

Περίληψη

Τα μακρά μη-κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs) αποτελούν έναν τύπο μορίων RNA που αναδείχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες ως σημαντικοί ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας. Η αλληλεπίδραση τους με το γονιδιωματικό DNA, άλλα RNA μετάγραφα ή πρωτεΐνες, έχει αποδειχτεί πως μπορεί να είναι καθοριστική στη διατήρηση ζωτικών λειτουργιών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αρκετές μελέτες σε εντόμα, οργανισμούς μοντέλα, όπως η φρουτόμυγα *D. melanogaster* και ο σκόρος *B. mori* έχουν αποκαλύψει το ρόλο των lncRNAs σε σημαντικές διαδικασίες όπως η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή και η ανοσία. Από την άλλη οι πληροφορίες για το ρόλο και τις λειτουργίες των lncRNAs σε έντομα-φορείς ασθενειών, όπως τα κουνούπια είναι περιορισμένες.

Η παρούσα διατριβή είχε ως στόχο να καλύψει αυτό το κενό διερευνώντας τα χαρακτηριστικά και τις λειτουργίες των lncRNAs στα δύο σημαντικότερα κουνούπια του γένους *Aedes*: τα *Ae. albopictus* και *Ae. aegypti*. Αυτά τα δύο είδη είναι οι κύριοι φορείς διαφόρων ιών, όπως ο Zika, ο δάγκειος πυρετός, ο chikungunya και ο κίτρινος πυρετός. Η αντιμετώπιση των παραπάνω ιών αποτελεί κυρίαρχο ζήτημα καθώς ευθύνονται για πολλά κρούσματα ασθενειών και επιδημίες σε όλο τον κόσμο. Σκοπός της διατριβής ήταν να διαλευκανθεί ο ρόλος συγκεκριμένων lncRNAs σε τρία βιολογικά συστήματα που έχουν ιδιαίτερες προοπτικές για την ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου των κουνουπιών: το αναπαραγωγικό σύστημα, το ανοσοποιητικό και την ανάπτυξη των προνυμφών.

Για την ανίχνευση των lncRNAs σε κάθε σύστημα ακολουθήθηκε μία παρόμοια μεθοδολογία. Αρχικά, διεξήχθη μια εκτενής ανάλυση γονιδιωματικών και μεταγραφομικών δεδομένων για τον χαρακτηρισμό διαφορετικά εκφρασμένων lncRNAs των κουνουπιών σε συνθήκες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή, την ανοσία ή την ανάπτυξη των προνυμφών. Στη συνέχεια, το προφίλ έκφρασης των επιλεγμένων lncRNAs επικυρώθηκε μέσω ποσοτικής Real-Time PCR και η έκφραση των γονιδίων στοχεύθηκε μέσω RNAi μεθοδολογιών. Η ενεργοποίηση του RNAi πραγματοποιήθηκε μέσω της μικροέγχυσης dsRNA σε ενήλικα κουνούπια. Η φαινοτυπική επίδραση της αποσιώπησής των lncRNAs αξιολογήθηκε για να προσδιοριστεί ο πιθανός ρόλος τους στα υπό μελέτη συστήματα.

Αρχικά, η αναπαραγωγική ανάλυση του *Ae. albopictus* επικεντρώθηκε στη διαλεύκανση του ρόλου lncRNA των οποίων η έκφραση επαγόταν στις ωοθήκες έπειτα από ένα γεύμα αίματος. Η στόχευση έξι lncRNAs οδήγησε τα κουνούπια σε μειωμένη ωοαπόθεση. Εν συνεχεία, τα πειράματα εστίασαν στο ρόλο ενός (Norma3) λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του και της έντονης επίδρασής που είχε η απουσία του στην ωοαπόθεση και την εκκόλαψη των αυγών. Η αποσιώπηση του Norma3 προκάλεσε σημαντικότερη μείωση των ποσοστών ωοαπόθεσης (47%) και εκκόλαψης των αυγών (53%). Παρατηρήθηκαν παράλληλα και άλλοι ελλαττωματικοί φαινότυποι, όπως καθυστερημένη ανάπτυξη των ωοθηκών και προβληματική εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η ανάλυση του ρόλου lncRNAs στην ανοσολογική απόκριση του *Ae. aegypti* εστίασε στη σχέση του με τον ιό Zika. Εντοπίστηκαν διαφορετικά εκφρασμένα lncRNAs έπειτα από μόλυνση με τον Zika και εξετάστηκε η επίδραση τους στην εξάπλωση του ιού καθώς και στην επιρροή που έχει η απουσία τους για το ανοσοποιητικό σύστημα. Τρία lncRNAs (Zinc1, Zinc2, Zinc22) εμφάνισαν σημαντικό αντίκτυπο στην ανοσία, καθώς η αποσιώπησή τους ενίσχυσε την ανοσολογική απόκριση και μείωσε σημαντικά την ένταση του ιού. Επιπλέον, η στόχευση δύο lncRNAs (Zinc22, Zinc9) επηρέασε τη γονιμότητα και την εκκόλαψη των αυγών του,

υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο τους στο αντιστάθμισμα αναπαραγωγής ανοσίας (reproduction-immunity trade off).

Η μελέτη αναπτυξιακών γονιδίων του *Ae. albopictus* στηρίχθηκε στην lncRNAs με αποκλειστική έκφραση στις προνύμφες γονιδίων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη μεταμόρφωση τους σε νύμφες. Αρκετά γονίδια εμφανίστηκαν υπερεκφρασμένα στις προνύμφες και εν συνεχεία επιχειρήθηκε η σίγηση τους. Αντί της μικροέγχυσης προκρίθηκε η χορήγηση στις προνύμφες διαγονιδιακών στλεχών *E. coli* με ικανότητα παραγωγής δίκλωνου RNA. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών έδειξαν ότι η σίτιση με βακτήρια ήταν ανεπαρκής μέθοδος για την ενεργοποίηση της απόκρισης RNAi. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με δημοσιευμένες μελέτες που υποστηρίζουν πως οι μεθοδολογίες τους προκάλεσαν επαρκή σίγηση.

Εκτός από την ταυτοποίηση συγκεκριμένων lncRNAs που επηρεάζουν την αναπαραγωγή και την ανοσία των κουνουπιών *Aedes albopictus* και *Aedes aegypti*, η βιοπληροφορική μας μελέτη επιβεβαίωσε την υψηλή εξειδίκευση των lncRNAs και στα *Aedes*, όπως ήδη έχει αναφερθεί και σε άλλα είδη. Τα lncRNAs του *Ae. albopictus* παρουσίασαν εξαιρετικά υψηλή ειδο-ειδικότητα, καθώς 7.827 από τα 7.900 χαρακτηρισμένα lncRNAs (99%) δεν εμφάνιζαν καμία ομολογία της αλληλουχίας τους με άλλα είδη εντόμων. Ο αντίστοιχος αριθμός ειδο-ειδικών lncRNAs του *Ae. aegypti* ήταν 3.6403 από τα 4.709 χαρακτηρισμένα γονίδια (77,4%).

Συνολικά, η παρούσα μελέτη παρουσίασε για πρώτη φορά ειδο-ειδικά lncRNAs με μεγάλες δυνατότητες χρήσης τους σε προσεγγίσεις ελέγχου των παρασιτικών εντόμων, ιδίως τα Norma3 και Zinc22 δύο lncRNA που ρυθμίζουν τη γονιμότητα των θηλυκών κουνουπιών *Ae. albopictus* και *Ae. aegypti*. Η ειδο-ειδικότητα αποτελεί σημαντικότατο ζήτημα κατά την ανάπτυξη των εντομοκτόνων, λόγω των σοβαρών βλαβών που προκαλούν σε έντομα μη-στόχους, όπως τα ωφέλιμα έντομα, οι επικονιαστές και οι φυσικοί θηρευτές. Η ειδο-ειδικότητα σε συνδυασμό με την υψηλή αποτελεσματικότητα είναι οι απώτεροι στόχοι κατά την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων για τον έλεγχο των εντόμων. Η υψηλή ειδο-ειδικότητα των επιλεγμένων lncRNAs σε συνδυασμό με τη λειτουργική τους σημασία τα καθιστούν ιδανικούς υποψήφιους μοριακούς στόχους νέων φυτοφαρμάκων.