



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ
ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ
dsRNAi ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *Aedes***



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ
ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ dsRNAi ΣΤΟ
ΓΕΝΟΣ Aedes»**

**“ANALYSIS OF NON-CODING TRANSCRIPTS FOR THE
DEVELOPMENT OF dsRNAi INSECTICIDES IN THE GENUS
AEDES”**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ.Τσουμάνη Κωνσταντίνα

Διδάσκουσα ΠΔ407, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής,
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιακουντή Αντώνιο, οι οποίοι με εμπιστεύθηκαν αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα για την διπλωματική μου εργασία. Επιπλέον, νιώθω ευγνωμοσύνη για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσαν και την αστείρευτη προθυμία τους να με βοηθήσουν και να με καθοδηγήσουν σε κάθε στάδιο της συνεργασίας μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ.Τσουμάνη Κωνσταντίνα, η οποία αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα Αλέξανδρο Μπελαβίλα-Τρόβα, για τις υποδείξεις του τόσο στο πρακτικό κομμάτι της εργασίας όσο και κατά την συγγραφή αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία, καθώς και τα μέλη της οικογένειάς μου και στους φίλους μου για τη συνεχή στήριξη και εμπιστοσύνη που μου χάρισαν ανιδιοτελώς κατά τη διάρκεια των τετραετών σπουδών μου, αλλά και σε αυτό το κρίσιμο στάδιο της ακαδημαϊκής μου σταδιοδρομίας.

Επιμέλεια εξωφύλλου: Βασιλακοπούλου Δήμητρα

Στο εξώφυλλο απεικονίζεται μία προνύμφη κουνουπιού τίγρη (*Aedes albopictus*) και πίσω από αυτή ένα παζλ δομημένο από τις τέσσερις νουκλεοτιδικές βάσεις.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Γένος Aedes (Aedes albopictus - Aedes aegypti).....	6
1.2. Κλιματική αλλαγή και εξάπλωση των ειδών Aedes.....	8
1.3. Μέθοδοι ελέγχου του πληθυσμού - Ανθεκτικότητα	10
1.4. RNAi μηχανισμός.....	12
1.5. RNAi εντομοκτόνα – Παραγωγή dsRNA - Τρόποι χορήγησης.....	14
1.6. Long noncoding RNAs (Λειτουργία – Κατηγορίες).....	17
1.7. Long noncoding RNAs - Παραδείγματα στα έντομα.....	20
1.8. Σκοπός.....	24
2. ΜΕΘΟΔΟΙ	25
2.1. Συνθήκες εκτροφής πληθυσμού <i>Aedes albopictus</i>	25
2.2. Μέθοδοι χειρισμού νουκλεϊκών οξέων	25
2.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια.....	25
2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	27
2.2.4. Κατακρήμνιση DNA.....	29
2.2.5. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού (επαλήθευση αποτελεσμάτων Colony PCR).....	30
2.3. Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων.....	31
2.3.1. PCR.....	31
2.3.2. Colony PCR.....	34
2.3.3. Real-Time PCR.....	35
2.3.4. PCR με την χρήση T7 εκκινητών.....	38
2.4. Μέθοδοι κλωνοποίησης DNA	40
2.4.1. Επεξεργασία πλασμιδιακού φορέα (T-vector).....	40
2.4.1.1. Πέψη πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού (SmaI).....	40
2.4.1.2. Απομόνωση του γραμμικού πλασμιδίου – PCR clean up.....	41
2.4.1.3. Αντίδραση T άκρων στο γραμμικό πλασμίδιο L4440.....	42
2.4.2. Αντίδραση σύνδεσης ενθέματος-φορέα.....	42
2.4.3. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων.....	43
2.4.3.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών.....	43
2.4.3.2. Δημιουργία κυττάρων E.coli HT115 για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση.....	44
2.5. Μέθοδοι παραγωγής dsRNA	46
2.5.1. In vitro μεταγραφή dsRNA.....	46

2.5.2. Κατακρήμνιση dsRNA	47
3. Αποτελέσματα.....	49
3.1. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης Inc11	49
3.1.1. Επιβεβαίωση προφίλ έκφρασης μέσω Real-Time PCR.....	49
3.2. Κατασκευή E. coli κλώνου με δυνατότητα σύνθεσης dsRNA έναντι του Inc11	51
3.2.1. PCR ενίσχυση τμήματος DNA του γονιδίου	51
3.2.2. Μετασηματισμός κυττάρων.....	52
3.2.3. Προσπάθειες επιβεβαίωσης θετικού κλώνου	53
3.2.3.1. Colony PCR	53
3.2.3.2. Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικό ένζυμο.....	54
3.3. Παραγωγή dsRNA έναντι του Inc11 μέσω in-vitro transcription	55
3.3.1. PCR ενίσχυση τμήματος DNA με την χρήση εκκνητών T7	55
3.3.2. Αντίδραση in-vitro transcription.....	56
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	61
5.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από ζωϊκούς ιστούς.....	61
5.2. Επώαση με DNase (DNase treatment).....	61
5.3. Σύνθεση cDNA.....	62
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κουνούπι τίγρης (*Aedes albopictus*), όσο και το συγγενικό του είδος *Aedes aegypti* αποτελούν σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία. Τα πρόσφατα κρούσματα αρμποϊών παγκοσμίως, σε συνδυασμό με την γρήγορη εξάπλωση των ειδών αυτών από τις τροπικές περιοχές προς τις χώρες της εύκρατης ζώνης και βορειότερα, καθιστούν τις προσπάθειες της έρευνας για τον περιορισμό του πληθυσμού των κουνουπιών, ύψιστης σημασίας. Έως και πρόσφατα, ο περιορισμός του πληθυσμού των κουνουπιών επιτυγχάνεται είτε με την εφαρμογή χημικών εντομοκτόνων, είτε με απελευθέρωση στείρων εντόμων στο περιβάλλον (Sterile Insect Technique, SIT). Ωστόσο, οι ανακαλύψεις στο χώρο της μοριακής βιολογίας και γονιδιωματικής, όπως η τεχνολογία σίγησης γονιδίων μέσω του μηχανισμού παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference) και η ταυτοποίηση γονιδίων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (lncRNAs), φέρνουν στο προσκήνιο νέες καινοτόμες λύσεις για τον περιορισμό του πληθυσμού των εντόμων υγειονομικής σημασίας.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη νέου εντομοκτόνου του οποίου η δράση βασίζεται στην αξιοποίηση των τεχνολογιών της μοριακής βιολογίας και στο μηχανισμό σίγησης του κυττάρου. Το βασικό πλεονέκτημα αυτού του εντομοκτόνου είναι η ειδοειδική στόχευση του κουνουπιού τίγρη, το οποίο το καθιστά πιο ασφαλή και φιλική για το περιβάλλον λύση στον περιορισμό του πληθυσμού των κουνουπιών αυτών.

Η εργασία περιλαμβάνει την παρουσίαση των πειραματικών διαδικασιών και των αποτελεσμάτων τους, με στόχο την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA, τα οποία στοχεύουν το γονίδιο μη κωδικοποιητικού μεταγράφου RNA (lncRNAs), με την κωδική ονομασία (lnc11), με δύο διαφορετικούς τρόπους, *in vivo* (με την χρήση βακτηρίων) και *in vitro* (με την χρήση του ενζύμου T7 πολυμεράση του RNA).

Στην παρούσα εργασία, στέφθηκε με επιτυχία η παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) *in vitro*. Ενώ η κλωνοποίηση του γονιδίου (lnc11) σε βακτηριακό κλώνο ήταν ανεπιτυχής. Ωστόσο, οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν τόσο από την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA *in vitro*, όσο από τις προσπάθειες κλωνοποίησης του γονιδίου, είναι χρήσιμες για τις μετέπειτα μελέτες που στοχεύουν στη βελτιστοποίηση της μεθόδου παραγωγής μορίων RNA με στόχο τη σίγηση παρόμοιων γονιδίων (lncRNAs) στο κουνούπι τίγρης.

ABSTRACT

The tiger mosquito (*Aedes albopictus*) and its relative species, *Aedes Aegypti*, pose a serious threat to public health. Recent outbreaks of arbovirus worldwide, coupled with the rapid spread of these species from the tropical regions to temperate countries and further north, make the efforts to diminish the population of mosquitoes of the highest importance. Until recently, the suppression of the mosquito population is achieved either by applying chemical insecticides, or by releasing sterile insects into the environment (Sterile Insect Technique, SIT). However, the discoveries in the field of Molecular Biological and Genomics, such as gene silencing, through RNA interference mechanism, and the identification of long non-coding genes (lncRNAs), present new solutions to limiting the population of pest with significant public health importance.

The purpose of this study was to develop a new insecticide whose action is based on the exploitation of Molecular Biology technologies and the RNAi pathway. The main advantage of this insecticide is the species specific targeting of the tiger mosquito, which makes it a safer and environmentally friendly pest control method.

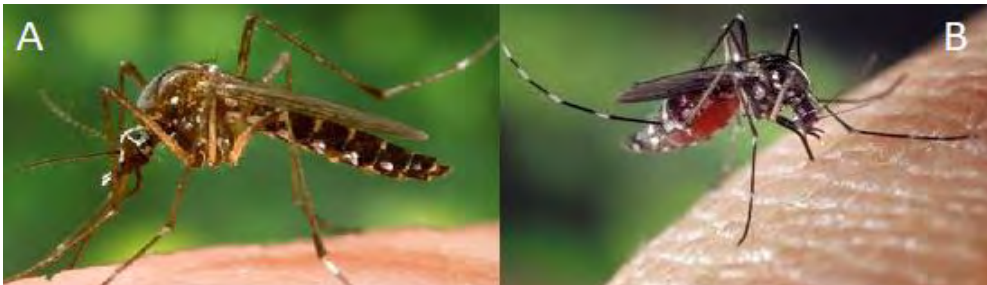
This study includes presenting the experimental procedures and the results of these attempts, to produce double stranded RNA molecules in order to suppress a long non-coding RNA transcript (lncRNA), named (lnc11), with two different methods, *in vivo* (bacterial transformation) and *in vitro* (using the enzyme T7 RNA polymerase).

In the present study, the production of double-stranded RNA molecules (dsRNA) *in vitro* was crowned successfully. In contrast, the gene cloning procedure of the gene (lnc11) was unsuccessful. However, the information obtained both from the production of double-stranded RNA molecules *in vitro*, as well as the attempts at gene cloning, will be useful in future studies aiming to optimize the dsRNA (double-stranded RNA) production protocol, in order to suppress similar genetic targets in the tiger mosquito.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γένος *Aedes* (*Aedes albopictus* - *Aedes aegypti*)

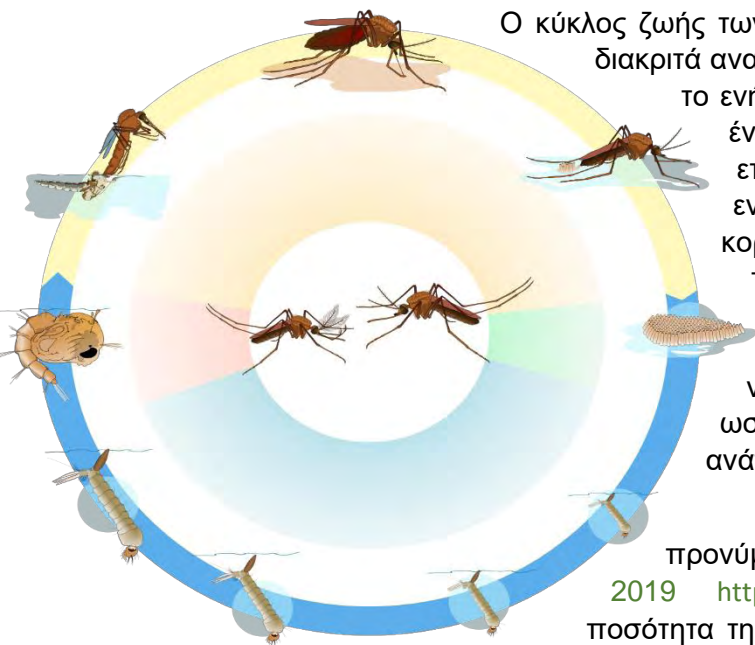
Στο γένος *Aedes* έχουν ταξινομηθεί περισσότερα από εννιακόσια πενήντα είδη κουνουπιών, όπως το *Aedes atropalpus*, το *Aedes brelandi* και το *Aedes fulvus*, πολλά εκ των οποίων λειτουργούν ως φορείς αρμποιών (αρθροϊσους, ιών που μεταδίδονται μέσω των αρθρώσεων) (Harbach and Ralph 2016). Ωστόσο δύο είδη έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, το *Aedes albopictus* και το *Aedes aegypti*. Είδη τα οποία αποτελούν την αιτία των πρόσφατων κρουσμάτων αρμποιών παγκοσμίως. Σε αυτούς τους ιούς



Εικόνα 1.1.1. Ενήλικα κουνούπια του γένους *Aedes*: A. *Aedes aegypti*, B. *Aedes albopictus*. (www.upane.it U. GISD. IUCNGISD.ORG. ; YELLOW FEVER MOSQUITO - AEDES AEGYPTI (LINNAEUS). UFL.EDU.)

περιλαμβάνονται ο ιός Zika (ZIKV), ο ιός του κίτρινου πυρετού (YFV), ο ιός dengue (DENV) και ο ιός chikungunya (CHIKV), για τους οποίους δεν υπάρχουν ακόμα διαθέσιμα εμβόλια στην αγορά (de Araújo et al. 2019; Kamal et al. 2018). Μέχρι προσφάτως, το *Aedes albopictus* είχε θεωρηθεί ως δευτερεύων φορέας του ιού

chikungunya (CHIKV), ενώ ο ιός αυτός πίστευαν ότι μεταδιδόταν κυρίως μέσω του συγγενικού είδους *Aedes aegypti*. Ωστόσο, οι επιδημίες του ιού chikungunya που ξέσπασαν τα έτη 2006-2007 στην Κεντρική Αφρική και Ιταλία, έδειξαν ότι ο κύριος φορέας ήταν το *Aedes albopictus* και όχι το *Aedes aegypti*. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η επιτυχής αντιγραφή και μετάδοση του ιού μέσω του *Aedes albopictus* οφειλόταν στην αντικατάσταση του αμινοξέος αλανίνη στην θέση 226 με βαλίνη της ιϊκής πρωτεΐνης E1 (de Lamballerie et al. 2008). Η αποτελεσματική μετάδοση αυτών των ιών μέσω αυτών των εντόμων-φορέων αποτελεί σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία και οφείλεται σε πολλαπλούς παράγοντες. Αρχικά, οι φορείς αυτοί έχουν την δυνατότητα να μεταφέρουν πολλά διαφορετικά παθογόνα τα οποία μεταλλάσσονται συνεχώς, ενώ ταυτόχρονα είναι φορείς ζωνόσων λόγω της ευκαιριακής συμπεριφοράς τους στην κατανάλωση αίματος. Ακόμα, η γρήγορη προσαρμογή τους σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες, η ταχύτατη επέκταση σε νέες περιοχές με τη βοήθεια της ανάπτυξης του εμπορίου και των ελλιπών κανόνων υγιεινής, ενδυναμώνει το παραπάνω επιχείρημα (Paupy et al. 2009; Medlock et al. 2012; Tatem et al 2006). Για τους παραπάνω λόγους, πολλές επιστημονικές έρευνες έχουν αφιερωθεί και αφιερώνονται στην μελέτη της φυσιολογίας, της συμπεριφοράς, της ανάπτυξης και της αντίστασης σε εντομοκτόνα των δύο αυτών κουνουπιών με στόχο την ανάπτυξη μεθόδων αντιμετώπισης των φορέων αρμποιών.



Ο κύκλος ζωής των κουνουπιών του γένους *Aedes* χωρίζεται σε τέσσερα διακριτά αναπτυξιακά στάδια, το αυγό, την προνύμφη, την νύμφη και το ενήλικο κουνούπι, και διαρκεί περίπου επτά μέρες. Για την έναρξη του κύκλου της ζωής των κουνουπιών απαιτείται η επώαση των αυγών στο νερό. Τα υδάτινα αυτά ενδιαίτηματα μπορούν να είναι είτε φυσικά, όπως βάλτοι και κορμοί δένδρων, είτε τεχνητά, για παράδειγμα κεραμικά ή πλαστικά δοχεία και λάστιχα αυτοκινήτων (Caputo et al. 2012). Τόσο η προνύμφη, της οποίας η ανάπτυξη αποτελείται από τέσσερα στάδια (instar), όσο και η νύμφη αναπτύσσονται και επιβιώνουν μέσα στο νερό, ωστόσο μόνο η προνύμφη τρέφεται κατά την διάρκεια της ανάπτυξής της.

Ο ρυθμός και η αποτελεσματικότητα της θρέψης της προνύμφης εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της τροφής (Rogers 2019 <https://www.britannica.com/animal/Aedes>). Όταν μεγάλη ποσότητα της τροφής είναι διαθέσιμη ή ο αριθμός των προνυμφών είναι μικρός τότε η μεταμόρφωση της προνύμφης σε νύμφη μπορεί να καθυστερήσει, με στόχο η προνύμφη να αποκτήσει το μέγιστο πιθανό βάρος στις παρούσες συνθήκες. Το μεγάλο μέγεθος της προνύμφης έχει συσχετιστεί με αντίστοιχο μέγεθος στα ενήλικα άτομα,

Εικόνα 1.1.2. κύκλος ζωής των κουνουπιών (Vector Disease Control International. Life Cycle: Mosquito Biology 101. Vdci.net.)

υψηλότερο προσδόκιμο ζωής και μεγαλύτερη παραγωγή σπερμάτων και αυγών. Από την άλλη πλευρά, όταν η διαθεσιμότητα θρεπτικών είναι περιορισμένη τότε εμφανίζεται ανταγωνισμός μεταξύ των προνυμφών ενός υδάτινου ενδιαιτήματος, κυρίως κατά την διάρκεια του τρίτου και τέταρτου σταδίου (instar) της προνύμφης όπου οι απαιτήσεις για τροφή είναι υψηλές. Σε αυτή την περίπτωση οι προνύμφες που έχουν αποκτήσει μεγαλύτερο μέγεθος έχουν ένα προβάδισμα εναντίον των μικρότερων, καθώς οι μεγαλύτερες προνύμφες φιλτράρουν την τροφή τους με υψηλότερη αποτελεσματικότητα. Αναλυτικότερα, σε περιοχές όπου το *Aedes albopictus* και το *Aedes aegypti* συμβιώνουν, όπως η Βόρεια Αμερική, Βραζιλία και η Κεντρική Αφρική, τα δύο είδη ανταγωνίζονται για τα υδάτινα ενδιαιτήματα όπου αναπαράγονται (Juliano et al. 2004; Braks et al. 2004; Simard et al. 2005). Ο ανταγωνισμός αυτός είναι πιο έντονος στο στάδιο της προνύμφης, όπου τα έντομα ανταγωνίζονται για χώρο και θρεπτικά συστατικά. Το *Aedes albopictus* φαίνεται να επικρατεί κατά του *Aedes aegypti*. Επιπρόσθετα, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις όπου η εισβολή του *Aedes albopictus* σε μία περιοχή όπου προϋπήρχε το συγγενικό του είδος *Aedes aegypti* είχε ως συνέπεια τον περιορισμό ή την εξαφάνιση του δεύτερου (Beilhe et al. 2013). Πρέπει να σημειωθεί



Εικόνα 1.1.3. Φυσικά και τεχνητά ενδιαιτήματα: Α. κορμοί δένδρου μπαμπού Β. πλαστικά δοχεία (Paupy et al. 2009)

ότι πολλές φορές αβιοτικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις και η αλατότητα του νερού, αλλά και βιοτικοί παράγοντες, για παράδειγμα οι βακτηριακές κοινότητες των υδάτινων ενδιαιτημάτων, πιθανοί θηρευτές και οι διαφορές μεταξύ πληθυσμών κουνουπιών διαφορετικών περιοχών, μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα του ανταγωνισμού μεταξύ των δύο ειδών (Lounibos et al. 2010; Leisnham et al. 2012; Yee et al. 2013; Beilhe et al. 2013; Ponnusamy et al. 2008; O'Neal et al. 2013; Leisnham et al. 2009; Leisnham et al. 2010)

Το ενήλικο άτομο παρουσιάζει μαύρο σώμα με σκουρόχρωμα και ανοιχτόχρωμα μοτίβα στο θώρακα και την κοιλία, με τις χαρακτηριστικές άσπρες γραμμές και στα έξι άκρα. Επίσης, ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο φύλων μπορεί να γίνει παρατηρώντας την κοιλία, όπου το υπογάστριο των θηλυκών ατόμων καταλήγει σε μία αιχμηρή άκρη. Τα θηλυκά κουνούπια είναι υπεύθυνα για την μετάδοση ιών κατά την διάρκεια των



Εικόνα 1.1.4. Διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών κουνουπιών (*Aedes albopictus*). Αριστερά αρσενικό ενήλικο κουνούπι και δεξιά θηλυκό ενήλικο κουνούπι (Mariangela Bozizzoni et al. 2013)

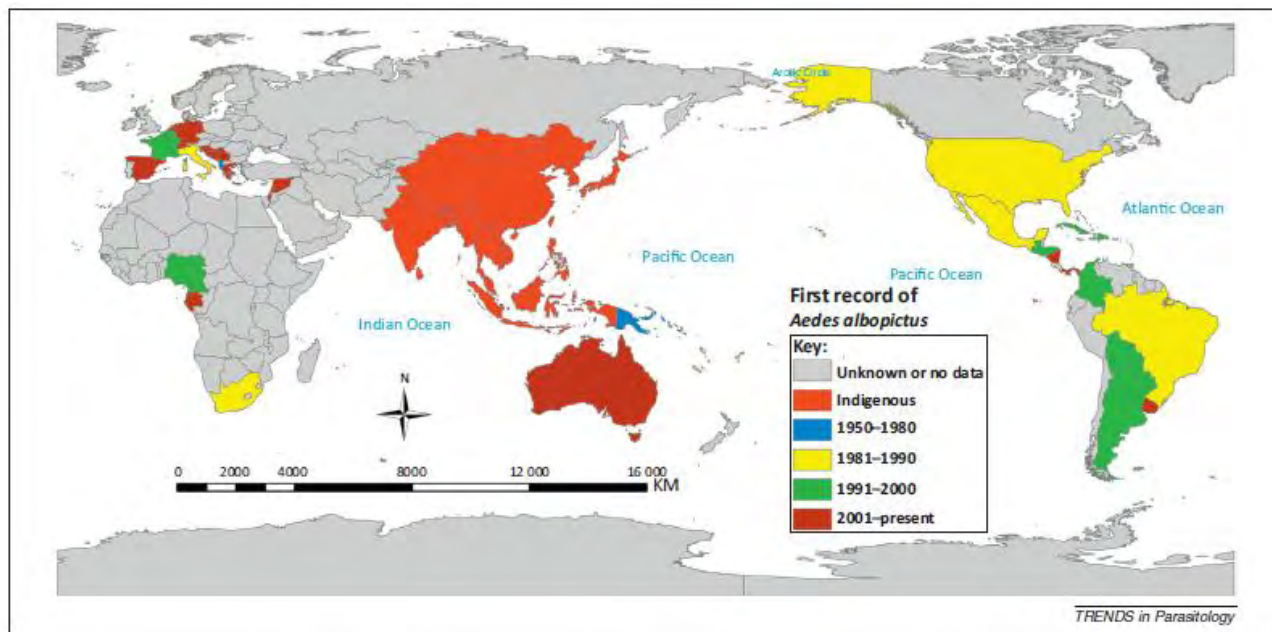
επαναλαμβανόμενων τσιμπημάτων για την κατανάλωση αίματος από τους ξενιστές τους, με στόχο την παραγωγή αυγών. Ο ιός συνεχίζει να αντιγράφεται στο εσωτερικό του εντόμου, ωστόσο ο αριθμός των ισωμάτων πρέπει να παραμείνει σε μη παθολογικά επίπεδα για το κουνούπι ξενιστή, το οποίο επιτυγχάνεται από την αποτελεσματική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του φορέα (Wang et al. 2018).

1.2. Κλιματική αλλαγή και εξάπλωση των ειδών *Aedes*

Η κλιματική αλλαγή και οι αυξημένες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα αλλάζουν το πρόσωπο του πλανήτη, το οποίο με την σειρά του έχει επηρεάσει την παγκόσμια εξάπλωση των εντόμων φορέων ασθενειών όπως το *Aedes aegypti* και το συγγενικό του είδος *Aedes albopictus* (Carrington et al. 2014; Kraemer et al. 2017; Semenza et al. 2017).

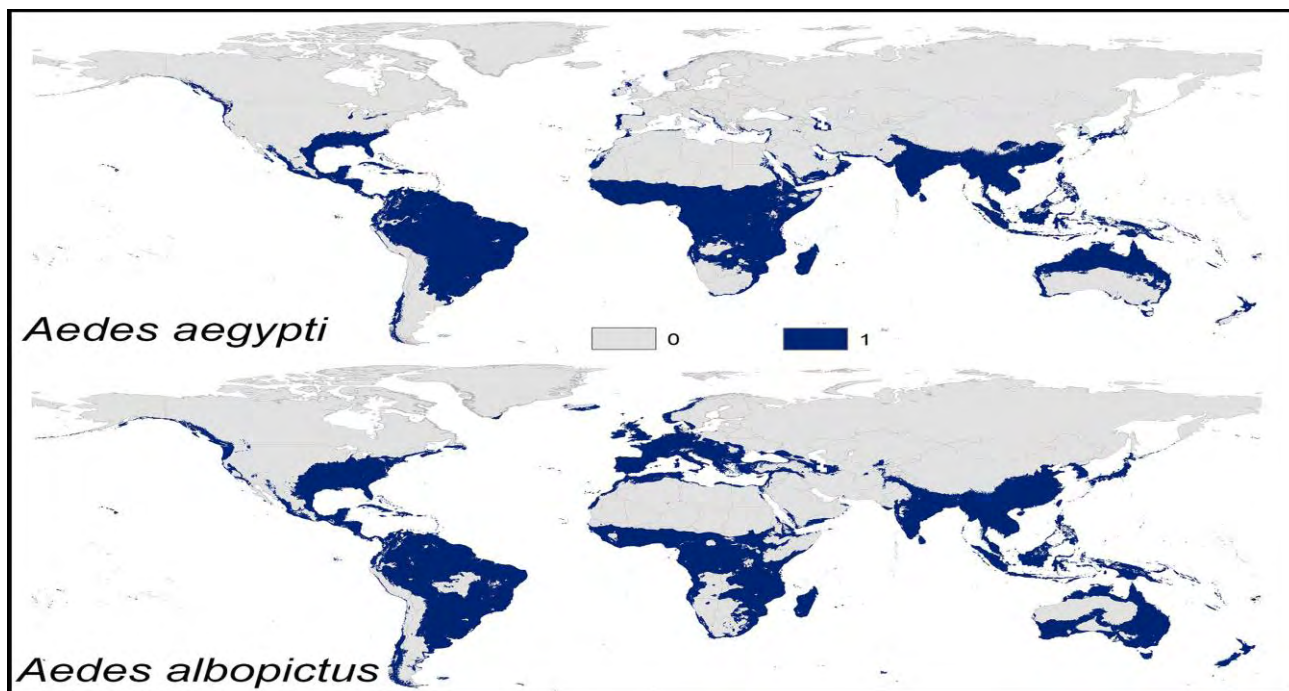
Το *Aedes albopictus*, γνωστό και ως κουνούπι τίγρης είναι ένα από τα πιο επεκτατικά είδη φορέων αρμποιών στον κόσμο. Με προέλευση από τα πυκνά δάση της ανατολικής Ασίας και τα νησιά του Δυτικού Ειρηνικού και Ινδικού Ωκεανού, τα έντομα αυτά έχουν καταφέρει να επεκταθούν εκτός τροπικών περιοχών, κατακτώντας μέχρι σήμερα κάθε ήπειρο εκτός από την Ανταρκτική (Caminade et al. 2012). Σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της επέκτασής του παίζει η πλαστικότητα που παρουσιάζει σε πολλά στοιχεία της συμπεριφοράς του, όπως τα υδάτινα ενδιαίτηματα όπου αναπαράγεται (μετάβαση σε αστικές περιοχές και αναπαραγωγή σε τεχνητά υδάτινα ενδιαίτηματα), την προτίμηση στην κατανάλωση αίματος (κατανάλωση τόσο ανθρώπινου όσο και ζωικού αίματος) και την προσαρμογή σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες (επιβίωση των αυγών σε χαμηλές θερμοκρασίες) (Paupy et al. 2009; Delatte et al. 2010; Kamgang et al. 2012). Η πρώτη καταγραφή κουνουπιού τίγρη στην Ευρώπη συνέβη στην Αλβανία το έτος 1979 (Benedict et al. 2007). Μετά από έξι χρόνια, το έτος 1985 εντοπίστηκε το πρώτο κουνούπι τίγρης στην περιοχή Harris County του Texas (Sprenger and Wuithiranyagool 1986), ενώ μέχρι σήμερα έχουν εδραιωθεί σε είκοσι έξι πολιτείες της Βόρειας Αμερικής. Όσον αφορά την Ελλάδα, τα πρώτα δείγματα κουνουπιών τίγρης βρέθηκαν το έτος 2003 στην Νότιο-Δυτικές επικράτειες της χώρας, την Κέρκυρα και την Θεσπρωτία. Τα επόμενα χρόνια έως και το έτος 2016, ο πληθυσμός των κουνουπιών κατάφερε να επεκταθεί στους περισσότερους νομούς της Ελλάδας (Badieritakis et al. 2017).

Από την άλλη πλευρά, το αρχέγονο είδος *Aedes aegypti formosus* της υπο-Σαχάριας Αφρικής, με προτίμηση στο αίμα ζώων έχει εξελιχθεί στο γνωστό *Aedes aegypti*, το οποίο πλέον εμφανίζει προτίμηση στην κατανάλωση ανθρώπινου αίματος κατά την διάρκεια της ημέρας και επιλέγει να αναπαύεται σε



Εικόνα 1.2.1. Χάρτης επέκτασης του κουνουπιού *Aedes albopictus*. Στο χάρτη απεικονίζονται οι πρώτες καταγραφές του κουνουπιού τίγρη παγκοσμίως. (Bozizzoni et al. 2013)

εσωτερικούς χώρους, έχει καταγραφεί σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τα μοντέλα πρόβλεψης της εξάπλωσης των δύο αυτών εντόμων φορέων που δημοσιεύτηκε το 2018 (Kamal et al. 2018), οι ερευνητές κατέληξαν στις παρακάτω εκτιμήσεις για τα έτη 2050 έως και το έτος 2070. Τα δύο είδη *Aedes* έχουν κοινά μοτίβα επέκτασης σε περιοχές της Ασίας και της Δυτικής Αφρικής, ωστόσο διαφέρουν στις περιοχές της Ευρώπης, Ανατολικής Αφρικής, της Αμερικής και Αυστραλίας. Όσον αφορά το *Aedes aegypti*, προβλέπεται ότι θα επεκταθεί σε περιοχές της Νότιας Αμερικής, όπως και τα νησιά της Καραϊβικής. Στην ήπειρο της Αφρικής αναμένεται να βρεθεί σε περιοχές όπως το Δυτικό Μαρόκο, την Βόρεια Αλγερία και Τυνησία, ενώ συγχρόνως προβλέπεται η εγκατάσταση του είδους στην Βόρεια Αυστραλία και στις ανατολικές ακτές της. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτή την έρευνα δεν συνυπολογίστηκε ο ανθρώπινος παράγοντας και ο ανταγωνισμός μεταξύ των δύο ειδών σε περιπτώσεις συμβίωσης σε κοινό βιότοπο. Όσον αφορά το *Aedes albopictus*, το είδος αυτό εμφανίζει ευρύτερη επέκταση παγκοσμίως λόγω της ικανότητάς του συγκεκριμένου είδους να προσαρμόζεται σε περιοχές με εύκρατο κλίμα και γενικότερα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, το *Aedes albopictus*, προβλέπεται να εδραιωθεί σε όλη την έκταση των συνόρων Βόρειας Αμερικής και Καναδά, αλλά και σε περιοχές του Νότιου Καναδά. Επιπλέον, το κουνούπι τίγρης σύμφωνα με τα στοιχεία των ερευνών προβλέπεται ότι θα φτάσει έως και την Βαλκανική χερσόνησο και τις χώρες της δυτικής Ευρώπης, κινούμενο όλο και βορειότερα στο χάρτη. Τέλος, περιορισμένοι πληθυσμοί έχουν καταγραφεί στην Νότια Ελβετία, Ολλανδία, Βουλγαρία, Ρωσία, Βέλγιο και Γερμανία, το οποίο επιβεβαιώνει τις παραπάνω προβλέψεις των επιστημόνων (Caminade et al. 2012).



Εικόνα 1.2.2. Χάρτης επέκτασης των κουνουπιών *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* βασισμένος στις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που είναι λιγότερο ευνοϊκές για την επιβίωση των κουνουπιών, με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που είναι επιτρεπόμενες για την επιβίωση των κουνουπιών (Kamal et al. 2018).

Ο παραπάνω χάρτης εξάπλωσης των *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* απεικονίζει με σχετική ακρίβεια τις περιοχές του πλανήτη στις οποίες θα εξαπλωθούν οι δύο βασικοί φορείς των αρμποιών με βάση τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες (Kamal et al. 2018). Η επιτυχία της εξάπλωσης των δύο αυτών ειδών και κυρίως του *Aedes albopictus* οφείλεται σε δύο βασικούς παράγοντες. Πρώτον, τον ανθρώπινο παράγοντα, δηλαδή στην ανάπτυξη του παγκόσμιου εμπορίου, στη παγκοσμιοποίηση και στην έλλειψη ελέγχου των φορτίων. Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας είναι η γρήγορη προσαρμογή του εντόμου στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που παρατηρείται ειδικά στην περίπτωση του κουνουπιού τίγρη (φωτοπεριοδική διάπαυση) (Tauber et al. 1987; Danks et al. 1987).

Καταλήγοντας, οι προβλέψεις αυτές αποτελούν σημαντικά κίνητρα για την αύξηση της ποιότητας ελέγχου εμπορευμάτων, ενώ ταυτόχρονα θέτει σε προτεραιότητα την ανάπτυξη μεθόδων περιορισμού των πληθυσμών αυτών των εντόμων φορέων (Kamal et al. 2018).

1.3. Μέθοδοι ελέγχου του πληθυσμού - Ανθεκτικότητα

Οι στρατηγικές ελέγχου του πληθυσμού των φορέων αρμποιών, *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus*, χωρίζονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες, έλεγχος του περιβάλλοντος αναπαραγωγής των κουνουπιών, χημικά εντομοκτόνα, βιολογικοί μέθοδοι ελέγχου και στρατηγικές βασισμένες στην γενετική (McGraw and O'Neill 2013).

Καταρχάς, οι περιβαλλοντικοί μέθοδοι ελέγχου των πληθυσμών κουνουπιών βασίζονται στον περιορισμό των σημείων αναπαραγωγής αυγών και κατανάλωσης αίματος. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν την εμπόδιση της εισόδου των εντόμων σε εσωτερικούς χώρους με τη χρήση προστατευτικών διχτυών ή σιτών. Ακόμα μία απλή μέθοδος είναι η αφαίρεση των τεχνητών υδάτινων ενδαιτημάτων που δημιουργούνται από τη συλλογή νερού σε κεραμικά δοχεία, πλαστικά ποτήρια, λάστιχα αυτοκινήτων κ.α. από τους

εξωτερικούς χώρους και ο συχνός καθαρισμός των δοχείων που κρατούν νερό, καθώς αποτελούν ιδανικά σημεία γονιμοποιημένων αυγών (Tangena et al. 2017; McGraw and O'Neill 2013; Fonseca et al. 2013).

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος περιορισμού ενός πληθυσμού εντόμων είναι η χρήση χημικών εντομοκτόνων. Ένα από τα πρώτα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση των κουνουπιών ήταν το εντομοκτόνο DDT. Επιπρόσθετα, σε αυτή την κατηγορία κατατάσσονται οργανοφωσφορικές ενώσεις, όπως για παράδειγμα το εντομοκτόνο temephos, αλλά και ενώσεις που δρουν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης (insect growth regulators-IGRs), όπως αυτές που εμπλέκονται στις αναπτυξιακές διαδικασίες της μεταμόρφωσης και απέκδυσης του εξωσκελετού (π.χ. οι αναστολείς σύνθεσης της χιτίνης (chitin synthesis inhibitors-CSIs) diflubezuron και novaluron) (WHO 2011; Ranson et al. 2010; Vontas et al. 2012; Fontoura et al. 2012).

Η ευρεία γενετική ποικιλομορφία των γονιδίων του μεταβολισμού τοξικών ενώσεων των πληθυσμών των κουνουπιών του γένους *Aedes* σε συνδυασμό με την εσφαλμένη και αλόγιστη χρήση χημικών εντομοκτόνων έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας σε πολλές περιοχές, λόγω της εξελικτικής πίεσης που ασκείται στους πληθυσμούς που εκτίθενται σε αυτές τις ενώσεις (de Araújo et al. 2019). Παραδείγματα ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο temephos έχουν παρατηρηθεί σε πληθυσμούς *Aedes aegypti* της Βραζιλίας από το έτος 2001. Ακόμα παλαιότερα, την δεκαετία του '60 στην Νότιο-Ανατολική Ασία είχαν εντοπιστεί πληθυσμοί του κουνουπιού *Aedes albopictus* με ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα DDT, dieldrin και fenthion (Tangena et al. 2018). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στην S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (glutathione S-transferases) πιθανόν να συσχετίζεται με αντίσταση στο πυρεθρίδιο (Enayati et al. 2005), ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι το ένζυμο αυτό εμπλέκεται στην αποτοξικοποίηση των οργανοφωσφορικών (Vontas et al. 2002) και του DDT (Lumjuan et al. 2005). Επιπλέον, σε πληθυσμούς της Βραζιλίας που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα temephos και cypermethrin, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε οξειδάσες μεικτής λειτουργίας (mixed-function oxidases), τα οποία είναι ένζυμα που συμμετέχουν στο μονοπάτι αποτοξικοποίησης ξενοβιοτικών. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλαπλά εντομοκτόνα συγχρόνως (de Araújo et al. 2019).

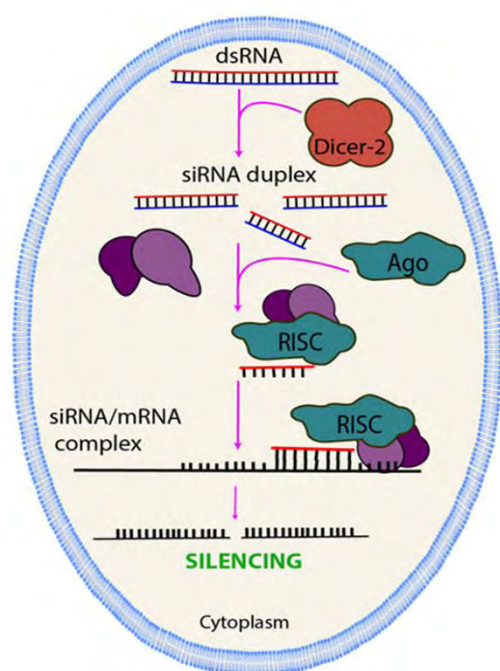
Η εμφάνιση ανθεκτικότητας, οδήγησε τους επιστήμονες στην ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών μεθόδων με πιο φιλικό για το περιβάλλον χαρακτήρα, όπως οι βιολογικές μέθοδοι ελέγχου και οι στρατηγικές βασισμένες στην γενετική. Στην περίπτωση των βιολογικών μεθόδων, γίνεται χρήση ζώντων οργανισμών ή μικροοργανισμών για την θανάτωση των εντόμων. Μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους είναι η χρήση των τοξινών που παράγονται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Τα τελευταία χρόνια, η προσοχή των ερευνητών έχει στραφεί στο μετασηματισμό συμβιωτικών βακτηρίων των εντόμων όπως αυτά του γένους *Asaia*, *Acinetobacter* και *Pantoea*, με σκοπό την δημιουργία παραδιαγονιδιακών (paratransgenesis) κουνουπιών (Valiente-Moro et al. 2013;). Ακόμα ένα εργαλείο περιορισμού πληθυσμών αποτελεί το φαινόμενο κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας λόγω μόλυνσης ενήλικων κουνουπιών με βακτήρια του γένους *Wolbachia*. Τα μολυσμένα με *Wolbachia* θηλυκά κουνούπια όχι μόνο εμφανίζουν καλύτερη φυσική κατάσταση, είναι και λιγότερο ευάλωτα σε μολύνσεις από του ιούς DENV και CHIKV από αυτά που δεν έχουν μολυνθεί (Turelli and Hoffmann 1995; Hoffman et al. 2011; Yeap et al. 2011). Επιπλέον, όταν μολυσμένα με *Wolbachia* αρσενικά κουνούπια ζευγαρώνουν με μη μολυσμένα ή μολυσμένα με διαφορετικό στέλεχος *Wolbachia* θηλυκά κουνούπια τότε προκύπτουν στείρα θηλυκά (Philip T. et al. 2015). Δύο ακόμη φιλικές για το περιβάλλον προσεγγίσεις, είναι η χρήση εντομοπαθολογικών μυκήτων (Read et al. 2009) με στόχο την μόλυνση κουνουπιών και η απελευθέρωση οργανισμών θηρευτών των εντόμων αυτών, όπως εντομοφάγα ψάρια (για παράδειγμα *Gambia spp.*, *Poecilia reticulata*) και εντόμων θηρευτών (για παράδειγμα το *Tomorhynchites splendens*), σε περιοχές αναπαραγωγής των κουνουπιών (Seng et al. 2008).

Η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων οικολογικών μεθόδων περιορισμού του πληθυσμού των φορέων αρμποιών αυξάνεται ραγδαία κάθε χρόνο. Απαντήσεις σε αυτή την ανάγκη δίνουν οι επιστήμονες με την εκμετάλλευση τεχνολογιών της γενετικής και μοριακής βιολογίας. Παραδείγματα αυτών των τεχνολογιών αποτελούν η δημιουργία στείρων εντόμων, η χρήση της τεχνολογίας CRISPR και παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference, RNAi). Η μέθοδος δημιουργίας στείρων εντόμων βασίζεται στην χρήση ακτινοβολίας για την πρόκληση τυχαίων μεταλλάξεων σε αρσενικά άτομα, τα οποία καθίστανται στείρα. Ακολούθως, η απελευθέρωση αυτών ατόμων στη φύση και το ζευγάρισμα με θηλυκά άτομα άγριου τύπου, οδηγούν στην παραγωγή μη γονιμοποιημένων αυγών και συνεπώς στη μείωση των ατόμων του πληθυσμού. Ωστόσο, η τυχαία μεταλλαξιγένεση των αρσενικών ατόμων έχει επιπτώσεις στην φυσική κατάσταση αυτών, με

αποτέλεσμα τα θηλυκά να προτιμούν αρσενικά αγρίου τύπου. Ακόμα μία νέα τεχνολογία η οποία πλέον χρησιμοποιείται ευρέως, είναι αυτή της μεταλλαξιγένεσης μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Με τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 μπορεί να επιτευχθεί η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση περιοχών του γονιδιώματος που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και επιβίωση των εντόμων (Ghosh et al. 2016). Τέλος, η τεχνολογία παρεμβαλλόμενου RNA (RNAi), εκμεταλλεύεται τον ενδογενή μηχανισμό σίγησης των ευκαρυωτικών κυττάρων για την ανάπτυξη εντομοκτόνων νέας γενιάς. Η τεχνολογία αυτή έχει ως βασική αρχή τη χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA, συμπληρωματικών της αλληλουχίας στόχου, τα οποία θα ενεργοποιήσουν το ενδογενές μονοπάτι σίγησης του κυττάρου (Bartel et al. 2004). Περισσότερες πληροφορίες για την τεχνολογία παρεμβαλλόμενου RNA (RNAi), ακολουθούν στα επόμενα κεφάλαια (1.4, 1.5).

1.4. RNAi μηχανισμός

Ο μηχανισμός μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης ανακαλύφθηκε στον οργανισμό μοντέλο *Ceanorhabditis elegans* από τους Andrew Z. Fire και Craig C. Mello το έτος 1998, ενώ λίγα χρόνια αργότερα, το 2006 κέρδισαν το βραβείο Nobel φυσιολογίας (Fire et al. 1998).

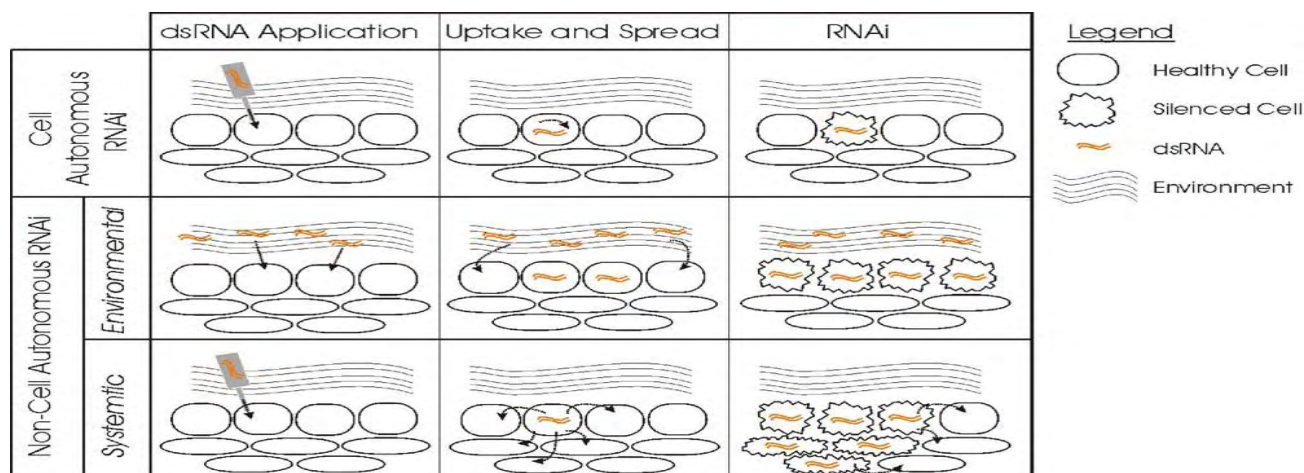


Εικόνα 1.4.1 Μονοπάτι παραγωγής μορίων siRNA. (Joga et al.2016)

ασθενειών (π.χ. *Aedes aegypti*), αλλά και σε άλλα έντομα (όπως *Drosophila melanogaster*) (Sijen and Plasterk 2003; Umbach and Cullen 2009).

Ο μηχανισμός παρεμβαλλόμενου RNA μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων όπου συμβαίνει η σίγηση. Η πρώτη κατηγορία αφορά την κυτταρικά αυτόνομη RNA σίγηση (Cell–Autonomous RNAi), σύμφωνα με την οποία όλα τα βήματα του μονοπατιού σίγησης όπως και η εισαγωγή ή παραγωγή του δίκλωνου RNA λαμβάνει μέρος σε ένα μεμονωμένο κύτταρο. Η δεύτερη κατηγορία αφορά μη κυτταρικά αυτόνομη RNA σίγηση (Non-Cell –Autonomous RNAi), σύμφωνα με την οποία το μονοπάτι σίγησης λαμβάνει μέρος σε διαφορετικά κύτταρα ή ιστούς από τόπο εισαγωγής ή

παραγωγής του δίκλωνου RNA. Επιπλέον, η κατηγορία αυτή διαιρείται σε δύο υποκατηγορίες, την σίγηση RNA μέσω του περιβάλλοντος (Environmental RNAi) και την συστηματική την σίγηση RNA (Systemic RNAi). Στην περίπτωση της πρώτης υποκατηγορίας τα δίκλινα μόρια RNA μεταφέρονται από το περιβάλλον προς τον έμβιο οργανισμό, ενώ στη συστηματική σίγηση RNA, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε πολυκύτταρους οργανισμούς, όπου το φαινόμενο της σίγησης εξαπλώνεται από κύτταρο σε κύτταρο και από ιστό σε ιστό. (Huvenne and Snagge 2010)



Εικόνα 1.4.2. Κατηγοριοποίηση του παρεμβαλλόμενου RNA ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που επηρεάζονται από το μηχανισμό της σίγησης. (Hanneke Huvenne and Guy Smagghe 2009)

Όπως αναγράφεται παραπάνω, η ενεργοποίηση του μονοπατιού μετα-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (RNAi pathway) απαιτεί την παρουσία δίκλωνου RNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Έως και σήμερα, οι γνώσεις της επιστημονικής κοινότητας για τον μηχανισμό εισαγωγής των δίκλωνων RNA μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων των εντόμων είναι περιορισμένοι. Ωστόσο, έχουν προταθεί μερικοί πιθανοί μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους θα μπορούσε να επιτευχθεί η μεταφορά των μορίων αυτών στο κυτόπλασμα του κυττάρου. Έχουν περιγραφεί δύο μονοπάτια πρόσληψης δίκλωνων μορίων RNA, με την βοήθεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορέων και μέσω του μηχανισμού ενδοκύτωσης. Όσον αφορά τους διαμεμβρανικούς πρωτεϊνικούς μεταφορείς, έχουν χαρακτηριστεί δύο πρωτεΐνες μεταφορείς SID-1 και SID-2. Ο μεταφορέας SID-1 συμμετέχει στη συστηματική σίγηση RNA καθώς συμμετέχει στην παθητική μεταφορά του δίκλωνου RNA μεταξύ γειτονικών κυττάρων, ενώ παράλληλα η πρωτεΐνη SID-2 εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα του πεπτικού σωλήνα και έχει συσχετιστεί με την μεταφορά των δίκλωνων μορίων RNA από το περιβάλλον στο εσωτερικό των κυττάρων. Ακόμα, υπάρχουν υποθέσεις που προτείνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών στην μεταφορά των δίκλωνων μορίων RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Winston et al. 2002; Jose et al. 2009; Whangbo and Hunter 2008). Γονίδια με παρόμοια λειτουργία με αυτή του γονιδίου *sid-1* έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλά έντομα, με τον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων αυτών να ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών τάξεων. Για παράδειγμα, τρία παράλογα του γονιδίου *sid-1* έχουν βρεθεί στο είδος *Tribolium castaneum* ενώ ομόλογες αλληλουχίες του *sid-1* έχουν εντοπιστεί σε ιχθύες και θηλαστικά (Tomoyasu et al. 2008). Ωστόσο, γονίδια με παραπλήσιο ρόλο με το γονίδιο *sid-2* δεν έχουν ταυτοποιηθεί σε κάποιο έντομο του οποίου το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί πλήρως (Joga et al. 2016). Εξάιρεση αποτελεί η τάξη των δίπτερων όπου δεν έχει κανένα γονίδιο με παρόμοια λειτουργία με αυτή των *sid-1* και *sid-2*. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα S2 εντόμου του γένους *Drosophila* απέδειξαν ότι η μεταφορά των δίκλωνων μορίων RNA πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων SR, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων (PRRs). Οι υποδοχείς SR (scavenger receptors) έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με τον μηχανισμό ενδοκύτωσης και φαγοκυττάρωσης παθογόνων. Σε πειραματική δοκιμασία σίγησης δύο υποδοχέων τύπου SR στο έντομο *Drosophila melanogaster* επιτεύχθηκε περισσότερο από 90% μείωση της πρόσληψης δίκλωνου RNA (Ulvila et al. 2006). Η πρόσληψη των δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) από τα κύτταρα είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες απόδοσης του μηχανισμού σίγησης μέσω παρεμβαλλόμενου RNA, για τον λόγο

αυτό περισσότερες μελέτες απαιτούνται για την κατανόηση του μηχανισμού μεταφοράς και την βελτίωση της τεχνολογίας σίγησης (RNAi).

1.5. RNAi εντομοκτόνα – Παραγωγή dsRNA - Τρόποι χορήγησης

Η τεχνολογία παρεμβαλλόμενου RNA έχει χρησιμοποιηθεί και χρησιμοποιείται τόσο ως μέθοδος ελέγχου και καταπολέμησης εντόμων αγροτικού και υγειονομικού ενδιαφέροντος, όσο και σε μελέτες φυσιολογίας, οικολογίας, συμπεριφοράς, εξελικτικής και αναπτυξιακής βιολογίας των εντόμων και άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών (Wynant et al. 2014).

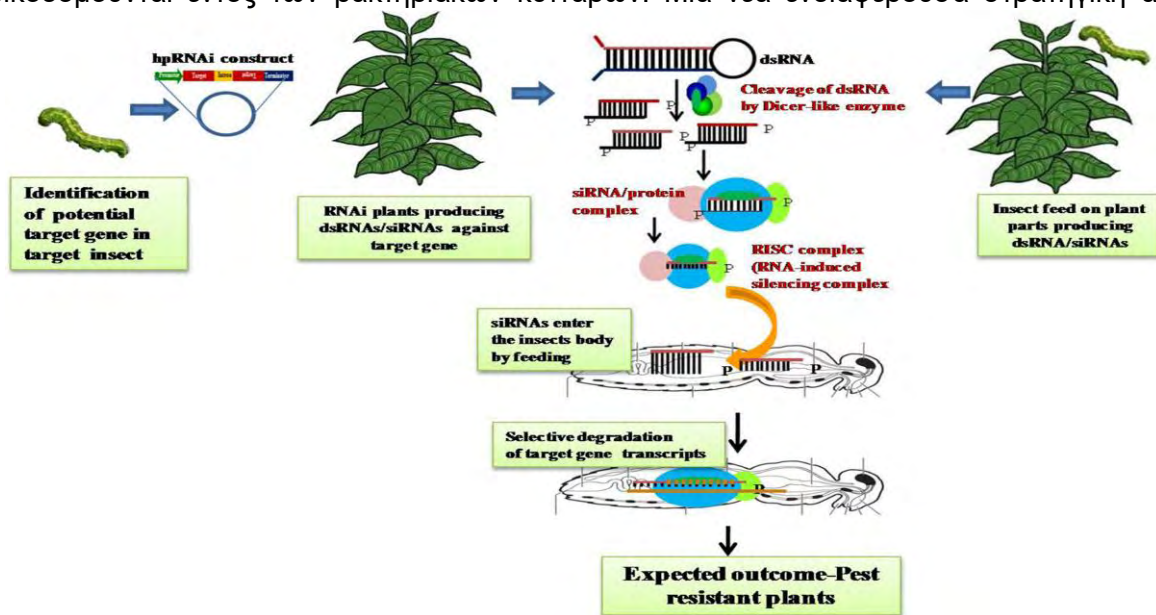
Όσον αφορά την καταπολέμηση εντόμων αγροτικού και υγειονομικού ενδιαφέροντος, η τεχνολογία του παρεμβαλλόμενου RNA αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την δημιουργία εντομοκτόνων νέας γενιάς. Η αρχή της χρήσης της τεχνολογίας του παρεμβαλλόμενου RNA για την παραγωγή εντομοκτόνων βασίζεται στην χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) στο εσωτερικό του εντόμου, τα οποία θα οδηγήσουν στη σίγηση του γονιδίου στόχου. Η παραγωγή εντομοκτόνων παρεμβαλλόμενου RNA ξεκινά με την επιλογή του γονιδιακού στόχου. Το γονίδιο στόχος πρέπει να πληροί δύο προφανή κριτήρια. Πρώτον, το επιλεγμένο γονίδιο πρέπει να είναι απαραίτητο ή τουλάχιστον να είναι σημαντικό για την ανάπτυξη ή/και τη γονιμότητα του εντόμου, ώστε η σίγηση του να προκαλεί θνησιμότητα ή/και στειρότητα. Δεύτερον, το τμήμα DNA το οποίο μεταγράφεται ως RNA πρέπει να είναι αποτελεσματικό στην ενεργοποίηση του μηχανισμού σίγησης του γονιδιακού στόχου στο κύτταρο (Zhang et al. 2017).

Τα δίκλινα αυτά μόρια RNA μπορούν να έχουν παραχθεί είτε *in vitro* είτε *in vivo*. Στην περίπτωση της *in vitro* παραγωγής δίκλωνου RNA, τα μόρια μπορούν να παραχθούν χημικά βάση προς βάση ή με τη χρήση του ενζύμου T7 πολυμεράσης του RNA και των κατάλληλων εκκινητών. Ακολουθώντας, τα νεοσυντηθέμενα μόρια δίκλωνου RNA μπορούν να χορηγηθούν με διαφορετικούς τρόπους όπως με μικροέγχυση, με επώαση των εντόμων σε υδατικό διάλυμα, μέσω της τροφής και μέσω του εγκλεισμού τους σε νανοσωματίδια ή λιπιδίωμα. Ένα παράδειγμα χορήγησης δίκλωνου RNA μέσω της τροφής είναι με την κατανάλωση φυτικών ιστών από το έντομο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται χορήγηση του δίκλωνου RNA το οποίο έχει παραχθεί *in vitro*, στο φυτό είτε εξωγενώς, όπου η απορρόφηση γίνεται από τη ρίζα, είτε μέσω ένεσης στον βλαστό. Και στις δύο περιπτώσεις το dsRNA διανέμεται στο φυτό μέσω του ξυλώματος και του φλοιώματος, με αποτέλεσμα τα έντομα που τρέφονται με φυτικούς ιστούς να προσλαμβάνουν ποσότητα δίκλωνων μορίων RNA. Αναφορικά με νανοσωματίδια και τα λιπιδίωμα, η χρήση τους στην μεταφορά των δίκλωνων μορίων RNA είναι προστατευτική, διότι το εξωτερικό περίβλημα που σχηματίζουν προστατεύει τα μόρια RNA από χημικούς και φυσικούς παράγοντες του περιβάλλοντος καθώς και νουκλεάσες. Το εξωτερικό αυτό περίβλημα αποτελείται είτε από νανοσωματίδια chitosan τα οποία αυτοπολυμερίζονται γύρω από τα μόρια dsRNA (μέσω των ελκτικών δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ των θετικά φορτισμένων αμινομάδων του chitosan και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του RNA), είτε από μακριές αλυσίδες λιπαρών οξέων ή μόρια χοληστερόλης, τα οποία σχηματίζουν ένα υδροφοβικό περίβλημα και ένα υδρόφιλο εσωτερικό περιβάλλον στο οποίο διαλύονται τα μόρια δίκλωνου RNA (Airs and Bartholomay 2017).

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

Εικόνα 1.5.1. Α. Φορείς δίκλωνων μορίων RNA. Β. Είδη νουκλειικών οξέων (Paul M. Airs and Lyric C. Bartholomay 2017)

Από την άλλη πλευρά, η in vivo παραγωγή των δίκλωνων μορίων RNA προϋποθέτει την παρουσία ενός ζωντανού οργανισμού, όπως φυτά, βακτήρια, μύκητες και ιοί. Η εξειδίκευση των ιών των αρθροπόδων τους καθιστά ιδανικούς φορείς RNA. Στην περίπτωση των ιών, τα ισωμάτια μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως μεταφορείς μονόκλωνων ή δίκλωνων μορίων RNA, είτε ως φορείς έκφρασης δίκλωνων μορίων RNA με δομή φουρκέτας, όταν η αλληλουχία του στόχου έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ιού (Lacey et al. 2015). Τόσο τα βακτήρια όσο οι μύκητες και τα φυτά μετασχηματίζονται με πλασμιδιακό φορέα από τον οποίο μεταγράφεται το δίκλωνο μόριο RNA. Αναλυτικότερα, ο πλασμιδιακός φορέας περιέχει κατά σειρά ένα εκκινήτη, την αλληλουχία στόχο, μία αλληλουχία θηλιάς, την συμπληρωματική αλληλουχία στόχου, η οποία υβριδίζεται μαζί με την αλληλουχία στόχο. Η πρόσληψη του δίκλωνου RNA πραγματοποιείται μέσω της τροφής (per os), με την κατανάλωση τμημάτων φυτικών ιστών και βακτηριακών κυττάρων και μυκήτων από το έντομο. Η παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) από φυτικά κύτταρα έχει αποδειχθεί χρήσιμη εναλλακτική μέθοδος για τον περιορισμό της χρήσης χημικών εντομοκτόνων στον αγροτικό τομέα. Τα μόρια RNA που παράγονται μέσα στα διαγονιδιακά φυτά απορροφώνται από τα έντομα κατά τη σίτιση, και οδηγούν στην έναρξη του μηχανισμού σίγησης του γονιδίου στόχου σε αυτά (Zhang et al. 2017). Η παραγωγή μορίων dsRNA μέσω μετασχηματισμένων βακτηρίων και μυκήτων έχει αποδειχθεί εξίσου χρήσιμη. Τόσο οι μύκητες όσο και αρκετά βακτηριακά στελέχη είναι καλά μελετημένοι οργανισμοί το οποίο καθιστά τον γενετικό τους μετασχηματισμό μία εύκολη διαδικασία. Όπως και στην περίπτωση των φυτών έτσι και στους μύκητες και τα βακτήρια, τα κύτταρα μετασχηματίζονται με τη χρήση ενός πλασμιδιακού φορέα. Ωστόσο, αυτή τη φορά, είναι απαραίτητη η παρουσία γονιδίου επιλογής, όπως γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη στα βακτήρια και γονίδιο βιοσύνθεσης τρυπτοφάνης ή ουρακίλης σε αυξοτροφικούς μύκητες, στο πλασμιδιακό φορέα. Επιπρόσθετα, πρέπει να σημειωθεί ότι για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA από βακτηριακές αποικίες επιλέγονται στελέχη που δεν εκφράζουν το ένζυμο RNase III, έτσι ώστε τα μόρια RNA που παράγονται να μην αποικοδομούνται εντός των βακτηριακών κυττάρων. Μία νέα ενδιαφέρουσα στρατηγική αποτελεί η



Εικόνα 2.5.2. Παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) σε φυτικά κύτταρα. (Mamta and Rajam 2017)

επιλογή συμβιωτικών βακτηρίων για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA στο εσωτερικό του οργανισμού του εντόμου ξενιστή του βακτηρίου (Taracena et al. 2015; Mamta and Rajam 2017; Hapairai et al. 2017).

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες, εκτός από την επιλογή του γονιδίου στόχου, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της σίγησης μέσω παρεμβαλλόμενου RNA στα έντομα. Συγκεκριμένα, συγκέντρωση του dsRNA που εισάγεται στο έντομο είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς πρέπει να υπάρχουν αρκετά μόρια RNA ώστε να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός σίγησης του κυττάρου ενώ παράλληλα να μην εμφανίζονται φαινόμενα χημικής παρεμβολής λόγω της υψηλής συγκέντρωσης. Εν τούτοις, ενώ η ισχύς του αποτελέσματος σίγησης είναι σαφώς εξαρτώμενη από τη δόση, η βέλτιστη συγκέντρωση δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA) δεν έχει βρεθεί ακόμα, διότι για κάθε γονίδιο στόχο και οργανισμό πρέπει να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση για να προκληθεί αποτελεσματικότερη σίγηση. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας είναι το μήκος του μορίου RNA που συντίθεται. Όταν εφαρμόζεται η χορήγηση δίκλωνων μορίων μέσω της τροφής, τότε τα τμήματα RNA έχουν μήκος συνήθως 300- 520 bp. Σε μελέτες κυττάρων S2 αποδείχθηκε ότι τα δίκλινα τμήματα RNA θα πρέπει να έχουν μήκος τουλάχιστον 211 bp. (Saleh et al. 2006) Επιπρόσθετα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία που χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό των δίκλωνων ορίων RNA καθορίζει μη ειδικές πιθανές επιδράσεις των μορίων αυτών σε γονίδια που δεν αποτελούν στόχο, αλλά και σε διαφορετικά είδη εντόμων. Για παράδειγμα, μόρια dsRNA με στόχο την V-ATPase του *Leptinotarsa decemlineata* (colorado potato beetle), προκάλεσαν σίγηση του ορθόλογου γονιδίου στο *Diabrotica virgifera virgifera* (corn rootworm) (Baum et al. 2007). Εκτός από τα χαρακτηριστικά του ίδιου του μορίου RNA, η φυσιολογία του εντόμου μπορεί να επηρεάσει έντονα την αποτελεσματικότητα του RNAi. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία dsRNase στο πεπτικό υγρό ή σίελο των εντόμων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* (Lepidoptera) και του *Lygus lineolaris* (Hemiptera) αντίστοιχα (Allen and Walker 2012). Το είδος *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) δεν φαίνεται να είναι επιρρεπές στη χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA μέσω της τροφής, το οποίο οφείλεται εν μέρει σε ιδιαίτερα δραστικές dsRNA-ειδικές ριβονουκλεάσες (dsRNases) στο μεσοστόμαχο του εντόμου αυτού (Wynant et al. 2014). Για την βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας της μεθόδου, θα ήταν ωφέλιμο τα δίκλινα μόρια RNA να μεταφέρονται στο εσωτερικό σωματιδίων, τα οποία θα τα προστατεύουν από νουκλεάσες και θα προάγουν την ενδοκύττωσή του στα κύτταρα στόχους όπως συμβαίνει με τη χρήση σφαιριδίων που αποτελούνται από νανοσωματίδια ή λιποσώματα αντίστοιχα. Τέλος, η συμμεταφορά πλασμιδιακών φορέων που κωδικοποιούν παράγοντες του μηχανισμού RNAi όπως Ago2 και Dcr2 πιθανόν να αυξήσει την απόδοση της μεθόδου (Joga Et al. 2016; Huvenne and Smagghe 2010). Είναι σημαντικό να καταγραφεί ότι η αποτελεσματικότητα του RNAi επηρεάζεται επίσης από τον ιστό-στόχο. Τέλος, ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της σίγησης είναι το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται το έντομο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όταν τα έντομα στοχεύονται σε νεότερα στάδια ανάπτυξης εμφανίζουν μεγαλύτερη σίγηση, λόγω του μικρότερου μεγέθους τους και του λιγότερο ανεπτυγμένου μηχανισμού άμυνας (Huvenne and Smagghe 2010; Araujo et al. 2006; Griebler et al. 2008).

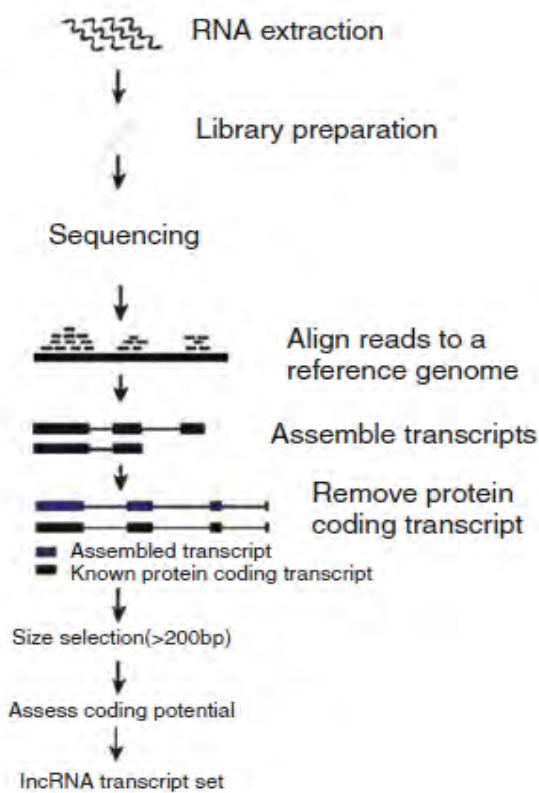
Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευτεί πολυάριθμες μελέτες επιτυχούς σίγησης γονιδίων με τη χρήση εντομοκτόνων παρεμβαλλόμενου RNA (RNAi). Παραδείγματος χάρη, η θρέψη προνυμφών του κουνουπιού *Aedes aegypti* με μετασχηματισμένο μύκητα, ο οποίος παρήγαγε δίκλινα μόρια RNA με στόχο το γονίδιο της πρωτεΐνης zeta 2 και του υποδοχέα των λευκοκυττάρων, είχε ως συνέπεια την θανάτωση αυτών (Hapairai et al. 2017). Ακόμη μία πρωτότυπη μελέτη είχε διεξαχθεί με τη χρήση δύο ειδών βακτηρίων, *Escherichia coli* και *Rhodococcus rhodnii* (φυσιολογικός συμβιώτης του εντόμου) για τη σίγηση δύο γονιδίων, την πρωτεΐνη RHBP (Rhodnius heme-binding protein) και του ενζύμου καταλάση (CAT) του *Rhodnius prolixus*. Τόσο με τη χρήση του συμβιωτικού βακτηρίου, όσο και με το στέλεχος HT115 *Escherichia coli*, επιτεύχθηκε σημαντική μείωση της παραγωγής των δύο πρωτεϊνών, το οποίο είχε άμεσο αντίκτυπο στο φαινότυπο των ενήλικων θηλυκών ατόμων και των νυμφών του φορέα της νόσου Chagas (Taracena et al. 2015). Το έτος 2017 δημοσιεύθηκε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν φυτά βαμβακιού, με μετασχηματισμένο χλωροπλαστικό γονιδίωμα, με σκοπό την σίγηση του γονιδίου CYP6AE14 του εντόμου *Helicoverpa armigera*. Τα αποτελέσματα της εργασίας παρουσίασαν ότι οι προνύμφες του *Helicoverpa armigera* δεν μπορούσαν πλέον

να μεταβολίσουν την ένωση gossypol με αποτέλεσμα να πεθαίνουν μετά την κατανάλωση φυτικών ιστών βαμβακιού (Jin et al. 2017).

Εν κατακλείδι, η παραγωγή εντομοκτόνων παρεμβαλλόμενου RNA ίσως αποτελεί ένα από τους πιο ασφαλείς και περιβαλλοντικά φιλικούς τρόπους ελέγχου εντόμων αγροτικού και υγειονομικού ενδιαφέροντος, διότι στοχεύοντας μία μοναδική αλληλουχία σε ένα είδος, εξαλείφεται η πιθανότητα παράπλευρων απωλειών όπως τα ωφέλιμα έντομα στην περίπτωση χρήσης συμβατικών εντομοκτόνων. Παράλληλα, η παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA in vivo με την εκμετάλλευση βακτηρίων και μυκήτων έχει αποδειχθεί αρκετά αποδοτική καθώς υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης αυτών των οργανισμών σε μεγάλη ποσότητα και με σχετικά χαμηλό κόστος.

1.6. Long noncoding RNAs (Λειτουργία – Κατηγορίες)

Με την ολοκλήρωση της αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, αποκαλύφθηκε ότι μόνο το 3,2% του γενετικού υλικού του ανθρώπου αποτελείται από κωδικοποιητικές αλληλουχίες (πρωτείνες), ενώ το υπόλοιπο αντιστοιχεί σε μη κωδικοποιητικό DNA. Για πολλά χρόνια, ο ρόλος του μη κωδικοποιητικού DNA έμεινε ανεξερεύνητος, ενώ από πολλούς οι αλληλουχίες αυτές χαρακτηρίζονταν ως μη λειτουργικά εξελικτικά κατάλοιπα (junk DNA). Η γρήγορη ανάπτυξη νέων τεχνολογιών αλληλούχησης μεταγραφωμάτων, οδήγησε στην ταυτοποίηση πολλών μακρών μη κωδικοποιητικών RNA σε πολυάριθμους οργανισμούς με σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη, την εμφάνιση παθολογίας και γενικότερα τον έλεγχο της λειτουργίας των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ως μακρά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (long noncoding RNA-lncRNA) ορίζονται τα μετάγραφα που έχουν μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων και δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη (Kapranov et al. 2007).



Εικόνα 1.6.1. Πρωτόκολλο ταυτοποίησης μη κωδικοποιητικών μεταγράφων RNA (lncRNAs) (Kumar et al. 2017)

Για την ταυτοποίηση μη κωδικοποιητικών lncRNAs συνήθως εφαρμόζεται το παρακάτω πρωτόκολλο. Αρχικά, το συνολικό RNA απομονώνεται από τον επιθυμητό ιστό του εντόμου, και το δείγμα αφού μετατραπεί σε DNA, αλληλουχείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των διαθέσιμων τεχνολογιών αλληλούχησης. Με την προϋπόθεση ότι υπάρχει διαθέσιμη η γονιδιωματική βιβλιοθήκη του εντόμου-οργανισμού στόχου, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του δείγματος ευθυγραμμίζονται με τα δεδομένα της βιβλιοθήκης. Μετά την επιτυχή συναρμολόγηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης, αφαιρούνται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε κωδικοποιητικά μετάγραφα και τα μετάγραφα με μήκος μικρότερο των 200 νουκλεοτιδίων. Τελευταίο βήμα αποτελεί ο υπολογισμός της κωδικοποιητικής ικανότητας αυτών των μεταγράφων, καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα μόρια lncRNAs δεν κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη (Kumar et al. 2017). Υπάρχουν τέσσερα κριτήρια τα οποία ορίζουν μία αλληλουχία ως μη κωδική. Πρώτον, εξετάζεται το μήκος πιθανών ανοικτών αναγνωστικών πλαισίων. Δεύτερον, εφόσον αυτά ανιχνευτούν συγκρίνεται το μέγεθος τους με το μήκος του μεταγράφου. Τρίτον, διερευνάται η παρουσία μοτίβων αλληλουχίας DNA που εμφανίζονται συνήθως σε κωδικοποιητικά μόρια και υπαγορεύονται από τον γενετικό κώδικα (τριπλέτες νουκλεοτιδίων, ζεύγη αμινοξέων). Τέλος, πραγματοποιείται ανάλυση της αλληλουχίας, η οποία κατακερματίζεται σε τμήματα μήκους k (k-mer). Τα τμήματα

αυτά συγκρίνονται μεταξύ κωδικοποιητικών και μη κωδικοποιητικών αλληλουχιών. Ωστόσο, η ταυτοποίηση γονιδίων μη κωδικοποιητικών lncRNA παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Για παράδειγμα, σε πολλές περιπτώσεις δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα για τα κωδικοποιητικά γονίδια των εντόμων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ψευδές θετικό αποτέλεσμα, κατά την ταυτοποίηση των αλληλουχιών lncRNA. Επιπλέον, τόσο κατά τον σχεδιασμό του πειράματος, όσο και κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα εμφανίζουν παροδική έκφραση και συγχρόνως παράγονται σε συγκεκριμένους ιστούς και κύτταρα. Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσεκτική επιλογή των χρονικών στιγμών (time-points) και κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του συνολικού RNA (Kumar et al. 2017). Ακόμα, λόγω της πιθανότητας ύπαρξης μη κωδικοποιητικών μορίων lncRNA, τα οποία μεταγράφονται από το μη κωδικοποιητικό κλώνο ενός γονιδίου (antisense lncRNAs), προτείνεται η χρήση της μεθόδου αλληλούχησης (stranded RNASeq) όπου κάθε μετάγραφο αλληλουχείται κατάλληλα ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της μεταγραφής του (Levin et al. 2010).

Αρκετές υποθέσεις έχουν προταθεί για την προέλευση των γονιδίων lncRNA. Γονίδια μη κωδικοποιητικών RNA εικάζεται ότι προκύπτουν από φαινόμενα αναδιπλασιασμού υπαρχόντων αλληλουχιών, μεταθετά στοιχεία ή μετά από μεταλλάξεις αρχικά κωδικοποιητικών αλληλουχιών οι οποίες εξελικτικά έχασαν την ικανότητα κωδικοποίησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών αποτελούν τα ψευδογονίδια, τα οποία μετά τον διπλασιασμό του πρωτογενούς γονιδίου συσσωρεύουν μεταλλάξεις οι οποίες τα καθιστούν πλέον ανίκανα να μεταγραφούν σε κωδικοποιητικό RNA. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η μεταφορά ρυθμιστικών στοιχείων της μεταγραφής πλησίον των μη μεταγραφόμενων αλληλουχιών, οδήγησε στην έναρξη της παραγωγής μη κωδικοποιητικών μορίων RNA από εν δυνάμει γονίδια lncRNA (Rao 2017; Marques and Ponting 2014; Ganesh and Svoboda 2016).

Τα μετάγραφα των γονιδίων αυτών παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των μορίων mRNA. Αναλυτικότερα όπως συμβαίνει και στα κωδικοποιητικά, τα γονίδια lncRNA μεταγράφονται από την πολυμεράση του RNA II, ενώ συνήθως η παρουσία παραγόντων μεταγραφής όπως το σύμπλοκο PIC (Pre-Initiation Complex) είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφής. Ακόμα, η πλειοψηφία των μορίων lncRNAs περιλαμβάνει 5' καλύπτρα (εκτός αυτών που προκύπτουν από ιντρόνια γονιδίων ή ανήκουν στην κατηγορία των κυκλικών lncRNAs) και συχνά υπόκεινται σε μάτισμα, το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πολλαπλών ισομόρφων. Τα μόρια lncRNA με πολυαδενυλιωμένο 3' άκρο τείνουν να είναι πιο σταθερά από αυτά που είναι μερικώς ή καθόλου αδενυλιωμένα. Η συνήθως χαμηλή έκφραση αυτών των γονιδίων έχει συσχετιστεί με τα χαμηλά επίπεδα της μεθυλίωσης των ιστονών (H3K4me3) στονυποκινητή. Ακόμα, σε καρκινικά κύτταρα HeLa έχουν βρεθεί μη κωδικοποιητικά μετάγραφα lncRNA (τα οποία προέρχονταν από την κωδικοποιητική αλυσίδα του γονιδίου) τα οποία ήταν σταθερότερα από τα μόρια mRNAs (Enuka et al. 2016). Τα μόρια lncRNA εντοπίζονται είτε στο πυρήνα είτε στο κυτοσόλιο του κυττάρου. Ο κυτταρικός εντοπισμός αυτών των μορίων εξαρτάται από την παρουσία μοτίβων στην αλληλουχία τους, τις πιθανές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. στρες). Επιπρόσθετα, η δομή των lncRNAs καθορίζει τον κυτταρικό εντοπισμό, την αποικοδόμηση και την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Κατά κανόνα στα μη κωδικοποιητικά μόρια lncRNA δεν παρατηρείται συντήρησή τους σε επίπεδο αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών οργανισμών. Εξάιρεση αποτελεί το lncRNA HOTAIR, μελέτη του οποίου σε 33 θηλαστικά αποκάλυψε παρόμοια λειτουργία μεταξύ των διαφορετικών ειδών, παρά τις διαφορές στην αλληλουχία του γονιδίου (Somarowthu et al. 2015). Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά αυτών των μη κωδικοποιητικών μεταγράφων είναι η υψηλή ειδικευση της χρονικής στιγμής και του τόπου έκφρασης των γονιδίων lncRNA. Το γεγονός αυτό ενδυναμώνει τις απόψεις που υποστηρίζουν ότι τα μόρια αυτά έχουν σημαντικό ρόλο σε βιολογικές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και η εμφάνιση παθολογιών (Rao 2017).

Feature	lncRNA	mRNA
Transcription		
	RNA polymerase II	RNA polymerase II
	RNA polymerase III (<i>B2-SINE</i> ; <i>NDM29</i> [101, 102])	
	RNA polymerases IV and V (plants, [103])	
Chromatin modifications		
H3K4me3	Low (eRNA, PROMPTs)	High
	High (others)	
H3K4me1	High (eRNA, PROMPTs)	Low
	Low (others)	
H3K27ac	High	Low
H3K36me	Moderate/high	High
H3K79me2	Enriched (bidirectional lncRNAs)	Low
H3K27me3	Present at bivalent and repressed promoters	Present at bivalent and repressed promoters
5'-Cap	Present (7-methylguanosine, m7G)	Present (m7G)
Poly(A) tail	Present or not	Present
	Bimorphic	
Length	200—>100 kb (10 kb mean)	5 kb mean
Exon-intron composition	Yes	Yes
	Exons are longer	
Splicing	Yes or less efficient	Yes
	No (macro lncRNA, vlincRNAs)	
RNA stability	Variable, globally lower than mRNA	Variable
	Highly unstable (eRNA, XUTs, CUTs, PROMPTs)	
Evolutionary conservation	High (lincRNAs)	High
	Low or not conserved (others)	
Protein-coding potential	Non or very low (sORFs)	Yes
Structure	Versatile, multi-modular	Kozak hairpin at the 5' end
Subcellular localization	Nucleus	Cytosol
	Cytosol	
	Mitochondria	
Expression specificity	high, including interindividual variability of expression	low to high
Transcript abundance	Very low or low	Moderate to high
	High (for few)	

Πίνακας 1.6.1. Σύγκριση ιδιοτήτων των κωδικοποιητικών μεταγραφικών μορίων (mRNA) και των μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (lncRNA). (Rao 2017)

Αναφορικά με τον λειτουργικό τους ρόλο, τα μόρια lncRNA μπορούν να δράσουν σε πολλαπλά επίπεδα, όπως σε επίπεδο γονιδίων ελέγχοντας την λειτουργία τους, σε επίπεδο χρωμοσώματος ή χρωμοσωμάτων δρώντας ως *cis* ή *trans* ρυθμιστικοί παράγοντες, στην οργάνωση και τον μεταβολισμό του κυττάρου, καθώς και στην ανάπτυξη του οργανισμού. Ακόμα, η συμβολή των γονιδίων αυτών είναι σημαντική στην ειδογένεση καθώς πολύ συχνά συμβαίνουν μεταλλάξεις στις αλληλουχίες των γονιδίων lncRNA (Lakhotia 2017).

Όσον αφορά τη λειτουργία των μη κωδικοποιητικών μορίων lncRNA, τα ίδια μπορούν να επηρεάσουν την οργάνωση και τη δομή της χρωματίνης (όπως η δομή του κεντρομερούς στο χρωμόσωμα) και την έκφραση των γονιδίων αλληλοεπιδρώντας είτε με τα σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης, είτε με τα σύμπλοκα τροποποίησης των ιστονών. Ένας ακόμη τρόπος με τον οποίο τα μόρια αυτά προκαλούν την

ενίσχυση της μεταγραφής γονιδίων είναι μέσω της υποβοήθησης της δημιουργίας θηλιάς για την μείωση της απόστασης του υποκινητή από την αλληλουχία του ενισχυτή (Ørom U et al. 2010). Ακόμα, τα μόρια lncRNA έχουν την ικανότητα να βοηθούν στην συγκρότηση πρωτεϊνικών παραγόντων για την δημιουργία συμπλόκων με στόχο την ενίσχυση ή καταστολή της μεταγραφής (Spitale et al. 2011). Άλλη μία λειτουργία των μορίων lncRNA, είναι ο καθορισμός της σταθερότητας των μεταγράφων, του χρόνου ημιζωής τους και της ικανότητας τους να μεταγραφούν, αλληλοεπιδρώντας είτε άμεσα με τα μόρια mRNA, είτε έμμεσα με την σύνδεσή τους με ρυθμιστικά μόρια/πρωτεΐνες των κωδικοποιητικών μεταγράφων. Επιπρόσθετα, τα μόρια lncRNA φαίνεται να εμπλέκονται στην αποθήκευση πρωτεϊνών, ομάδων αυτών ακόμα και μικρών μορίων RNA (miRNA) στο κύτταρο καθώς και στον καθορισμό της αρχιτεκτονικής και της οργάνωσης στα κυτταρικά διαμερίσματα ενώ παράλληλα μπορούν να λειτουργήσουν ως σηματοδότες κυτταρικού στρες (Jacob et al. 2013; Lakhotia 2017; Rao 2017).

Συνοψίζοντας, αναφορικά με τη πυρηνική λειτουργία τους, τα μη κωδικοποιητικά lncRNA μπορούν να καταταχθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τα μόρια lncRNA που επηρεάζουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης, η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα μόρια που συμβάλλουν στις επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης και στην τρίτη και τελευταία κατηγορία ανήκουν εκείνα τα μη κωδικοποιητικά lncRNA που καθορίζουν το επίπεδο των κωδικοποιητικών μεταγράφων, σταθερότητα μεταγράφων ή/και ικανότητα μεταγραφής (Hirose and Nakagawa 2016).

Πέρα από τη κατηγοριοποίηση των μη κωδικοποιητικών lncRNAs με βάση την λειτουργία τους, τα μόρια αυτά μπορούν να κατανεμηθούν σε ομάδες σύμφωνα με το μήκος της αλληλουχίας, την θέση τους σε σχέση με μία κωδικοποιητική περιοχή ή ρυθμιστικές αλληλουχίες, την υποκυτάρια θέση ή προέλευση, την βιολογική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν κ.α. Για παράδειγμα, με βάση το μήκος του μεταγράφου, εάν αυτό ξεπερνά τις 10kb τότε τα μόρια αυτά κατατάσσονται στις κατηγορίες vlincRNAs και macroRNAs, ενώ εάν το μήκος τους είναι μεγαλύτερο των 200 bp, αλλά μικρότερο των 10kb τότε ανήκουν στην κατηγορία των long και large ncRNAs. Η πλειοψηφία των γονιδίων vlincRNAs βρίσκεται κοντά σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες, ενώ τα γονίδια των macroRNAs μεταγράφονται συνήθως από τον αντινοσηματικό κλώνο κωδικοποιητικών αλληλουχιών. Ακόμα, μία σημαντική κατηγορία lncRNA είναι αυτή που κατανέμει τα μόρια σύμφωνα με την θέση τους σε σχέση με μία κωδικοποιητική περιοχή. Η κατηγορία αυτή χωρίζεται σε δύο ομάδες, αυτά που μεταγράφονται από περιοχές ενδιάμεσα γονιδίων (intergenic) και αυτά των οποίων οι αλληλουχίες τους αλληλοκαλύπτονται με αυτές κωδικοποιητικών γονιδίων (intragenic). Ακολούθως, η ομάδα των intragenic lncRNAs χωρίζεται σε τέσσερις υποομάδες ανάλογα με τη θέση τους πάνω στην αλληλουχία του γονιδίου. Η πρώτη υποομάδα αποτελείται από τα μόρια που μεταγράφονται από τον αντινοσηματικό κλώνο του γονιδίου (antisense), ενώ στη δεύτερη υποομάδα ανήκουν τα μόρια που μεταγράφονται και από τους δύο κλώνους (bidirectional). Τα μόρια που παράγονται από την μεταγραφή των ιντρονικών αλληλουχιών συμπεριλαμβάνονται στην τρίτη υποομάδα (intronic), ενώ τα μόρια των οποίων η αλληλουχία επικαλύπτεται από αυτή του νοσηματικού κλώνου του γονιδίου κατατάσσονται στην τέταρτη υποομάδα (overlapping sense lncRNAs). Τέλος, σε πολλές περιπτώσεις τα μόρια lncRNAs παράγονται από ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδιώματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών αποτελούν τα μόρια μη κωδικοποιητικών lncRNA που μεταγράφονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των τελομερών ή του κεντρομερούς, από το νοσηματικό ή τον μη νοσηματικό κλώνο ενός ενισχυτή ή ακόμα και την 3' μη κωδικοποιητική περιοχή γονιδίων (Rao 2017).

1.7. Long noncoding RNAs - Παραδείγματα στα έντομα

Όσο περισσότερες έρευνες αφιερώνονταν σε μελέτες των μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, τόσο η άποψη ότι αποτελούν άχρηστα στοιχεία του γονιδιώματος κατέρρευε. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι τα μη κωδικοποιητικά μόρια lncRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της ποικιλομορφίας και της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, δρώντας κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο. Ωστόσο, η σημαντικότητα άλλων μη κωδικοποιητικών μορίων (όπως tRNA, rRNA) είχε βρεθεί εδώ και αρκετά χρόνια, ενώ πολλοί μηχανισμοί δράσης των μη κωδικοποιητικών μορίων RNA παραμένει

ανεξερεύνητη. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ιδιότητα των μορίων αυτών να μεταγράφονται σε συγκεκριμένα τοπικά και χρονικά μοτίβα (Satyavathi et al. 2017; Kumar et al. 2017).

Το πρώτο μη κωδικοποιητικό γονίδιο lncRNA που ταυτοποιήθηκε σε ευκαρυωτικό οργανισμό ήταν το γονίδιο H19 (Pachnis et al. 1984; Bartolomei et al. 1991). Το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο έβδομο χρωμόσωμα του ποντικού και εμφανίζει υψηλή συντήρηση της αλληλουχίας του μεταξύ των θηλαστικών. Το προϊόν του γονιδίου αυτού παρουσιάζει αρκετά κοινά στοιχεία με αυτά των mRNA (μεταγράφεται από την πολυμεράση του RNA II, υπόκειται σε μάτισμα και έχει πολυαδενυλιωμένο 3' άκρο), όμως παράγει μη κωδικοποιητικό προϊόν (Brannan et al. 1990). Πειράματα σε διαγονιδιακούς ποντικούς με το γονίδιο H19 απέδειξε ότι το προϊόν του γονιδίου αυτού παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση (Bartolomei et al. 1991). Μετά από εκτενείς έρευνες, βρέθηκε ότι τόσο τα μόρια lncRNA του γονιδίου H19 όσο και αυτά του γονιδίου Xist εμπλέκονται στην απενεργοποίηση του ενός από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα των θηλαστικών (Gendrel and Heard 2014).

Transcript	Function/s
iab-2 through iab-8 in the <i>Ubx</i> -complex	Infra-abdominal domain (between <i>AbdA</i> and <i>AbdB</i> in the <i>Ubx</i> complex) specific expression in early embryos
<i>bxd</i> in the <i>Ubx</i> -complex	Regulation of transcription of <i>Ultrabithorax</i>
<i>lincX</i> (overlapping the cis-regulatory elements of <i>Scr</i>)	Activation of <i>Scr</i>
Reverse and forward ncRNAs from <i>vg</i> promoter	PRC2 activity modulation
<i>sxl</i> promoter transcripts	Regulation of <i>sxl_{PE}</i> and <i>sxl_{PC}</i> promoters of the <i>sxl</i> gene
<i>rga</i> (SIS RNA from <i>ragena</i>)	Regulation of <i>ragena</i> gene transcripts
7SK	Regulation of RNA polIII activity via P-TEFb
CRG (3'UTR overlapping lncRNA from <i>CASK</i> gene)	Regulation of RNA polIII binding at <i>CASK</i> gene

Πίνακας 1.7.1. Παραδείγματα χαρακτηρισμένων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων RNA (lncRNA) στο οργανισμό *Drosophila melanogaster*. (Rao 2017)

Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, στη *Drosophila melanogaster* δεν πραγματοποιείται απενεργοποίηση του ενός από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά άτομα, αλλά αυξημένη ενεργοποίηση του ενός χρωμοσώματος X στα αρσενικά άτομα. Αυτό επιτυγχάνεται με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης του ενός χρωμοσώματος X έτσι ώστε τα γονίδια του χρωμοσώματος αυτού να μεταγράφονται σχεδόν σε διπλάσια ποσότητα στα αρσενικά άτομα σε σχέση με τα θηλυκά (Mukherjee and Beermann 1965; Lakhotia and Mukherjee 1969). Σε αυτό τον μηχανισμό συμμετέχουν δύο μη κωδικοποιητικά μόρια lncRNA, roX1 και roX2, τα οποία μαζί με άλλες πέντε πρωτεΐνες αποτελούν μέρος του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης DCC (Dosage Compensation Complex) (Marchese and Huarte 2014; Lucchesi et al. 2005; Lucchesi 1998; Gelbart and Kuroda 2009; Georgiev et al. 2011; Koya and Meller 2011; Horabin 2012; Ferrari et al. 2014; Keller and Akhtar 2015; Lucchesi and Kuroda 2015). Όπως και στα θηλαστικά έτσι και στα έντομα, η βελτίωση των μεθόδων αλληλούχησης και βιοπληροφορικής ανάλυσης τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην ταυτοποίηση χιλιάδων γονιδίων lncRNA. Τα περισσότερα από αυτά έχουν βρεθεί στη *Drosophila melanogaster*, καθώς αποτελεί οργανισμό μοντέλο. Ένα ακόμα παράδειγμα μη κωδικοποιητικού γονιδίου lncRNA στη *Drosophila melanogaster* αποτελεί το γονίδιο *crg* (Cask Regulatory RNA Gene). Αναλυτικότερα, τμήμα του γονιδίου *crg* αλληλοκαλύπτεται με την 3' μη κωδικοποιητική περιοχή (UTR) της εξαρτώμενης από καλμοδουλίνη πρωτεϊνικής κινάσης (CASK), εμφανίζεται να διατηρείται στο γένος *Drosophila* και εμπλέκεται στην ικανότητα αναρρίχησης του εντόμου. Μελέτες σε μεταλλαγμένα έντομα για το γονίδιο CRG παρουσίασαν μειωμένη έκφραση του γονιδίου CASK. Αποδείχθηκε ότι τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα lncRNA του CRG είναι υπεύθυνα για την στρατολόγηση της πολυμεράσης του RNA II στον υποκινητή του γονιδίου της κινάσης CASK, το οποίο εξηγεί την προηγούμενη παρατήρηση (Li et al. 2012).

Acal	Trans-acting regulator of JNK signaling
roX1 and roX2	“Paint” the single X chromosome in male somatic cells to organize its chromatin for hyperactivity required for dosage compensation; also involved in differential regulation of genes in heterochromatic regions in males and females
AAGAG repeat RNA	Nuclear matrix constituent
Yar - intergenic RNA from <i>yellow-achaete</i> region	Regulation of sleep behavior
Y chromosome transcripts	“Giant” transcripts from Y-chromosome loops in primary spermatocytes required presumably for spermiogenesis
hsr ω transcripts	Developmentally expressed and stress induced multiple nuclear and cytoplasmic transcripts from the <i>hsrω</i> or <i>93D</i> gene; the large nuclear transcripts, together with diverse heterogeneous nuclear RNA binding proteins (hnRNPs) and some other proteins, organize the nucleoplasmic omega speckles and modulate a variety of cell regulatory networks
Yar, hsr ω -RA, oskar, CR43432	Dual function coding/noncoding RNAs
circMblRNA, Laccase2 circRNA	Possible sponges/decoys for miRNAs and transcription factors

Πίνακας 1.7.2. Παραδείγματα χαρακτηρισμένων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων RNA (lncRNA) στο οργανισμό *Drosophila melanogaster*. (ΣΥΝΕΧΕΙΑ) (Rao 2017)

Εκτός από τον οργανισμό μοντέλο *Drosophila melanogaster*, σημαντικά βήματα έχουν πραγματοποιηθεί για την ταυτοποίηση μη κωδικοποιητικών γονιδίων και σε άλλα είδη εντόμων. Για παράδειγμα, σε άρθρο που δημοσιεύτηκε το έτος 2017, οι συγγραφείς ισχυρίζονται ότι έχουν ταυτοποιήσει ένα μη κωδικοποιητικό μόριο lncRNA (lncRNA4) στο *Bombyx mori*, το οποίο παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με τον υποδοχέα Toll4. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, υποθέτουν ότι το μη κωδικοποιητικό μόριο lncRNA (lncRNA4) πιθανόν να δρα ως σημείο αποθήκευσης ή να απομακρύνει τα μονομερή του υποδοχέα Toll4 από την μεμβράνη, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την ανοσολογική απόκριση του κυττάρου (Satyavathi et al. 2017). Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης γονιδίων lncRNA σε κυτταρικές σειρές του *Aedes aegypti*, σε έντομα που είχαν μολυνθεί με τον ιό DENV-2 και σε μη μολυσμένα έντομα. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων, οι ερευνητές εντόπισαν ένα μη κωδικοποιητικό μετάγραφο (lincRNA_1317) το οποίο εμφανίζει υψηλότερη έκφραση σε έντομα που έχουν μολυνθεί είτε με τον ιό DENV-2 είτε με το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο του γένους *Wolbachia* σε σχέση με κουνούπια τα οποία δεν έχουν μολυνθεί. Σε επόμενα πειράματα εντοπίστηκαν μοτίβα σύνδεσης με μόρια miRNA στην αλληλουχία του lincRNA_1317. Συνεπώς, οδηγήθηκαν στην υπόθεση ότι το μετάγραφο αυτό πιθανόν να εμπλέκεται στην απόκριση σε μικροβιακή μόλυνση, ίσως μέσω της αλληλεπίδρασης του μεταγράφου με μόρια miRNAs, τα οποία όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (1.6) παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του κυττάρου (Etebari et al. 2016).

Gene	Species	Function	Mode
Neural expression Ks-1	<i>A. mellifera</i>	Sawata et al. identified a 17knt transcript that is expressed restrictively in the mushroom body of Kenyon cells in the honeybee brain and which accumulates in the nucleus. The transcript exhibits seven putative ORFs longer than 67 amino acids without any conservation in a related species (<i>Apis cerana</i>) nor similarity with known proteins (Sawata et al. 2002)	Unknown
AncR-1	<i>A. mellifera</i>	AncR-1 is preferentially expressed in the brain, sexual tissues, and some secretory organs and accumulates in nuclei. It contains multiple alternate isoforms, which are derived from a 6.9 kbp genomic locus (Sawata et al. 2004)	Unknown
Kakusei	<i>A. mellifera</i>	The kakusei is a 7000 nt long noncoding RNA with multiple constitutive and inducible variants, the expression of which is transiently upregulated by neural activity. It is localized exclusively in neural nuclei in discrete nuclear compartments. This gene may play specific roles in RNA metabolism in the honeybee brains, irrespective of behavioral experience (Kiya et al. 2008b)	Unknown
Laccov1/laccov2	<i>A. mellifera</i>	These two transcripts lack evidence of functional ORFs and are differentially expressed in queen and worker ovariole transcriptomes at the embryonic stage. Temporal expression shows that laccov1 might be involved in the autophagic cell death of ovarioles during worker embryogenesis, and fluorescent in situ hybridization (FISH) indicates perinuclear localization in omega speckle-like structures (Humann and Hartfelder 2011)	Unknown

Πίνακας 1.7.3. Παραδείγματα μη κωδικοποιητικών μεταγράφων RNA (lncRNA) στο οργανισμό *Apis mellifera*. (Kumar et al. 2017)

Καταλήγοντας, η ταυτοποίηση και αποσαφήνιση της λειτουργίας των μη κωδικοποιητικών γονιδίων lncRNA έχει αποδειχθεί δύσκολη διαδικασία. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις συχνές μεταλλάξεις και κατά συνέπεια στην έλλειψη της συντήρησης της νουλεοτιδικής αλληλουχίας των μη κωδικοποιητικών γονιδίων, αλλά και της δομής των μορίων lncRNAs μεταξύ των ειδών, ακόμα και αν η λειτουργία αυτών των μορίων είναι παρόμοια μεταξύ των οργανισμών (Kaputsa et al. 2014, Necsulea et al. 2014). Αντιθέτως, η ιδιότητα αυτή έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την ανάπτυξη εντομοκτόνων νέας γενιάς. Η ειδικότητα των εντομοκτόνων στόχευσης γονιδίων με χαμηλό ποσοστό συντήρησης μεταξύ των ειδών, όπως τα γονίδια μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, καθιστά τον έλεγχο των πληθυσμών εντόμων υγειονομικού και αγροτικού ενδιαφέροντος πιο ακριβή ως προς την στόχευση συγκεκριμένων επιβλαβών εντόμων, χωρίς τον κίνδυνο περιβαλλοντικής επιβάρυνσης και εξαφάνισης επωφελών εντόμων.

1.8. Σκοπός

Η τεχνολογία παρεμβαλλόμενου RNA είναι ένα χρήσιμο εργαλείο της μοριακής βιολογίας, το οποίο επιτρέπει την μελέτη λειτουργίας γονιδίων μέσω της σίγησής τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA που στοχεύουν γονίδια μη κωδικοποιητικών μεταγράφων RNA (lncRNAs) με δύο διαφορετικούς τρόπους, *in vivo* (με την χρήση βακτηρίων) και *in vitro* (με την χρήση του ενζύμου T7 πολυμεράση του RNA). Ακολουθεί η χορήγηση των μορίων αυτών μέσω της τροφής (per os) σε προνύμφες κουνουπιών του είδους *Aedes albopictus*, μελέτη του φαινοτύπου και των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου (lnc11). Η εργασία αυτή αποτελεί ένα έναυσμα για την ανάπτυξη νέων εντομοκτόνων που βασίζονται σε μεθόδους της μοριακής βιολογίας και αποτελούν πιο ασφαλή και φιλική για το περιβάλλον λύση στον περιορισμό του πληθυσμού των κουνουπιών τίγρη.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συνθήκες εκτροφής πληθυσμού *Aedes albopictus*

Ο πληθυσμός των κουνουπιών των οποίων το γενετικό υλικό χρησιμοποιήθηκε στις παρακάτω πειραματικές διαδικασίες προέρχεται από τοπικό στέλεχος *Aedes albopictus* της περιοχής του Βόλου και αποτελεί ευγενική παραχώρηση του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι συνθήκες εκτροφής στο εντομοτροφείο του εργαστηρίου μας όπου διατηρείται πλέον ο πληθυσμός κουνουπιών *Aedes albopictus* είναι οι εξής:

- Θερμοκρασία: 26°C
- Σχετική υγρασία: 60%
- Κύκλος φωτός (14 ώρες) : σκοταδιού (10 ώρες)

Για τη θρέψη των ενήλικων ατόμων χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σουκρόζης 10%, ενώ οι προνύμφες τρέφονται με θρυμματισμένη ξηρά γατοτροφή του εμπορίου. Όταν απαιτείται η παραγωγή νέων αυγών, πραγματοποιείται θρέψη των ενήλικων θηλυκών κουνουπιών με αίμα από ανθρώπινους δότες.

2.2. Μέθοδοι χειρισμού νουκλεϊκών οξέων

2.2.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια

➤ Διαλύματα

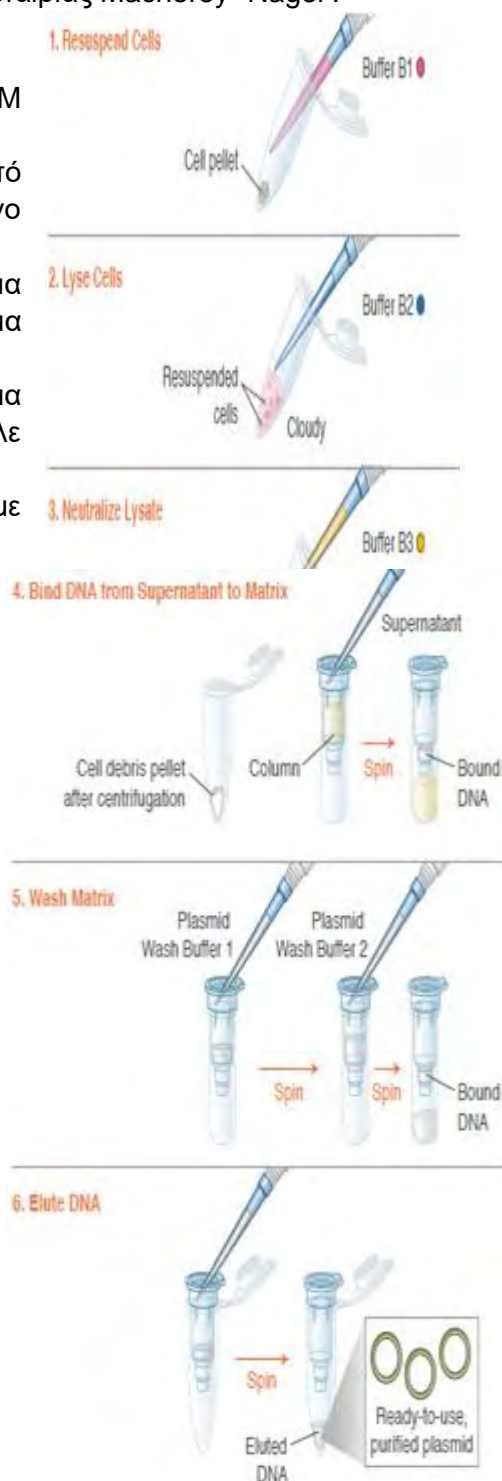
- Buffer A1 (διατηρείται στους 4 °C)
- Buffer A2
- Buffer A3
- Buffer AW (στο οποίο έχει προστεθεί 96 -100% αιθανόλη)
- Buffer A4 (στο οποίο έχει προστεθεί 96 -100% αιθανόλη)
- Elution Buffer

➤ Βήματα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα *E.coli* :

Πριν την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα πρέπει να έχει προηγηθεί η δημιουργία υγρής καλλιέργειας των βακτηριακών κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενοφθαλμισμό μίας μεμονωμένης αποικίας βακτηρίων σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml , ο οποίος περιέχει 4 ml υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth στο έχουν προστεθεί τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη και αμπικικιλίνη, στα οποία είναι ανθεκτικά τα βακτήρια αυτού του στελέχους *E.coli* (HT 115) που έχουν το πλασμίδιο L4440. Με την χρήση αντιβιοτικών περιορίζεται η πιθανότητα επιμόλυνσης της υγρής καλλιέργειας από άλλα στελέχη βακτηρίων. Ακολουθεί επώαση της υγρής καλλιέργειας στους 37°C, υπό ανακίνηση στα 210 RPM για 16-17ώρες.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα ακολουθούνται τα εξής βήματα του πρωτοκόλλου Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli* της εταιρίας Macherey- Nagel :

- i. Τα 4 ml υγρής καλλιέργειας φυγοκεντρώνται στα 4.000 RPM στους 25°C για 10 λεπτά.
- ii. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης έχει σχηματιστεί ίζημα από βακτηριακά κύτταρα. Προσεκτικά αφαιρείται το υπερκείμενο χωρίς να παρασυρθεί το ίζημα.
- iii. Ακολούθως προστίθενται 250 µl Buffer A1 , το ίζημα αναδιαλύεται με ανάδευση με τη συσκευή vortex. Το διάλυμα μεταφέρεται σε errendorf των 1,5 ml.
- iv. Προστίθενται 250 µl Buffer A2 , το διάλυμα ανακινείται ήπια με το χέρι μέχρι το διάλυμα να εμφανίζει ομοιογενές μπλε χρώμα και επωάζεται στο πάγκο έως και 5 λεπτά.
- v. Προστίθενται 300 µl Buffer A3, το διάλυμα ανακινείται ήπια με το χέρι μέχρι το διάλυμα να εμφανίζεται διαυγές.
- vi. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 11.000 RPM για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης στο σωλήνα errendorf των 1,5 ml έχουν σχηματιστεί δύο φάσεις, μία διαυγής φάση στο υπερκείμενο και λευκό ίζημα στο πάτο του σωλήνα. Εάν η διαυγής φάση δεν είναι αρκετά καθαρή τότε η φυγοκέντρηση μπορεί να επαναληφθεί στις ίδιες συνθήκες.
- vii. Μία στήλη απομόνωση DNA τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής των 2 ml , σε αυτή μεταφέρονται έως 700 µl της διαυγής φάσης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- viii. Το εκχύλισμα αφαιρείται.
- ix. Στη στήλη προστίθενται 500 µl AW, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- x. Το εκχύλισμα αφαιρείται.
- xi. Στη στήλη προστίθενται 600 µl Buffer A4 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- xii. Το εκχύλισμα αφαιρείται.
- xiii. Ακολουθεί φυγοκέντρηση με άδεια στήλη, δηλαδή δεν έχει προστεθεί κάποιο διάλυμα στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.
- xiv. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο errendorf των 1,5 ml και σε αυτή προστίθενται 20-30 µl Elution Buffer, που έχουν προηγουμένως θερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 70°C . Επώαση για 5 λεπτά στο πάγκο.
- xv. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 11.000 RPM για 5 λεπτά.



Εικόνα 2.2.1. Απομόνωση πλασμιδίου (New England Biolabs. Monarch® Plasmid Miniprep Kit)

Στο νέο errendorf 1,5 ml υπάρχει πλέον το καθαρό πλασμιδιακό DNA το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C και να χρησιμοποιηθεί σε επόμενες αντιδράσεις.

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης λειτουργεί ως μία μέθοδος διαχωρισμού, ποσοτικοποίησης, απομόνωσης και ταυτοποίησης τμημάτων DNA. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα μορίων DNA να διαχωρίζονται με βάση το φορτίο και το μέγεθος. Ακόμα, η ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση των δειγμάτων DNA επιτυγχάνεται με τη σύγκριση των ζωνών των δειγμάτων με αυτές του μάρτυρα (DNA Ladder) γνωστού μοριακού μεγέθους (bp) και συγκέντρωσης (ng/μl).

➤ Διαλύματα

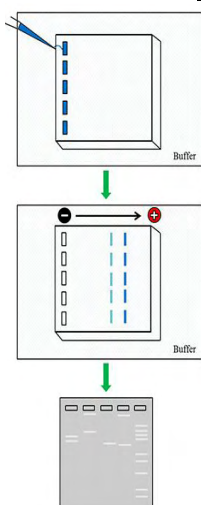
- Αγαρόζη (1% του όγκου του πηκτώματος)
- Διάλυμα TBE Buffer 5X
- Βρωμιούχο αιθίδιο (3% του όγκου του πηκτώματος)
- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων (Loading Buffer)
- Δείγματα DNA
- Μάρτυρας νουκλεοτιδικών βάσεων (DNA Ladder)

➤ Βήματα παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης 1%

Για την παρασκευή 100 ml πηκτώματος αγαρόζης 1% ακολουθούνται τα εξής βήματα :

- i. Ζυγίζεται και διαλύεται 0,1 g σκόνη αγαρόζης σε διάλυμα 100 ml TBE 0,5 X.
- ii. Το διάλυμα θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων , ανακινείται κάθε δύο λεπτά, μέχρι το διάλυμα να εμφανίζεται διαυγές (χωρίς την παρουσία ινών).
- iii. Το διάλυμα ψύχεται με κρύο τρεχούμενο νερό ώστε η θερμοκρασία του να μειωθεί στους 40°C - 50°C.
- iv. Αμέσως μετά προστίθεται 3 ml βρωμιούχου αιθιδίου και ανακινείται ώστε να αναμιχθεί στο διάλυμα αγαρόζης
- v. Σε στεγανοποιημένη βάση συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετείται το διάλυμα αγαρόζης, στην οποία έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί «χτενάκια» για την φόρτωση των δειγμάτων.
- vi. Το διάλυμα στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου σε διάστημα περίπου 30 λεπτών.
- vii. Αφού το διάλυμα έχει στερεοποιηθεί, αφαιρούνται τα «χτενάκια» και το πήκτωμα αγαρόζης είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί.

➤ Ηλεκτροφόρηση



Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- i. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται πλήρως από διάλυμα TBE 0,5 X.
- ii. Προστίθεται 1-2 μl Loading Buffer σε κάθε δείγμα DNA και αναδεύεται καλά με την χρήση πιπέτας. Το Loading Buffer περιέχει φικκόλη η οποία αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος και τις χρωστικές ενώσεις μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό της ξυλόλης που κάνουν το δείγμα ορατό στο γυμνό οφθαλμό.
- iii. Ποσότητα του δείγματος και ενός μάρτυρα (DNA Ladder) φορτώνεται στα πηγαδάκια του πηκτώματος με την χρήση πιπέτας.
- iv. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και στην συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται τάση (90V – 120V) για περίπου 30 λεπτά.
- v. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) όπου μπορούν να παρατηρηθούν οι ζώνες του DNA λόγω της παρουσίας βρωμιούχου αιθιδίου.

Εικόνα 2.2.2. Βήματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων DNA (Merck. Nucleic Acid Electrophoresis Protocols & Introduction. Sigma-Aldrich)

Τα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης μπορούν στην συνέχεια να απομονωθούν με τη χρήση του DNA extraction from agarose gels kit της εταιρίας Macherey- Nagel.

➤ Διαλύματα

- Buffer NT1
- Buffer NT3 (στο οποίο έχει προστεθεί 96-100% αιθανόλη)
- Elution Buffer

➤ Βήματα απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης



Gel slice

Incubation



Add Binding buffer



DNA Binding



Washing



Dry



Add Elution buffer



Purified fragment DNA

Για την επιτυχή απομόνωση δείγματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Από το πήκτωμα αγαρόζης κόβονται οι ζώνες που περιέχουν το επιθυμητό τμήμα DNA προς απομόνωση.
- Το κομμάτι του πηκτώματος ζυγίζεται στο εσωτερικό ενός erpendorf 1,5 ml (η ζυγαριά έχει μηδενιστεί προηγουμένως με ένα άδειο erpendorf 1,5 ml). Το βάρος του πηκτώματος βέλτιστα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,1 g.
- Για κάθε 0,1 g πηκτώματος αγαρόζης προστίθενται 200 μl διαλύματος NT1.
- Το erpendorf 1,5 ml επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 55°C για 15 – 20 λεπτά με ανάδευση σε συσκευή vortex κάθε 5 λεπτά.
- Σε ένα νέο σωλήνα συλλογής erpendorf 2 ml τοποθετείται μία στήλη απομόνωσης DNA και φορτώνονται σε αυτή έως 700 μl του διαλύματος πηκτώματος αγαρόζης – NT1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο σωλήνα συλλογής erpendorf 2 ml.
- Στην στήλη προστίθενται 700 μl NT3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο σωλήνα συλλογής erpendorf 2 ml.
- Τα βήματα vii και viii επαναλαμβάνονται.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται σε στεγνή στήλη, χωρίς να έχει προστεθεί κάποιο διάλυμα στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο erpendorf 1,5 ml.
- Προστίθενται 20 – 30 μl Elution Buffer, που έχουν προηγουμένως θερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 70°C, στο κέντρο της στήλης.
- Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Ακολουθεί η τελευταία φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.

Στο νέο erpendorf 1,5 ml υπάρχει πλέον το καθαρό DNA το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C και να χρησιμοποιηθεί σε επόμενες αντιδράσεις.

Εικόνα 2.2.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Bioneer Pacific-Print. Bioneer.com.au.)

2.2.4. Κατακρήμιση DNA

Ο καθαρισμός και η κατακρήμιση του DNA από ένα διάλυμα με την χρήση του πρωτοκόλλου εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο και κατακρήμιση με αιθανόλη, έχει ως αποτέλεσμα τον καθαρισμό του διαλύματος DNA από πρωτεΐνες, ολιγονουκλεοτίδια, άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα. Στην παρούσα εργασία, το παρακάτω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε με σκοπό την κατακρήμιση του φορέα με άκρα θυμίνης (T-vector), το οποίο αποτελεί το τελευταίο βήμα στην κατασκευή του φορέα με άκρα θυμίνης.

➤ Διαλύματα

- Πλασμιδιακό DNA
- Οξικό νάτριο CH_3COONa 0,3 M
- ddH_2O
- Διάλυμα φαινόλης: ισοαμυλικής αλκοόλης :χλωροφόρμιου (25:1:24)
- Παγωμένη αιθανόλη 70%
- Παγωμένη αιθανόλη 100%

➤ Βήματα εκχύλισης DNA με φαινόλη – χλωροφόρμιο και κατακρήμισης DNA με αιθανόλη

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της εκχύλισης και κατακρήμισης του DNA, η φυγόκεντρος πρέπει να έχει ψυχθεί στους 4°C .

Τα βήματα που ακολουθούνται για επιτυχή εκχύλιση του DNA είναι τα εξής:

- Σε ένα σωλήνα erpendorf των 1,5 ml προστίθενται τα εξής διαλύματα :
 - 50 μl πλασμιδιακού DNA
 - 15 μl οξικού νατρίου, αποτελεί 10% του τελικού όγκου του διαλύματος
 - 85 μl ddH_2O
- Στο πρώτο μίγμα διαλυμάτων προστίθεται ίσος όγκος (150 μl) διαλύματος φαινόλης: ισοαμυλικής αλκοόλης :χλωροφόρμιου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000 RPM στους 4°C για 10 λεπτά.
- Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, η υδάτινη φάση, που βρίσκεται στο υπερκείμενο, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf των 1,5 ml.



Τα βήματα που ακολουθούνται για επιτυχή κατακρήμιση του DNA με αιθανόλη είναι τα εξής:

- Σε ένα όγκο (1 vol) υδάτινης φάσης προστίθεται 2,5X όγκος (2,5 vol) 100% παγωμένη αιθανόλη. Το διάλυμα αναδεύεται επαρκώς με την χρήση πιπέτας.
- Το διάλυμα αιθανόλης επωάζεται στους -80°C για 1 ώρα.
- Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στους -80°C , το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 14.000 RPM στους 4°C για 45 λεπτά. Σε αυτό το σημείο σχηματίζεται ίζημα DNA σε μορφή ιζήματος (pellet).
- Η αιθανόλη αφαιρείται προσεκτικά χωρίς να αποκολληθεί το ίζημα DNA.
- Στο ίζημα προστίθενται 500 μl 70% παγωμένη αιθανόλη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000 RPM στους 4°C για 15 λεπτά.
- Η αιθανόλη αφαιρείται προσεκτικά. Το δείγμα μπορεί να φυγοκεντρηθεί για μερικά δευτερόλεπτα (spin down) ώστε να αφαιρεθεί αποτελεσματικότερα σταγονίδια αιθανόλης.

Εικόνα 2.2.5. Εκχύλισης DNA με φαινόλη – χλωροφόρμιο (PCR Clean-up Gel Extraction User Manual NucleoSpin® - Macherey-Nagel)

- viii. Ο σωλήνας erpendorf των 1,5 ml που περιέχει την πελέτα DNA τοποθετείται με ανοικτό το στόμιο σε υδατόλουτρο στους 65-70°C έως ότου να μην παρατηρούνται σταγόνες αιθανόλης στα τοιχώματα του σωλήνα.
- ix. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 30 μl ddH₂O.

2.2.5. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού (Επαλήθευση αποτελεσμάτων Colony PCR)

Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν δίκλωνες ρήξεις σε DNA αλληλουχίες. Λόγω αυτής της ιδιότητάς τους, συχνά πραγματοποιούνται "διαγνωστικές πέψεις", οι οποίες βοηθούν στην ταυτοποίηση-διαχωρισμό δειγμάτων DNA. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού κατηγορίας I, EcoRI-HF, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία της εικόνας 2.2.6. και πέπτει εσωτερικά αυτής (τα σημεία ρήξης απεικονίζονται με μαύρα βέλη). Το παρακάτω πρωτόκολλο, πραγματοποιήθηκε με στόχο την επαλήθευση των θετικών αποτελεσμάτων της αντίδρασης πολυμεράσης σε αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* HT115. Από την πέψη θα δημιουργηθούν διαφορετικού μεγέθους τμημάτων DNA στην περίπτωση μετασχηματισμένου ή μη πλασμιδίου.



Εικόνα 2.2.5. Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού EcoRI

- Διαλύματα
 - Πλασμιδιακό DNA
 - 10X CutSmart Buffer (NEB)
 - 20U/μl EcoRI-HF (NEB)
 - ddH₂O

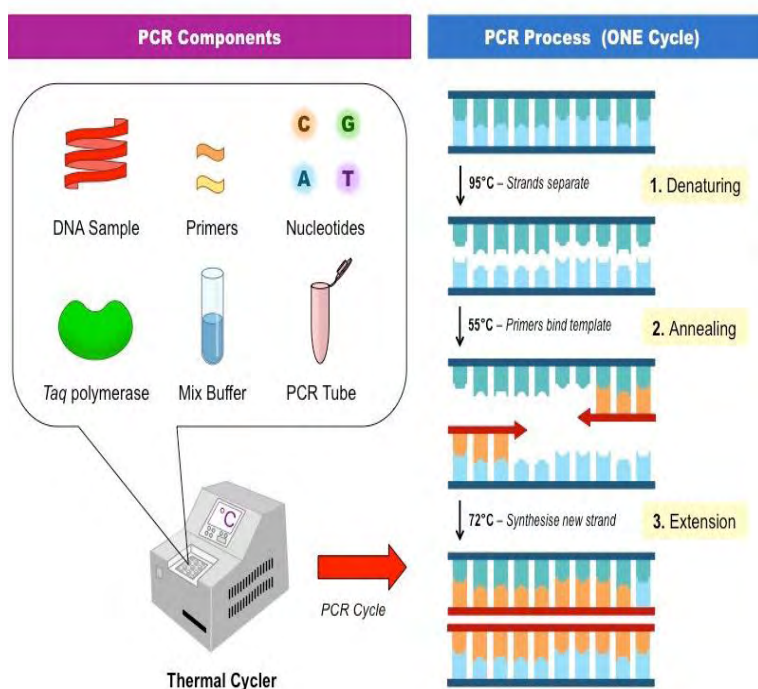
- Πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου L4440 με το ένζυμο περιορισμού EcoRI-HF:
 - i. Σε μία αντίδραση πέψης με περιοριστικό ένζυμο με τελικό όγκο 25μl προσθέτουμε τα εξής διαλύματα :
 - 2 μl πλασμιδιακό DNA, που προέρχεται από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα (το οποίο έχει προηγουμένως αναδευτεί με vortex)
 - 2,5 μl 10X CutSmart Buffer (NEB) (το οποίο έχει προηγουμένως αναδευτεί με vortex)
 - 0,5 μl 20U/μl EcoRI-HF (NEB)
 - 20μl ddH₂O (έως να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης, $V_{αντίδρασης} = 25 \mu\text{l}$)
 - ii. Το erpendorf των 1,5 ml επwάζεται στους 37°C για 1 ώρα.
 - iii. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με την επwαση του διαλύματος σε υδατόλουτρο στους 65°C για 20 λεπτά.
 - iv. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης για να διαπιστωθεί η επιτυχία της αντίδρασης

2.3. Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

2.3.1. PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χαρακτηρίζεται από εναλλαγές της θερμοκρασίας για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Η αντίδραση αποτελείται από έξι στάδια, από τα οποία τρία επαναλαμβάνονται για καθορισμένο αριθμό κύκλων (συνήθως 30-35 κύκλοι).

Αναλυτικότερα, η αντίδραση PCR αποτελείται από τα εξής βήματα (Εικόνα 2.1.1):



- i. Αποδιάταξη του DNA. Αρχικά το δείγμα θερμαίνεται στους 95 °C με σκοπό την αποδιάταξη του δίκλωνων μορίων DNA.
- ii. Υβριδισμός εκκινητών. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία μειώνεται με συνέπεια οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στην μήτρα DNA. Η τιμή της θερμοκρασίας υβριδοποίησης ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$) καθορίζεται από την αλληλουχία των ίδιων των εκκινητών (συνήθως στους 53°C - 60°C).
- iii. Πολυμερισμός των αλυσίδων DNA. Ακολούθως, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση επεκτείνει την αλληλουχία των εκκινητών συνθέτοντας νέους κλώνους δεοξυρροβονουκλεοτιδίων.

Εικόνα 2.3.1.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR | BioNinja. Bioninja.com.au.)

Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν την έναρξη των κύκλων αντιγραφής προηγείται θέρμανση του δείγματος στους 95 °C για μερικά λεπτά με αποτέλεσμα την αποδιάταξη του δείγματος DNA. Επιπλέον, μετά την ολοκλήρωση των κύκλων αντιγραφής ακολουθεί ένα τελευταίο βήμα επιμήκυνσης των νεοσυντηθέντων τμημάτων DNA, όπου δημιουργούνται τα άκρα αδενίνης. Τέλος, το δείγμα αποθηκεύεται στους 4°C.

➤ Σχεδιασμός εκκινητών PCR για την ενίσχυση του γονιδίου Inc11

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το τμήμα της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί ορίζεται επιλέγοντας ένα ζευγάρι εκκινητών με καθορισμένη αλληλουχία η οποία υβριδίζεται εκλεκτικά στο τμήμα DNA που θα ενισχυθεί. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου (Inc11) χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία της βάσης δεδομένων ncbi.

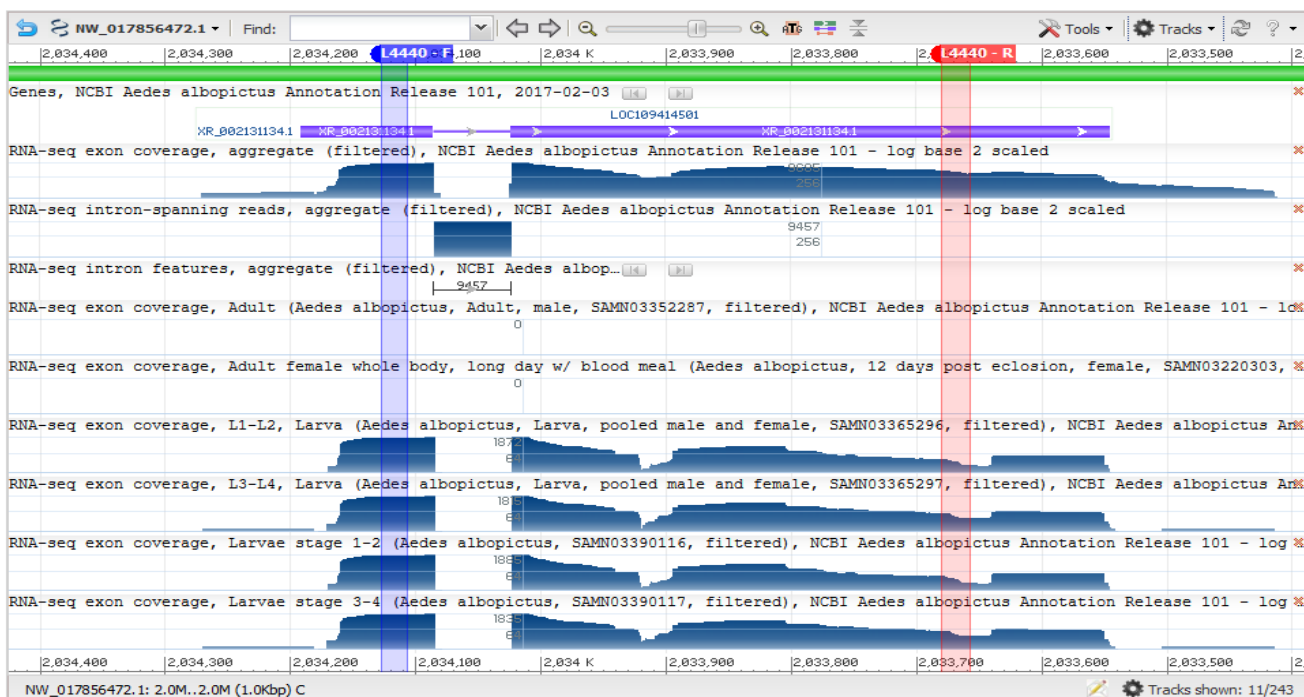
Αρχικά, απομονώνεται το τμήμα του γενετικού τόπου (Inc11), το οποίο θα ενισχυθεί από την πολυμεράση, μέσω της εισαγωγής του κωδικού του γονιδίου (XR_002131134.1) στην γραμμή αναζήτησης της βάσης δεδομένων ncbi. Στην συνέχεια, η αλληλουχία, εισάγεται στο εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών (primer designing tool) της ίδιας βάσης δεδομένων, όπου υπάρχει η δυνατότητα προσαρμογής διάφορων παραμέτρων όπως το μήκος του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί (300nt - 500nt), τη περιεκτικότητα των εκκινητών σε γουανίνη και κυτοσίνη (40% - 60% GC), τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (57°C - 63°C) κ.α. Αφού όλες οι παράμετροι έχουν καθοριστεί, στο εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών θα προτείνει ένα αριθμό ζευγών εκκινητών και αντίστοιχο τμήμα της αλληλουχίας που προκύπτει με την χρήση αυτών. Ακολούθως, επέρχεται ο έλεγχος των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών κάθε ζεύγους εκκινητών όπως η θερμοκρασία αποδιάταξη (συνήθως προτιμούνται εκκινητές με χαμηλή τιμή θερμοκρασίας, χαμηλότερη της

τιμή T_a της αντίδρασης) και η τιμή της ελεύθερης ενέργειας των δευτεροταγών δομών θηλίας, των ομοδιμερών και των ετεροδιμερών που σχηματίζουν κάθε ζεύγος εκκινητών (προτιμούνται εκκινητές με τιμή ελεύθερης ενέργειας υψηλότερη του -9kcal/mole , όπου η δομή θηλίας βρίσκεται μακριά από το 3' άκρο). Τέλος, εισάγοντας αυτή την φορά την αλληλουχία των εκκινητών στο εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών μπορεί να επιβεβαιωθεί ότι το συγκεκριμένο ζεύγος δεν θα υβριδοποιηθεί και σε κάποιο άλλο σημείο του γονιδιώματος του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται το δείγμα DNA (*Aedes albopictus*).

Στην περίπτωση του γονιδίου Inc11, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν σε περιοχές εξονίων του γενετικού τόπου, διότι η μήτρα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελείται από μόρια cDNA, που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση στα αναπτυξιακά στάδια instar 3–4 της προνύμφης του κουνουπιού τίγρης και όχι σε ενήλικα κουνούπια. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών της αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου (Inc11), χρησιμοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της αλληλουχίας, εκτός από ένα τμήμα περίπου 200nt στο 3' άκρο του μεταγράφου. Το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των εκκινητών της αντίδρασης Real-Time PCR, καθώς ήταν επιθυμητό να υπάρχει η μικρότερη δυνατή επικάλυψη των τμημάτων που ενισχύονται από τις δύο αυτές αντιδράσεις (βλέπε κεφάλαιο 2.3.3.). Τελικά, επιλέχθηκε το ζεύγος εκκινητών που παρήγαγε το μεγαλύτερο σε μήκος τμήμα DNA (407nt), και συγχρόνως πληρούσε τα παραπάνω κριτήρια (Εικόνα 2.3.1.2.).

Inc 11	
Transcript length	584 bp
L4440-amplicon/length	407 bp
L4440-amplicon/sequence	GCTTATGATATGTCTCTATCTAGTGTTAATCAACATGTTTCAAGCAGTGGACTATCTCTCAACCTTCGT TCTCCAGCCGTCATCGAAGAAGACTGTCACGAAAAAGCAAATGCGCAATGCAAATAATTCAGCCAGC ACACCATTGTTGCATCCGGAGCAAGGCGGTTCTGGTCATCCAATAAGCGGCCATAAATATCCGATTTA CGTTGTTCAACCTATACACAGCGTTCCAAATTTACCCCCACACTACGCTCATCAGTATTACCCCGGATG TCCACTGTGCCCAATAGATCCGCATTATTCGAGATATCCGGTATACCCAGCTATCCTGTGCATCCTGG ATATCAGCAACCAGATAGGTGGCACCTTGCAAACCCGAGGTGAATTGCAAGGGTATTTTAAAGTCTG TGAAACCAAAAGATCTTTTTAAATTGTTAGTGTTTAGTGATATCTGGTAGTGCTTGGCAGTTGAATAT AATTCACATTCGTTATTGAAAATGTTTCGTGTTCTATCATGTGCGAAAAGCAGATTTTCGTATTAGTTAGTA TATGATTTATTATAAAGAATTAAGTCTGGAGAACCT
L4440-Forward Primer	TCGTTCTCCAGCCGTCATC
L4440-Reverse Primer	CAACTGCCAAGCACTACCAGAT

Πίνακας 2.3.1.1. Εκκινητές αλυσιδωτής αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου Inc11



Εικόνα 2.3.1.2. Ζεύγος εκκινήτων για το γονίδιο Inc11. Με μπλέ χρώμα απεικονίζεται ο Forward εκκινήτης και με κόκκινο χρώμα ο Reverse εκκινήτης.

➤ Αντιδραστήρια

Για αντίδραση με τελικό όγκο 50 µl χρησιμοποιήθηκαν :

Υλικά	µl ανά αντίδραση	Συγκέντρωση
DNA μήτρα (cDNA L3-L4)	4	Άγνωστη
10 µM Forward εκκινήτης	2	0,4 µM
10 µM Reverse εκκινήτης	2	0,4 µM
10 mM dNTPS mix	1	0,2 mM (κάθε νουκλεοτίδιο)
5 U/µl KAPA Ταq Πολυμεράση	0,3	0,5 U
10 X KAPA Ταq ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	5	1 X
25 mM MgCl ₂	1	2 mM
ddH ₂ O	34,7	-

Πίνακας 2.3.1.2. Αντιδραστήρια PCR

➤ Στάδια θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη DNA	95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη DNA	95 °C	30 sec	35
Υβριδισμός εκκινητών	54 °C	30 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72 °C	25 sec	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	5 min	1
Αποθήκευση	4°C	∞	1

Πίνακας 2.3.1.3. Στάδια PCR

2.3.2. Colony PCR

Για την αντίδραση πολυμεράσης σε αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων *E.coli* HT115 χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές, αντιδραστήρια (βλέπε Πίνακα 2.1.1.) και παρόμοιες συνθήκες αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου (Inc11) από μήτρα cDNA. Ωστόσο στο παρόν πρωτόκολλο, χρησιμοποιούνται βακτηριακά κύτταρα και ως μήτρα το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, το οποίο έχει εισαχθεί στο βακτήριο. Το παρακάτω πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον εντοπισμό του βακτηριακού κλώνου που έχει μετασχηματιστεί με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο.

➤ Αντιδραστήρια

Για αντίδραση με τελικό όγκο 25 μl χρησιμοποιήθηκαν :

Υλικά	μl ανά αντίδραση	Συγκέντρωση
Βακτηριακή αποικία	-	-
10 μM Forward εκκινητής	1	0,4 μM
10 μM Reverse εκκινητής	1	0,4 μM
10 mM dNTPS mix	0,5	0,2 mM (κάθε νουκλεοτίδιο)
5 U/μl KAPA Taq Πολυμεράση	0,2	0,5 U
10 X KAPA Taq ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	2,5	1 X
25 mM MgCl ₂	0,5	2 mM
ddH ₂ O	19,3	-

Πίνακας 2.3.2.1. Αντιδραστήρια Colony PCR

Αφού έχει κατασκευαστεί το μείγμα των αντιδραστηρίων της αντίδρασης πολυμεράσης, με την χρήση μίας αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας, μικρή ποσότητα από κάθε αποικία αποσπάται από το τρυβλίο άγαρ, στο οποίο έχουν επιστρωθεί τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* HT115, και τοποθετείται στο σωλήνα της PCR

αντίδρασης. Πριν την τοποθέτηση της οδοντογλυφίδας στο διάλυμα της αντίδρασης, μικρή ποσότητα της αποικίας μεταφέρεται σε νέο τρυβλίο LB agar (copy plate), το οποίο στην συνέχεια επωάζεται στους 37°C για 16-17 ώρες.

➤ Στάδια θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη DNA	95 °C	4 min	1
Αποδιάταξη DNA	95 °C	30 sec	35
Υβριδισμός εκκινητών	54 °C	30 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72 °C	25 sec	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	2 min	1
Αποθήκευση	4°C	∞	1

Πίνακας 2.3.2.2. Στάδια Colony PCR

2.3.3. Real-Time PCR

Με στόχο την μελέτη έκφρασης του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού τίγρη πραγματοποιήθηκε αντίδραση Real-Time PCR (qPCR). Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε δείγμα cDNA από τα αναπτυξιακά στάδια : προνύμφη ημέρα 0-1, προνύμφη ημέρα 1-2, προνύμφη ημέρα 3-4, νύμφη και ενήλικο. Η αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο εκτελέστηκε για κάθε δείγμα σε δύο επαναλήψεις, για την αποφυγή τεχνικού σφάλματος. Το αρνητικό control δεν περιείχε δείγμα DNA ώστε να εντοπιστούν πιθανές επιμολύνσεις των δειγμάτων.

➤ Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου Inc11

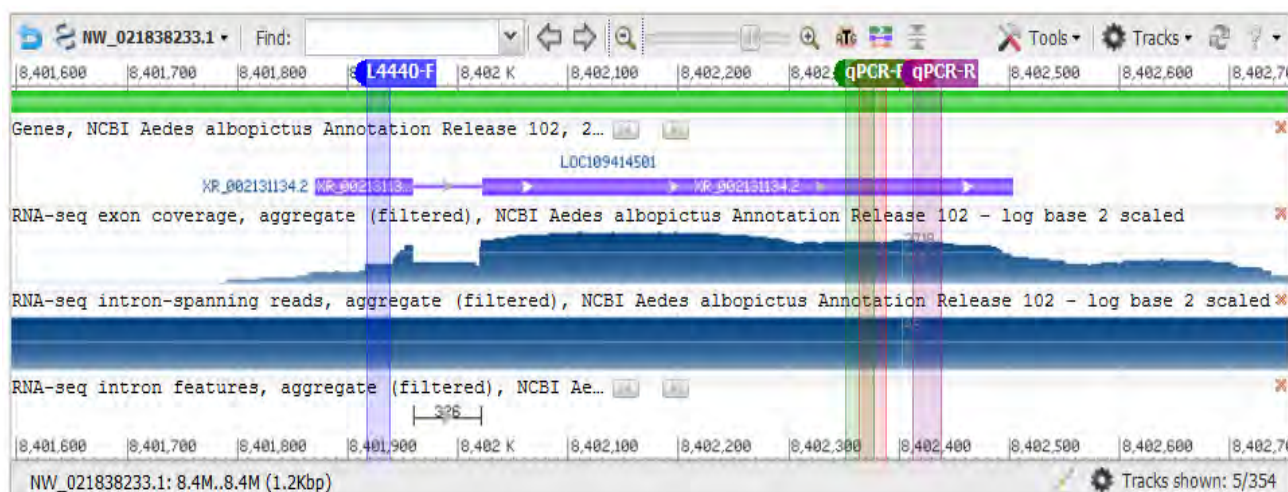
Κατά τον σχεδιασμό του ζεύγους εκκινητών για την αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, το τμήμα της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί στην παρούσα αντίδραση, πρέπει να ταυτίζεται όσο το δυνατόν λιγότερο με την αλληλουχία ενίσχυσης των προηγούμενων αντιδράσεων PCR (βλέπε πίνακα 2.3.1.1. και εικόνα 2.3.3.2.). Ο συγκεκριμένος σχεδιασμός εκκινητών επιτρέπει το διαχωρισμό των ενδογενών μορίων IncRNAs από τα εκείνα που έχουν παραχθεί εκτός του οργανισμού και εισάγονται σε αυτόν για την πρόκληση σίγησης των ενδογενών μορίων IncRNAs. Για το σχεδιασμό των εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου (Inc11) χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία της βάσης δεδομένων ncbi και IDT.

Αρχικά, απομονώθηκε η αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου (Inc11), από την θέση έναρξης του Reverse εκκινητή της αντίδρασης πολυμεράσης (πρωτόκολλο 2.3.1.) έως το τέλος του γονιδίου, χρησιμοποιώντας την γραμμή εργαλείων της βάσης δεδομένων ncbi. Στην συνέχεια, η αλληλουχία, τοποθετήθηκε στο εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών (PrimerQuest tool) της ιστοσελίδας IDT, όπου υπάρχει η δυνατότητα προσαρμογής διάφορων παραμέτρων της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR), όπως το μήκος του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί (50nt-150nt), τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (55°C - 60°C) κ.α. Εφόσον, καθορίστηκαν όλοι οι παράμετροι, στο εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών εμφανίστηκε ένας αριθμός ζευγών εκκινητών και αντίστοιχο τμήμα της αλληλουχίας που προκύπτει με την χρήση αυτών. Ακολούθως, επέρχεται ο έλεγχος των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών κάθε ζεύγους εκκινητών όπως η θερμοκρασία αποδιάταξη και η τιμή της ελεύθερης ενέργειας των δευτεροταγών δομών θηλιάς, των ομοδιμερών και των ετεροδιμερών που σχηματίζουν κάθε ζεύγος εκκινητών. Τέλος όπως και στην περίπτωση σχεδιασμού εκκινητών απλής PCR, ακολουθεί έλεγχος των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών κάθε ζεύγους εκκινητών όπως η θερμοκρασία αποδιάταξη και η τιμή της ελεύθερης ενέργειας των δευτεροταγών δομών θηλιάς, των ομοδιμερών και των ετεροδιμερών που σχηματίζουν κάθε ζεύγος εκκινητών, χρησιμοποιώντας το εργαλείο OligoAnalyzer της ιστοσελίδας IDT.

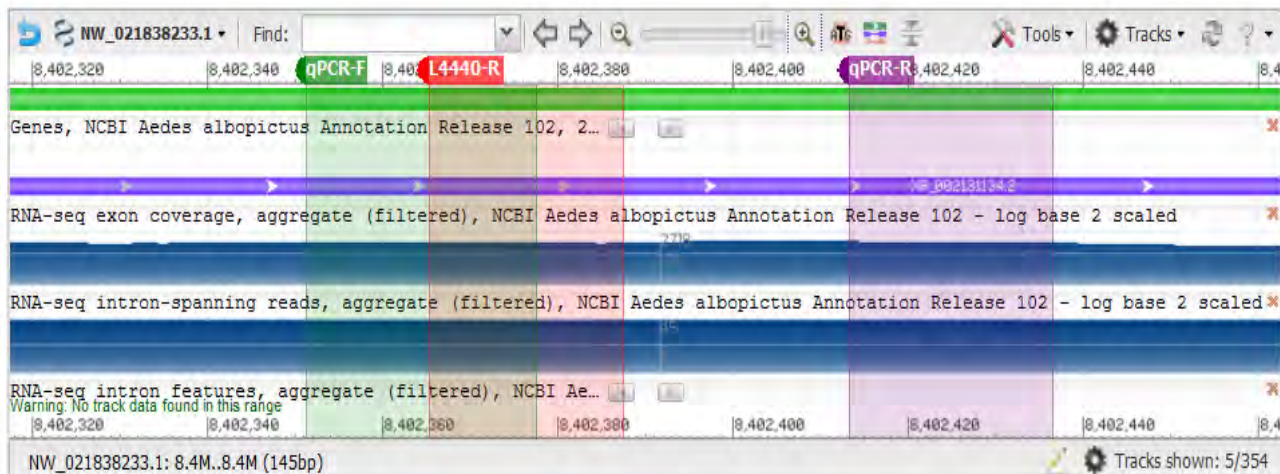
Στην περίπτωση αντίδρασης qPCR για το γονίδιο Inc11, επιλέχθηκε το ζεύγος εκκινητών που παρήγαγε το μεγαλύτερο σε μήκος τμήμα DNA (85nt) ενώ συγχρόνως είχε τα βέλτιστα δυνατά θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά (Πίνακας 2.3.3.1.).

Inc 11	
Transcript length	584 bp
qPCR-amplicon/length	85bp
qPCR-amplicon/sequence	TAGTGTTTAGTGATATCTGGTAGTGCTTGGCAGTTGAATATAATTACATTCGTTATT GAAAATGTCGTGTTCTATCATGTCGA
qPCR-Forward Primer	TAGTGTTTAGTGATATCTGGTAGTG
qPCR-Reverse Primer	TCGACATGATAGAACACGAACAT

Πίνακας 2.3.3.1. Αλληλουχία εκκινητών αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου Inc11



Εικόνα 2.3.3.1. Ζεύγη εκκινητών για το γονίδιο Inc11. Με μπλέ χρώμα απεικονίζεται ο Forward εκκινητής της αντίδρασης πολυμεράσης και με κόκκινο χρώμα ο Reverse εκκινητής της αντίδρασης πολυμεράσης, με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο Forward εκκινητής της αντίδρασης qPCR και με μωβ χρώμα ο Reverse της αντίδρασης qPCR.



Εικόνα 2.3.3.2. Μεγέθυνση της θέσης πρόσδεσης του ζεύγους εκκινήτων της αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR). Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται ο Reverse εκκινήτης της αντίδρασης πολυμεράσης, με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο Forward εκκινήτης της αντίδρασης qPCR και με μωβ χρώμα ο Reverse της αντίδρασης qPCR.

➤ Αντιδραστήρια

Για αντίδραση με τελικό όγκο 15 μl χρησιμοποιήθηκαν :

Υλικά	μl ανά αντίδραση	Συγκέντρωση
Template	4	-
10 μM qPCR Forward εκκινήτης	0,45	0,3 μM
10 μM qPCR Reverse εκκινήτης	0,45	0,3 μM
2X Supermix	7,5	1X
ddH ₂ O	2,6	-

Πίνακας 2.3.3.2. Αντιδραστήρια qPCR

Αφού έχει κατασκευαστεί το μείγμα των αντιδραστηρίων της αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, με την χρήση πιπέτας το μείγμα μοιράστηκε στα πηγαδάκια των αντιδράσεων και έπειτα προστέθηκε μικρή ποσότητα δείγματος από κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τόσο ο χώρος όσο και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στην παρούσα αντίδραση πρέπει να έχουν καθαριστεί προσεκτικά, ώστε να αποφευχθούν πιθανές μολύνσεις από το περιβάλλον.

	L 0-1	L 1-2	L 3-4	P	A	N.T.	-
C	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○

Εικόνα 2.3.3.3. Απεικόνιση των θέσεων κάθε δείγματος στα πηγαδάκια qPCR, L 0-1 : προνύμφη 0-1, L 1-2 : προνύμφη 1-2, L3-4 : προνύμφη 3-4, P : νύμφη, A : ενήλικο 1^{ης} ημέρας. N.T. : απουσία δείγματος DNA

➤ Στάδια θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη DNA	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη DNA	95°C	15 sec	39
Υβριδισμός εκκινητών	56°C	20 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72°C	15 sec	
Αποδιάταξη DNA	95°C	15 sec	1
Σταδιακή αποδιάταξη DNA	95°C - 56°C	0,5°C/5 sec	1

Πίνακας 2.3.3.3. Στάδια qPCR

2.3.4. PCR με την χρήση T7 εκκινητών

Το πρώτο βήμα στην σύνθεση δίκλωνου RNA in vitro, είναι η προσαρμογή του T7 υποκινητή ανοδικά της αλληλουχίας του γονιδίου (Inc11), που ενισχύθηκε σε προηγούμενη αντίδραση πολυμεράσης (κεφάλαιο 2.1.). Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πολυμεράσης με την χρήση εκκινητών που περιέχουν την αλληλουχία του φαγικού υποκινητή T7.

➤ Αντιδραστήρια

Για αντίδραση με τελικό όγκο 50 μl χρησιμοποιήθηκαν :

Υλικά	μl ανά αντίδραση	Συγκέντρωση
PCR amplicon*	1	1 ng/μl
10 μM T7 Forward εκκινητής	2	0,4 μM
10 μM T7 Reverse εκκινητής	2	0,4 μM
10 mM dNTPS mix	1	0,2 mM (κάθε νουκλεοτίδιο)
5 U/μl KAPA Taq Πολυμεράση	0,3	0,5 U
10 X KAPA Taq ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	5	1 X
25 mM MgCl ₂	1	2 mM
ddH ₂ O	37,7	-

Πίνακας 2.3.4.1. Αντιδραστήρια PCR με T7 εκκινητές

*ως μήτρα χρησιμοποιείται DNA της αντίδρασης πολυμεράσης του πρωτοκόλλου 2.3.1.

➤ Στάδια θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη DNA	95 °C	1 min	1
Αποδιάταξη DNA	95 °C	30 sec	10
Υβριδισμός εκκινητών	40 °C	30 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72 °C	27 sec	
Αποδιάταξη DNA	95 °C	30 sec	25
Υβριδισμός εκκινητών	54°C	30 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων DNA	72 °C	27 sec	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	30 sec	1
Αποθήκευση	4°C	∞	1

Πίνακας 2.3.4.2. Στάδια PCR με T7 εκκινητές

➤ Σχεδιασμός εκκινητών T7 για την ενίσχυση του γονιδίου Inc11

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών T7 χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο IDSeq της ιστοσελίδας E-RNAi. Οι εκκινητές αυτοί θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA (long dsRNA) στον οργανισμό *Aedes albopictus*, ο οποίος δεν υπάρχει ως προεπιλογή στο εργαλείο σχεδιασμού (No off-target database). Στην συνέχεια, εισήχθη η αλληλουχία του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11), η οποία είχε ενισχυθεί σε προηγούμενη αντίδραση πολυμεράσης (βλέπε κεφάλαιο 2.1.) σε μορφή FASTA.

Από τα πιθανά αποτελέσματα επιλέχθηκε αυτό το οποίο παράγει την μεγαλύτερη σε μήκος αλληλουχία DNA

E-RNAi
Design of RNAi constructs

Home IDSeq GBrowse Evaluation GenomeRNAi Help About

De-novo design by sequence or sequence identifier [Help]

1. Select type of RNAi reagent

2. Select organism
[Go back to select organism](#)

3. Enter target nucleotide sequences in raw or FASTA format (max. 50 sequences), in raw format newlines separate different queries

... or upload a file in FASTA format (*.fa, *.fasta and *.txt)
 Δεν επιλέχθηκε αρχείο.

[Help]

```
TCGTTCTCCAGCCGTCATCGAAGAAGACTGTCACGAAAAAGCAAATGCGCAA
TGCAAATAATTAGCCAGCACACCATTGTTGCATCCGGAGCAAGGCGGTTCT
GGTCATCCAATAAGCCGCCATAAATATCCGATTTACGGTTGTTCAACCTATAC
ACAGCGTTCCAAATTTACCCCCACACTACGTCATCAGTATTACCCCGGATG
TCCACTGTGCCCAATAGATCCGCATTATTGAGATATCCGGTATACCCGAGC
TATCCTGTGCATCCTGGATATCAGCAACCAGATAGGTGGCACCTTGCAAACC
CGAGGTGAATTGCAAGGGTTAATTTAAGTCTGTGAACCAGAAAGATCTTTTT
AAATTGTTAGTGTATTAGTATATCTGGTAGTGCTTGGCAGTTG
```

Εικόνα 2.3.4.1. Σχεδιασμός εκκινητών T7 για την ενίσχυση του γονιδίου Inc11

και συνεπώς και τα περισσότερα διαφορετικά μόρια siRNA. Τέλος, εξετάστηκαν τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά κάθε ζεύγους εκκινητών όπως η θερμοκρασία αποδιάταξης και η τιμή της ελεύθερης ενέργειας των δευτεροταγών δομών θηλιάς, των ομοδιμερών και των ετεροδιμερών που σχηματίζουν κάθε ζεύγος εκκινητών, με την χρήση του διαδικτυακού εργαλείου OligoAnalyzer της ιστοσελίδας IDT.

Inc 11	
Transcript length	584 bp
T7-amplicon/length	407 bp
T7-amplicon/sequence	TCGTTCTCCAGCCGTCATCGAAGAAGACTGTCACGAAAAAGCAAATGCGCAATGCAAATAATTTCAGC CAGCACACCATTGTTGCATCCGGAGCAAGGCGGTTCTGGTCATCCAATAAGCGGCCATAAAATATCCG ATTTACGTTGTTCAACCTATACACAGCGTTCCAAATTTACCCACACTACGCTCATCAGTATTACCCC GGATGTCCACTGTGCCAATAGATCCGCATTATTCGAGATATCCGGTATACCCAGCTATCCTGTGCA TCCTGGATATCAGCAACCAGATAGGTGGCACCTTGCAAACCCGAGGTGAATTGCAAGGGTTATTTTA AGTCTGTGAAACCAAAAGATCTTTTTAAATTGTTAGTGTTTAGTGATATCTGGTAGTGCTTGGCAGTT G
T7- Forward Primer	taatacgactcactatagggTCGTTCTCCAGCCGTCATC
T7- Reverse Primer	taatacgactcactatagggCAACTGCCAAGCACTACCAG

Πίνακας 2.3.4.3. T7-Εκκινητές αλυσιδωτής αντίδρασης για την ενίσχυση του γονιδίου Inc11

2.4. Μέθοδοι κλωνοποίησης DNA

2.4.1. Επεξεργασία πλασμιδιακού φορέα (T-vector)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του ενθέματος (Inc11) στο φορέα L4440 ήταν η μέθοδος "TA-Cloning", σύμφωνα με την οποία μία αλληλουχία ενθέματος, στην οποία έχουν προστεθεί άκρα αδενίνης μέσω της ιδιότητας του ενζύμου KAPA Taq πολυμεράσης, εισάγεται σε ένα φορέα με μονόκλινα άκρα θυμίνης, τα οποία έχουν προστεθεί χάρης του ίδιου ενζύμου (KAPA Taq πολυμεράσης), παρουσία νουκλεοτιδίων θυμίνης. Λόγω της συμπληρωματικότητας των δύο άκρων των δύο μορίων και με την βοήθεια του ενζύμου λιγάσης (T4 ligase), δημιουργείται νέος δεσμός μεταξύ των δύο μορίων, με αποτέλεσμα την κατασκευή του ανασυνδιασμένου πλασμιδίου.

2.4.1.1. Πέψη πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού (SmaI)

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο (2.2.6.), τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν δίκλωνες ρήξεις σε DNA αλληλουχίες. Αυτή η ιδιότητα, δεν χρησιμοποιείται μόνο για την ταυτοποίηση-διαχωρισμό δειγμάτων DNA, αλλά και για την κατασκευή φορέων. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού κατηγορίας I, SmaI, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία της εικόνας 2.4.1.1. και πέπτει εσωτερικά αυτής (τα σημεία ρήξης απεικονίζονται με μαύρα βέλη). Το παρακάτω πρωτόκολλο πέψης, πραγματοποιήθηκε με στόχο την κατασκευή τυφλών άκρων στο πλασμίδιο L4440, ώστε να προστεθούν σε αυτά το νουκλεοτίδιο θυμίνης (βλέπε πρωτόκολλο 4.1.1.3).



Εικόνα 2.4.1.1. Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού SmaI

➤ Διαλύματα

- Πλασμιδιακό DNA
- 10X CutSmart Buffer (NEB)
- 20 U/μl SmaI (NEB)
- ddH₂O

➤ Πέψη του πλασμιδίου L4440 με το ένζυμο περιορισμού SmaI :

- i. Σε ένα σωλήνα erppendorf των 1,5 ml προσθέτουμε τα εξής διαλύματα :
 - v. 2 µg πλασμιδικό DNA (το οποίο έχει προηγουμένως αναδευτεί με vortex)
 - vi. 5 µl 10X CutSmart Buffer (NEB) (το οποίο έχει προηγουμένως αναδευτεί με vortex)
 - vii. 1 µl 20 U/µl SmaI (NEB)
 - viii. ddH₂O έως να συμπληρωθεί ο όγκος της αντίδρασης ($V_{αντίδρασης} = 50 \mu\text{l}$)
- ii. Το erppendorf των 1,5 ml επωάζεται στους 25°C για 1 ώρα και 20 λεπτά.
 - iii. Ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου με την επώαση του διαλύματος σε υδατόλουτρο στους 65°C για 20 λεπτά.

2.4.1.2. Απομόνωση του γραμμικού πλασμιδίου – PCR clean up

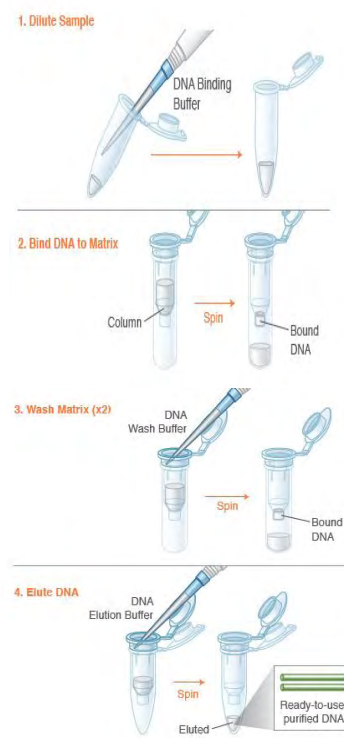
Ένα πρωτόκολλο που εφαρμόζεται για την γρήγορο καθαρισμό ενός διαλύματος DNA από ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα της προηγούμενης αντίδρασης, είναι το πρωτόκολλο PCR clean-up. Το πρωτόκολλο αυτό, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γραμμικού πλασμιδίου, μετά την επιτυχή πέψη του πλασμιδίου με περιοριστικό ένζυμο. Για τον καθαρισμό του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο PCR clean-up της εταιρίας Macherey- Nagel.

➤ Διαλύματα

- Buffer NT1
- Buffer NT3
- Elution Buffer

➤ Βήματα καθαρισμού δείγματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο PCR clean-up :

- i. Σε ένα σωλήνα erppendorf των 1,5 µl, για κάθε 50 µl αντίδρασης προστίθενται 100 µl διαλύματος NT1.
- ii. Το erppendorf 1,5 µl αναδύεται επαρκώς με την χρήση της συσκευής vortex.
- iii. Σε ένα νέο σωλήνα συλλογής erppendorf 2 µl τοποθετείται μία στήλη απομόνωσης DNA και φορτώνονται σε αυτή έως 700 µl του διαλύματος NT1.
- iv. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- v. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο σωλήνα συλλογής erppendorf 2 ml.
- vi. Στην στήλη προστίθενται 700 µl NT3 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 RPM για 1 λεπτό.
- vii. Το έκλουσμα απομακρύνεται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο σωλήνα συλλογής erppendorf 2 ml.
- viii. Τα βήματα vi και vii επαναλαμβάνονται.
- ix. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε στεγνή στήλη , χωρίς να έχει προστεθεί κάποιο διάλυμα στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.
- x. Η στήλη τοποθετείται σε νέο erppendorf 1,5 ml.
- xi. Προστίθενται 20 – 30 µl Elution Buffer, που έχουν προηγουμένως θερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 70°C, στο κέντρο της στήλης.
- xii. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.



Εικόνα 2.4.1.2. PCR clean up protocol (New England Biolabs. Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit)

xiii. Ακολουθεί η τελευταία φυγοκέντρωση στα 11.000 RPM για 2 λεπτά.

Στο νέο erpendorf 1,5 ml υπάρχει πλέον το καθαρό γραμμικό πλασμιδιακό DNA το οποίο μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C και να χρησιμοποιηθεί σε επόμενες αντιδράσεις.

2.4.1.3. Αντίδραση T άκρων στο γραμμικό πλασμίδιο L4440

Το παρακάτω πρωτόκολλο αντίδρασης T άκρων σε εφαρμόστηκε γραμμικό πλασμίδιο, όπου αξιοποιείται η ικανότητα του ενζύμου KAPA Taq πολυμεράσης, παρουσία νουκλεοτιδίων θυμίνης, να προσθέτει άκρα θυμίνης στα άκρα του γραμμικού DNA.

➤ Διαλύματα

- 2 mg γραμμικό πλασμιδιακό DNA (L4440)
- 100 mM δεοξυριβονουκλεοτίδια θυμίνης - dTTPs (Gene ON)
- 10X KAPA Taq Buffer
- 5 U/μl KAPA Taq Polymerase
- ddH₂O

➤ Αντίδραση προσθήκης άκρων θυμίνης σε γραμμικό πλασμίδιο

- i. Σε ένα σωλήνα erpendorf των 1,5 ml προστίθενται τα εξής διαλύματα :
 - 2 mg γραμμικό πλασμιδιακό DNA, το οποίο έχει αναδευτεί καλά με την χρήση της συσκευής vortex.
 - 2,5 μl dTTPs (Gene ON), το διάλυμα αναδεύεται με το χέρι ή με τη χρήση πιπέτας.
 - 5 μl KAPA Taq Buffer, το οποίο έχει αναδευτεί καλά με τη χρήση της συσκευής vortex.
 - 1 μl KAPA Taq Polymerase
 - Ο όγκος της αντίδρασης συμπληρώνεται με ddH₂O έως τα 50 μl.
- ii. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για 2-3 ώρες.

2.4.2. Αντίδραση σύνδεσης ενθέματος-φορέα

Όπως ειπώθηκε παραπάνω, η σύνδεση ενθέματος με άκρα αδενίνης και φορέα με άκρα θυμίνης προβλέπει την παρουσία του ενζύμου λιγάσης και της απαιτούμενης ενέργειας. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα του ενζύμου T4 λιγάσης και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

➤ Διαλύματα

- Δείγμα DNA
- Φορέας L4440 με άκρα θυμίνης (T-vector)
- 400 U/μl T4 λιγάση (NEB)
- 10X Buffer T4 ligase (NEB)
- ddH₂O

➤ Βήματα προετοιμασίας αντίδρασης σύνδεσης τμημάτων DNA με την χρήση T4 λιγάσης :

Η ποσότητα του φορέα και του ενθέματος DNA που θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση, υπολογίζεται με την βοήθεια του παρακάτω τύπου, οποίος συνυπολογίζει το μέγεθος του φορέα (2790 bp) , το μέγεθος του ενθέματος (407 bp) και την αναλογία ενθέματος : φορέα (7:1).

$$ng_{\text{ενθέματος}} = ng_{\text{φορέα}} * \frac{\text{μήκος ενθέματος}}{\text{μήκος φορέα}} * \text{Μοριακός Λόγος ενθέματος:φορέα}$$

Σύμφωνα με τον παραπάνω τύπο, στην αντίδραση T4 λιγάσης χρησιμοποιήθηκαν 25 ng φορέα και 25,53 ng ενθέματος με σκοπό ο μοριακός λόγος ενθέματος:φορέα της αντίδρασης να είναι 7:1.

- i. Σε ένα σωλήνα erppendorf των 1,5 ml προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια:
 - 2,1 μl δείγματος DNA, τα οποία έχει αναδευτεί με την χρήση της συσκευής vortex.
 - 2 μl πλασμιδιακός φορέας (T-vector), τα οποία έχει αναδευτεί με την χρήση της συσκευής vortex.
 - 1 μl T4 λιγάση (NEB)
 - 2 μl Buffer T4 ligase (NEB), τα οποία αναδεύονται με το χέρι ή με την χρήση πιπέτας.
 - 12,9 μl ddH₂O
- ii. Το διάλυμα επωάζεται στους 16°C για 16 ώρες.
- iii. Ακολουθεί θέρμανση του διαλύματος στους 65°C για 20 λεπτά , η οποία οδηγεί στην απενεργοποίηση του ένζυμου.

Το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C και να χρησιμοποιηθεί αργότερα για το μετασχηματισμό κυττάρων.

2.4.3. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων

2.4.3.1. Παρασκευή θρεπτικών υλικών

➤ Υλικά

- νερό (απιονισμένο)
- Ποσότητα σκόνης μείγματος LB Broth, 20g/L (Biolab)

Για την παρασκευή 300ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- i. ζυγίζονται 6g σκόνης LB Broth.
- ii. η ποσότητα σκόνης LB Broth αναμειγνύεται σε 300ml νερού.
- iii. το μείγμα αποστειρώνεται στους 121°C για τουλάχιστον 15 λεπτά.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της αποστείρωσης του διαλύματος και η θερμοκρασία του διαλύματος έχει πλέον κατεβεί θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται τα επιθυμητά αντιβιοτικά.

Στην περίπτωση παρασκευής 300ml υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth που περιέχει 10 μg/ml τετρακυκλίνης και 100 μg/ml αμπικιλλίνης προστίθενται:

- 600 μl τετρακυκλίνης
- 300 μl αμπικιλλίνης

Το υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί ή να αποθηκευτεί στους 4°C.

➤ Υλικά

- νερό (δεν περιέχει άλατα)
- Ποσότητα σκόνης μείγματος LB agar. 35g/L (Canvax Biotech)
- Άδεια τρυβλία

Τα βήματα παρασκευής 300ml στερεού θρεπτικού υλικού LB agar (10-15 τρυβλία περίπου) είναι τα εξής βήματα:

- ζυγίζονται 10,5 g σκόνης LB agar.
- η ποσότητα σκόνης LB agar αναμειγνύεται σε 300ml νερού.
- το μείγμα αποστειρώνεται στους 121°C για τουλάχιστον 15 λεπτά.

Με το πέρασ της ολοκλήρωσης της διαδικασίας αποστείρωσης του διαλύματος LB agar και η θερμοκρασία του διαλύματος έχει πλέον κατεβεί θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται τα επιθυμητά αντιβιοτικά.

Στην περίπτωση παρασκευής 300ml υγρού θρεπτικού υλικού LB agar που περιέχει 10 μg/ml τετρακυκλίνης και 100 μg/ml αμπικιλλίνης προστίθενται:

- 600 μl τετρακυκλίνης (5mg/ml)
- 300 μl αμπικιλλίνης (100mg/ml)

Ακολούθως το διάλυμα LB agar μοιράζεται σε άδεια τρυβλία υπό στείρες συνθήκες. Μόλις πήξει το άγαρ τα τρυβλία μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να αποθηκευτούν στους 4°C για μερικές εβδομάδες, αφού έχουν τυλιχθεί με προστατευτική μεμβράνη.

2.4.3.2. Δημιουργία κυττάρων *E.coli* HT115 για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση

Για τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων επιλέχθηκε το είδος *E.coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος HT115. Το στέλεχος αυτό επιλέχθηκε λόγω των ιδιοτήτων του, όπως την επαγόμενη από IPTG (ανάλογο λακτόζης) παραγωγή του ενζύμου T7 πολυμεράση του RNA και την έλειψη του ενζύμου RNA III. Οι παραπάνω δυνατότητες επιτρέπουν την ελεγχόμενη παραγωγή μορίων RNA και ταυτόχρονα αποτρέπουν τον κατακερματισμό τους από RNάσες.

➤ Υλικά

- Απιονισμένο νερό
- Γλυκερόλη 87%
- Θρεπτικό υλικό LB Broth με τετρακυκλίνη
- Τρυβλίο LB agar με τετρακυκλίνη
- Κύτταρα *E.coli* HT115 σε γλυκερόλη
- Σωλήνες falcon 50ml
- Σωλήνες erpendorf 1,5ml
- Κωνική φιάλη 500ml

Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου δημιουργίας κυττάρων *E.coli* HT115 για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση, απαιτείται η κατάλληλη προετοιμασία δύο ημέρες νωρίτερα. Αρχικά, δύο ημέρες πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου, κύτταρα *E.coli* HT115 πρέπει να έχουν επιστρωθεί σε τρυβλίο με LB agar, παρουσία τετρακυκλίνης. Μία ημέρα πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου, πρέπει να έχουν ολοκληρωθεί οι εξής διαδικασίες προετοιμασίας:

- i. Αποστείρωση 700ml νερού
- ii. Αποστείρωση κωνικής φιάλης των 500ml
- iii. Παρασκευή 320ml θρεπτικού υλικού LB Broth
- iv. Αποστείρωση 6 σωλήνων falcon των 50 ml
- v. Ψύξη 6 σωλήνων falcon των 50 ml
- vi. Ψύξη 50 σωλήνων erpendorf των 1,5ml
- vii. Παρασκευή και ψύξη διαλύματος 10% γλυκερόλης 30ml

Επιπλέον, μία ημέρα πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου, πραγματοποιείται ενοφθαλισμός υγρού θρεπτικού υλικού LB Broth (με τετρακυκλίνη) με μία από τις αποικίες των κυττάρων *E.coli* HT115 της στερεής καλλιέργειας που δημιουργήθηκε δύο ημέρες πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου.

Για την παρασκευή κυττάρων *E.coli* HT115 για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- i. Ενοφθαλισμός ποσότητας (περίπου 3ml) κυττάρων *E.coli* HT115 της υγρής καλλιέργειας, που κατασκευάστηκε την προηγούμενη ημέρα, σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth (300ml).
- ii. Επώαση της νέας υγρής καλλιέργειας στους 37°C υπό ανάδευση (210 RPM) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀ του εναιωρήματος να ανεβεί στην τιμή 0,4-0,6.
- iii. Μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε σωλήνες falcon των 50ml και επώαση τους στο πάγο για 10 λεπτά (αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων).
- iv. Φυγοκέντρηση της υγρής καλλιέργειας στις 4.000 RPM για 10 λεπτά στους 4°C (καταβύθιση των κυττάρων στο πάτο του σωλήνα).
- v. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού θρεπτικού υλικού.
- vi. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με κρύο ddH₂O (50ml ανά falcon).
- vii. Επανάληψη των βημάτων iv και v.
- viii. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
- ix. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με προψυγμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης (4ml ανά falcon).
- x. Φυγοκέντρηση των σωλήνων falcon στις 4.000 RPM για 10 λεπτά στους 4°C.
- xi. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
- xii. Ήπια επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με προψυγμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης (250μl ανά falcon).
- xiii. Διαίρεση του κυτταρικού εναιωρήματος σε κλάσματα των 50μl σε προψυγμένους σωλήνες erpendorf.
- xiv. Διατήρηση των κλασμάτων στους -80°C.

Τα κύτταρα *E.coli* HT115 είναι πλέον έτοιμα να χρησιμοποιηθούν σε μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση.

2.4.3. Μετασχηματισμός κυττάρων μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Μετά την κατασκευή δεκτικών κυττάρων *E.coli* HT115, τα κύτταρα είναι έτοιμα να μετασχηματιστούν μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, σύντομο ηλεκτρικός παλμός εφαρμόζεται σε μία μικρή ποσότητα κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών πόρων στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτοί οι πόροι θα λειτουργήσουν ως την δίοδο των ανασυνδυασμένων φορέων στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων. Για την επίτευξη του μετασχηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο.

➤ Διαλύματα

- 50 μl βακτηριακά κύτταρα
- 5 μl αντίδρασης λιγάσης
- 945 μl Θρεπτικό διάλυμα LB Broth (χωρίς αντιβιοτικά)

Τα δεκτικά κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα σε διάλυμα γλυκερόλης 20%, σε θερμοκρασία -80°C. Πριν το μετασχηματισμό τα κύτταρα που θα χρησιμοποιηθούν μεταφέρονται από τον χώρο αποθήκευσης σε δοχείο με πάγο, ενώ προηγουμένως έχει παρασκευαστεί θρεπτικό διάλυμα LB Broth, στο οποίο δεν έχουν προστεθεί αντιβιοτικά.

Για το μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* HT115 με την μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης ακολουθούνται τα εξής βήματα (εφόσον το διάλυμα των κυττάρων έχει ξεπαγώσει):

- i. 5 μl αντίδρασης λιγάσης προστίθενται στο σωλήνα erpendorf, που περιέχει τα βακτηριακά κύτταρα. Το διάλυμα αναδεύεται ήπια με το χέρι και επωάζεται ξανά στον πάγο για 5 λεπτά.
- ii. Τα 55 μl του προηγούμενου διαλύματος τοποθετούνται σε μία παγωμένη κυψελίδα.
- iii. Η προψηγμένη κυψελίδα τοποθετείται στο εσωτερικό της μηχανής ηλεκτροδιάτρησης και εφαρμόζεται παλμός σε αυτή.
- iv. Αμέσως μετά προστίθενται 945 μl θρεπτικό διάλυμα LB Broth (χωρίς αντιβιοτικά) και αναδεύεται ήπια με την χρήση πιπέτας.
- v. Το 1ml διαλύματος μετασχηματισμένων κυττάρων-θρεπτικό μεταφέρονται σε γυάλινο σωλήνα και επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C με ανάδευση 160-210 RPM.

Μετά τος πέρας της επώασης, ακολουθεί η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλίο LB agar.

➤ Υλικά

- τρυβλίο LB agar (περιέχει τετρακυκλίνη και αμπικιλίνη)
- 1ml διαλύματος μετασχηματισμένων κυττάρων-θρεπτικό
- αιθανόλη 70%

Πριν την επίστρωση της καλλιέργειας κυττάρων στα τρυβλία προηγείται η επώαση τους στους 37°C για περίπου 30 λεπτά. Τα βήματα της διαδικασίας αυτής είναι τα εξής:

- i. ποσότητα της υγρής καλλιέργειας (100 μl - 300 μl) μεταφέρονται σε τρυβλίο αγάρωσης (στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν βακτηριακά κύτταρα με ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και την αμπικιλίνη)
- ii. η γυάλινη βελόνα της επίστρωσης αποστειρώνεται με τον καθαρισμό της με αιθανόλη 70% και αμέσως μετά την θέρμανσή της σε φλόγιστρο.
- iii. Μετακινώντας την αποστειρωμένη βελόνα πάνω-κάτω στον οριζόντιο άξονα, η ποσότητα της υγρής καλλιέργειας απλώνεται ομοιόμορφα στο τρυβλίο άγαρ.
Το τρυβλίο επωάζεται τους 37°C για 16-17 ώρες

2.5. Μέθοδοι παραγωγής dsRNA

2.5.1. In vitro μεταγραφή dsRNA

Για την επίτευξη της παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA in vitro, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο μεταγραφής in vitro της εταιρίας MEGAscript.

➤ Αντιδραστήρια

Για αντίδραση με τελικό όγκο 21 μl χρησιμοποιήθηκαν :

Υλικά	μl ανά αντίδραση	Συγκέντρωση
T7 PCR amplicon	9	8,7 ng/μl
Enzyme Mix (SP6 and T7 RNA Polymerase)	2	-
10X Reaction Buffer	2	1X
ATP	2	75mM
CTP	2	75mM

GTP	2	75mM
UTP	2	75mM

Πίνακας 2.5.1. Αντιδραστήρια μεταγραφής in vitro

Μετά την πρόσθεση των απαραίτητων αντιδραστηρίων και την ήπια ανάδευσή τους με την χρήση πιπέτας, ακολουθεί επώαση του διαλύματος της αντίδρασης μεταγραφής in vitro στους 37°C για 16 ώρες. Τέλος με την ολοκλήρωση της επώασης των 16 ωρών, στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθεται 1 μl TURBO DNase για 15 λεπτά στους 37°C, με σκοπό τον τεμαχισμό των μορίων DNA.

2.5.2. Κατακρήμνιση dsRNA

Για την απομάκρυνση των ρυθμιστικών διαλυμάτων, των ενζύμων και αντιδραστηρίων από ένα διάλυμα και την απομόνωση του RNA εφαρμόζεται το παρακάτω πρωτόκολλο κατακρήμνισης dsRNA .

➤ Διαλύματα

- 2U/μl TURBO DNase της εταιρίας MEGAscript
- 1M NH₄Ac
- ddH₂O
- Διάλυμα φαινόλης: ισοαμυλικής αλκοόλης :χλωροφόρμιου (25:1:24)
- Παγωμένη αιθανόλη 70%
- Παγωμένη αιθανόλη 100%

➤ Για την απομόνωση του παραγόμενου RNA σε καθαρή μορφή πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο κατακρήμνισης RNA:

- i. Σε όγκο 20 μl αντίδρασης in vivo μεταγραφής προστίθενται 1 μl διάλυμα DNase I και επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά.
- ii. Σε ένα σωλήνα errendorf αναμειγνύονται τα εξής διαλύματα:
 - 20μl διάλυμα RNA
 - 15μl 1M NH₄Ac (10% του συνολικού διαλύματος)
 - 115μl ddH₂O
- iii. Στο διάλυμα των 150μl προστίθεται ίση ποσότητα (150μl) διάλυμα φαινόλης: ισοαμυλικής αλκοόλης :χλωροφόρμιου.
- iv. Το νέο διάλυμα φυγοκεντρείται στα 14.000 RPM, στους 4°C για 10 λεπτά.
- v. Το εναιώρημα (υδάτινη φάση) μεταφέρεται σε νέο σωλήνα (120μl).
- vi. Στο νέο σωλήνα προστίθενται 100% αιθανόλη, 2,5X φορές ο όγκος της υδάτινης φάσης (300μl).
- vii. Το διάλυμα αιθανόλης ψύχεται στους -80°C για 1 ώρα.
- viii. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 14.000 RPM, στους 4°C για 45 λεπτά.
- ix. Αφαιρείται η αιθανόλη 100% και προστίθενται 500μl 70% αιθανόλης.
- x. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 14.000 RPM, στους 4°C για 15 λεπτά.
- xi. Η αιθανόλη αφαιρείται όσο το δυνατόν καλύτερα από το σωλήνα.
- xii. Ο σωλήνας με το ίζημα RNA επωάζεται σε υδατόλουτρο με ανοικτό καπάκι, για την πλήρη αφαίρεση της αιθανόλης.
- xiii. Το ίζημα αναδιαλύεται σε νερό (31μl) με την χρήση της μηχανής ανάδευσης vortex.

Το δείγμα RNA από την αντίδραση μεταγραφής in vitro είναι πλέον έτοιμο για χρήση ή αποθήκευση στους -80°C.

3. Αποτελέσματα

3.1. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης Inc11

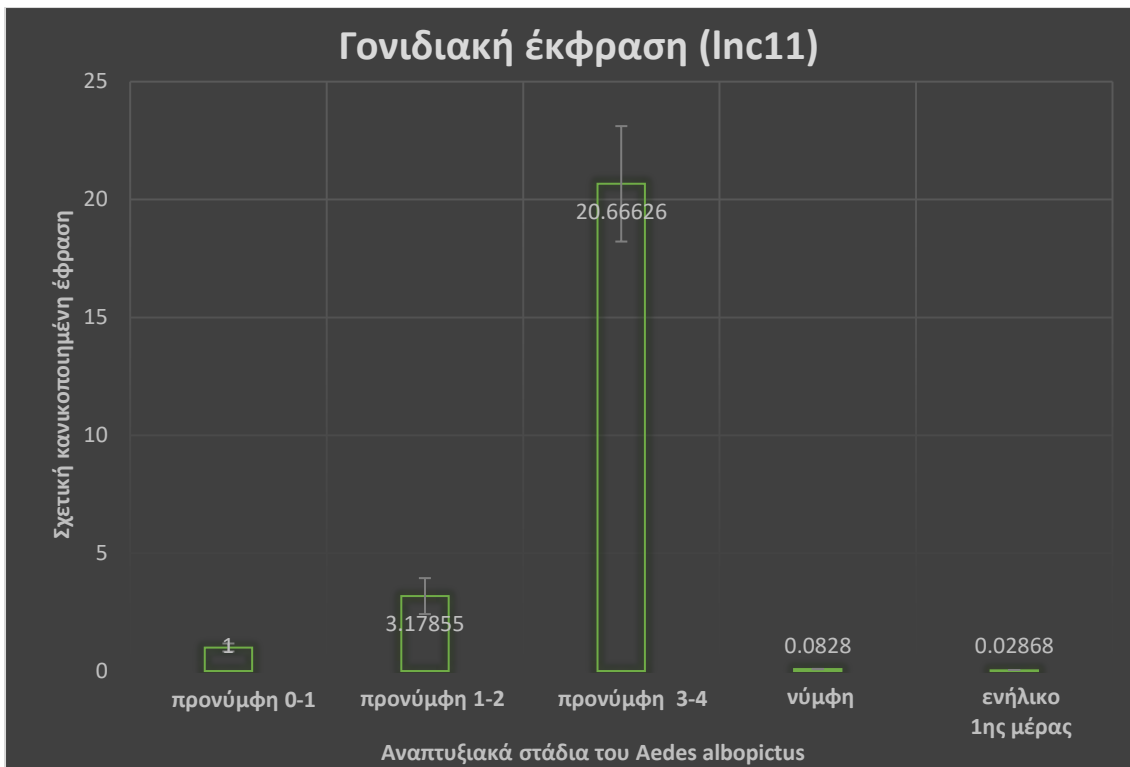
3.1.1. Επιβεβαίωση προφίλ έκφρασης μέσω Real-Time PCR

Για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) στα αναπτυξιακά στάδια του είδους *Aedes albopictus*, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Το γονίδιο αυτό (Inc11) ανήκει σε λίστα γονιδίων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων, η οποία προέκυψε μετά από μετανάλυση διαθέσιμων δεδομένων μεταγραφομικής από τα αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού τίγρη. Αναλυτικότερα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το γονίδιο (Inc11) σε δείγματα cDNA που προέρχονταν από τα αναπτυξιακά στάδια : προνύμφη σταδίου 0-1(L0-1), προνύμφη σταδίου 1-2 (L1-2), προνύμφη σταδίου 3-4 (L3-4), νύμφη (P) και ενήλικο (Adult).

Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, προηγήθηκε απομόνωση του ολικού RNA από δείγματα των αναπτυξιακών σταδίων προνύμφη ημέρα 0-1, προνύμφη ημέρα 1-2, προνύμφη ημέρα 3-4, νύμφη, ενήλικο και σύνθεση cDNA από τα δείγματα αυτά. Συγκεκριμένα, για την απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς κάθε αναπτυξιακού σταδίου χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Extrazol της εταιρίας DNA-GDAŇSK. Ακολούθησε επώαση με DNase για την πέψη μορίων DNA, που πιθανόν να απομονώθηκαν στο διάλυμα RNA και αντίδραση αντίστροφής μεταγραφής (σύνθεση cDNA) χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια της εταιρίας DNA-GDAŇSK. Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι στην αντίδραση σύνθεσης cDNA χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ολιγό-dT, οι οποίοι στοχεύουν τις ουρές αδενίνης των ώριμων μεταγράφων mRNA (τα πρωτόκολλα απομόνωσης ολικού RNA και σύνθεσης cDNA παρατίθενται στο παράρτημα). Συνεπώς, με την ολοκλήρωση των παραπάνω πρωτοκόλλων, υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα cDNA, που προέρχονται από μετάγραφα RNA ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων, από καθένα από τα αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού τίγρη.

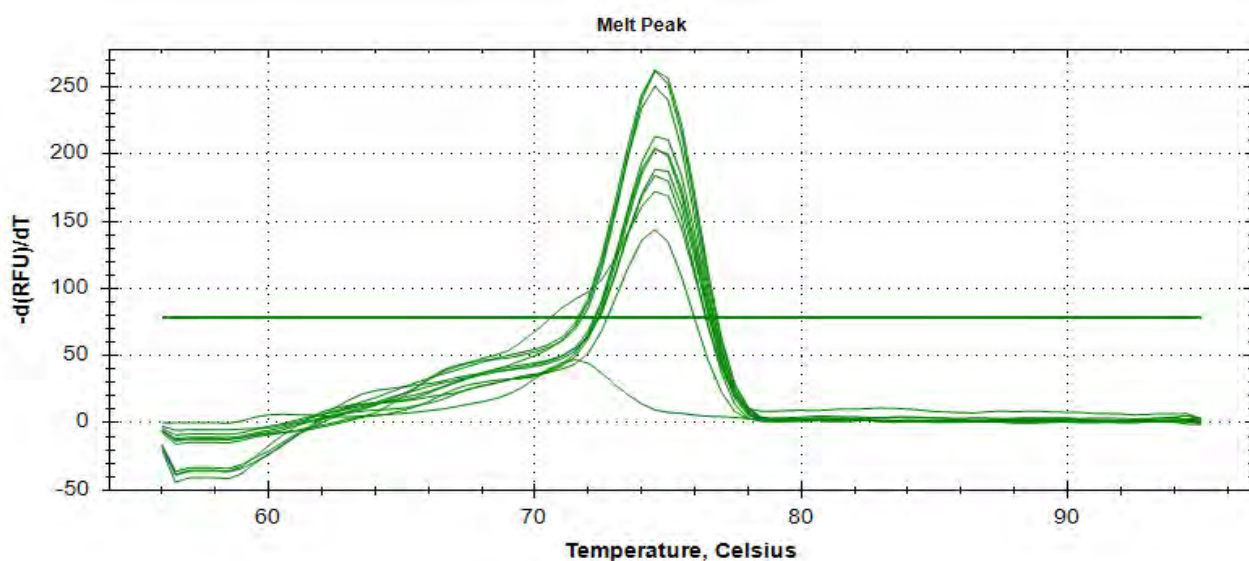
Τα δείγματα cDNA από τα αναπτυξιακά στάδια : προνύμφη ημέρα 0-1, προνύμφη ημέρα 1-2, προνύμφη ημέρα 3-4, νύμφη και ενήλικο, χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση Real-Time PCR με σκοπό την μελέτη του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) στα αναπτυξιακά στάδια του κουνουπιού τίγρη. Τόσο τα διαλύματα, οι εκκινητές όσο και οι συνθήκες της αντίδρασης αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.3.3.. Αντίστοιχη αντίδραση Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση των ριβοσωμικών γονιδίων RPS17 και RPL32 στα ίδια δείγματα cDNA των αναπτυξιακών σταδίων (προνύμφη ημέρα 0-1, προνύμφη ημέρα 1-2, προνύμφη ημέρα 3-4, νύμφη, ενήλικο), τα οποία εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (Dzaki and Azzam 2018). Για τον λόγο αυτό τα παραπάνω γονίδια (RPS17 και RPL32) αξιοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Η εξειδίκευση της αντίδρασης ελέγχθηκε με δύο τρόπους. Πρώτον, μέσω της παρατήρησης των αποτελεσμάτων της καμπύλης τήξης της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, όπου δεν παρατηρήθηκαν πολλαπλές κορυφές που να υποδηλώνουν την ύπαρξη διμερών εκκινητών ή παραπροϊόντων της αντίδρασης. Αντιθέτως, στο διάγραμμα παρουσιάστηκε μόνο μία κορυφή τήξης, η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο (Inc11) (εικόνα 3.1.1.). Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων της αντίδρασης Real-Time PCR σε πήκτωμα αγαρόζης και την εμφάνιση μία μοναδικής ζώνης, μεγέθους 85bp. Ακολούθησε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και απεικόνισή τους στο παρακάτω ραβδόγραμμα :

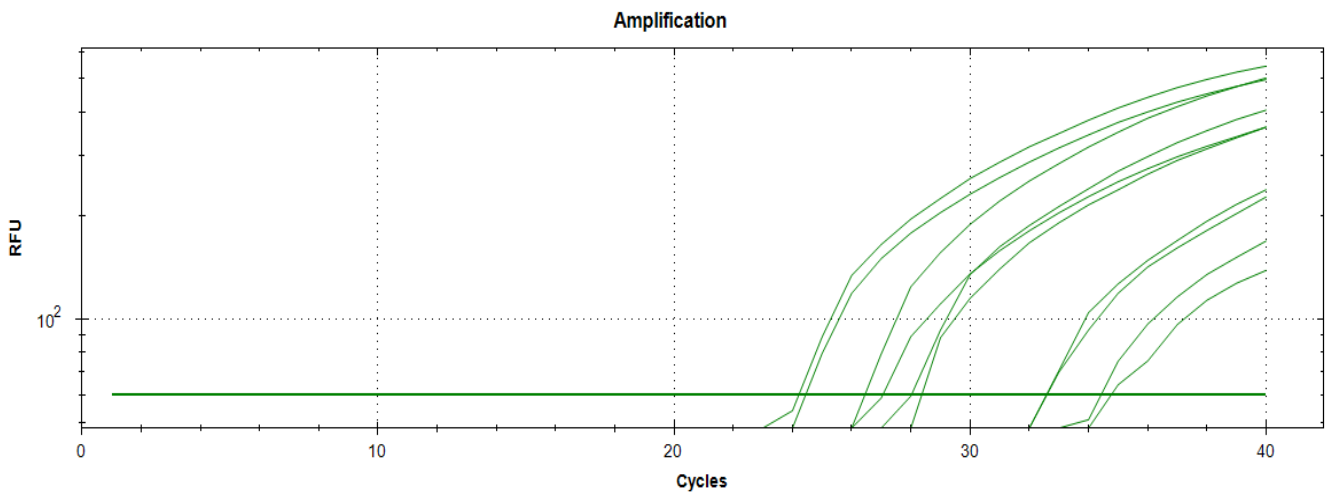


Διάγραμμα 3.1. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου (Inc11) στα αναπτυξιακά στάδια : προνύμφη σταδίου 0-1, προνύμφη σταδίου 1-2, προνύμφη σταδίου 3-4, νύμφη, ενήλικο.

Παρατηρώντας το διάγραμμα 3.1. γίνεται φανερό ότι η έκφραση του γονιδίου Inc11 αυξάνεται κατακόρυφα στο στάδιο της προνύμφης ημέρας 3-4, καθώς η έκφραση του γονιδίου είναι είκοσι φορές μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται στο στάδιο της προνύμφης μέρας 0-1. Αντιθέτως, η έκφραση του γονιδίου (Inc11) στο στάδιο της προνύμφης ημέρας 1-2 εμφανίζει μία μικρή αύξηση (τρεις φορές υψηλότερη έκφραση) σε σχέση με την προνύμφη ημέρας 0-1, ενώ τόσο στο στάδιο της νύμφης όσο και του ενήλικου 1^{ης} ημέρας η έκφραση του γονιδίου μειώνεται κατακόρυφα, σε επίπεδα κοντά στην τιμή μηδέν. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι ως επίπεδο έκφρασης ίσο με την μονάδα, ορίστηκε το επίπεδο έκφρασης του αναπτυξιακού σταδίου της προνύμφης ημέρας 0-1. Τα παραπάνω αποτελέσματα όσον αφορά το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11), επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της *in silico* ανάλυσης (η οποία προηγήθηκε της έναρξης της πειραματικής έρευνας) για το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης μίας λίστας γονιδίων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (IncRNAs), ένα εκ των οποίων είναι το γονίδιο (Inc11), όπου εμφανίζεται υψηλή έκφραση στο αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης ημέρας 3-4.



Εικόνα 3.1.1. Διάγραμμα καμπύλης τήξης της αντίδρασης Real-Time PCR για το γονίδιο (Inc11)



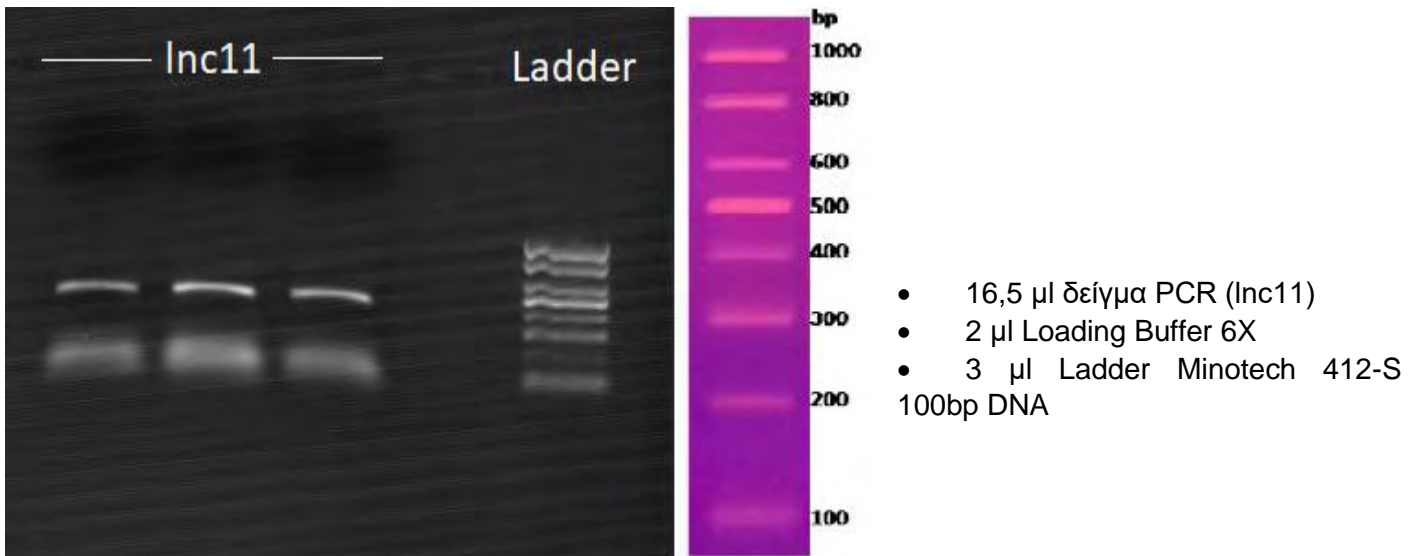
Εικόνα 3.1.2. Διάγραμμα καμπύλης ενίσχυσης της αντίδρασης Real-Time PCR για το γονίδιο (Inc11)

3.2. Κατασκευή *E. coli* κλώνου με δυνατότητα σύνθεσης dsRNA έναντι του Inc11

Στις παρακάτω υποενότητες του κεφαλαίου 3.2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσπαθειών κλωνοποίησης του γονιδίου (Inc11) στο βακτηριακό στέλεχος HT115 του *E.coli*. Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο της κλωνοποίησης ξεκινά με την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου, που επιθυμείται να κλωνοποιηθεί. Στην συνέχεια, εφόσον ο φορέας της κλωνοποίησης είναι έτοιμος για χρήση, πραγματοποιείται αντίδραση λιγάσης, όπου επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση του τμήματος του γονιδίου στόχου στο πλασμιδιακό φορέα. Ακολούθως, διεξάγεται το πρωτόκολλο μετασχηματισμού (ηλεκτροδιάτρηση) των βακτηρίων (*E.coli* του στελέχους HT115) και επιλογή του κλώνου που έχει δεχτεί τον ανασυνδυασμένο φορέα (Colony PCR και πέψη με ένζυμα περιορισμού). Στόχος των παραπάνω περιραματικών διαδικασιών ήταν η δημιουργία ενός βακτηριακού κλώνου, οποίος περιέχει τον ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και έχει την ικανότητα παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA. Τέλος, εφόσον έχει απομονωθεί ο θετικός κλώνος, υπάρχει η δυνατότητα χορήγησης των βακτηριακών αυτών κυττάρων σε προνύμφες κουνουπιών τίγρης, μέσω της τροφής, στοχεύοντας τη σίγηση του γονιδίου (Inc11), λόγω της παρουσίας παρεμβαλλόμενου RNA στο εσωτερικό των κυττάρων του οργανισμού του εντόμου.

3.2.1. PCR ενίσχυση τμήματος DNA του γονιδίου

Η αντίδραση πολυμεράσης με στόχο την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) ήταν επιτυχής. Στην παρακάτω εικόνα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης, είναι φανερό ότι έχει ενισχυθεί ένα τμήμα μήκους περίπου 400bp (407bp), όπως προβλέπεται από τον σχεδιασμό των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη αντίδραση πολυμεράσης (βλέπε πίνακα 2.3.1.1.). Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε συντιθέμενο cDNA από δείγμα ολικού RNA προνύμφης σταδίου 3-4 (L 3-4), καθώς ήταν γνωστό ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο του κουνουπιού. Η εμφάνιση της ζώνης κοντά στα 400 ζεύγη βάσεων επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση. Ακολούθησε απομόνωση της ζώνης των 407bp από το πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση του DNA extraction from agarose gels kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Ως αποτέλεσμα, αποθηκεύτηκαν 30 μl διαλύματος DNA, συγκέντρωσης 5,88 ng/μl τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση λιγάσης και στην αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές T7.

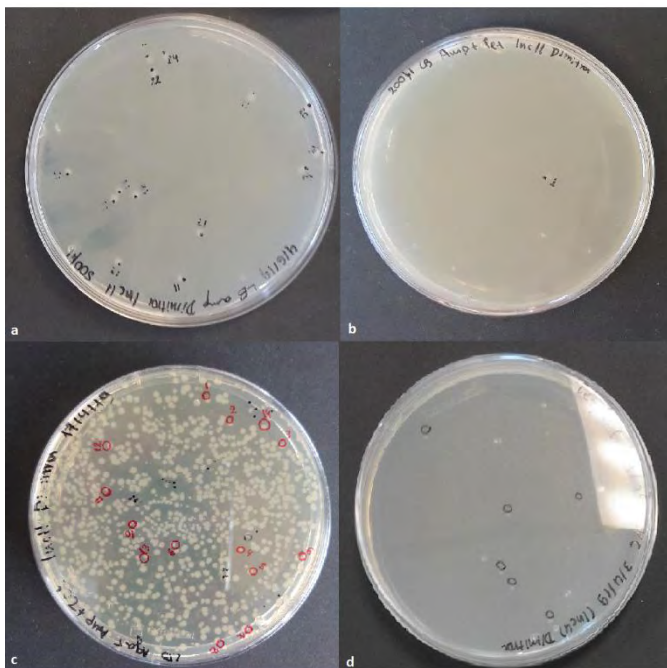


Εικόνα 3.2.1. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου Inc11 στον οργανισμό *Aedes albopictus* σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.2.2. Μετασχηματισμός κυττάρων

Μετά την κατασκευή του ανασυνδυασμένου φορέα L4440, ο οποίος περιέχει ως ένθεμα τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11), ακολούθησε ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E.coli* του στελέχους HT115 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα (5μl) της αντίδρασης T4 λιγάσης, η οποία μεταξύ των άλλων περιέχει ανασυνδυασμένους φορείς L4440. Αφού προηγήθηκε σύντομη επώαση υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων στους 37°C για 1 ώρα, ποσότητα αυτών (100μl-500μl υγρής καλλιέργειας) μεταφέρθηκε σε τρυβλίο άγαρ, όπου επώαστηκε ολονυχτίς (16-17 ώρες) στους 37°C.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται αποικίες κυττάρων *E.coli* σε τρυβλία άγαρ, που έχουν



Εικόνα 3.2.2. Αποτελέσματα μετασχηματισμού κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση. a και c κύτταρα μετασχηματισμένα με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, b και d αρνητικοί μάρτυρες.

προκύψει από δύο διαφορετικά γεγονότα μετασχηματισμού. Ακόμα στις δύο αυτές δοκιμές, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές απομονώσεις του φορέα L4440 και δεκτικά κύτταρα που είχαν κατασκευαστεί σε δύο διαφορετικές χρονικές περιόδους, ενώ το ένθεμα (Inc11) το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση λιγάσης προερχόταν από το ίδιο δείγμα (βλέπε 3.2.1. PCR ενίσχυση τμήματος DNA του γονιδίου). Αναλυτικότερα στην περίπτωση των τρυβλίων a και b χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη απομόνωση του φορέα L4440 και δεκτικά κύτταρα με απόδοση μετασχηματισμού $1,26 \times 10^6$. Από την άλλη πλευρά, για τον μετασχηματισμό των κυττάρων των τρυβλίων c και d χρησιμοποιήθηκε η πρώτη απομόνωση του φορέα L4440 και δεκτικά κύτταρα με απόδοση μετασχηματισμού 1×10^9 . Επιπρόσθετα, τα κύτταρα των τρυβλίων a και c έχουν μετασχηματιστεί με ποσότητα αντίδρασης λιγάσης η οποία περιείχε το ένθεμα (Inc11), ενώ στα τρυβλία b και d έχουν επιστρωθεί μετασχηματισμένα κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με ποσότητα αντίδρασης

λιγάσης η οποία δεν περιείχε το ένθεμα, παρά μόνο τον κομμένο φορέα L4440. Με άλλα λόγια, τα μετασχηματισμένα κύτταρα των τρυβλίων λειτουργούν ως αρνητικό control της αντίδρασης λιγάσης αλλά και της επιτυχής κατασκευής του φορέα άκρων θυμίνης.

Η διαφορά στον αριθμό των αποικιών στις περιπτώσεις a και c οφείλεται στην σημαντική διαφορά στην τιμή απόδοσης μετασχηματισμού των δεκτικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, με το τρυβλίο του εικονιδίου c να εμφανίζει μεγαλύτερο αριθμό αποικιών βακτηρίων λόγω της υψηλής απόδοσης των δεκτικών κυττάρων (1×10^9), τα οποία μετασχηματίστηκαν. Τέλος, οι ολιγάριθμες αποικίες, μία και έξι στο τρυβλίο b και d αντίστοιχα, οφείλονται στην εισαγωγή στο εσωτερικό των δεκτικών κυττάρων *E.coli*, κυκλικού φορέα οποίος δεν περιέχει το ένθεμα, ωστόσο έχει κλείσει κατά την διάρκεια της αντίδρασης με T4 λιγάση. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να αποδίδεται στην μειωμένη αποδοτικότητα της αντίδρασης προσαρμογής άκρων θυμίνης στο γραμμικό φορέα L4440, το οποίο επιτρέπει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των ελεύθερων τυφλών άκρων του γραμμικού πλασμιδίου παρουσία λιγάσης και ATP.

3.2.3. Προσπάθειες επιβεβαίωσης θετικού κλώνου

Όσον αφορά την κλωνοποίηση του γονιδίου (*Inc11*), η αντίδραση λιγάσης έχει δοκιμαστεί με τρεις διαφορετικές απομονώσεις του φορέα L4440, ενώ παράλληλα η επεξεργασία τους (πέψη, αντίδραση T άκρων και κατακρήμνιση) ολοκληρώθηκε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ακόμα, για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα κύτταρα με απόδοση μετασχηματισμού 1×10^9 όσο και αυτά με την μικρότερη απόδοση ($1,26 \times 10^6$). Το δείγμα του ενθέματος προέρχεται από την ίδια αντίδραση PCR για το *Inc11* ή από αραίωση αυτής (βλέπε 3.2.1.). Τέλος, στην επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων έχει δοκιμαστεί ένα εύρος ml αυτών (100μl-500μl) με στόχο την ανάπτυξη ενός περιορισμένου αριθμού αποικιών στα τρυβλία άγαρ και συνεπώς την εξέταση όλων των βακτηριακών κλώνων.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας:

- Εξετάστηκαν 152 αποικίες
- Έχει πραγματοποιηθεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα για 7 βακτηριακούς κλώνους
- Έχουν πραγματοποιηθεί 5 αντιδράσεις σύνδεσης ενθέματος με τον φορέα με το ένζυμο T4 λιγάση

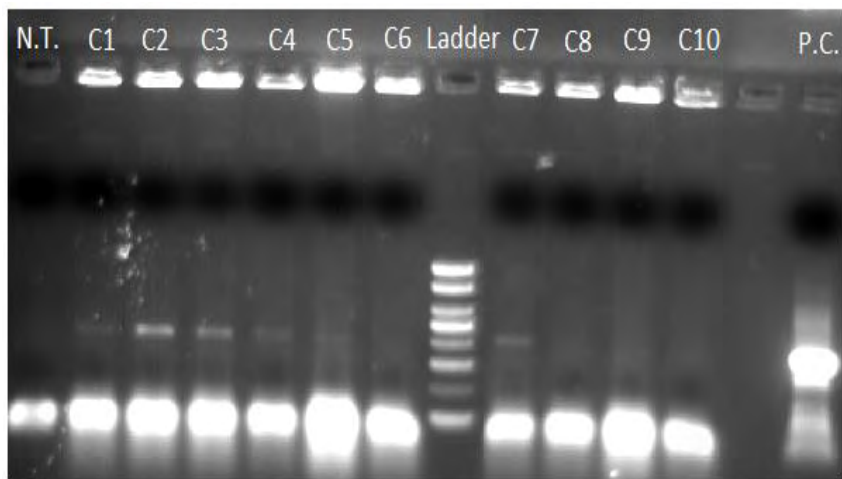
Παρακάτω παρουσιάζονται επιλεκτικά κάποια από τα αποτελέσματα των προσπαθειών κλωνοποίησης του γονιδίου (*Inc11*) σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους HT115, με στόχο την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA in vivo.

3.2.3.1. Colony PCR

Με στόχο την εύρεση του κλώνου που έχει δεχτεί τον ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο αντίδρασης πολυμεράσης σε βακτηριακές αποικίες (Colony PCR) σε επιλεγμένους κλώνους και σε άλλες περιπτώσεις όλων των αποικιών που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια του άγαρ (όπως συνέβη στην περίπτωση των αποικιών των εικόνων 3.2.3.1.1. και 3.2.3.1.2.). Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί για την ενίσχυση του τμήματος του εξεταζόμενου γονιδίου (*Inc11*) από συντιθέμενο cDNA, ωστόσο σε αυτό το πρωτόκολλο οι εκκινητές στοχεύουν στο ανασυνδιασμένο πλασμίδιο και συγκεκριμένα στην αλληλουχία του ενθέματος (τμήμα του γονιδίου *Inc11*). Συνεπώς στην περίπτωση όπου η μήτρα DNA της αντίδρασης προέρχεται από μετασχηματισμένο με τον ανασυνδιασμένο φορέα βακτηριακό κύτταρο, τότε στην ηλεκτροφόρηση αυτής της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης θα εμφανιστεί ζώνη μεγάλου περιήπου 400bp (407bp), όπως συνέβη και στην ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου (*Inc11*) από συντιθέμενο cDNA (βλέπε εικόνα 3.2.1.).

Τα παρακάτω αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης αντιδράσεων πολυμεράσης σε βακτηριακές αποικίες (Colony PCR) προέρχονται από την ίδια αντίδραση μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων *E.coli* του στελέχους HT115 (με απόδοση μετασχηματισμού $1,26 \times 10^6$), όπου στην αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη απομόνωση του φορέα L4440. Ακόμα, τα δείγματα των κλώνων της εικόνας 3.2.3.1.2. έχουν επιλεγθεί από το τρυβλίο a της εικόνας 3.2.2.. Στις ακόλουθες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε μικρό δείγμα των επιλεγμένων βακτηριακών αποικιών, 2μl δείγματος DNA του γονιδίου (*Inc11*) συγκέντρωσης 1ng/μl, το οποίο λειτούργησε ως θετικό control της αντίδρασης, ενώ ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκαν 25μl του μείγματος διαλυμάτων της αντίδρασης πολυμεράσης χωρίς την παρουσία

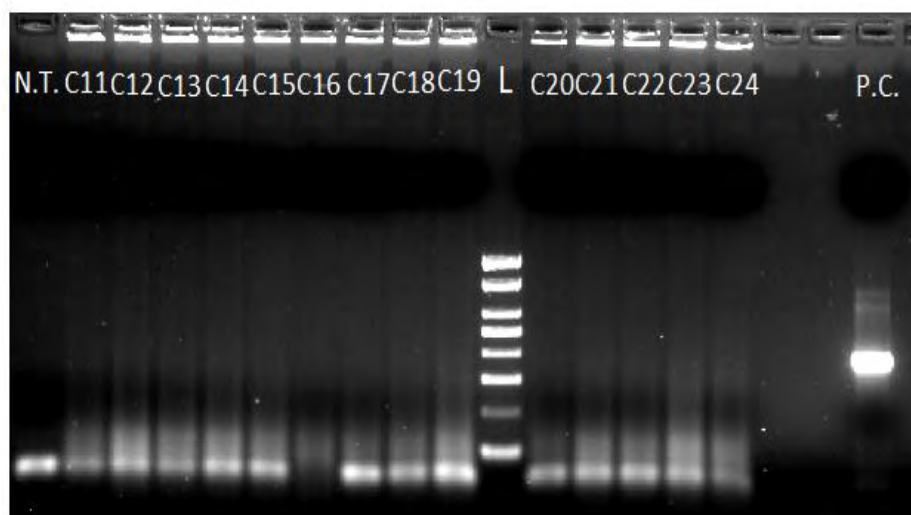
μήτρας DNA. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το μείγμα αντιδραστηρίων ενίσχυσης (PCR Mix) προστέθηκε τελευταίο στο σωλήνα αντίδρασης του αρνητικού control, με σκοπό τον εντοπισμό τυχόν μολύνσεων που μπορούν να προκύψουν κατά την διάρκεια εκτέλεσης του πρωτοκόλλου.



- 12 μl δείγμα Colony PCR
- 2 μl Loading Buffer 6X
- 3 μl Ladder Minotech 412-S 100bp DNA

Εικόνα 3.2.3.1.1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης 1% αντιδράσεων πολυμεράσης σε βακτηριακές αποικίες.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 3.2.3.1.1.) παρατηρούνται ζώνες χαμηλής έντασης στους κλώνους C1 έως C5 και C7 στο επιθυμητό μέγεθος (407bp). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην επιμόλυνση των συγκεκριμένων αντιδράσεων από το θετικό control είτε στην παρουσία μετασχηματισμένων κλώνων με το ανασυνδιασμένο πλασμιδίο. Για την επιβεβαίωση μίας εκ των δύο πιθανών εξηγήσεων της παραπάνω παρατήρησης, απαιτείται η εφαρμογή δεύτερης δοκιμασίας επαλήθευσης θετικού κλώνου, η οποία θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο (3.2.3.2. Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικό ένζυμο). Ωστόσο, στην περίπτωση των αντιδράσεων της δεύτερης εικόνας (3.2.3.1.2.), είναι φανερό ότι καμία από τις επιλεγμένες αποικίες δεν περιέχουν το ανασυνδυασμένο κλώνο, αλλά πιθανότατα έχουν λάβει τον κλειστό κυκλικό φορέα χωρίς το ένθεμα (Inc11).



- 12 μl δείγμα Colony PCR
- 2 μl Loading Buffer 6X
- 3 μl Ladder Minotech 412-S 100bp DNA

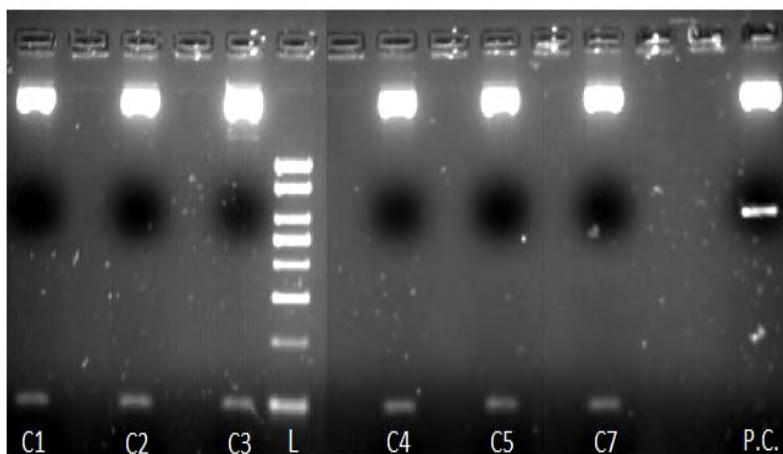
Εικόνα 3.2.3.1.2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης 1% αντιδράσεων πολυμεράσης σε βακτηριακές αποικίες.

3.2.3.2. Πέψη πλασμιδίων με περιοριστικό ένζυμο

Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, τα αποτελέσματα της εικόνας 3.2.3.1.1. του προηγούμενου κεφαλαίου απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Αρχικά, δημιουργήθηκαν υγρές καλλιέργειες των αποικιών, οι οποίες εμφάνισαν ζώνη μικρής έντασης, του αναμενόμενου μεγέθους. Μετά από επώαση αυτών για 16-17

ώρες στους 37 °C, ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA των έξι κλώνων και πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων με το ένζυμο περιορισμό EcoRI-HF, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.6.. Η εύρεση του κατάλληλου ενζύμου έγινε με την βοήθεια του προγράμματος SerialCloner, ενώ επιλέχθηκε το περιοριστικό ένζυμο, το οποίο πέπτει το πλασμίδιο σε δύο σημεία όπου θα δημιουργηθούν τμήματα διαφορετικού μεγέθους στην περίπτωση ανασυνδιασμένου και μη πλασμιδίου. Το ένζυμο EcoRI-HF δημιουργεί δύο ρήξεις εκτός του ενθέματος, αλλά κοντά στην θέση εισαγωγής του, ώστε να προκύπτουν διαφορετικού μεγέθους ζώνες στην περίπτωση μετασχηματισμένου και μη πλασμιδίου. Αναλυτικότερα, εάν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο, δηλαδή περιέχει το ένθεμα (Inc11) τότε μετά από την πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI-HF θα προκύψουν δύο τμήματα DNA μήκους 503bp και 2694bp, ενώ εάν το πλασμίδιο δεν είναι ανασυνδιασμένο, δηλαδή δεν έχει λάβει το ένθεμα (Inc11) τότε μετά από την πέψη με το ένζυμο περιορισμού EcoRI-HF θα προκύψουν δύο τμήματα DNA μήκους 96bp και 2694bp.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της πέψης με το ένζυμο περιορισμού EcoRI-HF των απομονωμένων από τις αποικίες 1,2,3,4,5 και 7 πλασμιδίων. Σε όλες τις αποικίες παρατηρείται η ζώνη μεγέθους περίπου 100bp (96bp). Συνεπώς, και τα έξι διαφορετικά πλασμίδια που υποβλήθηκαν σε πέψη δεν ήταν ανασυνδυασμένα και αντίστοιχα οι κλώνοι από τους οποίους απομονώθηκαν δεν είχαν μετασχηματιστεί με το ανασυνδιασμένο φορέα. Ως θετικό control (P.C.) της αντίδρασης πέψης με ένζυμο περιορισμού, χρησιμοποιήθηκε φορέας L4440, για τον οποίο ήταν γνωστό ότι είχε δεχθεί ένθεμα (Inc5), πέπτειται από το ένζυμο EcoRI-HF, και εμφανίζει ζώνη μεγέθους περίπου 600bp (582bp).



- 12 μl δείγμα πέψης με ένζυμο περιορισμού
- 2 μl Loading Buffer 6X
- 3 μl Ladder Minotech 412-S 100bp DNA

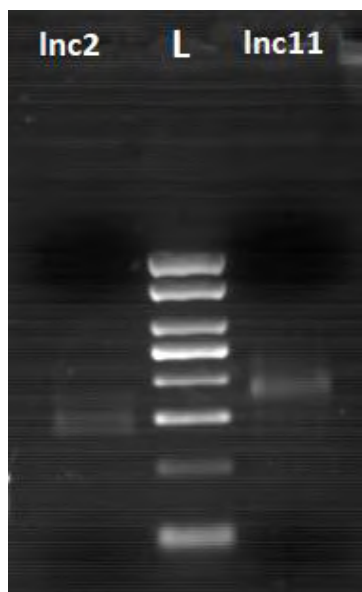
Εικόνα 3.2.3.2. Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων πέψης πλασμιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.3. Παραγωγή dsRNA έναντι του Inc11 μέσω in-vitro μεταγραφής

3.3.1. PCR ενίσχυση τμήματος DNA με την χρήση εκκινητών T7

Παράλληλα με τις προσπάθειες δημιουργίας βακτηριακού κλώνου ο οποίος θα παράγει δίκλινα μόρια RNA, ξεκίνησαν οι πειραματικές διαδικασίες για την παραγωγή δίκλωνου RNA *in vitro*. Ένα από τα πρώτα βήματα για την επίτευξη αυτού του στόχου, ήταν η ενίσχυση τμήματος του γονιδίου (Inc11) με την χρήση εκκινητών T7. Ως μήτρα DNA της αντίδρασης πολυμεράσης με την χρήση εκκινητών T7, χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα δείγματος της αντίδρασης ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου (Inc11), το οποίο είχε παραχθεί σε προηγούμενη αντίδραση (βλέπε 3.3.1.). Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης από πήκτωμα αγαρόζης, της αντίδρασης ενίσχυσης με τη χρήση εκκινητών T7. Στο πήκτωμα αγαρόζης της εικόνας 3.3.1. στην θέση του δείγματος (Inc11) είναι εμφανής μία ζώνη μεγέθους περίπου 400bp, η οποία αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μέγεθος (407bp) της αντίδρασης ενίσχυσης με τους

εκκινητές T7 (βλέπε πίνακα 2.3.4.3.). Η συγκέντρωση και η μάζα του δείγματος DNA εκτιμήθηκε μέσω της παρατήρησης και σύγκρισης της έντασης των 400bp με την ζώνη αντίστοιχου μεγέθους του μάρτυρα (Ladder) στο πήκτωμα αγαρόζης. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται στα 8,7ng/μl και η μάζα του στα 165,3 ng , τα οποία επαρκούν για την συνέχιση των πειραματικών διαδικασιών για την παραγωγή δίκλωνου RNA *in vitro*.

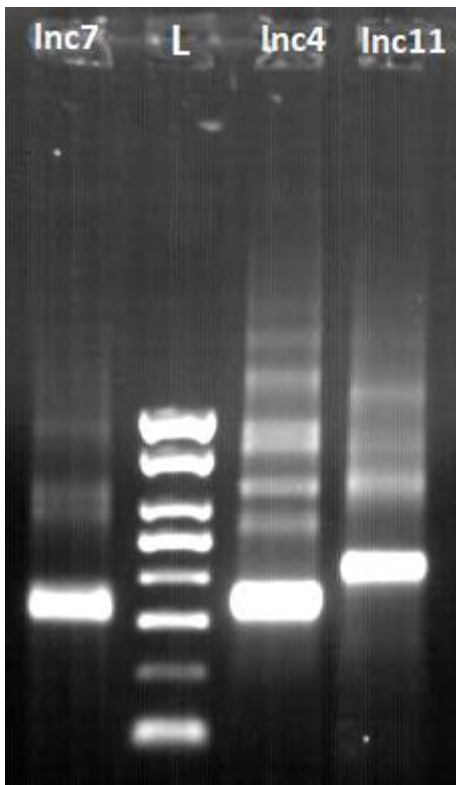


- 1 μl δείγμα ενίσχυσης με εκκινητές T7
- 2 μl Loading Buffer 6X
- 3 μl Ladder Minotech 412-S 100bp DNA

Εικόνα 3.3.1. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της αντίδρασης ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου (Inc11) με την χρήση εκκινητών T7 σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3.2. Αντίδραση *in-vitro* μεταγραφής

Εφόσον, έχουν παραχθεί και απομονωθεί μόρια DNA τα οποία φέρουν ανοδικά την αλληλουχία του T7 φαγικού εκκινητή, το επόμενο βήμα στην παραγωγή δίκλωνων μορίων *in vitro* είναι η αντίδραση μεταγραφής *in vitro* (βλέπε πρωτόκολλο 2.5.1.). Συγκεκριμένα, με την βοήθεια της T7 πολυμεράσης του RNA και της παρουσίας του T7 εκκινητή, τόσο στο κωδικοποιητικό όσο και στο αντι-νοηματικό κλώνο, παράγονται μονόκλινα μόρια RNA. Τα μονόκλινα αυτά μόρια RNA υβριδίζονται με τα συμπληρωματικά τους, σχηματίζοντας δίκλινα μόρια RNA. Ακολούθησε σύντομη επώαση του διαλύματος της αντίδρασης με αντιδραστήριο DNase, με στόχο την πέψη των μορίων DNA. Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχίας της αντίδρασης μεταγραφής *in vitro* μέσω ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο κατακρήμνισης dsRNA όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.5.2. Στην παρακάτω εικόνα 3.3.2. εμφανίζονται τα αποτελέσματα ηλεκτοφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, μικρής ποσότητα (1μl) του κατακρημισμένου RNA, η οποία είχε αραιωθεί από το αρχικό διάλυμα 100 φορές. Στην εικόνα παρατηρείται πολλαπλές ζώνες, με την ζώνη κοντά στις 400 ζεύγη βάσεων να είναι η μεγαλύτερη σε ένταση ζώνη. Το γεγονός αυτό είναι φυσιολογικό, καθώς τα μόρια που παράχθηκαν από την αντίδραση μεταγραφής *in vitro* προβλέπεται να έχουν μήκος περίπου 400bp (βλέπε πίνακα 2.3.4.3.), ενώ η εμφάνιση των υπόλοιπων ζωνών οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση του δείγματος RNA. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ακριβής υπολογισμός της συγκέντρωσης του καθαρού διαλύματος RNA (μέτρηση nanodrop), η τιμή της συγκέντρωσης του διαλύματος ανέρχεται στα 364,2ng/μl. Η μέτρηση αυτή αντιστοιχεί σε δείγμα αραιωμένο 100 φορές από το διάλυμα της κατακρήμνισης RNA και 10 φορές από το διάλυμα RNA το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80°C.



- 1 μl δείγμα RNA, αραίωση 1:100
- 1 μl Loading Buffer RNA 10X
- 3 μl Ladder Minotech 412-S 100bp DNA

Εικόνα 3.3.2. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης κατακρημισμένου RNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αύξηση των κρουσμάτων ασθενειών που οφείλονται σε αρμφοϊούς παγκοσμίως, σε συνδυασμό με τη ταχύτατη επέκταση του κουνουπιού τίγρη (*Aedes albopictus*) στην εύκρατη ζώνη, αλλά και βορειότερα, καθιστούν την έρευνα στρατηγικών περιορισμού του πληθυσμού των κουνουπιών, μία διαδικασία ύψιστης σημασίας. Η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στη δημιουργία και εφαρμογή εντομοκτόνων νέας γενιάς, των οποίων η λειτουργία βασίζεται στο μηχανισμό σίγησης του κυττάρου.

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές μεθόδους, *in vivo* και *in vitro*. Αρχικά, πρώτο βήμα και στις δύο μεθόδους παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA, αποτελεί η ενίσχυση τμήματος του γονιδίου στόχου από δείγμα cDNA. Ως γονίδιο στόχος χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο μη κωδικοποιητικού μεταγράφου, με την κωδική ονομασία (Inc11). Στόχος της εργασίας είναι η δημιουργία ειδοειδικών εντομοκτόνων, των οποίων η δράση βασίζεται σε μηχανισμούς της μοριακής βιολογίας. Για το λόγο αυτό η στόχευση γονιδίων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων αποτελεί ιδανικό υποψήφιο για την εκπλήρωση του στόχου αυτού, διότι όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αλληλουχία των γονιδίων μη κωδικοποιητικών μεταγράφων εμφανίζουν χαμηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ ακόμα και συγγενικών ειδών. Ακολουθως, στην περίπτωση της παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA *in vivo*, βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους HT115 μετασχηματίζονται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο L4440, σύμφωνα με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Ακόμα πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, πραγματοποιείται αντίδραση σύνδεσης (TA Cloning) τμήματος του γονιδίου στόχου με άκρα αδενίνης με τον πλασμιδιακό φορέα με άκρα θυμίνης (T-vector). Η θρέψη προνυμφών του κουνουπιού τίγρη με τους μετασχηματισμένους για το γονίδιο στόχο βακτηριακούς κλώνους, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δίκλωνων μορίων RNA στο εσωτερικό του οργανισμού του εντόμου και ως συνέπεια την επαγωγή του μονοπατιού σίγησης του κυττάρου (RNAi pathway). Από την άλλη πλευρά, για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA *in vitro*, εφαρμόζεται το πρωτόκολλο *in vitro* μεταγραφής με την χρήση του ενζύμου T7 RNA πολυμεράση (T7 RNA Polymerase). Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να παράγει μόρια RNA έχοντας ως μήτρα τμήματα DNA, των οποίων η αλληλουχία περιλαμβάνει τον εκκινήτη T7, τόσο στον κωδικό όσο και στον μη νοηματικό κλώνο του γονιδίου. Τέλος, πραγματοποιείται χορήγηση ποσότητας δείγματος δίκλωνων μορίων RNA σε προνύμφες κουνουπιών με μικροέγχυση (microinjection). Όπως και στην περίπτωση των βακτηρίων, αναμένεται εισαγωγή των δίκλωνων μορίων RNA στο εσωτερικό των κυττάρων του κουνουπιού και ενεργοποίηση του μονοπατιού σίγησης του γονιδίου στόχου μέσω του μηχανισμού RNA παρεμβολής. Μετά την ολοκλήρωση της χορήγησης μορίων δίκλωνου RNA και την εφαρμογή κατάλληλων θετικών και αρνητικών control στις προνύμφες κουνουπιών, ακολουθεί παρατήρηση του φαινοτύπου των εντόμων για τυχόν αναπτυσσόμενες ανωμαλίες που πιθανόν να οφείλονται στην επιτυχή σίγηση του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11).

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) στα αναπτυξιακά στάδια του είδους *Aedes albopictus* (βλέπε κεφάλαιο 3.1.), έδειξε υψηλή έκφραση στο στάδιο της προνύμφης ημέρας 3-4, ενώ τόσο στη νύμφη, όσο και στο ενήλικο κουνούπι η τιμή της έκφρασης είναι σχεδόν μηδενική. Για το λόγο αυτό, η σίγηση του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) μέσω της χορήγησης δίκλωνων μορίων RNA αποτελεί ιδανικό στόχο για τον περιορισμό του πληθυσμού των προνυμφών, και κατά επέκταση των ενήλικων κουνουπιών τίγρη.

Το πρωτόκολλο παραγωγής δίκλωνων μορίων RNA *in vitro* ολοκληρώθηκε χωρίς επιπλοκές, ενώ ταυτόχρονα παράχθηκε επαρκής ποσότητα δίκλωνων μορίων RNA (3,642 µg/µl) για την πραγματοποίηση πειραμάτων χορήγησης αυτών μέσω μικροέγχυσης. Συνεπώς, το πρωτόκολλο αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή δίκλωνου RNA που στοχεύει παρόμοιους γονιδιακούς στόχους. Ωστόσο, η παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA από κατάλληλα μετασχηματισμένους βακτηριακούς κλώνους (*in vivo*)

αποδείχθηκε ανεπιτυχής, παρόλες τις πολλαπλές προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν (βλέπε κεφάλαιο 3.2.3.). Τόσο η αδυναμία ακριβής ποσοτικοποίησης του δείγματος DNA της αντίδρασης ενίσχυσης, όσο και η αδυναμία διαχωρισμού των βακτηριακών κλώνων που είχαν δεχτεί το ανασυνδυασμένο φορέα με το γυμνό οφθαλμό, αποτέλεσαν σημαντικές προκλήσεις του πρωτοκόλλου κλωνοποίησης του γονιδίου (Inc11).

Παρακάτω προτείνονται τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου κλωνοποίησης, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, οι οποίες πιθανόν να οδηγήσουν στην επιτυχή επιλογή θετικού κλώνου για το γονίδιο (Inc11).

Αρχικά, η επιτυχής ενίσχυση του γονιδίου (Inc11), θα ήταν ωφέλιμο να ακολουθείται από εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη, με στόχο την απομάκρυνση των αλάτων, του ενζύμου και των καταλοίπων νουκλεοτιδίων, τα οποία μπορούν να μειώσουν την απόδοση του μετασχηματισμού κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση, αλλά και την αντίδραση σύνδεσης με το ένζυμο T4 λιγάση. Επιπλέον, εξίσου σημαντική είναι η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του δείγματος DNA ενθέματος, μετά την ολοκλήρωση της κατακρήμνισης, και η επιλογή της αναλογίας φορέα : ενθέματος που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση σύνδεσης με τη λιγάση T4. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, βέλτιστη αναλογία φορέα : ενθέματος για την αντίδραση σύνδεσης ενθέματος με άκρα αδενίνης, μεγέθους περίπου 500bp σε φορέα με άκρα θυμίνης, μεγέθους περίπου 3000bp (TA Cloning), αποτελεί η αναλογία 1:3 έως 1:6 ([TA-Blunt Ligation Kit Manual, NIPPON GENE CO.](#)). Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι τόσο το δείγμα του DNA ενθέματος, όσο και ο φορέας με άκρα θυμίνης (T-vector), πρέπει να προστατεύονται από πολλαπλές αυξομειώσεις της θερμοκρασίας (ψύξη-απόψυξη) και επιμόλυνση από νουκλεάσες, οι οποίες είναι πιθανό να οδηγήσουν σε απώλεια των άκρων αδενίνης και θυμίνης αντίστοιχα ([Handbook for TA-cloning, iNtRON Biotechnology](#)). Ακόμα, το πρόβλημα αδυναμίας διαχωρισμού των μετασχηματισμένων με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βακτηριακών κυττάρων με απλή παρατήρηση των αποικιών μπορεί να επιλυθεί χρησιμοποιώντας ή κατασκευάζοντας έναν φορέα, ο οποίος εκτός από τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για την παραγωγή δίκλωνων μορίων RNA, περιέχει επίσης ένα γονίδιο επιλογής, όπως το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ). Η ένθεση της αλληλουχίας του γονιδίου (Inc11) θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί εντός της αλληλουχίας ενός γονιδίου επιλογής, δίνοντας το πλεονέκτημα διαχωρισμού των θετικών κλώνων, παρατηρώντας απλώς τον φαινότυπο των αποικιών (π.χ. στην περίπτωση της β-γαλακτοσιδάσης, παρατήρηση του χρώματος της αποικίας).

Τέλος, κατά την διάρκεια των προσπαθειών κλωνοποίησης του γονιδίου (Inc11), πραγματοποιήθηκε *in silico* αναζήτηση παρόμοιων αλληλουχιών σε διάφορα είδη οργανισμών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο blastn της ιστοσελίδας ncbi, όπου εισάγοντας την αλληλουχία του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) πραγματοποιείται αναζήτηση αλληλουχιών με υψηλό βαθμό ταύτισης (megablast) σε διάφορους οργανισμούς. Αποτέλεσμα αυτής της αναζήτησης ήταν η εύρεση μίας παρόμοιας αλληλουχίας του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου Inc11 ([XR_002131134.1](#)) του *Aedes albopictus* στο συγγενικό του είδος *Aedes aegypti*, με το κωδικό όνομα [XR_002499605.1](#). Το γονίδιο αυτό, όπως και στην περίπτωση του γονιδίου Inc11, αντιστοιχεί σε γονίδιο μη κωδικοποιητικού μεταγράφου, άγνωστης λειτουργίας. Όσο αφορά την σχέση του με το γονίδιο Inc11, τα δύο γονίδια εμφανίζουν 77,05% ταύτιση (similarity) ως προς την αλληλουχία τους, ενώ η κάλυψη της αλληλουχίας του γονιδίου Inc11 από την αλληλουχία του αντίστοιχου γονιδίου στο *Aedes aegypti* υπολογίστηκε στο 70% (query cover).

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι τα γονίδια μη κωδικοποιητικών μεταγράφων (lncRNAs) παρουσιάζουν χαμηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των οργανισμών, ακόμα και μεταξύ συγγενικών ειδών ([Kaputsa et al. 2014](#), [Necsulea et al. 2014](#)). Αντίθετα, τα αποτελέσματα της *in silico* αναζήτησης αποκάλυψαν ότι η αλληλουχία του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (Inc11) έχει συντηρηθεί σε υψηλό βαθμό (77,05%), μεταξύ των δύο συγγενικών ειδών (*Aedes albopictus* και *Aedes aegypti*) του γένους *Aedes*. Συνεπώς, είναι πιθανό το μη κωδικοποιητικό γονίδιο (Inc11) να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της προνύμφης των κουνουπιών *Aedes albopictus* και *Aedes*

aegypti, καθώς η αλληλουχία του γονιδίου αυτού διατηρήθηκε σε υψηλό βαθμό ακόμα και μετά το φαινόμενο της ειδογένεσης.

Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις αυτές, λόγω του υψηλού ποσοστού συντήρησης της αλληλουχίας του γονιδίου μη κωδικοποιητικού μεταγράφου μεταξύ των δύο ειδών *Aedes*, τα μόρια siRNA που θα προκύψουν από τη χορήγηση των δίκλωνων μορίων RNA στα έντομα, είναι ικανά να στοχεύσουν όχι μόνο τα μετάγραφα του γονιδίου (Inc11) στο *Aedes albopictus*, αλλά και το αντίστοιχο γονίδιο (XR_002499605.1) στο *Aedes aegypti*. Με τον τρόπο αυτό, ο σχεδιασμός, η παραγωγή και η εφαρμογή ενός εντομοκτόνου δίκλωνου RNA (dsRNAi), το οποίο στοχεύει σε γονίδια μη κωδικοποιητικών μεταγράφων που έχουν συντηρηθεί μεταξύ των ειδών *Aedes albopictus* και *Aedes aegypti*, θα μπορούσε να περιορίσει τον πληθυσμό δύο από τους βασικότερους φορείς αρμποιών ταυτόχρονα. Ωστόσο, οι παραπάνω ισχυρισμοί αναμένεται να επιβεβαιωθούν από πειραματικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, παράλληλα με την επιτυχή ολοκλήρωση της κλωνοποίησης του γονιδίου (Inc11), θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μελέτη του προφίλ έκφρασης του γονιδίου (XR_002499605.1) σε κουνούπια *Aedes aegypti* διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων, αλλά και παρατήρηση του φαινοτύπου των προνυμφών των δύο ειδών του γένους *Aedes* μετά την χορήγηση δίκλωνων μορίων RNA.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

5.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από ζωϊκούς ιστούς

Τα δείγματα (ιστοί-οργανισμοί) αφού συλλεχθούν τοποθετούνται σε διάλυμα Extrazol (της εταιρίας DNA-GDAŃSK) για να διατηρηθεί το RNA. Η ποσότητα διαφέρει ανάλογα με τον όγκο που καταλαμβάνουν τα δείγματα (min. 20μL).

- Για την απομόνωση του ολικού RNA από δείγμα ιστών πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:
 - i. Ομογενοποίηση του δείγματος με χρήση pestle
 - ii. Ξέπλυμα pestle και προσθήκη Extrazol μέχρι τα 200μL.
 - iii. Καλό Vortex
 - iv. Επώαση σε RT για 5'
 - v. Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 10'
 - vi. Λήψη υπερκείμενου σε καινούριο tube
 - vii. Προσθήκη 0,1X BCP και καλό ανακάτεμα για min. 15"
 - viii. Επώαση σε RT για 2-15'
 - ix. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 14.000rpm, 15'
 - x. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο tube
 - xi. Προσθήκη 0,5X ισοπροπανόλη+0,5μL glycogen
 - xii. Επώαση σε RT για 10'
 - xiii. Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 15'
 - xiv. Αφαίρεση υπερκείμενου και πλύση με 200μl EtOH 75%
 - xv. Φυγοκέντρηση 4°C, 14.000rpm, 10'
 - xvi. Αφαίρεση EtOH και air-dry μέχρι την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης
 - xvii. Αναδιάλυση σε 30μl H₂O

5.2. Επώαση με DNase (DNase treatment)

Η διαδικασία λαμβάνει μέρος ώστε να καταστραφούν όλα τα μόρια DNA που μπορεί να υπάρχουν στο RNA extraction που έχει γίνει. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης μιας δεσοξυριβονουκλεάσης, ενός ενζύμου που υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στα μόρια του DNA.

- Για την εκτέλεση του πρωτοκόλλου επώασης με DNase πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:
 - i. Παρασκευάζεται Master mix: 10x buffer & DNase – σύντομο vortex στο buffer. Για 50μL αντίδρασης προστίθενται 5μL 10x buffer , 1μL DNase I και 4 μl ddH₂O για κάθε δείγμα. Προσοχή : η ποσότητα του RNA που θα μπει στην αντίδραση δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 ug συνολικά.
 - ii. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα από το RNA με βάση την συγκέντρωση του nanodrop έτσι ώστε να υπάρχουν 10 ug συνολικά και ο συνολικό όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 40 ul
 - iii. Προστίθενται 10μL master mix σε κάθε δείγμα (προσέχοντας να μην ακουμπάει το χέρι στο RNA στο tube.
 - iv. Αφού έχουν προστεθεί τα ένζυμα, πραγματοποιείται ανάδευση με vortex για 3" και μια πολύ σύντομη φυγοκέντρωση(λόγω του ότι περιέχουν γλυκερόλη μέσα, να αναμιχθεί με το νερό). Μετά απευθείας dry bath στους 37°C για 1 h.

- v. Μετά το waterbath, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και βάζω 40 μl sodium Acetate RNA grade 3M pH 5.6 και 310 μl ddH₂O (WFI).
- vi. Προστίθενται 400 μl phenol/chloroform, σε κάθε δείγμα και κάνω vortex για 30''-1'. Φυγοκέντρηση στα 14.000 rpm, 5 min 4 °C.
- vii. Αφαιρούνται 400 μl με πολύ προσοχή από το υπερκείμενο για να μην διαταραχθεί η μεσόφαση και τοποθετείται σε άδειο tube – το οποίο έχει ψυχθεί στον πάγο πριν ανοιχτό.
- viii. Προστίθενται 1000 μl 100 % ice cold EtOH, ανακινείται 4-5 φορές και τοποθεσιήθεται στους – 80 °C τουλάχιστον για 1 h (τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε αυτό το στάδιο για εβδομάδες).
- ix. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 min, 14.000 rpm, 4 °C. Αφαιρείται με πολύ προσοχή όλο το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί την πελέτα.
- x. Προστίθενται 500 μl 70 % ice cold EtOH (παρασκευασμένη με WFI). Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 5 min, 4 °C.
- xi. Αφαιρείται με πολύ προσοχή το υπερκείμενο, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα, πρώτα με την 1000αρα πιπέτα και μετά με την 100αρα για να πάρω όλη την αιθανόλη. Τα δείγματα αφήνονται με ανοικτό το καπάκι στον πάγο να στεγνώσουν για 5-10 λεπτά.
- xii. Επαναδιάλυση με WFI στα 30 ul και επώαση των δειγμάτων στους 65 °C για 5' για να επαναδιαλυθούν. Πραγματοποιείται έντονο vortex για 1 min, spin και ξανά vortex. Αποθηκεύση των δειγμάτων στους – 80 °C.

5.3. Σύνθεση cDNA

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

➤ Τα βήματα του πρωτοκόλλου σύνθεσης cDNA είναι τα εξής:

- i. Από κάθε δείγμα υπολογίζεις 1000ng RNA (στο nanodrop) και το διαλύονται σε 10 μl.
- ii. Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προστίθεται 1 μl από 50mM oligo-dT primers και 1μl από 10mM dNTPs. Τα δείγματα τοποθετούνται στους 65°C για 5' και αμέσως μετά στον πάγο
- iii. Ακολουθεί προετοιμασία του mix της αντίδρασης με τελικό όγκο 20μl. Για κάθε δείγμα προστίθενται 4 μl buffer 5x, 2 μl DTT (100 mM), 1 μl Rnase out (40U/μl), 1 μl MMLV-RT (200u/μl)
- iv. Ανάδευση με vortex, spin και πρόσθεση 8 μl σε κάθε δείγμα από το mix. Το δείγμα τοποθετείται στους 37 °C για 2 ώρες
- v. Μετά τις 2 ώρες προστίθενται 180 μl ddH₂O (WFI) και αποθηκεύεται στους -20 °C.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Airs P, Bartholomay L. RNA Interference for Mosquito and Mosquito-Borne Disease Control. *Insects*. 2017;8(1):4. doi:10.3390/insects8010004
- Allen ML, Walker WB. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of Insect Physiology*. 2012;58(3):391-396. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.12.014
- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2006;36(9):683-693. doi:10.1016/j.ibmb.2006.05.012
- Badieritakis E, Papachristos D, Latinopoulos D, et al. *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Greece: 13 years of living with the Asian tiger mosquito. *Parasitology Research*. 2017;117(2):453-460. doi:10.1007/s00436-017-5721-6
- Bagny Beilhe L, Delatte H, Juliano SA, Fontenille D, Quilici S. Ecological interactions in *Aedes* species on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012;27(4):387-397. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01062.x
- Bargielowski I, Lounibos LP. Rapid evolution of reduced receptivity to interspecific mating in the dengue vector *Aedes aegypti* in response to satyriation by invasive *Aedes albopictus*. *Evolutionary Ecology*. 2013;28(1):193-203. doi:10.1007/s10682-013-9669-4
- Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004;116(2):281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*. 1991;351(6322):153-155. doi:10.1038/351153a0
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*. 2007;25(11):1322-1326. doi:10.1038/nbt1359
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2007;7(1):76-85. doi:10.1089/vbz.2006.0562
- Braks MAH, Honório NA, Lounibos LP, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA. Interspecific Competition Between Two Invasive Species of Container Mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*. 2004;97(1):130-139. doi:10.1603/0013-8746(2004)097[0130:icbtis]2.0.co;2
- Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Molecular and Cellular Biology*. 1990;10(1):28-36. doi:10.1128/mcb.10.1.28
- Caminade C, Medlock JM, Ducheyne E, et al. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *Journal of The Royal Society Interface*. 2012;9(75):2708-2717. doi:10.1098/rsif.2012.0138
- Caputo B, Ienco A, Cianci D, et al. The "Auto-Dissemination" Approach: A Novel Concept to Fight *Aedes albopictus* in

- Urban Areas. McCall PJ, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(8):e1793. doi:10.1371/journal.pntd.0001793
- Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Barker CM, Scott TW. Effects of Fluctuating Daily Temperatures at Critical Thermal Extremes on *Aedes aegypti* Life-History Traits. Vasilakis N, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e58824. doi:10.1371/journal.pone.0058824
- Chujo T, Yamazaki T, Hirose T. Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016;1859(1):139-146. doi:10.1016/j.bbagr.2015.05.007
- Danks HV. *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*. Ottawa: Biological Survey Of Canada (Terrestrial Artropods; 1987.
- de Araújo AP, Paiva MHS, Cabral AM, et al. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. *Journal of Insect Science*. 2019;19(3). doi:10.1093/jisesa/iez054
- de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology Journal*. 2008;5(1):33. doi:10.1186/1743-422x-5-33
- Delatte H, Desvars A, Bouétard A, et al. Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2010;10(3):249-258. doi:10.1089/vbz.2009.0026
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 2005;14(1):3-8. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x
- Enuka Y, Lauriola M, Feldman ME, Sas-Chen A, Ulitsky I, Yarden Y. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Research*. 2015;44(3):1370-1383. doi:10.1093/nar/gkv1367
- Etebari K, Asad S, Zhang G, Asgari S. Identification of *Aedes aegypti* Long Intergenic Non-coding RNAs and Their Association with *Wolbachia* and Dengue Virus Infection. Olson KE, ed. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(10):e0005069. doi:10.1371/journal.pntd.0005069
- Ferrari F, Alekseyenko AA, Park PJ, Kuroda MI. Transcriptional control of a whole chromosome: emerging models for dosage compensation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014;21(2):118-125. doi:10.1038/nsmb.2763
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-811. doi:10.1038/35888
- Fonseca DM, Unlu I, Crepeau T, et al. Area-wide management of *Aedes albopictus*. Part 2: Gauging the efficacy of traditional integrated pest control measures against urban container mosquitoes. *Pest Management Science*. 2013;69(12):1351-1361. doi:10.1002/ps.3511
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(3):387-395. doi:10.1590/s0074-02762012000300014

- Ganesh S, Svoboda P. Retrotransposon-associated long non-coding RNAs in mice and men. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2016;468(6):1049-1060. doi:10.1007/s00424-016-1818-5
- Gelbart ME, Kuroda MI. Drosophila dosage compensation: a complex voyage to the X chromosome. *Development*. 2009;136(9):1399-1410. doi:10.1242/dev.029645
- Gendrel A-V, Heard E. Noncoding RNAs and Epigenetic Mechanisms During X-Chromosome Inactivation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2014;30(1):561-580. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122415
- Georgiev P, Chlamydas S, Akhtar A. Drosophila dosage compensation. *Fly*. 2011;5(2):147-154. doi:10.4161/fly.5.2.14934
- Ghosh S, Tibbit C, Liu J-L. Effective knockdown of Drosophila long non-coding RNAs by CRISPR interference. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(9):e84-e84. doi:10.1093/nar/gkw063
- Griebler M, Westerlund SA, Hoffmann KH, Meyering-Vos M. RNA interference with the allatregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *Journal of Insect Physiology*. 2008;54(6):997-1007. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.04.019
- Hammond SM. Dicing and slicing. *FEBS Letters*. 2005;579(26):5822-5829. doi:10.1016/j.febslet.2005.08.079
- Hapairai LK, Mysore K, Chen Y, et al. Lure-and-Kill Yeast Interfering RNA Larvicides Targeting Neural Genes in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-13566-y
- Harbach RE. *Culex pipiens*: Species Versus Species Complex – Taxonomic History and Perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2016;28(4s):10-23. doi:10.2987/8756-971x-28.4.10
- Harris AF, Ranson H, Rajatileka S. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;83(2):277-284. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0623
- Hawkes NJ, Janes RW, Hemingway J, Vontas J. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2005;81(3):154-163. doi:10.1016/j.pestbp.2004.11.003
- Hoffmann AA, Iturbe-Ormaetxe I, Callahan AG, et al. Stability of the wMel *Wolbachia* Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. Rasgon JL, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(9):e3115. doi:10.1371/journal.pntd.0003115
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476(7361):454-457. doi:10.1038/nature10356
- Horabin JI. Balancing sex chromosome expression and satisfying the sexes. *Fly*. 2012;6(1):26-29. doi:10.4161/fly.18822
- Huvenne H, Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of insect physiology*. 2010;56(3):227-235. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.10.004
- Jacob MD, Audas TE, Uniacke J, Trinkle-Mulcahy L, Lee S. Environmental cues induce a long noncoding RNA-dependent remodeling of the nucleolus. Matera AG, ed. *Molecular Biology of the Cell*. 2013;24(18):2943-2953.

Joga MR, Zotti MJ, Smaghe G, Christiaens O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Frontiers in Physiology*. 2016;7. doi:10.3389/fphys.2016.00553

Jose AM, Smith JJ, Hunter CP. Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(7):2283-2288. doi:10.1073/pnas.0809760106

Juliano SA, Lounibos LP, O'Meara GF. A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: differences between sites of coexistence and exclusion? *Oecologia*. 2004;139(4):583-593. doi:10.1007/s00442-004-1532-4

Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. Secundino NFC, ed. *PLOS ONE*. 2018;13(12):e0210122. doi:10.1371/journal.pone.0210122

Kamgang B, Nchoutpouen E, Simard F, Paupy C. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites & Vectors*. 2012;5(1):57. doi:10.1186/1756-3305-5-57

Kamgang B, Yougang AP, Tchoupo M, Riveron JM, Wondji C. Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasites & Vectors*. 2017;10(1). doi:10.1186/s13071-017-2408-x

Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science*. 2007;316(5830):1484-1488. doi:10.1126/science.1138341

Kapusta A, Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends in Genetics*. 2014;30(10):439-452. doi:10.1016/j.tig.2014.08.004

Keller CI, Akhtar A. The MSL complex: juggling RNA–protein interactions for dosage compensation and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2015;31:1-11. doi:10.1016/j.gde.2015.03.007

Koya SK, Meller VH. roX RNAs and Genome Regulation in *Drosophila Melanogaster*. *Long Non-Coding RNAs*. November 2010:147-160. doi:10.1007/978-3-642-16502-3_7

Kumar D, Hu X, Guo R, Xue R, Cao G, Gong C. Long Noncoding RNA: Disclosing New Horizon in the Molecular World of Insects. *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology*. September 2017:85-102. doi:10.1007/978-3-319-61343-7_5

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2015;132:1-41. doi:10.1016/j.jip.2015.07.009

Lakhotia SC, Mukherjee AS. Chromosomal basis of dosage compensation in *Drosophila*: I. Cellular autonomy of hyperactivity of the male X-chromosome in salivary glands and sex differentiation. *Genetical Research*. 1969;14(2):137-150. doi:10.1017/s001667230000197x

Lakhotia SC. From Heterochromatin to Long Noncoding RNAs in *Drosophila*: Expanding the Arena of Gene Function and Regulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017:75-118. doi:10.1007/978-981-10-5203-3_3

- Leisnham PT, Juliano SA. Interpopulation differences in competitive effect and response of the mosquito *Aedes aegypti* and resistance to invasion by a superior competitor. *Oecologia*. 2010;164(1):221-230. doi:10.1007/s00442-010-1624-2
- Leisnham PT, Lounibos LP, O'Meara GF, Juliano SA. Interpopulation divergence in competitive interactions of the mosquito *Aedes albopictus*. *Ecology*. 2009;90(9):2405-2413. doi:10.1890/08-1569.1
- Leisnham PT, Sandoval-Mohapatra S. Mosquitoes Associated with Ditch-Plugged and Control Tidal Salt Marshes on the Delmarva Peninsula. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011;8(8):3099-3113. doi:10.3390/ijerph8083099
- Levin JZ, Yassour M, Adiconis X, et al. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nature methods*. 2010;7(9):709-715. doi:10.1038/nmeth.1491
- Li M, Wen S, Guo X, et al. The novel long non-coding RNA CRG regulates *Drosophila* locomotor behavior. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(22):11714-11727. doi:10.1093/nar/gks943
- Lucchesi JC, Kelly WG, Panning B. Chromatin Remodeling in Dosage Compensation. *Annual Review of Genetics*. 2005;39(1):615-651. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.094210
- Lucchesi JC, Kuroda MI. Dosage compensation in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(5):a019398. doi:10.1101/cshperspect.a019398
- Lucchesi JC. Dosage compensation in flies and worms: the ups and downs of X-chromosome regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1998;8(2):179-184. doi:10.1016/s0959-437x(98)80139-1
- Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara L, Hemingway J, Ranson H. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;35(8):861-871. doi:10.1016/j.ibmb.2005.03.008
- Mamta B, Rajam MV. RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017;23(3):487-501. doi:10.1007/s12298-017-0443-x
- Marchese FP, Huarte M. Long non-coding RNAs and chromatin modifiers. *Epigenetics*. 2013;9(1):21-26. doi:10.4161/epi.27472
- Marques AC, Ponting CP. Intergenic lncRNAs and the evolution of gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2014;27:48-53. doi:10.1016/j.gde.2014.03.009
- McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(3):181-193. doi:10.1038/nrmicro2968
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, et al. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12(6):435-447. doi:10.1089/vbz.2011.0814
- Minard G, Mavingui P, Moro C. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*. 2013;6(1):146. doi:10.1186/1756-3305-6-146
- MUKHERJEE AS, BEERMANN W. Synthesis of Ribonucleic Acid by the X-Chromosomes of *Drosophila melanogaster*

and the Problem of Dosage Compensation. *Nature*. 1965;207(4998):785-786. doi:10.1038/207785a0

Necsulea A, Soumillon M, Warnefors M, et al. The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature*. 2014;505(7485):635-640. doi:10.1038/nature12943

Noden BH, O'Neal PA, Fader JE, Juliano SA. Impact of inter- and intra-specific competition among larvae on larval, adult, and life-table traits of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* females. *Ecological Entomology*. 2015;41(2):192-200. doi:10.1111/een.12290

Ørom UA, Derrien T, Beringer M, et al. Long Noncoding RNAs with Enhancer-like Function in Human Cells. *Cell*. 2010;143(1):46-58. doi:10.1016/j.cell.2010.09.001

Pachnis V, Belayew A, Tilghman SM. Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(17):5523-5527. doi:10.1073/pnas.81.17.5523

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*. 2009;11(14-15):1177-1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.005

Ponnusamy L, Xu N, Nojima S, Wesson DM, Schal C, Apperson CS. Identification of bacteria and bacteria-associated chemical cues that mediate oviposition site preferences by *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(27):9262-9267. doi:10.1073/pnas.0802505105

Rao MRS. *Long Non Coding Rna Biology*. S.L.: Springer; 2018.

Read AF, Lynch PA, Thomas MB. How to Make Evolution-Proof Insecticides for Malaria Control. Hurst LD, ed. *PLoS Biology*. 2009;7(4):e1000058. doi:10.1371/journal.pbio.1000058

Rogers K. *Aedes* | Description, Life Cycle, & Disease Transmission. In: *Encyclopædia Britannica*. ; 2016. <https://www.britannica.com/animal/Aedes>. Accessed September 5, 2019.

Saleh M-C, van Rij RP, Hekele A, et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*. 2006;8(8):793-802. doi:10.1038/ncb1439

Satyavathi V, Ghosh R, Subramanian S. Long Non-Coding RNAs Regulating Immunity in Insects. *Non-Coding RNA*. 2017;3(1):14. doi:10.3390/ncrna3010014

Semenza JC, Suk JE. Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiology Letters*. 2017;365(2). doi:10.1093/femsle/fnx244

Seng CM, Seta T, Nealon J, Socheat D, Chantha N, Nathan MB. Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *Aedes aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. *Journal of Vector Ecology*. 2008;33(1):139-144. doi:10.3376/1081-1710(2008)33[139:cuotlf]2.0.co;2

Sijen T, Plasterk RHA. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*. 2003;426(6964):310-314. doi:10.1038/nature02107

Somarowthu S, Legiewicz M, Chillón I, Marcia M, Liu F, Pyle AM. HOTAIR Forms an Intricate and Modular Secondary Structure. *Molecular Cell*. 2015;58(2):353-361. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.006

- Sprenger D, Wuithiranyagool T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1986;2(2):217-219. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3507493>. Accessed September 5, 2019.
- Tangena J-AA, Thammavong P, Lindsay SW, Brey PT. Risk of exposure to potential vector mosquitoes for rural workers in Northern Lao PDR. Hayden M, ed. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(7):e0005802. doi:10.1371/journal.pntd.0005802
- Taracena ML, Oliveira PL, Almendares O, et al. Genetically Modifying the Insect Gut Microbiota to Control Chagas Disease Vectors through Systemic RNAi. Dumonteil E, ed. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(2):e0003358. doi:10.1371/journal.pntd.0003358
- Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ. Global traffic and disease vector dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(16):6242-6247. doi:10.1073/pnas.0508391103
- Taylor LR, Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. Seasonal Adaptations of Insects. *The Journal of Animal Ecology*. 1987;56(1):374. doi:10.2307/4831
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome biology*. 2008;9(1):R10. doi:10.1186/gb-2008-9-1-r10
- Turelli M, Hoffmann AA. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*. 1995;140(4):1319-1338. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1206697/>. Accessed September 5, 2019.
- Ulvila J, Parikka M, Kleino A, et al. Double-stranded RNA Is Internalized by Scavenger Receptor-mediated Endocytosis in *Drosophila* S2 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(20):14370-14375. doi:10.1074/jbc.m513868200
- Umbach JL, Cullen BR. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & Development*. 2009;23(10):1151-1164. doi:10.1101/gad.1793309
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2012;104(2):126-131. doi:10.1016/j.pestbp.2012.05.008
- Wan Y, Kertesz M, Spitale RC, Segal E, Chang HY. Understanding the transcriptome through RNA structure. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(9):641-655. doi:10.1038/nrg3049
- Wang M, Thomas N, Jin H. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*. 2017;38:133-141. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003
- Wang Y-H, Chang M-M, Wang X-L, Zheng A-H, Zou Z. The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Developmental & Comparative Immunology*. 2018;83:12-21. doi:10.1016/j.dci.2017.12.001
- Whangbo JS, Hunter CP. Environmental RNA interference. *Trends in genetics: TIG*. 2008;24(6):297-305. doi:10.1016/j.tig.2008.03.007

Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science (New York, NY)*. 2002;295(5564):2456-2459. doi:10.1126/science.1068836

Wynant N, Santos D, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Molecular Biology*. February 2014:n/a-n/a. doi:10.1111/imb.12083

Yeap HL, Mee P, Walker T, et al. Dynamics of the "Popcorn" Wolbachia Infection in Outbred *Aedes aegypti* Informs Prospects for Mosquito Vector Control. *Genetics*. 2010;187(2):583-595. doi:10.1534/genetics.110.122390

Yee DA, Himel E, Reiskind MH, Vamosi SM. Implications of saline concentrations for the performance and competitive interactions of the mosquitoes *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopictus*). *Medical and Veterinary Entomology*. 2013;28(1):60-69. doi:10.1111/mve.12007

Zhang J, Khan SA, Heckel DG, Bock R. Next-Generation Insect-Resistant Plants: RNAi-Mediated Crop Protection. *Trends in Biotechnology*. 2017;35(9):871-882. doi:10.1016/j.tibtech.2017.04.009

EIKONEΣ

Bioneer Pacific - Print. Bioneer.com.au. <https://bioneer.com.au/Special-Pages/Print.aspx?printpath=/Products/DNA-RNA-Preparation-Kits/Single-Spin-Column-type-Nucleic-Acid-Extraction-Ki/Fragment-DNA-Purification-Kits/AccuPrep%C2%AE-PCR-Purification-Kit&classname=CMS.MenuItem>. Published 2019.

Merck. Nucleic Acid Electrophoresis Protocols & Introduction. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/nucleic-acid-electrophoresis.html>. Published 2010.

New England Biolabs. Monarch® Plasmid Miniprep Kit | NEB. Neb.com. <https://www.neb.com/products/t1010-monarch-plasmid-miniprep-kit#Protocols,%20Manuals%20%20Usage>. Published 2017. Accessed September 10, 2019.

New England Biolabs. Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) | Purification Kits | NEB. Neb.com. <https://international.neb.com/products/t1030-monarch-pcr-dna-cleanup-kit-5-ug#Product%20Information>. Published 2016. Accessed September 10, 2019.

PCR | BioNinja. Bioninja.com.au. <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>. Published 2019. Accessed September 10, 2019.

PCR Clean-up Gel Extraction User Manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Midi NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Maxi.; 2018.

https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSPCRGelMidi.pdf. Accessed September 10, 2019.

Roger D. yellow fever mosquito - *Aedes aegypti* (Linnaeus). Ufl.edu. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm. Published 2017. Accessed September 5, 2019.

Vector Disease Control International. Life Cycle: Mosquito Biology 101. Vdci.net. <http://www.vdci.net/mosquito-biology-101-life-cycle>. Published 2017. Accessed September 5, 2019.
www.upane.it U. GISD. iucngisd.org. <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=109>. Published 2009.