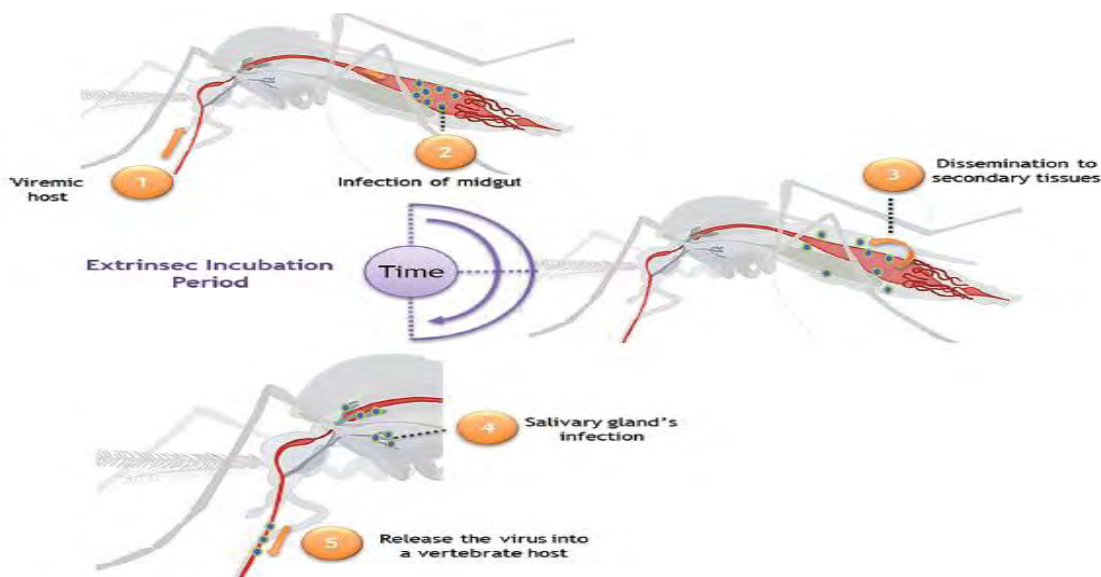
επιφάνεια του νερού. Το στάδιο της νύμφης χαρακτηρίζεται από πολύ λιγότερη θνησιμότητα από αυτό της προνύμφης και διαρκεί 2-3 ημέρες αλλά αναλόγως τη θερμοκρασία μπορεί να διαρκέσει περισσότερο. Σχεδόν όλες οι νύμφες θα καταφέρουν να μεταμορφωθούν στο ενήλικο έντομο. Το ενήλικο έντομο αναδύεται από την νύμφη και παραμένει για μερικά λεπτά στην επιφάνεια του νερού χάρη στην επιφανειακή τάση [8].

Σεξουαλικές και τροφικές συνήθειες: Τα αρσενικά *Aedes albopictus* 2,5 ώρες μετά την μεταμόρφωσή τους από νύμφες σε ενήλικα, μπορούν να αναγνωρίζουν και έλκονται από τον ήχο της δόνησης των φτερών των θηλυκών [9,10]. Κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος το αρσενικό γραπώνει τις άκρες της κοιλιακής χώρας του θηλυκού και πραγματοποιείται η διείσδυση του γενετικού οργάνου του αρσενικού (aedeagus) στην γεννητική περιοχή του θηλυκού [9]. Το ζευγάρι κρατά λιγότερο από 1 λεπτό με τα μεγαλύτερα σε μέγεθος αρσενικά και θηλυκά να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη επιτυχία [11]. Η πρόσληψη αίματος από τα θηλυκά έπεται από ένα επιτυχές ζευγάρι είναι απαραίτητη και προηγείται της εναπόθεσης των αυγών. Το αίμα είναι σημαντική πηγή πρωτεϊνών και είναι απαραίτητο για όλα τα στάδια ωρίμανσης των αυγών κατά τον γονοτροπικό κύκλο. Κατά τη διάρκεια ενός γονοτροπικού κύκλου τα περισσότερα είδη κουνουπιών χρειάζονται μία πρόσληψη αίματος από έναν οργανισμό, όμως το *Ae. Albopictus* και το *Ae. aegypti* πολλές φορές πραγματοποιούν παραπάνω από μία προσλήψεις αίματος, συχνά από διαφορετικά άτομα. Τα 2 αυτά είδη κουνουπιών φαίνεται ότι προτιμούν το ανθρώπινο αίμα κάτι που τα καθιστά επικίνδυνους επιδημιολογικούς φορείς όπως επίσης και το προαναφερθέν γεγονός ότι προσλαμβάνουν αίμα παραπάνω από μία φορά κατά τον γονοτροπικό τους κύκλο [12,13]. Τα

κουνούπια εντοπίζουν δυνατούς στόχους για πρόσληψη αίματος χάρη στον άνεμο αλλά και μυρωδιών που εκλύονται από το στόχο με σημαντικότερες από αυτές το διοξείδιο του άνθρακα αλλά διάφορα συστατικά του ιδρώτα, στοιχεία που καθορίζουν και τις προτιμήσεις των κουνουπιών όσον αφορά τους ιδανικούς για αυτά οργανισμούς-άτομα στόχους [14].

1.1.2 Η επιδημιολογική σημασία του *Aedes albopictus* ως φορέας ιών

Αλληλεπιδράσεις ιού και φορέα: Οι arboviruses (arthropod-borne viruses) είναι ιοί που μεταδίδονται μέσω των αρθρόποδων στον άνθρωπο. Τα αρθρόποδα μολύνονται από αυτούς τους ιούς κατά την πέψη του αίματος που προέρχεται από μολυσμένο ξενιστή. Η συγκεκριμένη κατηγορία ιών απαιτεί για τον πολλαπλασιασμό της το κυτταρικό περιβάλλον των αρθρόποδων. Έπειτα από μια χρονική περίοδο μετά τη μόλυνση του αρθρόποδου, μολυσματικά σωματίδια του ιού είναι παρόντα στις εκκρίσεις σιέλου του εντόμου και μπορεί να μεταδοθεί σε έναν σπονδυλωτό οργανισμό [15,16,17]. Για την επιτυχή επιμόλυνση του εντόμου φορέα θα πρέπει να γίνει σύνδεση σωματιδίων του ιού σε κυτταρικούς υποδοχείς επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου του εντόμου [18]. Σε επόμενο στάδιο σωματίδια του ιού διέρχονται από το μεσέντερο στην αιμόλεμφο και από εκεί φτάνει όλους τους ιστούς του οργανισμού. Στα με συμβατά με τους arboviruses είδη κουνουπιών η μόλυνση παραμένει περιορισμένη στο μεσέντερο καθώς ο ιός δεν μπορεί να διέλθει στην αιμόλεμφο [19]. Στα κουνούπια του γένους *Aedes*, όπως και το *Aedes albopictus*, εικάζεται ότι οι αδένες σιέλου περιέχουν υποδοχείς που αναγνωρίζονται από τους arboviruses και επιτρέπουν την ενδοκύττωσή τους. Μετά την μόλυνση των αδένων σιέλου ο ιός πολλαπλασιάζεται και απελευθερώνεται στον αγωγό σιέλου του κουνουπιού για οριζόντια μεταφορά σε έναν σπονδυλωτό οργανισμό κατά τη διάρκεια αποκόμισης αίματος από αυτόν από το μολυσμένο κουνούπι [20]. Μόλις οι σιελογόνοι αδένες του κουνουπιού μολυνθούν από arbovirus το κουνούπι θα μεταδίδει τον ιό εφόρου ζωής [21]. Όλη η διαδικασία επιμόλυνσης του κουνουπιού συνοψίζεται στην παρακάτω εικόνα:

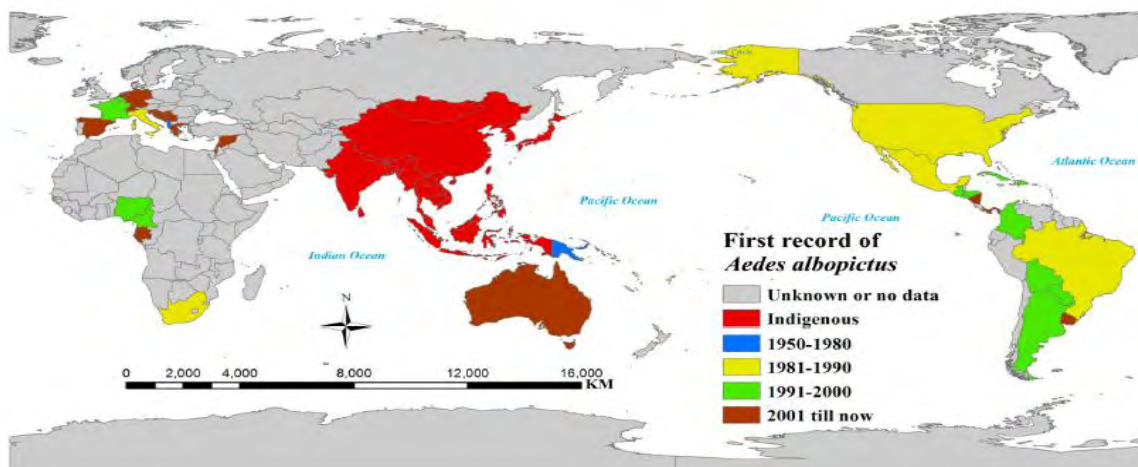


Εικόνα 3 Εδώ απεικονίζονται τα κύρια στάδια επιμόλυνσης του κουνουπιού φορέα από arbovirus. (1. Το κουνούπι εκτίθεται στον arbovirus κατά την πέψη αίματος προερχόμενο από μολυσμένο ξενιστή. (2) Επιμόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων του μεσεντέρου από σωματίδια του ιού και επικείμενος πολλαπλασιασμός και εγκαθίδρυση του ιού στο μεσέντερο. (3) Μετάδοση του ιού μέσω της αιμόλεμφο σε δευτερεύοντες ιστούς. (4) Επιμόλυνση των σιελογόνων αδένων. (5) Απελευθέρωση του ιού στους σιελογόνους αγωγούς και οριζόντια μεταφορά του ιού σε νέο οργανισμό ξενιστή κατά τη διάρκεια άντλησης αίματος από αυτόν από το κουνούπι [26].

Χαρακτηριστικοί αρβονίρους και σημασία: Το *Aedes albopictus* έχει ενοχοποιηθεί ως φορέας του ιού chikungunya όπως έχουν δείξει μελέτες που το συνδέουν με την εξάπλωση του ιού [23]. Το *Aedes albopictus* επίσης αποτελεί φορέα του επικίνδυνου ιού του Δάγγειου Πυρετού (Dengue virus), αν και το *Aedes aegypti* εξακολουθεί να είναι ο σημαντικότερος φορέας για τον ιό. Το *Aedes albopictus* έχει επίσης ενοχοποιηθεί για μικρού σκέλους επιδημίες του ιού, κάτι που προκαλεί έντονη ανησυχία για την πιθανή εμφάνιση κρουσμάτων του ιού σε ανθρώπους σε χώρες που το *Aedes albopictus* έχει πρόσφατα μεταναστεύσει [22]. Επιδημίες και των 2 προηγούμενων ιών έχουν παρατηρηθεί στο La reunion island στην Ιταλία και θεωρείται ότι το *Aedes albopictus* συνέβαλε σημαντικά στην εξάπλωση του ιού [22,23,154]. Το *Aedes albopictus* αποτελεί φορέα και για τον ιό του δυτικού Νείλου, κρούσματα του οποίου έχουν καταγραφεί και στην Ελλάδα. Τέλος έχει δειχθεί πειραματικά ότι θα μπορούσε να αποτελέσει φορέα και για τον ιό Zika [154]. Όλοι οι παραπάνω ιοί ανήκουν στην κατηγορία των Αρβονίρους και είναι ιοί με μονόκλωνο RNA ως γενετικό υλικό. Συνηθισμένα κλινικά χαρακτηριστικά έκθεσης ανθρώπων στον ιό αποτελούν ο πυρετός, ο πονοκέφαλος η ναυτία, η κόπωση, η εγκεφαλίτιδα καθώς και η πρόκληση εμετού [24,25]. Ο λόγος που αυτοί οι ιοί χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής είναι ότι ενώ μπορούν να αποβούν μοιραίοι σε ηλικιωμένα άτομα καθώς και άτομα με ανοσολογικά σύνδρομα, δεν υπάρχουν διαθέσιμες εξειδικευμένες θεραπείες και εμβόλια εναντίον τους [26].

1.1.3 Εξάπλωση του *Aedes albopictus*

Το γεγονός ότι το *Aedes albopictus* αποτελεί φορέα διαφορετικών Αρβονίρους, σε συνδυασμό με την επικινδυνότητα αυτής της ομάδας ιών και της ανθρωπόφιλης τάσης του κουνουπιού, καθιστά την μελέτη της εξάπλωσής του, από επιδημιολογικής άποψης ιδιαίτερως σημαντική.



Εικόνα 4 Ποιοτική απεικόνιση της εξάπλωσης του *Aedes albopictus* σε παγκόσμιο επίπεδο. Το χρώμα καταδεικνύει τον χρόνο που καταγράφηκε για πρώτη φορά η παρουσία του κουνουπιού στην εκάστοτε περιοχή [27].



Εικόνα 5 Απεικόνιση της εξάπλωσης του *Aedes albopictus* στην Ευρώπη. Ιδιαίτερα ανυσηχτικό είναι το γεγονός ότι αποικισμός του κουνουπιού φαίνεται να έχει πραγματοποιηθεί και στην Ελλάδα όπως διακρίνεται στην εικόνα από το κόκκινο χρώμα [26].

Το ερώτημα που προκύπτει είναι το πως το συγκεκριμένο κουνούπι έχει καταφέρει να αποικίσει τόσο διαφορετικά περιβάλλοντα από κλιματικής άποψης. Το *Aedes albopictus* έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε κλιματικές διακυμάνσεις μέσω φωτοπεριοδικής διάπαυσης [28,29]. Η διάπαυση είναι μια εξαρτώμενη από το περιβάλλον περίοδος στασιμότητας που χαρακτηρίζεται από αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια, στην σηματοδότηση ινσουλίνης, στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στην υπερέκφραση γονιδίων απόκρισης στο stress [30-32]. Έχει δειχθεί ότι υπάρχει μια ταχεία εξελικτική προσαρμογή όσον αφορά τον προγραμματισμό της διάπαυσης σε πληθυσμούς *Aedes albopictus* που έχουν εξαπλωθεί στην Αμερική και φαίνεται ότι η δυνατότητα αυτή είναι κρίσιμη για τον καθορισμό του δυναμικού εξάπλωσης αυτού του εντόμου [29,32]. Μελέτες έχουν δείξει 2 κεντρικά γονίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διεκπεραίωση της διάπαυσης στο *Aedes albopictus*, το *Perck* και το *PCNA* [31]. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη ενός παγκοσμίου σετ γονιδίων σχετιζόμενων με τη διάπαυση, τα οποία θα μπορούσαν να στοχευθούν προκειμένου να δημιουργηθούν επιπλοκές στη διαδικασία της διάπαυσης και να εμποδιστεί η εξάπλωση πολλών επιβλαβών εντόμων [31].

1.1.4 Βιολογικές και χημικές μέθοδοι καταπολέμησης του *Ae. albopictus*

Όπως προαναφέρθηκε δεν υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια και εξιδεικευμένες θεραπείες εναντίον των Αrboviruses. Επομένως ο μόνος άμεσος δυνατός τρόπος περιορισμού μόλυνσεων από αυτούς τους ιούς συμπεριλαμβανομένων των ιών *Dengue* (DENV) και *Chikungunya* (CHIKV) είναι μέσω ελέγχου και στόχευσης των φορέων αυτών των ιών και για αυτό η ανάπτυξη μεθόδων για την καταπολέμηση του *Ae. albopictus*, επιβεβαιωμένου φορέα Αrboviruses και με τεράστιο δυναμικό εξάπλωσης σε διαφορετικά κλίματα, είναι κρίσιμη. Οι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν μπορούν να διαχωριστούν σε 4 βασικές κατηγορίες: 1) Τροποποίηση του περιβάλλοντος σε μη ευνοϊκό για την εξάπλωση του

οργανισμού, 2) χρήση χημικών ενώσεων θανατηφόρων για τον οργανισμό, 3) Βιολογικός έλεγχος, 4) Μέθοδοι περιορισμού της εξάπλωσης που βασίζονται στην γενετική στόχευση. Το αναμενόμενο είναι ότι η καλύτερη δυνατή στρατηγική θα αποτελούσε έναν συγκεκριμένο συνδυασμό των τεσσάρων προηγούμενων προσεγγίσεων [34].

Τροποποίηση του περιβάλλοντος: Για την επιτυχία αυτής της προσέγγισης είναι απαραίτητη η συνεργασία της κοινότητας καθώς και γνώση της οικολογίας του οργανισμού. Ο συστηματικός καθαρισμός του νερού σε σημεία τα οποία θα μπορούσαν να εκμεταλλεύονται από τα κουνούπια για την εναπόθεση αυγών αλλά και η εισαγωγή σιτών στα παράθυρα των σπιτιών έχει δειχθεί ότι μπορεί να συντελέσει στον περιορισμό του κουνουπιού αλλά και στην μείωση της μετάδοσης του ιού DENV [33,35].

Χημικές ενώσεις: Πολλές χημικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση του *Ae.albopictus* σε επίπεδο προνύμφης και σε επίπεδο ενήλικου. Ρυθμιστές της ανάπτυξης εντόμων (Methoprene, novaluron, pyriproxifen) καθώς και οργανοφωσφωρικές ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και είναι σχετικά άοσμες, έχουν χρησιμοποιηθεί σε περιοχές αναπαραγωγής του κουνουπιού για τη μείωση των πληθυσμών των προνυμφών [36,38]. Τα πυρεθροειδή είναι μια κατηγορία ενώσεων με αποτελεσματικότητα εναντίον των ενήλικων κουνουπιών και έχουν εφαρμοστεί σε Ευρώπη, Ασία αλλά και στην νότια Αμερική. Έχει παρατηρηθεί όμως και στις 3 προηγούμενες περιπτώσεις, ότι λόγω εξελικτικής πίεσης έχει αρχίσει να εμφανίζεται ανθεκτικότητα από το *Ae. albopictus* στα χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται [37,38].

Βιολογικός έλεγχος: Αναδυόμενες τεχνικές περιορισμού της εξάπλωσης του κουνουπιού είναι η χρήση τοξινών που παράγονται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) ,οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν εναντίον των προνυμφών των κουνουπιών καθώς και η εκμετάλλευση μικροοργανισμών που συμβιώνουν με το κουνούπι όπως τα *Asaia*, *Acinetobacter*, and *Pantoea* ή η χρήση *Wolbachia* και θηρευτών των κουνουπιών [39,40,41]. Το Bti χρησιμοποιείται ευρέως στην Αμερική ενώ φαίνεται να είχε αποτέλεσμα στη μείωση των κρουσμάτων DENV στη Μαλαισία από *Ae. aegypti* και *Ae. albopictus* [42,43]. Παρά το γεγονός ότι το Bti φαίνεται να έχει αρνητικές επιδράσεις μόνο στα κουνούπια και τη μαύρη μύγα, η χρήση του στην Ευρώπη απαγορεύεται στα πλαίσια της ασφάλειας, καθώς δεν υπάρχουν πειστικές απαντήσεις στην αξιολόγηση της επίδρασης που μπορεί να είχε οικολογικά η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού από Bti σε άλλους οργανισμούς καθώς και η παρεμβολή του Bti στα συστήματα ποιοτικής ανάλυσης του πόσιμου νερού [44]. Ορισμένα στελέχη της *Wolbachia* (wRi, wMelPop, wPip, and wMel,) φαίνεται όταν εισάγονται σε έμβρυα *Ae. albopictus* με μικροένεση εμποδίζουν την μόλυνσή τους από CHIKV και DENV αν και ο μηχανισμός αυτός δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός [45-50]. Τέλος μια άλλη βιολογική μέθοδος που έχει ήδη εφαρμοστεί στο *Ae. aegypti* και θεωρητικά θα μπορούσε να είναι εφαρμόσιμη στο *Ae. albopictus* θα ήταν η χρήση θηρευτών των κουνουπιών όπως η εισαγωγή στο επιθυμητό οικοσύστημα συγκεκριμένων ειδών ψαριών που τρέφονται με προνύμφες κουνουπιών, ή του κουνουπιού ελέφαντα *Toxorhynchites splendens* [41].

Γενετικά-βασισμένες στρατηγικές: Οι 2 κύριες προσεγγίσεις όσον αφορά τις γενετικές μεθόδους αφορούν: α) την εξάλειψη ή μείωση του πληθυσμού στόχου β) την αντικατάσταση του πληθυσμού σταδιακά, με γενετικά τροποποιημένα στελέχη με μειωμένο δυναμικό φορέα [52]. Μεγαλύτερη ανάπτυξη έχει πραγματοποιηθεί σε προσεγγίσεις της πρώτης κατηγορίας με στόχο είτε την μείωση της γενικής υγείας των κουνουπιών(μικρότερη ικανότητα πτήσης) είτε την παραγωγή και απελευθέρωση στο περιβάλλον στείρωμένων κουνουπιών μέσω ραδιενεργής ακτινοβολίας και εισαγωγής τυχαίων μεταλλάξεων(sterile insect technique SIT) [51,53,54]. Αρσενικά, στείρωμένα μέσω έκθεσης σε

ραδιενέργεια, *Ae.albopictus* έχουν απελευθερωθεί στην Ιταλία την περίοδο 2005-2009 με επιτυχή μείωση του τοπικού πληθυσμού [54].

Το κοινό που έχουν και οι 4 προηγούμενες προσεγγίσεις(περιβαλλοντικές, χημικές, βιολογικές και γενετικές) είναι ότι συγκεκριμένες μεθοδολογίες τους έχουν εφαρμοστεί εκτός του εργαστηρίου με μικρή ή μεγάλη κλίμακα. Όμως έχουν μειονεκτήματα που καθιστούν αναγκαία την ανάπτυξη νέων καινοτόμων μεθόδων. Η χρήση χημικών μπορεί να μην έχει εμφανή επίδραση στα θηλαστικά και συγκεκριμένα στον άνθρωπο, όμως δεν παρουσιάζει ικανοποιητική εξειδίκευση στα έντομα στόχους με αποτέλεσμα την θανάτωση ωφέλιμων για τον άνθρωπο εντόμων ή εντόμων των οποίων η απώλεια θα διατάρασσε το οικοσύστημα. Το ίδιο πρόβλημα παραμένει σε μικρότερο βαθμό και στις βιολογικές μεθόδους που έχουν περιγραφεί ως τώρα καθώς τα Bti στοχεύουν όλα τα είδη κουνουπιών και την μαύρη μύγα και όχι συγκεκριμένα το *Aedes albopictus* ενώ η χρήση μικροοργανισμών η οργανισμών θηρευτών μπορεί να διαταράξει το τοπικό οικοσύστημα πάλι λόγω μείωσης του πληθυσμού εντόμων που δεν αποτελούν στόχους.

Το μοτίβο που αναδύεται λοιπόν ότι μια εφαρμόσιμη μέθοδος εκτός από το να είναι οικονομικά βιώσιμη θα πρέπει να είναι και όσο το δυνατόν πιο εξιδεικευμένη και προσαρμόσιμη σε ενδεχόμενες εμφανίσεις ανθεκτικότητας από στελέχη του πληθυσμού. Η τεχνική SIT είναι εξιδεικευμένη και προφανώς είναι αδιανόητη η εμφάνιση ανθεκτικότητας στην ραδιενέργεια, όμως τα στείρωμένα κουνούπια ακριβώς επειδή οι μεταλλάξεις είναι μη ελεγχόμενες, παρουσιάζουν μια γενικότερη πτώση υγείας και φυσικής κατάστασης με αποτέλεσμα να μην επιλέγονται από τα θηλυκά για αναπαραγωγή ειδικά παρουσία άλλων υγείων αρσενικών μειώνοντας έτσι την αποδοτικότητα της μεθόδου(α92-97). Μια μέθοδος με τεράστια δυνατότητα εξειδίκευσης, η οποία με το κατάλληλο υπόβαθρο θα μπορούσε εύκολα να τροποποιείται σε περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας στον πληθυσμό, και τέλος με επιλογή κατάλληλων γονιδίων στόχων δεν επιδρά στον εξωτερικό φαινότυπο των κουνουπιών και στην γενικότερη φυσική κατάσταση, είναι το RNAi.

Το RNAi είναι μια οικονομικά βιώσιμη μέθοδος με ποικίλες εφαρμογές, μία μόνο εκ των οποίων είναι ο περιορισμός επικίνδυνων εντόμων. Για το RNAi θα γίνει μια πλήρης περιγραφή στην επόμενη υποενότητα.

1.2 RNAi

1.2.1 Εισαγωγή στο RNAi

Την τελευταία δεκαετία μετά την ανακάλυψη του μηχανισμού της RNA παρεμβολής (RNAi) [55], εμφανίστηκε μεγάλη ανάπτυξη όσον αφορά την κατανόηση της λειτουργίας των μικρών μη κωδικοποιητών μορίων RNA ή αλλιώς small non-coding RNAs (sncRNAs) στα φυτά, τα ζώα και τους μύκητες. Τα sncRNAs αρχικά παρατηρήθηκαν ως ενδιάμεσοι παράγοντες μιας διαδικασίας γονιδιακής σίγησης, που εκείνη την εποχή ήταν ελάχιστα κατανοητή [56]. Πλέον είναι γνωστά πολλά διαφορετικά είδη sncRNA [57], και το κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ τους είναι ότι όλα προσδέονται σε κάποιο μέλος μιας πρωτεΐνης της οικογένειας των αργοναυτών (AGO) [58], η οποία δρα σαν οδηγός προς συγκεκριμένα μόρια στόχους. Το σύμπλοκο μεταξύ των AGO, του μονόκλωνου RNA και άλλων βοηθητικών παραγόντων ονομάζεται σύμπλοκο RISC (RNA induced silencing complex). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις AGO πρωτεΐνες εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση όσον αφορά τον αριθμό τους από είδος σε είδος, από ένα μόνο γονίδιο έως δεκάδες. Οι AGO αναγνωρίζουν τους στόχους ενός μονοπατιού RNAi μέσω αναγνώρισης λόγω συμπληρωματικότητας αζωτούχων βάσεων μεταξύ του μορίου RNA στόχου και του sRNA που βρίσκεται προσδεμένο στην AGO. Μετά την αναγνώριση του στόχου η δράσεις των AGO διαφέρουν. Κάποιες AGO διαθέτουν μια επικράτεια με δραστικότητα RNaseH και μπορούν να διασπάσουν το μόριο RNA στόχο έπειτα από μια επιτυχή αναγνώριση. Άλλες AGO δεν καταλύουν οι ίδιες την ενζυμική διάσπαση του στόχου αλλά συμμετέχουν στην στρατολόγηση άλλων παραγόντων [58,59].

1.2.2 Μηχανισμοί δράσης του RNAi

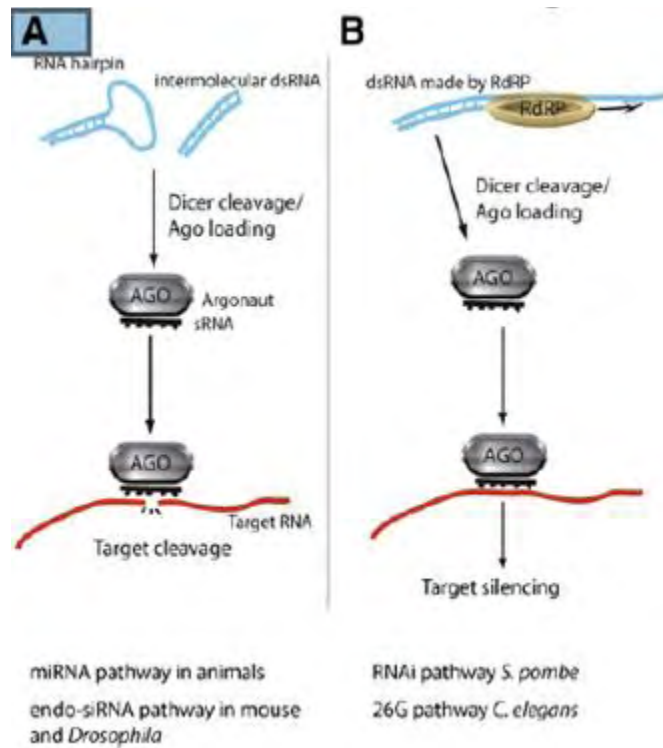
Μονοπάτια επαγωγής RNAi εξαρτώμενα από τη δράση της *dicer*: Ένας αριθμός μονοπατιών του RNAi αξιοποιούν δίκλινα RNA (dsRNA) για την παραγωγή sncRNA μέσω της δράσης του ενζύμου *dicer*. Παρά το γεγονός ότι έχουν ανακαλυφθεί μονοπάτια που δεν αξιοποιούν την *dicer*, φαίνεται ότι στην πλειονότητα των οργανισμών η *dicer* διαδραματίζει απαραίτητο ρόλο στην διεκπεραίωση του RNAi. Οι πηγές προέλευσης των dsRNA μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με το μονοπάτι RNAi [60].

- Τα περισσότερα miRNA πριν αντληθούν από την *dicer* εμφανίζονται σε ενδομοριακές αναδιπλωμένες καταστάσεις με τη δομή “συνδετήρα” (hairpin structure). Σε αυτή τη μορφή ονομάζονται pri-miRNA και έχουν μέγεθος περίπου 70 βάσεις.
- Μία άλλη κατηγορία sncRNA, τα siRNA μπορούν να αντληθούν από ακόμη πιο εκτεταμένες αναδιπλωμένες καταστάσεις δομής συνδετήρα που μπορούν να προκύψουν από συμπληρωματικότητα των βάσεων μεταξύ μεταγράφων που προέκυψαν από το ίδιο γονίδιο μέσω αμφίδρομης μεταγραφής, ή και από διαφορετικά γονίδια. Τέτοιου τύπου siRNA έχουν περιγραφεί και στο ποντίκι και στη *Drosophila* [61-65].
- Ένας άλλος τρόπος παραγωγής dsRNA που έχει παρατηρηθεί στα φυτά, στον *C. elegans* και στο *S. pombe* είναι μέσω της δράσης των ενζύμων της οικογένειας των RNA εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RdRPs) [66]. Σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η δράση αυτών των ενζύμων καταλήγει στην παραγωγή dsRNA μέσω μεταγραφής με υπόστρωμα RNA, τα οποία dsRNA χρησιμοποιούνται στην συνέχεια σαν υπόστρωμα ενός εκ των τεσσάρων *dicer* ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά στα ζώα έχουν παρατηρηθεί μόνο στον *C. elegans* [67,68,69].

Το κοινό που έχουν όλες οι προηγούμενες περιπτώσεις είναι ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης των dsRNA (παραγωγή πρόδρομων miRNA μέσω μεταγραφής γονιδίων, παραγωγή dsRNA μέσω μεταγραφής διαφορετικών απομακρυσμένων γονιδίων ή αμφίδρομης μεταγραφής ενός γονιδίου/ομάδας γειτονικών

γονιδίων, και τέλος μέσω της δράσης RdRP) κεντρικό κοινό σημείο όλων των μονοπατιών είναι η επεξεργασία των dsRNA μέσω της dicer που οδηγεί σε πέψη και διάσπαση σε μικρότερα μόρια sRNA, είτε από την ίδια την dicer είτε από τη στρατολόγηση άλλων παραγόντων, τα οποία θα προσδεθούν σε μέλη της οικογένειας AGO.

Στην επόμενη εικόνα απεικονίζονται σχηματικά τα παραπάνω μονοπάτια που περιγράφηκαν.



Εικόνα 6 : Τα μόρια RNA που χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα για την παραγωγή όλων των ειδών sRNAs απεικονίζονται με μπλε χρώμα, τα μόρια sRNAs απεικονίζονται με μαύρο χρώμα και τέλος τα RNA μετάγραφα-στόχοι απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα [76].

A: Το κύριο μονοπάτι RNAi. Παραδείγματα αυτού του μονοπατιού είναι τα ένδο- siRNA μονοπάτια στην *Drosophila* και στα θηλαστικά. Και στις 2 περιπτώσεις η AGO2 είναι μάλλον η AGO πρωτεΐνη που εμπλέκεται [76].

B: Παραγωγή dsRNA μπορεί να επαχθεί από τη δράση της RdRP. Αυτός ο μηχανισμός έχει παρατηρηθεί στον *C.elegans* και στον *S.pombe* [76].

Από τα διαθέσιμα δεδομένα μέχρι στιγμής φαίνεται ότι στα κουνούπια, συμπεριλαμβανόμενου και του *Ae.albopictus* ο κύριος μηχανισμός RNAi που λαμβάνει χώρα είναι ο A(εικόνα 6) [77].

1.2.3 φυσιολογική σημασία του RNAi

Σημασία του RNAi για τους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς:

Στον οργανισμό *S. pombe* ένα πυρηνικό μονοπάτι RNAi διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ορθή λειτουργία του κεντρομερούς. Το μονοπάτι αυτό συμμετέχει στον σχηματισμό της ετεροχρωματίνης στις περικεντρομερικές περιοχές που πλευρίζουν το κεντρικό κεντρομερές [78].

Ο πυρηνικός, RNAi κατευθυνόμενος σχηματισμός ετεροχρωματίνης διαδραματίζει κεντρικό ρόλο και στην σεξουαλική αναπαραγωγή του οργανισμού *Tetrahymena* (*T. thermophila*) μέσω της ανάπτυξης νέων μακροπυρήνων [79].

Σημασία του RNAi για τους ζωικούς οργανισμούς:

Στον *C.elegans* έχει βρεθεί ένας επαγόμενος από RNAi μηχανισμός που εμπλέκεται στην σίγηση με συζευγμένης ετεροχρωματίνης κατά το στάδιο της μείωσης [80]. Στον ίδιο οργανισμό ένας διαφορετικός μηχανισμός εξαρτώμενος από το RNAi ευθύνεται για τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στο νεαρό έμβρυο [81].

Στο ποντίκι ένας μηχανισμός RNAi ευθύνεται για την επαναμεθυλίωση περιοχών του γονιδιώματος που είχαν απομεθυλωθεί κατά την ανάπτυξη των PGC(primordial germ line) κυττάρων, διαδικασία ύψιστης σημασίας από την σκοπιά της αναπτυξιακής βιολογίας για το ποντίκι [82].

Σκοπός των παραπάνω παραδειγμάτων είναι η κατανόηση της σημασίας του RNAi σε βασικά μονοπάτια ανάπτυξης και σεξουαλικής αναπαραγωγής των οργανισμών. Το RNAi επιτυγχάνει τον πολύπλοκο συντονισμό της έκφρασης πολλών εμπλεκόμενων γονιδίων στις διαδικασίες χάρη στην ικανότητα ελεγχόμενης ποσοτικά και ποιοτικά γονιδιακής σίγησης. Εκτός όμως από τις εξιδεικευμένες ανά οργανισμό χρήσεις του RNAi όσον αφορά την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τον συντονισμό της μεταγωγής σήματος διάφορων άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών απαραίτητων για την επιβίωση των οργανισμών, παρακάτω αναφέρονται 2 ακόμη γενικές λειτουργίες του RNAi με ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον:

Για τις περισσότερες βιολογικές λειτουργίες που ρυθμίζονται μέσω RNAi κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα miRNA. Πειραματικά δεδομένα φαίνεται όμως να δείχνουν ότι διαδραματίζεται στους οργανισμούς σε μεγάλο βαθμό σίγηση "εγωιστικών" στοιχείων του γονιδιώματος, όπως για παράδειγμα των τρανσποζονίων μέσω στόχευσης των μεταγράφων τους από το RNAi [84]. Ένα άλλο βιολογικό φαινόμενο RNAi στο οποίο διαδραματίζουν κύριο ρόλο τα siRNAs είναι η γονιδιακή σίγηση στοιχείων του γονιδιώματος ιών, διαδικασία που προστατεύει τους οργανισμούς από μολύνσεις. Στα κουνούπια, συμπεριλαμβανόμενου του *Ae. albopictus* έχει βρεθεί τέτοιος μηχανισμός [85].

Στην επόμενη εικόνα απεικονίζεται το αντικό μονοπάτι RNAi που εντοπίζεται στα έντομα και έχει κεντρικό ρόλο στο αν θα εγκατασταθεί μια μόλυνση. Η σημασία του είναι τεράστια καθώς όπως έχει ήδη καταστεί σαφές πολλά έντομα είναι φορείς επικίνδυνων ιών για τον άνθρωπο με το κουνούπι τίγρη να αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα. Επίσης αποτελεί παράδειγμα συστημικού RNAi, ενός μοναδικού μηχανισμού ενίσχυσης του RNAi σήματος σε όλο τον οργανισμό.

1.2.4 Το RNAi ως εργαλείο της μοριακής βιολογίας και εφαρμογές στα έντομα

Εισαγωγικά στοιχεία: Το RNAi μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την γονιδιακή σίγηση γονιδίων στόχων ενός οργανισμού με χορήγηση εξωγενών dsRNA που στοχεύουν RNA ενδογενές η και εξωγενές (αν ο στόχος είναι η προστασία του οργανισμού από κάποιον ιό) [86]. Το RNAi μπορεί να εφαρμοστεί για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών στον άνθρωπο [87,88], της βελτίωσης της ανθεκτικότητας των φυτών (άρθρο φυτά) αλλά και στη βασική έρευνα για τη μελέτη της λειτουργίας κάποιου γονιδίου. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να εφαρμοστεί με τεράστια επιτυχία για τον έλεγχο του πληθυσμού συγκεκριμένων εντόμων που είναι επιβλαβή για την οικονομία και την δημόσια υγεία. Η ανάπτυξη τεχνικών RNAi είναι επίσης απαραίτητη εξαιτίας την εμφάνισης ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη υποενότητα αλλά και της τοξικότητας των εντομοκτόνων σε ωφέλιμα έντομα [89].

Διακύμανση της αποτελεσματικότητας του RNAi στα έντομα: Η απόκριση RNAi μπορεί να διαφέρει από είδος σε είδος, μεταξύ μελών του ίδιου είδους, ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών ιστών του ίδιου οργανισμού. Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της απόκρισης RNAi στα έντομα είναι:

A) . Πολύ σημαντικό στοιχείο που μπορεί να καθορίσει σε μεγάλο βαθμό την απόκριση είναι η δυνατότητα επαγωγής συστημικού RNAi από τον οργανισμό και η παρουσία της RdRP. Στα δίπτερα έντομα συμπεριλαμβανομένου του *Aedes albopictus* δεν έχει παρατηρηθεί συστημικό RNAi [92].

B) Παρουσία εξωκυτταρικών νουκλεασών στο πεπτικό σύστημα του εντόμου: Το κουνούπι *Locusta migratoria*, έχει χορηγηθεί dsRNA απευθείας στη σωματική κοιλότητα του εντόμου με μικροένεση με θετική RNAi απόκριση. Χορήγηση όμως των dsRNA μέσω της τροφής δεν είχαν το ίδιο αποτέλεσμα αφού στο πεπτικό σύστημα του εντόμου τα dsRNA αποικοδομούνταν από εξωνουκλεάσες [90,91].

Γ) Ο βαθμός επιτυχίας της RNAi απόκρισης εξαρτάται πολλές φορές και από τον ιστό στόχο, καθώς δεν φαίνεται να έχουν όλοι οι ιστοί στον ίδιο βαθμό την ίδια ικανότητα να επάγουν μια RNAi απόκριση. Για παράδειγμα στο *Aedes aegypti*, οι ιστοί του κεφαλιού και των ωοθηκών αποκρίθηκαν λιγότερο στα εξωγενή dsRNA σε σχέση με τους άλλους ιστούς. Από την άλλη πλευρά, το κουνούπι *Anopheles gambiae* είχε ελαττωμένη απόκριση στους σιελογόνους αδένες του σε σχέση με τους άλλους ιστούς έπειτα από εξωγενή χορήγηση dsRNA [93,94].

Δ) Γνώση του μηχανισμού του RNAi σε ένα είδος: η γνώση για το μηχανισμό είναι πολύ σημαντική για την επιτυχία της διαδικασίας. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του *Tribolium castaneum* το οποίο εμφανίζει διακύμανση στο μέγεθος απόκρισης στο RNAi ακόμη και μεταξύ του ίδιου είδους και με την ίδια μέθοδο χορήγησης [95,96]. Υπάρχουν πολλές υποθέσεις για την εξήγηση αυτού του αξιοπερίεργου φαινομένου με τις κυριότερες να συνιστούν:

1) Η ευαισθησία στο RNAi καθορίζεται από ένα ατελώς επικρατές γονίδιο ή από πολλά γονίδια με αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών φαινότυπων ακόμη και στο ίδιο είδος [97].

2) Οι ιικές μολύνσεις είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την επιτυχία στο RNAi μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Κάποιοι ιοί διαθέτουν μηχανισμούς καταστολής του μηχανισμού RNAi του εντόμου με αποτέλεσμα να εξωτερικώς χορηγούμενα dsRNA να μην χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για γονιδιακή σίγηση [98].

Ε) Επιλογή RNAi στόχου και συνθηκών: Λαμβάνοντας υπόψη όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του RNAi καθίσταται πολύ σημαντικό η διαδικασία εφαρμογής να είναι βέλτιστα σχεδιασμένη. Για την επιλογή του γονιδίου στόχου είναι πολύ σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη δεδομένα μεταγραφικής ενεργότητας του γονιδίου, των αναπτυξιακών σταδίων στα οποία αυτό υπερεκφράζεται (επομένως αυξάνεται η πιθανότητα να είναι απαραίτητο) ενώ θα πρέπει να αξιολογείται και η πιθανότητα σίγησης γονιδίων που δεν αποτελούν στόχους (λεπτομερής ανάλυση της αλληλουχίας του υποψήφιου γονιδίου στόχου για εξάλειψη αυτής της πιθανότητας). Αν το γονίδιο στόχος κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη, είναι σημαντικό η πρωτεΐνη να έχει μικρή διάρκεια ζωής, αλλιώς σίγηση του γονιδίου δεν εγγυάται έναν θνησιγόνο φαινότυπο αν τα επίπεδα της προυπάρχουσας πρωτεΐνης είναι υψηλά [99]. Επίσης το μήκος του χορηγούμενου dsRNA βέλτιστα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 200-520 βάσεων στα περισσότερα έντομα και το ιδανικό μήκος αλλάζει από έντομο σε έντομο [100]. Τέλος θα πρέπει να αξιολογείται η δοσολογία dsRNA που χορηγείται στο έντομο και να αξιολογούνται για αυτόν τον υπολογισμό δεδομένα ποσοτικής έκφρασης του γονιδίου στόχου [99].

1.2.5 Εφαρμογή του RNAi στα έντομα μέσω συνθετικών μικροοργανισμών

Συστήματα μεταφοράς RNAi: Σαφώς τα προβλήματα ανεπαρκούς ευαισθησίας στο RNAi θα πρέπει να λυθούν πριν την ευρεία αξιοποίηση της τεχνολογίας ως εντομοκτόνο. Οι λύσεις που βρίσκονται υπό ανάπτυξη εστιάζουν στην εύρεση τρόπων χορήγησης του dsRNA στα έντομα και γενικά στους οργανισμούς με τέτοιον τρόπο που να προστατεύονται από αποικοδόμηση και η εισαγωγή τους στα κύτταρα να είναι επιτυχής. Οι δυνατότητες αυτών των συστημάτων μεταφοράς είναι τεράστιες. Σε αυτήν την υποενότητα θα δοθεί μεγάλη βαρύτητα στην χρήση συνθετικών μικροοργανισμών ως συστήματα μεταφοράς, καθώς αυτή η μέθοδος πρωταγωνιστεί σε επόμενες ενότητες της παρούσας εργασίας, αλλά θα πραγματοποιηθεί και μια σύνοψη και όλων των υπολοίπων μεθόδων.

Μικροοργανισμοί: Η αξιοποίηση μικροοργανισμών για την εφαρμογή του RNAi προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι: το χαμηλό κόστος (οι δαπάνες για την καλλιέργεια μικροοργανισμών είναι σχετικά μικρές ακόμη και σε μεγάλη κλίμακα), η δυνατότητα μαζικής παραγωγής dsRNA in vivo και τέλος σε εφαρμογές εκτός εργαστηρίου δεν απαιτείται συνεχόμενος διασκορπισμός των οργανισμών στο περιβάλλον αφού υπάρχει η δυνατότητα αυτόνομου πολλαπλασιασμού.

Βακτήρια: Τα συστήματα βακτηρίων, παρά την απλότητά τους, είναι μία από τις αποδοτικότερες μεθόδους για την εισαγωγή dsRNA στα έντομα. Τα συστήματα αυτά αξιοποιούν την γενετικά τροποποιημένη σειρά στελεχών βακτηρίων HT115, τα οποία δεν εκφράζουν την RNase III, η οποία αποτελεί ριβονουκλεάση με δυνατότητα αποικοδόμησης των dsRNA. Επίσης τα στελέχη HT115 έχουν

τροποποιηθεί ώστε να εμπεριέχουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση και ελέγχεται από ένα επαγόμενο οπερόνιο *lac* [101,102]. Τα HT115 βακτήρια συνήθως μετασχηματίζονται με ένα πλασμίδιο L4440 το οποίο περιέχει δύο T7 υποκινητές εκατέρωθεν της περιοχής κλωνοποίησης. Έτσι μετασχηματισμός HT115 με ανασυνδυασμένα πλασμίδια L4440 θα έχει ως αποτέλεσμα παραγωγή dsRNA στα βακτήρια με έναν εξωγενώς ελεγχόμενο τρόπο αφού η έκφραση της T7 πολυμεράσης ελέγχεται από το οπερόνιο *lac*. Η παραπάνω μέθοδος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στον οργανισμό *Caenorhabditis elegans* και έκτοτε έχει βρει ευρεία εφαρμογή σε άλλα έντομα [101,102].

Σε μια πρωτοπόρα εφαρμογή της μεθόδου το 2009, βακτήρια που εξέφραζαν dsRNA κατά του γονιδίου της συνθάσης της χιτίνης, καταναλώθηκαν από το σκουλήκι *Spodoptera exigua*, με αποτέλεσμα όχι μόνο τη γονιδιακή σίγηση του γονιδίου της συνθάσης της χιτίνης στον οργανισμό, αλλά και σε μειωμένη ανάπτυξη των προνυμφών και επαγόμενη θνησιμότητα στους οργανισμούς. Το σημαντικότερο όμως συμπέρασμα είναι ότι παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του γονιδίου στην τραχεία και στην επιδερμίδα του οργανισμού, γεγονός που υποδεικνύει την δράση συστημικού RNAi [103].

Πιθανότατα η αποδοτικότητα της μεθόδου οφείλεται στο γεγονός ότι στο εσωτερικό των βακτηρίων το dsRNA προστατεύεται από την αποικοδόμηση από νουκλεάσες του πεπτικού συστήματος των οργανισμών [104].

Σκόπιμο είναι να αναφερθεί ότι τα HT155 *E.coli* βακτήρια, παρά την αποτελεσματικότητά τους ως μέθοδος μεταφοράς dsRNA, αποτελούν παθογόνα πολλών εντόμων, αρκετά από τα οποία είναι ωφέλιμα από οικονομικής ή περιβαλλοντικής άποψης, με αποτέλεσμα η μαζική χρήση τους εκτός του εργαστηρίου να εγείρει ερωτήματα όσον αφορά την οικολογικές και οικονομικές συνιστώσες ενός τέτοιου εγχειρήματος. Μία καλύτερη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση βακτηρίων ή και μυκήτων που αποτελούν συμβιωτικούς με τα έντομα μικροοργανισμούς ως συστήματα μεταφοράς. Οι συγκεκριμένη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι πολύ οικονομική ακόμη και σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας καθώς μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια θα μεταδίδονταν στους τοπικά μη τροποποιημένα συμβιωτικά βακτήρια. Για παράδειγμα, γονιδιακή σίγηση στους οργανισμούς *Rhodnius prolixus* και *Frankliniella occidentalis* επετεύχθη μέσω γενετικά τροποποιημένων συμβιωτικών βακτηρίων που εκφράζαν το επιθυμητό dsRNA [105].

Σε μια άλλη μελέτη, για γονιδιακή σίγηση του κουνουπιού *Anopheles stephensi* χρησιμοποιήθηκαν γενετικά τροποποιημένα συμβιωτικά με το κουνούπι μικροάλγη, τα οποία καταναλώθηκαν από προνύμφες του κουνουπιού. Αυτά τα εναλλακτικά μέσα μεταφοράς έχουν αξιολογηθεί αμελητέα ως προς την παθογένειά τους στα άλλα έντομα καθιστώντας τα ιδιαίτερα ελκυστικά ως οικολογικά εντομοκτόνα [106].

Μύκητες: Πολλές προσεγγίσεις εφαρμογής του RNAi βασίζονται στην χρήση μυκήτων αντί βακτηρίων λόγω των μοναδικών πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν αυτοί οι οργανισμοί. Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί για την γονιδιακή σίγηση γονιδίων στόχων σε προνύμφες του *Aedes aegypti* με μεγάλη επιτυχία [70]. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας είναι:

- η παρουσία της RdRP γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο για την επαγωγή συστημικού RNAi μετά την είσοδο του στον οργανισμό στόχο
- Απουσία ολοκληρωμένου ενδογενούς μηχανισμού RNAi(απουσία *dicer* και πρωτεϊνών AGO) γεγονός που καθιστά τη συσσώρευση των βιοσυντιθέμενων dsRNA αρκετά γρήγορη [70].

- Γενετική τροποποίηση για παραγωγή dsRNA απευθείας στο κεντρικό γονιδίωμα του ζυμομύκητα χωρίς να καθίσταται απαραίτητη η παρουσία πλασμιδίων (μεγαλύτερη οικολογική ασφάλεια λόγω απουσία φαινομένων οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς) [70].
- Όσον αφορά τα κουνούπια, έχει βρεθεί ότι η παρουσία μυκήτων καθιστά ευνοϊκή επιλογή για τα θυληκά εγκυμονούντα κουνούπια την εναπόθεση αυγών. Το γεγονός αυτό θα αύξανε ακόμη περισσότερο την αποτελεσματικότητα της μεθόδου σε περίπτωση απελευθέρωσης στο περιβάλλον μυκήτων που παράγουν dsRNA εναντίον ενός συγκεκριμένου κουνουπιού στόχου [70].

Τα ίδια πλεονεκτήματα παρουσιάζουν και άλλοι μύκητες όπως ο *P.pastoris*. Ο οργανισμός αυτός επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για γονιδιακή σίγηση στο *Ae. Aegypti* με τελικό αποτέλεσμα την επίτευξη 90% σίγησης του γονιδίου στόχου [71].

Τέλος, πολλά υποσχόμενη είναι η αξιοποίηση ιών ως μέσα εφαρμογής γονιδιακής σίγησης σε οργανισμούς. Σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η εξειδίκευση των ιών όσον αφορά τα είδη που προσβάλλουν, η υψηλή τους αποδοτικότητα στη μόλυνση κυττάρων με την εισαγωγή των νουκλεϊκών τους οξέων στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον και τέλος η εφαρμογή του RNAi από πολλά έντομα ως αντικό μηχανισμό σημαίνει άμεση παραγωγή lncRNAs από τα dsRNA του γενετικά τροποποιημένου ιού με άμεση γονιδιακή σίγηση. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι κάποιοι ιοί έχουν μηχανισμούς καταστολής του RNAi στους οργανισμούς, γεγονός που περιορίζει τον αριθμό των υποψήφιων ιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα μεταφοράς [107-109].

1.2.6 Εφαρμογή RNAi με άλλες προσεγγίσεις

Οι παρακάτω προσεγγίσεις έχουν αξιοποιηθεί για την εφαρμογή του RNAi χωρίς τη διαμεσολάβηση μικροοργανισμών:

A) Μία άλλη προσέγγιση που μπορεί να αυξήσει την σταθερότητα των dsRNA αλλά και την απόδοση της εισαγωγής τους στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον είναι η αφομοίωσή τους σε νανοσωματίδια. Τα νανοσωματίδια είναι συστήματα μεταφοράς που αποτελούνται από υπομονάδες είτε φυσικών είτε συνθετικών πολυμερών. Ένα βιοπολυμερές που χρησιμοποιείται για αυτήν την προσέγγιση είναι το chitosan το οποίο παράγεται με αποακετυλίωση της χιτίνης, ενός πολυσακχαρίτη ο οποίος είναι σημαντικό στοιχείο του εξωσκελετού των αρθροπόδων [110].

B) Ένα άλλο σύστημα μεταφοράς αφορά την αξιοποίηση λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα είναι κυστίδια που στο εξωτερικό τους περιβάλλονται από λιπιδικές ομάδες, δηλαδή μακρομόρια με υδρόφοβες ουρές και υδρόφιλη κεφαλή. Τα λίπη σε υδατικό περιβάλλον παρουσία των dsRNA αναπτύσσουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα- θετικά φορτισμένες κεφαλές των λιπιδίων) με αποτέλεσμα τα λίπη να περιβάλλουν τα dsRNA με τις υδρόφιλες κεφαλές τους προς την εξωτερική πλευρά της νεοσχηματιζόμενης στοιβάδας και τις υδρόφοβες ουρές τους εσωτερικά. Τα λιποσώματα λόγω του λιποφιλικού χαρακτήρα τους διαπερνούν σχετικά εύκολα την φωσφολιπιδική μεμβράνη των κυττάρων και έτσι τα dsRNA εισέρχονται στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον ενώ παράλληλα προστατεύονται από αποικοδόμηση εξωτερικά αυτού [111].

Γ) Μία σχετικά πρόσφατη μέθοδος μεταφοράς dsRNA αφορά πρωτεϊνικά συστήματα μεταφοράς. Τα CPPs (cell penetrating peptides) αποτελούν πρωτεΐνες που λόγω του θετικού τους φορτίου μπορούν να

δεσμεύουν νουκλεϊκά οξέα αλλά και να τα μεταφέρουν μέσα στα κύτταρα με ενδοκυττάρωση τους. Συνήθως αποτελούνται από 10-30 αμινοξέα με υψηλή περιεκτικότητα σε αργινίνη και λυσίνη [112].

Δ)Τέλος μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για εφαρμογή του RNAi κατά εντόμων που αποτελούν απειλή για καλλιέργειες, είναι η χρήση των ίδιων των φυτών ως μέσω μεταφοράς dsRNA. Γενετική τροποποίηση του φυτού για παραγωγή του dsRNA, προσφέρει το πλεονέκτημα της παραγωγής απευθείας siRNAs αφού τα φυτά διαθέτουν τον δικό τους RNAi μηχανισμό. Έτσι τα έντομα, που για παράδειγμα τρέφονται με φύλλα του φυτού, παράλληλα εισάγουν και όλη την ποσότητα siRNA που έχει παραχθεί από το τροποποιημένο φυτό. Η αποδοτικότητα αφομοίωσης των siRNA από τα έντομα είναι σημαντικά μικρότερη από τα dsRNA και για να υπάρχει αποτέλεσμα θα πρέπει τα siRNA να είναι το λιγότερο 60 βάσεις [113].

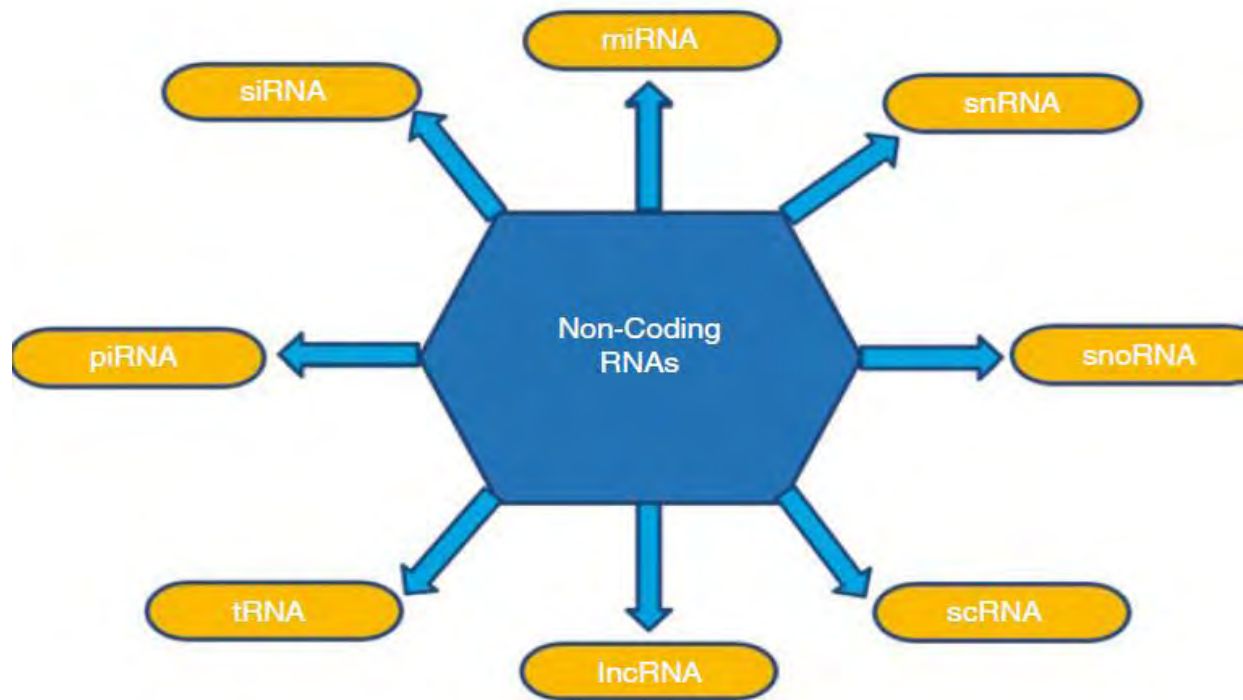
1.3 Long non-coding RNAs

1.3.1 Εισαγωγή στα Long non-coding RNAs

Σε αυτό το σημείο έχει ήδη καταστεί σαφή η απειλή που αποτελεί το *Aedes albopictus* για την δημόσια υγεία αλλά και η άμεση ανάγκη ανάπτυξης μεθοδολογιών για εξειδικευμένες, οικολογικές και αποδοτικές προσεγγίσεις αντιμετώπισης αυτού του εντόμου. Το RNAi διαθέτει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και για αυτό στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της πτυχιακής εργασίας αξιοποιήθηκαν σαν προσέγγιση χρησιμοποιώντας ως μέσο μεταφοράς το στέλεχος HT115 του βακτηρίου *E.coli*. Όμως πριν ξεκινήσει όλη αυτή η διαδικασία προηγήθηκε η επιλογή του γονιδίου στόχου, στο οποίο θα πραγματοποιούνταν γονιδιακή σίγηση μέσω του RNAi. Το γονίδιο που επιλέχθηκε τελικά κωδικοποιεί ένα μεγάλο μη-κωδικό RNA (Long non-coding RNA), η σημασία των οποίων θα υπογραμμιστεί σε αυτήν την υποενότητα.

Κατηγοριοποίηση των μη κωδικών RNA(ncRNA): Σε μια σημαντική αναφορά στο άρθρο των Kowalczyk and Higgs [122], πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των sncRNA και των lncRNA. Με βάση αυτήν την κατηγοριοποίηση τα sncRNA αποτελούνται από τις εξής ομάδες: miRNA, snoRNA, piRNA, snRNA, scRNA, siRNA και tRNA. Τα lncRNA αποτελούνται από τις ομάδες των: antisense ncRNA, sense lncRNA, intergenic lncRNA, intronic lncRNA) [123,124].

Σύνοψη των παραπάνω κατηγοριών μπορεί να γίνει στην επόμενη εικόνα.



Εικόνα 7: Κατηγορίες μη κωδικών RNA (ncRNA) [114].

Η κατηγοριοποίηση των lncRNA έγινε με κριτήριο τον τρόπο μεταγραφής τους και τη θέση τους στο γονιδίωμα αλλά πιο συγκεκριμένα σε σύγκριση με τη θέση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Εκτός των lncRNA που αναφέρονται παρακάτω υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη lncRNA που μεταγράφονται από ψευδογονίδια(pseudogene lncRNA) και από ενισχυτές(enhancer lncRNA) [123,124].

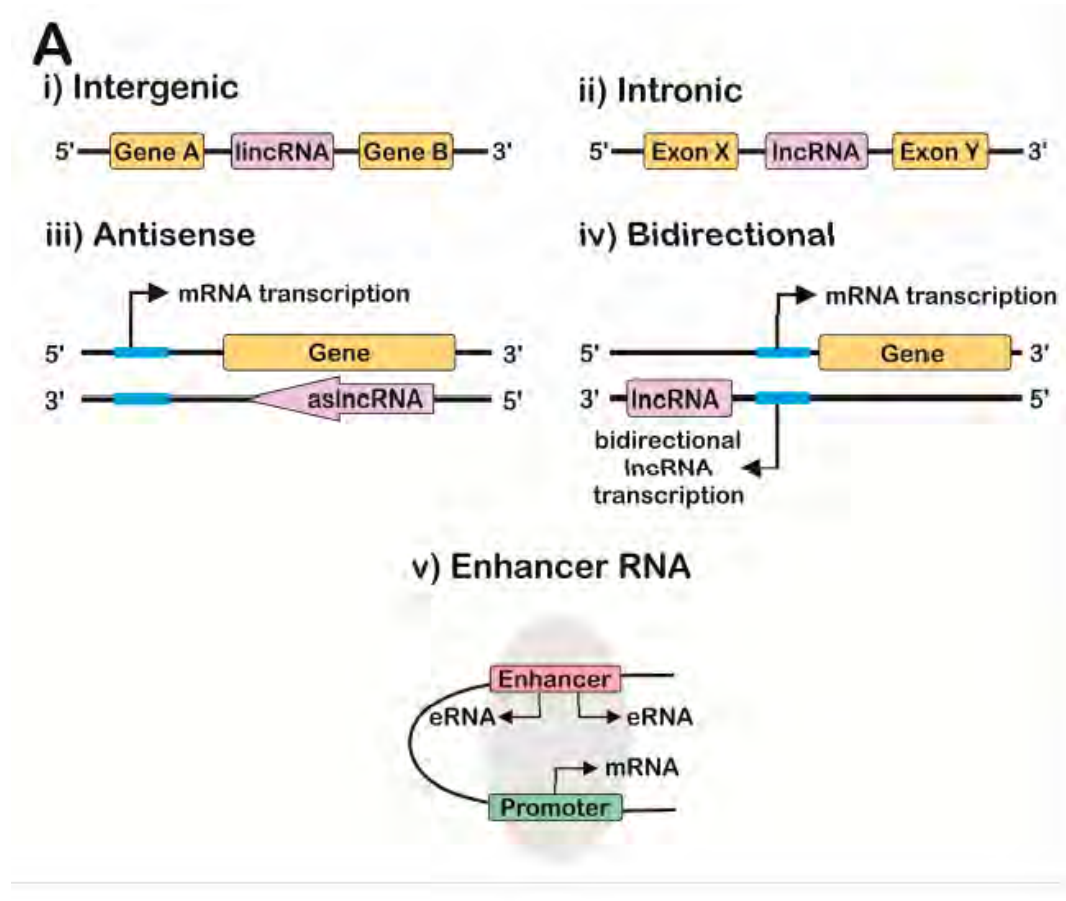
Διαγονιδιακά(Intergenic) lncRNA: Έχουν το χαρακτηριστικό ότι μεταγράφονται σε γενετικούς τόπους μεταξύ γονιδίων και από τους 2 κλώνους του DNA.

Ιντρονικά (Intronic) lncRNA: Μεταγράφονται αποκλειστικά από ιντρόνια στο εσωτερικό γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες.

Νοηματικά(sense) lncRNA: Μεταγράφονται από την νοηματική αλυσίδα γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και μπορεί να περιέχουν κομμάτια εξωνίων ή ακόμη και όλο το γονίδιο συμπεριλαμβάνοντας και ιντρόνια.

Μη νοηματικά(antisense) lncRNA: Έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με τα νοηματικά lncRNA με τη διαφορά ότι η μεταγραφή τους γίνεται από την αντινοηματική αλυσίδα του γονιδίου.

Οι παραπάνω μηχανισμοί μεταγραφής αλλά και η προαναφερθέν περίπτωση των enhancer lncRNAs συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 8 Η κατηγοριοποίηση των lncRNA εξαρτάται από τη θέση τους στο γονιδίωμα. (i) Διαγονιδιακά lncRNA (Intergenic lncRNA) (ii) Ιντρονικά lncRNA (intronic lncRNA). (iii) Τα μη νοηματικά lncRNA (antisense lncRNA). (iv) Τα αμφίδρομα lncRNA (bidirectional lncRNA). (v) τα lncRNA ενισχυτές (enhancer lncRNA) προέρχονται από περιοχές ενισχυτών γονιδίων και μεσολαβούν στην τοποθέτηση μεταγραφικών παραγόντων σε υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες [125].

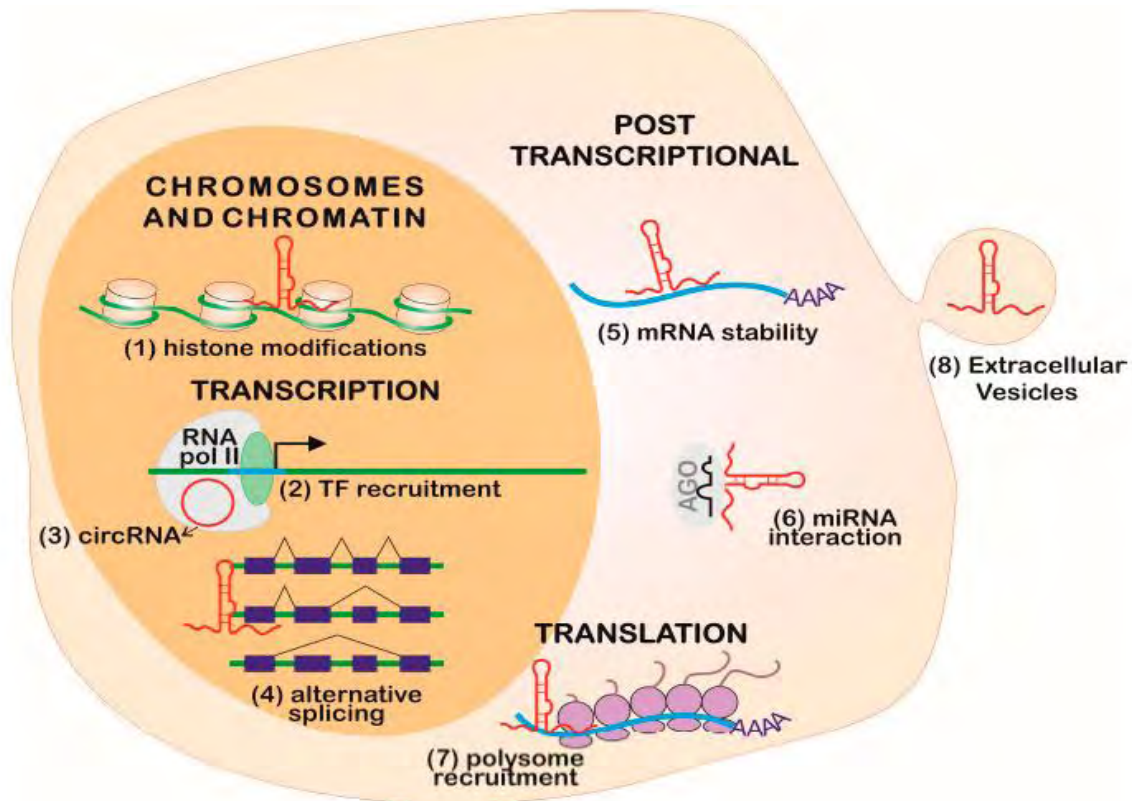
Γενικά χαρακτηριστικά Long non-coding RNAs (lnc RNAs): Τα lncRNA αποτελούν την πιο πολύπλευρη ομάδα από τα RNA που δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Γενικό χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας είναι ότι αποτελούνται από νουκλεοτίδια άνω των 200 βάσεων. Χιλιάδες lncRNA έχουν ανακαλυφθεί στο γονιδίωμα των εντόμων χάρη στην ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχησης νέας γενιάς αλλά και της βιοπληροφορικής [115]. Τα lncRNA εμφανίζουν μικρό βαθμό συντήρησης ακόμη και ανάμεσα σε είδη που ανήκουν στο ίδιο γένος [116]. Το γεγονός αυτό τα καθιστά υποψήφιους στόχους γονιδιακής σίγησης μέσω RNAi καθώς η στόχευσή τους θα μπορούσε να είναι σε μεγάλο βαθμό εξειδικευμένη χωρίς παράπλευρα είδη-στόχους. Βιολογικά τα lncRNA έχουν συσχετιστεί με πολλές σημαντικές διεργασίες ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης, ρύθμισης του μηχανισμού εκφυλισμού του X χρωμοσώματος αλλά και επιγενετικού εντυπώματος ολόκληρων χρωμοσωμάτων [117-120]. Τα lncRNA έχουν παραπλήσιες ιδιότητες με τα mRNA όσον αφορά τις μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις που δέχονται (μάτισμα, πολυαδενιλίωση του 3' άκρου και προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο [121].

1.3.2 Μηχανισμός δράσης των lncRNA

Εισαγωγικά στοιχεία: Τα lncRNA μπορούν να αλληλοεπιδρούν με νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες μέσω συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών τους ή μέσω δομικής αναγνώρισης αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο ένα συγκεκριμένο lncRNA μπορεί να αλληλοεπιδρά με ένα μεγάλο εύρος μακρομορίων. Αυτές οι αλληλοεπιδράσεις επάγονται από ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα [128]. Η χωρική τοποθέτηση ενός lncRNA στο κύτταρο είναι ενδεικτική της λειτουργίας του [126]. Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί lncRNA στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα αλλά και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων [129,130]. Βιοπληροφορικά δεδομένα και αποτελέσματα από RNA-seq αναλύσεις έχουν δείξει ότι περισσότερα από τα μισά lncRNA βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και σχετίζονται με τη σταθερότητα και τη μετάφραση των mRNA [131]. Τα lncRNA που βρίσκονται στον πυρήνα σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τη χρωματίνη, μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα πυρηνικά mRNA [127]. Εξίσου σημαντικό με την ενδοκυτταρική χωρική τοποθέτηση των lncRNA, είναι οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές τους, καθώς και αυτές καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία τους [141]. Αλλαγές στη δομή των lncRNA μπορούν να δρουν ρυθμιστικά καθορίζοντας τη διαθεσιμότητα περιοχών που δεσμεύουν οι σχετιζόμενες με RNA πρωτεΐνες μέσω θερμοδυναμικών προσαρμογών στην σταθερότητα των δομών φουρκέτας που εντοπίζονται στα lncRNA [132,133]. Οι πιο συχνές χημικές ρυθμιστικές τροποποιήσεις των lncRNA, αλλά και άλλων διαφορετικών κατηγοριών RNA, είναι η μετάπτωση της αδενοσίνης σε ινοσίνη από την απαμινάση της αδενοσίνης και οι αντιστρεπτές αντιδράσεις μεθυλίωσης-απομεθυλίωσης της N6-μέθυλο-αδενοσίνης [134]. Εκτός από την ρύθμιση της λειτουργίας, αυτές οι τροποποιήσεις σημαίνουν το μόριο ως ενδογενές και απουσία τους μπορεί να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων τύπου Toll [140].

Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης: Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυώτες είναι περίπλοκη και διαμερισματοποιημένη. Η ρύθμιση είναι εμφανής σε πολλά στάδια, όπως: Στην οργάνωση της χρωματίνης, στην στρατολόγηση των παραγόντων που επιτελούν τη μεταγραφή, στην επεξεργασία του mRNA και τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα, στον χρόνο ημιζωής των mRNA, την διαδικασία της μετάφρασης αλλά και των μεταμεταγραφικών τροποποιήσεων, όλα εκ των οποίων ενδέχεται να ρυθμίζονται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό από τα lncRNA [140,135]. Τα lncRNA μπορούν να εκκρίνονται σε κυστίδια έξω από το κύτταρο ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση και στο περιβάλλον εκτός του κυττάρου

[136].



Εικόνα 9 Απεικόνιση της συμμετοχής των lncRNA στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. (1) Συμπύκνωση του χρωμοσώματος και της χρωματίνης μέσω τροποποιήσεων των ιστονών. (2) Στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων. (3) Δέσμευση στην RNA Pol II. (4) Ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος. (5) Ρύθμιση της σταθερότητας των mRNA. (6) ρύθμιση της διαθεσιμότητας των miRNA. (7) Στρατολόγηση του πολυσώματος. (8) Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε γειτονικά κύτταρα-προσέγγιση μέσω εξωκυτταρικών κυστιδίων [125].

Παρακάτω εξετάζονται τα μονοπάτια που απεικονίζονται στην προηγούμενη εικόνα:

Χρωμόσωμα και δομή χρωματίνης: Έχει βρεθεί ότι lncRNAs όπως το H19, το AIR αλλά και το XIST, το οποίο εμπλέκεται στην απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, σχετίζονται με τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης και το εντύπωμα [128]. Επίσης σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα τα lncRNA αλληλοεπιδρούν απευθείας με χρωματίνη και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρείται η πολυδυναμία [137]. Τα lncRNA αλληλοεπιδρούν με το DNA βάση της συμπληρωματικότητας των βάσεων με ένα μονόκλωνο τμήμα DNA είτε με τη διπλή έλικα [140].

Μεταγραφή: Σε επίπεδο μεταγραφής τα lncRNA μπορεί να διαθέτουν μια περιοχή που δρα ως ενισχυτής αυξάνοντας τον ρυθμό μεταγραφής ενός γονιδίου με αποτέλεσμα τα lncRNA να διαθέτουν ικανότητα cis ρύθμισης [138]. Κάποια lncRNA μπορούν να προσδένονται στην RNA Pol II (β31) ενώ κάποια enhancer lncRNA προσδένονται σε μεταγραφικούς παράγοντες ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας την μεταγραφή

συγκεκριμένων γονιδίων [139]. Τέλος κάποια lncRNA μπορούν να προσδένονται σε μεταγραφικούς ενεργοποιητές ή καταστολείς όπως οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τη στρατολόγησή τους και ρυθμίζοντας τη μεταγραφή [126].

Μετα-μεταγραφική ρύθμιση: Τα lncRNA μπορούν να δράσουν ως ενδογενώς ανταγωνιστικά RNA (ceRNA) παρουσιάζοντας θέσεις δέσμησης για τα miRNA [142,143]. Με αυτόν τον μηχανισμό μπορούν να παρεμβαίνουν στην πρόσδεση του miRNA με το mRNA στόχο του. Τα miRNA εμπλέκονται επίσης στην βιογένεση των miRNA με αρκετούς μηχανισμούς, ενώ τα ίδια ακόμη μπορεί να αποτελούν μορφές πρόδρομων miRNA [144]. Επίσης τα lncRNA μπορούν να συμμετέχουν στην διαδικασία του ματίσματος αλληλοεπιδρώντας με πολλούς παράγοντες ματίσματος που διεκπεραιώνουν την διαδικασία [145]. Τέλος έχει βρεθεί ότι τα lncRNA μπορούν να επάγουν το μονοπάτι NMD (non-sense mediated mRNA decay) με έναν miRNA-ανεξάρτητο τρόπο, επηρεάζοντας έτσι την σταθερότητα των mRNA. Αποτέλεσμα της δράσης του NMD μονοπατιού είναι η RNA αποικοδόμηση [146].

Μετάφραση: Τα lncRNA μπορούν να επάγουν ή να καταστείλουν τον μηχανισμό της μετάφρασης. Μία τους λειτουργία είναι η στρατολόγηση του πολυσώματος, προωθώντας την μη-εξαρτώμενη από την παρουσία καλύπτρας στο 5' άκρο των mRNA [147]. Τα lncRNA σε άλλες περιπτώσεις μπορούν να στρατολογήσουν καταστολείς της μετάφρασης τερματίζοντας την διαδικασία [148].

1.3.3 Φυσιολογικές λειτουργίες των lncRNA στα έντομα

Οι ρόλοι των lncRNA στην διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος αλλά και στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης έχουν καταστήσει σημαντική την παρουσία τους σε ένα πλήθος παθολογικών και φυσιολογικών καταστάσεων. Στα θηλαστικά, οι σημαντικότερες από αυτές είναι η συμβολή τους στην αποσιώπηση του χρωμοσώματος X, στο εντύπωμα, στις χρόνιες παθολογικές καταστάσεις, στην ανοσολογική απόκριση, και σε κάποια παθογόνα. Οι παραπάνω κατηγορίες δεν αποτελούν το συνολικό εύρος δράσης των lncRNA (συμμετοχή των lncRNA σε αναπτυξιακές διαδικασίες, στην ενδοκρινική ρύθμιση και λουπά) [149-151], γεγονός που τονίζει την τεράστια ποικιλία που εμφανίζεται όσον αφορά τις λειτουργίες αυτών των μορίων. Όσον αφορά τα έντομα, δυστυχώς τα δεδομένα δεν είναι πολλά, υπάρχουν όμως κάποια καλά μελετημένα παραδείγματα, κάποια εκ των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω:

Στην *Drosophila* υπάρχουν δεδομένα εμπλοκής των lncRNA στις παρακάτω φυσιολογικές διαδικασίες:

- **Επιγενετικός έλεγχος γονιδιακής ρύθμισης:** Στα αρσενικά παρατηρείται αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας συγκεκριμένων γονιδίων του X χρωμοσώματος. Στην διαδικασία αυτή φαίνεται να εμπλέκονται τα lncRNA *roX1* και *roX2* τα οποία σε συνεργασία με ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο επιτυγχάνουν την ακετυλίωση στο κατάλοιπο λυσίνης 16 της ιστόνης 4, γεγονός που αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την ολοκλήρωση του μηχανισμού [72].
- **Πρόδος αναπτυξιακών διαδικασιών:** Το σύμπλοκο *BX-C* στην *Drosophila* αποτελείται από 4 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των γονιδίων διαφέρει στις διαφορετικές περιοχές της κοιλιακής περιοχής και φαίνεται ότι στην διαφορική αυτή ρύθμιση εμπλέκονται lncRNAs [73].
- **Συμπεριφορά:** το *gar* είναι ένα lncRNA στην *Drosophila* το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται στην ρύθμιση του ύπνου [74].

Χαρακτηρισμός λειτουργιών σε άλλα έντομα:

- Στην *Apis mellifera* (μέλισσα) φαίνεται ότι το lncRNA *kakusei* εμπλέκεται στον καταβολισμό του RNA σε πυρήνες νευρώνων, γεγονός που δείχνει ότι μάλλον έχει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του εγκεφάλου της μέλισσας [75].
- Στην *Plutella xylostella* (είδος πεταλούδας) lncRNA εμπλέκονται στην αποτοξικοποίηση και των μεταβολισμό τοξινών [152].
- Στο *Bombyx mori* (μεταξοσκώληκας) το lncRNA *Fben-1* εμπλέκεται στις διαδικασίες βιοσύνθεσης, μεταφοράς και έκκρισης του μεταξιού [153].

Με όλα τα παραπάνω παραδείγματα καθίσταται σαφές ότι τα lncRNA εμπλέκονται σε πολύ σημαντικές φυσιολογικές διαδικασίες στους οργανισμούς, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης θνησιμότητας σε ένα είδος αν ένα lncRNA που διεκπεραιώνει μια σημαντική βιολογική διεργασία, υποστεί γονιδιακή σίγηση μέσω RNAi. Το κύριο όμως πλεονέκτημα της στόχευσης μέσω RNAi ενός lncRNA είναι ότι εμφανίζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης στο ίδιο είδος αλλά σημαντικές διαφορές ως προς την αλληλουχία με άλλα είδη, ακόμη και με συγγενικά είδη, όπως έχει ήδη προαναφερθεί.

Έτσι λοιπόν προέκυψε η ιδέα που οδήγησε στον κύκλο πειραμάτων που περιγράφεται σε επόμενη ενότητα με στόχο την εφαρμογή του RNAi για την γονιδιακή σίγηση ενός lncRNA στόχου που φυσιολογικά εκφράζεται στο *Aedes albopictus*. Ο βαθμός επικινδυνότητας του συγκεκριμένου οργανισμού έχει ήδη επισημανθεί, συνεπώς η ανάπτυξη ενός βιολογικού εντομοκτόνου που βασίζεται στον κύκλο πειραμάτων αυτής της εργασίας ενδεχομένως να είχε αρκετά οφέλη έπειτα από τις απαραίτητες δοκιμές.

2. Σκοπός

Η ιδέα που οδήγησε στον κύκλο πειραμάτων που περιγράφεται σε επόμενη ενότητα, αφορά την στοχευμένη εφαρμογή του RNAi για την γονιδιακή σίγηση ενός γονιδίου στόχου που φυσιολογικά εκφράζεται στο *Aedes albopictus*. Ο βαθμός επικινδυνότητας του συγκεκριμένου οργανισμού έχει ήδη επισημανθεί, συνεπώς η ανάπτυξη ενός βιολογικού εντομοκτόνου που βασίζεται στον κύκλο πειραμάτων αυτής της εργασίας ενδεχομένως να είχε αρκετά οφέλη έπειτα από τις απαραίτητες δοκιμές. Έτσι λοιπόν σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας γονιδιακής σίγησης ενός lncRNA στο κουνούπι τίγρη με τελικό αποτέλεσμα έναν δυσλειτουργικό φαινότυπο για το κουνούπι (εμφάνιση θνησιμότητας, μειωμένης απόθεσης αυγών και λοιπά). Για την επιτυχία αυτού του εγχειρήματος ήταν απαραίτητη η εκπλήρωση δύο σημαντικών στόχων. Ο πρώτος στόχος ήταν η κατασκευή του συνθετικού μικροοργανισμού που θα χρησιμοποιούνταν για την εφαρμογή του RNAi στο κουνούπι τίγρη. Ο δεύτερος στόχος αφορούσε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση αφορούσε την απομόνωση RNA από δείγματα προνυμφών και νυμφών στα οποία είχε εφαρμοστεί RNAi αλλά και από δείγματα μάρτυρες. Σε δεύτερη φάση ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης μέσω Real-Time PCR με τους παρατηρηθέντες φαινότυπους. Για την εκπλήρωση του πρώτου στόχου αρχικά κατασκευάστηκε το ανασυνδυασμένο με το γονίδιο lncRNA πλασμίδιο L4440. Σε μετέπειτα φάση το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό στελεχών HT115 του βακτηρίου *E.coli*, τα οποία και καλλιεργήθηκαν με στόχο τη μαζική παραγωγή του επιθυμητού dsRNA. Για την εκπλήρωση του δεύτερου στόχου, σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκαν εισαγωγές μετασχηματισμένων βακτηρίων σε έναν πληθυσμό 120 προνυμφών του κουνουπιού τίγρη χωρισμένων σε 2 τρυβλία ανά 2 μέρες ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία σε άλλα δύο τρυβλία με συνολικό πληθυσμό 120 κουνουπιών αλλά με μη μετασχηματισμένα βακτήρια (δημιουργία πληθυσμού μάρτυρα). Σε δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από συγκεκριμένα δείγματα προνυμφών και νυμφών, έγινε μετατροπή τους σε cDNA και ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου με Real-time PCR. Επίσης πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φαινότυπων που παρουσίασαν οι 2 πληθυσμοί με κύριες παραμέτρους, τα επίπεδα θνησιμότητας, την γενική υγεία (ικανότητα πτήσης, ευκινησίας και λοιπά) και τέλος την ικανότητα άντλησης αίματος και εναπόθεσης αυγών.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ

3.1 Εργαστηριακές συνθήκες εκτροφής πληθυσμού *Aedes albopictus*

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είναι τοπικό(Βόλος) και αποτελεί ευγενική χορηγία του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας της Σχολής Γεωπονικών επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Α)Συνθήκες επώασης:

- Θερμοκρασία: 26°C
- Σχετική υγρασία: 60%
- κύκλος φωτός/σκοταδιού σε ώρες: 14/10

Β)Τροφές κουνουπιών:

- Τροφή ενηλίκων: Υδατικό διάλυμα σουκρόζης 10% (ζαχαρόνερο) και αίμα από ανθρώπινους δότες
- Τροφή προνυμφών: θρυμματισμένη ξηρά γατοτροφή(εμπορίου).

3.2 Τεχνικές χειρισμού νουκλεϊκών οξέων

3.2.1 Απομόνωση RNA από βακτήρια

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιώντας διάλυμα φαινόλης-χλωροφόρμιου αποτελεί μια αποτελεσματική και οικονομική μέθοδο με ικανοποιητικά ποσοστά καθαρισμού ενός διαλύματος από πρωτεΐνες και λιπίδια. Στόχος είναι η δημιουργία 2 φάσεων υδρόφιλης και υδρόφοβης φύσης ώστε τα διάφορα μόρια του διαλύματος να κατανεμηθούν με βάση τις χημικές τους ιδιότητες. Το DNA η RNA που απομονώνεται τελικά είναι κατάλληλο για μοριακούς χειρισμούς.

ΥΛΙΚΑ

- οξικό Αμμώνιο 7,5M
- ddH₂O
- Μείγμα φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης 25:24:1
- 100% αιθανόλη
- 70% αιθανόλη

ΜΕΘΟΔΟΣ

Αρχικά πραγματοποιείται μια φυγοκέντρηση στα 14.000 RPM για 15 λεπτά ώστε να σπάσουν τα βακτήρια. Στη συνέχεια το εναιώρημα μεταφέρεται σε άλλο tube και ξεκινά η παρακάτω διαδικασία η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάκτηση καθαρού RNA από οποιοδήποτε υδατικό διάλυμα.

1. Η υδατινή φάση θα πρέπει να είναι περίπου 150μl. Αρχικά γίνεται προσθήκη 50μl οξικού αμμωνίου και στη συνέχεια προσθήκη milli Q νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 150μl.
2. Προσθήκη 150μl διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιου.
3. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 20 λεπτά στα 14000 RPM.
4. Συλλογή υδατικής φάσης και μεταφορά σε άλλο tube(περίπου 150μl).
5. Προσθήκη 100% αιθανόλης, σε ποσότητα 2,5 φορές τον αρχικό όγκο (δηλαδή περίπου 400μl).
6. Επώαση στους -20°C για 2 ώρες.
7. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 45 λεπτά στα 14000 RPM.
8. Απομάκρυνση του διαλύματος με απότομο αναποδογύρισμα του tube, προσέχοντας να μην ξεκολλήσει το pellet.
9. Προσθήκη 1ml 70% αιθανόλης
10. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 15 λεπτά στα 14000 RPM.
11. Απομάκρυνση της αιθανόλης και στη συνέχεια spin down των tubes και μεταφορά στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 55°C ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
12. Προσθήκη 20μl νερού και φύλαξη στους -4°C για μελλοντική χρήση του καθαρού πλέον δείγματος.

3.2.2 Απομόνωση DNA (DNA extraction) από *Aedes albopictus*

Η απομόνωση DNA από στέλεχος του *Aedes albopictus* πραγματοποιείται για να δημιουργηθεί ένα μεγάλο απόθεμα γενετικού υλικού, το οποίο χρησιμεύει σαν μήτρα για οποιαδήποτε αντίδραση PCR, η οποία στοχεύει στην ενίσχυση γονιδίων του κουνουπιού. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

ΥΛΙΚΑ

- Ιστός *Aedes albopictus*
- CTAB (Centrimonium Bromide) 10%
- NaCl 5M
- EDTA 0,5M
- Tris-HCl 1M PH=8
- Rnase A (2mg/ml)
- Πρωτεΐνάση K (50mg/ml)

- Χλωροφόρμιο
- Οξικό νάτριο 10%
- PVP
- Β Mercaptoethanol
- Αιθανόλη 100%
- ddH₂O

ΜΕΘΟΔΟΣ

- Παρασκευή Buffer CTAB:

Πρώτα γίνεται η προσθήκη PVP και τελευταία η προσθήκη του CTAB 10% αφού έχει προηγηθεί vortex και προθέρμανση στους 37°C.

ΥΛΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
CTAB 10%	0,45ml (3%)
EDTA 0,333M (άλλαξε κατά την μέτρηση του PH) PH=8	0,09ml(20mM)
Tris-HCl 1M PH=8	0,15ml (100mM)
PVP 40kd	0,045g (3%)
B mercaptoethanol	0,003ml (0,2%)
NaCl 5M	0,42ml (1,4M)
ddH ₂ O	0,345ml
Τελικός όγκος	1,5ml

- Στο tube που βρίσκεται ο ιστός από *Aedes albopictus* διαδοχικές προσθήκες CTAB Buffer 50ml, 50ml και 100ml. Στα μεσοδιαστήματα των προσθηκών κονιορτοποίηση των ιστών με χρήση pestles για περίπου 2 λεπτά τη φορά.
- Προσθήκη 20ml RNase και μεταφορά των tubes στο υδατόλουτρο στους 37°C για 30 λεπτά.
- Προσθήκη Πρωτεϊνάσης K 0,4ml, επώαση στους 55°C για 1 ώρα.
- Προσθήκη 200ml CTAB και 400ml Χλωροφόρμιο με επακόλουθο vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 14.000 RPM για 10 λεπτά στους 4°C και συλλογή της πάνω φάσης.
- Εφαρμογή πρωτοκόλλου καθαρισμού δείγματος DNA με φαινόλη χλωροφόρμιο. (βλ υποενότητα 3.2.1 από το στάδιο 5 και έπειτα.)

3.2.3 Απομόνωση RNA (RNA extraction) από *Aedes albopictus*

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα δείγματα κουνουπιών που είχαμε στην διάθεσή μας στο στάδιο της προνύμφης (15 προνύμφες ανά δείγμα) και της νύμφης (5 νύμφες ανά δείγμα) είναι απαραίτητη διαδικασία για οποιαδήποτε ποσοτικοποίηση επιθυμούμε να πραγματοποιήσουμε με qPCR όσον αφορά την έκφραση ενός γονιδίου στόχου.

ΥΛΙΚΑ

- Ισοπροπανόλη
- Extrazol
- Γλυκογόνο 10mg/ml

- BCP
- Ο επιθυμητός ιστός
- 70% αιθανόλη

ΜΕΘΟΔΟΣ

- Εξαγωγή των tubes από τους -80°C και τοποθέτησή τους στον πάγο. Μόλις ξεπαγώσουν, ακολουθεί ένα σύντομο spin-down για να καθιζάνουν τυχόν υπολείμματα στα τοιχώματα.
- Τα tubes εμπεριείχαν 20μl Extrazol. Προσθήκη 40μl Extrazol και ομογενοποίηση των ιστών με χρήση εμβόλων (pestles) RNase free. Αυτό το στάδιο δεν έχει συγκεκριμένη χρονική διάρκεια και συνεχίζεται μέχρι την πλήρη κονιορτοποίηση των ιστών.
- Προσθήκη 90 μl Extrazol ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 150μl
- Φυγοκέντρηση 14000g για 15 λεπτά στους 4°C και συλλογή της πάνω φάσης. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό tube.
- Προσθήκη 17μl BCP(0,1 V), ανάδευση χωρίς vortex, και φυγοκέντρηση στα 21000g για 15 λεπτά στους 4°C .
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό tube χωρητικότητας 1,5mL και διατήρηση στον πάγο.
- Προσθήκη 80μl ισοπροπανόλης και 0,5μl γλυκογόνου, vortex και επώαση για 1 ώρα στους -20°C .
- Φυγοκέντρηση με ταχύτητα 21.000g, σε θερμοκρασία 4°C για 30min, για την κατακρήμνιση του RNA σε μορφή ιζήματος (pellet).
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml 70% αιθανόλης. φυγοκέντρηση στα 21.000g για 15 λεπτά στους 4°C .
- Αφαίρεση της μεγαλύτερης ποσότητας αιθανόλης με γρήγορο άδειασμα του tube και εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης από το pellet με επώαση των tubes στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά στους 55°C με τα καπάκια ανοιχτά.
- Αναδιάλυση του pellet σε νερό και επεξεργασία με DNase (βλ 3.2.4)
- Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο(βλ 3.2.1)

- Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C για βραχυπρόθεσμη χρήση ή στους -80°C για μακροπρόθεσμη χρήση.

3.2.4 Επεξεργασία RNA με DNase (DNase treatment)

Η επεξεργασία ενός δείγματος RNA με δεοξυριβονουκλεάση I (DNase I) είναι πολλές φορές απαραίτητη για την αποικοδόμηση του DNA που βρίσκεται στο δείγμα ώστε στη συνέχεια το καθαρό πλέον δείγμα να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειραματικές τεχνικές.

Η DNase I είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει την υδρόλυση των φωσφωδιεστερικών δεσμών του DNA, διασπώντας το σε νουκλεοτίδια και ολιγονουκλεοτίδια. Η δράση της συμπεριλαμβάνει την υδρόλυση μονόκλωνων, δίκλωνων DNA καθώς και υβριδίων DNA-RNA.

Υλικά

- RNA
- DNase I
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) ενζύμου DNase I (10 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.6 σε θερμοκρασία 25°C)
- Ρυθμιστικό διάλυμα απενεργοποίησης του ενζύμου (Inactivation buffer)
- Αποστειρωμένο dd H₂O

Μέθοδος

Οι αναλογίες είναι ενδεικτικές για ένα τυπικό δείγμα με όγκο 20μL

Υλικά	ποσότητες
RNA διάλυμα	20μL
DNase I	1μL(1X)
Buffer	2,5μL

Τα σωληνάκια αφήνονται για επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.

Χρειάζεται στο τέλος να εφαρμοστεί συμπληρωματικά εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο (βλ 3.2.1) λόγω παρουσίας φαινολικών ενώσεων στα δείγματα και επιπλοκών στην real time PCR

3.2.5 Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA ιστού

Η αντίστροφη μεταγραφή αποτελεί μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την μετατροπή μονόκλωνων μορίων RNA σε δίκλινα μόρια DNA μέσω της σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας cDNA. Η μετατροπή αυτή εξυπηρετεί δύο σκοπούς. Αφενός αυξάνεται η προστασία του δείγματος από ενζυμική αποικοδόμηση από ριβονουκλεάσες, αφετέρου δίνεται η δυνατότητα πραγματοποίησης PCR στο δείγμα σε περιπτώσεις περαιτέρω αναλύσεων γονιδιακής έκφρασης (η PCR αξιοποιεί μόνο δίκλινα μόρια).

Υλικά:

- Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (MMLV-RT)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (5X)
- Αναστολέας ριβονουκλεασών
- Ολικό RNA του επιθυμητού ιστού
- Oligo dT εκκινητές(νουκλεοτιδική αλληλουχία με 15 βάσεις θυμίνης)
- dNTPs

Μέθοδος

Υλικά	Ποσότητες
Oligo dT εκκινητές	1,5μL (450ng)
RNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση(1000ng)
dNTPs	1 μL (2mM)
Buffer	4 μL (1X)
Αναστολέας ριβονουκλεασών	1 μL
Αντίστροφη μεταγραφάση	1 μL
ddH ₂ O	Εξαρτάται από την τιμή του RNA
Επώαση στους 37°C για 1 ώρα Επώαση στους 70°C για 10 λεπτά	
Τελικός όγκος	20 μL

3.2.6 Ανάκτηση πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες βακτηρίων

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε αρχικά για την απομόνωση του πλασμιδίου L4440 από κύτταρα E.coli DH5a από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια για την μετέπειτα ενζυμική κατεργασία του πλασμιδίου και εισαγωγή ενός ενθέματος. Είναι επίσης κρίσιμη στην περίπτωση που θέλουμε να απομονώσουμε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που καλλιέργεια μετασηματισμένων βακτηρίων ώστε να σταλθεί για αλληλούχιση και να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα του ενθέματος. Το kit που χρησιμοποιήθηκε είναι το NucleoSpin plasmid purification kit από την εταιρία Macherey-Nagel. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.2.7 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού μπορούν να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και να τις κόβουν σε συγκεκριμένες θέσεις δημιουργώντας είτε συμπληρωματικά είτε τυφλά άκρα. Οι κυριότερες χρήσεις τους αφορούν την κοπή πλασμιδίων και γενικότερα κυκλικών μορίων DNA ώστε να ανασυνδυαστούν στη συνέχεια με το επιθυμητό ένθεμα αλλά αξιοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς καθώς από το πρότυπο θραυσμάτων μιας αλληλουχίας στόχου που έχει επεξεργαστεί με ένα ένζυμο περιορισμού μπορούν να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα(πχ επιβεβαίωση της ύπαρξης ενός ενθέματος σε πλασμίδιο). Τα πλασμίδια διαθέτουν μια περιοχή με πολλές θέσεις αναγνώρισης για διαφορετικά ένζυμα περιορισμού που ονομάζεται πολυσυνδέτης.

Η θερμοκρασία της αντίδρασης, καθώς και η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί και ο χρόνος της αντίδρασης ποικίλουν και εξαρτώνται από το ένζυμο που θα χρησιμοποιήσουμε. Ενδεικτικά Θα

περιγραφεί μια αντίδραση που αξιοποιεί ένζυμο περιορισμού EcoRV-HF και μία αντίδραση που αξιοποιεί το SmaI.

ΥΛΙΚΑ

- Ένζυμο EcoRV-HF/SmaI
- Cutsmart buffer/SmaI buffer 10X
- ddH₂O
- Πλασμίδιο

ΜΕΘΟΔΟΣ

ΥΛΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Πλασμίδιο	4,10μl
Buffer SmaI	5μl
Ένζυμο SmaI	1μl
ddH ₂ O	39,90μl
Τελικός όγκος	50μl
ΥΛΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Πλασμίδιο	1μl
Cutsmart Buffer	2,5μl
Ένζυμο EcoRV-HF	0,5μl
ddH ₂ O	21μl
Τελικός όγκος	25μl

Απενεργοποίηση των ενζύμων στους 65°C για 20 λεπτά.

Η αντίδραση πέψης με EcoRV-HF πραγματοποιείται στους 37°C για 1 ώρα και χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την είσοδο του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση και παρατήρηση των ζωνών. Ανάλογα με το μέγεθος της ζώνης προκύπτει η επιτυχία της κλωνοποίησης, για παράδειγμα στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η ύπαρξη ζώνης περίπου στις 100 βάσεις θα σήμαινε ότι ο κλώνος δεν είναι ανασυνδυασμένος, ενώ ύπαρξη ζώνης περίπου στις 500 βάσεις θα επιβεβαίωνε την ύπαρξη ενθέματος. Η αντίδραση πέψης με το SmaI πραγματοποιείται στους 25°C για 1 ώρα και 20 λεπτά. Είναι πολύ σημαντικό να ξέρουμε ακριβώς πόσες φορές και σε ποιες θέσεις κόβει το πλασμίδιο μας το ένζυμο που επιλέγουμε να χρησιμοποιήσουμε (Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήσαμε L4440 κόβεται στις θέσεις 2053,2167 από το EcoRV-HF και στη θέση 2071 από το SmaI)

Στην επόμενη εικόνα απεικονίζεται ο χάρτης του πλασμιδίου L4440 καθώς και οι διάφορες θέσεις κοπής για τα διαφορετικά ένζυμα περιορισμού.

- 3) Θέρμανση και ανάδευση της κωνικής φιάλης ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- 4) Προσθήκη 3,3 ml βρωμιούχου αιθιδίου στην φιάλη(επιβεβαιώνουμε πρώτα ότι η θερμοκρασία της επιφάνειας της φιάλης είναι τέτοια ώστε να μπορεί να κρατηθεί με γυμνό χέρι).
- 5) Εισαγωγή του διαλύματος αγαρόζης σε ειδικές μήτρες και τοποθέτηση χτενών που θα δημιουργήσουν μικρά πηγαδάκια μόλις το διάλυμα στερεοποιηθεί.
- 6) Αναμονή μέχρι να πραγματοποιηθεί πλήρης στερεοποίηση και αφαίρεση των χτενών.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

- 1) Τοποθέτηση του πηκτώματος στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- 2) Προσθήκη 0,5X TBE ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια του πηκτώματος.
- 3) Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα.
- 4) Εισαγωγή των δειγμάτων καθώς και του Ladder στα πηγαδάκια του gel.
- 5) Επιβολή ηλεκτρικού πεδίου και έναρξη της ηλεκτροφόρησης.

Η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης μπορεί να γίνει με υπεριώδη ακτινοβολία, ή πολύ πιο εύκολα με γυμνό μάτι παρακολουθώντας τα 2 συστατικά του διαλύματος φόρτωσης(μπλε της βρωμοφαινόλης στα 300bp και κυανούν της ξυλόλης στα 4000bp)

3.2.9 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Για την ανάκτηση αλληλουχίας DNA γνωστού μεγέθους από ένα gel ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήσαμε το NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit(Macherey-Nagel). Η ανάκτηση αποσκοπεί σε περαιτέρω καθαρισμό της αλληλουχίας και διεξάγεται μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ώστε να είναι ξεκάθαρη η ζώνη που θεωρούμε ότι έχει το μέγεθος που αναμένουμε από την αλληλουχία που πρέπει να απομονωθεί. Το κόστιμο της ζώνης γίνεται με νυστέρι, και στη συνέχεια αξιοποιείται το kit. Κατά την πορεία των πειραμάτων η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για την απομόνωση του κομμένου πλασμιδίου από gel ηλεκτροφόρησης το οποίο χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διαχωριστούν σε διαφορετικές ζώνες το κομμένο με το άκοπο πλασμίδιο (Διαφορετική ταχύτητα τρεξίματος στο gel μεταξύ των 2 μορφών). Η τεχνική εφαρμόστηκε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.3 Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

3.3.1 Σχεδιασμός εκκινητών με OligoAnalyzer Tool και Primer Blast

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών λαμβάνονται υπόψη συγκεκριμένα κριτήρια όσον αφορά τα δομικά τους χαρακτηριστικά, την εξειδίκευσή τους αλλά και τα δεδομένα από RNA sequencing της περιοχής στόχου.

Για τα δομικά χαρακτηριστικά λαμβάνονται υπόψη οι παρακάτω παράμετροι, οι οποίοι ελέγχονται με το OligoAnalyzer Tool:

- Για την αποφυγή σχηματισμού ομοδιμερών: $\Delta G > -9$
- Για την αποφυγή σχηματισμού ετεροδιμερών: $\Delta G > -9$
- Για την αποφυγή σχηματισμού διατάξεων (Hairpin) που οφείλονται σε ενδομοριακή συμπληρωματικότητα: $T_m + 10 < T_m$ του εκκινητή

Για να είναι ένας εκκινητής εξειδικευμένος θα πρέπει να μην δημιουργούνται παραπροϊόντα στην αντίδραση από την ενίσχυση αλληλουχιών που δεν αποτελούν στόχους. Για την αποφυγή της ενίσχυσης άλλων γενετικών τόπων, αναζητείται η ειδικότητα των εκκινητών με χρήση του προγράμματος primer blast.

Τέλος πρέπει να αξιολογηθεί η περιοχή για την οποία έχει σχεδιαστεί ο εκκινητής για την εγκυρότητα της αλληλουχίας της. Αυτό γίνεται από αξιολόγηση των reads μιας αλληλουχίας με βάση τα RNA seq δεδομένα που υπάρχουν. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των reads τόσο πιο σίγουροι μπορούμε να είμαστε για την αλληλουχία της περιοχής που υβριδίζεται ο εκκινητής, όπως αυτή παρουσιάζεται στην βάση δεδομένων.

3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και Colony PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει την απομόνωση και την ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA χωρίς την χρήση ζωντανών μικροοργανισμών αλλά μέσω ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Αρχή της PCR είναι ο εκθετικός πολλαπλασιασμός επιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλαπλά αντίγραφα μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων που χαρακτηρίζονται από εναλλαγή τριών βασικών βημάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες το κάθε ένα. Σε κάθε κύκλο, οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι χρησιμοποιούνται σαν μήτρες για τη σύνθεση νέων κλώνων προσδίδοντας στην PCR το χαρακτηριστικό του «εκθετικού πολλαπλασιασμού DNA». Χρησιμοποιήσαμε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου Inc7 αλλά και για την διάκριση μετασχηματισμένων και μη αποικιών (colony PCR)

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

1. **Το στάδιο της αποδιάταξης.** Στο στάδιο αυτό αποδιάτασσεται το δίκλωνο DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του, σε υψηλή θερμοκρασία 94-95°C.
2. **Το στάδιο της υβριδοποίησης.** Στο στάδιο αυτό υβριδοποιούνται οι εκκινητές (primers) στις αποδιαταγμένες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m).
3. **Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Στο στάδιο αυτό δρα η Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινητές επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C.

Ο τελικός προσδιορισμός των μορίων DNA που παράγονται από ένα αρχικό μόριο DNA είναι 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων. Πρέπει όμως να λαμβάνεται υπόψη ότι μετά τους 30 κύκλους, η μέθοδος αρχίζει και εμφανίζει συχνά λάθη.

Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια στις αναγραφόμενες συνθήκες:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4min	1
Αποδιάταξη	95°C	30sec	30
Υβριδισμός	T_a	30sec	
Επιμήκυνση	72°C	1kb/sec	

Τελική επιμήκυνση	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	

Υλικά:

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- dNTPs
- Ταq πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Buffer)
- MgCl₂

Μέθοδος:

Για την πραγματοποίηση μιας τυπικής αντίδρασης PCR τελικού όγκου 20μl προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια:

Υλικά	C _{αρχικό}	C _{τελικό}	Ποσότητα
DNA	-	10-40ng	Εξαρτάται από το C _{αρχ}
Buffer	10X	1X	2,5μL
dNTPs	40mM	0,8mM	0,5μL
εκκινητής F	10pmol/μL	0,4-0,6μM	1μL
εκκινητής R	10pmol/μL	0,4-0,6μM	1μL
Τaq πολυμεράση	5units/μL	1unit	0,3μL
ddH₂O	-	-	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος			25μL

Έπειτα τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή με το κατάλληλο πρόγραμμα (ρυθμίσεις κύκλων-σταδίων) και επάζονται για καθορισμένη ώρα. Προαιρετικά, για την ενίσχυση της αντίδρασης προστίθενται και συμπληρωματικό MgCl₂ καθώς ευνοείται η ικανότητα της Ταq πολυμεράσης να προσδένεται στην αλληλουχία

Παραλλαγή της PCR αποτελεί η Colony PCR στην οποία η μόνη διαφορά είναι ότι στα tubes της PCR τρίβεται με οδοντογλυφίδα μια αποικία βακτηρίων, αφήνοντας DNA το οποίο αποτελεί και το DNA μήτρα της αντίδρασης, υπό στείρες συνθήκες. Η μόνη διαφορά όσον αφορά τη στοιχειομετρία της αντίδρασης είναι ότι προστίθεται παραπάνω όγκος ddH₂O ώστε να συμπληρωθούν τα 25μl της αντίδρασης. Ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική σε περίπτωση που θέλουμε να ανιχνεύσουμε πιθανές μετασηματισμένες με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτηριακές αποικίες σε ένα τριβλίο petri.

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

Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με αυτήν της απλής PCR, χρησιμοποιούνται τα ίδια αντιδραστήρια και επαναλαμβάνονται τα ίδια στάδια, με την ειδοποιό διαφορά να έγκειται στην δυνατότητα της Real-Time PCR για οπτικοποίηση της ενίσχυσης των τμημάτων DNA, σε πραγματικό χρόνο. Έτσι λοιπόν η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον ακριβή προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας των νουκλεϊκών οξέων που βρίσκονται σε ένα δείγμα καθώς και για την ποσοτική σύγκριση της ίδιας αλληλουχίας DNA/RNA μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.

Παρακάτω φαίνονται τα στάδια μιας τυπικής Real-Time PCR:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	15sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός	56°C	20sec	
Επιμίκνυση	72°C	15sec	
Απαλοιφή θορύβου	95°C-56°C	ανά 5sec μειώνεται η T κατά 0,5°C	1

Ένα τυπικό σύστημα αντίδρασης μιας real time PCR είναι το παρακάτω:

Υλικά:

- DNA
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal, της εταιρίας kapa biosystems

Υλικά	Ποσότητες
cDNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση
Buffer mix	7,5μl (1X)
Εκκινητής F	0,45μl
Εκκινητής R	0,45μl
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	20μl

Μέθοδος:

Για την πραγματοποίηση μιας Real-time PCR προστίθενται στα ειδικά PCR σωληνάκια τα παρακάτω συστατικά με τελικό όγκο 15μL. Τα συστατικά της αντίδρασης dNTPs, Taq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, MgCl₂ και SYBR Green βρίσκονται ήδη στο Buffer mix.

Για το κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιείται ξεχωριστή αντίδραση ενίσχυσης με το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών ανά γονίδιο, καθώς και με τους εκκινητές του *hkg*.

3.4 Μέθοδοι κλωνοποίησης DNA

3.4.1 Προσθήκη T άκρων σε πλασμίδιο

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση λιγάσης μεταξύ ενός πλασμιδίου στο οποίο έχει γίνει πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού και ένα ένθεμα το οποίο δεν εμφανίζει συμπληρωματικότητα στα άκρα του (blunt ends) με το πλασμίδιο μπορούμε να δοκιμάσουμε τη μέθοδο TA cloning. Η τεχνική βασίζεται στην προσθήκη άκρων θυμίνης στο πλασμίδιο και άκρων αδενίνης στο ένθεμα. Τα άκρα αδενίνης έχουν προστεθεί ήδη στο τμήμα DNA που θα χρησιμοποιηθεί σαν ένθεμα κατά το τελευταίο στάδιο της PCR από την οποία και παράχθηκε μαζικά, λόγω της ιδιαιτερότητας της Taq πολυμεράσης. Για την προσθήκη των άκρων θυμίνης στο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα νουκλεοτιδίων θυμίνης (dTTPs) 100mM
- Kappa Taq buffer 10X
- Kappa Taq πολυμεράση
- Κομμένο πλασμίδιο
- ddH₂O

ΜΕΘΟΔΟΣ

ΥΛΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
DTTPs (C _{τελ} =2mM)	1,6μl
Kappa Taq buffer (10X→1X)	8μl
Kappa Taq πολυμεράση	0,5μl
Ανοικτό πλασμίδιο 240ng	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	80μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 72°C για 2 ώρες, στη συνέχεια το διάλυμα καθαρίζεται με πρωτόκολλο φαινόλης χλωροφόρμιο και αποθηκεύεται στους 4°C.

3.4.2 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA σε πλασμίδιο (ligation)

Στόχος αυτής της τεχνικής είναι η δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου L4440, το οποίο αργότερα θα χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό του στελέχους E.coli HT115. Το ένζυμο που θα καταλύσει την αντίδραση σύνδεσης είναι η T4 DNA λιγάση, η οποία προτιμάται καθώς μπορεί να καταλύσει τη σύνδεση όλων των ειδών των άκρων. Στο συγκεκριμένο πείραμα ο φορέας είχε blunt ends στα οποία προστέθηκαν άκρα θυμίνης, ενώ το ένθεμα διέθετε άκρα αδενίνης τα οποία απέκτησε από την PCR στην οποία ενισχύθηκε (Η προσθήκη Αδενίνων είναι αποτέλεσμα της ατελής λειτουργίας της Kappa DNA πολυμεράσης.) Στην αρχή της αντίδρασης η λιγάση καταλύει τον σχηματισμό 2 φωσφωδιεστερικών δεσμών και το ένθεμα συνδέεται στον ένα άκρο του πλασμιδίου. Σε επόμενο στάδιο η λιγάση καταλύει τον σχηματισμό άλλων 2 φωσφωδιεστερικών δεσμών και το πλασμίδιο κυκλοποιείται με το ένθεμα εισαγμένο. Η προσθήκη των T άκρων στον φορέα εξασφαλίζει ότι το πλασμίδιο δεν κυκλοποιείται χωρίς το ένθεμα καθώς δεν υπάρχει συμπληρωματικότητα.

ΥΛΙΚΑ

- T4 DNA λιγάση
- Buffer DNA λιγάσης
- Πλασμίδιο L4440 με T άκρα
- Ένθεμα
- ddH₂O

ΜΕΘΟΔΟΣ

Η αναλογία φορέα-πλασμιδίου πρέπει να είναι κατά προτίμηση 7:1 ή και μεγαλύτερη, προκειμένου η αντίδραση να είναι αποδοτική.

Χρησιμοποιείται σωληνάκι τύπου Eppendorf

ΥΛΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
T4 DNA λιγάση	1μl
Buffer T4 DNA λιγάσης	2μl
Πλασμίδιο 50ng	3,3μl
Ένθεμα	13,7μl
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο(δεν χρειάστηκε λόγω αραιού ενθέματος)
Τελικός Όγκος	20μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 16°C για 16 ώρες. Στη συνέχεια το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων.

3.4.3 Παρασκευή κυττάρων δεκτικών για ηλεκτροδιάτρηση

Για να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα που έχουμε επιλέξει για τον επιθυμητό μετασχηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης, θα πρέπει πρώτα να υποστούν μια προκαταρκτική επεξεργασία που τροποποιεί τα

κυτταρικά τους τοιχώματα και έτσι η εισαγωγή ξένου DNA κατά την ηλεκτροδιάτρηση καθίσταται πολύ πιο αποδοτική. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την δημιουργία αυτών των δεκτικών κυττάρων περιγράφεται παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

- Στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ(σε 1L περιέχει 10g Tryptone, 15g Agar, 15g Yeast extract, 5g NaCl)
- Υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth (10g Bactrotryptone, 5g Yeast extract, 5g NaCl)
- 10% γλυκερόλη
- ddH₂O
- Κύτταρα E.Coli HT115

ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Επίστρωση κυττάρων HT115 σε στερεό υλικό LB άγαρ με χρήση αποστειρωμένου βιολογικού κρίκου(streaking). Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C για 16 ώρες.
2. Προσθήκη σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα 1ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
3. Επιλογή μιας αποικίας από τη στερεή καλλιέργεια με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και εισαγωγή της οδοντογλυφίδας με την αποικία στον δοκιμαστικό σωλήνα με το υγρό θρεπτικό υλικό κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
4. Επώση της υγρής καλλιέργειας στους 37°C για 16 ώρες υπό ανάδευση στα 210rpm
5. Μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη που περιέχει 300ml LB Broth.
6. Επώση της καλλιέργειας στους 37°C στα 210rpm μέχρι η τιμή οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ να κυμαίνεται στα 0,4-0,6 (δηλαδή τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική φάση).
7. Μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνες τύπου Falcon 50ml και τοποθέτηση στον πάγο για 10 λεπτά ώστε τα κύτταρα να σταματήσουν να αναπτύσσονται.
8. Φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 λεπτά στα 4000rpm ώστε να κατακρημνιστούν τα κύτταρα χωρίς να σπάσουν τα κυτταρικά τους τοιχώματα.
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων με αποστειρωμένο ddH₂O (50 ml τελικός όγκος).
10. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9.
11. Απομάκρυνση του εναιωρήματος και επαναδιάλυση σε 4ml γλυκερόλης 10%
12. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C στις 4000rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου
13. Προσθήκη 250μl γλυκερόλης σε κάθε falcon και διαίρεση της ποσότητας σε προψυγμένα Eppendorf σωληνάκια
14. Διατήρηση στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.4.4 Μετασηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που αποσκοπεί στην δημιουργία οπών στο κυτταρικό τοίχωμα δεκτικών κυττάρων, έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η εισαγωγή ξένων μορίων DNA

μέσα στο κύτταρο. Η μέθοδος βασίζεται στην στιγμιαία αποδιοργάνωση της φωσφωλιπιδιακής μεμβράνης μέσω ηλεκτρικών παλμών. Για να αποφευχθεί η λύση των κυττάρων ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην τιμή της έντασης των ηλεκτρικών παλμών καθώς και στο χρονικό εύρος που αυτοί εφαρμόζονται. Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος μετασχηματισμού που είναι αποδοτική ακόμη και με μικρές ποσότητες DNA.

ΥΛΙΚΑ

- Δεκτικά κύτταρα E.coli HT115.
- Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο L4440
- Θρεπτικό υλικό LB Broth
- Τρυβλία με LB άγαρ(αμικικιλίνη 100μg/ml τετρακυκλίνη 12,5μg/ml)

ΜΕΘΟΔΟΣ

- Απόψυξη των δεκτικών κυττάρων από τους -80°C στον πάγο για 5 λεπτά
- Προσθήκη στο tube με τα κύτταρα(50μl), 5μl από το tube με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και τα άλλα συστατικά αντίδρασης της λιγάσης, ανάδευση με ελαφρύ πιπετάρισμα και αναμονή για άλλα 5 λεπτά.
- Μεταφορά του μίγματος(55μl) σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα διαμέτρου 0,2cm και μεταφορά στην θέση εισδοχής της συσκευής.
- Εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού 1,8-2,2 watt για 5-6 msec.
- Άμεση μεταφορά υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth στην κυψελίδα(945μl)
- Ανάδευση και μεταφορά όλης της ποσότητας σε αποστειρωμένο σωλήνα
- Επώαση για 1 ώρα στους 37°C στα 210rpm
- Επίστρωση 300ml σε τρυβλίο με LB άγαρ και αποθήκευση της υπόλοιπης ποσότητας στο ψυγείο
- Επώαση της στερεής καλλιέργειας για 16 ώρες στους 37°C
- Φύλαξη η απευθείας δοκιμές για εύρεση ανασυνδυασμένων αποικιών με colony PCR και απομόνωση πλασμιδίου/πέψη με ένζυμα περιορισμού/ηλεκτροφόρηση

3.4.5 Αλληλούχιση κατά Sanger

Για την αλληλούχιση των δειγμάτων αξιοποιήθηκε η μέθοδος κατά Sanger από την εταιρία CEMIA(cellular and molecular immunological applications) η οποία εδράζεται στην Λάρισα. Τα δείγματα που αποστέλονται για αλληλούχιση πρέπει να έχουν ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας($1,9 > OD_{260/280} > 1,8$)

Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα τεχνικά χαρακτηριστικά(συγκέντρωση και όγκος) των δειγμάτων για μια αντίδραση αλληλούχισης.

Template	Size	Concentration	Volume per reaction
Plasmid DNA		100 ng/μl	10 μl
PCR Products	100-300 bp	5-10 ng/μl	10 μl
PCR Products	300-1000 bp	10-20 ng/μl	10 μl
PCR Products	>1000 bp	20-50 ng/μl	10 μl
BACs, cosmids		500 ng/μl	10 μl

Figure 1 Πίνακας συγκέντρωσης-όγκου δείγματος ανά κατηγορία

Μέθοδος: Η αλληλούχιση κατά Sanger βασίζεται στο γεγονός ότι ενώ τα φυσιολογικά dNTPs έχουν τη δυνατότητα να συνάπτουν μεταξύ τους φωσφωδιεστερικούς δεσμούς κατά την αντιγραφή του DNA, τα ddNTPs, στα οποία απουσιάζει η 3' υδροξυλομάδα, δεν εμφανίζεται αυτή η δυνατότητα. Έτσι λοιπόν για την αλληλούχιση μιας περιοχής ενός πλασμιδίου ή ενός προϊόντος PCR πραγματοποιούνται 4 διαφορετικές αντιδράσεις και σε κάθε μια πραγματοποιείται in vitro αντιγραφή του DNA παρουσία όλων των φυσιολογικών dNTPs. Η κάθε όμως εκ των τεσσάρων αντίδραση περιέχει και ένα εκ των τεσσάρων ειδών ddNTPs, τα οποία έχουν τροποποιηθεί έτσι ώστε μετά την προσάρτηση τους να εκπέμπουν συγκεκριμένο φθορισμό. Το αποτέλεσμα είναι σε κάθε αντίδραση να δημιουργούνται στα πλαίσια της τυχερότητας διαφορετικοί πρόωροι τερματισμοί της αντιγραφής λόγω προσάρτησης στην αλυσίδα ενός ddNTP και σε κάθε τερματισμό να παράγεται διαφορετικός φθορισμός. Στο τέλος όλων των αντιδράσεων δημιουργείται με την κατάλληλη βιοπληροφορική επεξεργασία το χρωματογράφημα, ερμηνεία του οποίου φανερώνει την ταυτότητα αλληλουχίας που επιθυμούμε.

3.5 Μέθοδοι παραγωγής dsRNA

3.5.1 In Vitro Transcription-παραγωγή dsRNA

Για την διεξαγωγή συγκεκριμένων πειραμάτων RNAi είναι απαραίτητη η μαζική παραγωγή dsRNA τα οποία για να δημιουργηθούν χρειάζεται να έχουμε στην διάθεση μας δίκλωνο DNA το οποίο θα λειτουργήσει ως μήτρα. Το δίκλωνο DNA είναι ουσιαστικά προϊόν μιας προηγούμενης απλής PCR, στην οποία οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν την αλληλουχία του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης στα άκρα τους, έτσι ώστε το προϊόν ενίσχυσης να διαθέτει και αυτό στα άκρα του προσαρτημένα T7 άκρα. Αυτό είναι καθοριστικό για να μπορέσει να προσδεθεί η RNA πολυμεράση του T7 Megascript kit στο PCR προϊόν και να παραχθεί εν τέλει δίκλωνο dsRNA για μελλοντικά πειράματα γονιδιακής σίγησης.

ΥΛΙΚΑ

- Διαλύματα των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων
- Ρυθμιστικό διάλυμα buffer
- Διάλυμα RNA πολυμεράσης
- ddH₂O
- DNA μήτρα με T7 άκρα

ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικά	Ποσότητες
DNA	Ανάλογα την συγκέντρωση του δείγματος
Reaction buffer	5μl (1X)
Mix RNA πολυμεράσης	5μl
Mix ριβονουκλεοτιδίων	20μl(5μl από το καθένα)
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	50μl

Η αντίδραση προτιμάται να γίνεται με τελικό όγκο 20μl.

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 16 ώρες

Αφού πραγματοποιηθεί η αντίδραση, ακολουθούνται το πρωτόκολλο επεξεργασίας με DNase που περιγράφεται αμέσως μετά και τέλος το δείγμα καθαρίζεται με πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφόρμιου το οποίο έχει ήδη περιγραφεί. Μετά το καθαρό δείγμα που περιέχει τα dsRNA φυλάσσεται στους -80°C.

3.5.2 Επαγωγή Μεταγραφής γονιδίου σε κύτταρα HT115 με IPTG

Το στέλεχος *E.coli* που χρησιμοποιήσαμε (HT115) έχει την ιδιαιτερότητα ότι η έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης του ελέγχεται από τον χειριστή του οπερονίου της λακτόζης. Όταν στον χειριστή έχει προσδεθεί ο καταστολέας, δεν μπορεί να επαχθεί μεταγραφή του οπερονίου. Φυσιολογικά μεταγραφή επάγεται παρουσία της αλλολακτόζης, η οποία προσδένεται στον καταστολέα και έτσι ο υποκινητής του οπερονίου είναι λειτουργικός και μπορεί να επαχθεί μεταγραφή. Το IPTG είναι δομικά παρόμοιο με την αλλολακτόζη με αποτέλεσμα να μπορεί και αυτό να επάγει μεταγραφή μόλις προστεθεί εξωγενώς στον κυτταρικό πληθυσμό και εισέλθει στα κύτταρα. Έπειτα εκφράζεται η T7 RNA πολυμεράση και έτσι προσδένεται στον T7 υποκινητή του πλασμιδίου που χρησιμοποιήσαμε για τον μετασχηματισμό L4440 και ξεκινά η παραγωγή dsRNA. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για μαζική παραγωγή dsRNA από τα κύτταρα, πριν αυτά εισαχθούν στον πληθυσμό *Aedes albopictus*, ήταν το εξής:

ΥΛΙΚΑ

- IPTG 0,2M
- Αποστειρωμένες φλάσκες-σωλήνες
- 900ml LB Broth
- Τρυβλία LB άγαρ(ένα με αποικίες *E.coli* μετασχηματισμένων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο Inc 7 και ένα μάρτυρα)
- Milli Q H₂O

ΜΕΘΟΔΟΣ

1. Υπό ασηπτικές συνθήκες γίνεται εισαγωγή μέσω οδοντογλυφίδας μιας αποικίας μετασχηματισμένων E.coli σε σωλήνα που περιέχει 3ml LB broth και μίας αποικίας μάρτυρα σε έναν άλλο αντίστοιχο σωλήνα.
2. Επώαση για 16 ώρες στους 37°C στα 210 RPM.
3. Ανακαλλιέργεια σε φλάσκες με 47ml LB Broth και επώαση στις ίδιες συνθήκες μέχρι το OD να φτάσει 0,5-0,6(περίπου 1 ώρα και 20 λεπτά).
4. Προσθήκη 100μl IPTG στην κάθε φλάσκα.
5. Επώαση για 4 ώρες.
6. Μεταφορά σε Falcon για φυγοκέντρηση.
7. Φυγοκέντρηση 5000RPM για 10 λεπτά και ξεσκαρτάρισμα του εναιωρήματος
8. Προσθήκη 1ml Milli Q νερού και στα 2 falcon.

3.6 Παρωδική αποσιώπηση γονιδίων

Μέθοδος

Η εφαρμογή του RNAi πραγματοποιήθηκε με χορήγηση 400μl διαλύματος μετασχηματισμένων κυττάρων E.coli HT115 που παράγουν το επιθυμητό dsRNA σε 2 διαφορετικά τρυβλία τα οποία περιείχαν από 60 προνύμφες κουνουπιών. Ως μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν άλλα 2 τρυβλία στα οποία χορηγήθηκαν μη μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli της ίδιας σειράς. Κατανάλωση των μετασχηματισμένων κυττάρων από τις προνύμφες έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο των dsRNA στον οργανισμό των κουνουπιών, με αναμενόμενο αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του RNAi μηχανισμού και την επακόλουθη σίγηση του γονιδίου στόχου.

4. Αποτελέσματα

4.1 Δημιουργία συνθετικού E.coli με ικανότητα επαγωγής RNAi

4.1.1 Επιλογή γονιδίου-στόχου και δημιουργία ενθέματος

Το γονίδιο στόχος που επιλέχθηκε για γονιδιακή σίγηση στο κουνούπι τίγρη είναι το XR_002129214.1, το οποίο μεταγράφει ένα lncRNA, στο οποίο και δόθηκε η ονομασία "lnc7". Βασικό κριτήριο για την επιλογή του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν η εμφανιζόμενη υπερέκφρασή του αποκλειστικά στο στάδιο της προνύμφης του κουνουπιού. Ως μήτρα για την PCR αξιοποιήθηκαν δείγματα cDNA του κουνουπιού αλλά αργότερα πραγματοποιήθηκε DNA extraction από ενήλικα κουνούπια ώστε να χρησιμοποιηθεί DNA και όχι cDNA για μελλοντικές PCR στο συγκεκριμένο γονίδιο καθώς η υπο στόχευση περιοχή βρίσκεται στο ίδιο εξώνιο (η αλλαγή αυτή πραγματοποιήθηκε καθώς η παραγωγή cDNA για χρήση PCR είναι οικονομικά ασύμφορη).

Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε στη συνέχεια για να εξακριβωθεί ότι έχει το σωστό μέγεθος (άρα θεωρητικά και την σωστή αλληλουχία με δεδομένο ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξειδικευμένοι) και ότι δεν έχουν δημιουργηθεί παραπροϊόντα.

Στην επόμενη εικόνα απεικονίζεται το gel αγαρόζης όπου ηλεκτροφορήθηκε το προϊόν ενίσχυσης το οποίο υπολογίζεται να έχει μήκος 362 βάσεις με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.



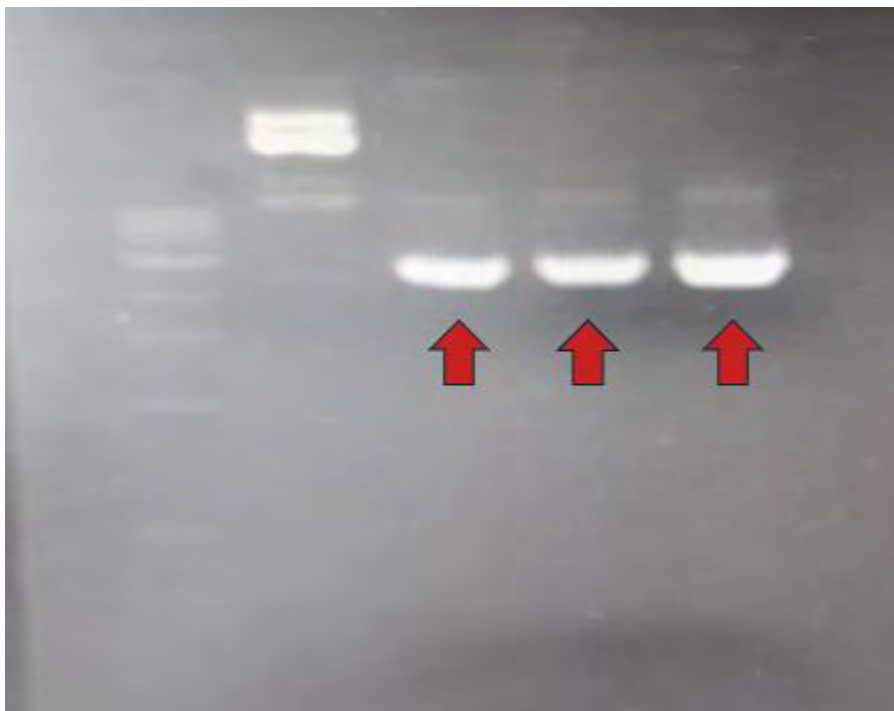
Εικόνα 11: Agarose gel 1%, Ethidium bromide 3%, Ladder: Minotech 100bp DNA Ladder marker 0,5μg/μl

Παρατηρούνται 3 έντονες ζώνες κοντά στην 4^η ζώνη του μάρτυρα η οποία αντιστοιχεί στις 400 βάσεις. Αυτές οι ζώνες αντιστοιχούν στο προϊόν ενίσχυσης της PCR. Οι αχνές ζώνες που παρατηρούνται ακριβώς από κάτω αντιστοιχούν σε σχηματιζόμενα κατά την PCR διμερή εκκινητών. Τα αποτελέσματα του gel δείχνουν με υψηλό βαθμό αξιοπιστίας ότι το περιεχόμενο των πάνω ζωνών σε DNA αποτελείται εξ ολοκλήρου από το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου lnc7 με μήκος 362 βάσεων. Σε επόμενο βήμα

πραγματοποιήθηκε gel extraction για απομόνωση του DNA από τις 3 πάνω ζώνες της εικόνας και καθαρισμό από τα άλλα στοιχεία της αντίδρασης PCR αλλά και από την αгарόζη και το βρωμιούχο αιθίδιο του gel. Μετά τον καθαρισμό και την απομόνωση του προϊόντος ενίσχυσης της PCR, Το Inc7 ένθεμα δημιουργήθηκε επιτυχώς.

4.1.2 Δημιουργία του T φορέα (T vector)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βακτηρίων DH5a(plasmid extraction). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη των πλασμιδίων με το ένζυμο SmaI, το οποίο κόβει μία φορά το πλασμίδιο στη θέση 2071. Τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδίου ηλεκτροφορήθηκαν ώστε να εξακριβωθεί η επιτυχία της αντίδρασης και φαίνονται στην επόμενη εικόνα:



Εικόνα 12: Agarose gel 1%, Ethidium bromide 3%, Ladder: Minotech 1kb DNA Ladder marker 0,5μg/μl

Τα πλασμίδια παρουσιάζουν αναδιπλώσεις καθώς ηλεκτροφορούνται και αυτό αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των κυκλικών μορίων DNA. Ως εκ τούτου δημιουργούνται κατά την ηλεκτροφόρηση διαφορετικές ζώνες εξαιτίας του γεγονότος ότι κάποιες διαμορφώσεις είναι πιο ευκίνητες από άλλες κατά την διαδρομή μέσω των πόρων της αгарόζης. Στην πρώτη στήλη της εικόνας ηλεκτροφορείται άπεπτο πλασμίδιο που λειτουργεί σαν μάρτυρας ενώ δεξιά ηλεκτροφορείται το προϊόν πέψης. Μετά την πέψη η πλειονότητα του πλασμιδίου θα βρίσκεται σε γραμμική μορφή, και για αυτό παρατηρούνται

διαφορετικές ζώνες σε σχέση με τον μάρτυρα. Θεωρώντας ότι η αντίδραση πέψης ήταν αποδοτική μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πλειονότητα του γραμμικού πλασμιδίου βρίσκεται στις φωτεινές ζώνες. Επομένως πραγματοποιήθηκε απομόνωση από πηκτή των φωτεινών και έντονων ζωνών των δειγμάτων πέψης. Στο δείγμα που προέκυψε μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό των ζωνών θεωρούμε ότι βρίσκεται το γραμμικό πλασμίδιο. Στην συνέχεια ακολούθησε αντίδραση προσθήκης άκρων θυμίνης στο κομμένο πλασμίδιο και μετέπειτα καθαρισμός του σχηματισμένου T φορέα από τα συστατικά της αντίδρασης, με πρωτόκολλο απομόνωσης και καθαρισμού DNA με σύστημα φαινόλης- χλωροφόρμιου.

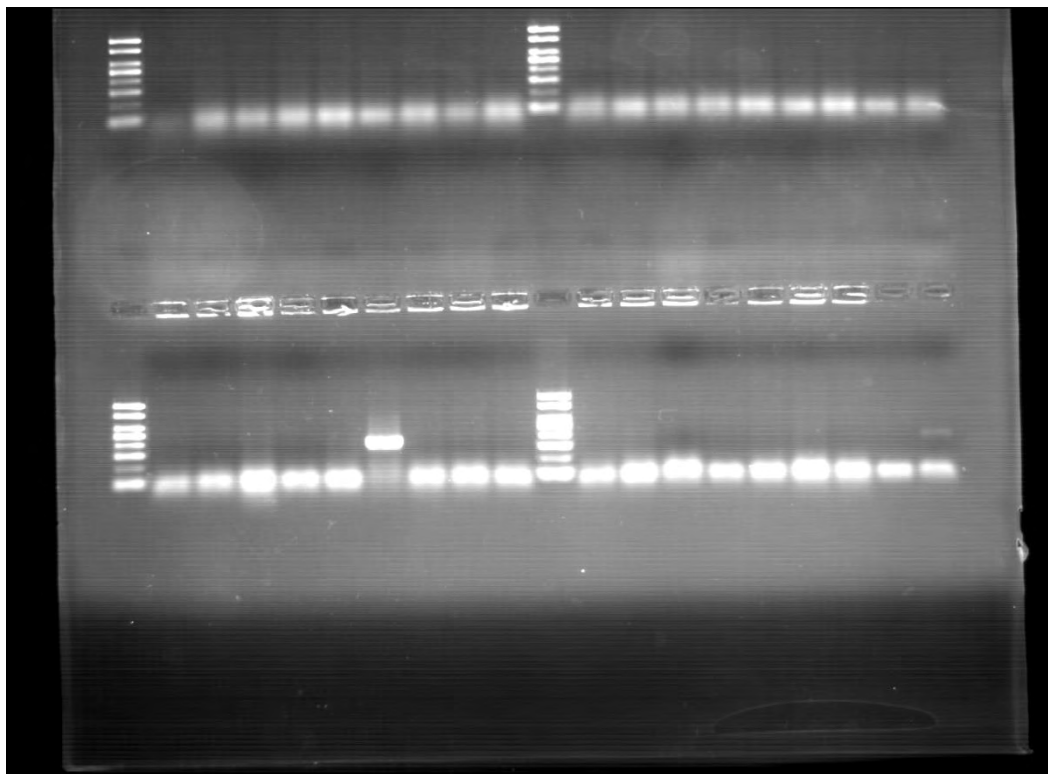
4.1.3 Αντίδραση λιγάσης και κλωνοποίηση σε βακτήρια.

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης μεταξύ του T φορέα και του ενθέματος Inc7. Στη συνέχεια 10μl του διαλύματος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών βακτηρίων του στελέχους HT115 μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης, έτσι ώστε μόνο τα βακτήρια στα οποία έγινε επιτυχημένη εισαγωγή του πλασμιδίου, το οποίο διαθέτει γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη, να μπορέσουν να καλλιεργηθούν σε στερεή καλλιέργεια. Δεδομένου όμως ότι η αντίδραση προσθήκης T άκρων δεν πραγματοποιήθηκε σε όλα τα πλασμίδια, είναι αναμενόμενο στην αντίδραση της λιγάσης κάποια πλασμίδια να έκλεισαν χωρίς να εμπεριέχουν το ένθεμα, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν συνεχίζουν να παρέχουν αντίσταση στην αμπικιλίνη. Για τον παραπάνω λόγο χρειάζεται περεταίρω έλεγχος για την εύρεση των αποικιών που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και όχι το μη ανασυνδυασμένο. Για τον υπολογισμό της απόδοσης της αντίδρασης της λιγάσης πραγματοποιήθηκαν άλλοι 2 μετασχηματισμοί: στον ένα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιώντας διάλυμα αντίδρασης λιγάσης χωρίς το ένθεμα (μόνο τον T φορέα) και ο άλλος χρησιμοποιώντας διάλυμα αντίδρασης λιγάσης που περιείχε το απλό κομμένο πλασμίδιο χωρίς τα T άκρα και χωρίς το ένθεμα. Δυστυχώς οι δύο παραπάνω μάρτυρες έχασαν την αξιοπιστία τους λόγω τεχνικού λάθους και πραγματοποιήθηκαν κατευθείαν οι διαδικασίες εύρεσης της επιθυμητής αποικίας όπως αναφέρονται αναλυτικά στην παρακάτω παράγραφο.

4.1.4 Εύρεση της επιθυμητής αποικίας και εξακρίβωση με αλληλούχηση

A) Colony PCR

Επίστρωση 300ml του διαλύματος των μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο έδωσε 146 αποικίες. Οι πρώτες 20 αποικίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε colony PCR δεν έδωσαν την επιθυμητή ζώνη 362 βάσεων που αντιστοιχεί στο Inc7 το οποίο σημαίνει ότι τα παραγματικά ανασυνδυασμένα πλασμίδια ήταν λίγα. Σε μετέπειτα colony PCR που πραγματοποιήθηκε σε άλλες 30 αποικίες βρέθηκε θετική αποικία, όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα του gel ηλεκτροφόρησης:



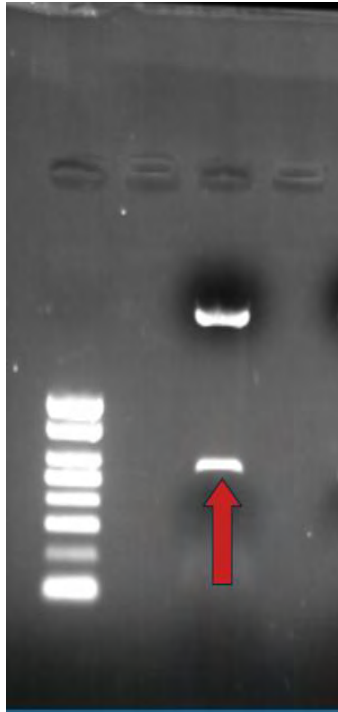
Εικόνα 13 Αποτελέσματα της colony PCR: Agarose gel 1%, Ethidium bromide 3%, Ladder: Minotech 100bp DNA Ladder marker 0,5μg/μl

Οι ζώνες που εμφανίζονται κάτω από 100

βάσεις με βάση τον ladder αντιστοιχούν σε διμερή εκκινητών. Η ζώνη που εμφανίζεται κάτω αριστερά αντιστοιχεί στο Inc7 και εμφανίστηκε στην αποικία νούμερο 44, ενώ η ίδια πιο αχνή ζώνη που εμφανίζεται κάτω δεξιά αποτελεί τον θετικό μάρτυρα. Δεξιά του θετικού μάρτυρα βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας που διασφαλίζει την αξιοπιστία του gel.

B) Πέψη με ένζυμο περιορισμού

Η δεύτερη μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA της υποψήφιας αποικίας 44 και η κοπή του πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού EcoRV. Το ένζυμο αυτό κόβει το πλασμίδιο στις θέσεις 2053 και 2167. Επομένως στην ακόλουθη ηλεκτροφόρηση σε περίπτωση που το πλασμίδιο δεν είναι ανασυνδυασμένο, αναμένεται να προκύψει ζώνη 114 βάσεων. Αν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο με το Inc7, του οποίου η εισαγωγή έγινε στη θέση 2071, τότε αναμένουμε ζώνη κοντά στις 500 βάσεις. Τα αποτελέσματα του gel της πέψης των απομονωμένων πλασμιδίων με το EcoRV φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα:



Εικόνα 14

Agarose gel 1%

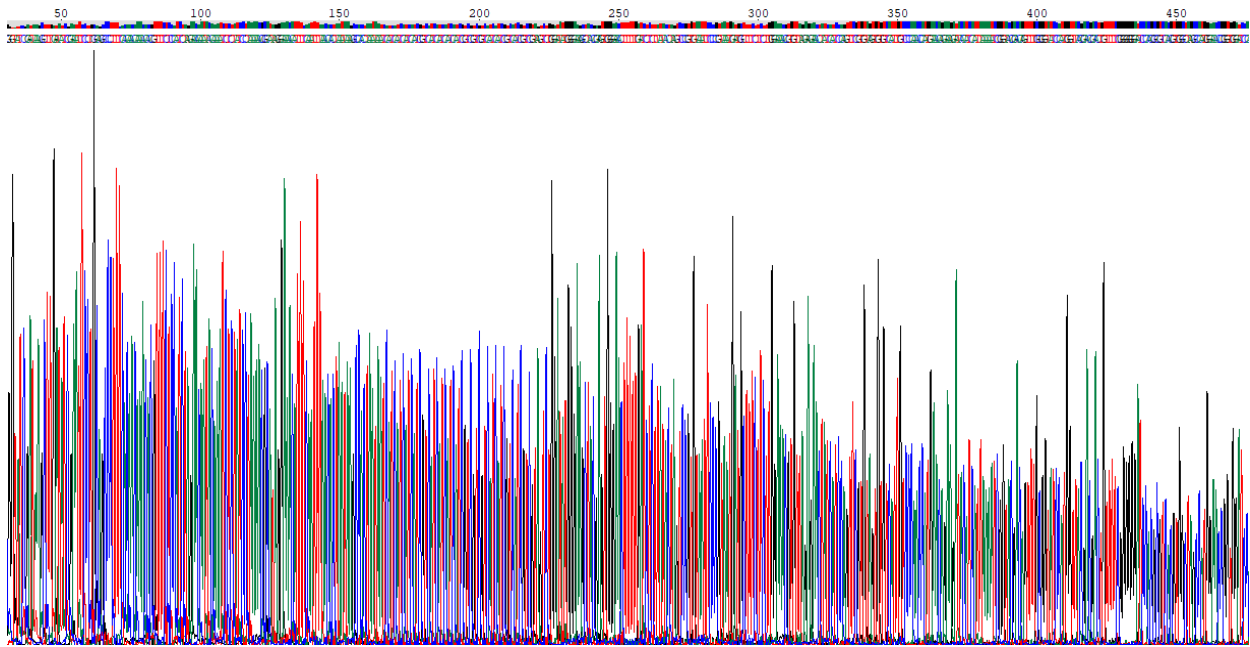
Ethidium bromide 3%

Ladder: Minotech 1kb DNA Ladder
marker 0,5μg/μl

Φαίνεται στην διπλανή εικόνα μία έντονη ζώνη ανάμεσα στα 500 και 600 bp. Το προϊόν αναμένονταν στις 476 βάσεις(με δεδομένω τις θέσεις που κόβουν τα ένζυμα περιορισμού). Μία πιθανή εξήγηση για αυτό το γεγονός είναι η στραβή τοποθέτηση του πηκτώματος στην συσκευή, παρολαυτά η ύπαρξη μιας και μοναδικής έντονης ζώνης θεωρήθηκε ενθαρρυντική(το πείραμα δυστυχώς δεν επαναλήφθηκε). Η επάνω ζώνη αντιστοιχεί στο πλασμίδιο. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την Colony PCR μας προέτρεψαν να στείλουμε το πλασμίδιο για αλληλούχιση ως τελική επιβεβαίωση ότι είναι πράγματι ανασυνδυασμένο, και επομένως ότι τα μετασηματισμένα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα γονιδιακής σίγησης.

Γ) Αλληλούχιση

Δείγμα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στάλθηκε για να αλληλούχηθεί με τη μέθοδο SANGER νέας γενιάς. Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής M13(-20) Forward. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για την περιοχή που αντιστοιχεί στο Inc7 παρουσιάζονται στο παρακάτω χρωματογράφημα και είναι αρκετά ποιοτικά.



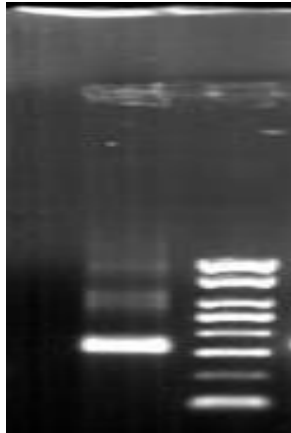
Εικόνα 15 Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του ενθέματος *Inc7*

Τα διαφορετικά χρώματα απεικονίζουν διαφορετικά νουκλεοτίδια. Παρά την ύπαρξη ορισμένων πολυμορφισμών, το γονίδιο που αλληλουχήθηκε είναι χωρίς αμφιβολία το *Inc7*.

Έτσι αφού έγινε επιβεβαίωση και με αλληλούχιση, τα συνθετικά κύτταρα που δημιουργήθηκαν μπορούν να αξιοποιηθούν ως εργαλεία RNAi.

4.2 Δημιουργία dsRNA για το γονίδιο *Inc7*

Για μελλοντικά πειράματα αξιολογήθηκε ότι εκτός από τη χρήση μικροοργανισμών για την εφαρμογή του RNAi, απομονωμένο dsRNA *Inc7* θα μπορούσε επίσης να αξιοποιηθεί για συγκεκριμένες εφαρμογές όπως για παράδειγμα η χορήγηση dsRNA σε προνύμφες με μικροενέσεις. Για την απομόνωση αξιοποιήθηκε σε πρώτη φάση η χρήση εκκινητών, με την αλληλουχία του υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης στα άκρα τους, για την πραγματοποίηση PCR του γονιδίου *Inc7*, ώστε να προσαρτηθούν τα T7 άκρα και στις 2 πλευρές του προϊόντος ενίσχυσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση και gel extraction του προϊόντος και *in vitro* μεταγραφή του πλέον καθαρού DNA. Ο λόγος που προσαρτήθηκαν τα T7 άκρα στο προηγούμενο βήμα είναι ότι σε αυτά προσδέεται η RNA πολυμεράση του T7 megascrypt kit που αξιοποιήθηκε για την *in vitro* μεταγραφή. Το dsRNA προϊόν που παράχθηκε ηλεκτροφορήθηκε και επιβεβαιώθηκε ότι αντιστοιχεί στο προβλεπόμενο μέγεθος του dsRNA για το *Inc7*.



Εικόνα 16 dsRNA, προϊόν *in vitro* μεταγραφής για το *Inc7*

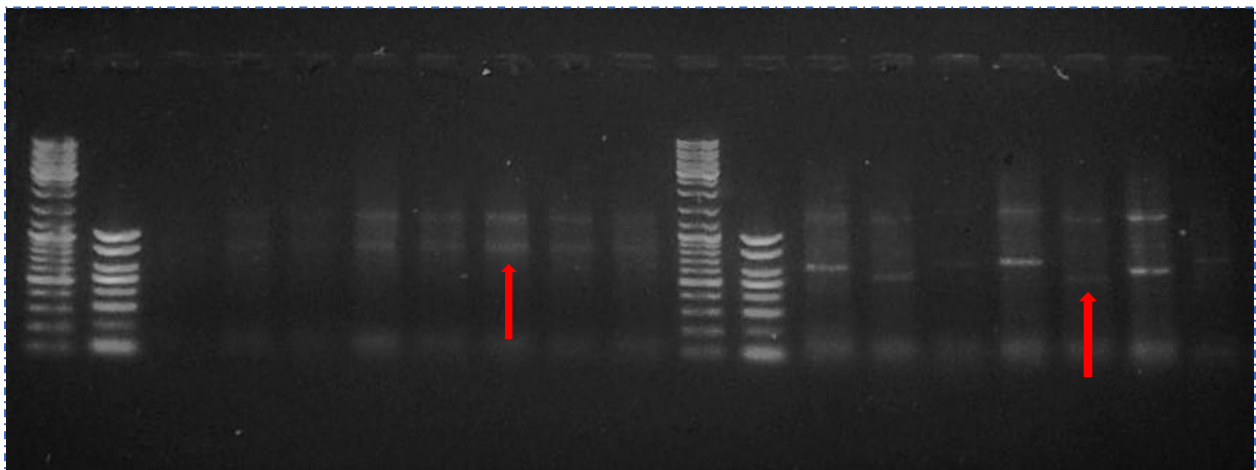
Η φωτεινή ζώνη της αριστερής εικόνας του gel αριστερά του ladder αντιστοιχεί στο προϊόν ενίσχυσης της *in vitro* μεταγραφής, το οποίο μαζί με τα T7 άκρα θα έπρεπε να κυμαίνεται στις 339 βάσεις (η ζώνη με βάση τον ladder εντοπίζεται ανάμεσα στις 300 και 400 βάσεις)

4.3 Εφαρμογή RNAi σε προνύμφες του κουνουπιού τίγρη

Η εφαρμογή του RNAi μέσω των συνθετικών *E.coli* και η στοχοποίηση του *Inc7* γονιδίου έδωσε ενδιαφέρον αποτελέσματα τόσο σε επίπεδο ανάλυσης και σύγκρισης γονιδιακής έκφρασης με *real-time* PCR αλλά και σε επίπεδο φαινότυπου.

4.3.1 Επαγωγή μεταγραφής του *Inc7* από τα μετασηματισμένα βακτήρια

Η επαγωγή της μεταγραφής του *Inc7* για την παραγωγή dsRNA πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση IPTG στα μετασηματισμένα βακτήρια. Τα βακτήρια μετά από επώαση περίπου 3 ωρών σε υγρές καλλιέργειες, ελέγχονταν φωτομετρικά μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να κυμαίνονταν από 0,5 έως 0,6. Απομόνωση του RNA από βακτήρια πριν και μετά την χορήγηση του IPTG απεικονίζεται στην επόμενη εικόνα:

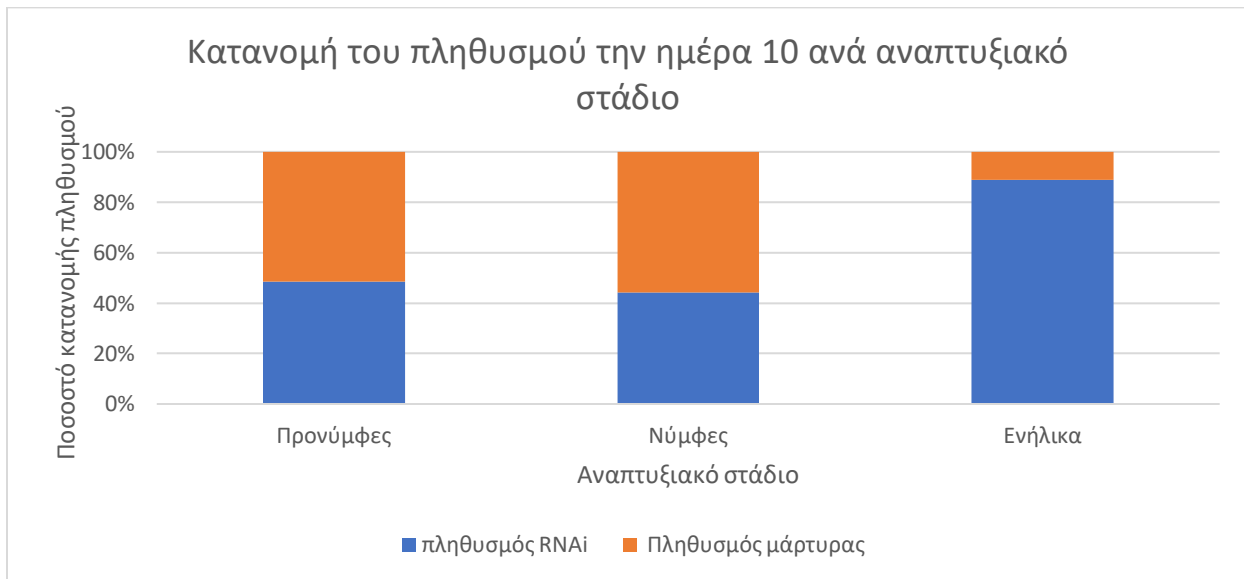


Εικόνα 17 dsRNA παραγόμενο *in vivo* από τα μετασηματισμένα στελέχη των βακτηρίων

Εκτός από το *Inc7* παρουσιάζονται και τα dsRNA άλλων συνθετικών βακτηρίων για άλλους στόχους που δεν σχετίζονται με το συγκεκριμένο σύνολο πειραμάτων. Αριστερά της εικόνας απεικονίζονται τα βακτήρια πριν τη χορήγηση του IPTG. Δεξιά μετά τη χορήγηση του IPTG. Με κόκκινα βέλη απεικονίζεται το RNA που προήλθε από τα βακτήρια που έκφραζαν το *Inc7*. Παρατηρούνται 2 αχνές ζώνες αριστερά και δεξιά που αντιστοιχούν στις 2 ριβοσωμικές υπομονάδες των βακτηρίων. Μόνο δεξιά παρατηρείται μια επιπλέον αχνή ζώνη που αντιστοιχεί στο dsRNA *Inc7*.

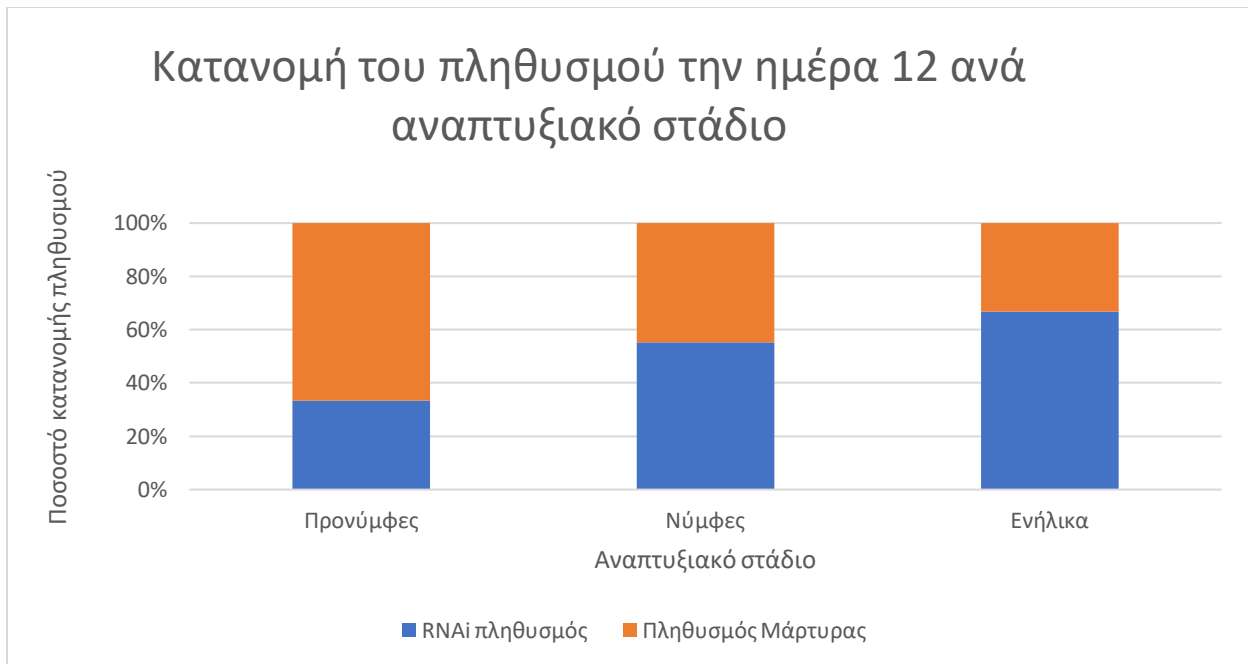
4.3.2 Χορήγηση των συνθετικών βακτηρίων στο κουνούπι και παρατήρηση φαινοτύπου

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 4 τρυβλία το καθένα εκ των οποίων περιείχε 60 προνύμφες του κουνουπιού τίγρη σε 30ml νερό. Από τα 4 τρυβλία, τα 2 αξιοποιήθηκαν ως μάρτυρες, και σε αυτά χορηγήθηκε ανα 2 μέρες 400ml από μη μετασχηματισμένα βακτήρια, τα οποία φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα χωρίς το ένθεμα. Στα άλλα 2 χορηγήθηκαν 400ml μετασχηματισμένων βακτηρίων που είχαν επωαστεί παρουσία IPTG ώστε να έχουν παράξει μεγάλη ποσότητα dsRNA. Το πείραμα συνεχίστηκε μέχρι το έντομο να φτάσει στο ενήλικο στάδιο ενώ εξετάστηκε και η αναπαραγωγική του ικανότητα. Επίσης ανά 2 μέρες πραγματοποιούνταν συλλογή ορισμένων προνυμφών και νυμφών ώστε να υπάρχουν δείγματα μετά την ολοκλήρωση του πειράματος για ανάλυση γονιδιακής έκφρασης. Στο επόμενο διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανομή του πληθυσμού όσον αφορά τα αναπτυξιακά στάδια στις ημέρες 10 και 12 του πειράματος και παρατηρείται ότι το ποσοστό θνησιμότητας παραμένει σταθερό στους 2 πληθυσμούς. Όμως φαίνεται να υπάρχει μια ταχύτερη μετάβαση από το στάδιο της νύμφης, στο ενήλικο στάδιο στα RNAi κουνούπια σε σχέση με τους μάρτυρες.



Εικόνα 18 Απεικόνιση της ποσοστιαίας διαφοράς της αναλογίας των ατόμων στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, μεταξύ των 2 πληθυσμών την ημέρα 10. Στον πληθυσμό μάρτυρα παρατηρήθηκαν 51 προνύμφες, 19 νύμφες και 1 ενήλικο. Στον RNAi πληθυσμό παρατηρήθηκαν 48 προνύμφες, 15 νύμφες και 8 ενήλικα.

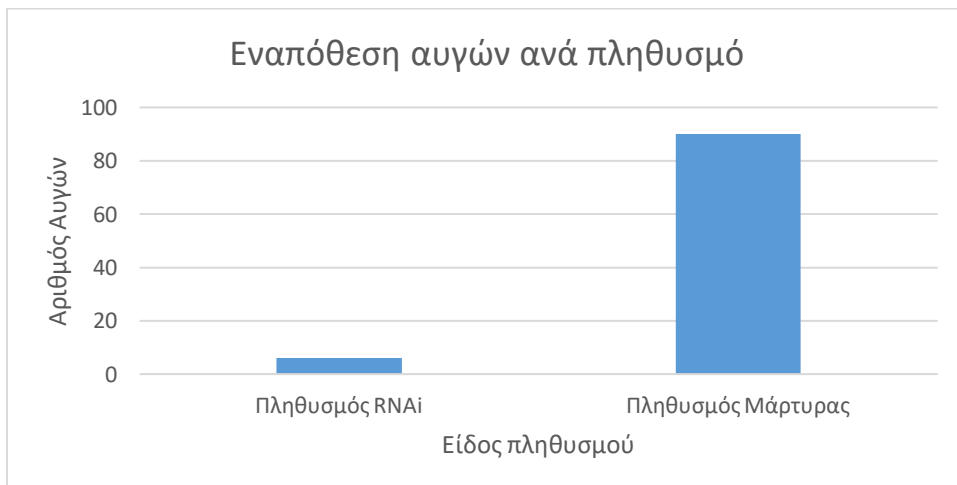
Όπως παρατηρείται στο παραπάνω διάγραμμα, την ημέρα 10 παρά το γεγονός ότι η θνησιμότητα είναι σταθερή, όπως και η αναλογία προνυμφών και νυμφών, φαίνεται ότι για το ένα ενήλικο κουνούπι που εμφανίστηκε στον μάρτυρα, εμφανίστηκαν 8 ενήλικα κουνούπια στα RNAi κουνούπια.



Εικόνα 19 Απεικόνιση της ποσοστιαίας διαφοράς της αναλογίας των ατόμων στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, μεταξύ των 2 πληθυσμών την ημέρα 12. Στον πληθυσμό μάρτυρα παρατηρήθηκαν 28 προνύμφες, 13 νύμφες και 11 ενήλικα. Στον RNAi πληθυσμό παρατηρήθηκαν 14 προνύμφες, 16 νύμφες και 22 ενήλικα.

Στο παραπάνω διάγραμμα που απεικονίζεται η ημέρα 12, η θνησιμότητα συνεχίζει να είναι σταθερή στον πληθυσμό σαν σύνολο αλλά διατηρείται το πρότυπο διαφοράς στην αναλογία των ενηλίκων με 22 ενήλικα κουνούπια στον RNAi πληθυσμό και 11 ενήλικα στον μάρτυρα.

Εκτός από τον ρυθμό ανάπτυξης ένας άλλος πολύ ενδιαφέρον φαινότυπος παρουσιάζεται στο επόμενο διάγραμμα, στο οποίο απεικονίζεται η εναπόθεση των αυγών από τα ενήλικα των 2 πληθυσμών. Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια πρόσληψης αίματος από τα κουνούπια, έλαβε αίμα η πλειοψηφία των θηλυκών, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά της αναλογίας αρσενικών και θηλυκών στους 2 πληθυσμούς.

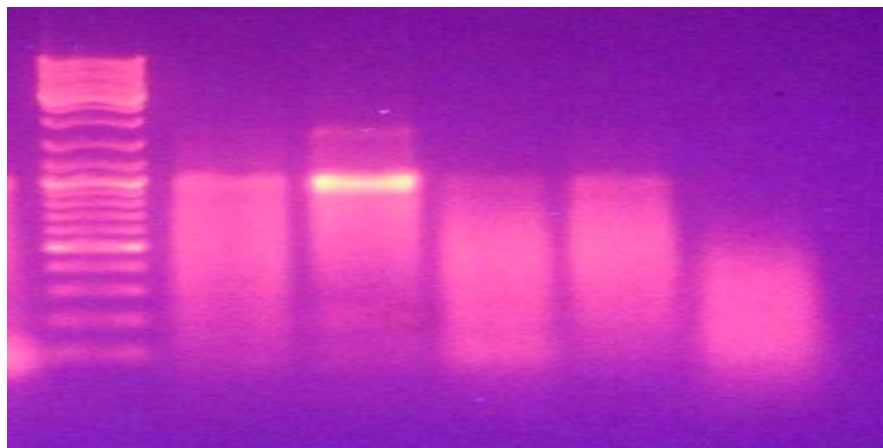


Εικόνα 20 Απεικόνιση της διαφοράς της εναπόθεσης των αυγών μεταξύ των 2 πληθυσμών.

Στο προηγούμενο διάγραμμα, διακρίνεται ξεκάθαρα η διαφορά στην εναπόθεση των αυγών, με τα RNAi κουνούπια να εμφανίζουν μόλις 6 αυγά, ενώ τα κουνούπια μάρτυρες 90 αυγά.

4.3.3 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με Real-time PCR

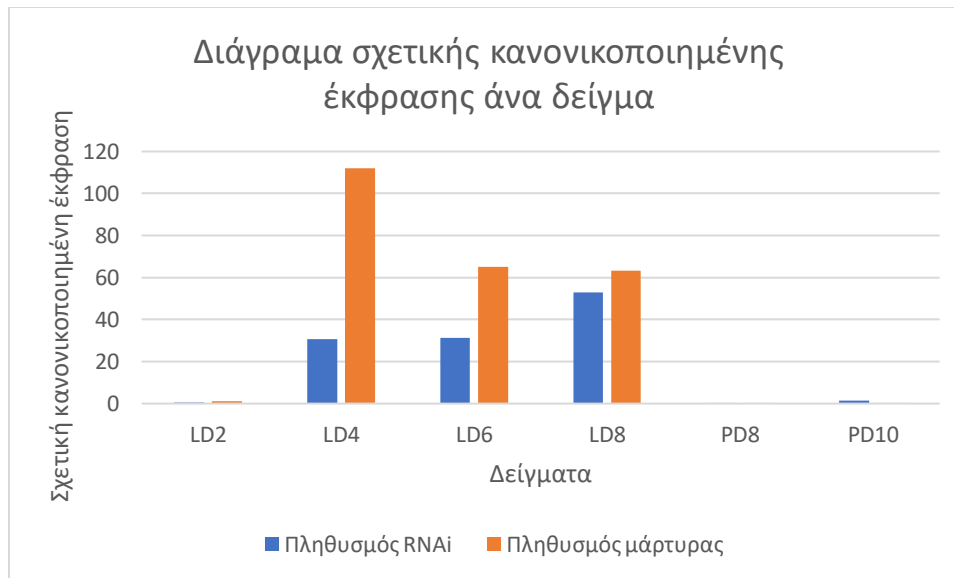
Η μέθοδος της Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ποσοτικής έκφρασης του γονιδίου *Inc7* σε προνύμφες και νύμφες των 2 πληθυσμών. Σε περίπτωση που η ποσοτική έκφραση παραμένει σταθερή σε σχέση με τον πληθυσμό μάρτυρα, η εξήγηση του φαινότυπου μπορεί να αποδοθεί σε τυχαίο γεγονός ή σε siRNA που παράχθηκαν έναντι παράπλευρου στόχου εκτός του *Inc7*. Η διαπίστωση παρολαυτά μεταβολών στην έκφραση του *Inc7*, αποτελεί αν όχι απόδειξη, ισχυρή ένδειξη ότι ο φαινότυπος οφείλεται στην σίγηση του συγκεκριμένου γονιδίου. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από δείγματα προνυμφών των ημερών 2,4,6,8 (αντίστοιχα Ld2(larva day 2) ,Ld4,Ld6,Ld8). Τις ημέρες 10 και 12 πραγματοποιήθηκε η συλλογή δειγμάτων νυμφών(αντίστοιχα P1(pupa day 1),P3). Μετά την απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκε επώαση με αντίστροφη μεταγραφή και μετατροπή σε cDNA ώστε στην συνέχεια αυτό να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την Real-time PCR. Δυστυχώς λόγω τεχνικού λάθους το δείγμα Ld2 αναμείχθηκε με το cDNA πληθυσμών στους οποίους είχε εφαρμοστεί RNAi αξιοποιώντας άλλα γονίδια στόχους, εκτός των πλαισίων της πτυχιακής μου. Για αυτό και το συγκεκριμένο δείγμα δεν είναι αξιόπιστο. Το RNA που απομονώθηκε από τα κουνούπια ηλεκτροφορήθηκε για την διαπίστωση της ποιότητάς του με τα αποτελέσματα να εμφανίζονται στην επόμενη εικόνα:



Εικόνα 21 Ξεκινώντας από την πρώτη στήλη απεικονίζονται τα δείγματα Ld4,Ld6,Ld8,P1,P3

Η ζώνη που εμφανίζεται στην δεύτερη στήλη αντιστοιχεί στο ριβοσωμικό RNA και δείχνει ότι το RNA του δείγματος είναι σε καλή κατάσταση και δεν έχει γίνει επιμόλυνση με κάποια ριβονουκλεάση. Παρολαυτά η αχνή ζώνη άνωθεν της έντονης ζώνης υποδεικνύει την ύπαρξη ποσότητας γονιδιωματικού DNA, το οποίο αντλήθηκε κατά το στάδιο απομόνωσης RNA. Στην πρώτη , τρίτη και τέταρτη στήλη, η ζώνη εμφανίζεται αλλά πιο αχνά ενώ τα αποτελέσματα της πέμπτης στήλης δείχνουν μη ποιοτικό δείγμα.

Στην real-time PCR που πραγματοποιήθηκε στο cDNA των δειγμάτων, έπειτα από επεξεργασία των δεδομένων προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα, ύστερα από επεξεργασία με το πρόγραμμα Microsoft Excel:



Εικόνα 22 Επεξεργασμένα δεδομένα Real-time PCR για τα επίπεδα έκφρασης του Inc7 σε σχέση με του μάρτυρα. Οι συντομογραφίες LD και PD αντιστοιχούν σε Larva Day(προνύμφη ημέρας) και Pupa Day(νύμφη ημέρας) αντίστοιχα.

Τα διαγράμματα Real-time PCR του μάρτυρα και του Inc7-RNAi έδωσε αρκετά δεδομένα για μια αρχική σύγκριση, αλλά για να υπάρξει εμπιστοσύνη στην εγκυρότητα του αποτελέσματος πρέπει να γίνει κανονικοποίηση με ένα ιδιόσυστατο γονίδιο, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το RpS17. Αυτό το βήμα εξαλείφει διαφορές στην έκφραση που προκύπτουν από διαφορετική ποσότητα cDNA στα σωληνάκια της αντίδρασης της Real-time PCR.

Τα αποτελέσματα της Real-time υποδεικνύουν διαφορές στην έκφραση του Inc7 μεταξύ μάρτυρα και RNAi κουνουπιών, με το Inc7 να εμφανίζει μικρότερη έκφραση (ειδικά τις ημέρες 4,6), σε σχέση με την αντίστοιχη μέρα του μάρτυρα.

5.Συζήτηση

5.1 Κλωνοποίηση του Inc7

Παρά το γεγονός ότι η επιτυχής κλωνοποίηση του γονιδίου επιβεβαιώθηκε πέρα από κάθε αμφιβολία μέσω αλληλούχισης, η μη αναμενόμενη χαμηλή απόδοση των μετασχηματισμών προκαλεί ενδιαφέρον. Από τις 54 αποικίες στις οποίες παραγματοποιήθηκε colony PCR, μόνο μία έδωσε θετική ζώνη (αποικία νούμερο 44). Μία αρκετά πιθανή εξήγηση είναι ότι δεν πραγματοποιείται σωστά η προσθήκη αδενών στα άκρα του ενθέματος κατά την PCR με αποτέλεσμα να μην γίνεται η ενσωμάτωση του ενθέματος κατά την αντίδραση της λιγάσης. Διεξαγωγή πειραμάτων ελέγχου θα μπορούσαν να επιβεβαιώσουν αυτήν την υπόθεση, ώστε στη συνέχεια να δημιουργηθεί μια κατεύθυνση για τις επακόλουθες αλλαγές που πρέπει να εφαρμοστούν στο πρωτόκολλο ώστε η απόδοση των επιθυμητών μετασχηματισμών να αυξηθεί. Μια καλή προσέγγιση θα ήταν η δημιουργία 3 διαφορετικών PCR προϊόντων με διαφορετικό χρόνο στο στάδιο προσθήκης αδενινών. Στην επακόλουθη αντίδραση λιγάσης θα χρησιμοποιούνταν και τα 3 αυτά προϊόντα PCR με τον ίδιο T φορέα σε διαφορετικές αντιδράσεις. Επίσης θα πραγματοποιούνταν 2 διαφορετικές αντιδράσεις μάρτυρες, η μία εκ των οποίων θα περιείχε μόνο τον T φορέα και η άλλη μόνο το κομμένο πλασμίδιο χωρίς τα T άκρα. Μετασχηματισμοί και καλλιέργειες βακτηρίων θα πραγματοποιούνταν και με τα 5 προηγούμενα προϊόντα αντίδρασης λιγάσης. Από την μέτρηση των αποικιών είναι δυνατή η εξακρίβωση του προβλήματος. Αν τα T άκρα δεν έχουν προστεθεί με μεγάλη απόδοση αναμένουμε πολλές αποικίες στα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με τον T φορέα, καθώς μετά την ένωση των άκρων του πλασμιδίου από τη λιγάση, πραγματοποιείται φυσιολογικά η εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτήρια και η επακόλουθη μεταγραφή του γονιδίου ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Αν η αντίδραση λιγάσης δεν πραγματοποιείται σε μεγάλη απόδοση τότε θα παρατηρήσουμε μικρό αριθμό αποικιών στην καλλιέργεια βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το κομμένο πλασμίδιο. Αν κανένα από τα 2 προηγούμενα ενδεχόμενα δεν πραγματοποιηθεί, τότε η σύγκριση των αριθμών των αποικιών από τα διαφορετικά προϊόντα PCR θα αποκαλύψει σε ποιες ρυθμίσεις γίνεται η καλύτερη προσθήκη των αδενινών στο ένθεμα, και επομένως αυξάνεται η απόδοση αντίδρασης της λιγάσης.

5.2 Φαινότυπος κουνουπιών

Η μειωμένη απόθεση των αυγών που παρατηρήθηκε από τα RNAi κουνούπια, δείχνει ότι το Inc7 ίσως θα μπορούσε όντως να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο στόχο γονιδιακής σίγησης για τον έλεγχο του πληθυσμού του κουνουπιού τίγρη. Μία υπόθεση για την εξήγηση αυτής της παρατήρησης είναι ότι τα RNAi κουνούπια παρουσίασαν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης, η οποία ενδεχομένως να είναι πρόωρη. Αυτό σημαίνει ότι κάποια στοιχεία του αναπαραγωγικού συστήματος των κουνουπιών μπορεί να μην σχηματίστηκαν σωστά με αποτέλεσμα την επαγωγή στειρότητας είτε στα αρσενικά είτε στα θηλυκά. Ίσως το Inc7 να διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην αναπτυξιακή βιολογία του κουνουπιού ως αρνητικός ρυθμιστής της, έτσι ώστε να αποφεύγεται η μετάβαση από το ένα αναπτυξιακό στάδιο στο άλλο, αν δεν έχουν πρώτα ολοκληρωθεί συγκεκριμένες αναπτυξιακές διαδικασίες. Η σίγηση λοιπόν του γονιδίου αυτού, θα είχε ως αποτέλεσμα την πρόωρη ανάπτυξη με σημαντικές επιπτώσεις στην φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος του οργανισμού. Τα δεδομένα της ανάλυσης με Real-time PCR υποστηρίζουν ότι η σίγηση ήταν επιτυχής αλλά για την διεξαγωγή πιο αξιόπιστων συμπερασμάτων, το πείραμα θα πρέπει να επαναληφθεί υπό αυστηρότερες συνθήκες και με ύπαρξη βιολογικών αντιγράφων (biological replicates). Αυτό σημαίνει ότι για κάθε δεδομένη μέρα γίνεται απομόνωση προνύμφων από διαφορετικούς πληθυσμούς που μεγαλώνουν στο εργαστήριο ξεχωριστά ο ένας από τον άλλο. Σε κάθε ξεχωριστό πληθυσμό έχει γίνει σίγηση του ίδιου γονιδίου. Έτσι κατά την Real-time PCR,

εκτός από τον εντοπισμό διαφορετικού προτύπου έκφρασης μεταξύ των πληθυσμών RNAi και του πληθυσμού Control, καθίσταται εξίσου σημαντικό οι διαφορετικοί πληθυσμοί, στους οποίους όμως έχει πραγματοποιηθεί σίγηση του ίδιου γονιδίου, να έχουν παρόμοιο προφίλ έκφρασης μετά την κανονικοποίηση. Έτσι αυξάνεται σημαντικά η στατιστική σημαντικότητα του πειράματος.

5.3 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Η κατασκευή ενός GFP κουνουπιού θα είχε αρκετό ενδιαφέρον καθώς θα παρείχε έναν τρόπο οπτικοποίησης των dsRNA που εισέρχονται στο κουνούπι μέσω των βακτηρίων. Σύγκριση της διεισδυτικότητας των dsRNA δοκιμάζοντας διαφορετικές μεθόδους RNAi θα παρείχε ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο μελέτης της μεθόδου. Επίσης η εφαρμογή του RNAi κατά του *Inc7* χρησιμοποιώντας άλλους οργανισμούς σαν φορείς, όπως για παράδειγμα στελέχη ζυμομυκήτων ίσως αύξαναν την αποδοτικότητα της μεθόδου, ενώ παράλληλα θα μείωναν τον οικολογικό κίνδυνο εφαρμογής της μεθόδου εκτός του εργαστηριακού περιβάλλοντος (Υπενθυμίζεται ότι το *E.coli* αποτελεί παθογόνο πολλών ωφέλιμων εντόμων).

6. Παράρτημα

6.1 Μεγέθη προϊόντων ενίσχυσης

Αντίδραση	Μέγεθος αλληλουχίας ενίσχυσης
PCR	362bp
T7 PCR	299bp
Real-Time PCR	118bp

6.2 Ένζυμα περιορισμού

Αλληλουχία αναγνώρισης EcoR V:

```
5'... GATATC...3'  
3'... CTA TAG...5'
```

Αλληλουχία αναγνώρισης SmaI:

```
5'... CCCGGG...3'  
3'... GGGCCC...5'
```

7. Βιβλιογραφία

- [1] Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiri T, Carrington LB, Kramer LD, Thomas MB, Scott TW. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(18):7460–7465
- [2] Zettel C, Kaufman P. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). Florida: Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension. Publication #EENY-434. 2013
- [3] Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:124–126
- [4] Juliano SA, O'Meara GF, Morrill JR, Cutwa MM. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*. 2002;130:458–469
- [5] Forattini OP. *Medical Culicidology*. Edusp, São Paulo, Brazil, 2002, vol 2, p. 548
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Information on *Aedes albopictus*. Version of 7 November 2005. 2007
- [7] Couret J, Dotson EM, Benedict M: Temperature, larval diet, and density effects on development rates and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0087468
- [8] Lourenço-de-Oliveira R. Vector biology and behaviour. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. *Dengue theories and practices*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2015. pp.76–92.
- [9] Roth LM. A study of mosquito behavior. An experimental laboratory study of the sexual behavior of *Aedes aegypti* (Linnaeus). *Am Midl Nat*. 1948;40:265–352. doi:10.2307/242160
- [10] Nelson JM, Usman S, Pont CP, Self LS. Seasonal abundance of adult and immature *Aedes aegypti* (L) in Jakarta. *Bull Penel Kesch*. 1976;4(1–2):1–8
- [11] Ponlawat A, Harrington LC. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Am Soc Trop Med Hyg*. 2009;79(3):312–318
- [12] Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol*. 2005;42:844–849
- [13] Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, et al. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya on La Réunion. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10:249–258. doi:10.1089/vbz.2009.0026
- [14] Cummins B, Cortez R, Foppa IM, Walbeck J, Hyman JM. A spatial model of mosquito host-seeking behavior. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(5):e1002500. doi:10.1371/journal.pcbi.1002500
- [15] Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol*. 1983;28:229–262

- [16] Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:115–137
- [17] Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(1):249–277. doi:10.3390/ijerph10010249
- [18] Londono-Renteria B, et al. Dengue virus infection of *Aedes aegypti* requires a putative cysteine rich venom protein. *PLoS Pathogens.* 2015;11:e1005202
- [19] Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 2007;7:9
- [20] Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses.* 2014;6:3991–4004. doi:10.3390/v6103991.
- [21] Halstead SB. Dengue virus–mosquito interactions. *Annu Rev Entomol.* 2008;53:15.1–15.19
- [22] Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5):e646
- [23] Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge, Lourenco-De-Oliveira R, Caro V, Lambrechts L, Failloux AB. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci.* 2014;281:1–8
- [24] Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2348. doi:10.1371/journal.pntd.0002348. pmid:23936579
- [25] Li MI, Wong PS, Ng LC, Tan CH. Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1792. doi:10.1371/journal.pntd.0001792. pmid:22953014
- [26] Chouin Carneiro, Thais & Dos Santos, Flavia. (2017). Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. 10.5772/66946.
- [27] Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol.* 2013;29(9):460–468. doi:10.1016/j.pt.2013.07.003
- [28]. Hanson SM, Craig GB. Cold acclimation, diapauses, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1994; 31:192–201. [PubMed: 8189409]
- [29]. Lounibos LP, et al. Asymmetric Evolution of Photoperiodic Diapause in Temperate and Tropical Invasive Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. America.*

2003; 96:512–518.

[30]. Poelchau MF, et al. A de novo transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. *BMC Genomics*. 2011; 12:619. [PubMed: 22185595]

[31]. Poelchau MF, et al. Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc. Biol. Sci.* 2013; 280:20130143. [PubMed: 23516243]

[32]. Urbanski J, et al. Rapid adaptive evolution of photoperiodic response during invasion and range expansion across a climatic gradient. *Am. Nat.* 2012; 179:490–500. [PubMed: 22437178]

[33]. McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Rev. Microbiol.* 2013; 11:181–193. [PubMed: 23411863]

[34]. WHO. *Global Strategic Framework For Integrated Vector Management Document WHO_CDS_CPE_PVC_2004*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

[35]. Fonseca DM, et al. Area-wide management of *Aedes albopictus*: Gauging the efficacy of traditional integrated pest control measures against urban container mosquitoes. *Pest Manag. Sci.* 2013

[36]. WHO. Fifth Edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011. *Global insecticide use for vector-borne disease control, a 10 year assessment (2000–2009)*. Document WHO/HTM/NTD/VEM/WHOPES/2011.6

[37]. Ranson H, et al. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*. 2010; 1

[38]. Vontas J, et al. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochem. Physiol.* 2012; 104:126–131.
Bonizzoni et al. Page 11

[39]. Zouache K, et al. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One*. 2009; 4:e6388. [PubMed: 19633721]

[40]. Minard G, et al. Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013; 83:63–73. [PubMed: 22808994]

[41]. Chang MS, et al. Challenges and future perspective for dengue control in the Western Pacific Region. *Western Pacific Surveillance Response J.* 2011; 2:9–16.

[42]. Sulaiman S, et al. Field evaluation of *Vectobac G*, *Vectobac 12AS* and *Cactimos WP* against the dengue vector *Aedes albopictus* in tires. *J. Vector. Ecol.* 1997; 22:122–124. [PubMed: 9491362]

[43]. Tan AW, et al. Spray application of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti strain AM65-52) against *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* Skuse populations and impact on dengue transmission in a dengue endemic residential site in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2012;

43:296–310. [PubMed: 23082582]

[44]. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis israelensis* AM65-52. *EFSA Journal*. 2013; 11:3054.

[45]. Xi Z, et al. Interspecific transfer of *Wolbachia* into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proc. Biol. Sci.* 2006; 273:1317–1322. [PubMed: 16777718]

[46]. Fu Y, et al. Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76:5887–5891. [PubMed: 20601501]

[47]. Suh E, et al. Pathogenicity of life-shortening *Wolbachia* in *Aedes albopictus* after transfer from *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7783–7788. [PubMed: 19820149]

[48]. Calvitti M, et al. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 2010; 47:179–187. [PubMed: 20380298]

[49]. Blagrove MS, et al. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109:255–260. [PubMed: 22123944]

[50]. Blagrove MS, et al. A *Wolbachia* wMel Transinfection in *Aedes albopictus* is not detrimental to host fitness and Inhibits Chikungunya Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7:e2152. [PubMed: 23556030]

[51]. Zouache K, et al. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One.* 2009; 4:e6388. [PubMed: 19633721]

[52]. Terenius O, et al. Molecular genetic manipulation of vector mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2008;4:417–423. [PubMed: 18996342]

[53]. Labbé GM, et al. Female-specific flightless (*fsRIDL*) phenotype for control of *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6:e1724. [PubMed: 22802980]
Bonizzoni et al. Page 12

[54]. Bellini R, et al. Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J. Med. Entomol.* 2013; 50:317–325. [PubMed: 23540120]

[55] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.

[56] Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.

- [57] Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108.
- [58] Ender, C., and Meister, G. (2010). Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 1819–1823.
- [59] Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 22–32.
- [60] Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
- [61] Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320, 1077–1081.
- [62] Chung, W.J., Okamura, K., Martin, R., and Lai, E.C. (2008). Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr. Biol.* 18, 795–802.
- [63] Okamura, K., Chung, W.J., Ruby, J.G., Guo, H., Bartel, D.P., and Lai, E.C. (2008b). The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* 453, 803–806.
- [64] Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453, 539–543.
- [65] Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., and Hannon, G.J. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534–538.
- [66] Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., and Tabara, H. (2007). In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J.* 26, 5007–5019.
- [67] Herr, A.J., and Baulcombe, D.C. (2004). RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 69, 363–370.
- [68] Xie, Z., and Qi, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 720–724.
- [69] Voinnet, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* 13, 317–328.

[70]Hapairai, L. K., et al. (2017). "Lure-and-Kill Yeast Interfering RNA Larvicides Targeting Neural Genes in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti*." *Scientific Reports* 7(1): 13223.

[71]Junnila A., Revay E.E., Muller G.C., Kravchenko V., Qualls W.A., Xue R.D., Allen S.A., Beier J.C., Schlein Y. Efficacy of attractive toxic sugar baits (ATSB) against *Aedes albopictus* with garlic oil encapsulated in beta-cyclodextrin as the active ingredient. *Acta Trop.* 2015;152:195–200

[72]Deng X, Meller VH: roX RNAs are required for increased expression of X-linked genes in *Drosophila melanogaster* males. *Genetics* 2006, 174:1859-1866. 26.

[73]Lipshitz HD, Peattie DA, Hogness DS: Novel transcripts from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *Genes Dev* 1987, 1:307-322.

[74]Soshnev AA, Ishimoto H, McAllister BF, Li X, Wehling MD, Kitamoto T, Geyer PK: A conserved long noncoding RNA affects sleep behavior in *Drosophila*. *Genetics* 2011, 189:455-468.

[75]Kiya T, Kunieda T, Kubo T: Inducible- and constitutive-type transcript variants of *kakusei*, a novel non-coding immediate early gene, in the honeybee brain. *Insect Mol Biol* 2008, 17:531- 536.

[76]Rene F. ketting et al. The many faces of RNAi. *Developmental Cell*. Volume 20, issue 2, P148-161, , 2011

[77]Kiya T, Kunieda T, Kubo T: Inducible- and constitutive-type transcript variants of *kakusei*, a novel non-coding immediate early gene, in the honeybee brain. *Insect Mol Biol* 2008, 17:531- 536.

[78]Grewal, S.I. (2010). RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 134–141.

[79]Mochizuki, K., and Gorovsky, M.A. (2004). Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 181–187.

[80]Maine, E.M., Hauth, J., Ratliff, T., Vought, V.E., She, X., and Kelly, W.G. (2005). EGO-1, a putative RNA-dependent RNA polymerase, is required for heterochromatin assembly on unpaired dna during *C. elegans* meiosis. *Curr. Biol.* 15, 1972–1978.

[81]Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917.

[82]Claycomb, J.M., Batista, P.J., Pang, K.M., Gu, W., Vasale, J.J., van Wolfswinkel, J.C., Chaves, D.A., Shirayama, M., Mitani, S., Ketting, R.F., et al. (2009). The Argonaute CSR-1 and its 22G-RNA cofactors are required for holocentric chromosome segregation. *Cell* 139, 123–134.

[83]Vogel, E., et al. (2019). "RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests." *Frontiers in Physiology* 9(1912).

- [84] Klattenhoff, C., and Theurkauf, W. (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* 135, 3–9. doi: 10.1242/dev.006486
- [85] Wang, X., Aliyari, R., Li, W., Li, H., Kim, K., Atkinson, P., et al. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312, 452–454. doi: 10.1126/science.1125694
- [86] Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., and Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 657–685. doi: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003
- [87] Tolentino M. Interference RNA technology in the treatment of CNV. *Ophthalmol Clin North Am* 2006;19:393–399. vi–vii. [PubMed: 16935214]
- [88] Leonard JN, Schaffer DV. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Ther* 2006;13:532–540. [PubMed: 16177819]
- [89] Ansari, M. S., Moraiet, M. A., and Ahmad, S. (2014). “Insecticides: impact on the environment and human health,” in *Environmental Deterioration and Human Health*, eds R. Akhtar and E. Grohmann (Dordrecht: Springer), 99–123. doi: 10.1007/978-94-007-7890-0-6
- [90] Luo, Y., Wang, X., Wang, X., Yu, D., Chen, B., and Kang, L. (2013). Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via doublestranded RNA injection and feeding. *Insect Mol. Biol.* 22, 574–583. doi: 10.1111/imb.12046
- [91] Luo, Y., Wang, X., Yu, D., and Kang, L. (2012). The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. *RNA Biol.* 9, 663–671. doi: 10.4161/rna.19986
- [92] Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., et al. (2011). RNA interference in lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.* 57, 231–245. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.11.006
- [93] Telang, A., Rechel, J. A., Brandt, J. R., and Donnell, D. M. (2013). Analysis of ovaryspecific genes in relation to egg maturation and female nutritional condition in the mosquitoes *Georgacraigius atropalpus* and *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *J. Insect Physiol.* 59, 283–294. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.11.006
- [94] Boisson, B., Jacques, J. C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K., et al. (2006). Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett.* 580, 1988–1992. doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.069
- [95] Whyard, S., Singh, A. D., and Wong, S. (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 824–832. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.09.007

- [96]Abd El Halim, H. M., Alshukri, B. M. H., Ahmad, M. S., Nakasu, E. Y. T., Awwad, M. H., Salama, E. M., et al. (2016). RNAi-mediated knockdown of the voltage gated sodium ion channel TcNav causes mortality in *Tribolium castaneum*. *Sci. Rep.* 6:29301. doi: 10.1038/srep29301
- [97]Sugahara, R., Tanaka, S., Jouraku, A., and Shiotsuki, T. (2017). Geographic variation in RNAi sensitivity in the migratory locust. *Gene* 605, 5–11. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.028
- [98]Swevers, L., Ioannidis, K., Kolovou, M., Zografidis, A., Labropoulou, V., Santos, D., et al. (2016). Persistent RNA virus infection of lepidopteran cell lines: interactions with the RNAi machinery. *J. Insect Physiol.* 9, 81–93. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.09.001
- [99]Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., et al. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59, 1212–1221. doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.08.014
- [100]Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., et al. (2012). Characterizing the mechanism of action of doublestranded RNA activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS One* 7:e47534. doi: 10.1371/journal.pone.0047534
- [101]Timmons, L., Court, D. L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103–112. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00579-5
- [102]Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854–854. doi: 10.1038/27579
- [103]Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., et al. (2009). Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One* 4:e6225. doi: 10.1371/journal.pone.0006225
- [104]Vatanparast, M., and Kim, Y. (2017). Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *PLoS One* 12:e0183054. doi: 10.1371/journal.pone.0183054
- [105]Whitten, M. M. A., Facey, P. D., Del Sol, R., Fernández-Martínez, L. T., Evans, M. C., Mitchell, J. J., et al. (2016). Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proc. Biol. Sci.* 283:20160042. doi: 10.1098/rspb.2016.0042
- [106]Kumar, A., Wang, S., Ou, R., Samrakandi, M., Beerntsen, B. T. T., and Sayre, R. T. T. (2013). Development of an RNAi based microalgal larvicide to control mosquitoes. *Malar. World J.* 4:6.
- [107]Bronkhorst, A. W., and Van Rij, R. P. (2014). The long and short of antiviral

defense: small RNA-based immunity in insects. *Curr. Opin. Virol.* 7, 19–28.
doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.010

[108]Kolliopoulou, A., Taning, C. N. T., Smagghe, G., and Swevers, L. (2017). Viral Delivery of dsRNA for control of insect agricultural pests and vectors of human disease: prospects and challenges. *Front. Physiol.* 8:399. doi: 10.3389/fphys.2017.00399

[109]Swevers, L., Vanden Broeck, J., and Smagghe, G. (2013). The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis. *Front. Physiol.* 4:319. doi: 10.3389/fphys.2013.00319

[110]Dass, C. R., and Choong, P. F. M. (2008). Chitosan-mediated orally delivered nucleic acids: a gutful of gene therapy. *J. Drug Target.* 16, 257–261. doi: 10.1080/10611860801900801

[111]Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J., et al. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33, 95–103. doi: 10.1016/J.YMETH.2003.11.023

[112]Durzyńska, J., Przysiecka, Ł, Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Warowicka, A., et al. (2015). Viral and other cell-penetrating peptides as vectors of therapeutic agents in medicine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 32–42. doi: 10.1124/jpet.115.223305

[113]Pitino, M., Coleman, A. D., Maffei, M. E., Ridout, C. J., and Hogenhout, S. A. (2011). Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One* 6:e25709. doi: 10.1371/journal.pone.0025709

[114]Kumar, D., et al. (2018). Long Noncoding RNA: Disclosing New Horizon in the Molecular World of Insects. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology*. D. Kumar and C. Gong. Cham, Springer International Publishing: 85-102.

[115]Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R et al (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316:1484–1488

[116]Kutter C, Watt S, Stefflova K, Wilson MD, Goncalves A et al (2012) Rapid turnover of long noncoding RNAs and the evolution of gene expression. *PLoS Genet* 8:e1002841

[117]Ulitsky I, Bartel DP (2013) LincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 154:26–46

[118]Bonasio R, Tu S, Reinberg D (2010) Molecular signals of epigenetic states. *Science* 330:612–616

[119]Fatica A, Bozzoni I (2013) Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 15:7–21

[120]Gardini A, Shiekhattar R (2014) The many faces of long noncoding RNAs. *FEBS J* 282(9):1647–1657.

[121]Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S et al (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression.

Genome Res 22:1775–1789

[122] Kowalczyk MS, Higgs DR, Gingeras TR (2012) Molecular biology: RNA discrimination. *Nature* 482:310–311

[123] Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 139:629–641

[124] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genetics* 10:155–159

[125] Fernandes JCR, Acuña SM, Aoki JI, Floeter-Winter LM, Muxel SM. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA*. 2019;5(1):17. Published 2019 Feb 17. doi:10.3390/ncrna5010017

[126] Long, Y.; Wang, X.; Youmans, D.T.; Cech, T.R. How do lncRNAs regulate transcription? *Sci. Adv.* 2017, 3, eaao2110.

[127] Derrien, T.; Johnson, R.; Bussotti, G.; Tanzer, A.; Djebali, S.; Tilgner, H.; Guernec, G.; Martin, D.; Merkel, A.; Knowles, D.G.; et al. The gencode v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012, 22, 1775–1789

[128] Rinn, J.L.; Chang, H.Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 2012, 81, 145–166.

[129] Rackham, O.; Shearwood, A.-M.J.; Mercer, T.R.; Davies, S.M.K.; Mattick, J.S.; Filipovska, A. Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *RNA* 2011, 17, 2085–2093.

[130] Cabili, M.N.; Dunagin, M.C.; McClanahan, P.D.; Biaesch, A.; Padovan-Merhar, O.; Regev, A.; Rinn, J.L.; Raj, A. Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome Biol.* 2015, 16, 20.

[131]. Carlevaro-Fita, J.; Rahim, A.; Guigó, R.; Vardy, L.A.; Johnson, R. Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells. *RNA* 2016, 22, 867–882.

[132] Liu, N.; Dai, Q.; Zheng, G.; He, C.; Parisien, M.; Pan, T. N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* 2015, 518, 560–564.

[133] Zhou, K.I.; Parisien, M.; Dai, Q.; Liu, N.; Diatchenko, L.; Sachleben, J.R.; Pan, T. N(6)-methyladenosine modification in a long noncoding RNA hairpin predisposes its conformation to protein binding. *J. Mol. Biol.* 2016, 428, 822–833.

[134] Liu, N.; Pan, T. N6-methyladenosine-encoded epitranscriptomics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016, 23, 98–102.

- [135]. Kopp, F.; Mendell, J.T. *Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs.* *Cell* 2018, 172, 393–407.
- [136]. Hewson, C.; Capraro, D.; Burdach, J.; Whitaker, N.; Morris, K.V. *Extracellular vesicle associated long non-coding RNAs functionally enhance cell viability.* *Non-Coding RNA Res.* 2016, 1, 3–11.
- [137]. Guttman, M.; Donaghey, J.; Carey, B.W.; Garber, M.; Grenier, J.K.; Munson, G.; Young, G.; Lucas, A.B.; Ach, R.; Bruhn, L.; et al. *Lincrnas act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation.* *Nature* 2011, 477, 295–300.
- [138]. Engreitz, J.M.; Haines, J.E.; Perez, E.M.; Munson, G.; Chen, J.; Kane, M.; McDonel, P.E.; Guttman, M.; Lander, E.S. *Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing.* *Nature* 2016, 539, 452–455.
- [139]. Azofeifa, J.G.; Allen, M.A.; Hendrix, J.R.; Read, T.; Rubin, J.D.; Dowell, R.D. *Enhancer RNA profiling predicts transcription factor activity.* *Genome Res.* 2018.
- [140]. Chen, Y.G.; Satpathy, A.T.; Chang, H.Y. *Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs.* *Nat. Immunol.* 2017, 18, 962–972.
- [141]. Kertesz, M.; Wan, Y.; Mazor, E.; Rinn, J.L.; Nutter, R.C.; Chang, H.Y.; Segal, E. *Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast.* *Nature* 2010, 467, 103–107.
- [142] Hansen, T.B.; Jensen, T.I.; Clausen, B.H.; Bramsen, J.B.; Finsen, B.; Damgaard, C.K.; Kjems, J. *Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges.* *Nature* 2013, 495, 384–388.
- [143] Furió-Tarí, P.; Tarazona, S.; Gabaldón, T.; Enright, A.J.; Conesa, A. *Spongescan: A web for detecting microRNA binding elements in lncRNA sequences.* *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, W176–W180.
- [144] Dhir, A.; Dhir, S.; Proudfoot, N.J.; Jopling, C.L. *Microprocessor mediates transcriptional termination of long noncoding RNA transcripts hosting microRNAs.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015, 22, 319–327.
- [145] Gonzalez, I.; Munita, R.; Agirre, E.; Dittmer, T.A.; Gysling, K.; Misteli, T.; Luco, R.F. *A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015, 22, 370–376.
- [146] Gong, C.; Maquat, L.E. *lncRNAs transactivate Stau1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements.* *Nature* 2011, 470, 284–288.
- [147] Carrieri, C.; Cimatti, L.; Biagioli, M.; Beugnet, A.; Zucchelli, S.; Fedele, S.; Pesce, E.; Ferrer, I.; Collavin, L.; Santoro, C.; et al. *Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded Sineb2 repeat.* *Nature* 2012, 491, 454–457.
- [148] Wang, K.C.; Yang, Y.W.; Liu, B.; Sanyal, A.; Corces-Zimmerman, R.; Chen, Y.; Lajoie, B.R.; Protacio, A.; Flynn, R.A.; Gupta, R.A.; et al. *A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression.* *Nature* 2011, 472, 120–124.

[149] Salviano-Silva, A.; Lobo-Alves, S.C.; Almeida, R.C.; Malheiros, D.; Petzl-Erler, M.L. *Besides pathology: Long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. Non-Coding RNA* 2018, 4, 3.

[150] Kapranov, P.; Cheng, J.; Dike, S.; Nix, D.A.; Dutttagupta, R.; Willingham, A.T.; Stadler, P.F.; Hertel, J.; Hackermuller, J.; Hofacker, I.L.; et al. *Rna maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. Science* 2007, 316, 1484–1488.

[151] Carninci, P.; Kasukawa, T.; Katayama, S.; Gough, J.; Frith, M.C.; Maeda, N.; Oyama, R.; Ravasi, T.; Lenhard, B.; Wells, C.; et al. *The transcriptional landscape of the mammalian genome. Science* 2005, 309, 1559–1563.

[152] Etebari, K., et al. (2015). "Genome wide discovery of long intergenic non-coding RNAs in Diamondback moth (*Plutella xylostella*) and their expression in insecticide resistant strains." *Scientific Reports* 5: 14642.

[153] Taguchi, S.; Iwami, M.; Kiya, T. *Identification and characterization of a novel nuclear noncoding RNA, Fben-1, which is preferentially expressed in the higher brain center of the female silkworm moth, Bombyx mori. Neurosci. Lett.* 2011, 496,

[154] Caminade Cyril, Medlock Jolyon M., Ducheyne Els, McIntyre K. Marie, Leach Steve, Baylis Matthew and Morse Andrew P. *Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito Aedes albopictus: recent trends and future scenarios.*

