

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

“Διερεύνηση του ρόλου ενός μακρού μη κωδικοποιητικού RNA, *Maiden 4*, στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus*”



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΧΡΙΣΤΟΓΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2026

Θέμα πτυχιακής εργασίας:

“ Διερεύνηση του ρόλου ενός μακρού μη κωδικοποιητικού RNA *Maiden 4*, στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus* ”

Thesis topic:

“ Investigation of the role of a long non coding RNA, *Maiden 4*, in the reproductive capacity of female *Aedes albopictus* mosquitoes ”

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας έλαβε χώρα στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Λάρισα, κατά το χρονικό διάστημα Μαρτίου 2024 - Δεκεμβρίου 2024 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Μαθιόπουλου και της υποψήφιας διδάκτορα κα. Λ. Κατσιαμάνη.

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Γιακουντής Αντώνιος**

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

### **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να βρίσκομαι στο εργαστήριο και την εμπιστοσύνη του να δουλέψω πάνω σε ένα τόσο σπουδαίο και συνάμα ενδιαφέρον project. Στο ίδιο πλαίσιο, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής τον κ. Αντώνιο Γιακουντή και την κα. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της πτυχιακής εργασίας μου.

Οφείλω, ιδιαιτέρως, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Λευκή Κατσιαμάνη που ήταν πάντα εκεί για να με καθοδηγεί και να με βοηθάει σε κάθε βήμα της πτυχιακής εργασίας μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το πολύ ευχάριστο κλίμα.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αδιάλειπτη στήριξη τους, δίνοντας μου κουράγιο να ξεπερνώ τα εμπόδια και να πετυχαίνω τους στόχους μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ραγδαία πρόοδος του κλάδου της γονιδιωματικής και η αναβάθμιση των παραδοσιακών τεχνικών αλληλούχησης αποτέλεσε το καθοριστικό βήμα για την ανίχνευση μεγαλύτερου αριθμού μακρών μη κωδικοποιητικών RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs), ο ρόλος των οποίων έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια λόγω του έντονου ρυθμιστικού τους χαρακτήρα σε ποικίλες αναπτυξιακές διεργασίες. Η ειδο-ειδική και ιστο-ειδική φύση των μορίων αυτών τα καθιστά ιδανικά για την ανάπτυξη καινοτόμων και φιλικότερων προς το περιβάλλον μεθόδων πληθυσμιακού ελέγχου των εντόμων.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου ενός μακρού μη κωδικοποιητικού RNA (lncRNA), *Maiden 4*, στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus*. Το κουνούπι *Aedes albopictus* επιλέχθηκε μιας και αποτελεί απειλή για την δημόσια υγεία καθώς μπορεί να μεταδώσει πολλές σοβαρές ασθένειες για τον άνθρωπο. Το συγκεκριμένο γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για ένα μακρό μη κωδικοποιητικό RNA (lncRNA), επιλέχθηκε γιατί εμφανίζει αύξηση της έκφρασης στις ωοθήκες και στα έμβρυα του *Aedes albopictus* μετά από λήψη γεύματος αίματος, γεγονός που υπογραμμίζει τον πιθανό ρυθμιστικό του ρόλου στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών. Παράλληλα, υπάρχει και η ένδειξη ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο μεταφέρεται αυτούσιο από τα θηλυκά κουνούπια στα έμβρυα, στα πολύ αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, λίγο πριν την ενεργοποίηση της ζυγωτικής έκφρασης και μάλιστα στην πορεία εκφράζεται και από τα ίδια τα έμβρυα.

Για την διαλεύκανση τόσο του πιθανού ρυθμιστικού ρόλου του γονιδίου στις ωοθήκες όσο και της πιθανής εμπλοκής του στην διαδικασία του MZT (Maternal to Zygotic Transition) στα έμβρυα αξιοποιήθηκε η τεχνολογία RNAi για την σίγηση του γονιδίου *Maiden 4*. Σε μετέπειτα στάδιο αφού επιβεβαιώθηκε μοριακά η μεταγραφική σίγηση του γονιδίου *Maiden 4*, ακολούθησε παρατήρηση του φαινοτύπου. Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας ελέγχθηκαν, ειδικότερα, το ποσοστό εκκολαψιμότητας των αυγών και η ικανότητα ανάπτυξης των απογόνων.

## ABSTRACT

The rapid progress in the field of genomics and the upgrading of traditional sequencing techniques to more modern and large-scale sequencing techniques has been the decisive step for the detection of a larger number of long non-coding RNAs (lncRNAs), which have emerged in recent years due to their strong regulatory character in a variety of developmental processes. The species- and tissue-specific nature of these molecules makes them ideal for the development of innovative and environmentally friendly methods of insect population control.

The aim of this thesis is to investigate the role of a long non-coding RNA, *Maiden 4*, in the reproductive capacity of female *Aedes albopictus* mosquitoes. The *Aedes albopictus* mosquito was chosen since it is a threat to public health as it can transmit many serious human diseases. This gene, which encodes a long non-coding RNA (lncRNA), was chosen because its expression is induced in the ovaries and embryos of *Aedes albopictus* after a blood meal, probably due to its potential regulatory role in the reproductive capacity of female mosquitoes. At the same time, there is also evidence that this transcript is transferred unaltered from female mosquitoes to embryos in the very early stages of embryogenesis, shortly before activation of zygotic expression, and indeed in the process is expressed by the embryos themselves. To elucidate both the possible regulatory role of the gene in the ovaries and its possible involvement in the Maternal to Zygotic Transition (MZT) process in embryos, RNAi technology was utilized to silence the *Maiden 4* gene. At a later stage after molecularly confirming the transcriptional silencing of the *Maiden 4* gene, observation of the phenotype followed. In this thesis, in particular, the hatching rate of the eggs and the growth rate of the offspring were tested.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	
ABSTRACT.....	
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>1.1 Μη κωδικοποιητικά RNAs (non coding RNAs).....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs).....	11
1.1.2 Ταξινόμηση των lncRNAs.....	12
1.1.3 Μηχανισμοί δράσης των lncRNAs.....	14
1.1.4 Ρόλος των lncRNAs στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων.....	15
<b>1.2 Maternal to zygotic transition (MZT).....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Στάδια και μηχανισμοί του MZT.....	17
1.2.2 Ρόλος του MZT στην ανάπτυξη των εντόμων.....	20
1.2.3 Συγκριτική ανάλυση του MZT μεταξύ διαφορετικών ειδών.....	21
1.2.4 Συμμετοχή των lncRNAs στο MZT.....	22
1.2.5 Εφαρμογές του MZT στον έλεγχο των εντόμων.....	23
<b>1.3 Το Ασιατικό Κουνούπι Τίγρης <i>Aedes albopictus</i>.....</b>	<b>24</b>
1.3.1. Προέλευση και Εξάπλωση.....	24
1.3.2. Φορέας λοιμωδών ασθενειών.....	25
1.3.3. Βιολογικός κύκλος.....	25
<b>1.4 Μέθοδοι αντιμετώπισης πληθυσμού κουνουπιών.....</b>	<b>26</b>
1.4.1 Παραδοσιακές βιολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης.....	27
1.4.2 Παραδοσιακές χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης.....	27
<b>1.5 Μέθοδος παρεμβολής του RNA (RNAi).....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Μηχανισμός δράσης του RNAi.....	28
1.5.2 Αξιοποίηση τεχνολογίας RNAi ως εργαλείο για την καταπολέμηση των εντόμων.....	29
1.5.3 Μέθοδοι χορήγησης του dsRNA στα έντομα.....	31
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>33</b>

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

<b>3.1</b> Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού κουνουπιών <i>Aedes Albopictus</i> και εργαστηριακές συνθήκες.....	<b>34</b>
<b>3.2</b> Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων.....	<b>34</b>
3.2.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction).....	<b>34</b>
3.2.2 Επεξεργασία με DNase I (DNase Treatment).....	<b>35</b>
3.2.3 Σύνθεση cDNA (cDNA Treatment).....	<b>37</b>
3.2.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis).....	<b>37</b>
3.2.5 Ανάκτηση μορίων DNA από γέλη αγαρόζης (Agarose Gel Extraction).....	<b>39</b>
<b>3.3</b> Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων.....	<b>40</b>
3.3.1 Σχεδιασμός εκκινητών για PCR και qPCR.....	<b>41</b>
3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με την χρήση T7 εκκινητών.....	<b>42</b>
3.3.3 Ποσοτική PCR (qPCR) ή PCR πραγματικού χρόνου.....	<b>43</b>
<b>3.4</b> Παραγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA).....	<b>45</b>
3.4.1 In vitro transcription.....	<b>45</b>
3.4.2 Επεξεργασία με DNase I (DNase Treatment).....	<b>46</b>
3.4.3 Κατακρήμνιση του dsRNA.....	<b>47</b>
<b>3.5</b> Χορήγηση του dsRNA μέσω μικροέγχυσης.....	<b>47</b>
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>4.1</b> Προφίλ έκφρασης γονιδίου στόχου- Επιβεβαίωση βιβλιογραφικών δεδομένων.....	<b>49</b>
4.1.1 Προφίλ έκφρασης του <i>Maiden 4</i> σε ωοθήκες και έμβρυα.....	<b>49</b>
4.1.2 Προφίλ έκφρασης του <i>Maiden 4</i> στους διάφορους ιστούς και στα αρσενικά κουνούπια.....	<b>50</b>
<b>4.2</b> Ενίσχυση γονιδίων στόχων και επιβεβαίωση της.....	<b>51</b>
4.2.1 Ενίσχυση του γονιδίου <i>Maiden 4</i> με την χρήση T7 εκκινητών.....	<b>51</b>

4.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου <i>GFP</i> με την χρήση T7 εκκινητών.....	52
4.3 Παραγωγή dsRNA έναντι των <i>Maiden 4</i> και <i>GFP</i> .....	53
4.4 Μικροέγχυση των dsRNA μορίων σε πληθυσμούς ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών.....	54
4.5 Επιβεβαίωση της μεταγραφικής σίγησης του <i>Maiden 4</i> .....	54
4.6 Φαινοτυπικός έλεγχος του ποσοστού εκκολασιμότητας των αυγών και της ικανότητας ανάπτυξης των απογόνων.....	55
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>56</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>60</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Μη κωδικοποιητικά RNAs (non coding RNAs)

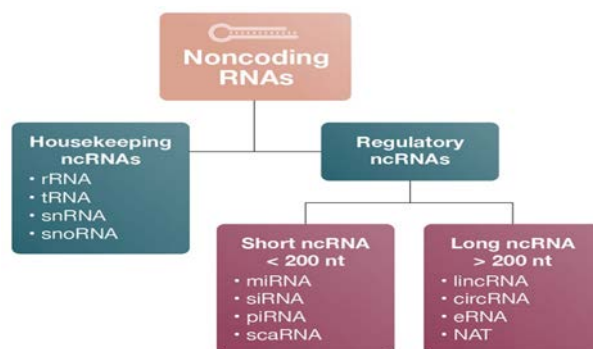
Πρόσφατες υψηλής απόδοσης μεταγραφομικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι περίπου το 90% του ανθρώπινου γονιδιώματος μεταγράφεται σε RNA[1]. Ωστόσο, μόνο το 1-2% αυτών των μεταγράφων κωδικοποιούν για πρωτεΐνες ενώ η πλειοψηφία τους χαρακτηρίζονται ως μη-κωδικοποιητικά μετάγραφα (ncRNAs)[1]. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση κατέδειξε ότι το ποσοστό των αλληλουχιών των μη κωδικών μεταγράφων αυξάνεται δραματικά όσο προχωράμε σε εξελικτικά πολυπλοκότερους οργανισμούς[1]. Μια πιθανή βιολογική υπόθεση για αυτή την παρατήρηση είναι η πιθανή ρυθμιστική ικανότητα που φέρουν αυτά τα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (ncRNAs)[1]. Η ύπαρξη μη κωδικοποιητικών μορίων RNAs, όπως είναι τα rRNAs και τα tRNAs έχει αναγνωριστεί από την δεκαετία του 1950. Ολόκληρες οικογένειες νέων γονιδίων που παράγουν ncRNAs έχουν αναγνωριστεί από τότε[2]. Τα μη κωδικοποιητικά RNAs (ncRNAs) έχουν αναδειχθεί ως μια κρίσιμη κατηγορία μορίων στον τομέα της μοριακής βιολογίας[2]. Στο παρελθόν, το επίκεντρο της γενετικής έρευνας εστιαζόταν κυρίως στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες, διότι θεωρούνταν ότι ήταν οι κύριοι παράγοντες στην ρύθμιση και την εκτέλεση κυτταρικών λειτουργιών[2]. Ωστόσο, με την πρόοδο της τεχνολογίας και των ερευνητικών τεχνικών έχει γίνει ολοένα και πιο προφανές πως τα ncRNAs παίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες[1,2]. Η ανακάλυψη των μη κωδικοποιητικών μορίων RNA έφερε επανάσταση στην κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης και ρύθμισης καθώς συμμετέχουν σε ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της μεταγραφικής ρύθμισης, της μετά-μεταγραφικής ρύθμισης και των επιγενετικών τροποποιήσεων [1].

Τα ncRNAs μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση την βιολογική τους λειτουργία[1,3]:

1] Ιδιοσυστάτα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (housekeeping) μεταξύ των οποίων: τα rRNAs, τα tRNAs, τα snRNAs και τα snoRNAs. Και οι τέσσερις τύποι μεταγράφων εκφράζονται συνεχώς για να εξελίσσονται ομαλά βασικές λειτουργίες του κυττάρου (πρωτεϊνοσύνθεση, μάτισμα).

2] Ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά μετάγραφα (regulatory) τα οποία διαχωρίζονται με βάση το μήκος του σε:

- Μικρά μη-κωδικά RNA μόρια: < 200 νουκλεοτιδίων στα οποία εντάσσονται : τα miRNAs, τα siRNAs, τα piRNAs και τα scaRNAs. Συμπεριλαμβάνονται και τα snRNAs, snoRNAs ιδιοσυστάτα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα.
- Μακρά μη-κωδικά RNA μόρια: > 200 νουκλεοτιδίων στα οποία εντάσσονται: τα lincRNAs, τα circRNAs, τα eRNAs και τα NAT. Συμπεριλαμβάνονται και τα rRNAs, tRNAs ιδιοσυστάτα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα.



Εικόνα 1. Ταξινόμηση των μη κωδικοποιητικών μορίων RNA[3].

### 1.1.1 Μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (lncRNAs)

Μια κατηγορία ncRNAs είναι τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (lncRNAs). Πρόκειται για ιστο-ειδικά μετάγραφα των οποίων το μήκος ξεπερνάει τα 200 νουκλεοτίδια, μπορούν να μεταγραφούν από οποιονδήποτε κλώνο του DNA και δεν διαθέτουν δυνατότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά μερικά διαθέτουν μικρά ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs). Η πλειοψηφία των χαρακτηρισμένων lncRNAs είναι μετάγραφα της RNA πολυμεράσης-II. Για αυτό παρουσιάζουν σημαντικές δομικές ομοιότητες με τα mRNAs και διαθέτουν 5'καλύπτρες και 3'πολυ-A ουρές[4]. Πολλά lncRNAs υφίστανται ανεπαρκή επεξεργασία και για αυτό παραμένουν εντός του πυρήνα, ενώ άλλα υφίστανται ολοκληρωμένη επεξεργασία (ορθό μάτισμα) και μπορούν να εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα. Είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα mRNAs και διαθέτουν μικρότερο αριθμό εξονίων, λόγω του αναποτελεσματικού μάτισματος[5], ενώ τα επίπεδα έκφρασής τους είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα των mRNAs. Εξίσου σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα lncRNA παρουσιάζουν χαμηλή συντήρηση στην πρωτοταγή δομή τους (αλληλουχία νουκλεοτιδίων) στα διαφορετικά είδη (ειδο-ειδικά), αλλά υπάρχει υψηλότερη συντήρηση στις δευτεροταγείς και τριτοταγές δομές τους. Αυτό συμβαίνει επειδή οι λειτουργίες των lncRNAs βασίζονται κυρίως στην δομή τους και αυτές δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ειδών[6,7]. Τα lncRNAs έχουν ποικίλες ρυθμιστικές λειτουργίες κυρίως σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ελέγχοντας, μεταξύ άλλων, την ανάπτυξη, τον μεταβολισμό και την κυτταρική διαφοροποίηση[7]. Έχει αποδειχθεί ότι τα μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και άλλα μη κωδικοποιητικά RNA, όπως τα miRNAs, για να σχηματίσουν λειτουργικά σύμπλοκα που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Διαθέτουν επίσης την ικανότητα να ρυθμίζουν την μετα-μεταφραστική λειτουργία των πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλιώσεων, ακετυλιώσεων και ουβικουιτινιλιώσεων[4]. Τα χαρακτηριστικά τους αυτά τα καθιστούν καλούς στόχους για ειδο- και ιστο-ειδικές προσεγγίσεις.

Όπως τα mRNAs έτσι και τα lncRNAs μπορούν να σιγηθούν και κατά συνέπεια να μειορρυθμιστούν από miRNAs. Συνεπώς, και σε αυτά τα μόρια RNA μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνολογία RNAi[8].

## 1.1.2 Ταξινόμηση των lncRNAs

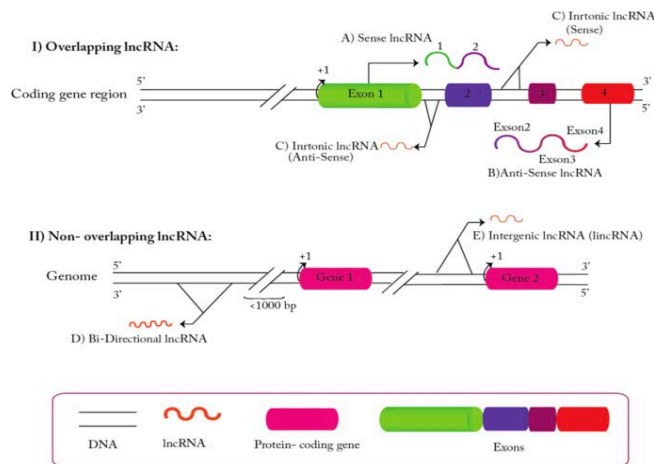
Τα lncRNAs κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον γονιδιακό τόπο από τον οποίο μεταγράφονται και συγκεκριμένα σε σχέση με την θέση των πλησιέστερων κωδικών γονιδίων[9,10]:

1] Αλληλεπικαλυπτόμενα (overlapping) lncRNAs, τα οποία ομαδοποιούνται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες:

- Νοηματικά (sense) lncRNAs: Μεταγράφονται από την ίδια αλυσίδα με τα γειτονικά κωδικοποιητικά γονίδια και μπορεί να περιλαμβάνουν εξόνια ή ιντρόνια τους. Συχνά μπορεί να αλληλεπικαλύπτουν τμήμα ή ολόκληρη την αλληλουχία των γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων.
- Αντινοηματικά (antisense) lncRNAs: Μεταγράφονται από τον αντίθετο κλώνο από τον οποίο μεταγράφονται τα γειτονικά κωδικοποιητικά γονίδια. Μπορεί να αλληλεπικαλύπτουν τμήμα ή ολόκληρη την αλληλουχία των γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων.
- Ιντρονικά (intronic) lncRNAs: Μεταγράφονται είτε από την νοηματική είτε από την αντινοηματική αλυσίδα ενός ιντρονίου ενός γειτονικού κωδικοποιητικού γονιδίου και πιθανόν να αλληλεπικαλύπτεται με εξονική περιοχή του.

2] Μη αλληλεπικαλυπτόμενα (non-overlapping) lncRNAs, τα οποία ομαδοποιούνται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες:

- Αμφίδρομα (bidirectional) lncRNAs: Μεταγράφονται προς αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με τα γειτονικά κωδικοποιητικά γονίδια.
- Μεσογονιδιακά (intergenic) lncRNAs: Μεταγράφονται ως ξεχωριστή μονάδα μεταξύ δύο κωδικοποιητικών γονιδίων και συνήθως ρυθμίζουν τα μετάγραφα (mRNAs) των γονιδίων αυτών. Μάλιστα, δεν εμφανίζουν αλληλοεπικάλυψη με την αλληλουχία των κωδικοποιητικών γονιδίων.
- Ιντρονικά (intronic) lncRNAs: Μεταγράφονται είτε από την νοηματική είτε από την αντινοηματική αλυσίδα ενός ιντρονίου ενός γειτονικού κωδικοποιητικού γονιδίου και μπορεί να μεταγράφεται αυστηρά η ιντρονική αλληλουχία χωρίς να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη με εξονική περιοχή κωδικοποιητικού γονιδίου.



Εικόνα 2. Ταξινόμηση των μακρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (lncRNAs) με βάση τον γονιδιακό τόπο μεταγραφής[11].

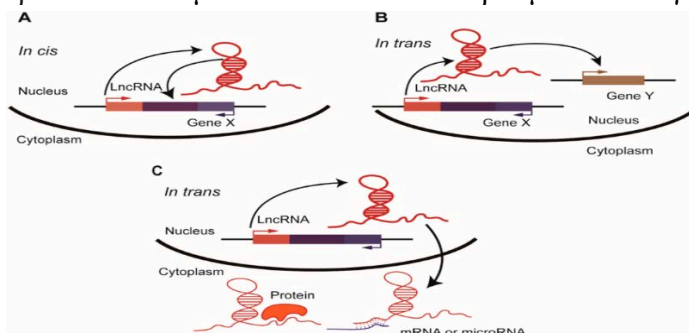
Έχουν εντοπιστεί και lncRNAs τα οποία μεταγράφονται από μη κωδικοποιητικές περιοχές. Ειδικότερα[12]:

- Σχετιζόμενα με ενισχυτές lncRNAs (eRNAs): Μεταγράφονται από ενισχυτές που ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων. Ένα παράδειγμα αποτελεί το eNEMAL.
- Σχετιζόμενα με υποκινητές lncRNAs (Prompts): Μεταγράφονται από τον αντίθετο κλώνο που βρίσκεται ο υποκινητής ενός γειτονικού γονιδίου.

Έχει βρεθεί ότι τα lncRNAs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και την χρωματίνη, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να έχουν δυναμική επίδραση σε αλληλουχίες DNA. Έτσι, μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε τα lncRNAs και με βάση τον τρόπο που επιδρούν πάνω στο DNA σε[13,14]:

1] cis-acting lncRNAs: Ρυθμίζουν την έκφραση γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων, συχνά στο ίδιο χρωμόσωμα. Ένα παράδειγμα τέτοιου lncRNA αποτελεί το XIST το οποίο συμμετέχει στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X στα θηλυκά θηλαστικά.

2] trans-acting lncRNAs: Ρυθμίζουν την έκφραση κωδικοποιητικών γονιδίων που εντοπίζονται σε απομακρυσμένους γενετικούς τόπους. Η δράση τους δεν περιορίζεται αποκλειστικά και μόνο στο ίδιο χρωμόσωμα, αλλά επεκτείνεται σε απομακρυσμένες γενετικές περιοχές, ακόμα και σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Ένα παράδειγμα τέτοιου lncRNA αποτελεί το HOTAIR, το οποίο δρά ως "μοριακή σκαλωσιά" για πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία θα ρυθμίσουν επιγενετικά την γονιδιακή έκφραση.



### 1.1.3 Μηχανισμοί δράσης των lncRNAs

Τα lncRNAs των οποίων οι μηχανισμοί δράσης έχουν χαρακτηριστεί, φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών του ανθρώπινου οργανισμού. Συγκεκριμένα, μπορούν και ελέγχουν την γονιδιακή έκφραση σε πολλαπλά επίπεδα καθώς αποκτούν πολλές διαφορετικές δευτεροταγείς δομές οι οποίες συνδέονται με πληθώρα υποστρωμάτων. Μεταξύ άλλων αλληλεπιδρούν με νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) και πρωτεΐνες ρυθμίζοντας την δομή και λειτουργία της χρωματίνης, την μεταγραφή γειτονικών και απομακρυσμένων γονιδίων αλλά και επηρεάζοντας την μετα-μεταγραφική ρύθμιση των κωδικοποιητικών RNA (RNA-splicing), την σταθερότητα των μεταγράφων και την μετάφραση[4,15]. Η μοριακή δράση ενός lncRNA καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον εντοπισμό του μέσα στο κύτταρο[16]. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα lncRNAs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, με εξαίρεση μερικά τα οποία εντοπίζονται και στα δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα[16,17].

Αναλυτικότερα, οι μηχανισμοί δράσης και οι βιολογικές λειτουργίες των lncRNAs παρουσιάζονται παρακάτω:

Στον πυρήνα:

- 1] **Σηματοδοτικά lncRNA** (signaling lncRNAs): Εκφράζονται ως απόκριση σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος και λειτουργούν ως μοριακά σινιάλα, ρυθμίζοντας θετικά ή αρνητικά την διαδικασία της μεταγραφής[18].
- 2] **lncRNA-οδηγοί** (guide lncRNAs): Συμμετέχουν στην καθοδήγηση και μεταφορά διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων (ενεργοποιητών, καταστολέων) και τροποποιητών της χρωματίνης (μεθυλοτρανσφεράσες, ακετυλοτρανσφεράσες, αποακετυλάσες) σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση[18].
- 3] **lncRNA ενισχυτές** (enhancer lncRNAs): Παράγονται από ενεργούς ενισχυτές και συμβάλλουν στην ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης γειτονικών κωδικοποιητικών γονιδίων είτε αλλάζοντας την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική της χρωματίνης είτε στρατολογώντας μεταγραφικούς παράγοντες[18].
- 4] **lncRNA-δολώματα** (decoy lncRNAs): Συνδέονται με μεταγραφικούς παράγοντες, τροποποιητές της χρωματίνης, παράγοντες ματίσματος και άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (RNPs). Με αυτό τον τρόπο αποκλείουν τις ρυθμιστικές αυτές πρωτεΐνες από το να έχουν πρόσβαση σε ρυθμιστικά στοιχεία του DNA και έτσι δεν ασκούν τις δράσεις τους[18].
- 5] **lncRNA-εμπλεκόμενα στο μάτισμα**: Συμμετέχουν στην ρύθμιση της διαδικασίας του ματίσματος, αλληλεπιδρώντας είτε άμεσα με πρόδρομα μόρια mRNAs είτε με παράγοντες ματίσματος[15].

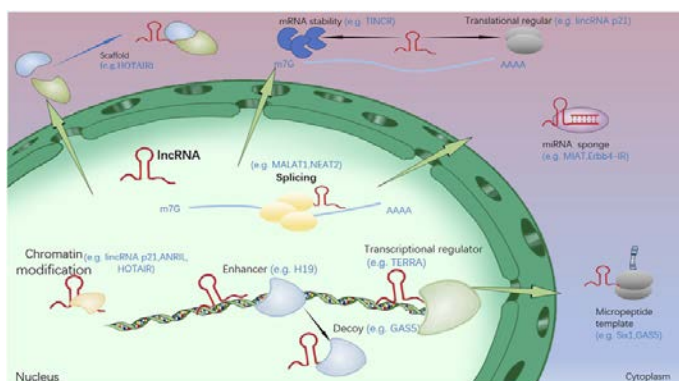
Στο κυτταρόπλασμα:

1] **lncRNA-ικριώματα** (scaffold lncRNAs): Δρουν ως κεντρικός σκελετός που μπορεί να δεσμεύσει διάφορες πρωτεΐνες βοηθώντας την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Κατά συνέπεια δημιουργούνται πρωτεϊνικά σύμπλοκα[18].

2] **lncRNA-εμπλεκόμενα στην σταθερότητα και μετάφραση των mRNa:** Αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες (RBPs) που συνδέονται στην 3'UTR καθώς επίσης μπλοκάρουν την σύνδεση των μικρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (microRNAs) στα mRnas-στόχους. Έτσι, επηρεάζουν τον ρυθμό αποικοδόμησης, τα επίπεδα έκφρασης των mRnas και καθορίζουν εν τέλει τα επίπεδα παραγωγής πρωτεϊνών[15].

3] **lncRNA-μοριακοί σπόγγοι για miRNAs** (miRNAs sponges): Ανταγωνίζονται miRNAs με τα οποία εμφανίζουν συμπληρωματικότητα. Κατά συνέπεια τα miRNAs δεν είναι πλέον διαθέσιμα να προσδεθούν στα mRna στόχους, εμποδίζοντας την αναστολή της μετάφρασης ή την αποικοδόμηση των συγκεκριμένων mRnas από τα miRNAs[15].

4] **Κωδικοποιητικά lncRNA** : Περιέχουν ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια και για αυτό αποτελούν υπόστρωμα για κωδικοποίηση μικρών λειτουργικών πεπτιδίων, γνωστά ως μικροπεπτίδια (micro peptides). Αυτά με την σειρά τους παρεμβάλλονται σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, αλληλεπιδρούν με άλλες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες ελέγχοντας την δράση τους αλλά και λειτουργούν ως ρυθμιστές της μεταγραφής επηρεάζοντας την επιγενετική κατάσταση του DNA και την αρχιτεκτονική της χρωματίνης[15].



Εικόνα 4. Οι λειτουργίες και οι μηχανισμοί δράσης των lncRNAs εντός του πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα[19].

#### 1.1.4 Ρόλος των lncRNAs στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων

Τα lncRNAs έχουν μελετηθεί εκτενώς σε φυτά και θηλαστικά και έχει εξακριβωθεί μάλιστα ότι εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές βιολογικές διεργασίες[21]. Τα τελευταία χρόνια έρευνες που επικεντρώνονται στον τομέα των lncRNAs στα έντομα έχουν αυξηθεί δραματικά, υποδεικνύοντας τον κομβικό τους ρόλο στην ανάπτυξη, στην ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα αλλά και στην αναπαραγωγή τους[20]. Το έντομο μοντέλο *Drosophila melanogaster* άνοιξε τον δρόμο για την μελέτη των

lncRNAs και των ρόλων που αυτά έχουν στα έντομα[21]. Ακολούθησαν έρευνες για τον λειτουργικό τους ρόλο και σε άλλα έντομα όπως η μέλισσα *Apis mellifera*, ο μεταξοσκώληκας *Bombyx mori* και τα κουνούπια του γένους *Aedes*. Έχουν βρεθεί ειδικά lncRNAs τα οποία στα συγκεκριμένα έντομα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγική τους ικανότητα. Ειδικότερα[20,21]:

1] *Drosophila melanogaster*: Μελέτες αποσιώπησης γονιδίων επιβεβαίωσαν την συμμετοχή αρκετών lncRNAs στην σπερματογένεση και στην γονιμότητα των αρσενικών φρουτόμυγων. Πιο συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν ορισμένα lncRNAs (CR44455/6, CR45542 και CR44420 TS1) τα οποία εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις των αρσενικών εντόμων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην συμπύκνωση της χρωματίνης και την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων κατά την ανάπτυξη των γονάδων. Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί και επιβεβαιωθεί η εμπλοκή ενός ακόμη lncRNA (CR43484) στα τελικά στάδια της σπερματογένεσης[21]. Επίσης, το *iab-8* αποτελεί ένα lncRNA το οποίο καταστέλλει την έκφραση ενός ομοιοτικού γονιδίου (*abd-A*) και απουσία του υπάρχει γενικευμένη στειρότητα[20,21]. Τέλος, ένα ειδικό για το αρσενικό αναπαραγωγικό όργανο lncRNA που ταυτοποιήθηκε είναι το (*msa*) και συμμετέχει ενεργά στην διαδικασία ανάπτυξης των δευτερογενών κυττάρων των επικουρικών αδένων στις αρσενικές φρουτόμυγες[21].

2] *Apis mellifera*: Έχουν ταυτοποιηθεί δύο ιντρονικά lncRNAs (*Lncov1* and *Lncov2*) τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στις ωοθήκες των εργατριών και των βασιλισσών μελισσών[21]. Το *Lncov1* υπερ εκφράζεται στις ωοθήκες των εργατριών μελισσών και σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο μέσω αυτοφαγίας κατά την μεταμόρφωση τους από προνύμφες σε νύμφες[22]. Το *Lncov2* παρουσιάζει υψηλή έκφραση στις ωοθήκες των βασιλισσών μελισσών και φαίνεται πως συμβάλλει στην ανάπτυξη και την διατήρηση της ενεργότητας των ωοθηκών[21].

3] *Bombyx mori*: Ένα lncRNA που βρέθηκε να υπερεκφράζεται στους όρχεις του αρσενικού *Bombyx mori* είναι το *Bmdsx-AS1*. Αυτό ρυθμίζει την εναλλακτική συρραφή του πρόδρομου *mRNA* του γονιδίου *doublesex* (*Bmdsx*), το οποίο εμπλέκεται λειτουργικά με την διαδικασία του φυλοκαθορισμού[20,21].

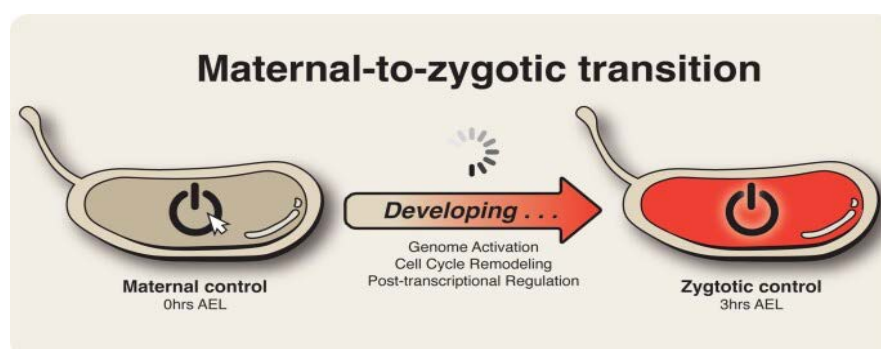
4] *Aedes aegypti*: Μια μελέτη με επίκεντρο το κουνούπι *Aedes aegypti* οδήγησε στην ταυτοποίηση 4.689 καινούριων lncRNAs, ορισμένα από τα οποία παρουσιάζουν στοιχεία μητρικής κληρονομησης και πρώιμης εμβρυϊκής έκφρασης. Επιπρόσθετα, υψηλή έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για κάποια από τα lncRNAs εντοπίστηκε στις ωοθήκες κουνουπιών μετά την κατανάλωση γεύματος αίματος. Μάλιστα, η έκφραση τους διαρκεί έως και τις 12 πρώτες ώρες της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Το γεγονός θέτει το ερώτημα αν αυτά τα lncRNAs μεταβιβάζονται αυτούσια από την μητέρα στο έμβryo, ένα φαινόμενο γνωστό ως MZT (maternal to zygotic transition), καθώς σε αυτό το διάστημα των 12 ωρών δεν έχει τεθεί σε λειτουργία η μεταγραφή του ζυγωτικού γονιδιώματος[21].

5] *Aedes albopictus*: Όπως και στο *Aedes aegypti* έτσι και στο *Aedes albopictus* πιθανολογείται ότι τα lncRNAs διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε ρυθμιστικές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων η ωογένεση και η ανάπτυξη των εμβρύων. Μια

μελέτη του 2019 οδήγησε στον χαρακτηρισμό 2.623 lncRNAs, εκ των οποίων τα 37 παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στα δύο φύλα. Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι σχετίζονται με την αναπαραγωγική ικανότητα των κουνουπιών έγιναν πειράματα σίγησης μέσω RNAi σε ένα υπερ-εκφρασμένο γονίδιο ενήλικου αρσενικού κουνουπιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πράγματι υπάρχει συσχέτιση με αναπαραγωγικές διαδικασίες, καθώς εντοπίστηκε μειωμένος ρυθμός εκκολασιμότητας των αυγών κατά 29,5% σε σχέση με τα φυσιολογικά[23]. Μια πιο πρόσφατη έρευνα του 2022, η οποία έλαβε χώρα στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, εντόπισε δέκα γονίδια που παράγουν lncRNAs τα οποία υπερ-εκφράζονται στις ωοθήκες θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus* έπειτα από λήψη γεύματος αίματος. Ακολουθώντας πάλι την μέθοδο παρεμβολής RNA (RNAi) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της τάξης του 43% της ωοαπόθεσης, 53% του ρυθμού εκκολασιμότητας των αυγών, ενώ διαπιστώθηκε και μείωση του μεγέθους των ωοθηκών[24].

## 1.2 Maternal to zygotic transition (MZT)

Το MZT αποτελεί μια θεμελιώδους σημασίας αναπτυξιακή διαδικασία για την ομαλή ανάπτυξη πολλών οργανισμών τόσο σπονδυλωτών όσο και ασπόνδυλων, καθώς σηματοδοτεί την μετάβαση από την αξιοποίηση των μητρικών μεταγράφων και πρωτεϊνών στην πλήρη ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος (ZGA) και άρα την ανεξαρτητοποίηση από τα μητρικά αποθέματα. Είναι ένα κρίσιμο γεγονός που διαδραματίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης λίγο μετά την γονιμοποίηση και συμβάλλει καθοριστικά στον έλεγχο βασικών πρωταρχικών αναπτυξιακών σταδίων μεταξύ των οποίων η κυτταρική διαφοροποίηση και η οργανογένεση. Πρόκειται για ένα εξελικτικά συντηρημένο φαινόμενο, αλλά με διαφοροποιήσεις κυρίως στην χρονική ρύθμιση μεταξύ των ειδών που αντανακλούν ειδικές προσαρμογές στην ανάπτυξη και το περιβάλλον τους[25].



Εικόνα 5. Γραφική απεικόνιση του MZT[26].

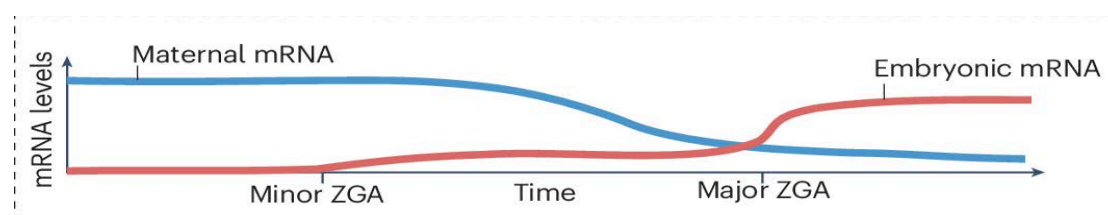
### 1.2.1 Στάδια και μηχανισμοί του MZT

Το μητρικό γονιδίωμα ελέγχει πρακτικά τις πρώτες φάσεις της εμβρυικής ανάπτυξης διαφόρων οργανισμών. Τα μητρικά RNAs και οι πρωτεΐνες, τα οποία έχουν αποθηκευτεί στο ωάριο κατά την ωογένεση, συμμετέχουν καθοριστικά σε βασικά βιοσυνθετικά μονοπάτια του εμβρύου, κατευθύνουν τις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις

και προσδιορίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Όσο η ανάπτυξη του εμβρύου συνεχίζεται, δύο κύριες κυτταρικές διαδικασίες πυροδοτούνται και από κοινού διαμορφώνουν τα στάδια του MZT[25]:

1] Αποικοδόμηση μητρικών RNA και πρωτεϊνών: Στην αρχή του MZT ξεκινά η πρώτη φάση αποικοδόμησης των μητρικών μεταγράφων και πρωτεϊνών με την βοήθεια προϊόντων μητρικής προέλευσης. Έπειτα, λαμβάνει χώρα η δεύτερη φάση αποικοδόμησης η οποία απαιτεί την σύνθεση νέων προϊόντων από το ζυγωτικό γονιδίωμα[26].

2] Ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος: Στην πορεία του MZT της *D. melanogaster* περίπου 100 γονίδια είναι μεταγραφικά ενεργά στις πρώτες 1-2 ώρες μετά την ωοτοκία, ενώ μερικές χιλιάδες από αυτά ενεργοποιούνται μετά από 2-3 ώρες. Αυτό υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος είναι μια σταδιακή διαδικασία που χαρακτηρίζεται από ένα μικρό και ένα μεγάλο μεταγραφικό κύμα, αντίστοιχα[26]. Κατά την διάρκεια του μικρού μεταγραφικού κύματος μεταγράφονται γονίδια απαραίτητα για την κυτταροποίηση, την οργάνωση της χρωματίνης μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων, τον φυλοκαθορισμό, την αντιστάθμιση της γονιδιακής δόσης, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs συμβάλλοντας στην αποικοδόμηση των μητρικών μορίων[26,28]. Τα γονίδια που μεταγράφονται κατά την φάση του μεγάλου κύματος εμπλέκονται κυρίως στην διαδικασία επιβράδυνσης της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου διαδικασία που καθορίζει το κυτταρικό πεπρωμένο και την διαφοροποίηση[29].



Εικόνα 6. Στάδια του MZT: Αποικοδόμηση μητρικών mRNA και ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος σε δύο φάσεις[30].

Η αποικοδόμηση των μητρικών RNA ρυθμίζεται με την συμμετοχή τόσο μητρικών όσο και ζυγωτικών μηχανισμών ελέγχου[26,27]:

- **Μητρικοί μηχανισμοί ελέγχου αποικοδόμησης μητρικών RNA:** Έχει παρατηρηθεί ότι πάνω από το 20% των μητρικών μεταγράφων αποσταθεροποιούνται από τους μητρικούς μηχανισμούς[25]. Τα γονίδια αυτά λειτουργούν ανεξάρτητα από το εάν το ωοκύτταρο έχει γονιμοποιηθεί και απουσία ζυγωτικών προϊόντων. Ένας πρωταρχικός ρυθμιστής του μονοπατιού αποικοδόμησης των μητρικών μεταγράφων είναι η RNA συνδεδεμένη πρωτεΐνη Smaug, η οποία εκτιμάται πως είναι υπεύθυνη για την αποσταθεροποίηση άνω των μισών μητρικών mRNA[26,27].
- **Ζυγωτικοί μηχανισμοί ελέγχου αποικοδόμησης μητρικών RNA:** Λειτουργούν σε περίπτωση που έχουν συμβεί η γονιμοποίηση και η ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος[26]. Έχει παρατηρηθεί ότι η δράση των ζυγωτικών μηχανισμών οφείλεται για ένα επιπλέον 15%

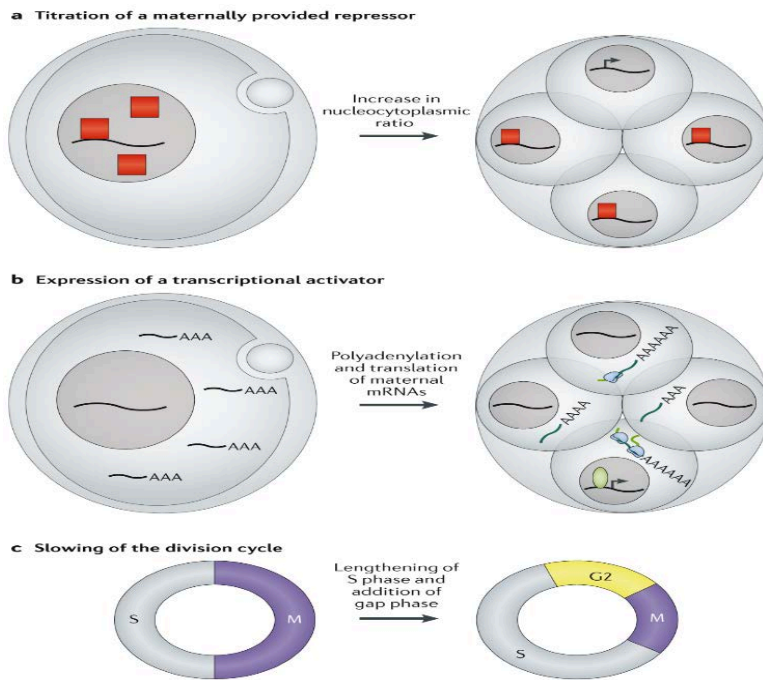
αποικοδόμησης των μητρικών μεταγράφων, φτάνοντας στο τέλος του MZT σε ποσοστό 35%[25]. Ένας βασικός μηχανισμός στηρίζεται στην συμμετοχή εξειδικευμένων μικρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (miRNAs), όπως το mir-309 στην *Drosophila*, το mir-430 στο zebrafish και το mir-427 στο *Xenopus*[26,27].

Η δυναμική ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος ελέγχεται από πολλαπλούς ανεξάρτητους μηχανισμούς, οι οποίοι επιδρούν καθοριστικά στο χρονικό παράθυρο της ενεργοποίησης. Παρακάτω φαίνονται αναλυτικά οι τρεις βασικότεροι μηχανισμοί ελέγχου[26].

1] Διάρκεια κυτταρικής διαίρεσης: Στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι κύκλοι διαίρεσης είναι πολύ σύντομοι, καθώς αποτελούνται μόνο από τις S και M φάσεις, χωρίς ενδιάμεσα διαστήματα (G1, G2 φάσεις). Συνεπώς, τα πρώιμα μετάγραφα τείνουν να είναι μικρά χωρίς ιντρόνια. Καθώς προχωρά η ανάπτυξη, η S φάση επιμηκύνεται, ενώ στην 14η πυρηνική διαίρεση προστίθεται και η G2 φάση. Με αυτόν τον τρόπο οι κύκλοι κυτταρικών διαιρέσεων επιβραδύνονται, επιτρέποντας τον συντονισμό πιο σύνθετων βιολογικών διεργασιών όσο αναπτύσσεται το έμβρυο[26, 27].

2] Αναλογία πυρηνικού περιεχομένου προς κυτταρόπλασμα ή N/C ratio: Η επιρροή του N/C ratio στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη διερευνάται περισσότερο από έναν αιώνα. Ένα μοντέλο που έχει προταθεί για αυτό υποθέτει πως κάποιος καταστολέας που έχει μεταφερθεί από την μητέρα και είναι παρών στο κυτταρόπλασμα του πρώιμου εμβρύου μειώνεται με την αύξηση της ποσότητας του DNA κατά την διάρκεια των αρχικών κυτταρικών διαιρέσεων. Αυτό οδηγεί σε ελάττωση της συγκέντρωσης του καταστολέα ανά μονάδα DNA. Έχει βρεθεί κιόλας πως όταν η συγκέντρωση του καταστολέα πέσει κάτω από ένα κρίσιμο όριο, αρχίζει προοδευτικά να ενεργοποιείται η ζυγωτική μεταγραφή[26]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα καταστολέων αποτελούν οι μητρικά μεταφερόμενες ιστόνες, που λειτουργούν ως μεταγραφικοί καταστολείς[26].

3] Παρουσία εξειδικευμένων μεταγραφικών ενεργοποιητών: Αρχικά θεωρούνταν πως ο καθορισμός του χρόνου ενεργοποίησης του ζυγωτικού γονιδιώματος εξαρτιόταν αποκλειστικά από μητρικά μεταφερόμενους καταστολείς. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και μερικοί απαραίτητοι μεταγραφικοί ενεργοποιητές, των οποίων η έκφραση είναι αυστηρά ρυθμισμένη. Αυτοί οι ενεργοποιητές προήλθαν από μητρικά αποθηκευμένα mRNAs τα οποία στην συνέχεια μεταφράστηκαν, καθοδηγώντας την μεταγραφική ενεργοποίηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μεταγραφικού ενεργοποιητή που αναγνωρίστηκε στην *Drosophila* αποτελεί η πρωτεΐνη Zelda (Zld). Η απουσία του από το έμβρυο οδήγησε σε μη σωστή ολοκλήρωση του MZT με μορφολογικά ελαττώματα κατά την κυτταροποίηση, ενώ ευθύνεται και για την μειορρυθμισμό χιλιάδων γονιδίων (mir-309) κατά την πορεία του MZT[26,27].



Εικόνα 7 Διάφοροι μηχανισμοί που καθορίζουν το χρονικό παράθυρο του ZGA [29].

## 1.2.2 Ρόλος του MZT στην ανάπτυξη των εντόμων

Ο ρόλος του MZT στην ανάπτυξη των εντόμων αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο που σηματοδοτεί την μετάβαση από την μητρική στην αυτορρυθμιζόμενη ανάπτυξη του εμβρύου. Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, κατά την διάρκεια του MZT διαδραματίζονται δύο βασικές κυτταρικές διεργασίες: Η αποικοδόμηση μητρικών RNA και πρωτεϊνών καθώς και η ενεργοποίηση του ζυγωτικού γονιδιώματος. Αυτές οι διαδικασίες είναι θεμελιώδεις για την ρύθμιση της ανάπτυξης των αξόνων, την μορφογένεση και την κυτταρική διαφοροποίηση. Πιο συγκεκριμένα:

**Ρύθμιση αξόνων συμμετρίας:** Κατά την διάρκεια του MZT στην *Drosophila* ενεργοποιούνται ζυγωτικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον καθορισμό του εμπροσθοπίσθιου και ραχιοκοιλιακού άξονα. Γνωστά παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια *bicoid* και *oskar*, τα οποία είναι μητρικής προέλευσης μορφογόνα, και συμμετέχουν στον προσδιορισμό εμπρόσθιου και οπίσθιου άξονα αντίστοιχα[26,27]. Μάλιστα, το γονίδιο *hunchback*, το οποίο μεταγράφεται κατά το διάστημα του μικρού και μεγάλου κύματος ενεργοποίησης της ζυγωτικής έκφρασης (πυρηνικοί κύκλοι 10-13) ενεργοποιείται από το γονίδιο *bicoid*, καθορίζοντας την εμπρόσθια ανάπτυξη του εμβρύου (σχηματισμός κεφαλιού και θώρακα)[26,31].

**Μορφογένεση, δημιουργία ιστών και κυτταρική διαφοροποίηση:** Η μορφογένεση εξαρτάται από την ακρίβεια της χρονικής έκφρασης των ζυγωτικών γονιδίων κατά το MZT. Γονίδια όπως το *zerknüllt* και το *twist* στην *Drosophila* ενεργοποιούνται για να καθοδηγήσουν την ανάπτυξη ιστών και μετέπειτα οργάνων. Αναλυτικότερα, το

*zerknüllt* συμβάλλει καθοριστικά στο σχηματισμό των δύο βασικών μεμβρανών του αμνιακού σάκου, του άμνιου και του χορίου, που προσφέρουν προστασία στο έμβρυο και ρυθμίζουν από κοινού την ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών στοιχείων κατά την εμβρυογένεση[32]. Από την άλλη, το γονίδιο *twist* διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη της μεσοδερμικής στιβάδας, η οποία στην συνέχεια θα δώσει γένεση σε ιστούς που θα διαμορφώσουν το μυϊκό, κυκλοφορικό και σκελετικό σύστημα[32].

### 1.2.3 Συγκριτική ανάλυση του MZT μεταξύ διαφορετικών ειδών

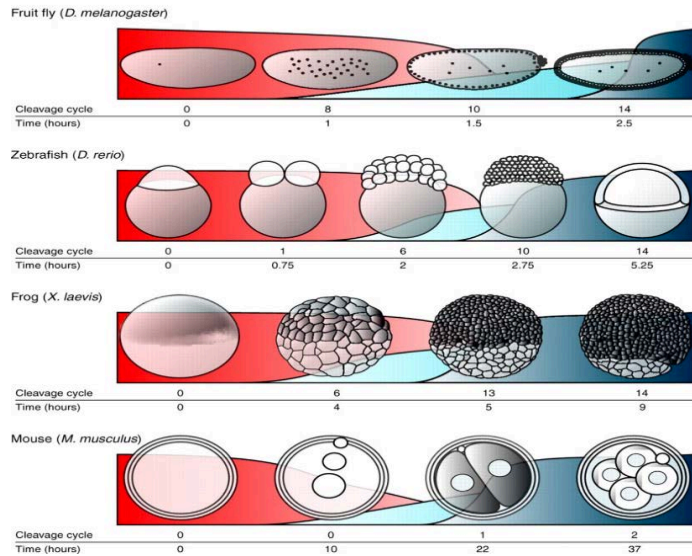
Παρά την υψηλή εξελικτική συντήρηση του φαινομένου MZT, διάφορες έρευνες καταδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών διαφοροποιήσεων σε αυτή την διαδικασία μεταξύ διαφορετικών ειδών. Αυτές οι διαφορές αφορούν τόσο την χρονική διάρκεια της μετάβασης όσο και τους μηχανισμούς που αξιοποιούνται για το ZGA. Ακολουθεί μια συγκριτική ανάλυση του MZT σε ορισμένα χαρακτηριστικά είδη:

1] ***Drosophila melanogaster***: Το MZT στην *Drosophila* αρχίζει γύρω στον 8ο (μικρό κύμα) - 14ο (μεγάλο κύμα) κύκλο διαιρέσεων, 1-2,5 h μετά την γονιμοποίηση, και είναι αρκετά συγχρονισμένο. Η αρχική φάση ανάπτυξης βασίζεται αποκλειστικά σε μητρικά μετάγραφα και πρωτεΐνες, ενώ το ZGA λαμβάνει χώρα μετά από πολλούς κύκλους διαιρέσεων[33].

2] ***Zebra fish***: Το MZT στο ψάρι ζέβρα διαδραματίζεται περίπου στον 6ο (μικρό κύμα) - 10ο (μεγάλο κύμα) κύκλο διαίρεσης, 2-2,75h μετά την γονιμοποίηση. Οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις είναι αρκετά συγχρονισμένες και γρήγορες, ενώ κατά το MZT ο ρυθμός κυτταροδιαιρέσεων επιβραδύνεται σημαντικά προκειμένου το ζυγωτικό γονιδίωμα να αρχίσει να ελέγχει την εμβρυϊκή ανάπτυξη[33].

3] ***Xenopus laevis***: Το MZT στον βάτραχο εμφανίζεται μεταξύ του 6ου (μικρό κύμα) και του 13ου κύκλου διαίρεσης, 4-5 h μετά την γονιμοποίηση. Οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις είναι όπως και στο ζεβρόψαρο, ταχείες και συγχρονισμένες, ενώ κατά το MZT ο ρυθμός κυτταροδιαιρέσεων μειώνεται δραστικά και ξεκινάει η έκφραση των ζυγωτικών γονιδίων που θα καθοδηγήσουν την ανάπτυξη του εμβρύου[33].

4] ***Mouse (M. musculus)***: Το MZT στο ποντίκι συμβαίνει αρκετά νωρίς μόλις στον 1ο κύκλο διαίρεσης, 10-22h μετά την γονιμοποίηση. Οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις είναι αργές και ασύμμετρες, με ξεκάθαρη διαφοροποίηση ήδη από τα πρώτα στάδια. Το MZT σε αντίθεση με άλλα είδη είναι σταδιακό και ξεκινά πριν ολοκληρωθεί πλήρως η κατανάλωση των μητρικών μορίων. Το γεγονός αυτό επισημαίνει πως στα θηλαστικά η ανάπτυξη είναι αρκετά σύνθετη και για αυτό η διαφοροποίηση των κυττάρων και η μορφογένεση γίνονται με μεγαλύτερη ακρίβεια και έλεγχο[33].



Εικόνα 8. Συγκριτική ανάλυση του MZT σε τέσσερις οργανισμούς μοντέλα. Η καμπύλη με το κόκκινο χρώμα αναπαριστά το προφίλ αποικοδόμησης των μητρικών μορίων για κάθε είδος. Η ανοιχτή και σκούρη μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύουν το μικρό και μεγάλο κύμα ενεργοποίησης του ζυγωτικού γονιδιώματος αντίστοιχα[25].

Συνολικά, λοιπόν, παρατηρείται ότι ασπόνδυλα όπως η *Drosophila* χαρακτηρίζονται από ταχύτερη και συγχρονισμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη, με το MZT να ολοκληρώνεται γρηγορότερα, υποδηλώνοντας κατά αυτό τον τρόπο την ανάγκη τους για άμεση επιβίωση και προσαρμογή στο εξωτερικό περιβάλλον. Τουναντίον, σε σπονδυλωτά όπως το ψάρι ζέβρα, ο βάτραχος και το ποντίκι το ZGA συμβαίνει αργά και σταδιακά, γεγονός το οποίο τονίζει την εξελικτική πολυπλοκότητα των οργανισμών αυτών και την ανάγκη τους για προσεκτική οργάνωση και κυτταρική διαφοροποίηση ήδη από τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια. Επίσης γίνεται φανερό ότι στα σπονδυλωτά και εντονότερα στο ποντίκι υπάρχει μεγαλύτερη χρονική εξάρτηση από τα μητρικά μετάγραφα και πρωτεΐνες συγκριτικά με τα ασπόνδυλα στα οποία το MZT γίνεται γρηγορότερα, μειώνοντας έτσι την εξάρτηση τους από τα μητρικά μόρια[33].

Έχουν δημοσιευθεί ακόμη δύο μελέτες που αφορούν την έναρξη του φαινομένου MZT σε κουνούπια των γενών *Aedes* και *Anopheles*. Σχετικά με τα έμβρυα των κουνουπιών αυτών, η αρχή της ζυγωτικής μεταγραφικής δραστηριότητας παρατηρείται σχετικά νωρίς στο χρονικό διάστημα 2-4 h (μικρό κύμα ενεργοποίησης) μετά την ωοαπόθεση και μπορεί να φτάσει έως και τις 12 h που συμπίπτει με την έναρξη της γαστριδίωσης. Κατά το χρονικό διάστημα 0-2 h δεν αναμένεται μεταγραφική δραστηριότητα στα έμβρυα και για αυτό η παρουσία οποιουδήποτε μεταγράφου θεωρείται μητρική κληρονομιά[34,35].

## 1.2.4 Συμμετοχή των lncRNAs στο MZT

Πρόσφατες έρευνες έχουν αναδείξει τη δυναμική έκφραση και συμμετοχή των lncRNA στην διαδικασία του MZT σε διάφορα είδη. Μια πρώτη μελέτη[36] αναφέρεται στην ταυτοποίηση τεσσάρων lncRNA, εκφραζόμενων σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα ποντικών (mESCs), τα οποία ελέγχονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4 και Nanog, υποστηρίζοντας μάλιστα την πιθανή εμπλοκή τους στην

πολυδυναμία των mESCs. Έπειτα, σε μια άλλη μελέτη[37] επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή και η υψηλή έκφραση πολλών lncRNAs (συγκεκριμένα lincRNAs) για την διατήρηση της πολυδυναμίας των mESCs. Διαπιστώθηκε ότι η σίγηση αυτών των lncRNA είχε ως αποτέλεσμα τα mESCs να μεταβούν από το στάδιο της πολυδυναμίας τους στο στάδιο της διαφοροποίησης, ένα αποτέλεσμα παρόμοιο με αυτό που προκύπτει εάν κατασταλεί η έκφραση γνωστών καινοτόμων μεταγραφικών παραγόντων[37]. Μετά από τις προηγούμενες μελέτες διεξήχθη μια μεγάλη έρευνα[38] γύρω από το εμβρυϊκό μεταγράφομα του ψαριού ζέβρα που οδήγησε στην ταυτοποίηση περίπου 11.000 lncRNAs που εκφράζονται κατά την εμβρυογένεση. Στη εν λόγω μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι λειτουργίες αυτών των lncRNAs κυμαίνονταν από ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέχρι και ρύθμιση της μορφογένεσης στα αρχικά εμβρυϊκά στάδια[38]. Τέλος, μια πιο πρόσφατη μελέτη[39] επικεντρωμένη στο προφίλ έκφρασης γνωστών lncRNA των κουνελιών ανίχνευσε 107 διαφορεικά εκφρασμένα lncRNAs στο χρονικό παράθυρο από το ώριμο ωάριο έως το στάδιο των δύο κυττάρων καθώς και ακόμη 419 διαφορεικά εκφρασμένα lncRNAs από το στάδιο των οκτώ κυττάρων μέχρι και το στάδιο του μοριδίου. Αυτά τα χρονικά σημεία συμπίπτουν με το μικρό και μεγάλο κύμα ενεργοποίησης του ζυγωτικού γονιδιώματος αντίστοιχα, φανερώνοντας τον κομβικό ρόλο που διαδραματίζουν αυτά τα lncRNAs στο να συμβεί ομαλά το MZT και να ρυθμιστούν με ακρίβεια τα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης των κουνελιών[39].

### 1.2.5 Εφαρμογές του MZT στον έλεγχο των εντόμων

Το MZT αποτελεί μια απαραίτητη βιολογική διαδικασία για την σωστή ανάπτυξη και λειτουργία των νέων οργανισμών. Εάν λοιπόν, στοχευθούν μόρια που συμμετέχουν σε αυτήν, αναμένεται να επηρεαστεί δραματικά η εμβρυϊκή ανάπτυξη, με αποτέλεσμα να γεννηθούν έμβρυα με σημαντικά μορφολογικά ελλείμματα[25]. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο, έρευνες επικεντρώνονται στην διατάραξη του MZT, κάτι που αναμένεται να βοηθήσει σημαντικά στην διαχείριση πληθυσμών παρασιτικών εντόμων, φορείς ασθενειών ή γεωργικά παράσιτα. Πιο συγκεκριμένα με τις μεθόδους RNAi, CRISPR/Cas9 και Gene Drive μπορούν να στοχευθούν κρίσιμα γονίδια που εμπλέκονται στο MZT, διαταράσσοντας την ανάπτυξη των εντόμων και οδηγώντας σε μείωση του πληθυσμού τους[35]. Για παράδειγμα, το γονίδιο *Zelda* αποτελεί έναν στόχο για τους ερευνητές μιας και κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση βασικών ζυγωτικών γονιδίων τόσο στις φρουτόμυγες όσο και στις κατσαρίδες[26,40]. Η αναγνώριση, λοιπόν, τέτοιων απαραίτητων για το MZT μορίων μπορούν να ανοίξουν τον δρόμο για την ανάπτυξη καινοτόμων εντομοκτόνων, τα οποία στοχεύουν συγκεκριμένα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και τα οποία μάλιστα μπορούν να στοχεύσουν ακόμη και ειδο-ειδικά μόρια. Μάλιστα, στοχεύοντας τα έντομα σε αυτά τα τόσο πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, αποφεύγονται και οι αρνητικές επιπτώσεις τους στο περιβάλλον (π.χ. καταστροφή καλλιεργειών, μετάδοση ασθενειών κ.α.).

### 1.3 Το Ασιατικό Κουνούπι Τίγρης *Aedes albopictus*

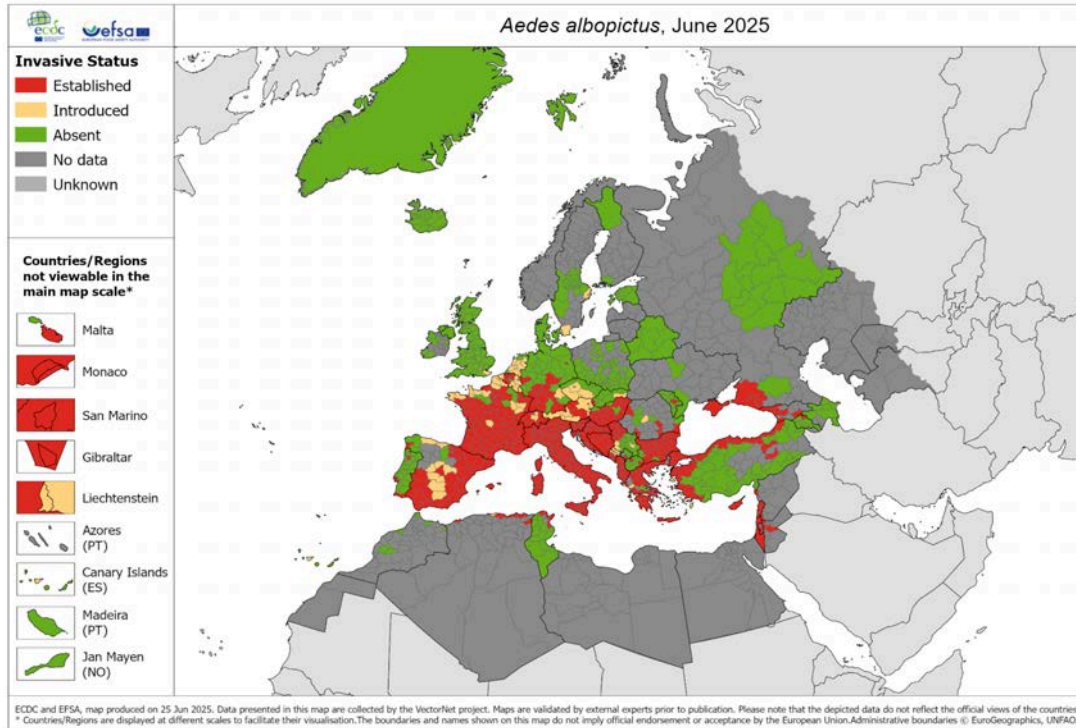
Το κουνούπι *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894), γνωστό και ως Ασιατικό κουνούπι τίγρης λόγω της χαρακτηριστικής λευκής γραμμής στον θώρακα, την κοιλιά και τα πόδια, είναι ένα δίπτερο έντομο της οικογένειας *Culicidae* που μαζί με το συγγενές *Aedes aegypti* ανήκει στο γένος *Aedes*. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος, 2-10 χιλιοστά, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και το φύλο. Μάλιστα, τα αρσενικά είναι 20% μικρότερα σε μέγεθος από ότι τα θηλυκά. Η διάρκεια ζωής διαφέρει μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus*, με τα αρσενικά να ζούν κατά μέσο όρο 5-10 ημέρες, ενώ τα θηλυκά ζουν περισσότερο 2-4 εβδομάδες. Το *Aedes albopictus* θεωρείται ως το περισσότερο χωροκατακτητικό είδος κουνουπιού παγκοσμίως[41,42].



Εικόνα 9. Το ασιατικό κουνούπι Τίγρης [43].

#### 1.3.1. Προέλευση και Εξάπλωση

Το *Aedes albopictus* προέρχεται από τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και από εκεί προέρχεται και το όνομα του “Ασιατικό κουνούπι Τίγρης” (“Asian Tiger Mosquito”)[44]. Στην χώρα μας, την Ελλάδα, το Ασιατικό κουνούπι Τίγρης πρωτοεμφανίστηκε στην Κέρκυρα και την Ηγουμενίτσα μετά από δειγματοληψίες κουνουπιών που διεξήχθησαν τις χρονιές 2003 και 2004[45]. Λόγω του μεσογειακού κλίματος της Ελλάδας, το κουνούπι βρήκε ιδανικές συνθήκες για την περαιτέρω εξάπλωσή του και σε περιοχές της Αττικής, της Πελοποννήσου και της Κεντρικής Μακεδονίας[46]. Η ταχεία διασπορά του οφείλεται στην υψηλή βιολογική προσαρμοστικότητα που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο είδος. Τα αυγά του μπορούν να επιβιώσουν σε χαμηλή θερμοκρασία και ξηρασία για πολλούς μήνες, αναπαράγονται εύκολα ακόμη και σε τεχνητά υδάτινα ενδιαιτήματα όπως γλάστρες, φρεάτια και δύνανται να λάβουν γεύμα αίματος από διαφορετικά είδη ξενιστών[47,48].



Εικόνα 10. Χάρτης κατανομής του κουνουπιού *Aedes albopictus* στην Ευρώπη, σύμφωνα με αναφορά του ECDC τον Ιούνιο του 2025[49].

### 1.3.2. Φορέας λοιμωδών ασθενειών

Από υγειονομική σκοπιά το *Aedes albopictus* έχει πολύ μεγάλη σημασία καθώς μπορεί να μεταδώσει πολυάριθμες σοβαρές για τον άνθρωπο ασθένειες. Εργαστηριακές έρευνες έχουν αποδείξει ότι είναι ικανός φορέας περισσότερων από είκοσι αρμοπιών, ιών που μεταδίδονται μέσω των αρthropόδων, μεταξύ των οποίων ο ιός του Δάγκειου Πυρετού, ο ιός Ζίκα, ο ιός του Κίτρινου Πυρετού και ο ιός Chikungunya[50]. Εκτός των αρμοπιών, το Ασιατικό κουνούπι τίγρης είναι υπεύθυνο για την μετάδοση νηματωδών σκωλήκων του γένους *Dirofilaria* που προκαλούν ασθένειες κυρίως στα σκυλιά αλλά και στους ανθρώπους γνωστές ως διροφιλαριώσεις. Επιπλέον, το κουνούπι τίγρης ευθύνεται για την διασπορά και άλλων μολυσματικών ιών, όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV), ο ιός ανατολικής εγκεφαλίτιδας ιπποειδών (EEEV), ο ιός εγκεφαλίτιδας ιπποειδών της Βενεζουέλας (VEEV), ο ιαπωνικός ιός της εγκεφαλίτιδας (JEV) και ο ιός La Crosse (LACV)[51]. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά επιθετικό κουνούπι που τρέφεται με γεύμα αίματος κυρίως ανθρώπου (ανθρωπόφιλο είδος) αλλά μπορεί να τραφεί και από άλλα θηλαστικά[52]. Τσιμπάει σχεδόν όλο το 24ώρο και κυρίως σε 2 κύκλους: το πρωί (06:00-9:00) και το απόγευμα (15:00 και 20:00) ενώ έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να αναζητήσει τους ξενιστές του σε χαμηλούς ρυθμούς ακόμη και κατά την διάρκεια της νύχτας (20:00-5:00)[53].

### 1.3.3. Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος των κουνουπιών του γένους *Aedes* συνοδεύεται από μεγάλες αλλαγές στην μορφολογία, στην λειτουργία και στο περιβάλλον στο οποίο αυτά

επιβιώνουν και αναπτύσσονται. Ανήκουν στην κατηγορία των ολομετάβολων εντόμων, λόγω της συνεχούς μεταμόρφωσης την οποία υπόκεινται. Ο κύκλος ζωής τους απαρτίζεται από τέσσερα διακριτά αναπτυξιακά στάδια, με τον χρόνο πλήρους ανάπτυξης ενός αυγού σε ενήλικο κουνούπι να διαρκεί γύρω στις 8-10 μέρες σε ευνοϊκές συνθήκες[54].

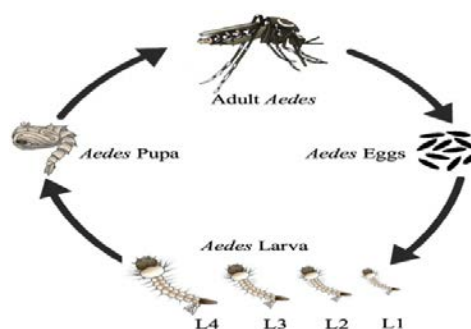
1] Αυγά (eggs): Τα κουνούπια του γένους *Aedes*, μεταξύ των οποίων τα *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus*, συνήθως αποθέτουν από 50 μέχρι 120 αυγά σε κάθε γέννα. Η εκκόλαψη των αυγών στην φύση, κοντά σε υδάτινες επιφάνειες φυσικές ή τεχνητές, ποικίλλει χρονικά από λίγες μέρες (τρεις συνήθως) έως και μήνες μετά την ωοαπόθεση και εξαρτάται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες[54,55].

2] Προνύμφες (larvae): Η εκκόλαψη των αυγών θα δώσει τις προνύμφες πρώτου σταδίου. Πρόκειται για καθαρά υδρόβια όντα. Το στάδιο της προνύμφης απαρτίζεται από τέσσερα καλά διαχωρισμένες και διαδοχικές περιόδους (L1-L4) κατά τις οποίες οι προνύμφες αυξάνουν σε μέγεθος και αποβάλλουν τον εξωσκελετό τους (έκδυση). Η συνολική διάρκεια των τεσσάρων αυτών προνυμφικών σταδίων φυσιολογικά διαρκεί γύρω στις επτά ημέρες, ωστόσο, ποικίλλει λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών[54,55].

3] Νύμφες (pupae): Μετά το τελευταίο στάδιο ανάπτυξης της προνύμφης (L4) το κουνούπι εκδύεται και περνάει στο στάδιο της νύμφης. Έχουν χαρακτηριστική μορφή που θυμίζει “κόμμα” και είναι υδρόβιες. Η διαδικασία μεταμόρφωσης από νύμφη σε ενήλικο κουνούπι διαρκεί συνήθως 2-3 ημέρες και όπως και στις προνύμφες αυτό εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες[54,55].

4]Ενήλικο κουνούπι (adult): Το ενήλικο κουνούπι είναι το τελευταίο στάδιο του βιολογικού κύκλου. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ενήλικα κουνούπια χρησιμοποιούν ως βασική πηγή ενέργειας το νέκταρ και τους χυμούς των φυτών, ενώ επιπλέον τα θηλυκά τρέφονται με αίμα που είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες απαραίτητες για την σωστή ανάπτυξη και ωρίμανση των αυγών[54,55].

Εικόνα 11. Κύκλος ζωής των κουνουπιών του γένους *Aedes* από αυγά σε ενήλικα[54].



## 1.4 Μέθοδοι αντιμετώπισης πληθυσμού κουνουπιών

Μέχρι τώρα οι επικρατούσες στρατηγικές ελέγχου του πληθυσμού των κουνουπιών επικεντρώνονται κατά βάση στην αξιοποίηση συνθετικών εντομοκτόνων[56]. Ωστόσο, αυτά παρουσιάζουν μια σειρά από προβλήματα. Πρώτα από όλα, η αλόγιστη χρήση τους έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εκτιθέμενων εντόμων

[57]. Επιπροσθέτως, τα συνθετικά εντομοκτόνα διαθέτουν ευρύ φάσμα δράσης στοχεύοντας και έντομα μη-στόχους που μπορεί να είναι εποικοδομητικά (π.χ μέλισσες) ή φυσικοί εχθροί παρασίτων (π.χ πασχαλίτσες). Με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η ισορροπία του οικοσυστήματος και μειώνεται η βιοποικιλότητα[56,58]. Τέλος, ορισμένα εντομοκτόνα (οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά κ.α) εμφανίζουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες για τον άνθρωπο. Έτσι κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης φιλικότερων προς το περιβάλλον στρατηγικών πληθυσμιακού ελέγχου και οι οποίες να είναι ειδο-ειδικές[57].

#### 1.4.1 Παραδοσιακές βιολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Οι βιολογικές μέθοδοι πληθυσμιακού ελέγχου αξιοποιούν φυσικούς θηρευτές και παθογόνους μικροοργανισμούς για να ελαττώσουν δραστικά τους πληθυσμούς κουνουπιών που είναι σημαντικοί φορείς ασθενειών. Τα πλεονεκτήματα των μεθόδων είναι ότι χρησιμοποιούν μη χημικά, φιλικά προς το περιβάλλον μέσα και διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην διαχείριση πληθυσμών κουνουπιών για τα οποία δεν έχουν υπάρξει αντικές θεραπείες, όπως του γένους *Aedes*[59]. Ενδεικτικά:

1] Φυσικοί εχθροί κουνουπιών: Μερικά παραδείγματα αποτελούν το προνυμφοφάγα ψάρια που ανήκουν στα γένη *Gambusia* και *Roecilia* και το λεγόμενο κουνούπι "Ελέφαντας" (*Toxorhynchites*)[59,60].

2] Παθογόνοι μικροοργανισμοί: Παράδειγμα αποτελεί ο *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) που είναι πιθανόν ο πιο κοινός μικροοργανισμός που δρά ως προνυμφοκτόνο κουνουπιών στην Ευρώπη[61,62].

#### 1.4.2 Παραδοσιακές χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Η χρήση δύο τάξεων χημικών εντομοκτόνων έχει επιτραπεί ως βασική στρατηγική διαχείρισης του πληθυσμού των κουνουπιών και αυτές είναι τα πυρεθροειδή και οι ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (IGRs)[63,64]. Ειδικότερα:

1] Πυρεθροειδή: Είναι συνθετικές οργανικές ενώσεις που μιμούνται την φυσική πυρεθρίνη, μια νευροτοξική ουσία που εξάγεται από τα άνθη του φυτού *Chrysanthemum cinerariaefolium*[63].

2] Ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (IGRs): Είναι χημικές ουσίες που παρεμβαίνουν και διακόπτουν τον κύκλο ζωής των εντόμων, οδηγώντας στην θανάτωση τους πριν καν προλάβουν να ενηλικιωθούν[64].

## 1.5 Μέθοδος παρεμβολής του RNA (RNAi)

Η παρεμβολή του RNA ή αλλιώς RNAi όπως αποκαλείται, είναι το φαινόμενο που επάγει την μετα-μεταγραφική σίγηση ενός γονιδίου έπειτα από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρού παρεμβατικού RNA (small interfering RNA-siRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική προς αυτή του γονιδίου[65]. Το φαινόμενο της σίγησης ενός γονιδίου μέσω του RNAi ανακαλύφθηκε αρχικά το 1998 στον νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* από τους Fire και Melo[66]. Πρόκειται για έναν φυσικό, αρχέγονο εγγενή αμυντικό μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων όταν απαντώνται στο κύτταρο δίκλωνο μόρια της ίδιας αλληλουχίας. Ίσως είναι αποτέλεσμα εξελικτικών μηχανισμών για την αντιμετώπιση ιικών λοιμώξεων και μεμονωμένων μεταθετών γενετικών στοιχείων τα οποία εξαπλώνονται χρησιμοποιώντας ως γενετικό υλικό δίκλωνο RNA (dsRNA) και προκαλούν αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος. Ο μηχανισμός αυτός εντοπίζεται σε όλα τα μέλη του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Βέβαια, στα κύτταρα των θηλαστικών έχει αντικατασταθεί από πιο εξελιγμένους αμυντικούς μηχανισμούς. Μέχρι και σήμερα, η απόδειξη ότι το RNAi μπορεί να εφαρμοστεί για ερευνητικούς σκοπούς και σε κύτταρα θηλαστικών έδωσε στους ερευνητές ένα σπουδαίο εργαλείο με το οποίο δύνανται να καταστείλουν την έκφραση ενός γονιδίου-ενδιαφέροντος όταν εισάγουν στο κύτταρο ένα ειδικά σχεδιασμένο για το συγκεκριμένο γονίδιο δίκλωνο RNA (dsRNA) το οποίο θα πυροδοτήσει είτε την αποικοδόμηση του mRNA είτε την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να κατανοήσουν καλύτερα την λειτουργία του γονιδίου αυτού[65].

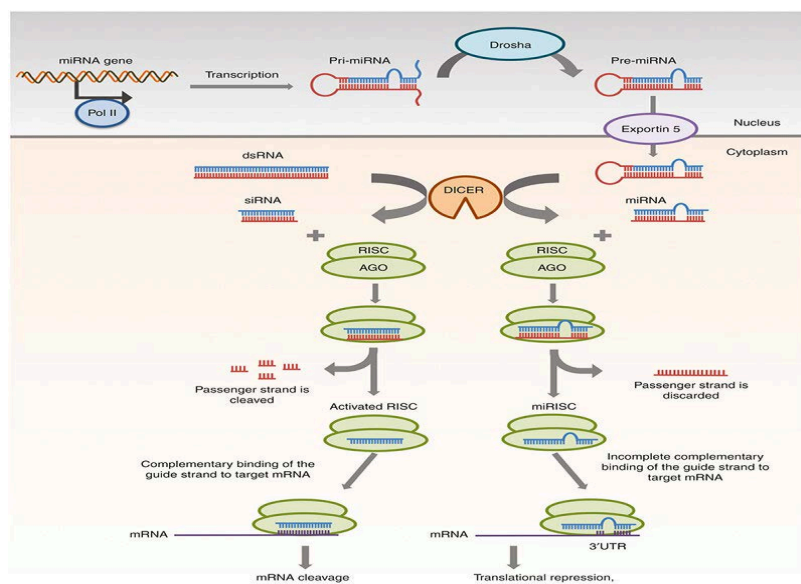
### 1.5.1 Μηχανισμός δράσης του RNAi

Υπάρχουν δύο βασικές μορφές μικρών μορίων RNA τα οποία μπορούν να πυροδοτήσουν το μονοπάτι RNA interference (RNAi) και να δράσουν ως καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης: τα μικρά παρεμβατικά RNAs (siRNAs) συχνά εξωγενούς προέλευσης και τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs (miRNAs) ενδογενούς προέλευσης. Παρότι τα siRNAs και τα miRNAs συμμετέχουν στον ίδιο μηχανισμό RNAi, τα μόρια αυτά παρουσιάζουν διαφορές στη βιοσύνθεση και τους μηχανισμούς δράσης τους[67]. Ειδικότερα:

**siRNAs:** Το μονοπάτι παρεμβολής του RNA μπορεί να χωριστεί σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση, μακρά δίκλωνο μόρια RNA (dsRNA) αναγνωρίζονται και επεξεργάζονται από μια την Dicer. Μετά την πέψη του dsRNA από μια RNAση-τύπου III, την Dicer, προκύπτουν siRNAs ποικίλου μήκους 21-24 νουκλεοτιδίων με μικρές μονόκλωνες προεξοχές δύο νουκλεοτιδίων σε κάθε 3' άκρο. Στην δεύτερη φάση, τα τεμαχισμένα siRNAs ενσωματώνονται στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσίωπησης RISC, το οποίο διαθέτει ένζυμο το ένζυμο AGO με ικανότητα ελικάσης που ξεδιπλώνει τις δύο αλυσίδες του siRNA[67]. Από τις δύο αλυσίδες θα παραμείνει λειτουργική η μια, η οποία καλείται κλώνος-οδηγός (guide strand), ενώ η άλλη θα απομακρυνθεί. Ο κλώνος-οδηγός θα κατευθύνει το σύμπλοκο RISC στο mRNA με το οποίο εμφανίζει συμπληρωματικότητα και θα υβριδίσει. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης θα ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη "Αργοναύτης"

(AGO2) και αυτή στην περίπτωση των siRNAs που εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με το mRNA στόχο θα προκαλέσει τον κατακερματισμό του. Κατά συνέπεια, η παραγωγή της πρωτεΐνης που παράγεται από το αντίστοιχο mRNA μειώνεται[68]. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι εξωγενή συνθετικά siRNAs ή ενδογενή εκφρασμένα siRNAs μπορούν να ενσωματωθούν στο σύμπλοκο RISC, παρακάμπτοντας έτσι την διαδικασία επεξεργασίας από το ένζυμο Dicer[67].

**miRNAs:** Τα miRNAs εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και σε αντίθεση με τα siRNAs μεταγράφονται από διακριτά miRNA γονίδια. Η μεταγραφή πραγματοποιείται στον πυρήνα από την RNA Pol II, οδηγώντας στην σύνθεση καλυμμένων και πολυαδενυλιωμένων πρωτογενών miRNA μεταγράφων (pri-miRNAs). Αυτά τα pri-miRNAs αναγνωρίζονται και επεξεργάζονται από το σύμπλοκο Microprocessor που περιλαμβάνει μια RNAση-τύπου III, την Drosha, και μια πρωτεΐνη συνοδό που αναγνωρίζει τα pri-miRNAs. Έτσι παράγονται μήκους 70-100 νουκλεοτιδίων μακρά πρόδρομα miRNAs με δομή στελέχους-βρόχου (pre-miRNAs). Έπειτα, τα pre-miRNAs εξάγονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα μέσω της δράσης μιας εξπορτίνης (Exp 5). Όπως και με τα siRNAs, έτσι και τα miRNAs επεξεργάζονται στο κυτταρόπλασμα από την Dicer παράγοντας τα ώριμα δίκλινα μόρια miRNAs μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων και φορτώνονται στο σύμπλοκο RISC. Η διαφορά με τα siRNAs είναι ότι κυρίως τα miRNAs υβριδίζουν μερικώς με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες στόχους, προκαλώντας την καταστολή της μετάφρασης του mRNA στόχου. Βέβαια, δεν αποκλείεται το miRNA να υβριδίζει πλήρως με το mRNA στόχο, οδηγώντας στην αποικοδόμηση του mRNA[68,69].



Εικόνα 12. Μηχανισμοί γονιδιακής σίγησης RNAi των siRNAs και miRNAs[68].

### 1.5.2 Αξιοποίηση τεχνολογίας RNAi ως εργαλείο για την καταπολέμηση των εντόμων

Το RNAi χρησιμοποιείται εκτενώς ως εργαστηριακό εργαλείο για τη στοχευμένη σίγηση γονιδίων εντόμων, με την εισαγωγή εξωγενούς συνθετικού δίκλωνου RNA

(dsRNA) ως επαγωγέα του μονοπατιού. Το εξωγενές dsRNA σχεδιάζεται ούτως ώστε να εμφανίζει πλήρη συμπληρωματικότητα με μια περιοχή του γονιδίου ενδιαφέροντος και μόνο με αυτό, ώστε να αποφευχθεί η δράση του συμπλόκου RISC σε περιοχές μη-στόχους, εξασφαλίζοντας την ειδικότητα της μεθόδου[68]. Όσον αφορά γενικά τον έλεγχο του πληθυσμού των εντόμων, αρχικά πραγματοποιείται η μελέτη και η αναγνώριση γονιδίων ζωτικής σημασίας. Υποψήφια γονίδια παραδείγματος χάριν μπορεί να είναι αυτά που σχετίζονται με το αναπαραγωγικό τους σύστημα. Έπειτα, θα γίνει η σύνθεση ενός δίκλωνου μορίου RNA (dsRNA) με την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και αυτό θα εισαχθεί στον οργανισμό ενεργοποιώντας τον μηχανισμό του RNAi. Η απουσία του μεταγράφου που παράγεται από το γονίδιο-στόχο, ενδέχεται να επηρεάσει σημαντικά βασικές λειτουργίες του εντόμου και έτσι να οδηγηθεί στον θάνατο[70,71]. Σε έντομα όπως τα κολεόπτερα, η τεχνολογία RNAi έχει μελετηθεί εκτενώς, παρέχοντας σαφείς ενδείξεις για την αποτελεσματικότητά της στην καταπολέμηση εντόμων. Πιο συγκεκριμένα, στο κολεόπτερο *Tribolium castaneum* έχουν αναφερθεί δυο είδη RNAi. Το εμβρυϊκό RNAi, με απευθείας έγχυση του dsRNA στα έμβρυα[72] και το γονεϊκό RNAi, με έγχυση του dsRNA σε θηλυκές νύμφες[73]. Ωστόσο, αυτές οι προσεγγίσεις είναι χρήσιμες κυρίως για την μελέτη των αρχικών σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Σε αρκετές περιπτώσεις το αποτέλεσμα της σίγησης δεν διαρκεί και στα μεταγενέστερα στάδια όπως το νυμφικό ή το ενήλικο στάδιο και το γονίδιο επανεκφράζεται. Ακόμη πολλά αναπτυξιακά γονίδια λειτουργούν σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, καθιστώντας δύσκολη την μελέτη λειτουργιών στα όσιμα στάδια διότι το έντομο δεν κατορθώνει να επιβιώσει[72,73]. Στον αντίποδα, μια νέα μελέτη επισημαίνει ότι το αποτέλεσμα της σίγησης με την μέθοδο RNAi σε προνύμφες του *Tribolium castaneum* (larval RNAi) παραμένει ενεργό και στα μεταγενέστερα στάδια με ορατή επίδραση ακόμη και στα ενήλικα έντομα. Για παράδειγμα, η σίγηση γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του *Tribolium castaneum* (*Tc-achaete-scute-homolog*) οδήγησε σε διαταραχές της διαδικασίας έκδυσης και σε σημαντικές μορφολογικές ανωμαλίες στα ενήλικα έντομα[74]. Παράλληλα σε ένα άλλο κολεόπτερο το *Leptinotarsa decemlineata*, η στόχευση του γονιδίου που κωδικοποιεί την β υπομονάδα του πρωτεασώματος, οδήγησε σε υψηλή θνησιμότητα των προνυμφών, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα στοχευμένης καταπολέμησης του μέσω RNAi[75]. Σε μια ακόμη σημαντική μελέτη στο κολεόπτερο *Diabrotica virgifera virgifera* εφαρμόστηκε RNAi με κύριους στόχους δύο γονίδια που συμμετέχουν στην αναπαραγωγή του (*dnvgr* and *dnbol*). Η χορήγηση dsRNA μέσω τεχνητής διαίτας σε ενήλικα ή και προνύμφες προκάλεσαν σημαντική μείωση της γονιμότητάς τους. Επίσης, προνύμφες που τράφηκαν με διαγονιακές ρίζες καλαμποκιού που εκφράζει *dnbol* dsRNA εμφάνισαν μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας[76]. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επιτυχούς αξιοποίησης της τεχνολογίας RNAi για την καταπολέμηση εντόμων, αποτελεί η μελέτη στο λεπιδόπτερο *Helicoverpa armigera*. Ειδικότερα, η σίτηση προνυμφών με dsRNAs ειδικών για έξι γονίδια που συμμετέχουν στην ορμονική βιοσύνθεση προκάλεσε υψηλή θνησιμότητα, μειωμένο βάρος προνυμφών, μορφολογικές ανωμαλίες και καθυστερημένη μεταμόρφωση σε νύμφες[77]. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της τεχνολογίας RNAi σε κολεόπτερα και άλλα έντομα, η εφαρμογή της στα Δίπτερα παραμένει μέχρι σήμερα λιγότερο ανεπτυγμένη. Σε είδη όπως η *Ceratitis capitata*, η

αποτελεσματικότητα του RNAi, μέσω της διατροφής, μειώνεται σημαντικά λόγω των εντερικών νουκλεασών που αποικοδομούν τα μόρια πριν μπορέσουν να επηρεάσουν τα γονίδια-στόχους. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη στην *Ceratitidis capitata* δείχνει ότι η συνδυαστική χορήγηση μέσω διατροφής dsRNAs που στοχεύουν ένα ζωτικό γονίδιο και δυο εντερικές νουκλεάσες, σε ενήλικα, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη θνησιμότητα (έως και 79% εντός μιας εβδομάδας)[78]. Τα δεδομένα αυτά ανοίγουν νέες προοπτικές για την εφαρμογή του RNAi και στα κουνούπια, καθιστώντας δυνατή τη μελέτη κρίσιμων γονιδίων που επηρεάζουν την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη τους, ανοίγοντας ένα νέο μονοπάτι καταπολέμησης των πληθυσμών και των ασθενειών που αυτά μεταδίδουν. Η υψηλή ειδικότητα της μεθόδου για ένα συγκεκριμένο είδος (μικρό φάσμα δράσης), σε συνδυασμό με την περιβαλλοντική της ασφάλεια για όλο το οικοσύστημα συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (αποφυγή χρήσης τοξικών χημικών ουσιών), μπορεί να αντικαταστήσει τα κλασικά χημικά εντομοκτόνα με πιο φιλικά προς το περιβάλλον ειδο-ειδικά εντομοκτόνα[71].

### 1.5.3 Μέθοδοι χορήγησης του dsRNA στα έντομα

Παρά την μεγάλη χρησιμότητα της τεχνολογίας RNAi ως πολλά υποσχόμενη στρατηγική ελέγχου των πληθυσμών των εντόμων, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εύρεσης αποτελεσματικών μεθόδων χορήγησης του dsRNA. Είναι γνωστό ότι η αποτελεσματικότητα των μεθόδων χορήγησης του dsRNA καθορίζεται από μια πληθώρα παραγόντων όπως για παράδειγμα η παρουσία ενζύμων αποικοδόμησης (νουκλεασών), η επιτυχής κυτταρική πρόσληψη, η ποσότητα και η σταθερότητα του dsRNA[79]. Μεταξύ των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων χορήγησης ανήκουν η μικροέγχυση, ο εμποτισμός (soaking), η κατάποση μέσω της τροφής (ingestion), η SIGS (Spray-Induced Gene Silencing)[79,80]. Η μέθοδος της μικροέγχυσης (Microinjection) αποτελεί την πιο αποτελεσματική εργαστηριακή μέθοδο χορήγησης του dsRNA στο κύτταρο στόχο καθώς αυτό εγχύεται απευθείας στο έντομο-στόχο γνωρίζοντας την ακριβή ποσότητα και συγκέντρωση του dsRNA που χορηγήθηκε. Χρησιμοποιήθηκε από τους Fire και Mello τις πρώτες μέρες ανακάλυψης του RNAi, το 1998, ως τρόπος χορήγησης του dsRNA στον νηματώδη σκόληκα *C.elegans*[66]. Μέχρι και σήμερα αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη και αποτελεσματική μέθοδο εισαγωγής του dsRNA σε οργανισμούς in vivo συμπεριλαμβανομένων και των αρthropόδων[81]. Τα πρώτα πετυχημένα πειράματα μικροέγχυσης σε έντομα έγιναν σε έμβρυα της *D.melanogaster* από τους Kennerdell και Carthew το 1998. Μετά από αυτό ακολούθησαν και άλλα πειράματα μικροέγχυσης σε πολλά είδη εντόμων, μεταξύ των οποίων το κόκκινο σκαθάρι *T. castaneum*, η μέλισσα *Apis mellifera*, ο σκόρος *Manduca sexta* και η κατσαρίδα *B. germanica*[80]. Σχετικά με πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης σε κουνούπια, η εισαγωγή του dsRNA μέσω της μικροέγχυσης γίνεται συνήθως στο στάδιο της νύμφης και στα ενήλικα κουνούπια. Γενικά, το πιο κοινό σημείο έγχυσης ειδικά σε ενήλικα κουνούπια είναι ο θώρακας καθώς από εκεί το dsRNA θα περάσει γρήγορα στην αιμολέμφο και έπειτα θα γίνει η συστηματική κατανομή του σε όλα τα όργανα και κύτταρα του εντόμου, ξεφεύγοντας μάλιστα από φραγμούς όπως το εξωτερικό περίβλημα και το εντερικό επιθήλιο[82]. Η τεχνική της μικροέγχυσης φέρει ορισμένα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους χορήγησης του dsRNA. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι

οι ερευνητές μπορούν να εισάγουν άμεσα το dsRNA στον ιστό στόχο ή στην αιμολέμφο, παρακάμπτοντας τους φραγμούς του εντέρου και του εξωτερικού περιβλήματος, τα οποία πιθανώς να ήταν πρόβλημα σε μεθόδους όπως η κατάποση μέσω τροφής ή ο διαποτισμός[81,83]. Ακόμη, η ποσότητα του dsRNA που χορηγείται στον οργανισμό είναι γνωστή σε αντίθεση με την μέθοδο της τροφής ή του διαποτισμού[82,83]. Ωστόσο πρόκειται για μια πολύ λεπτομερή και χρονοβόρα διαδικασία με ανάγκη για βελτιστοποίηση πολλών παραγόντων[81]. Για παράδειγμα, η επιλογή της κατάλληλης βελόνας, η κατάλληλη ποσότητα dsRNA και το σημείο της έγχυσης είναι πολύ βασικοί παράγοντες και μπορεί να διαφέρουν αρκετά μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών[83].



Εικόνη 13. Μέθοδοι μικροέγχυσης ενδοθηρακικά σε ενήλικο κουνούπι *A. gambiae*[84].

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου ενός μακρού μη κωδικοποιητικού μορίου RNA (lncRNA), του *Maiden 4*, στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus*. Το αντικείμενο μελέτης στηρίχθηκε σε μια πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, η οποία ανέδειξε ορισμένα lncRNAs που παρουσιάζουν υπερέκφραση στις ωοθήκες θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus* έπειτα από λήψη γεύματος αίματος και τα οποία τελικά σχετίζονται με την αναπαραγωγή των κουνουπιών[24].

Σε συνέχεια και περαιτέρω εμβάθυνση της προηγούμενης έρευνας, μελετώνται στο προαναφερόμενο εργαστήριο και άλλα lncRNAs που εμφανίζουν αύξηση της έκφρασης, τόσο στις ωοθήκες έπειτα από λήψη γεύματος αίματος, όσο και στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια. Μεταξύ αυτών των lncRNAs, επιλέχθηκε να μελετηθεί στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας το *Maiden 4*, ένα lncRNA που φαίνεται να εμφανίζει αυτό το διπλό προφίλ έκφρασης. Αφού, λοιπόν, κατανοηθεί ο ρόλος του γονιδίου στην αναπαραγωγική βιολογία των κουνουπιών, μέσω λειτουργικής ανάλυσης, απώτερος στόχος θα είναι η αντικατάσταση των κλασικών εντομοκτόνων με πιο καινοτόμα ειδο-ειδικά εντομοκτόνα.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Εκτροφή εργαστηριακού πληθυσμού κουνουπιών *Aedes albopictus* και εργαστηριακές συνθήκες

Ο εργαστηριακός πληθυσμός κουνουπιών *Aedes albopictus* είναι του στελέχους Foshan που προέρχεται από αγρίου τύπου κουνούπια της νοτιοανατολικής Κίνας. Ο συγκεκριμένος πληθυσμός αξιοποιείται για τα πειράματα που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο Μοριακής βιολογίας και Γονιδιωματικής[85]. Για την εκκόλαψη των αυγών και την ανάπτυξη των προνυμφών χρησιμοποιείται διάλυμα θρεπτικού υποστρώματος (nutrient broth) που αποτελείται από πεπτόνη (15 g/L), D+ γλυκόζη (1 g/L), χλωριούχο νάτριο (6 g/L) και εκχύλισμα μαγιάς (3 g/L), με σύνθεση ανάλογη της εμπορικής φόρμουλας Standard I Nutrient Broth (Carl Roth). Για την εκτροφή των προνυμφών και των νυμφών χρησιμοποιείται κονιορτοποιημένη ξηρά γατοτροφή, ενώ για των ενηλίκων διάλυμα σακχαρόζης 10% και ανθρώπινο αίμα για την ωρίμανση των ωοθηκών των θηλυκών κουνουπιών. Οι προνύμφες, οι νύμφες και τα ενήλικα κουνούπια εκτρέφονται στο εντομοτροφείο σε θερμοκρασία 25°C, σχετική υγρασία 60-70% και κύκλου φωτοπεριόδου 14h φωτός και 10h σκοταδιού. Η διαβίωση των κουνουπιών γίνεται σε ειδικά κλουβιά για έντομα κατασκευασμένα από δίχτυ που βρίσκονται στο εντομοτροφείο[24].

#### 3.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων

##### 3.2.1 Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Στόχος της διαδικασίας απομόνωσης του RNA από τους διάφορους ιστούς του κουνουπιού είναι η μεταγραφομική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων σε κάθε δείγμα, μέσω της μεθόδου της ποσοτικής PCR (qPCR) που θα συζητηθεί παρακάτω[86]. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TripleXtractor της εταιρείας GRiSP Research Solutions με κωδικό GB23.0200, με το οποίο επιτυγχάνεται η απομόνωση του συνολικού RNA από ζωικούς και φυτικούς ιστούς. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για το κάθε δείγμα έγινε συλλογή ιστών στα κατάλληλα χρονικά σημεία ανάλογα με τον στόχο του πειράματος.

**ΥΛΙΚΑ:** Απομονωμένος ιστός / TripleXtractor / Χλωροφόρμιο / Ισοπροπυλική αλκοόλη / Γλυκογόνο 50 mg / ml/ 75 % EtOH / 70 % EtOH / ddH<sub>2</sub>O / Tube 1,5 ml / Ειδικά pestles

**ΜΕΘΟΔΟΣ:**

#### ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

- 1] Συλλογή ιστών και τοποθέτησή τους σε tube των 1,5 ml.
- 2] Σε κάθε tube γίνεται προσθήκη 150 μl tripleXtractor.
- 3] Μηχανική ομογενοποίηση των ιστών.

4] Προσθήκη επιπλέον 50μl tripleXtractor για να καθαριστεί το έμβολο και να πέσει οποιοσδήποτε ιστός (τελικός όγκος 200 μl).

#### **ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΦΑΣΕΩΝ**

- 1] Επώαση των δειγμάτων για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 2] Προσθήκη 40 μl χλωροφορμίου.
- 3] Ανακίνηση των δειγμάτων προσεκτικά και έντονα για 15 sec με χέρι.
- 4] Επώαση των δειγμάτων για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5] Φυγοκέντρηση δειγμάτων στις 12000 στροφές (g) για 15 min στους 4 °C .
- 6] Συλλογή της υδατικής φάσης.

#### **ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ RNA**

- 1] Μεταφορά του υπερκειμένου με το RNA σε δεύτερο tube με προσοχή για να μην διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση των πρωτεϊνών.
- 2] Ανάμειξη του RNA με κρύα ισοπροπυλική αλκοόλη (200 μl) +1,5 μl γλυκογόνο.
- 3] Καλή ανακίνηση των δειγμάτων.
- 4] Επώαση των δειγμάτων για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5] Φυγοκέντρηση δειγμάτων στα 12000 g για 15 min στους 4 °C.

#### **ΞΕΠΛΥΜΑ RNA**

- 1] Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- 2] Πλύσιμο του κυτταρικού ιζήματος (περιέχει το RNA) με 75% ΕΤΟΗ (500 μl) και 70% ΕΤΟΗ.
- 3] Καλή ανακίνηση των δειγμάτων.
- 4] Φυγοκέντρηση στα 7500 g για 5 min στους 4 °C.

#### **ΕΠΑΝΑΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ**

- 1] Στέγνωμα του ιζήματος και επώαση των δειγμάτων για 10min στους 60 °C
- 2] Επαναδιάλυση σε 12 μl ddH<sub>2</sub>O.
- 3] Διατήρηση του RNA στους -80 °C για μακροχρόνια αποθήκευση ή στους -20 °C για σύντομη αποθήκευση.
- 4] Προσδιορισμός της πυκνότητας και καθαρότητας δείγματος στο φασματοφωτόμετρο quawell.

#### **3.2.2 Επεξεργασία με DNase I (DNase Treatment)**

Σκοπός της συγκεκριμένης διεργασίας είναι η απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA που μπορεί να υπάρχουν κατά την απομόνωση του συνολικού RNA. Αυτό επιτυγχάνεται

με ένα ένζυμο την DNάση I η οποία υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των μορίων DNA[87].

**ΥΛΙΚΑ:** Απομονωμένο RNA / Turbo DNase I (2 U/ ul) / 10x TURBO DNase Buffer / Αναστολέας ριβονουκλεασών RNaseOUT (40 U / ul) / Ammonium acetate 7,5 M/ Φαινόλη / Χλωροφόρμιο / Γλυκογόνο 50 mg / ml / 100 % EtOH / 70 % EtOH / ddH<sub>2</sub>O/ Tube 1,5 ml

## **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

1] Πιπετάρισμα κατάλληλης ποσότητας RNA με βάση την συγκέντρωση του nanopdrop ώστε να υπάρχουν 8 ng συνολικά και προσθήκη νερού έως ότου να έχουν όλα τον ίδιο όγκο.

2] Φασματοφωτομέτρηση στο Q3000 της εταιρείας Quawell- ώστε να υπάρχουν 8 ng συνολικά και προσθήκη νερού έως ότου όλα τα δείγματα να έχουν τον ίδιο όγκο.

3] Προσθήκη της αναγκαίας ποσότητας master mix σε κάθε δείγμα.

4] Vortex για 3" και σύντομο spin.

5] Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 1h για να δράσει το ένζυμο.

6] Μεταφορά στον πάγο και προσθήκη 135 µl Ammonium Acetate 7,5 M και 235 µl ddH<sub>2</sub>O.

7] Προσθήκη 400 µl φαινόλης / χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1, σε κάθε δείγμα και vortex για 30 sec-1 min.

8] Φυγοκέντρηση στους 14.000 rpm για 5 min στους 4 °C.

9] Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση του σε άδειο καινούριο tube.

10] Προσθήκη 1000 µl 100 % EtOH μαζί με 1 µl γλυκογόνο 50 mg / ml , ανακίνηση 4-5 φορές και επώαση στους – 80 °C για τουλάχιστον 1 h.

- Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε αυτό το στάδιο για εβδομάδες

11] Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 30 min στους 14.000 rpm και τους 4 °C. Αφαίρεση του υπερκειμένου χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα.

12] Προσθήκη 500µl 70 % EtOH και φυγοκέντρηση στους 14.000 rpm για 10 min στους 4 °C.

13] Απομάκρυνση του υπερκειμένου, σύντομη φυγοκέντρηση και αφαίρεση μέσω πιπέτας των υπολειμμάτων αιθανόλης. Επώαση των δειγμάτων με ανοιχτό το καπάκι πλάγια στον πάγο για περίπου 10 min.

14] Επαναδιάλυση με σε 12 µl ddH<sub>2</sub>O 1 και τοποθέτηση των δειγμάτων (κλειστά) στους 55 °C για 5 min για να επαναδιαλυθούν. Ακολουθεί έντονο vortex για 1 min και μετά spin. Αποθήκευση των δειγμάτων στους – 80 °C.

\* Μέτρηση 2 µl δείγματος στο φασματοφωτόμετρο quawell.

### 3.2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (cDNA Treatment)

Το απομονωμένο RNA από τα προηγούμενα βήματα μπορεί να μετατραπεί σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής που γίνεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcriptase). Το cDNA μπορεί να κατασκευαστεί με διαφορετικούς εκκινήτες (random hexamers, gene specific, oligo-dT), ανάλογα με το στόχο του πειράματος[88]. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήσαμε oligo-dT προκειμένου να μετατρέψουμε σε cDNA μόνο τα ώριμα μετάγραφα. Οι oligo-dT primers προσδένονται στις poly-A ουρές των μεταγράφων.

**ΥΛΙΚΑ:** Απομονωμένο RNA / Oligo-dT primers 50mM / 10mM dNTPs / Αναστολέας ριβονουκλεασών RNaseOUT (40 U/ul) / 5x Buffer MMLV-RT / DTT 100mM / MMLV-RT (200 U/ ul)/ ddH<sub>2</sub>O

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

- 1] Από κάθε δείγμα υπολογίζονται 1000 ng RNA και γίνεται διάλυση σε 10 μl.
- 2] Σε κάθε αραιωμένο δείγμα προστίθεται 1 μl από 50 mM oligo-dT primers και 1 μl από 10 mM dNTPs. Τοποθέτηση στους 65 °C για 5 min στο heat block και αμέσως μετά στον πάγο για 10 min.
- 3] Παρασκευή του mix της αντίδρασης με τελικό όγκο 20 μl. Για κάθε δείγμα ρίχνονται 4 μl buffer 5x, 2 μl DTT (100 mM), 0,5 μl Rnase out (40 U/μl), 1 μl MMLV-RT (200 u/μl) + 0,5 μl ddH<sub>2</sub>O.
- 4] Vortex, spin και προσθήκη 8 μl σε κάθε δείγμα από το mix. Επώαση στους 37 °C για 2 h.
- 5] Μετά τις 2 h προσθήκη 380 μl ddH<sub>2</sub>O και αποθήκευση στους -20 °C.

Προσθήκη 4 μl ανά δείγμα για qPCR.

### 3.2.4 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης (Gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος υπό την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση της ηλεκτροστατικής δύναμης προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου, με ταχύτητα ανάλογη του φορτίου και της μάζας τους, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να γίνεται κυρίως με βάση το μέγεθος. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας[89].

**ΥΛΙΚΑ:** Αγαρόζη / Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x / Ζυγός ακριβείας / Αλουμινόχαρτο /Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)/ Θερμοπροστατευτικό γάντι/ Καλούπι για

πήκτωμα αγαρόζης και “χτενάκι”/ Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml/ Κωνική φιάλη των 250 ml/ Δείγματα νουκλεϊκών οξέων/ loading dye 6x / ladder 100 bp Enzyquest

## **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια:

- 1] Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
- 2] Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.
- 3] Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφηση του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

### ***Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης***

Ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα αγαρόζης ανάλογα με την πυκνότητα και τον όγκο που θέλουμε να έχει το πήκτωμα.

- 1] Με την χρήση ενός ογκομετρικού σωλήνα μετριέται ο όγκος του αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TBE (0,5X) που θα χρησιμοποιηθεί.
- 2] Προετοιμασία του καλουπιού στο οποίο το διάλυμα θα πήξει ενώ προστίθεται και ένα “χτενάκι” το οποίο επιλέγεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
- 3] Σε κωνική φιάλη τοποθετείται η αγαρόζη και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X.
- 4] Τοποθέτηση της κωνικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων σε υψηλή θερμοκρασία έως ώτου επέλθει βρασμός. Με την χρήση θερμοπροστατευτικού γαντιού αναδεύεται η κωνική φιάλη μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως.
- 5] Με την χρήση του θερμοπροστατευτικού γαντιού αναδεύεται η κωνική φιάλη κάτω από κρύο τρεχούμενο νερό έως ώτου το διάλυμα φτάσει περίπου τους 37 °C
- 6] Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε συγκέντρωση πηκτώματος και σύντομη ανάδευση για τη διαλυτοποίησή του.
- 7] Τοποθέτηση του διαλύματος μας στο ήδη έτοιμο εκμαγείο το οποίο στη συνέχεια αφήνεται να κρυώσει καλά αφού πρώτα απαλειφθούν τυχόν φουσκάλες που μπορεί να υπάρχουν στην επιφάνειά του.
- 8] Όταν το διάλυμα στερεοποιηθεί πλήρως, αφαιρείται με προσοχή το “χτενάκι” και το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.

9] Θα πρέπει το πήκτωμα αγαρόζης να καλύπτεται πλήρως από διάλυμα TBE 0,5X μέσα στην συσκευή για την σωστή διεξαγωγή της διαδικασίας.

### **Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων**

1] Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων μας στο πήκτωμα αγαρόζης, προστίθεται η χρωστική Gel Loading Dye Purple 6x. Σε δείγματα 50μl προστίθενται 10μl Gel Loading Dye Purple.

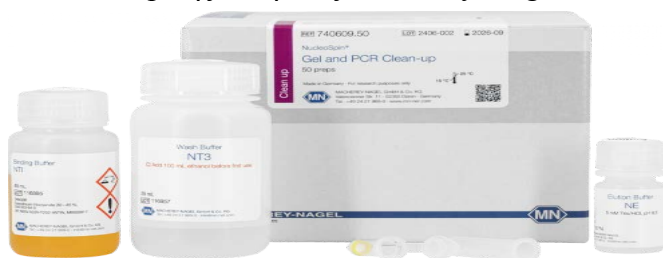
2] Στα πηγάδια που δημιουργήθηκαν από το “χτενάκι” φορτώνονται τα δείγματα καθώς και ο μάρτυρας (ladder) ο οποίος επιλέγεται με βάση το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων που αναμένεται να παρατηρήσουμε .

3] Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 120V (20-30 min) για ηλεκτροφόρηση DNA μορίων και 90V (10-15 min) για ηλεκτροφόρηση RNA μορίων.

4] Μετά από περίπου 30 min, το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) για την παρατήρηση των ζωνών.

### **3.2.5 Ανάκτηση μορίων DNA από γέλη αγαρόζης (Agarose Gel Extraction)**

Η ανάκτηση μορίων DNA αποσκοπεί στην απομόνωση και τον καθαρισμό μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας η οποία έχει διαχωριστεί από τις υπόλοιπες σε πήκτωμα αγαρόζης. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα ακριβώς μετά την ηλεκτροφόρηση και το κομμάτι που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA θα αφαιρεθεί ούτως ώστε να απομονωθεί και να καθαριστεί[90]. Η διαδικασία της ανάκτησης της επιθυμητής ζώνης DNA από το gel αγαρόζης έγινε σύμφωνα με το ειδικό kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρείας Macherey-Nagel.



Εικόνα 14. Kit απομόνωσης DNA της εταιρείας Macherey-Nagel.

**ΥΛΙΚΑ:** NT1 buffer/ NT3 buffer/ ddH<sub>2</sub>O/ Στήλη απομόνωσης DNA (Column)/ Σωλήνας συλλογής (Collection tube) / Ζυγός ακριβείας/ Tube 1,5 ml

**ΜΕΘΟΔΟΣ:** Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο ανάκτησης των επιθυμητών μορίων DNA από γέλη αγαρόζης περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1] Τοποθέτηση ενός άδειου tube σε ζυγό ακριβείας, όμοιου των προηγούμενων που τοποθετήθηκαν οι ζώνες από το πήκτωμα αγαρόζης, και μηδενισμός.

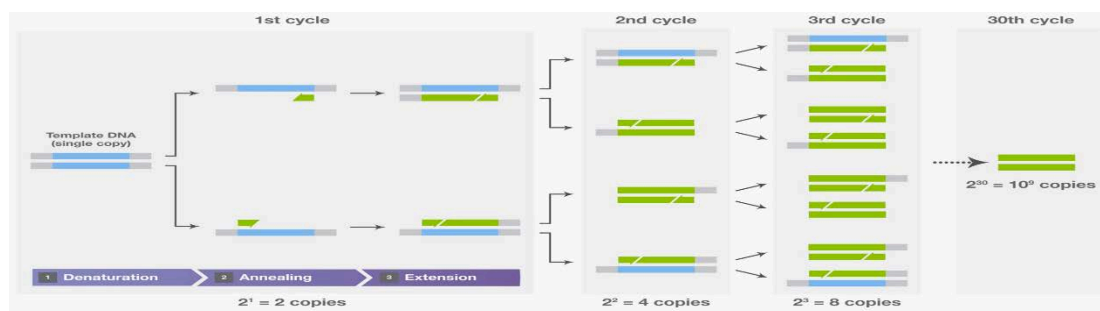
- 2] Υπολογισμός του βάρους κάθε δείγματος ξεχωριστά.
  - 3] Προσθήκη 200 µl διαλύματος Buffer NT1 ανά 100 mg πηκτώματος
  - 4] Τοποθέτηση του πηκτώματος στο heatblock για 5-10 min στους 50 °C μέχρι να λιώσει πλήρως η αγαρόζη. Ανάδευση ανά 2-3 min.
  - 5] Μεταφορά έως και 700 µl του διαλύματος σε ειδική στήλη (NucleoSpin Gel and PCR clean-up column) προσαρμοσμένη σε σωλήνα συλλογής (collection tube 2 ml) και φυγοκέντρηση στα 11.000 g .
  - 6] Απόρριψη του υγρού που εκλούσθηκε και επανάληψη του σταδίου 5 εάν υπάρξει περίσσεια διαλύματος.
  - 7] Προσθήκη 700 µl διαλύματος Buffer NT3 στην ειδική στήλη για έκπλυση και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 min.
  - 8] Απόρριψη του υγρού που εκλούσθηκε.
  - 9] Πραγματοποίηση και 2ης φυγοκέντρησης στα 11.000 g όπου αντί για 1 min κάνουμε 5 min και απόρριψη πάλι του υγρού από τον σωλήνα συλλογής.
  - 10] Φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 min για να απομακρυνθεί τελείως το Buffer NT3 και επώαση της ειδικής στήλης για 2-5 min στους 70 °C για να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη.
  - 11] Τοποθέτηση της ειδικής στήλης σε ένα νέο tube των 1,5 ml.
  - 12] Προσθήκη 15 µl ddH<sub>2</sub>O, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 5 min. Το στάδιο αυτό (στάδιο έκλυσης) πραγματοποιείται 2 διαδοχικές φορές.
- \*Μέτρηση 2 µl στο φασματοφωτόμετρο quawell.

### 3.3 Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction ή PCR) είναι μια απλή και γρήγορη in vitro τεχνική της μοριακής βιολογίας με πολλαπλές εφαρμογές, βασική ιδέα της οποίας είναι η παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η αντίδραση PCR, εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του in vivo μηχανισμού αντιγραφής του DNA με άπώτερο σκοπό την in vitro ενίσχυση συγκεκριμένης ακολουθίας DNA, χωρίς την μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Οποιαδήποτε περιοχή πάνω στο γονιδίωμα μπορεί να ενισχυθεί αρκεί να είναι γνωστά τα δύο άκρα της περιοχής ενδιαφέροντος. Τα βασικά συστατικά μιας συμβατικής PCR είναι το εκμαγείο DNA (με την περιοχή ενδιαφέροντος), οι εκκινητές (forward και reverse), η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα για την αποτελεσματική δράση του ενζύμου (Buffer), τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τα ιόντα Mg<sup>2+</sup> και αποστειρωμένο νερό[91]. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς

κύκλους (συνήθως 25-35), καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα διακρίνουμε τα εξής στάδια[91,92]:

- Αποδιάταξη (*denaturation*): Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
- Υβριδισμός εκκινητών (*primer annealing*): Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται / ενώνονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
- Επιμήκυνση (*extension*): Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) με κατεύθυνση 5' προς 3' χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης του νέου κλώνου είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.



Εικόνα 15. Απεικόνιση των τριών βασικών σταδίων των επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιδράσεων της PCR[92].

### 3.3.1 Σχεδιασμός εκκινητών για PCR και qPCR

Ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου στόχου, μέσω της συμβατικής PCR και της qPCR, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εργαλείου PrimerQuest της Integrated DNA Technologies (IDT). Σχετικά με τον έλεγχο των εκκινητών ως προς την ομολογία και την ειδική πρόσδεση στην αλληλουχία ενδιαφέροντος, αξιοποιήθηκε το εργαλείο Primer Blast της NCBI ώστε να αποφευχθεί η ενίσχυση παραπροϊόντων. Τέλος, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Oligoanalyzer της IDT, το οποίο διερευνά την δυνατότητα σχηματισμού ομοδιμερών και ετεροδιμερών δομών καθώς και την T<sub>m</sub> για τον σχεδιασμό δομών φουρκέτας (hairpins), λόγω της ενδομοριακής συμπληρωματικότητας. Σε κάθε περίπτωση, για την T<sub>m</sub> στην οποία δημιουργούνται φουρκέτες πρέπει να ισχύει το κριτήριο T<sub>m</sub>+10< Primer T<sub>m</sub>, ενώ για το ΔG κάθε πιθανής δομής πρέπει να ισχύει το κριτήριο ΔG> -9 [93]. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που επιλέχθηκαν, εν τέλει, έπειτα από την αξιολόγηση των ιδιοτήτων τους και τα μεγέθη των προϊόντων ενίσχυσης κάθε αντίδρασης απεικονίζονται παρακάτω:

Maiden4_T7_F LOC109407277/115258717	<b>TAATACGACTCACTATAGGGTAACTG</b> <b>TGAGCATTGCCAGC</b>
Maiden4_T7_R	<b>TAATACGACTCACTATAGGGTGAATT</b> <b>TTCATCGCGGATCT</b>
Maiden4_qPCR_F LOC109407277	<b>GTCCAGTAGTCCGTCCGTCT</b>
Maiden4_qPCR_R	<b>ATGGACGTTCAAGTATGGAGTTT</b>

### 3.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με την χρήση T7 εκκινητών

Για την ενίσχυση του γονιδίου *Maiden 4* που διερευνάται, διεξήχθη μια αντίδραση συμβατικής PCR χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της KAPA Hifi Taq πολυμεράσης της εταιρείας KAPA Biosystems. Για κάθε αντίδραση ο τελικός όγκος προσαρμόστηκε στα 50  $\mu$ l. Οι ποσότητες των συστατικών του mix όπως προέκυψαν από το πρωτόκολλο παρουσιάζονται παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Όγκος ( $\mu$ l)/ αντίδραση	Τελική Συγκέντρωση
Buffer 5x Hifi	5x	10 $\mu$ l	1x
dNTPs mix	10 mM	1,5 $\mu$ l	0,6 mM
Primer-F	10 mM	1,5 $\mu$ l	0,6 mM
Primer-R	10 mM	1,5 $\mu$ l	0,6 mM
KAPA Hifi Taq pol	1 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	-	32,5 $\mu$ l	-
Template (cdna whole body)	2 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l	4 ng/ $\mu$ l

Σημαντικό να τονιστεί ότι οι εκκινητές της συγκεκριμένης αντίδρασης PCR είναι συζευγμένοι με T7 άκρα, τα οποία αποτελούν περιοχές του υποκινητή που αναγνωρίζει η T7 RNA πολυμεράση.

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR είναι:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 min	1
Αποδιάταξη	95°C	20 sec	30
Υβριδοποίηση	61°C	15 sec	
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	
Τελική Επιμήκυνση	72°C	1 min	1

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *GFP*, το οποίο ενισχύθηκε με ίδιο θερμοκρασιακό πρωτόκολλο με το γονίδιο *Maiden 4*, με μόνη διαφορά ότι η θερμοκρασία υβριδισμού (Ta) ρυθμίστηκε στους 55 °C.

### 3.3.3 Ποσοτική PCR (qPCR) ή PCR πραγματικού χρόνου

Η PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR (qPCR) είναι μια μοριακή τεχνική που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του γονιδιωματικού DNA ή του RNA, μέσω μετατροπής του σε cDNA, σε πραγματικό χρόνο. Παρά το γεγονός ότι τα συστατικά της qPCR είναι κοινά με κάθε άλλη συμβατικού τύπου αντίδραση PCR, διαθέτει ένα επιπρόσθετο συστατικό που καθιστά εφικτή την παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Το συστατικό αυτό πρόκειται για μια ειδική φθορίζουσα χρωστική, συνήθως την SYBR GREEN, η οποία έχει την ικανότητα τόσο της επιλεκτικής πρόσδεσης σε δίκλωνο DNA με τρόπο ανάλογο με την ποσότητα του στο υπό εξέταση δείγμα, όσο και της παραγωγής φωτός σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (522 nm). Πιο συγκεκριμένα παρουσία δίκλωνου DNA γίνεται ισχυρή δέσμευση μορίων της χρωστικής μεταξύ των δύο αλυσίδων, αυτά αλλάζουν διαμόρφωση και αυξάνουν έτσι την εκπομπή φθορισμού κατά 200 φορές σε σύγκριση με τον φθορισμό των μη δεσμευμένων μορίων χρωστικής στο δείγμα. Ο φθορισμός γίνεται ανιχνεύσιμος από έναν ανιχνευτή φθορισμού εντός του θερμοκυκλοποιητή. Άρα γίνεται κατανοητό πως σε κάθε κύκλο αντίδρασης στην αρχή έχουμε μηδενικό φθορισμό, λόγω αποδιάταξης των δύο κλώνων του DNA, έπειτα αυξάνεται ο φθορισμός λόγω της τήξης μορίων των εκκινητών και στο τέλος λόγω της δημιουργίας δύο δίκλωνων αντιγράφων δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής και συνεπώς έχουμε πολύ φθορισμό. Μάλιστα όσο προχωρούν οι κύκλοι της αντίδρασης, παράγονται και περισσότερα δίκλιωνα μόρια DNA με αποτέλεσμα να έχουμε σταδιακή αύξηση του φθορισμού που ανιχνεύεται στο δείγμα[94,95].

Στην ποσοτική PCR (qPCR) διακρίνονται 3 πολύ σημαντικές καμπύλες[95]:

- **Καμπύλη ενίσχυσης:** Συσχετίζει τον αριθμό κύκλων (Ct) της αντίδρασης στον άξονα χ με την ποσότητα φθορισμού στον άξονα y.

- **Καμπύλη αποτελεσματικότητας ή απόδοσης:** Δημιουργία πρότυπης καμπύλης που συσχετίζει την ποσότητα DNA (ng) στον άξονα x με το Cq κάθε δείγματος στον άξονα y.
- **Καμπύλη τήξης:** Συσχετίζει την θερμοκρασία κάθε δείγματος στον άξονα x με την ποσότητα φθορισμού στον άξονα y. Χρησιμοποιείται για διάκριση τυχόν παραπροϊόντων από το κύριο προϊόν.

Η real-time PCR χρησιμοποιείται κυρίως, για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων στόχων μέσω της ενίσχυσης του cDNA. Η κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης των γονιδίων στόχων στηρίζεται σε γονίδια που διατηρούν σταθερή και υψηλή έκφραση μεταξύ των συνθηκών του πειράματος μας. Αυτά τα γονίδια καλούνται ιδιοσύστατα (housekeeping) και πρόκειται κυρίως για γονίδια του κυτταροσκελετού ή του μεταβολισμού[95]. Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής αξιοποιήθηκε το γονίδιο RPL32.

Για τη μελέτη της μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου στόχου, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR σε δείγματα cDNA από:

1] Ιστούς ωοθηκών πριν (NBF) και μετά το γεύμα αίματος (PBM) σε έξι διαφορετικά χρονικά σημεία 12h,24h,36h,48h,60h και 72h.

2] Έμβρυα σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία 0-1h, 0-4h και 4-8h.

3] Ιστούς του κεφαλιού, του μεσεντέρου, των μαλπιγγειανών σωληναρίων, του σώματος αλλά και σε ολόκληρο το σώμα αρσενικών κουνουπιών. Η qPCR πραγματοποιήθηκε σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή της εταιρείας Bio-Rad, ενώ η ανάλυση των δεδομένων έγινε με βάση το πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager. Για την αντίδραση αξιοποιήθηκε SYBR mix της εταιρείας KAPA Biosystems που περιέχει χρωστική SYBR GREEN, DNA πολυμεράση, dNTPs και ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης MgCl<sub>2</sub>. Η προσθήκη του cDNA γίνεται χωριστά ενώ για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια φτιάχτηκε κατάλληλο mix. Ο υπολογισμός των όγκων των συστατικών του mix έγινε με βάση το εργαλείο Mastermix calculator του Bio-Rad CFX Manager και οι ποσότητες των συστατικών της αντίδρασης φαίνονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα:

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)/ αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
SYBR mix	2X	7,5 μl	1X
Primer-F	10 μM	0,3 μl	200 nM
Primer-R	10 μM	0,3 μl	200 nM
Template	-	4 μl	-
ddH <sub>2</sub> O	-	2,9 μl	-
Total Volume		15 μl	

Πολύ σημαντικά στοιχεία για την μέγιστη αποτελεσματικότητα μιας αντίδρασης qPCR είναι τόσο η εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας τήξης ( $T_a$ ) των εκκινητών όσο και η εύρεση της καταλληλότερης συγκέντρωσης των εκκινητών στα δείγματα. Μέσω μιας επιπλέον αντίδρασης PCR, γνωστής ως gradient PCR, καθίσταται εφικτή η επανάληψη της αντίδρασης ενίσχυσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού. Έτσι, η βέλτιστη θερμοκρασία τήξης ( $T_a$ ) των εκκινητών βρέθηκε να είναι στους 59 °C. Σχετικά με την εύρεση της καταλληλότερης συγκέντρωσης των εκκινητών κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη ενός αρχικού δείγματος cDNA. Βρέθηκε ότι η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης έφτασε το 106,9% με τελική συγκέντρωση των εκκινητών στα 200 nM.

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR είναι:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη	95 °C	5 sec	40
Υβριδισμός εκκινητών	59 °C	15 sec	
Επιμήκυνση εκκινητών	72 °C	10 sec	

### 3.4 Παραγωγή δίκλωνου RNA (dsRNA)

Στην περίπτωση του συγκεκριμένου πειράματος γίνεται σχεδιασμός δίκλωνων μορίων RNA συμπληρωματικών προς το γονίδιο-στόχο με απώτερο σκοπό την αποσιώπηση του γονιδίου *Maiden 4* και μετέπειτα έλεγχο της επίδρασης της στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών *Aedes albopictus*. Η διαδικασία παραγωγής του dsRNA περιλαμβάνει τα στάδια της in vitro μεταγραφής, της επεξεργασίας με DNase I και της κατακρήμνισης του dsRNA.

#### 3.4.1 In vitro transcription

Η in vitro μεταγραφή είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε εργαστηριακό περιβάλλον και αποσκοπεί στην δημιουργία δίκλωνου RNA από εκμαγείο DNA. Η παραγωγή του dsRNA βασίζεται στην χρήση εξειδικευμένων RNA πολυμερασών, όπως η T7, και αναστολέων ριβονουκλεασών RNase OUT. Το εκμαγείο DNA φέρει ειδικές περιοχές του υποκινητή που αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά η T7 RNA πολυμεράση, τα T7 άκρα [81,96]. Με αυτόν τον τρόπο και παρουσία του ενζύμου θα έχουμε από κάθε κλώνο του γονιδίου *Maiden 4* μεταγραφή RNA μορίων τα οποία θα είναι μεταξύ τους συμπληρωματικά και εν τέλει θα σχηματιστεί το δίκλωνο μόριο RNA. Για την in vitro μεταγραφή χρησιμοποιήθηκε το conventional in vitro transcription kit της εταιρείας Thermofisher. Ο τελικός όγκος ανά αντίδραση ορίστηκε στα 50  $\mu$ l.

**ΥΛΙΚΑ:** 5X Transcription buffer/ ATP/GTP/CTP/UTP Mix (10 mM each) / Template DNA (προϊόν PCR με T7 άκρα) / Αναστολέας ριβονουκλεασών RNaseOUT (50 U/μl)/ T7 RNA polymerase (30 U/μl) / ddH<sub>2</sub>O

### **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

1] Απόψυξη των αντιδραστηρίων στον πάγο και καλό vortex του template και του transcription buffer.

2] Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίων σε 1,5 ml tube, σύμφωνα με τους όγκους αντιδραστηρίων ανά αντίδραση που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

3] Σύντομο spin και επώαση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 37 °C για 2h.

Οι ποσότητες των συστατικών του mix όπως προέκυψαν από το πρωτόκολλο παρουσιάζονται παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Όγκος (μl)/ αντίδραση	Τελική συγκέντρωση	2,5 αντ/σεις
5x Transcription buffer	5x	10 μl	1x	25 μl
NTPs	10 mM	10 μl	2 mM	25 μl
Template DNA (προϊόν PCR με T7 άκρα)	239,1 ng/ μl	2,1 μl	502 ng/ μl	5,25 μl
RNase Inhibitor	-	1,25 μl	50 U	3,125 μl
T7 RNA Pol	-	1,5 μl	30 U	3,75 μl
ddH <sub>2</sub> O	-	25,15 μl	-	62,875 μl

### **3.4.2 Επεξεργασία με DNase I (DNase Treatment)**

Η συγκεκριμένη διαδικασία αποσκοπεί στην απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA εκμαγείου που έχει παραμείνει στα δείγματα κατά την διαδικασία της in vitro μεταγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται με το ένζυμο DNάση I η οποία υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς των μορίων DNA[87].

**ΥΛΙΚΑ:** Turbo DNase I (2 U/ ul)/ EDTA 0.5 M pH 8.0

### **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

Προσθήκη του ενζύμου DNase I (2 ul, 2 U/ ul) στους 37°C για 15 min. Αφού τα δείγματα επωαστούν γίνεται η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας χηλικού παράγοντα (2 μl 0.5 M EDTA pH 8.0) με απώτερο σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και κατά συνέπεια τον τερματισμό της αντίδρασης. Τα δείγματα επωάζονται στην συνέχεια στο φουρνάκι στους 65 °C για 10 min.

### 3.4.3 Κατακρήμνιση του dsRNA

Η κατακρήμνιση του dsRNA γίνεται με στόχο την απομάκρυνση των ρυθμιστικών διαλυμάτων, των ενζύμων και αντιδραστηρίων και την τελική απομόνωση του μεταγραφόμενου RNA[97].

**ΥΛΙΚΑ:** Γλυκογόνο 50 mg/ml / CH<sub>3</sub>COONa 5 mM/ 100 % EtOH/ 75 % EtOH / 70 % EtOH/ ddH<sub>2</sub>O/ Tube 1,5 ml

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

1] Προσθήκη 2,5X του όγκου 100 % EtOH, 0,1X CH<sub>3</sub>COONa 5 mM, 1 μl γλυκογόνου (50mg/ ml) και 150 μl ddH<sub>2</sub>O για τη κατακρήμνιση του dsRNA υπό τη μορφή ιζήματος και τοποθέτηση στους -80 °C για τουλάχιστον 1h. Τα δείγματα αφέθηκαν στους -80 °C όλο το βράδυ.

2] Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C στα 12000 g για 30 min, απόρριψη υπερκείμενου και πλύση με 500 μl 75% EtOH.

3] Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C στα 12000 g για 10 min, απόρριψη υπερκείμενου και πλύση με 500 μl 70% EtOH.

4] Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 4°C στα 12000 g για 10 min και απόρριψη υπερκείμενου προσεκτικά για να μην διαταραχθεί η πελέτα.

5] Τοποθέτηση των δειγμάτων στο φουρνάκι για στέγνωμα για 10-15 min.

6] Επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 30 μl ddH<sub>2</sub>O, έντονο vortex και spin.

7] Μέτρηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο quawell.

8] Διατήρηση των δειγμάτων στην κατάψυξη.

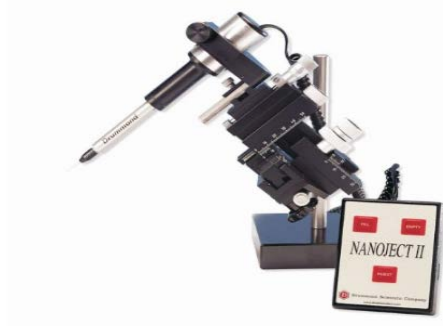
### 3.5 Χορήγηση του dsRNA μέσω μικροέγχυσης

Η μέθοδος της μικροέγχυσης χρησιμοποιείται για την χορήγηση ειδικά σχεδιασμένων δίκλωνων μορίων RNA (dsRNA), τα οποία θα επάγουν τον μηχανισμό του RNAi για την σίγηση των γονιδίων στόχων[66,82]. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία δημιουργήθηκαν dsRNA τα οποία είναι ειδικά σχεδιασμένα για σίγηση του γονιδίου *Maiden 4*. Οι ενέσεις έγιναν σε ενήλικα θηλυκά κουνούπια του *Aedes albopictus*.

**ΥΛΙΚΑ:** Γυάλινη βελόνα/ Nanoject II της εταιρείας Drummond Scientific/ Mineral oil/ Parafilm/ dsRNA/ 70% EtOH

### **ΜΕΘΟΔΟΣ:**

- 1] Τοποθέτηση των κουνουπιών στο ψυγείο για 5 min για την αναισθητοποίηση τους.
- 2] Τοποθέτηση των κουνουπιών σε τρυβλίο εκτεθειμένο σε πάγο κατά την διάρκεια της μικροέγχυσης.
- 3] Συναρμολόγηση και καθαρισμός της συσκευής μικροένεσης με 70% αιθανόλη.
- 4] Προετοιμασία της βελόνας με προσεκτικό σπάσιμο του άκρου της και γέμισμα με mineral oil.
- 5] Εισαγωγή βελόνας στη συσκευή μικροένεσης και γέμισμα με κατάλληλη ποσότητα dsRNA τοποθετημένο σε κομμάτι parafilm κάτω από το μικροσκόπιο.
- 6] Ρύθμιση συσκευής για την μικροέγχυση 64.4nl dsRNA ανά έγχυση.
- 7] Μικροέγχυση κουνουπιών με προσεκτική διάτρηση της επιδερμίδας τους, σε εύκολα προσεγγίσιμους ιστούς όπως ο θώρακας.
- 8] Τοποθέτηση κουνουπιών που έχουν υποβληθεί σε μικροέγχυση σε ξεχωριστό δοχείο και χορήγηση ζαχαρόνερου.
- 9] Καθαρισμός και αποσυναρμολόγηση συσκευής μικροέγχυσης.
- 10] Λήψη γεύματος αίματος θηλυκών κουνουπιών 24 ώρες μετά την χορήγηση του dsRNA.



Εικόνα 16 Συσκευή μικροέγχυσης ( Fisher Scientific ).

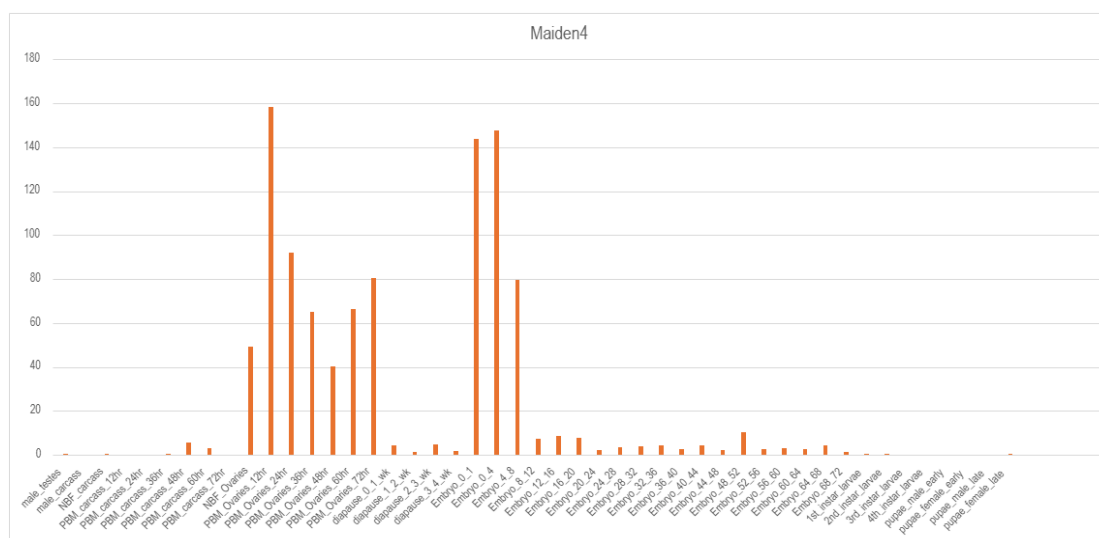
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Προφίλ έκφρασης γονιδίου στόχου - Επιβεβαίωση βιβλιογραφικών δεδομένων

Η επιλογή του γονιδίου του συγκεκριμένου lncRNA βασίστηκε σε RNA seq δεδομένα των Gamez et al.(2020) στα οποία φαίνεται ότι το γονίδιο αυτό αρχίζει να εκφράζεται αποκλειστικά στις ωοθήκες του *Aedes albopictus* μετά από λήψη γεύματος αίματος, γεγονός το οποίο υπογραμμίζει την πιθανή ρυθμιστική του δράση στο αναπαραγωγικό δυναμικό των κουνουπιών. Παράλληλα, με βάση τα ίδια βιβλιογραφικά δεδομένα, υποστηρίζεται ακόμη ότι το συγκεκριμένο μεταγράφο μεταφέρεται αυτουσία από τα θηλυκά κουνούπια στα έμβρυα στα πολύ αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και μάλιστα φαίνεται να εκφράζεται ανεξάρτητα και από τα ίδια τα έμβρυα. Συνολικά, λοιπόν, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο lncRNA αποτελεί μητρική κληρονομιά με πιθανό ρόλο τόσο στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών κουνουπιών όσο και στην διαδικασία του MZT στα έμβρυα.

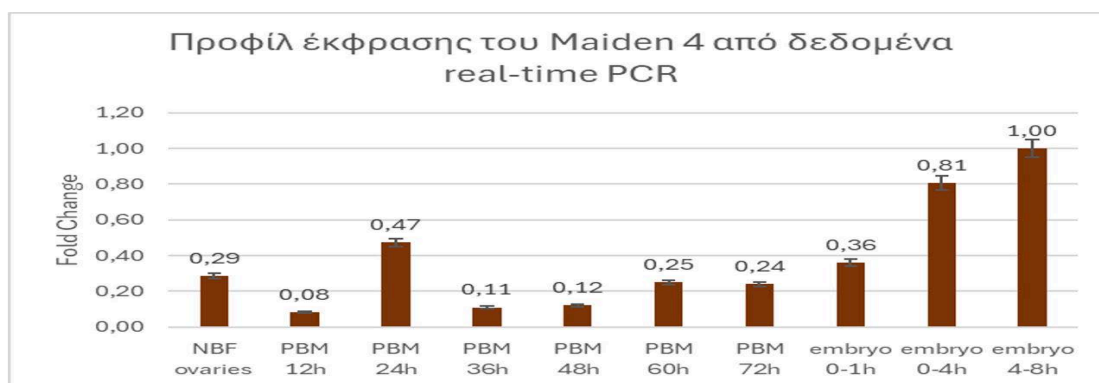
#### 4.1.1 Προφίλ έκφρασης του *Maiden 4* σε ωοθήκες και έμβρυα

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα της μεταγραφομικής ανάλυσης του *Aedes albopictus* στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια, το γονίδιο *Maiden 4* παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης τόσο στις ωοθήκες πριν (NBF) και μετά (PBM) το γεύμα αίματος σε έξι χρονικά σημεία από την ωογένεση μέχρι και την ωρίμανση των ωοθηκών (0-72 h PBM) αλλά και στα έμβρυα σε τρία χρονικά σημεία (0-8 h). Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο γράφημα 1, η έκφραση *Maiden 4* είναι αυξημένη στις ωοθήκες του *Aedes albopictus* μετά από λήψη γεύματος αίματος παρουσιάζοντας την υψηλότερη έκφρασή του στις 12 h PBM. Έπειτα η έκφραση πέφτει σταδιακά έως τις 48 h και στην συνέχεια ελαφρώς αυξάνεται από τις 48h έως τις 72 h. Στα έμβρυα, το *Maiden 4* έχει την πιο υψηλή του έκφραση στα έμβρυα 0-4 h, ενώ πέφτει ελαφρώς αλλά παραμένει υψηλή η έκφρασή του στα έμβρυα 4-8 h.



Γράφημα 1. Βιβλιογραφικά δεδομένα της έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* τόσο στις ωοθήκες μετά την λήψη γεύματος αίματος στα έξι χρονικά σημεία όσο και στα έμβρυα στα τρία χρονικά σημεία.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης, διεξήχθη ποσοτική PCR σε δείγματα cDNA από ιστούς ωοθηκών ενήλικων κουνουπιών αλλά και σε έμβρυα στα αντίστοιχα χρονικά σημεία που ελέγχθηκαν και για τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Για την κανονικοποίηση των τιμών χρησιμοποιήθηκε το ιδιοσύστατο γονίδιο RPL32. Όπως απεικονίζεται στο γράφημα 2, το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* δεν ταυτίζεται πλήρως με αυτό των βιβλιογραφικών δεδομένων, όμως μοιράζεται κοινά σημεία. Πιο συγκεκριμένα, το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-4 h και 4-8 h βρέθηκε ανεστραμμένο σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα με την υψηλότερη τιμή έκφρασης του γονιδίου να εντοπίζεται στα έμβρυα 4-8 h αντί για εκείνα των 0-4 h. Επίσης, το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-1h είναι σημαντικά χαμηλότερο από την υψηλότερη τιμή έκφρασης του γονιδίου στα έμβρυα 4-8 h, σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Με βάση την μέγιστη τιμή έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 4-8 h έγινε και η σύγκριση των τιμών έκφρασής του στα υπόλοιπα χρονικά σημεία των εμβρύων αλλά και στις ωοθήκες. Έτσι, η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *Maiden 4* ανιχνεύεται στις ωοθήκες των 24 h μετά την λήψη γεύματος αίματος σε σχέση με τα άλλα χρονικά σημεία των ωοθηκών, γεγονός το οποίο δεν ταυτίζεται πλήρως με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Όπως φαίνεται στο γράφημα 1, η μέγιστη τιμή έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στις ωοθήκες είναι στις 12 h PBM και όχι στις 24 h PBM. Συνολικά, όμως, το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στις ωοθήκες ακολουθεί τα βιβλιογραφικά δεδομένα όπου παρατηρείται μια μέγιστη έκφραση μετά από γέυμα αίματος συνοδευόμενη από μια σταδιακή πτώση και μια ελαφριά επάνοδο στην έκφραση.



Γράφημα 2. Αποτελέσματα τιμών έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* σε ωοθήκες και έμβρυα στα αντίστοιχα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα χρονικά σημεία συγκριτικά με την υψηλότερη τιμή στα έμβρυα 4-8 h (fold change).

#### 4.1.2 Προφίλ έκφρασης του *Maiden 4* στους διάφορους ιστούς και στα αρσενικά κουνούπια

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα των Gamez *et al.* (2020), το *Maiden 4* αποτελεί ένα ιστοειδικό μη κωδικοποιητικό γονίδιο, του οποίου η έκφραση παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή στα έμβρυα 4-8h και φαίνεται ότι εκφράζεται και στους ιστούς των ωοθηκών ενήλικων θηλυκών κουνουπιών. Η επιβεβαίωση της ιστοειδικότητας του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με ποσοτική PCR σε δείγματα cDNA από ιστούς κεφαλιού (head), μεσεντέρου (midgut), μαλπιγγειανών

σωληναρίων (malpighian tubes), σώματος (carcass) θηλυκών κουνουπιών καθώς και σε δείγματα cDNA από ολόκληρο το σώμα αρσενικών κουνουπιών. Για την κανονικοποίηση των τιμών χρησιμοποιήθηκε πάλι το ιδιοσύστατο γονίδιο RPL32. Οι τιμές έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στους παραπάνω ιστούς και στα αρσενικά κουνούπια συγκρίθηκαν ως προς την τιμή έκφρασής του στα έμβρυα 4-8 h, όπου εκεί λαμβάνει και τη μέγιστη τιμή του. Όπως φαίνεται στο γράφημα 3, η έκφραση του *Maiden 4* σε όλους τους ιστούς και τα αρσενικά κουνούπια απουσιάζει συγκριτικά με την έκφρασή του στα έμβρυα 4-8 h, επιβεβαιώνοντας την ιστοειδικότητα του.



Γράφημα 3. Αποτελέσματα τιμών έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* σε ιστούς του κεφαλιού, του μεσεντέρου, των μαλπιγγειανών σωληναρίων, του σώματος θηλυκών κουνουπιών καθώς και σε αρσενικά κουνούπια συγκριτικά με την υψηλότερη τιμή στα έμβρυα 4-8 h (fold change).

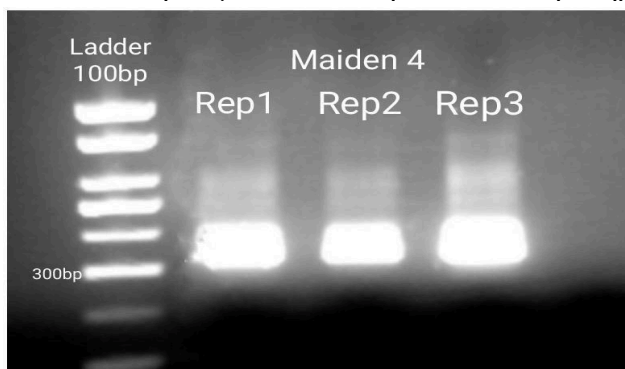
## 4.2 Ενίσχυση γονιδίων στόχων και επιβεβαίωση της

Αφού έγινε η επιβεβαίωση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* εργαστηριακά, το επόμενο βήμα ήταν η στόχευσή του σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω του RNAi. Προκειμένου, λοιπόν, να παραχθούν τα dsRNA μόρια που θα στοχεύουν τα μετάγραφα των γονιδίων, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών των γονιδίων στόχων μέσω συμβατικής PCR συζευγμένης με T7 εκκινητές. Εκτός του γονιδίου *Maiden 4*, επιλέχθηκε και ενισχύθηκε και το γονίδιο της GFP, το οποίο αξιοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, λόγω της απουσίας του στο γονιδίωμα του κουνουπιού *Aedes albopictus* και άρα, της αδυναμίας στόχευσης του, ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία της χορήγησης των dsRNA μορίων στα κουνούπια.

### 4.2.1 Ενίσχυση του γονιδίου *Maiden 4* με την χρήση T7 εκκινητών

Η ενίσχυση του γονιδίου *Maiden 4* πραγματοποιήθηκε μέσω τριών αντιδράσεων συμβατικής PCR με την προσθήκη T7 εκκινητών, καθεμία από τις οποίες είχε τελικό όγκο 50 μl, ώστε να παραχθεί αρκετό υπόστρωμα DNA. Ως DNA εκμαγείο για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε cDNA από σώμα ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών καθώς με αυτό τον τρόπο θα ενισχυθούν μόνο τα ώριμα μετάγραφα. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης είναι τα 350 bp (310 bp του προϊόντος ενίσχυσης μαζί με 40 bp της αλληλουχίας των T7 εκκινητών). Η ενίσχυση επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και την προσθήκη 10 μl 6x loading dye χρωστικής. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 20 εντοπίζονται οι αναμενόμενες ζώνες

όταν το πήκτωμα τοποθετηθεί και παρατηρηθεί κάτω από UV ακτινοβολία.



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση του Maiden 4 T7-PCR προϊόντος και με χρήση του ladder 100 bp της EnzyQuest.

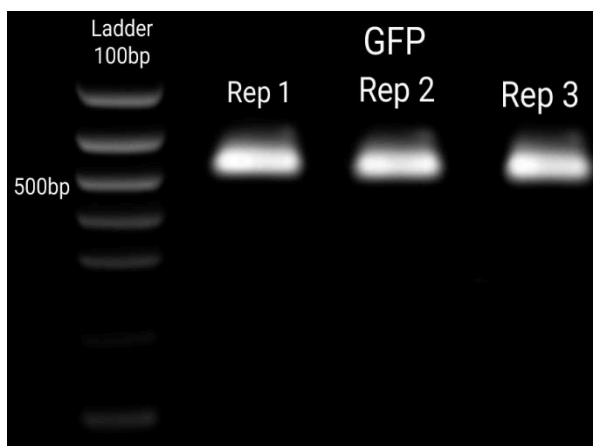
#### 4.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου GFP με την χρήση T7 εκκινητών

Η ενίσχυση του γονιδίου GFP πραγματοποιήθηκε μέσω τριών αντιδράσεων συμβατικής PCR με την χρήση των ακόλουθων T7 εκκινητών:

Forward: **taatacgactcactatagggCCGCCAGTGTGCTGGAA**

Reverse: **taatacgactcactatagggGATATCTGCAGAATTCGCC**

Ως εκμαγείο της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακός φορέας που το εκφράζει. Το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης είναι τα 540 bp (500 bp του προϊόντος ενίσχυσης μαζί με 40 bp της αλληλουχίας των T7 εκκινητών). Η ενίσχυση επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η παραγωγή, στην συνέχεια, μορίων dsRNA έναντι του GFP θα χρησιμεύσει ως αρνητικός μάρτυρας ώστε να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία της χορήγησης των dsRNA μορίων στα κουνούπια. Στην εικόνα 21 φαίνονται ενισχυμένες οι αναμενόμενες ζώνες όταν το πήκτωμα τοποθετηθεί και παρατηρηθεί κάτω από UV ακτινοβολία.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση του GFP T7-PCR προϊόντος και με χρήση του ladder 100 bp της EnzyQuest.

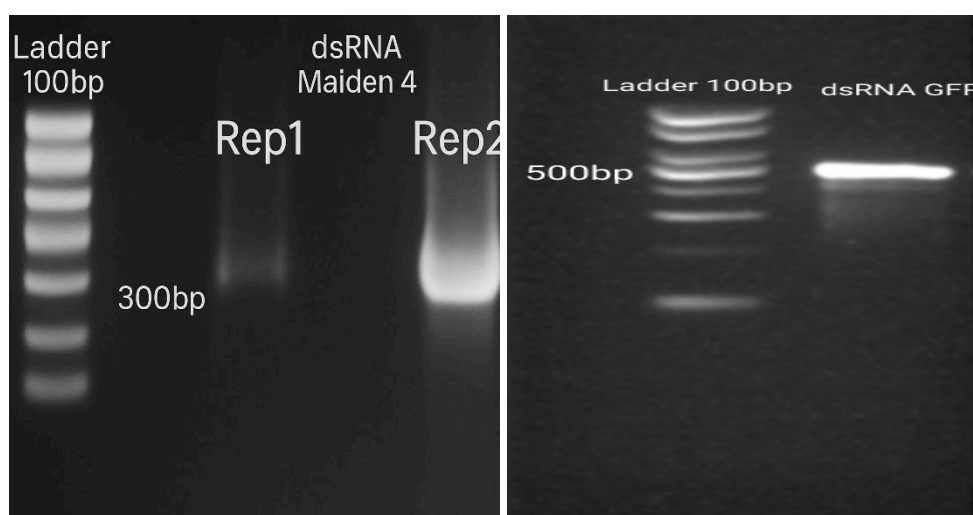
### 4.3 Παραγωγή dsRNA έναντι των *Maiden 4* και *GFP*

Τα τμήματα DNA που ήταν οι στόχοι της ενίσχυσης, εν προκειμένω, τα γονίδια *Maiden 4* και *GFP* θα “κουβαλάνε” και τα T7 άκρα στο 5' άκρο κάθε κλώνου (sense - antisense). Με αυτόν τον τρόπο και παρουσία του ενζύμου T7 RNA πολυμεράσης θα γίνει από κάθε κλώνο των γονιδίων *Maiden 4* και *GFP* μεταγραφή RNA μορίων τα οποία θα είναι μεταξύ τους συμπληρωματικά. Εν τέλει θα σχηματιστεί το δίκλωνο μόριο RNA (dsRNA). Αυτά τα μόρια θα πυροδοτήσουν όλο τον μηχανισμό της αποσιώπησης του RNA (RNAi). Οι επιθυμητές ζώνες των προϊόντων ενίσχυσης των γονιδίων *Maiden 4* και *GFP* ανακτήθηκαν με την βοήθεια του ειδικού kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρείας Macherey-Nagel. Οι συγκεντρώσεις των DNA προϊόντων μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Quawell ώστε να εξασφαλιστεί η ύπαρξη της αναγκαίας ποσότητας για το επόμενο βήμα της *in vitro* μεταγραφής.

- Συγκέντρωση *Maiden 4* (ng /  $\mu$ l) = 239,1
- Συγκέντρωση *GFP* (ng /  $\mu$ l) = 93,3

Στην συνέχεια με τα δείγματα αυτά προχώρησε η *in vitro* μεταγραφή και για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το conventional *in vitro* transcription kit της εταιρείας Thermofisher (AM1312). Ο τελικός όγκος ανά αντίδραση ορίστηκε στα 50  $\mu$ l. Έγιναν 2 αντιδράσεις για το *Maiden 4* και 1 για το *GFP*. Η ηλεκτροφόρηση των dsRNA μορίων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Οι συγκεντρώσεις των πυκνών dsRNA μορίων έναντι των *Maiden 4* και *GFP* προσδιορίστηκαν μέσω του φασματοφωτόμετρου Quawell ως εξής:

- Συγκέντρωση *Maiden 4* (ng /  $\mu$ l) = 5449,2
- Συγκέντρωση *GFP* (ng /  $\mu$ l) = 5800,2



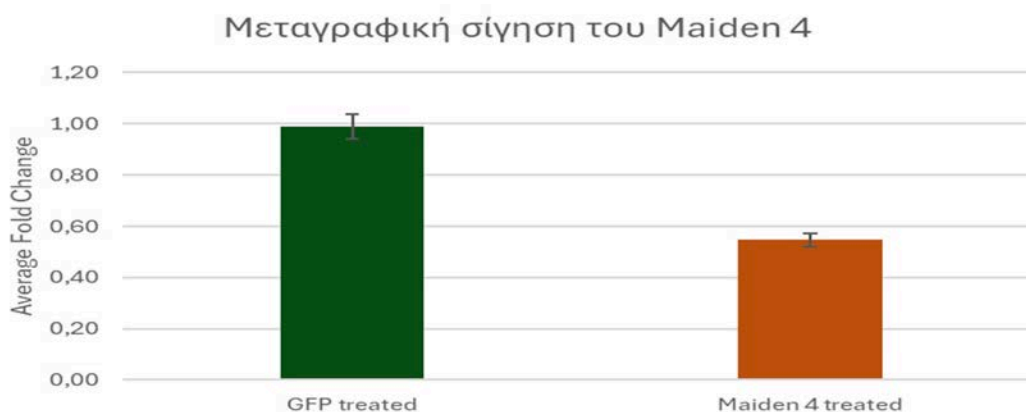
Εικόνες 19-20. Ηλεκτροφόρηση των dsRNA μορίων έναντι των *Maiden 4* και *GFP* με ζώνες στις 310 bp και 500 bp αντίστοιχα.

## 4.4 Μικροέγχυση των dsRNA μορίων σε πληθυσμούς ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών

Τα δίκλιωνα μόρια RNA που παρήχθησαν και έχουν ως στόχο τα γονίδια *Maiden 4* και *GFP* χορηγήθηκαν, μέσω της διαδικασίας της μικροέγχυσης, στον θώρακα ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών που είχαν προηγουμένως ζευγαρώσει. Μετά την μικροέγχυση τα κουνούπια τοποθετήθηκαν για μια ημέρα σε κλουβιά με ζαχαρόνερο ώστε να ανακάμψουν πλήρως από την ένεση, ενώ τη δεύτερη ημέρα χορηγήθηκε γέυμα αίματος σε αυτά που κατάφεραν να επιβιώσουν. Το ενέσιμο διάλυμα dsRNA είχε συγκέντρωση 5 μg/ml και η ποσότητα έγχυσης για κάθε κουνούπι ανέρχονταν στα 64,4 nl. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι να διαπιστωθεί εάν η γονιδιακή σίγηση του γονιδίου *Maiden 4* έχει επίδραση στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών, ελέγχοντας φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως το ποσοστό εκκολασιμότητας των αυγών και της ικανότητας ανάπτυξης των απογόνων.

## 4.5 Επιβεβαίωση της μεταγραφικής σίγησης του *Maiden 4*

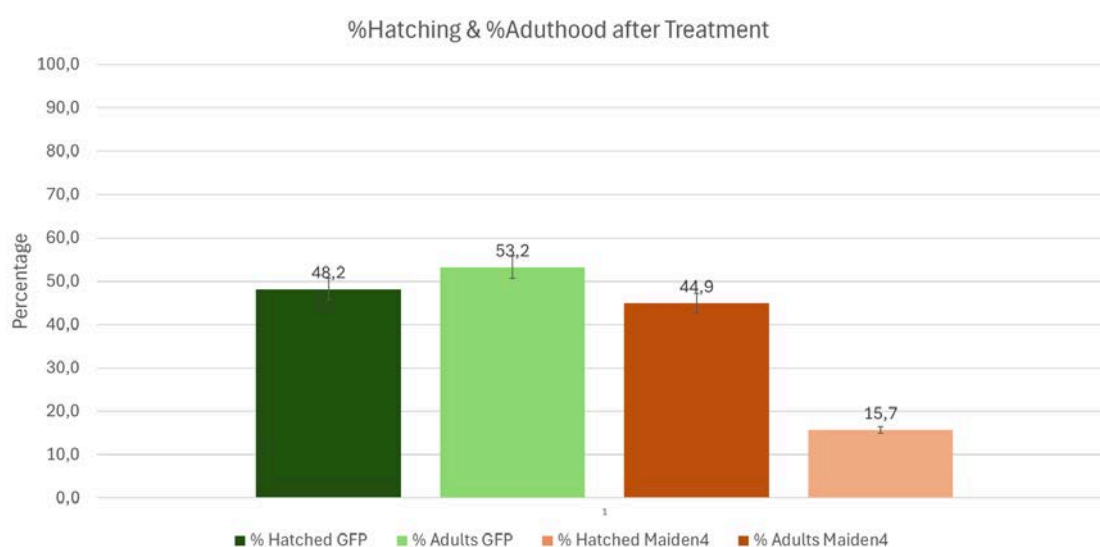
Αφού πραγματοποιήθηκε η χορήγηση των dsRNA μορίων έναντι των γονιδίων *Maiden 4* και *GFP*, στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* ώστε να εξεταστεί εάν έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η σίγηση του γονιδίου *Maiden 4* σε κουνούπια που υπέστησαν παρεμβολή με dsRNA, ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης του μηχανισμού RNAi. Για την επιβεβαίωση της μεταγραφικής σίγησης του γονιδίου *Maiden 4* πραγματοποιήθηκε, αρχικά, απομόνωση RNA από ιστούς ωοθηκών 24h PBM της πειραματικής ομάδας κουνουπιών *Maiden 4* και της ομάδας ελέγχου *GFP* (14 βιολογικές επαναλήψεις για κάθε ομάδα), κατόπιν σύνθεση cDNA και τελικά real-time PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινήτων τόσο για την ενίσχυση του γονιδίου *Maiden 4* όσο και για τα ιδιοσύστατα γονίδια. Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή επιλέχθηκε με κριτήριο το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* όπως αυτό αποτυπώνεται από τα δεδομένα real-time PCR που διεξήχθη σε δείγματα ωοθηκών ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών (υποενότητα 4.1.1 γράφημα 2), σύμφωνα με το οποίο το γονίδιο παρουσιάζει τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης στις 24 h PBM. Τα αποτελέσματα αναπαριστώνται στο γράφημα 4 όπου είναι εμφανής η απόκλιση ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα, υποδηλώνοντας μεταγραφική σίγηση του γονιδίου *Maiden 4*. Μάλιστα, το ποσοστό σίγησης του γονιδίου *Maiden 4* ανέρχεται στο 44%.



Γράφημα 4. Μεταγραφική σίγηση του γονιδίου *Maiden 4* ανάμεσα σε ομάδα ελέγχου και πειραματική ομάδα.

#### 4.6 Φαινοτυπικός έλεγχος του ποσοστού εκκολασιμότητας των αυγών και της ικανότητας ανάπτυξης των απογόνων

Σε επόμενο στάδιο έγινε η προσπάθεια συσχέτισης της μεταγραφικής σίγησης του γονιδίου *Maiden 4* με τον φαινότυπο και πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκε το ποσοστό εκκολασιμότητας των αυγών και η ικανότητα ανάπτυξης των απογόνων. Στο γράφημα 5 παρουσιάζονται σε στήλες με τα αντίστοιχα χρώματα τα ποσοστά εκκολασιμότητας των αυγών και ικανότητας ανάπτυξης των απογόνων ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα. Όπως γίνεται αντιληπτό, δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκκολασιμότητας των αυγών ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα με 48,2% και 44,9% αντίστοιχα. Δεν συμβαίνει, όμως, το ίδιο και με την ικανότητα ανάπτυξης των απογόνων των κουνουπιών αυτών. Ειδικότερα, το ποσοστό ενηλικίωσης των εκκολαπτόμενων αυγών διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα με 53,2% και 15,7% αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι ενώ περίπου παρόμοιος αριθμός αυγών εκκολάπτονται και στις 2 συνθήκες, μόνο το 15,7% των εκκολαπτόμενων αυγών στην πειραματική ομάδα (44,9%) κατορθώνουν να φτάσουν στο ενήλικο στάδιο σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (48,2%) όπου φτάνουν στο ενήλικο στάδιο πάνω από τα μισά αυγά που εκκολάφθηκαν (53,2%). Σημαντικό να αναφερθεί ότι ο φαινότυπος παρατηρήθηκε για πρακτικούς λόγους για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων. Όσα δηλαδή δεν ενηλικιώθηκαν δεν σημαίνει ότι πέθαναν ή ότι δεν ενηλικιώθηκαν τελικά ποτέ, απλά δεν έγινε μέσα στο χρονικό πλαίσιο της παρατήρησης. Συνολικά, λοιπόν, το πρόβλημα δεν εντοπίζεται στο στάδιο της εκκόλαψης των αυγών αλλά στο πόσα από τα αυγά που εκκολάφθηκαν κατόρθωσαν να φτάσουν μέχρι και το στάδιο της ενηλικίωσης στο χρονικό διάστημα των 3 εβδομάδων.



Γράφημα 5. Ποσοστά εκκολασιμότητας των αυγών και ικανότητας ανάπτυξης των απογόνων ανάμεσα σε ομάδα ελέγχου και πειραματική ομάδα.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το Ασιατικό κουνούπι τίγρης *Aedes albopictus* προέρχεται από τις τροπικές και υποτροπικές περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και θεωρείται ως το πιο χωροκατακτητικό είδος κουνουπιού παγκοσμίως. Εξαιτίας τόσο του μεσογειακού κλίματος της Ελλάδας όσο και της υψηλής βιολογικής προσαρμοστικότητάς του αναπτύχθηκαν ιδανικές συνθήκες για την περαιτέρω εξάπλωσή του και στη χώρα μας. Από υγειονομική σημασία το *Aedes albopictus* αποτελεί απειλή για την Δημόσια Υγεία καθώς μπορεί να μεταδώσει πολυάριθμες σοβαρές για τον άνθρωπο ασθένειες. Προκειμένου, λοιπόν, να περιοριστεί η πιθανότητα μετάδοσης απειλητικών για την ζωή ασθενειών, η ανάγκη ελέγχου και περιορισμού των πληθυσμών των κουνουπιών αυτών είναι πάντα επίκαιρη. Ωστόσο, αναζητούνται εναλλακτικές και φιλικότερες προς το περιβάλλον στρατηγικές πληθυσμιακού ελέγχου μιας και τα κλασικού τύπου εντομοκτόνα, που θεωρούνται η πρώτη γραμμή αντιμετώπισης, συνοδεύονται από ευρύ φάσμα δράσης και δεν στοχεύουν αποκλειστικά τα κουνούπια αλλά και ωφέλιμα έντομα μη-στόχους. Η παρούσα πτυχιακή εργασία βασίστηκε στην μελέτη μιας πολλά υποσχόμενης ομάδας γονιδίων, των μακρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (lncRNAs), τα οποία διακρίνονται για τις πολυάριθμες ρυθμιστικές τους λειτουργίες, ελέγχοντας μεταξύ άλλων την αναπαραγωγή, τον μεταβολισμό και την κυτταρική διαφοροποίηση. Όπως προαναφέρθηκε, η λειτουργία τους απορρέει από τη στερεοδιαμόρφωση που λαμβάνουν στο χώρο και έτσι δεν σχετίζεται με τη δυνατότητά τους να κωδικοποιούν κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν, αφού είναι μη-κωδικά RNAs. Για το λόγο αυτό, χαρακτηρίζονται από απουσία συντήρησης σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, ακόμα και ανάμεσα συγγενικών ειδών. Το γεγονός αυτό τους προσδίδει ιδιαίτερη ειδο-ειδικότητα, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά στην προοπτική ειδο-ειδικών προσεγγίσεων καταπολέμησης των εντόμων.

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα RNA seq δεδομένα των Gamez *et al.* (2020), στα οποία παρουσιάζεται το σύνολο του μεταγραφώματος στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του βιολογικού κύκλου του κουνουπιού *Aedes albopictus*, επιλέχθηκε και το γονίδιο που αποτέλεσε αντικείμενο διερεύνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας και το οποίο ονομάστηκε *Maiden 4*. Από το συγκεκριμένο γονίδιο μεταγράφεται ένα μακρό μη κωδικοποιητικό RNA (lncRNA), το οποίο αρχίζει να εκφράζεται αποκλειστικά στις ωοθήκες του *Aedes albopictus* μετά από λήψη γεύματος αίματος, γεγονός το οποίο οφείλεται στον πιθανό ρυθμιστικό του ρόλου στην αναπαραγωγική ικανότητα των θηλυκών κουνουπιών. Εκτός αυτού, υπάρχει και η ένδειξη ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο μεταφέρεται αυτούσιο από τα θηλυκά κουνούπια στα έμβρυα, στα πολύ αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, πριν την ενεργοποίηση της ζυγωτικής έκφρασης και μάλιστα στην πορεία εκφράζεται και από τα ίδια τα έμβρυα. Άρα, πιθανολογείται ότι το συγκεκριμένο lncRNA αποτελεί μητρική κληρονομιά με πιθανό ρόλο τόσο στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών κουνουπιών όσο και μετέπειτα στην διαδικασία του MZT στα έμβρυα.

Με βάση τα εργαστηριακά αποτελέσματα της qPCR, διακρίνονται δύο μέγιστα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* με το ένα να εντοπίζεται στις ωοθήκες 24 h (PBM) και το άλλο στα έμβρυα 4-8 h. Μάλιστα το μέγιστο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 4-8 h ξεπερνά αυτό των ωοθηκών 24 h. Ωστόσο, όπως

αναφέρθηκε νωρίτερα στα αποτελέσματα, το προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* δεν ταυτίζεται πλήρως με αυτό των βιβλιογραφικών δεδομένων, όμως μοιράζεται κοινά σημεία. Πιο συγκεκριμένα, το μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-4 h και 4-8 h βρέθηκε ανεστραμμένο σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα με την υψηλότερη τιμή έκφρασης του γονιδίου να εντοπίζεται στα έμβρυα 4-8 h αντί για εκείνα των 0-4 h. Επίσης, το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-1h είναι σημαντικά χαμηλότερο από την υψηλότερη τιμή έκφρασης του γονιδίου στα έμβρυα 4-8 h, σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Με βάση την μέγιστη τιμή έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 4-8 h έγινε και η σύγκριση των τιμών έκφρασης του στα υπόλοιπα χρονικά σημεία των εμβρύων αλλά και στις ωοθήκες. Έτσι, η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου *Maiden 4* ανιχνεύεται στις ωοθήκες των 24 h μετά την λήψη γεύματος αίματος σε σχέση με τα άλλα χρονικά σημεία των ωοθηκών, γεγονός το οποίο δεν ταυτίζεται πλήρως με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Η μη πλήρης ταύτιση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με τα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορεί να εξηγηθεί, κυρίως, από διαφορές στο μέγεθος και στη σύνθεση των δειγμάτων, δεδομένου ότι τόσο για την εκτροφή του εργαστηριακού πληθυσμού κουνουπιών *Aedes albopictus*, όσο και για τις εργαστηριακές συνθήκες ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Ειδικότερα όσον αφορά τις ωοθήκες, στο εργαστήριο η κάθε βιολογική επανάληψη περιλάμβανε ένα ζευγάρι ωοθηκών από ένα μοναδικό έντομο, ενώ στα έμβρυα η κάθε βιολογική επανάληψη περιελάμβανε περίπου 10 αυγά εντόμων. Αντίθετα, στην βιβλιογραφία για κάθε βιολογική επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πολλών κουνουπιών *Aedes albopictus* (pool), δηλαδή περισσότερα ζευγάρια ωοθηκών στην μια περίπτωση και αυγών στην άλλη. Ουσιαστικά, λοιπόν, για την εξαγωγή των βιβλιογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν πιο σύνθετα και μεγάλα δείγματα, γεγονός το οποίο μειώνει τις όποιες ατομικές βιολογικές διαφορές, δίνοντας πιο σταθερή μέση τιμή έκφρασης. Άρα, οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στο εργαστηριακό προφίλ έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4*, τόσο στις ωοθήκες, όσο και στα έμβρυα, σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούν να εξηγηθούν. Παρά τις αποκλίσεις, η γενική τάση αυξημένης έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4*, τόσο στις ωοθήκες μετά από λήψη γεύματος αίματος, όσο και στα έμβρυα, παραμένει συμβατή με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, υποστηρίζοντας την εγκυρότητα των εργαστηριακών αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά το μέγιστο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στις ωοθήκες 24 h (PBM), πιθανόν να εξυπηρετεί κάποιον εν δυνάμει ρυθμιστικό ρόλο του γονιδίου στο αναπαραγωγικό δυναμικό των θηλυκών κουνουπιών. Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε στην παρατήρηση ότι, ενώ η έκφραση του γονιδίου *Maiden 4* είναι σε χαμηλά επίπεδα πριν από το γέυμα αίματος και πέφτει σε ακόμη χαμηλότερα επίπεδα στις 12 h PBM, κατόπιν συμβαίνει μια απότομη αύξηση της έκφρασης του στις 24 h PBM φτάνοντας μάλιστα στο μέγιστο επίπεδο του στις ωοθήκες.

Από την άλλη πλευρά, το μέγιστο επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 4-8 h οφείλεται στην πιθανή συμμετοχή του συγκεκριμένου lncRNA, το οποίο μεταγράφεται από το γονίδιο *Maiden 4* στην θεμελιώδη διαδικασία του MZT. Είναι γνωστό από έρευνες ότι κατά το χρονικό διάστημα 0-2 h δεν αναμένεται μεταγραφική δραστηριότητα στα έμβρυα των κουνουπιών κυρίως από τα γένη *Aedes* (στο οποίο ανήκει και το *Aedes albopictus*) και *Anopheles* και για αυτό η παρουσία

οποιοδήποτε μεταγράφου θεωρείται μητρική κληρονομιά. Η υπόθεση αυτή, της μητρικής κληρονομιάς, φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση του μεταγράφου του γονιδίου *Maiden 4*, όπου παρατηρείται η ύπαρξη του στα έμβρυα 0-1 h, στα οποία προφανώς δεν έχει προλάβει να ξεκινήσει η ζυγωτική μεταγραφή. Εκτός της παρουσίας του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-1 h, παρατηρείται η εκκίνηση μιας επιπλέον έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-4 h φτάνοντας μάλιστα στο μέγιστο επίπεδο στα έμβρυα 4-8 h. Αυτό σημαίνει ότι τα ίδια τα έμβρυα εκφράζουν ανεξάρτητα το συγκεκριμένο γονίδιο στα πλαίσια του φαινομένου MZT.

Έχει διαπιστωθεί στα κουνούπια *Aedes aegypti*, που είναι συγγενικά με τα *Aedes albopictus*, ότι το χρονικό παράθυρο 2-4 h αφορά το μικρό κύμα ενεργοποίησης (minor wave) και μετά τις 4 h τοποθετείται χρονικά το μεγάλο κύμα ενεργοποίησης (major wave). Με βάση τα αποτελέσματα, δημιουργείται η υπόθεση πως εάν η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα 0-4 h ξεκίνησε ακριβώς στις 4 ώρες και συνεχίστηκε εντονότερα στα έμβρυα 4-8 h, τότε ίσως και η μεταγραφή του γονιδίου να συμπίπτει με την μεταγραφή γονιδίων του μεγάλου κύματος ενεργοποίησης. Σχετικά με την ιστοειδικότητα του συγκεκριμένου γονιδίου, αυτή επιβεβαιώθηκε καθώς η έκφραση του γονιδίου *Maiden 4* είναι απύσα σε όλους τους ιστούς θηλυκών κουνουπιών και το σώμα αρσενικών κουνουπιών συγκριτικά με την μέγιστη τιμή έκφρασης του στα έμβρυα 4-8 h.

Για την διαλεύκανση τόσο του πιθανού ρυθμιστικού ρόλου του γονιδίου στις ωοθήκες, όσο και της πιθανής εμπλοκής του στην διαδικασία του MZT στα έμβρυα αξιοποιήθηκε η τεχνολογία RNAi για την σίγηση του γονιδίου *Maiden 4*.

Το ποσοστό σίγησης του γονιδίου *Maiden 4* στις ωοθήκες των 24 h (PBM) στα κουνούπια μετά την χορήγηση dsRNA έναντι του *Maiden 4* υπολογίστηκε στο 44% σε σχέση με την συνθήκη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της qPCR που διεξήχθη σε δείγματα ενηλίκων θηλυκών κουνουπιών το γονίδιο λαμβάνει τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης στις ωοθήκες των 24 h (PBM). Για αυτό ο υπολογισμός και η παρατήρηση των επιπέδων έκφρασης του *Maiden 4*, μετά την μικροέγχυση, έγινε στις ωοθήκες των 24 h (PBM). Σε τελικό στάδιο έγινε η προσπάθεια συσχέτισης της επίδρασης της μειορρυθμίστη του γονιδίου *Maiden 4* με την εκκολαψιμότητα των αυγών και την ικανότητα ανάπτυξης των εμβρύων. Όσον αφορά την ικανότητα εκκόλαψης των αυγών διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά εκκολαψιμότητας ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την πειραματική ομάδα δεν διέφεραν σημαντικά με 44,9% και 48,2% αντίστοιχα. Το πειραματικό ενδιαφέρον, όμως, αφορούσε την ανάπτυξη των απογόνων. Ενώ η αφετηρία της εκκόλαψης των αυγών ήταν παραπλήσια και για τις δύο ομάδες κουνουπιών, υπήρξε μια σημαντική απόκλιση στα ποσοστά ενηλικίωσης των εκκολαπτόμενων αυγών. Μόνο το 15,7% των εκκολαπτόμενων αυγών στην πειραματική ομάδα (44,9%) κατορθώνουν να φτάσουν στο ενήλικο στάδιο σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (48,2%) όπου φτάνουν στο ενήλικο στάδιο πάνω από τα μισά αυγά που εκκολάφθηκαν (53,2%). Άρα, τα έμβρυα αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν ομαλά κατά την πορεία του βιολογικού τους κύκλου είτε στο προνυμφικό είτε στο νυμφικό στάδιο. Και αν ληφθεί υπόψη η επιπρόσθετη υψηλή έκφραση του γονιδίου *Maiden 4* και από τα έμβρυα 0-4 h και 4-8 h, ίσως, να είναι διττή η φύση του συγκεκριμένου γονιδίου. Εκτός του πιθανού του ρόλου στην

αναπαραγωγική διαδικασία εικάζεται ότι συμβάλλει καθοριστικά και στην φυσιολογική πορεία ανάπτυξης των εμβρύων. Μάλιστα, όπως έχει προαναφερθεί, ενδέχεται το συγκεκριμένο γονίδιο να μεταγράφεται και από τα έμβρυα ακριβώς στις 4 h και έπειτα στα πλαίσια του μεγάλου κύματος ενεργοποίησης του ζυγωτικού γονιδιώματος. Σε κάθε περίπτωση, ο αριθμός των εξεταζόμενων βιολογικών δειγμάτων ήταν αρκετά μικρός ώστε να είναι απόλυτα αντιπροσωπευτικός των φαινοτυπικών παρατηρήσεων. Για τον λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαίος ένας νέος κύκλος πειραμάτων με περισσότερα βιολογικά αντίγραφα, ώστε να εξαλειφθούν τυχόν λανθασμένοι χειρισμοί κατά την πειραματική διαδικασία και ανεπιθύμητες μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, στον νέο κύκλο πειραμάτων που πρόκειται να διεξαχθεί καλό θα ήταν να συμπεριληφθούν και ομάδες εμβρύων διαφορετικών χρονικών διαστημάτων. Παραδείγματος χάριν, έμβρυα 3-5 h και 4-6 h για να υπάρχει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την ακριβή χρονική εκκίνηση της μεταγραφής του γονιδίου *Maiden 4* στα έμβρυα. Επιπρόσθετα, τα μετάγραφα του γονιδίου *Maiden 4*, όπως και άλλα αντίστοιχα μετάγραφα, φαίνεται ότι μεταφέρονται αυτούσια από την μητέρα στους απογόνους. Οπότε, με την μέθοδο του RNAi, παρά την περιορισμένη δράση στον οργανισμό και το χρονικό σημείο της στόχευσης, λόγω της φύσης αυτών των μεταγράφων, μπορούν αυτά να στοχευθούν, επηρεάζοντας τα έμβρυα ένα στάδιο πριν από την μητέρα. Με έμμεσο τρόπο, δηλαδή, γίνεται προσπάθεια να επηρεαστούν οι απόγονοι χωρίς άμεση παρέμβαση στο γονιδίωμα του εντόμου, όπως θα λειτουργούσε για παράδειγμα το σύστημα CRISPR/Cas.

Συμπερασματικά, μετά τον νέο κύκλο πειραμάτων εάν αποδειχθεί θετική η συμμετοχή του συγκεκριμένου lncRNA στο αναπαραγωγικό σύστημα των κουνουπιών και μετέπειτα στην ανάπτυξη των εμβρύων, ενδέχεται να ανοίξει ένας νέος δρόμος που θα αντικαταστήσει τα κλασικά εντομοκτόνα με πιο καινοτόμες ειδο-ειδικές εντομολογικές προσεγγίσεις.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (non coding RNAs).

1] Kaikkonen, M. U., Lam, M. T. Y., & Glass, C. K. (2011b). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*, 90(3), 430–440. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr097>

2] Vasiliadis Medical Books. (2022, November). *Μη κωδικοποιητικό RNA*. Vasiliadis Books. <https://www.vasiliadis-books.gr/2022/11/μη-κωδικοποιητικό-rna/>

3] Bio-Rad. (n.d.). *Coding and non-coding RNA*. Bio-Rad Laboratories. Retrieved July 30, 2025, from <https://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/coding-and-non-coding-rna>

#### 1.1.1 Μακρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (lncRNAs).

4] Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z., & Shen, F. (2019b). Mechanisms and functions of Long Non-Coding RNAs at multiple regulatory levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5573. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>

5] Statello, L., Guo, C., Chen, L., & Huarte, M. (2020). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>

6] Mattick, J.S., Amaral, P.P., Carninci, P. *et al.* Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 430–447 (2023).

7] Aliperti, V., Skonieczna, J., & Cerase, A. (2021). Long Non-Coding RNA (LNCrNA) roles in cell biology, neurodevelopment and neurological disorders. *Non-Coding RNA*, 7(2), 36. <https://doi.org/10.3390/nrna7020036>

8] Zheng, G. X. Y., T, B., DO, Webster, D. E., Khavari, P. A., & Chang, H. Y. (2014). Dicer-microRNA-Myc circuit promotes transcription of hundreds of long noncoding RNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(7), 585–590. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2842>

#### 1.1.2 Ταξινόμηση των μακρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (lncRNAs).

9] Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biology*, 10(6), 924–933. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>

10] Zhao, N., Zhang, J., Zhao, Q., Chen, C., & Wang, H. (2021). Mechanisms of Long Non-Coding RNAs in Biological Characteristics and Aerobic Glycolysis of Glioma.

*International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11197.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222011197>

11] Yousefi, H., Maheronnaghsh, M., Molaei, F. *et al.* Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance. *Oncogene* 39, 953–974 (2020)

12] Arunkumar, G. (2023). LncRNAs: the good, the bad, and the unknown. *Biochemistry and Cell Biology*, 102(1), 9–27. <https://doi.org/10.1139/bcb-2023-0155>

13] Kornienko, A.E., Guenzl, P.M., Barlow, D.P. *et al.* Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC Biol* 11, 59 (2013).

14] Zhao, Y., Teng, H., Yao, F., Yap, S., Sun, Y., & Ma, L. (2020). Challenges and strategies in ascribing functions to long noncoding RNAs. *Cancers*, 12(6), 1458. <https://doi.org/10.3390/cancers12061458>

### 1.1.3 Μηχανισμοί δράσης των μακρών μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (lncRNAs).

15] Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z., & Shen, F. (2019). Mechanisms and functions of Long Non-Coding RNAs at multiple regulatory levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5573. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>

16] Wei, C., Xu, Y., Shen, Q., Li, R., Xiao, X., Saw, P. E., & Xu, X. (2023). Role of long non-coding RNAs in cancer: From subcellular localization to nanoparticle-mediated targeted regulation. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, 33, 774–793. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.07.009>

17] Zhang, K., Shi, Z., Chang, Y., Hu, Z., Qi, H., & Hong, W. (2014). The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. *Gene*, 547(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.043>

18] Bär, C., Chatterjee, S., & Thum, T. (2016). Long noncoding RNAs in cardiovascular pathology, Diagnosis, and therapy. *Circulation*, 134(19), 1484–1499. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.116.023686>

19] Wang, Z., Yang, X., Gui, S., Yang, F., Cao, Z., Cheng, R., Xia, X., & Li, C. (2021). The roles and mechanisms of LNCRNAs in liver fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.779606>

### 1.1.4 Ρόλος των lncRNAs στο αναπαραγωγικό σύστημα των εντόμων.

20] Zafar, J., Huang, J., Xu, X., & Jin, F. (2023). Recent advances and future potential of Long Non-Coding RNAs in insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms24032605>

21] Choudhary, C., Sharma, S., Meghwanshi, K. K., Patel, S., Mehta, P., Shukla, N., Ngoc, D., DO, Rajpurohit, S., Suravajhala, P., & Shukla, J. N. (2021). Long

Non-Coding RNAs in insects. *Animals*, 11(4), 1118.  
<https://doi.org/10.3390/ani11041118>

22] Humann, F. C., Tiberio, G. J., & Hartfelder, K. (2013). Sequence and expression characteristics of long noncoding RNAs in honey bee caste development – potential novel regulators for transgressive ovary size. *PLoS ONE*, 8(10), e78915.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078915>

23] Xu, Y., Dong, Y., Xu, Y., Lai, Z., Jin, B., Hao, Y., Gao, Y., Sun, Y., Chen, X., & Gu, J. (2019). Differentiation of Long Non-Coding RNA and mRNA Expression Profiles in Male and Female *Aedes albopictus*. *Frontiers in Genetics*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00975>

24] Belavilas-Trovas, A., Gregoriou, M., Tastsoglou, S., Soukia, O., Giakountis, A., & Mathiopoulos, K. (2022). A species-specific lncRNA modulates the reproductive ability of the asian tiger mosquito. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.885767>

## 1.2 Maternal to zygotic transition (MZT)

25] Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136(18), 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>

26] Harrison, M. M., Marsh, A. J., & Rushlow, C. A. (2023). Setting the stage for development: the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. *Genetics*.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/iyad142>

### 1.2.1 Στάδια και μηχανισμοί του MZT, 1.2.2 Ρόλος του MZT στην ανάπτυξη των εντόμων.

27] Hamm, D. C., & Harrison, M. M. (2018). Regulatory principles governing the maternal-to-zygotic transition: insights from *Drosophila melanogaster*. *Open Biology*, 8(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.180183>

28] Lee, M. T., Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the Maternal-to-Zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 581–613. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013027>

29] Schulz, K. N., & Harrison, M. M. (2018). Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nature Reviews Genetics*, 20(4), 221–234.  
<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0087-x>

30] Kravchenko, P., Tachibana, K. Rise and SINE: roles of transcription factors and retrotransposons in zygotic genome activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 26, 68–79 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00772-6>

31] Perry, M. W., Bothma, J. P., Luu, R. D., & Levine, M. (2012). Precision of hunchback expression in the *drosophila* embryo. *Current Biology*, 22(23), 2247–2252.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.051>

32] Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes & Development*, 5(9), 1568–1576. <https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1568>

### 1.2.3 Συγκριτική ανάλυση του MZT μεταξύ διαφορετικών ειδών.

33] Vastenhouw, N. L., Cao, W. X., & Lipshitz, H. D. (2019). The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development*, 146(11). <https://doi.org/10.1242/dev.161471>

34] Biedler, J. K., Hu, W., Tae, H., & Tu, Z. (2012). Identification of Early Zygotic Genes in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* and Discovery of a Motif Involved in Early Zygotic Genome Activation. *PLoS ONE*, 7(3), e33933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033933>

35] Wu, Y., Hu, W., Biedler, J.K. *et al.* Pure early zygotic genes in the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Parasites Vectors* 11 (Suppl 2), 652 (2018).

### 1.2.4 Συμμετοχή των lncRNA στο MZT.

36] Mohamed, J. S., Gaughwin, P. M., Lim, B., Robson, P., & Lipovich, L. (2009). Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA*, 16(2), 324–337. <https://doi.org/10.1261/rna.1441510>

37] Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B. *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477, 295–300 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10398>

38] Pauli, A., Valen, E., Lin, M. F., Garber, M., Vastenhouw, N. L., Levin, J. Z., Fan, L., Sandelin, A., Rinn, J. L., Regev, A., & Schier, A. F. (2011). Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome Research*, 22(3), 577–591. <https://doi.org/10.1101/gr.133009.111>

39] Shi, Y., Cai, M., Du, K., Bai, X., Tang, L., Jia, X., Chen, S., Wang, J., & Lai, S. (2021). Dynamics of Known Long Non-Coding RNAs during the Maternal-to-Zygotic Transition in Rabbit. *Animals*, 11(12), 3592. <https://doi.org/10.3390/ani11123592>

### 1.2.5 Εφαρμογές του MZT στον έλεγχο των εντόμων.

40] Ventos-Alfonso A, Ylla G, Belles X. Zelda and the maternal-to-zygotic transition in cockroaches. *FEBS J.* 2019 Aug;286(16):3206-3221. doi: 10.1111/febs.14856. Epub 2019 Apr 30. PMID: 30993896.

## 1.3 Το Ασιατικό Κουνούπι Τίγρης *Aedes albopictus*.

41] *Asian Tiger Mosquito*. (n.d.). Center for Invasive Species Research.  
[http://c isr.ucr.edu/asian\\_tiger\\_mosquito.html](http://c isr.ucr.edu/asian_tiger_mosquito.html)

42] Maruniak, J. E. (2025, March 25). *Asian Tiger Mosquito, Aedes albopictus (Skuse) (Insecta: Diptera: Culicidae)*. Ask IFAS - Powered by EDIS.  
<https://edis.ifas.ufl.edu/publication/IN594>

43] Eritja, R. (2022). *Aedes albopictus (Asian tiger mosquito) [Dataset]*. In *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.94897>

### 1.3.1. Προέλευση και Εξάπλωση.

44] Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). *Potential range of Aedes mosquitoes*. U.S. Department of Health & Human Services. Retrieved July 30, 2025, from <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/mosquitoes/in-the-us.html>

45] A. Samanidou-Voyadjoglou, E. Patsoula, G. Spanakos and N.C. Vakalis, Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece, *European Mosquito Bulletin*, 19 (2005), 10-11.

46] Giatropoulos, A., Balatsos, G., Lytra, I., Karras, V., Koliopoulos, G., Papachristos, D., & Michaelakis, A. (2024). Records of *Aedes (Stegomyia) cretinus* in Greece before and after the invasion of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae). *European Journal of Entomology*, 121, 199–205.  
<https://doi.org/10.14411/eje.2024.022>

47] Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(6), 435–447. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0814>

48] European Centre for Disease Prevention and Control. (2024, March 20). *Aedes albopictus – Factsheet for experts*.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-albopictus>

49] European Centre for Disease Prevention and Control. (2025, July 1). *Aedes albopictus – Current known distribution: June 2025*.  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-june-2025>.

### 1.3.2. Φορέας λοιμωδών ασθενειών.

50] Becker, N., Schön, S., Klein, AM. *et al.* First mass development of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)—its surveillance and control in Germany. *Parasitol Res* 116, 847–858 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5356-z>

51] Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(6), 435–447. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0814>

52] Hawaii State Department of Health. (2015, November). *Dengue and the Aedes albopictus mosquito*. <https://health.hawaii.gov/docd/files/2015/11/Dengue-and-Aedes-albopictus.pdf>

53] Muhammad, N. a. F., Kassim, N. F. A., Majid, A. H. A., Rahman, A. A., Dieng, H., & Avicor, S. W. (2020). Biting rhythm and demographic attributes of *Aedes albopictus* (Skuse) females from different urbanized settings in Penang Island, Malaysia under uncontrolled laboratory conditions. *PLoS ONE*, 15(11), e0241688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241688>

### 1.3.3. Βιολογικός κύκλος.

54] Hossain, M. S., Raihan, M. E., Hossain, M. S., Syeed, M. M. M., Rashid, H., & Reza, M. S. (2022). Aedes larva detection using ensemble learning to prevent dengue endemic. *BioMedInformatics*, 2(3), 405–423. <https://doi.org/10.3390/biomedinformatics2030026>

55] GeneWatch UK. (n.d.). *Aedes aegypti and Aedes albopictus: Life cycle, biology and distribution*. Retrieved July 30, 2025, from [https://www.genewatch.org/appen\\_4\\_\\_doc\\_4](https://www.genewatch.org/appen_4__doc_4)

## 1.4 Μέθοδοι αντιμετώπισης πληθυσμού κουνουπιών.

56] Meier, C. J., Rouhier, M. F., & Hillyer, J. F. (2022). Chemical control of mosquitoes and the pesticide treadmill: A case for photosensitive insecticides as larvicides. *Insects*, 13(12), 1093. <https://doi.org/10.3390/insects13121093>

57] Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>

58] Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyaulah, M., AlShahrani, A. M., Muzammil, K., Saati, A. A., Wahab, S., Elbendary, E. Y., Kambal, N., Abdelrahman, M. H., & Hussain, S. (2024). Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon*, 10(7), e29128. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29128>

### 1.4.1 Παραδοσιακές βιολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης.

59] Huang, Y., Higgs, S., & Vanlandingham, D. (2017). Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. *Insects*, 8(1), 21. <https://doi.org/10.3390/insects8010021>

- 60] Benelli, G., Jeffries, C., & Walker, T. (2016). Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. *Insects*, 7(4), 52. <https://doi.org/10.3390/insects7040052>
- 61] Guidi, V., Lehner, A., Lüthy, P., & Tonolla, M. (2013). Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* Spores in Urban Catch Basins after Simultaneous Application against Mosquito Larvae. *PLoS ONE*, 8(2), e55658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055658>
- 62] Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A., Velayudhan, R., Roberts, B., & Horstick, O. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical Medicine & International Health*, 18(5), 564–577. <https://doi.org/10.1111/tmi.12087>

#### 1.4.2 Παραδοσιακές χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης.

- 63] Soderlund, D. M. (2011). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165–181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>

- 64] MGK. (n.d.). *Not all IGRs are created equal*. Retrieved July 30, 2025, from <https://www.mgk.com/professional-pest-control/not-all-igrs-are-created-equal/>

#### 1.5 Μέθοδος παρεμβολής του RNA (RNAi).

- 65] Δ. Μανδήλης, Σ. Βλαχόπουλος, Δ. Μήκας και Β. Ζουμπουρλής ( 2006 )  
 Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών, Εργαστήριο Μονάδας Βιοϊατρικών Εφαρμογών  
 Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Η Μέθοδος της Παρεμβολής του RNA  
 (RNAInterference) στη Βιολογία και την Ιατρική.

- 66] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>

##### 1.5.1 Μηχανισμός δράσης του RNAi.

- 67] Rychahou, P. G., Jackson, L. N., Farrow, B. J., & Evers, B. M. (2006). RNA interference: Mechanisms of action and therapeutic consideration. *Surgery*, 140(5), 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.03.009>

- 68] Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y., & Leung, S. W. S. (2015). SiRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, 4, e252. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>

- 69] Massirer, K. B., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNAs that interfere with RNAi. *Worm*, 2(1), e21835. <https://doi.org/10.4161/worm.21835>

##### 1.5.2 Αξιοποίηση τεχνολογίας RNAi ως εργαλείο για την καταπολέμηση των εντόμων.

70] Mamta, B., & Rajam, M. V. (2017). RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 487–501. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0443-x>

71] Airs, P., & Bartholomay, L. (2017). RNA interference for mosquito and Mosquito-Borne disease control. *Insects*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/insects8010004>

72] Brown SJ, Mahaffey JP, Lorenzen MD, Denell RE, Mahaffey JW (1999) Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol Dev* 1:11–15

73] Bucher, G., Scholten, J., & Klingler, M. (2002). Parental RNAi in Tribolium (Coleoptera). *Current Biology*, 12(3), R85–R86. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00666-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00666-8)

74] Tomoyasu, Y. & Denell, R.E. Larval RNAi in Tribolium (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.* 214, 575–578 (2004).

75] Zhu, F., Xu, J. J., Palli, R., Ferguson, J. & Palli, S. R. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manage Sci* 67, 175–182, <https://doi.org/10.1002/ps.2048> (2011)

76] Niu, X., Kassa, A., Hu, X. *et al.* Control of Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Reproduction through Plant-Mediated RNA Interference. *Sci Rep* 7, 12591 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12638-3>

77] Jaiwal, A., Natarajaswamy, K., & Rajam, M. V. (2020). RNA silencing of hormonal biosynthetic genes impairs larval growth and development in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Biosciences*, 45(1). <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00079-6>

78] Volpe, G., Mazzucchiello, S. M., Rosati, N., Lucibelli, F., Varone, M., Baccaro, D., Mattei, I., Di Lelio, I., Becchimanzi, A., Giordano, E., Salvemini, M., Aceto, S., Pennacchio, F., & Saccone, G. (2024). Simultaneous Silencing of Gut Nucleases and a Vital Target Gene by Adult dsRNA Feeding Enhances RNAi Efficiency and Mortality in *Ceratitis capitata*. *Insects*, 15(9), 717. <https://doi.org/10.3390/insects15090717>

### 1.5.3 Μέθοδοι χορήγησης του dsRNA στα έντομα.

- 79] Santos-Ortega, Y., & Flynt, A. (2021). Double-Strand RNA (dsRNA) Delivery Methods in Insects: *Diaphorina citri*. *Methods in Molecular Biology*, 253–277. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1633-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1633-8_19)
- 80] Lu, Y., Deng, X., Zhu, Q., Wu, D., Zhong, J., Wen, L., & Yu, X. (2023). The DSRNA delivery, targeting and application in pest control. *Agronomy*, 13(3), 714. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030714>
- 81] Zhu, K. Y., & Palli, S. R. (2019). Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annual Review of Entomology*, 65(1), 293–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025224>
- 82] Munawar, K., Alahmed, A. M., & Khalil, S. M. S. (2020). Delivery methods for RNAi in mosquito larvae. *Journal of Insect Science*, 20(4). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa074>
- 83] Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H., & Smagghe, G. (2012). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, 20(1), 4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x>
- 84] National Institutes of Health. (2024, January 10). *Disease resistance successfully spread from modified to wild mosquitoes in large cage*. U.S. Department of Health & Human Services. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/disease-resistance-successfully-spread-modified-wild-mosquitoes-large-cage>

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 85] Wang, Jiayi et al., *Journal of Infection* Volume 91, Issue 3, 106591 September 2025. The chikungunya virus outbreak in Foshan, China: A rising public health threat in tropical and subtropical regions
- 86] The Basics: RNA Isolation | Thermo Fisher Scientific - ES [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) › general-articles
- 87] DNase Treatment & Removal Reagents | Thermo Fisher Scientific - US [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) › ... › TechNotes
- 88] Overview of cDNA Synthesis - CD Genomics [www.cd-genomics.com](http://www.cd-genomics.com) › resource-overvie...
- 89] [PDF] ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ - upatras [eclasseclass.upatras.gr](http://eclasseclass.upatras.gr) › ΑΣΚΗΣΗ 4 - ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

- 90] DNA Purification from an Agarose Gel (Protocol for NucleoSpin ...[www.protocols.io](http://www.protocols.io) › view › dna-purification...
- 91] Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle, Enzymes, Steps ...[microbenotes.com](http://microbenotes.com) › Biochemistry
- 92] PCR Basics | Thermo Fisher Scientific - US[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) › pcr-education › p...
- 93] Rules and Tips for PCR & qPCR Primer Design | IDT[www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) › Home › Blog
- 94] Introduction to Quantitative PCR (qPCR) Gene Expression Analysis[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) › pcr › real-time-pcr[PDF] Introduction to Quantitative PCR: methods and applications guide[www.gene-quantification.de](http://www.gene-quantification.de) › qpcrGuide-Stratagene
- 95] [PDF] Introduction to Quantitative PCR: methods and applications guide[www.gene-quantification.de](http://www.gene-quantification.de) › qpcrGuide-Stratagene
- 96] Overview of In Vitro Transcription | Thermo Fisher Scientific - US[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) › mrna-research
- 97] Precipitation of RNA with Ethanol - CSH Protocols[cshprotocols.cshlp.org](http://cshprotocols.cshlp.org) › content › pdb.prot101717.full.pdf