

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Βιολογία Ανάπτυξης Εκτρεφόμενων Πλατυψάρων»

Μενέλαος Κάβουρας

ΒΟΛΟΣ 2020

«Βιολογία Ανάπτυξης Εκτρεφόμενων Πλατυψάρων»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- 1) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Καθηγητής Π.Θ., Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών.
- 2) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π.Θ., Υδατοκαλλιέργειες.
- 3) **Κωνσταντίνος Αναστασιάδης**, Καθηγητής BIOTEC TU Dresden, Genetic Engineering of Stem Cells.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Καθηγητής Π.Θ., Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών.
- 2) **Κωνσταντίνος Αναστασιάδης**, Καθηγητής BIOTEC TU Dresden, Genetic Engineering of Stem Cells.
- 3) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π.Θ., Υδατοκαλλιέργειες.
- 4) **Δημήτριος Βαφείδης**, Καθηγητής Π.Θ., Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση – έμμεση χρησιμότητά τους.
- 5) **Μιχαήλ Παυλίδης**, Καθηγητής Π.Κ., Τμήμα Βιολογίας. Φυσιολογία – Ενδοκρινολογία Ιχθύων.
- 6) **Κωνσταντίνος Μυλωνάς**, Διευθυντής Έρευνας, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Ι.Θ.Α.Β.Β.ΥΚ.
- 7) **Ευθυμία Αντωνοπούλου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Α.Π.Θ. Φυσιολογία ζωικών οργανισμών με έμφαση στα ψάρια.

Μενέλαος Κάβουρας, «Βιολογία Ανάπτυξης Εκτρεφόμενων Πλατυψάρων»

Μενέλαος Κάβουρας, 2020, Βιολογία Ανάπτυξης Εκτρεφόμενων Πλατυψάρων

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων 16

Συνολικός αριθμός σελίδων διατριβής 149

Αριθμός πινάκων 20

Αριθμός σχημάτων 27

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών 173

Στην Οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής μελέτης, υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ατόμων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από βάθους καρδιάς τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο για την εμπιστοσύνη, την επίβλεψη και την καθοδήγησή του. Η πολυδιάστατη υποστήριξή του υπήρξε καταλυτή στη μέχρι σήμερα πορεία μου. Επίσης, οφείλω θερμές ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, για τις ιδέες που μου προσέφερε και για όλες τις συζητήσεις, τόσο στο πλαίσιο της διατριβής μου όσο και εκτός. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Αναστασιάδη, για το ενδιαφέρον που έδειξε και τις συμβουλές που παρείχε σχετικά με την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής οι παρατηρήσεις των οποίων ήταν γόνιμες και εποικοδομητικές για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Δεν πρέπει να παραλείψω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον πρώην Γενικό Γραμματέα της Αποκεντρωμένης Διοίκησης Δυτικής Ελλάδας, Πελοποννήσου και Ιονίου, κ. Μανώλη Αγγελάκα, που πίστεψε στις δυνατότητές μου και με ενθάρρυνε για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, ως πράξη φιλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες μου, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, στις καλές αλλά και στις δύσκολες στιγμές όλων αυτών των ετών, καθώς και τους Ολλανδούς φίλους και συνεργάτες, Ewout Blom, Robbert Blonk, Andres Kamstra & Arjan Palstra.

Ξεχωριστή μνεία οφείλω στην ακριβή μου Κορίνα για τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επιστημονική και ψυχολογική συμβολή της.

Τέλος, ως πράξη ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, για την πολύτιμη και πολύπλευρη στήριξη που μου παρείχαν ανιδιοτελώς όλα αυτά τα χρόνια, στη δύσκολη προσπάθεια του συνδυασμού εργασίας, έρευνας και συγγραφής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	ix
ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	xii
ABSTRACT	xiv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	8
Ο πολυμορφισμός των ομοιοτικών γονιδίων (SNP & TRP) και η βιωσιμότητα των ωών της κοινής γλώσσας (<i>Solea solea</i>)	8
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	12
1.2.1 Διαχείριση των γεννητόρων	12
1.2.2 Διαχείριση των ωών	12
1.2.3 Δειγματοληψία των ωών	12
1.2.4 Εξαγωγή – απομόνωση του γενωμικού DNA και κλωνοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων.....	13
1.2.5 Εξαγωγή – απομόνωση γενωμικού DNA για ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας	15
1.2.6 Ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας – HRM.....	15
1.2.7 Φυλογενετική ανάλυση	21
1.2.8 Αλληλουχίες και εξελικτική ανάλυση.....	24
1.2.9 Στατιστικές μέθοδοι.....	24
1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
1.3.1 Ανίχνευση πολυμορφισμού	25
1.3.2 Μεμονωμένη ανάλυση των πολυμορφικών τόπων	25
1.3.3 Ανάλυση απλοτύπων	28
1.3.4 Φυλογενετική ανάλυση των ομοιοτικών γονιδίων <i>hoxa2a</i> & <i>hoxa2b</i>	29
1.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	33
1.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	40
Η γονιδιακή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων (<i>hox</i>) και των γονιδίων υπεύθυνων για τη σύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας.....	40
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	40
2.1.1 Ομοιοτικά γονίδια (<i>hox</i> genes).....	40
2.1.2 Σύνθεση εικοσιδυοεξαενοϊκού οξέος (DHA).....	41

2.1.3 Στόχος εργασίας	43
2.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	44
2.2.1 Διαχείριση γεννητόρων	44
2.2.2 Διαχείριση των ωών	45
2.2.3 Δειγματοληψία ωών	45
2.2.4 Κλωνοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων	46
2.2.5 Απομόνωση-εξαγωγή RNA.....	47
2.2.7 Στατιστικές αναλύσεις	48
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
2.3.1 Χρονική έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων σε έμβρυα με προέλευση τους γεννήτορες P.	51
2.3.2 Σύγκριση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων μεταξύ εμβρύων διαφορετικής προέλευσης.....	55
2.3.4 Η έκφραση των Δ4 λιπο-ακυλ-αποσατουράσης (Δ4fad) και επιμυκηνάσης (elon15)	57
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
2.4.1 Χρονική έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων	59
2.4.2 Σύγκριση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων στις 48 hpf μεταξύ P και G1 γεννητόρων	63
2.4.3 Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας (LC-PUFA)	64
2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	68
Οπτική Απεικόνιση των Προτύπων της Γονιδιακής Έκφρασης. Μια Υπολογιστική Προσέγγιση με CAS Λογισμικό	68
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	68
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ & ΔΕΔΟΜΕΝΑ	70
3.2.1 Περιγραφή των δεδομένων.....	70
3.2.2 Μέθοδοι	71
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
3.3.1 1η Μελέτη Περίπτωσης (1st Case Study)	72
3.3.2 2 ^η Μελέτη Περίπτωσης (2 nd Case Study)	75
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	83
3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	86

Μελέτη του μεταγραφώματος με Τεχνικές Αλληλούχησης Νέας Γενιάς (NGS) – Φυσιολογικά άτομα vs άτομα με αμφιχρωματισμό.....	86
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	86
4.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	92
4.2.1 Δειγματοληψία.....	92
4.2.2 Αλληλούχηση mRNA.....	92
4.2.3 Ανάλυση βιοπληροφορικής.....	94
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	96
4.3.1 Ποιοτική ανάλυση-στατιστικά στοιχεία.....	96
4.3.2 Γονιδιακή έκφραση.....	97
4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	105
4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	115
Τελικά Συμπεράσματα & Προοπτικές.....	115
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	119

ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

act-b	Beta-actin
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AKT	Protein kinase B
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ARA	Arachidonic acid
ATP	Adenosine triphosphate
BIC	Bayesian Information Criteria
CaMKII	Calmodulin-dependent protein Kinase II
CAS	Computer Algebra System
cDNA	Complementary DNA
CE	Cornified Envelope
CEGMA	Core Eukaryotic Genes Mapping Approach
CREB	Cyclic-AMP Response Element Binding protein
DEL	Deletion
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dph	Days post hatching
ef1a	Elongation factor 1 alpha
ELOVL5/elovl5	Fatty Acid Elongase 5
EM algorithm	Expectation Maximization algorithm
EPA	Eicosapentaenoic <i>acid</i>
EPTP	Epitempin
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDR	Benjamini-Hochberg False Discovery Rate
FLG	Filaggrin
GDP	Guanosine 5'-diphosphate
GenAlEx	Genetic Analysis in Excel
GluR1,2,3,4	Glutamate Receptor 1,2,3,4
GRIP	Glutamate receptor interacting protein
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
Hox/hox	Homeobox
hpf	hours post fertilization
HRM	High Resolution Melt
IMARES	Institute for Marine Resources and Ecosystem Studies
INDEL(s)	Insertion – Deletion(s)
INS	Insertion
LC-PUFA(s)	Long Chain – Polyunsaturated Fatty Acid(s)
LGI	Leucine-rich Glioma Inactivated
LRT	Likelihood Ratio test
LTP	Long Term Potentiation
MCH	Melanin-concentrating <i>hormone</i>
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	Messenger RNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Next Generation Sequencing
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NSF	N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Protein

PAML	Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood
PCA	Principal Component Analysis
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PERP	p53 effector related to PMP-22
PG	Paralog Group
PGE2	Prostaglandin E2
PICK	Protein Interacting with C Kinase
PKC	Protein Kinase C
POMC	Pro-opiomelanocortin
PSD95	Postsynaptic Density Protein 95
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription PCR
REST	Relative expression software tool
RNA	Ribonucleic acid
rps4	Ribosomal Protein S4
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE	Soluble NSF Attachment Receptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TR	Tandem Repeat
TRP	Tandem Repeat Polymorphism
ub	Ubiquitin
ubx	Ultrabithorax
VIF	Variance Inflation factor
α -MSH	α -Melanocyte-stimulating hormone
$\Delta(4,5,6)$ FAD/ $\Delta(4,5,6)$ fad	Delta (Δ) Fatty-Acyl-Desaturase
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ABSTRACT

Common sole (*Solea solea*) aquaculture production is based mostly on wild caught breeders. Recently, the successful reproduction of first-generation fish which were reared in captivity was accomplished. Consistency in good quality and quantity of produced eggs throughout the year, also of next generation broodstock, is a sine qua non condition for reducing the overall cost of sole production. *Hox* genes and enzymes involved in Docosahexaenoic (DHA) synthesis play a pivotal role in normal embryonic development and alterations of their expression pattern may be important to the egg viability. *Hox* mutations could alter the phenotype dramatically with detrimental effects. In intensively reared flatfish, like common sole, one major disorder regards body pigmentation, called with the general term “malpigmentation”. Divergence from normal coloring has an impact on the survival of the species in the marine environment as well as on the sales price of farmed animals. *Solea solea* is a species presenting complexity during the transformation stage and weaning difficulties associated with chromatic and skeletal abnormalities. qRT-PCR was performed in egg batches from two common sole broodstocks, a wild caught and a next generation one hatchery reared, in order to determine the temporal expression profiles of six *hox* genes (*hoxa1a*, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxb1a* and *hoxb1b*) involved in early embryonic development and *hoxa13a* involved in late embryonic development. Comparison of expression was also carried out for $\Delta 4$ fatty-acyl-desaturase ($\Delta 4fad$) and 5 elongase (*elovl5*) in 48 hpf eggs and in one day post hatching (dph) larvae. These enzymes are involved in DHA synthesis and responsible for the rapid development of retinal and neural tissues. Following on to gene expression analysis we provided a visual framework in the environment of a main computer algebra

system (CAS), Mathematica, to picture variations and evolution schemes in above mentioned gene expression. Our computational approach constructs snapshots for gene expression profiles, with the advantage of being self-evident, concise and clear. We also elucidated the observed polymorphism between viable and non-viable eggs of common sole (*Solea solea*) in three *hox* genes; *hoxa1a*, *hoxa2a* and *hoxa2b*. Three sites were highly polymorphic (one site in *hoxa1a* and 2 sites in *hoxa2b*), and High-Resolution Melt (HRM) was carried out in 52 viable and 61 non-viable eggs collected at 48 hours post fertilization (hpf). To examine the differences in transcriptional level, between normally pigmented and ambicolorated juveniles, analysis of whole transcriptome was performed by using Next Generation Sequencing (NGS) techniques. Regarding temporal expression of *hox* genes, our results showed that premature expression of *hoxa13a* was detected in sole embryos, implying a precocious arrestment of development and maternal expression. Differences in the expression levels of *hoxb1a* and *hoxb1b* between batches were detected, as well as in the presence and the activity of the two genes *hoxa2a* and *hoxa2b* from paralog groups during embryonic development. Principal Component Analysis showed that common sole embryos descending from different broodstocks presented differences in expression patterns of *hox* genes. $\Delta 4fad$ expression was recorded in sole eggs but was up-regulated in larvae. Our findings could give insights of rearing broodstocks with different origin in concert, and also gaining a steady production of eggs with high quality. About our computational approach to visualize gene expression data, we accurately depict the magnitudes of the changes and/or relative changes in expression, by using both unscaled and autoscaled data in a variety of snapshots. Our programming approach made use of Mathematica's built-in

matrix functions and created an interface that automates the process of creating cognitively and aesthetically compelling representations of qRT-PCR data of different target genes and treatments. Regarding *hox* genes polymorphism, a case-control study was used to analyze such polymorphism and results illustrated a significant increased risk for non-viability for either both minor alleles and homozygous genotypes in minor alleles, mainly under the recessive genetic model. Haplotype analyses demonstrated a significant recessive effect on the risk of non-viability for the three haplotypes, by increasing the odds of disrupting embryonic development for up to three-fold. Phylogenetic analysis showed that the Acanthopterygian paralogue genes *hoxa2a* and *hoxa2b*, are separated distinctly in two paralog clades. Furthermore, there is a significant ω variation between *hoxa2a* and *hoxa2b* genes in Acanthopterygii, Pleuronectiformes and *Solea solea*, revealing their diverged evolutionary rate. Lastly, there is evidence that one codon of *hoxa2b* at the position 274 is under positive selection in *Solea solea*. Finally, the NGS results revealed that ambicolorated juveniles exhibit a divergent function mainly of the central nervous system at the synaptic level, as well as the ionic channels that affect the muscular and cardiac function. Genes or biological pathways directly involved in physiology or biochemistry of coloring were not detected, implying the close association / relation of pigmentation process with the differentiation of nerve cells and the development of nervous system.

Keywords: *Solea solea*, *hox* genes, gene expression, polymorphism, embryonic development, egg quality, visual analytics, ambicoloration, Next Generation Sequencing.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πλατύψαρα λόγω της οικονομικής και οικολογικής τους σημασίας έχουν καταστεί σημαντικός στόχος για το ραγδαία αναπτυσσόμενο κλάδο των υδατοκαλλιεργειών. Τα συναντάμε κυρίως στην ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα, στα βάθη των ωκεανών, σε κλειστές θάλασσες, σε παραποτάμιες περιοχές και εκβολικά συστήματα σε όλο τον πλανήτη. Περισσότερο από 1 εκ. τόνοι εκφορτώνονται κατ'έτος και η αξία τους στις ΗΠΑ για το 2012 άγγιξε τα 330 εκ δολάρια. Η γλώσσα (*Solea solea*) θεωρείται ένα πολλά υποσχόμενο είδος με υψηλό κέρδος, χάριν της ζήτησης και της υψηλής τιμής διάθεσης της στην αγορά.

Σε ορισμένα είδη, συμπεριλαμβανομένης της γλώσσας, η παραγωγή τους εξαρτάται κυρίως από την αλίευση και την ελεγχόμενη αναπαραγωγή άγριων γεννητόρων εγκλιματισμένων σε συνθήκες αιχμαλωσίας (P), ενώ η αναπαραγωγή από άτομα νέας ή πρώτης γενιάς (G1), προερχόμενα από τους άγριους γεννήτορες και εγκλιματισμένους σε συνθήκες εκτροφής, παραμένει περιορισμένη. Τα κύρια προβλήματα που προκύπτουν είναι η ασταθής ποιότητα των αβγών, που παρουσιάζουν μειωμένη βιωσιμότητα και μικρό ποσοστό γονιμοποίησης, καθώς και η εμφάνιση ατόμων με μεγάλο ποσοστό δυσμορφιών, ανωμαλιών στο χρωματισμό και αυξημένη θνησιμότητα κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των αβγών είναι κυρίως γενετικοί, διατροφικοί, περιβαλλοντικοί και σχετίζονται άμεσα με τη φυσιολογία και λειτουργία του εμβρύου. Είναι γνωστό πως τα ομοιοτικά γονίδια (*hox genes*), είναι βασικοί πρωταγωνιστές της φυσιολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης σε όλα τα είδη του ζωικού βασιλείου, καθώς είναι μεταγραφικοί παράγοντες που με τη συντονισμένη χωροχρονική τους έκφραση, οδηγούν τη μορφογένεση κατά μήκος του

προσθοπίσθιου άξονα. Τα ομοιοτικά γονίδια είναι οργανωμένα σε συστάδες (clusters), η θέση των οποίων αντικατοπτρίζει συγγραμμικά, την περιοχή και το χρόνο έκφρασής τους στο έμβρυο. Έτσι, τα γονίδια που βρίσκονται στο 3' άκρο εκφράζονται νωρίτερα και προσθιότερα, ενώ τα αντίστοιχα του 5' άκρου, αργότερα και οπισθιότερα (Gaunt, 2015). Η ρύθμιση της έκφρασης καταλλήλων γονιδίων στόχων και των δικτύων τους από τα ομοιοτικά γονίδια, οδηγούν σε διαφοροποίηση των τμημάτων (μεταμερίδια) του οργανισμού από τα οποία προέρχονται οι ιστοί, τα όργανα και οι βιολογικές δομές που τα χαρακτηρίζουν. Έκτοπες κι ασύγχρονες μεταβολές στην έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων καθώς και αλλαγές στη νουκλεοτιδική τους σύσταση (μεταλλάξεις), οδηγούν σε σοβαρές μορφολογικές διαταραχές και σε διακοπή της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Casaca et al., 2014; Mallo & Alonso, 2013; Deschamps et al., 1999; Prince et al., 1998; Gibson & Hogness, 1996; Krumlauf, 1994).

Επίσης, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του οπτικού και νευρικού ιστού των εμβρύων και των νυμφών έχει το εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (DHA) τα επίπεδα του οποίου εξαρτώνται από τη δίαιτα των γεννητόρων και κατά συνέπεια της ποσότητας που αποθηκεύεται στο ωάριο, της διατροφής των νυμφών, καθώς και της ενεργοποίησης του βιοχημικής του σύνθεσής όπου εμπλέκονται τα ένζυμα *Δ4 αποκορεσμάση (Δ4Fad desaturase)* και η *επιμηκυνάση5 (Elovl5)*.

Επιπλέον, στα εκτρεφόμενα πλατύψαρα όπως η γλώσσα, διαταραχές στο χρωματισμό είναι συνηθισμένες και περιγράφονται με τον όρο «δυσχρωμίες». Οι δυσχρωμίες είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τις ανωμαλίες χρωματισμού στην τυφλή και οφθαλμική πλευρά του ιχθύος, οι οποίες υποδιαιρούνται σε τρεις

κατηγορίες: 1) πλήρης ή μερικός αλμπινισμός (ψευδοαλμπινισμός ή υπομελάνωση) που αφορά στην οφθαλμική πλευρά, 2) Αμφιχρωματισμός, όταν η τυφλή πλευρά εμφανίζει τον ίδιο χρωματισμό της οφθαλμικής πλευράς, και 3) Κηλίδωση ή υπερμελάνωση, όταν σε τμήματα της τυφλής πλευράς εμφανίζεται χρωματισμός παρόμοιος με την οφθαλμική πλευρά.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της βιολογίας ανάπτυξης της γλώσσας (*Solea solea*), μέσω: i) της καταγραφής του χρονικού προτύπου έκφρασης του 3' άκρου, *hoxa1a*, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxb1a* και *hoxb1b* καθώς και του 5' άκρου, *hoxa13a*, ομοιοτικών (*hox*) γονιδίων, από 0 έως 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hrf), της σύγκρισης του προτύπου έκφρασης των παραπάνω ομοιοτικών γονιδίων σε επιλεγμένη χρονική στιγμή (48 hrf)¹, μεταξύ εμβρύων προερχόμενων από άγριους γεννήτορες (P) και από γεννήτορες της πρώτης γενιάς (G1), ii) της μελέτης και της σύγκρισης του προτύπου έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση του εικοσιδυαεξαενοϊκού οξέος (DHA) από το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA), σε έμβρυα στις 48 hrf και σε άρτι εκκολαφθείσες νύμφες, μία (1) μέρα μετά την εκκόλαψη (dph), από γεννήτορες P και G1, iii) την καταγραφή και τον εντοπισμό σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και προσθαφαιρέσεων στις αλληλουχίες των ομοιοτικών γονιδίων *hoxa1a*, *hoxa2a* και *hoxa2b*, μεταξύ βιώσιμων και μη-βιώσιμων εμβρύων και την πιθανή συσχέτισή τους με την εμβρυϊκή θνησιμότητα μέσω της μελέτης ελέγχου περιπτώσεων (case-control study), iv) ο εντοπισμός και καταγραφή της διαφορικής έκφρασης γονιδίων μεταξύ ατόμων γλώσσας με φυσιολογικό

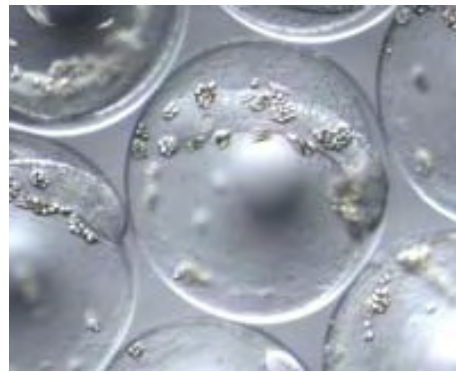
¹ Πέραν των 48 ωρών η εμβρυϊκή θνησιμότητα τείνει να εξαλειφθεί και η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων είναι σε πλήρη εξέλιξη.

χρωματισμό και αμφιχρωματισμό, μέσω της τεχνικής αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing -NGS-) και ν) μέρος της διατριβής εστίασε στην οπτικοποίηση qRT-PCR δεδομένων γονιδιακής έκφρασης, με σκοπό τον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των προτύπων έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων. Σ' αυτό το πλαίσιο χρησιμοποιήθηκε ένα κυρίαρχο σύστημα υπολογιστικής άλγεβρας, το Mathematica, που μετέτρεψε τα μεταγραφικά δεδομένα (μέσες τιμές Ct των τεχνικών επαναλήψεων) σε στατικές και δυναμικές εικόνες μέσω της δημιουργίας μοτίβων από πολύχρωμα πλαίσια που αναπαριστούν τη γονιδιακή έκφραση.

Να σημειωθεί ότι ως χρόνος «0 hpf» νοείται ο χρόνος συλλογής των ωών αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, και αντιστοιχεί στα πρώτα στάδια των κυτταρικών διαιρέσεων του ζυγωτού (αυλάκωση), στις 2-12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Γονιμοποιημένα βιώσιμα ωά παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



Βιώσιμο ωό γλώσσας, 12 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Lund, 2007).



Βιώσιμο ωό γλώσσας, 54 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Lund, 2007).

Κατά την ανάλυση του χρονικού προτύπου έκφρασης και ενώ η ανίχνευση του *hoxa13a* αναμενόταν χρονικά κατά την ολοκλήρωση και προς το τέλος της εμβρυϊκής ανάπτυξης, εντούτοις, υψηλά επίπεδα μεταγράφων ανιχνεύτηκαν ήδη από τα πρώιμα στάδια (0-12 hpf), τα οποία μειώθηκαν σημαντικά έως τις 48 hpf. Στη

συνέχεια και μετά τις 48 hrf, το χρονικό πρότυπο έκφρασης ακολούθησε τη φυσιολογική, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τάση, με υψηλότερη έκφραση στις 96 hrf, σηματοδοτώντας τον τερματισμό και ολοκλήρωση της διαδικασίας. Ο πρώιμος και σε υψηλά επίπεδα έκφρασης εντοπισμός του *hoxa13a*, πιθανώς να σημαίνει την πρόωρη διακοπή της αναπτυξιακής διαδικασίας, που οδηγεί σε αυξημένη εμβρυϊκή θνησιμότητα μέχρι και τις 48 hrf, ή της μητρικής προέλευσης μεταγράφων *hoxa13a*, ο ρόλος των οποίων πρέπει να μελετηθεί.

Επίσης, ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη στη γλώσσα, των δύο παραλόγων ομοιοτικών γονιδίων των *hoxa2a* και *hoxa2b* τα οποία παρουσίασαν παρόμοιο χρονικό πρότυπο έκφρασης. Στους τελεόστεους, τα ομοιοτικά γονίδια της παράλογης ομάδας 2 (PG2), διαφέρουν τόσο στον αριθμό όσο και στο πρότυπο έκφρασής τους ακόμα και σε συγγενικά είδη, δηλώνοντας έτσι έναν όχι και τόσο ξεκάθαρο λειτουργικό ρόλο μεταξύ τους.

Στις 48 hrf, η σύγκριση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων μεταξύ εμβρύων με διαφορετική προέλευση γεννητόρων P και G1, έδειξε να διαφέρει ως προς τα *hoxb1a* και *hoxb1b*, τα οποία παρουσίασαν αυξορρύθμιση στα αβγά με προέλευση από γεννήτορες πρώτης γενιάς (G1). Αντίστοιχα, η ανάλυση κοινών συνιστωσών κατέγραψε επίσης το διαχωρισμό του προτύπου έκφρασης σε δύο διακριτές ομάδες ανάλογα με την προέλευση (P) ή (G1).

Για πρώτη φορά εξετάστηκε η έκφραση της *αποκορεσμάσης Δ4*, στη *Solea solea*. Μετάγραφα της ανιχνεύτηκαν τόσο στα έμβρυα όσο και στις νύμφες και των δύο ομάδων P και G1, σε αντίθεση με τη *Solea senegalensis* όπου το ένζυμο ενεργοποιείται μεταγραφικά μόνο κατά νυμφικά στάδια. Αξιοσημείωτη είναι η

αυξορρύθμιση της έκφρασης του ενζύμου στις άρτι εκκολαφθείσες νύμφες (1 dph) σε σύγκριση με τα αβγά των 48 hpf, δηλώνοντας αυξημένες απαιτήσεις σε DNA. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των δύο ενζύμων, της *αποκορεσμάσης Δ4* και της *επιμηκυνάσης5*, ήταν υψηλότερα στις νύμφες με προέλευση τους άγριους γεννήτορες (P).

Τα αποτελέσματα της μελέτης του πολυμορφισμού μεταξύ βιώσιμων και μη βιώσιμων εμβρύων, έδειξαν σημαντική αύξηση του κινδύνου για μη-βιωσιμότητα τόσο σε επίπεδο αλληλομόρφων όσο και σε επίπεδο γονοτύπων και απλοτύπων. Συγκεκριμένα και αναφορικά με το γονίδιο *hoxa2b* η ξεχωριστή παρουσία των δύο ελασσόνων αλληλομόρφων, δηλ. ένας σημειακός πολυμορφισμός (T>C) ή το έλλειμμα μιας κωδικής τριπλέτας (CAG) αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο της διακοπής της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Επιπρόσθετα, σε επίπεδο γονοτύπων η ομοζυγωτία ως προς τα δύο παραπάνω ελάσσονα αλληλόμορφα (CC ή --) επίσης αυξάνει τις πιθανότητες να τερματιστεί πρόωρα η εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η ανάλυση απλοτύπων έδειξε αυξημένο κίνδυνο μη-βιώσιμης ανάπτυξης για τρεις από αυτούς. Τον υψηλότερο κίνδυνο τον εμφανίζει ένας από αυτούς και είναι τρεις φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον συχνότερα απαντώμενο απλότυπο.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης - συναρμογής του μεταγραφώματος με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς, έδειξαν ότι τα νεαρά άτομα με πλήρη χρωματισμό της τυφλής πλευράς (αμφιχρωματισμό) εμφάνισαν αποκλίνουσα λειτουργία κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος στο επίπεδο των συνάψεων και της διαβίβασης της σηματοδότησης στη μετασυναπτική περιοχή. Επιπλέον, φαίνεται να επηρεάζονται και διαδρομές που σχετίζονται με τις αναπτυξιακές

λειτουργίες του οργανισμού. Καταγράφηκε κυρίως η στενή σύνδεση των χρωματικών κυττάρων με την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων και του νευρικού συστήματος. Η διαδρομή, δέσμευση του γλουταμινικού οξέος – ενεργοποίηση των υποδοχέων AMPA & NMDA – μακράς διάρκειας διέγερση του μετασυναπτικού δυναμικού – σχηματισμός δυναμικού μακράς διάρκειας (LTP) – πλαστικότητα των συνάψεων, φαίνεται να επηρεάζεται στα άτομα με αμφιχρωματισμό. Οι βιολογικές διαδρομές και λειτουργίες που επηρεάζονται συνδέονται κυρίως με λειτουργίες όπως η μάθηση και η μνήμη. Επιπλέον, φαίνεται να επηρεάζεται η αναπτυξιακή βιολογία των συνάψεων, συγκεκριμένα μέσω της αλληλεπίδρασης της οικογένειας πρωτεϊνών LGI με την οικογένεια πρωτεϊνών ADAM. Ο σχηματισμός των συνάψεων και η ωρίμανσή τους απαιτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των προσυναπτικών και μετασυναπτικών νευρώνων. Σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις μεσολαβούν διάφορες ομάδες συναπτογόνων πρωτεϊνών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών, μεσολαβώντας στη συναπτική μετάδοση και στην μυελοποίηση. Επίσης, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν στην καρδιακή λειτουργία τα ιοντικά κανάλια που δρουν μέσω του ATPασών του τύπου «P». Τέλος, φαίνεται να επηρεάζεται ο σχηματισμός του κεράτινου περιβλήματος που σχετίζεται με την περίοδο της εμβρυογένεσης και δυσλειτουργίες φραγής και δομικά ελαττώματα στις συνδέσεις των δεσμοσωμάτων.

Λέξεις κλειδιά: *Solea solea*, ομοιοτικά γονίδια, γονιδιακή έκφραση, πολυμορφισμός, εμβρυική ανάπτυξη, ποιότητα ωών, οπτική αναλυτική, αμφιχρωματισμός, τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

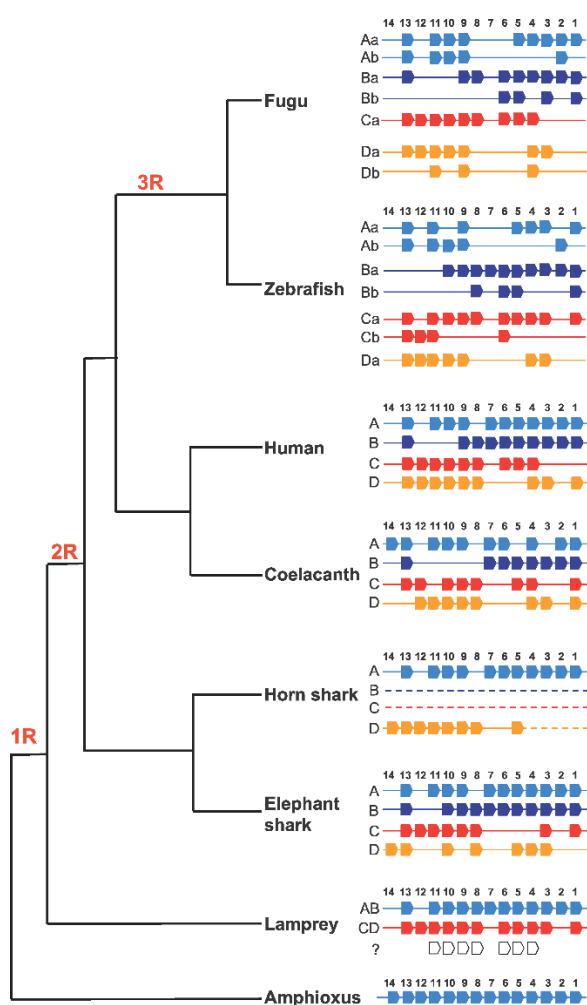
Ο πολυμορφισμός των ομοιοτικών γονιδίων (SNP & TRP) και η βιωσιμότητα των ωών της κοινής γλώσσας (*Solea solea*)

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως αναφέρθηκε, η καλλιέργεια της γλώσσας της κοινής, βασίζεται κυρίως στην αναπαραγωγή υπό ελεγχόμενες συνθήκες (Devauchelle et al., 1987). Η σταθερή ποιότητα και ποσότητα των παραγόμενων ωών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, είναι εκ των ων ουκ άνευ για τη επιτυχημένη μαζική παραγωγή νεαρών ιχθυδίων (Palstra et al., 2015; Lund et al., 2008;). Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί όλα αυτά τα χρόνια, στις συνθήκες εκτροφής και ευζωίας των εκτρεφόμενων γεννητόρων (Palstra et al., 2015; Morais, Aragão, et al., 2014; Baynes et al., 1993; Devauchelle et al., 1987), οι υπό μεταχείριση γεννήτορες, εξακολουθούν να παράγουν ωά τα οποία παρουσιάζουν διακυμάνσεις που αφορούν τόσο στην ποιότητα όσο και στην ποσότητα, συντηρώντας το κόστος εκτροφής της γλώσσας, υψηλό (Bjørndal et al., 2016).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των ωών, περιλαμβάνουν, περιβαλλοντικούς, φυσιολογικούς, διατροφικούς και γενετικούς (Lund et al., 2008). Τα ομοιοτικά γονίδια έχουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο και ρύθμιση των μηχανισμών ανάπτυξης σε όλους του οργανισμούς με αμφίπλευρη συμμετρία, λόγω της τμηματοποίησης - διαφοροποίησης του προσθοπίσθιου άξονα και του συσχετισμού τους με την εξέλιξη των ειδών, δημιουργώντας και εισάγοντας νέα σωματικά πρότυπα και σχέδια στο ζωικό βασίλειο. Τα ομοιοτικά γονίδια κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται κυρίως στο λειτουργικό και μορφολογικό διαχωρισμό των μεταμερών και στην εξειδίκευση των κυττάρων. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά στη μύγα των φρούτων, *Drosophila melanogaster*. Στους τελεόστεους, είναι οργανωμένα σε επτά ή οκτώ συστάδες ή clusters (Aa, Ab, Ba, Bb, Ca, Cb, Da and/or Db), ως αποτέλεσμα διαδοχικών διπλασιασμών του συνολικού γονιδιώματος (υπόθεση "3R") και ταξινομούνται σε δεκατρείς παράλογες ομάδες (Paralog Groups, PG). Οι πρωτεΐνες των ομοιοτικών γονιδίων χαρακτηρίζονται από μια καλώς συντηρημένη

περιοχή που ονομάζεται «ομοιοκυτίο» ή «ομοιοτική περιοχή» (homeobox, homeodomain). Επιπλέον, τα ομοιοτικά γονίδια χαρακτηρίζονται από χωρική και χρονική συγγραμμικότητα, επειδή τα γονίδια που βρίσκονται στο 3' άκρο, εκφράζονται νωρίτερα και στις περισσότερες πρόσθιες περιοχές του εμβρύου, ενώ αυτά του άκρου 5' εκφράζονται αργότερα και στις περισσότερες οπίσθιες περιοχές, **Εικόνα 1.1**. Η παρουσία επτά / οκτώ συστάδων σε όλους τους τελεόστεους, υποδηλώνει ότι το γεγονός του διπλασιασμού, έλαβε χώρα 110 εκ. χρόνια πριν (Wang et al., 2009; McClintock et al., 2003; Jozefowicz et al., 2003; Prince, 2002; McClintock et al., 2001; Akam, 1998; Pendleton et al., 1993).



Εικόνα 1.1: Η εξέλιξη της συστοιχίας των ομοιοτικών γονιδίων των σπονδυλωτών. Οργάνωση και ιστορικό του ολικού διπλασιασμού του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050101.g005>.

Η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων είναι σημαντική είτε για την εξέλιξη της μορφολογίας των ειδών, είτε για τη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη. Μικρές αλλαγές που αφορούν στο χρόνο έκφρασης ή στην ποσότητα, μπορούν να είναι κρίσιμες για τον προσθοπίσθιο σχεδιασμό και φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού (Jozefowicz et al., 2003; Prince, 2002). Σημαντικές δια- και ενδοειδικές αποκλίσεις-παραλλαγές έχουν παρατηρηθεί σε περιοχές που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων (Wang et al., 2009; Boldogkői, 2004). Επίσης, το σημαντικό χαρακτηριστικό τους που είναι η αυτορρύθμισή (autoregulation) και η διασταυρούμενη μεταξύ τους ρύθμιση (cross-regulation), είναι κρίσιμη για την έκφραση του δικτύου γονιδίων που καθένα από τα αυτά ελέγχει, όπου μία μετάλλαξή τους μπορεί να προκαλέσει δραματικές αλλαγές στον φαινότυπο (Prince, 2002).

Στη *Drosophila melanogaster*, έχει αποδειχτεί ότι η έκθεση σε αιθέρα επάγει την απώλεια της έκφρασης του γονιδίου *ultrabithorax (ubx)* εξαιτίας μιας αλληλομορφικής παραλλαγής (allelic variation) του γονιδίου (Akam, 1998; Gibson & Hogness, 1996;). Στα θαλάσσια είδη, όπως ο αχινός (*Strongylocentrotus purpuratus*), το ασκιδιοειδές *Ciona intestinalis*, το κεφαλοχορδωτό *Branchiostoma floridae*, παρουσιάζουν υψηλή αλληλομορφική παραλλακτικότητα (allelic variation) στο γονιδίωμά τους (Marlétaz et al., 2010). Υψηλός πολυμορφισμός, στη μοναδική συστάδα (cluster) ομοιοτικών γονιδίων, εντοπίστηκε στο κεφαλοχορδωτό *Branchiostoma floridae*. Το 2% των νουκλεοτιδίων είναι το αποτέλεσμα σημειακού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) ή μικρών ενθέσεων/ελλείψεων (intels), υποδηλώνοντας υψηλότερο επίπεδο πολυμορφισμού σε σχέση με άλλα θαλάσσια είδη όπως, το *Takifugu rubripes* και το *Ciona intestinalis*.

Τα ομοιοτικά γονίδια των παράλογων ομάδων 1 και 2, απαντώνται κοντά στο 3' άκρο των συστάδων, είναι από τα πρώτα που εκφράζονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στις πρόσθιες περιοχές, και ρυθμίζουν την έκφραση των υπολοίπων (Schulte & Frank, 2014). Στον μυν και στον ξενόποδα, έχουν εντοπιστεί τρία ομοιοτικά γονίδια της παράλογης ομάδας 1, ενώ στους τελεόστεους ο αριθμός τους ποικίλει. Για τα ομοιοτικά γονίδια της παράλογης ομάδας 2, αναφέρονται περισσότερες πληροφορίες στο Κεφάλαιο 2.

Είναι καταγεγραμμένο ότι οι δυσμορφίες ή οι φαινοτυπικές αποκλίσεις είναι στενά συνδεδεμένες με την αλληλομορφική παραλλακτικότητα των ομοιοτικών γονιδίων στους φυσικούς πληθυσμούς (Wang et al., 2009; Yuko Hano, et al., 2001; Muragaki et al., 1996). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, εδράζει εκτός της καλώς συντηρημένης περιοχής του ομοιοκυτίου (Wang et al., 2009; Amemiya et al., 2008). Στο είδος του τελεόστεου *Takifugu rubripes*, έχει αναφερθεί ότι τα ομοιοτικά γονίδια, *hoxa*, μετά των διπλασιασμό του γονιδιώματος, παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό μεταλλάξεων και ασύμμετρη απόκλιση μεταξύ των παραλόγων, με τα παράλογα γονίδια της ομάδας b, να αποκλίνουν με γρηγορότερους ρυθμούς από τα αντίστοιχα της ομάδας a (Wagner et al., 2005).

Η ύπαρξη διαδοχικών επαναλήψεων που παρουσιάζει η αλληλουχία του DNA (tandem repeats, TR) και αφορούν σε μόνο- δι- ή τρι-νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, εντοπίζονται κυρίως στα εξώνια, εσώνια και στις περιοχές μεταξύ των γονιδίων, υποδηλώνει τον σημαντικό τους ρόλο στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθώς και στη δομή και λειτουργία του RNA και των πρωτεϊνών (Faux et al., 2005; Kashi et al., 1997). Είναι περιοχές που εμφανίζουν υψηλό πολυμορφισμό ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων και η έκτασή τους είναι στενά συνδεδεμένη με ασθένειες και δυσλειτουργίες που αφορούν κυρίως στο νευρικό σύστημα (Hannan, 2012). Αυτές οι επαναλήψεις και οι εκτάσεις τους δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, με ολίσθηση των DNA πολυμερασών (replication slippage mechanism). Τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις οι οποίες κωδικοποιούν περιοχές όμοιων αμινοξέων, που καλούνται ομοπεπτίδια ή ομοιοπεπτίδια (homopeptides), συνήθως απαντώνται σε μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν ρόλο ρυθμιστών των αναπτυξιακών διαδικασιών (Hannan, 2012; Nithianantharajah & Hannan, 2007; Faux et al., 2005).

Στην παρούσα εργασία, καταγράφηκε ο πολυμορφισμός τριών ομοιοτικών γονιδίων, που βρίσκονται κοντά στο 3' άκρο των συστάδων, τα *hoxa1a*, *hoxa2a* και *hoxa2b*, σε βιώσιμα και μη βιώσιμα ωά του είδους *Solea solea*, τα οποία συλλέχθηκαν 48 hpf. Η ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας (high resolution melt, HRM) εφαρμόστηκε σε 52 βιώσιμα και 61 μη βιώσιμα έμβρυα. Με την τεχνική αυτή ελέγχθηκαν διεξοδικά οι δύο πιο συχνοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σημείου και

ένας πολυμορφισμός διαδοχικής τρινουκλεοτιδικής επανάληψης (ομοιοπεπτίδιο). Η φυλογενετική ανάλυση των ομοιοτικών γονιδίων της παράλογης ομάδας 2 πραγματοποιήθηκε με σκοπό της καλύτερης κατανόησης της υψηλότερης παραλλακτικότητας του *hoxa2b* σε σχέση με το παράλογό του *hoxa2a*.

1.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2.1 Διαχείριση των γεννητόρων

Μια ομάδα ήδη εγκλιματισμένων άγριων γεννητόρων, διατηρείται στις εγκαταστάσεις του ινστιτούτου IMARES, Ijmuiden, Ολλανδία. Η ομάδα αυτή αποτελούνταν από $N_p=38$ άτομα με αναλογία θηλυκών : αρσενικών, 21:17. Οι συνθήκες εκτροφής και αναπαραγωγής ήταν όμοιες όπως αυτές περιγράφονται με λεπτομέρεια στην εργασία (Blonk et al., 2009). Η περίοδος ωοτοκίας διήρκησε από τον Ιούνιο μέχρι και τα τέλη Αυγούστου του έτους 2014 και λάμβανε χώρα σε καθημερινή βάση.

1.2.2 Διαχείριση των ωών

Η συλλογή των ωών από το συλλέκτη γίνονταν καθημερινά. Τα ωά ζυγίζονταν και τα επιπλέοντα διαχωρίζονταν από τα μη επιπλέοντα. Τρεις κωνικές δεξαμενές περίπου 80 L, οι οποίες προμηθεύονταν με θαλασσινό νερό μέσω κλειστού συστήματος ανακύκλωσης, καθώς και με σύστημα αερισμού, χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση των επιπλεόντων ωών. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 10 °C. Όλες οι παρτίδες εκκολάφθηκαν στις 120 hrf.

1.2.3 Δειγματοληψία των ωών

Στις 0, 24 και 48 hrf τα μη επιπλέοντα ωά απομακρύνονταν από τις δεξαμενές επώασης και ζυγίζονταν. Επιπλέοντα και μη επιπλέοντα ωά από τρεις ομάδες ωοτοκίας με τρεις βιολογικές επαναλήψεις εκάστη, συλλέχθηκαν στις 0, 24 και 48 hrf, εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf που περιείχαν διάλυμα συντήρησης RNA-later. Στη συνέχεια, αποθηκεύτηκαν στους -24 °C μέχρι την τελική εξαγωγή - απομόνωση του γενωμικού DNA. Μετά τις 48 hrf, η ποσότητα των μη επιπλεόντων ωών ήταν αμελητέα και αυτή η χρονική στιγμή

επιλέχθηκε για την συλλογή δειγμάτων για την περαιτέρω ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας, HRM.

1.2.4 Εξαγωγή – απομόνωση του γενωμικού DNA και κλωνοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων

Η εξαγωγή του γενωμικού DNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο φαινόλης – χλωροφόρμιου (Sambrook et al., 1989). Για την απομόνωση και κλωνοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων της γλώσσας οι οποίες δεν ήταν γνωστές, αλληλουχίες από διαφορετικά είδη ιχθύων που αντιστοιχούσαν στα προαναφερθέντα ομοιοτικά γονίδια στοιχήθηκαν και εκφυλισμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν στις συντηρημένες περιοχές όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.1**. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο *hoxa2a* ήταν επίσης κατάλληλοι και για την απομόνωση τμήματος του *hoxa2b*. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γενωμικό DNA και με τη χρήση της σειράς αντιδραστηρίων KAPA Taq DNA HotStart Polymerase (KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa), σε θερμοκυκλοποιητή, MJ Research PTC-200. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, στα 90 V για 1 ώρα και 30 λεπτά και απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης από το πήκτωμα αγαρόζης με τη σειρά αντιδραστηρίων Nucleospin® Gel purification (MACHEREY- NAGEL), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό, τα προϊόντα κυκλοδετήθηκαν (ligated) στο φορέα pcR®II-TOPO® και ακολούθησε ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων TOPO10 (Invitrogen) με τη μέθοδο του θερμικού κλονισμού (shock).

Πίνακας 1.1

Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό των εκκινητών, θερμοκρασίες υβριδισμού, και μέγεθος των προϊόντων PCR από γενωμικό DNA

Target gene / GenBank Accession number	GenBank accession number (Sequences used for primer design)	Primer's name	Priming sequences (5' – 3')	Product length (bp)	T (°C) annealing
<i>hoxa1a</i> / KX235355	AB232918 (<i>Oryzias latipes</i>)	hoxa1aF	GAYTAYWCKGTGATGAGC	986	58.0
	DQ481663 (<i>Takifugu rubripes</i>)	hoxa1aR	GTACTTGTTAAAGTGGAAATC		
<i>hoxa2a</i> / KX235356	EF594313 (<i>Astatotilapia burtoni</i>)	hoxa2aF ¹	TATCAATAGTCAGCCGTCGCT	1402	60.0
	JQ976896 (<i>Anguilla japonica</i>)	hoxa2aR ¹	GGGAAATGTTTCAGATTKYT		
<i>hoxa13a</i> / KX235358	FJ824598 (<i>Callorhinchous milii</i>)	hoxa13aF	KGTRATGTTCTSTACGAC	1220	58.0
	AGRG01012345 (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	hoxa13aR	TMGTGACYTGCKCTCRGA		
<i>hoxa2b</i> / KX235357	AB232919 (<i>Oryzias latipes</i>)	hoxa2bF	CDTCCARAGTTCRTCAATCAAG	1001	60.0
	DQ481664 (<i>Takifugu rubripes</i>)				
	EF594311 (<i>Astatotilapia burtoni</i>)	hoxa2bR	TGRAACCAVACYTTSACYTG		
	JQ976897 (<i>Anguilla japonica</i>)				
FJ823133 (<i>Oreochromis niloticus</i>)	hoxa2bR	TGRAACCAVACYTTSACYTG			
AGRG01020967 (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)					
<i>hoxb1a</i> / KX235359	AB232920 (<i>Oryzias latipes</i>)	hoxb1aF	TGGATGAARGTVAARAGRA	1480	57.0
	DQ481665 (<i>Takifugu rubripes</i>)	hoxb1aR	BCGYTTYTTCTGYTTCAT		
	JQ976898 (<i>Anguilla japonica</i>)				
	AF071251 (<i>Danio rerio</i>)	hoxb1aR	BCGYTTYTTCTGYTTCAT		

¹Ζεύγος εκκινητών που ταίριαξε εξίσου για την απομόνωση του *hoxa2b* (μέγεθος προϊόντος: 1342 bp)

Για την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών M13 και πραγματοποιήθηκε από την VBC Biotech, Vienna, Austria. Η ταυτοποίηση έγινε με ομοπαράθεση των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων GenBank, NCBI, USA όπου και κατατέθηκαν, με τους εξής κωδικούς πρόσβασης: KX235355, KX235356, KX235257, KX235358, KX235359 και KX257479.

1.2.5 Εξαγωγή – απομόνωση γενωμικού DNA για ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας

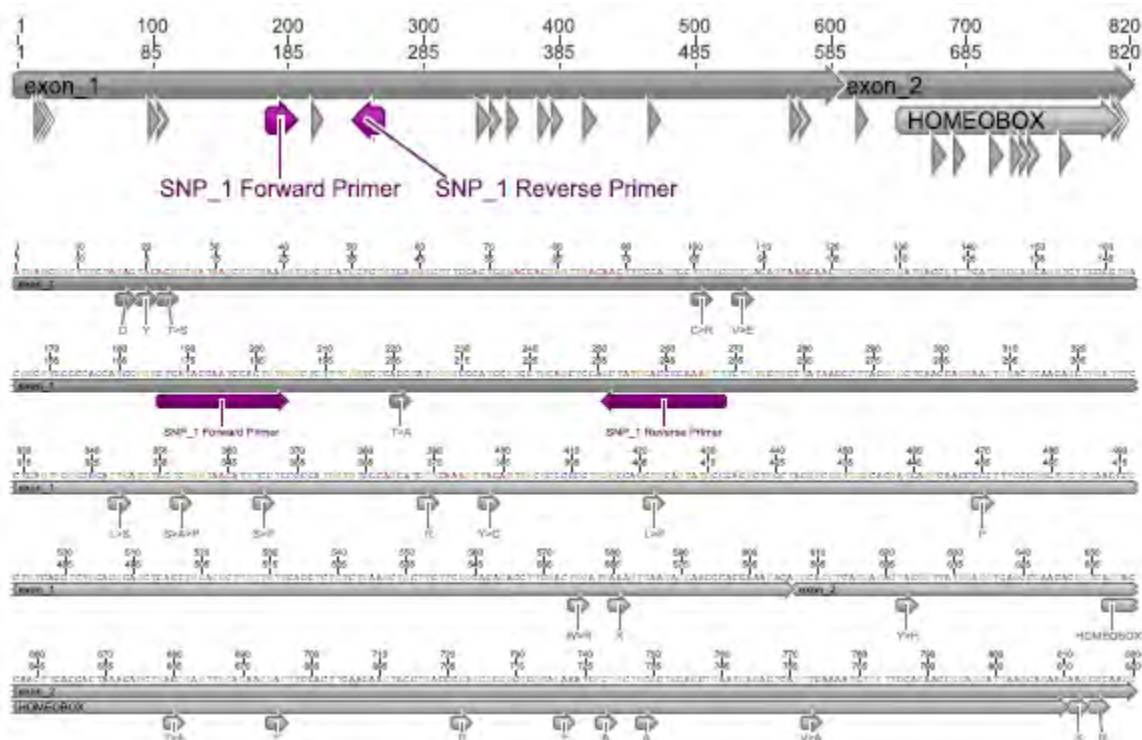
Μεμονωμένα έμβρυα, 52 & 61, ηλικίας 48 hpf, προερχόμενα από τρεις (3) επιπλέουσες και μη επιπλέουσες παρτίδες ωοτοκίας, αντίστοιχα, απομονώθηκαν, εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και η εξαγωγή του γενωμικού DNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο φαινόλης – χλωροφόρμιου, με μικρές τροποποιήσεις που αφορούσαν στις ποσότητες των αντιδραστηρίων σε αναλογία 1:10 (Sambrook et al., 1989). Η ποιότητα και ποσότητα του DNA ελέγχθηκε στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000.

1.2.6 Ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας – HRM

Με βάση την ομοπαράθεση των αλληλουχιών, οι δύο συχνότεροι σημειακοί, μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί (<15%), SNP1 και SNP2, και ένας πολυμορφισμός που αφορούσε σε διαδοχικώς επαναλαμβανόμενα τρινουκλεοτίδια, TRP, επιλέχθηκαν για την ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας. Ο σημειακός πολυμορφισμός SNP1, βρίσκεται στη θέση 220 (A ή G) του mRNA του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa1a*, **Εικόνα 1.2, Πίνακας 1.2**, ο αντίστοιχος SNP2 εντοπίζεται στη θέση 749 (T ή C) του mRNA του γονιδίου *hoxa2b*, **Εικόνα 1.3, Πίνακας 1.3** και ο TRP, ο οποίος εντοπίζεται επίσης στο mRNA του γονιδίου *hoxa2b*, αφορά στην ένθεση / αφαίρεση ενός κωδικονίου, CAG, στη θέση 232-234 που κωδικοποιεί το αμινοξύ γλουταμίνη (Q), **Εικόνα 1.3, Πίνακας 1.3**. Για καθένα από τα κλωνοποιημένα γονίδια, *hoxa1a* και *hoxa2b*, ένα ζεύγος εκκινητών για κάθε πολυμορφισμό σχεδιάστηκε. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες υβριδισμού παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.4**. Η ανάλυση τήξης υψηλής διακριτικότητας πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή, Rotor-gene 6000 (Corbet Life

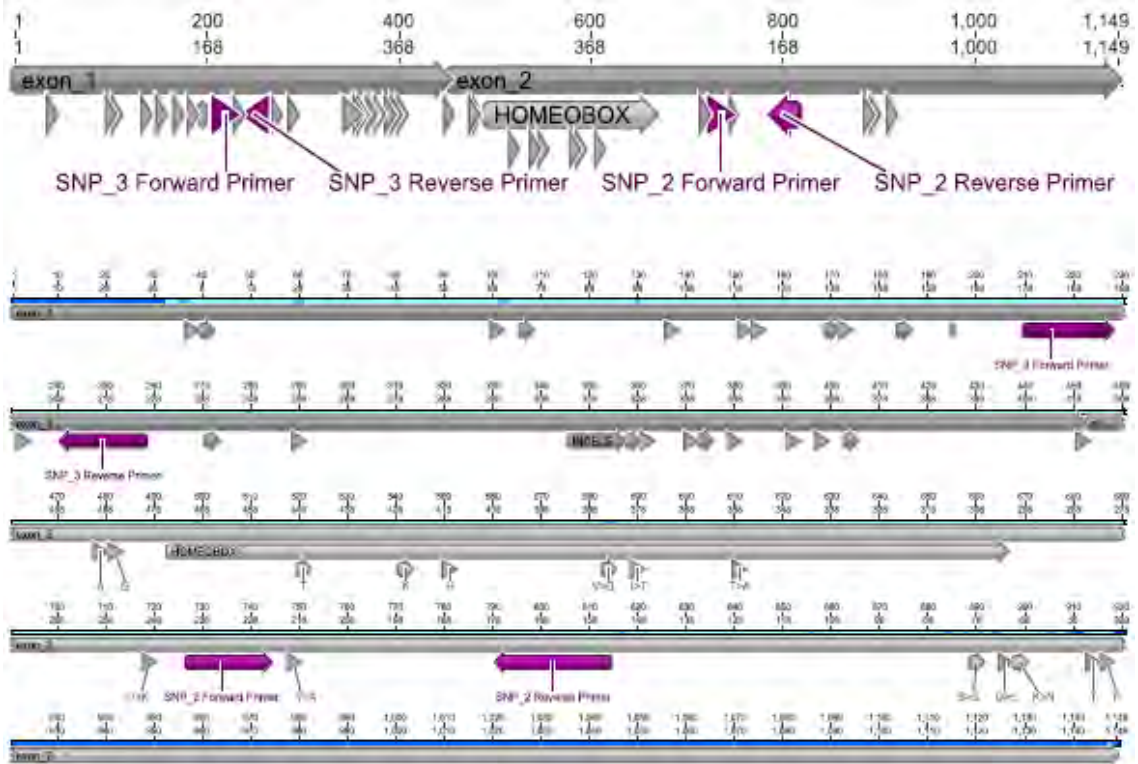
Science, Australia). Για τις αντιδράσεις PCR, οι οποίες περιείχαν 15-25 ng γενωμικού DNA, εκτελέστηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις, χρησιμοποιώντας τη σειρά αντιδραστηρίων «type-it HRM kit» (Qiagen), σε δύο βήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε τελικό όγκο 25 μ L. Ένα και μοναδικό προϊόν επιβεβαιώθηκε από την ομοιομορφία των κορυφών των καμπυλών τήξης και από τις μοναδικές δέσμες, με τα αναμενόμενα μήκη, στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Τα διαδοχικά στάδια των αντιδράσεων PCR περιλάμβαναν ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης στους 95 $^{\circ}$ C για 5 λεπτά, ακολούθησαν 40 κύκλοι με τα εξής δύο στάδια: i) αποδιάταξη – μετουσίωση στους 95 $^{\circ}$ C για 10 λεπτά, ii) υβριδοποίηση και επέκταση σε θερμοκρασία ανάλογη με το ζεύγος των εκκινητών για 30 s. Επίσης, ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών, τα διαστήματα της θερμοκρασίας για την ανάλυση HRM, με ρυθμό 0,1 $^{\circ}$ C ανά s, παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Δύο θετικά δείγματα ελέγχου, ένα για κάθε κλωνοποιημένο απλότυπο (που έχει ήδη αλληλουχηθεί) και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχου, συμπεριλήφθηκαν σε κάθε ανάλυση.

Εικόνα 1.2



Τμήμα mRNA του *hoxa1a* του είδους *Solea solea*. Φαίνονται οι πολυμορφικοί τόποι και το ζεύγος των εκκινητών για την ανάλυση HRM (SNP1).

Εικόνα 1.3



Πλήρες mRNA του *hoxa2b* του είδους *Solea solea*. Φαίνονται οι πολυμορφικοί τόποι και τα ζεύγος των εκκινήτων για την ανάλυση HRM (SNP2 & TRP ή SNP3).

Πίνακας 1.2 Πολυμορφικές θέσεις (SNPs) στο *hoxa1a* μεταξύ βιώσιμων και μη-βιώσιμων εμβρύων στη *Solea solea*

Synonymous (S) Non-synonymous (NS)	Amino acid	Triplette	Position		
S	D	GAC	16	18	
S	Y	TAC	19	21	
NS	T>S	ACG	22	24	
NS	C>R	TGT	100	102	
NS	V>E	GTG	106	108	
NS	T>A	ACC	220	222	HRM ¹
NS	L>S	TTG	343	345	
NS	S>A>P	TCG	352	354	
NS	S>P	TCC	364	366	
S	R	CGT	388	390	
NS	Y>C	TAC	397	399	
NS	L>P	CTG	421	423	
S	P	CCC	469	471	
NS	W>R	TGG	574	576	
S	K	AAA	580	582	
NS	Y>H	TAC	622	624	
NS	T>A	ACG	679	681	
S	E	GAG	694	696	HOMEBOX ²
S	R	CGA	721	723	
S	E	GAA	736	738	
S	A	GCG	742	744	
S	A	GCG	748	750	
NS	V>A	GTC	772	774	
S	K	AAG	811	813	
S	R	CGC	814	816	

NS=13, S=12

¹ SNP1 ανάλυση με HRM

² SNPs παρόντα στην περιοχή Homeobox

Πίνακας 1.3 Πολυμορφικές θέσεις (SNPs) στο *hoxa2b* μεταξύ βιώσιμων και μη-βιώσιμων εμβρύων στο είδος *Solea solea*

Synonymous (S) Non-synonymous (NS)	Amino acid	Triplette	Position		
S	N	AAT	37	39	
S	S	AGT	40	42	
S	Q	CAG	100	102	
S	S	TCA	106	108	
NS	S>P	TCG	136	138	
S	P	CCC	151	153	
S	P	CCC	154	156	
S	I	ATC	169	171	
S	P	CCC	172	174	
NS	G>E	GGG	184	186	
DEL ³	-	C	195	195	
INDEL	Q	CAG	232	234	HRM ¹
NS	T>S	ACT	271	273	
NS	E>G	GAG	289	291	
INDELS	poly-A & poly-T	ACTACTACTGCT	346	357	
NS	A>T	GCT	358	360	
S	A	GCT	361	363	
S	A	GCT	370	372	
NS	T>A	ACT	373	375	
NS	A>T	GCT	379	381	
NS ³	S>P>H	TCT	391	393	
S	S	TCA	397	399	
NS	S>P	TCT	403	405	
NS	Q>H	CAA	451	453	
S	A	GCT	478	480	
S	G	GGA	481	483	
S	T	ACG	520	522	HOMEBOX ²
S	K	AAG	541	543	
S	H	CAT	550	552	
NS	V>D	GTC	583	585	
NS	I>T	ATT	589	591	
NS	T>A	ACG	610	612	
NS	D>K	AAG	718	720	
NS	V>A	GTG	748	750	HRM ¹
NS	S>G	AGT	889	891	
NS	D>E	GAC	895	897	
NS	K>N	AAA	898	900	
S	T	TTC	913	915	
S	P	CCC	916	918	

NS=18, S=18

¹ SNP2, GTG or GCG (V or A), θέση 749 & TRP, INDEL 232-234, CAG (Q)

² SNPs παρόντα στην περιοχή Homeobox

³ έλλειψη (DEL) παρατηρήθηκε στα μη-βιώσιμα ωά, η σερίνη (S) ήταν παρούσα αποκλειστικά στα βιώσιμα ωά.

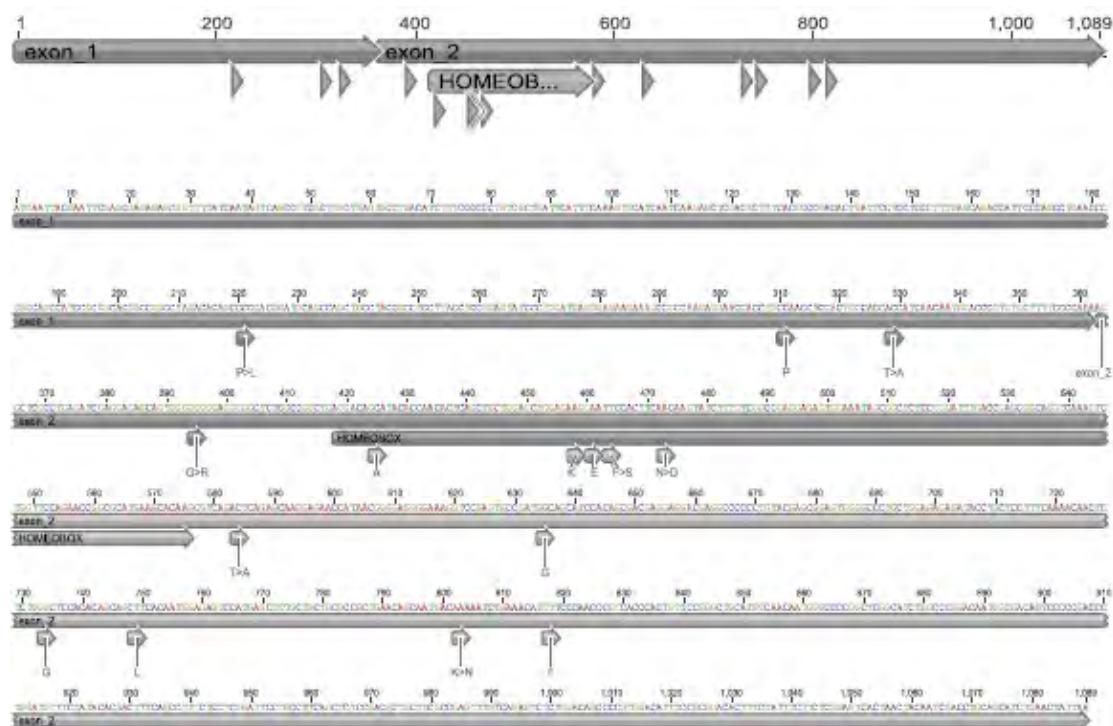
Πίνακας 1.4 Θερμοκρασίες υβριδισμού και μέγεθος των προϊόντων PCR, ανά ζεύγος εκκινητών, για την ανάλυση HRM

SNPs	<i>hox</i> gene	Priming sequences (5' – 3')	Amplicon size (bp)	T (°C) annealing (HRM temperature interval)
SNP1	<i>hoxa1a</i>	F: CTCATACCAATCCACTGTG R: AACTTTGGGGTCCATAGC	83	61,4 (78-90)
SNP2	<i>hoxa2b</i>	F: GAGGACGAGCTGGAGCAG R: TTTGGTGGAAATATCTGTCCCTTT	88	62.8 (80-90)
TRP	<i>hoxa2b</i>	F: CTCCAAGCAGCAACAGCAG R: GCAGCCTTTCACCGCCTG	49	68 (75-90)

1.2.7 Φυλογενετική ανάλυση

Η παρουσία υψηλού πολυμορφισμού του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa2b*, **Εικόνα 1.3 & Πίνακας 1.3** σε σχέση με το παράλογό του *hoxa2a*, **Εικόνα 1.4 & Πίνακας 1.5** και με σκοπό να ερευνησουμε την μεταξύ τους γενετική απόκλιση κατά την διάρκεια της εξέλιξής τους, πραγματοποιήθηκε η φυλογενετική τους ανάλυση σε επίπεδο τάξης Pleuronectiformes καθώς και σε επίπεδο είδους στη *Solea solea*. Για το σκοπό αυτό 25 διαφορετικά είδη επιλέχθηκαν. Ως είδη αναφοράς (outgroup), επιλέχθηκαν τα *Heterodondus francisci* και *Latimeria menadoensis*, ως βασικά ακτινοπτερύγια τα *Lepisosteus oculatus*, *Polypterus bichir* και *Amia calva*, ως βασικός τελεόστεος, το *Anguilla japonica* και εκπρόσωποι των ακανθοπτερυγών οι εξής τάξεις: Beloniformes, Cyprinodontiformes, Perciformes, Tetraodontiformes και Pleuronectiformes (Crow et al., 2009). Τα επιλεγμένα είδη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.6**.

Εικόνα 1.4



Πλήρες mRNA του γονιδίου *hoxa2a* του είδους *Solea solea* και οι τόποι με πολυμορφισμό.

Πίνακας 1.5 Πολυμορφικές θέσεις (SNPs) στο *hoxa2a* μεταξύ βιώσιμων και μη-βιώσιμων εμβρύων.

Synonymous (S) Non-synonymous (NS)	Amino acid	Triplet	Position	
NS	P>L	CCC	220	222
S	P	CCA	310	312
NS	T>A	ACC	328	330
NS	G>R	GGG	394	396
S	A	GCA	424	426
S	K	AAG	457	459
S	E	GAA	460	462
NS	F>S	TTC	463	465
NS	N>D	AAC	472	474
NS	T>A	ACT	583	585
S	G	GGC	634	636
S	G	GGC	733	735
S	L	CTT	748	750
NS	K>N	AAA	802	804
S	F	TTT	817	819

HOMEOBOX¹

NS=7, S=8

¹ SNPs παρόντα στην περιοχή Homeobox

Πίνακας 1.6 Οι αλληλουχίες και ο κωδικός πρόσβασης στη βάση δεδομένων NCBI, που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση

Lineage	Order	Scientific name	Accession number (<i>hoxa2</i>)	
Chondrichthys		<i>Heterodontus francisci</i>	AF224262	
Sarcopterygii		<i>Latimeria menadoensis</i>	FJ497005	
Actinopterygii	Polypteriformes	<i>Polypterus bichir</i>	AC132195	
	Semionotiformes	<i>Lepisosteus oculatus</i>	XM_006636056	
	Amiiformes	<i>Amia calva</i>	GEUG01017022	
Teleosts			<i>hoxa2a</i>	<i>hoxa2b</i>
Elopomorpha	Anguilliformes	<i>Anguilla japonica</i>	JQ976896	JQ976897
Acanthopterygii	Beloniformes	<i>Oryzias latipes</i>	AB207976	AB207985
Acanthopterygii	Beloniformes	<i>Oryzias melastigma</i>	KX244494	KX244496
Acanthopterygii	Cyprinodontiformes	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	KP661597	KP965864
Acanthopterygii	Perciformes	<i>Astatotilapia burtoni</i>	EF594313	EF594311
Acanthopterygii	Perciformes	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_00543828	FJ823133
Acanthopterygii	Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i>	DQ481663	DQ481664
Acanthopterygii	Pleuronectiformes	<i>Paralichthys olivaceus</i>	XM_020090484	XM_020107684
Acanthopterygii	Pleuronectiformes	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	XM_008331458	XM_008323392
Acanthopterygii	Pleuronectiformes	<i>Solea solea</i>	MF163118	MF163119

1.2.8 Αλληλουχίες και εξελικτική ανάλυση

Η ομοπαράθεση των αλληλουχιών έγινε με τη χρήση του αλγόριθμου «Muscle» (Edgar, 2008), ο οποίος περιλαμβάνεται στο λογισμικό πακέτο MEGA7 (Kumar et al., 2016). 24 διαφορετικά μοντέλα αντικατάστασης νουκλεοτιδίων ελέγχθηκαν με το παραπάνω λογισμικό. Η ανάλυση περιλάμβανε 25 διαφορετικές αλληλουχίες και συνολικά 1.239 νουκλεοτιδικές θέσεις. Η φυλογενετική αναπαράσταση έγινε με τη μέθοδο της ένωσης γειτόνων (neighbor-joining) (Saitou & Nei, 1987). Εφαρμόστηκε ο έλεγχος με επανάθεση (bootstrap), 2.000 επαναλήψεων (Felsenstein, 1985). Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA7 (Kumar et al., 2016). Η εκτίμηση των τιμών ω και ο έλεγχος για προσαρμοστική εξέλιξη (θετική επιλογή) των παράλογων γονιδίων, στην τάξη Pleuronectiformes και στο είδος *Solea solea*, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο PAMLX (version 1.3.1) (Xu & Yang, 2013).

1.2.9 Στατιστικές μέθοδοι

Τα αλληλόμορφα ελέγχθηκαν για την ισορροπία Hardy-Weinberg στα δείγματα με βιώσιμα ωά (έμβρυα), με το λογισμικό GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012), και με έλεγχο χ τετραγώνου. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σύνδεσης ανισορροπίας (linkage disequilibrium) για όλους τους τόπους, ανά ζεύγη, με την εφαρμογή του αλγόριθμου EM (expectation-maximization), με το λογισμικό πρόγραμμα Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Η ανάλυση των τόπων, μεμονωμένα, για τις αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες εκτιμήθηκε με τη στατιστική μέθοδο παλινδρόμηση logit εξετάζοντας τέσσερα γενετικά μοντέλα: i) προσθετικό, (additive) ii) υπολειπόμενο (recessive), iii) κυριαρχικό (dominant) και iv) υπέρ-κυριαρχικό (over-dominant). Επίσης, η παλινδρόμηση logit εφαρμόστηκε και για την ανάλυση των απλοτύπων στα γενετικά μοντέλα, προσθετικό, υπολειπόμενο και κυριαρχικό, αξιοποιώντας την εντολή «haplotype» στο στατιστικό πακέτο STATA (version 14.0) (Marchenko, 2010).

1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

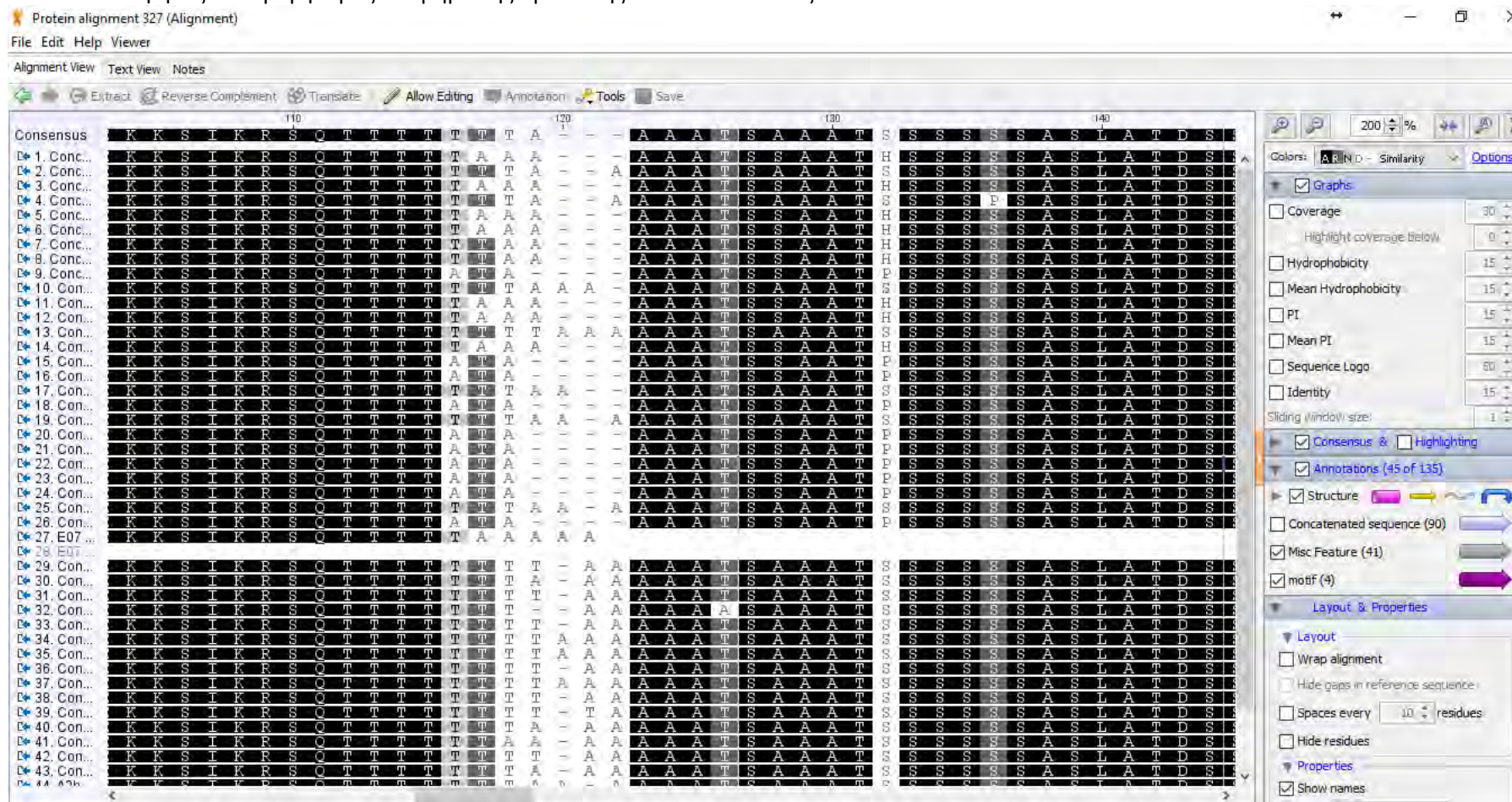
1.3.1 Ανίχνευση πολυμορφισμού

Οι **Εικόνες 1.2, 1.3 και 1.4**, καθώς και οι **Πίνακες 1.2, 1.3 και 1.5**, συνοψίζουν τα αποτελέσματα σχετικά με την ανίχνευση πολυμορφικών τόπων των τριών ομοιοτικών γονιδίων *hoxa1a*, *hoxa2a* και *hoxa2b*, μεταξύ ομάδων (παρτίδων) βιώσιμων και μη βιώσιμων ωών (εμβρύων) *Solea solea*. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι και τα τρία γονίδια έχουν σχεδόν παρόμοιο ποσοστό συνώνυμων και μη-συνώνυμων αντικαταστάσεων, ακόμα και στις θεωρητικώς πιο συντηρημένες περιοχές, όπως είναι το ομοιοκυτίο, ή homeobox. Στο περισσότερο πολυμορφικό *hoxa2b*, σε σχέση με τα υπόλοιπα, παρατηρήθηκε η απουσία ενός νουκλεοτιδίου (C) στη θέση 195 του mRNA, μόνο στα μη βιώσιμα έμβρυα, η οποία οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και σε πρόωρη εισαγωγή του κωδικονίου τερματισμού. Επίσης μια σημαντική παρατήρηση είναι η παρουσία της σερίνης (S) στο κωδικόνιο, στη θέση, 131 (132 για την συναινετική – consensus – αλληλουχία), αποκλειστικά στα βιώσιμα ωά (**Εικόνα 1.5**). Για τα μη βιώσιμα ωά, είναι παρόντα σε ίσες αναλογίες, επιπλέον τα αμινοξέα προλίνη (P) και ιστιδίνη (H), 10:26 και 9:26, αντίστοιχα. Η μετάφραση του mRNA του γονιδίου *hoxa2b*, χαρακτηρίζεται από μια περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη (κωδικόνια GAC), η οποία αποτελείται από οκτώ μονάδες γλουταμίνης, χωρισμένες στη μέση από μία μονάδα προλίνης (P) (κωδικόνιο CCG), στην περιοχή 217-243 του mRNA (κωδικόνια 73-81). Ένα επίσης ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που παρουσιάζει το ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b*, είναι η παρουσία επιπλέον τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων οδηγώντας σε περιοχές πλούσιες σε ομοιοπεπτίδια όπως η περιοχή 334-372 (κωδικόνια 73-81) που αποτελείται από μονάδες θρεονίνης (T) και αλανίνης (A), που χαρακτηρίζεται από ενθέσεις / ελλείψεις με συνέπεια ο αριθμός τους να ποικίλει (**Εικόνα 1.5**).

1.3.2 Μεμονωμένη ανάλυση των πολυμορφικών τόπων

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η σχέση μεταξύ δύο σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και ενός πολυμορφισμού διαδοχικών τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (TRP). Τέσσερα γενετικά μοντέλα ελέγχθηκαν για τις αλληλομορφικές συγκρίσεις. Ο **Πίνακας 1.7** συνοψίζει την περιγραφή των

Εικόνα 1.5. Υψηλός πολυμορφισμός σε τμήμα της πρωτεΐνης **HoxA2b** στο είδος *Solea solea*



Ομοπαράθεση τμημάτων αλληλουχιών της πρωτεΐνης HoxA2b μεταξύ μη-βιώσιμων (1-26) και βιώσιμων (29-43) ομάδων ωών στο είδος *Solea solea*. Στην περιοχή 116-122, παρουσιάζεται ευκρινώς η περιοχή που χαρακτηρίζεται από ενθέσεις/ελλείψεις, καθώς και η παρουσία σερίνης (S), στη θέση 132, αποκλειστικά στην ομάδα των βιώσιμων ωών.

Πίνακας 1.7 Ανάλυση μεμονωμένων τόπων: Αλληλομορφικές και γονοτυπικές συσχετίσεις λαμβάνοντας υπόψη όλα τα γενετικά μοντέλα των υπό εξέταση πολυμορφισμών που σχετίζονται με μη-βιωσιμότητα, σε μελέτη case-control. Οι λόγοι των πιθανοτήτων (odd ratios) αναπαριστούν το πόσες φορές αυξάνεται ο κίνδυνος για μη-βιωσιμότητα, συνοδευόμενες από τις σημαντικότητες τους.

SNPs	Non-Viable, n (%)	Viable, n (%)	Alleles		Additive		Dominant		Recessive		Over-dominant	
			Odd ratios (95% CI)	P value	Odd ratios (95% CI)	P value	Odd ratios (95% CI)	P value	Odd ratios (95% CI)	P value		
SNP1												
A	89 (78.1)	73 (77.7)										
G (minor)	25 (21.9)	21 (23.3)	1.02(0.53-1.98)	0.943								
AA (ref)	39 (68.4)	29 (61.7)					1.34(0.60-3.03)	0.474				
AG	11 (19.3)	15 (31.9)			1.83(0.73-4.58)	0.194					1.96(0.80-4.82)	0.142
GG	7 (12.3)	3 (6.4)			0.58(0.14-2.42)	0.452			0.49(0.12-2.0)	0.318		
SNP2												
T	46 (54.8)	75 (79.8)										
C (minor)	38 (45.2)	19 (20.2)	3.26(1.68-6.32)	0.000								
TT (ref)	20 (47.6)	29 (61.7)					1.77(0.76-4.12)	0.184				
TC	6 (14.3)	17 (36.2)			1.95(0.66-5.82)	0.229					0.29(0.10-0.84)	0.022
CC	16 (38.1)	1 (2.1)			0.04(0.01-0.35)	0.003			28.31(3.6-225,9)	0.002		
TRP												
Q (CAG)	35 (47.2)	61 (62.2)										
X(---) (minor)	47 (57.3)	37 (37.8)	2.21(1.22-4.03)	0.009								
QQ (ref)	9 (22.0)	18 (36.7)					2.06(0.81-5.29)	0.131				
QX	17 (41.5)	25 (51.0)			0.74(0.27-2.02)	0.551					0.68(0.29-1.57)	0.366
XX	15 (36.5)	6 (12.3)			0.20(0.06-0.69)	0.011			4.13(1.4-11.9)	0.009		

παραπάνω πολυμορφισμών, καθώς και τις συχνότητες των αλληλομόρφων στις κατηγορίες βιώσιμων και μη βιώσιμων ωών. Μεταξύ των τριών πολυμορφισμών, οι συχνότητες των ελασσόνων αλληλομόρφων (minor alleles), των SNP2 και TRP, που αφορούν στο ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b*, ήταν σημαντικώς υψηλότερες στην ομάδα των μη-βιώσιμων εμβρύων. Αυξημένος κίνδυνος για μη-βιωσιμότητα παρατηρήθηκε για τον γονότυπο “CC” του SNP2 (ομοζυγωτία ως προς το ελάσσον αλληλόμορφο), στα τρία από τα τέσσερα γενετικά μοντέλα, προσθετικό, υπολειπόμενο και κυριαρχικό. Αντίστοιχα, υψηλός, στατιστικά σημαντικός κίνδυνος, παρατηρήθηκε και για την περίπτωση του πολυμορφισμού των διαδοχικών τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (TRP), για τα γενετικά μοντέλα, προσθετικό και υπολειπόμενο. Το καλύτερο (best fit) μοντέλο, με τις μικρότερες τιμές p , είναι και για τις δύο παραπάνω περιπτώσεις, το υπολειπόμενο γενετικό μοντέλο, με τιμές $P < 0,002$ και $P < 0,009$ για το SNP2 και TRP, αντίστοιχα. Αναφορικά με τον σημειακό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό του *hoxa1a* (SNP1), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, είτε σε επίπεδο αλληλομόρφων, είτε σε επίπεδο γονοτύπων, σε όλα τα γενετικά μοντέλα, κατά τον έλεγχο.

1.3.3 Ανάλυση απλοτύπων

Ο **Πίνακας 1.8** παρουσιάζει τις συχνότητες των απλοτύπων από τους παραπάνω προρρηθέντες πολυμορφισμούς. Η ανάλυση των απλοτύπων (**Πίνακας 1.9**), έδειξε ένα στατιστικώς σημαντικό αυξημένο κίνδυνο, στο υπολειπόμενο γενετικό μοντέλο, για τους απλότυπους Αλανίνη(A)-Αλανίνη(A)-Γλουταμίνη(Q) (1,71 0,64-2,79), Αλανίνη(A)-Βαλίνη(V)-Απουσία Γλουταμίνης(X) (3,16 1,67-4,66) και Θρεονίνη(T)-Βαλίνη(V)- Απουσία Γλουταμίνης(X) (2,39 0,66-4,12) με τιμές $p = 0,002$, $0,0001$ και $0,007$, αντίστοιχα (μετά από διόρθωση Bonferroni). Ο απλότυπος Αλανίνη(A)-Βαλίνη(V)-Απουσία Γλουταμίνης(X) είχε τη μεγαλύτερη επίδραση και αύξησε τον κίνδυνο για πρόωρο τερματισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης κατά τρεις φορές περισσότερο από τον συχνότερα εμφανιζόμενο απλότυπο, Αλανίνη(A)-Αλανίνη(A)-Απουσία Γλουταμίνης(X). Λιγότερα ισχυρά αλλά εξίσου στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα εμφάνισαν οι απλότυποι A-A-Q και T-V-X, στο προσθετικό γενετικό

μοντέλο. Επιπλέον, η συνδυασμένη ανάλυση των απλοτύπων, που αφορούν στα SNP2 και TRP, έδειξε ότι για τους απλότυπους, A-Q και V-X αυξάνεται στατιστικώς σημαντικά ο κίνδυνος κατά 1,37 ($P<0,004$) και 2,39 ($P<0,0001$) φορές, αντίστοιχα, σε σχέση με τον συχνότερα εμφανιζόμενο.

Πίνακας 1.8 Συχνότητες απλοτύπων. Οι απλότυποι αναπαρίστανται ως SNP1-SNP2-TRP

Haplotypes	Amino acids	Frequency
G-C-X ¹	A-A-X	0.41
G-C-(CAG)	A-A-Q	0.24
G-T-X ¹	A-V-X	0.12
A-C-(CAG)	T-A-Q	0.12
A-T-X ¹	T-V-X	0.08

* frequencies > 0.0176991

¹ Απουσία τριπλέτας CAG ή Γλουταμίνης (Q)

Πίνακας 1.9

Ανάλυση απλοτύπων: συσχέτιση των απλοτύπων με το κίνδυνο μη-βιωσιμότητας

Haplotypes (amino acids)	Additive		Dominant		Recessive	
	Odd ratios (95% CI)	P value	Odd ratios (95% CI)	P value	Odd ratios (95% CI)	P value
A-A-Q	1.38 (0.48-2.28)	0.003	0.11 (-0.84-1.06)	0.818	1.71 (0.64-2.79)	0.002
A-V-X ¹	1.29 (0.19-2.38)	0.021	-0.52 (-1.63-0.59)	0.359	3.16 (1.67-4.66)	0.000
T-A-Q	0.03 (-1.37-1.44)	0.964	-0.85 (-2.21-0.50)	0.218	-11.90 (-18.6-18.6)	0.990
T-V-X ¹	1.09 (-1.12-2.30)	0.079	0.59 (-1.52-0.78)	0.527	2.39 (0.66-4.12)	0.007

¹ Απουσία γλουταμίνης (Q)

1.3.4 Φυλογενετική ανάλυση των ομοιοτικών γονιδίων *hoxa2a* & *hoxa2b*

Για την φυλογενετική ανάλυση, έγινε έλεγχος 24 διαφορετικών μοντέλων αντικατάστασης νουκλεοτιδίων, με το λογισμικό πρόγραμμα MEGA7. Το μοντέλο «Tamura 3-parameter», προέκυψε να έχει τη χαμηλότερη τιμή του εσωτερικού κριτηρίου εγκυρότητας, Bayesian Information Criterion (BIC) και χρησιμοποιήθηκε για τις περαιτέρω αναλύσεις. Για το συγκεκριμένο μοντέλο, λήφθηκε υπόψη, διακριτή κατανομή γάμμα (G) με πέντε κατηγορίες αξιολόγησης, με ένα μέρος των τόπων να είναι εξελικτικώς αμετάβλητοι (I), (εκτιμώμενη τιμή 0,16, T92+G+I) (Tamura & Kumar, 2002; Tamura, 1992). Η φυλογενετική ανάλυση περιγράφεται στην **Εικόνα 1.6**. οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν βάσει της μεθόδου «Tamura 3-parameter».

Εφαρμόστηκε έλεγχος «bootstrap», με 2.000 επαναλήψεις (Felsenstein, 1985). Ο ρυθμός μεταβολής μεταξύ των τόπων προσαρμόστηκε-διαμορφώθηκε με γάμμα (G) κατανομή. Η παράμετρος μορφής (shape parameter)=1,13. Η τοπολογία του φυλογενετικού δέντρου είναι σε συμφωνία με τη φυλογένεση των Ακτινοπτερύγιων και όμοια με προηγούμενες φυλογενετικές αναλύσεις (Wagner et al., 2005; Crow et al., 2009). Από το φυλογενετικό δέντρο προκύπτει ότι τα παράλογα γονίδια των Ακανθοπτερύγιων, *hoxa2a* και *hoxa2b*, διαχωρίζονται σε δύο διακριτούς κλάδους (clades).

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.6**, το μήκος των διακλαδώσεων (branches), μεταξύ των παράλογων κλάδων, *hoxa2a* και *hoxa2b*, είναι διαφορετικό, με την παράλογη ομάδα b, να εμφανίζει το μεγαλύτερο μήκος, υποδηλώνοντας διαφορετικές τιμές ω . Σε πολλαπλή ομοπαράθεση συγγενικών αλληλουχιών, η τιμή ω ορίζεται ως ο λόγος των μη-συνώνυμων (dN) προς συνώνυμων (dS) αντικαταστάσεων ανά θέση. Για τιμή ίση με τη μονάδα ($=1$), οι ρυθμοί είναι συγκρίσιμοι και η προς εξέταση αλληλουχία δεν υφίσταται εξελικτική πίεση (neutral selection-ουδέτερη). Για τιμή μεγαλύτερη της μονάδας (>1), ο ρυθμός των μη-συνώνυμων αντικαταστάσεων είναι μεγαλύτερος και η υπό εξέταση αλληλουχία υπόκειται σε «θετική» επιλογή (positive selection), με τάση διαφοροποίησης της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Τέλος, για τιμή μικρότερη της μονάδας (<1), ο ρυθμός των συνώνυμων αντικαταστάσεων υπερσχύει και η αλληλουχία υπόκειται σε «ουδέτερη» ή «εκκαθαρίζουσα» επιλογή (neutral or purifying selection), διατηρώντας αμετάβλητη τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Για τον υπολογισμό των τιμών ω μεταξύ των θέσεων και των διαφορετικών σειρών - διακλαδώσεων (lineages - branches), εφαρμόστηκαν έλεγχοι του λόγου μεγίστης πιθανοφάνειας (likelihood ratio tests, LRT), τα οποία έδειξαν τα εξής: i) η συμπερίληψη ουδέτερων θέσεων με τιμή $\omega=1$ δικαιολογείται στατιστικώς ($p<0,001$), ii) η μεταβολή των τιμών ω μεταξύ των κλάδων *hoxa2*, *hoxa2a* και *hoxa2b*, διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ($p<0,001$), μετά τη διόρθωση Bonferroni, οι τιμές των οποίων είναι αντίστοιχα, 0,11286, 0,12780 και 0,34535, υποδηλώνοντας διαφορετικό εξελικτικό ρυθμό μεταξύ των παράλογων ομάδων a και b, iii) υπάρχουν ενδείξεις για διαφορετικές τιμές ω για τον κλάδο που οδηγεί στα Pleuronectiformes και αφορά αμφότερα στα παράλογα γονίδια *hoxa2a* και

hoxa2b, με σημαντικότητες, μετά τη διόρθωση Bonferroni, $p < 0,01$ και $p < 0,05$, αντίστοιχα. Επιπλέον, ο έλεγχος πιθανοφάνειας και η προσέγγιση BEB (Bayes empirical Bayes), έδειξε ότι είναι επιτρεπτό να θεωρήσουμε θέσεις με τιμές $\omega > 1$, δηλαδή θέσεις που είναι κάτω από την επίδραση θετικής εξέλιξης (positive selection), όπως το κωδικόνιο στη θέση 149, με τιμή $\omega = 0,995$ και $p < 0,01$, iv) ομοίως, αναφορικά με το είδος *Solea solea*, υπάρχουν ενδείξεις διαφορετικών τιμών ω και βελτίωση της πιθανοφάνειας, όταν επιτρέπουμε στο μοντέλο, θέσεις να παίρνουν τιμές $\omega > 1$, μόνο για το παράλογο ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b*. Το κωδικόνιο στη θέση 274, παρουσιάζει τιμή $\omega = 0,972$ και $P < 0,05$ (Πίνακας 1.10). Η εκτίμηση της μέσης εξελικτικής απόκλισης εντός των ομάδων *hoxa2a* και *hoxa2b*, έδειξε τριπλάσια απόκλιση με τιμές $d_a = 0,14 \pm 0,01$ και $d_b = 0,40 \pm 0,02$, αντίστοιχα.

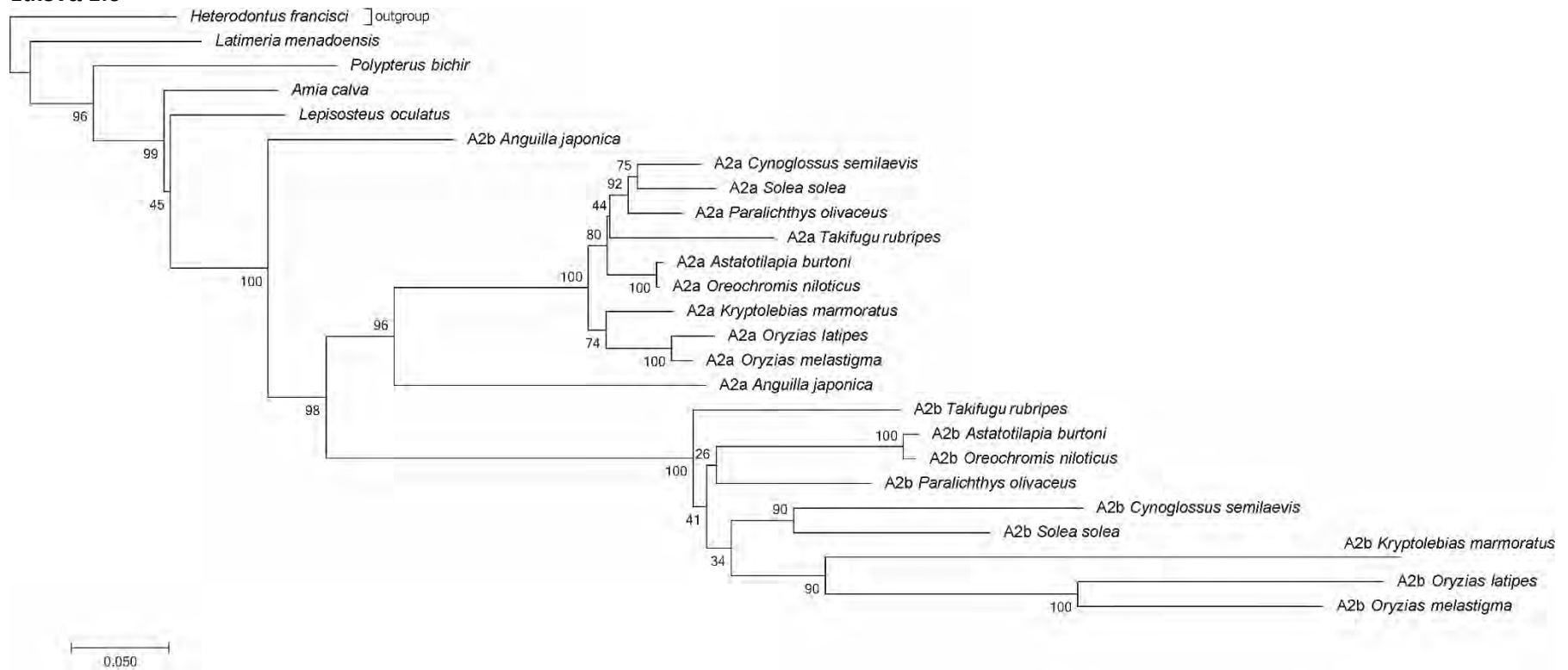
Πίνακας 1.10 Τιμές ω μεταξύ των διαφορετικών κλάδων

Taxa	<i>hoxa2a</i> τιμή ω	<i>hoxa2b</i> τιμή ω
Acanthopterygii	0,12391**	0,34550**
Pleuronectiformes	0,07385**	0,36002*
<i>Solea sole</i>	0,11509	0,38499*

* $P < 0,05$ μετά τη διόρθωση Bonferroni

** $P < 0,005$ μετά τη διόρθωση Bonferroni

Εικόνα 1.6



Φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης hoxA2b. Για τη φυλογενετική αναπαράσταση εφαρμόστηκε η μέθοδος Neighbor-Joining και έλεγχος «bootstrap», με 2.000 επαναλήψεις. Η παράμετρος μορφής (shape parameter)=1,13.

1.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες που αφορούν σε τεχνικές μεταλλάξεων και λειτουργικής αποσιώπησης (loss of function), σε διάφορα σπονδυλωτά, έδειξαν ότι τα ομοιοτικά γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (McEllin et al., 2015; Casaca et al., 2014; Duboule, 1998; Krumlauf, 1994; McGinnis et al., 1992). Η πιο σημαντική παρατήρηση, των αποτελεσμάτων μας ήταν η παρουσία πολυμορφισμού και στα τρία προς εξέταση γονίδια, *hoxa1a*, *hoxa2a* & *hoxa2b*, ακόμα και σε θεωρούμενες καλά συντηρημένες περιοχές, όπως το ομοιοκυτίο (homeobox), το οποίο χαρακτηρίζει την οικογένεια των ομοιοτικών γονιδίων (*hox* genes). Ο βαθμός πολυμορφισμού ήταν παρόμοιος είτε αναφορικά με τα βιώσιμα, μη-βιώσιμα έμβρυα, είτε αναφορικά με τις συνώνυμες και μη-συνώνυμες αντικαταστάσεις. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, αποσαφήνισαν τη σημαντική σχέση μεταξύ των παραλλαγών του γονιδίου *hoxa2b* και της εμβρυϊκής θνησιμότητας σε δείγματα ωών στο είδος *Solea solea*. Οι δύο πολυμορφικοί τόποι του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa2b*, SNP2 & TPR, εμφάνισαν σημαντικώς αυξημένες συχνότητες των ελασσόνων αλληλομόρφων τους στην ομάδα των μη-βιώσιμων ωών, αυξάνοντας τις πιθανότητες της μη-βιωσιμότητας κατά 3,26 και 2,21, αντίστοιχα. Δηλαδή, έμβρυα γλώσσας, που είναι φορείς της κυτοσίνης (C) ή τους λείπει η τριπλέτα (CAG), που κωδικοποιεί την γλουταμίνη (G), έχουν αυξημένες πιθανότητες για διακοπή της εμβρυϊκής τους ανάπτυξης με κίνδυνο θανάτου. Η επιπλέον ανάλυση γονοτύπων, έδειξε ότι στο υπολειπόμενο γενετικό μοντέλο, ο γονότυπος “CC”, που κωδικοποιεί την Αλανίνη, και η παρουσία σε ομοζυγωτία, αλληλομόρφων με ένα κατάλοιπο γλουταμίνης λιγότερο, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο κατά 28,31 και 4,13 φορές, αντίστοιχα. Για να εξεταστεί περαιτέρω το συνδυαστικό αποτέλεσμα των δύο αλληλομορφικών παραλλαγών του γονιδίου *hoxa2b*, εφαρμόστηκε συνδυαστική ανάλυση των απλοτύπων, η οποία έδειξε ισχυρή τάση για την αύξηση του κινδύνου, όταν ένα από τα δύο ελάσσονα αλληλόμορφα, δηλ. A ή X είναι παρόν. Αντίθετα, όταν είναι παρόντα και τα δύο ελάσσονα αλληλόμορφα, ο κίνδυνος είναι αμελητέος.

Είναι ενδιαφέρον, όταν το ελάσσον αλληλόμορφο (G, κωδικοποιεί την Αλανίνη) του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa1a*, συνδυαστεί με τους προαναφερθέντες απλότυπους

του *hoxa2b*, A-Q & V-X, ο παράγοντας κίνδυνος αυξάνεται από 1,37 σε 1,71 και 2,39 σε 3,16 φορές, αντίστοιχα. Ανάλογα, η παρουσία του συχνότερα εμφανιζόμενου αλληλόμορφου (major allele) του *hoxa1a* (A, κωδικοποιεί την Θρεονίνη), αντιστρέφει τις επιβλαβείς συνέπειες του απλότυπου A-Q, ευνοώντας τη βιωσιμότητα κατά 11,90 φορές, ενώ δεν έχει επίπτωση στον απλότυπο V-X.

Το ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b* στο είδος *Solea solea*, παρουσιάζει χαρακτηριστικές πολυμορφικές περιοχές ομοπεπτιδίων, γλουταμίνης, αλανίνης και θρεονίνης που δεν είναι παρούσες σε άλλα ορθόλογα ή παράλογα γονίδια, γεγονός που το διαφοροποιεί. Στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το έκταμα του ομοιοπεπτιδίου γλουταμίνης στο *hoxa2b* της γλώσσας, χωρίζεται-διακόπτεται στη μέση με ένα κατάλοιπο προλίνης. Παρόμοιες σταθεροποιητικές παρεμβολές ευνοούνται από τη φυσική επιλογή, υποδηλώνοντας ένα βασικό προσαρμοστικό ρόλο (Albà et al., 1999). Οι επαναλήψεις γλουταμίνης, απαντώνται συχνά σε μεταγραφικούς παράγοντες και παρουσιάζουν υψηλή ετεροζυγωτία, όπως παρατηρήθηκε και στα δικά μας αποτελέσματα. Στη *Drosophila melanogaster*, η πρωτεΐνη Ultrabithorax (Ubx), παρουσιάζει ένα έκταμα πολυ-αλανίνης στο καρβοξυλικό άκρο. Αυτή η ομοιοπεπτιδική περιοχή, αυξάνει τη κατασταλτική ισχύ του γονιδίου και συνδράμει στη μορφολογική διαφοροποίηση των εντόμων. Περιοχές πλούσιες σε Αλανίνη και σε Αλανίνη/Γλουταμίνη αποτελούν τμήμα των ομοιοτικών πρωτεϊνών και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, με ιδιότητες καταστολής της γονιδιακής έκφρασης. Αυτές οι περιοχές, φαίνεται να αλληλοεπιδρούν με το μεταγραφικό δίκτυο, ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση και ενεργοποίηση των γονιδίων (Galant & Carroll, 2002). Είναι επίσης, γνωστές κι ως “πηγές δυναμικών μεταλλάξεων” λόγω της γενετικής μεταβλητότητας που παρουσιάζουν (Richards, 2001). Οι προεκτάσεις των ομοιοπεπτιδίων πέραν ενός ορίου, σχετίζονται με ποικιλία ασθενειών. Δυσλειτουργίες λόγω προέκτασης των πολυγλουταμινικών περιοχών, περιλαμβάνουν ειδικές εγκεφαλικές περιοχές, οι οποίες σχετίζονται με τον εκφυλισμό του νευρικού συστήματος και νευρολογικά συμπτώματα. Στον άνθρωπο, τουλάχιστον εννέα διαταραχές, που περιλαμβάνουν διαφορετικά γονίδια, σχετίζονται με τα εκτάματα γλουταμίνης. Σε ορισμένες πρωτεΐνες, οι προεκτάσεις αλανίνης οδηγούν σε ανωμαλίες

την αναπτυξιακή διαδικασία, μέσω της λειτουργικής αποσιώπησης των μεταγραφικών παραγόντων. Οι ασθένειες που αφορούν σε προεκτάσεις των περιοχών πλούσιων σε Αλανίνη, σχετίζονται κυρίως με διαταραχές της μορφολογίας του σώματος, ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη των αναπαραγωγικών δομών, οστών, άκρων και εγκεφάλου, επηρεάζοντας των άξονα υποθαλάμου / υπόφυσης (Shoubridge & Gecz, 2012).

Ο διπλασιασμός του γονιδιώματος που έλαβε χώρα λίγο πριν την εμφάνιση των τελεόστων (Amores et al., 2004), είχε ως αποτέλεσμα την απόκλιση των διπλασιασμένων γονιδίων, που οδήγησε στην εμφάνιση νέων λειτουργιών (neofunctionalization), οι οποίες συνδέθηκαν κυρίως με αλλαγές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Crow et al., 2009; Amores et al., 1998). Τα ομοιοτικά γονίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αρχιτεκτονικής δομής του σώματος των μετόζων (McClintock et al., 2001). Στο παρόν πόνημα, εξετάσαμε την μοριακή εξέλιξη των παράλογων ομοιοτικών γονιδίων, *hoxa2a* και *hoxa2b*, στη γλώσσα (*Solea solea*) και στα συγγενικά είδη των Pleuronectiformes, με το να εκτιμήσουμε την ασυμμετρική απόκλιση καθώς και τις εξελικτικές δυνάμεις που δρουν πάνω σε αυτά. Τα αντίγραφα (διπλασιασμένα) γονίδια εμφανίζουν, αμφότερα ή ένα από αυτά, λιγότερο έντονα την πίεση της αρνητικής ή εκκαθαριστικής επιλογής (negative ή purifying selection), επιτρέποντας τη συσσώρευση αλλαγών σε μοριακό επίπεδο, ενώ παράλληλα διατηρούν τις βασικές λειτουργίες της πρωτεΐνης (McClintock et al., 2001; Jozefowicz et al., 2003; Crow et al., 2009). Όπως απεικονίζεται στο φυλογενετικό δέντρο (**Εικόνα 1.6**), τα παράλογα *hoxa2a* και *hoxa2b* των Ακανθοπτερύγιων, έχουν συσσωρεύσει αρκετές αλλαγές ώστε να διαχωρίζονται σε δύο ξεχωριστούς κλάδους (a) και (b). Ο Wagner et al., 2005, έδειξαν στο *Takifugu rubripes*, ότι υπάρχει ασυμμετρική απόκλιση μεταξύ των ομάδων των παράλογων γονιδίων (a) και (b), με τα (b) παράλογα να αποκλίνουν ταχύτερα από τα όμοιά τους (a), παρουσιάζοντας αυξημένο εξελικτικό ρυθμό. Στο φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία, το μήκος των διακλαδώσεων (branches) των γονιδίων *hoxa2b*, παρουσιάζεται σε όλα τα είδη μεγαλύτερο από τα αντίστοιχα των *hoxa2a*, λόγω του υψηλότερου ρυθμού νουκλεοτιδικής αντικατάστασης (Crow et al., 2009). Με σκοπό να εξηγηθεί η παρατηρούμενη ασυμμετρία μεταξύ των παράλογων γονιδίων, ερευνήθηκε η αναλογία

μη-συνώνυμων (dN) προς συνώνυμων (dS) αντικαταστάσεων ανά θέση, γνωστή κι ως αναλογία ω (dN/dS, ω ratio), καθώς και ο έλεγχος διαφορετικών μοντέλων ως προς την τιμή ω , με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood). Το μοντέλο της μίας και μοναδικής τιμής ω για όλους τους κλάδους (M0), παρουσίασε τη χειρότερη επίδοση πιθανοφάνειας και τιμή $\omega=0,21086$, υποδηλώνοντας την ύπαρξη εκκαθαριστικής επιλογής (purifying selection) για όλες τις σειρές (lineages). Οι έλεγχοι πιθανοφάνειας, έδειξαν επιπλέον ότι η συμπερίληψη ουδέτερων νουκλεοτιδικών τόπων με τιμή $\omega=1$, είναι στατιστικώς αποδεκτή (justified), στα σχεδόν ουδέτερα μοντέλα 1 και 7, ενώ για τα μοντέλα θετικής επιλογής (positive selection), 2 και 8, δεν παρουσίασαν στατιστικές σημαντικότητες. Η παρατηρούμενη ετερογένεια των τιμών ω μεταξύ των παράλογων ομοιοτικών γονιδίων *hoxa2a* και *hoxa2b*, στους Ακανθοπτερυγες (Acanthopterygii), Πλευρονήκτες (Pleuronectiformes) και στη γλώσσα (*Solea solea*), υποδηλώνει μια ισχυρότερη και περισσότερο σταθεροποιητική εξελικτική δύναμη (selection) για το *hoxa2a*. Αυτή η ετερογένεια ενδεχομένως να οφείλεται στην ύπαρξη θετικής επιλογής (positive selection) ή σε ελαστικότερη, με λιγότερους περιορισμούς, εκκαθαριστική επιλογή (purifying selection), που αφορά στο *hoxa2b*, αποδεικνύοντας ότι η δράση της φυσικής επιλογής διαφοροποιείται στα παράλογα γονίδια (Crow et al., 2009). Συνεπώς, ο υψηλότερος εξελικτικός ρυθμός που παρατηρείται στο *hoxa2b*, δεν μπορεί να αιτιολογηθεί μόνο με την παρουσία της θετικής επιλογής σε όλο το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου, αν και ορισμένες νουκλεοτιδικές θέσεις φαίνεται να είναι υπό την επιρροή της θετικής επιλογής, στους Πλευρονήκτες και στη γλώσσα. Η ανάλυση της αντικατάστασης των νουκλεοτιδικών βάσεων και η σύγκριση των κλάδων των παράλογων γονιδίων εμφάνισε σχεδόν τριπλάσια απόκλιση μεταξύ των παράλογων γονιδίων *hoxa2a* και *hoxa2b*. Επιπλέον, η τοπολογία έδειξε ότι ο ρυθμός εξέλιξης μεταξύ των παράλογων γονιδίων εμφανίζει ασυμμετρία σχεδόν σε όλα τα taxa. Η περίπτωση του φαινομένου του διπλασιασμού του γονιδιώματος, συνήθως οδηγεί σε υψηλότερους εξελικτικούς ρυθμούς και αποκλίσεις (Crow et al., 2009). Αν και δεν υπάρχει ξεκάθαρη ένδειξη για την παρουσία θετικής επιλογής, η στατιστικώς σημαντική διακύμανση της τιμής ω μεταξύ των *hoxa2a* και *hoxa2b*, συνάγει το συμπέρασμα ότι περισσότερες μη-συνώνυμες νουκλεοτιδικές

αντικαταστάσεις λαμβάνουν χώρα στο ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b* και λίγα μόνο κωδικόνια βρίσκονται υπό θετική επιλογή.

Οι διακυμάνσεις του μήκους των ομοιοπεπτιδίων συμβαίνουν περίπου με ρυθμό 100.000 φορές μεγαλύτερο από τις σημειακές μεταλλάξεις. Αυτό το χαρακτηριστικό διευκολύνει τις αλλαγές στη μορφολογία των οργανισμών με το να επιταχύνει το ρυθμό εξέλιξης των ειδών. Η συγκεκριμένη ταχεία μεταλλαξιμότητα συνήθως προσθέτει ασταθή μεταβλητότητα στην εγκεφαλική ανάπτυξη και / ή προδιαθέτει ευπάθεια σε ασθένειες. Η παρουσία των ομοιοπεπτιδίων στους μεταγραφικούς παράγοντες διαδραματίζει ρόλο καταστολής ή ενεργοποίησης της έκφρασης των γονιδίων, ρυθμίζοντας και ελέγχοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα γονιδιακά δίκτυα. Επιπλέον ρόλο έχουν στην αλλαγή και τροποποίηση του τρόπου αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων μεταβάλλοντας τους σηματοδοτικούς καταρράκτες (King, 2012). Ένα σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των ομοιοπεπτιδίων διαδραματίζει και η μεθυλίωση του DNA, ως απάντηση στην περιβαλλοντική καταπόνηση (stress). Υπό συνθήκες καταπόνησης, η μεθυλίωση του DNA ενδεχομένως επάγει τη μεταβολή του μήκους του ομοιοπεπτιδίου, οδηγώντας σε αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και στη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών. Αν ο παράγοντας καταπόνησης παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα, η φυσική επιλογή δρα και σταθεροποιεί το μήκος του ομοιοπεπτιδίου με την παρεμβολή σημειακών μεταλλάξεων (Faux, 2012). Έχει αποδειχτεί ότι η φυσική επιλογή δρα σε επίπεδο πρωτεϊνών και είναι σημαντική για τον επιπολασμό των ομοιοπεπτιδίων (Faux et al., 2005). Επιπλέον, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι πρωτεΐνες που έχουν ομοιοπεπτιδικές περιοχές, παρουσιάζουν διακριτές εκλεκτικές (εξελικτικές) πιέσεις (selective pressure) και χαρακτηριστικά, και τις ομοιοπεπτιδικές περιοχές περισσότερο ενεργητικές (Faux et al., 2007). Στο παρόν πόνημα, η παρουσία τριών αντίστοιχων περιοχών στο γονίδιο *hoxa2b* στο είδος *Solea solea*, θα μπορούσε να εξηγήσει τις παρατηρηθείσες υψηλές τιμές (ω) (**Πίνακας 1.10**) μεταξύ των taxa των Ακτινοπτέρυγων και των Πλευρονηκτών. Αυτό το γεγονός ενδεχομένως να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τους διακριτούς ρόλους και τις λειτουργίες που παρουσιάζουν τα ομοιοτικά γονίδια της παράλογης ομάδας 2 (a και b) ή ακόμα και μεταξύ των ορθόλογων της

ομάδας (b) των υπολοίπων ειδών, αιτιολογώντας το φαινόμενο ότι ακόμα και σε συγγενικά είδη ο αριθμός και οι λειτουργίες των γονιδίων αυτής της ομάδας να διαφέρουν σημαντικά (Le Pabic et al., 2007).

1.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η βιωσιμότητα των ωών της γλώσσας είναι στενά συνδεδεμένη με τη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ορισμένα γονίδια, ιδιαίτερα οι μεταγραφικοί παράγοντες, είναι οι πρωταγωνιστές στις διαδικασίες ανάπτυξης των πρώτων σταδίων της ζωής. Στο παρόν πόνημα, έγινε φανερό ότι το ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b* έχει σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα των ωών, καθώς ορισμένες μορφές πολυμορφισμού σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με υψηλό κίνδυνο μη-βιωσιμότητας. Το γονίδιο *hoxa2b* παρουσιάζει υψηλή συχνότητα πολυμορφισμού σε σημειακές θέσεις και σε επίπεδο αμινοξέων (κωδικόνιων), καθώς και μεγαλύτερες τιμές (ω) από το παράλογό του *hoxa2a*, υποδηλώνοντας αυξημένους ρυθμούς εξέλιξης. Η παρουσία τριών ομοιοπεπτιδικών περιοχών, πλούσιων σε γλουταμίνη, θρεονίνη και αλανίνη, οι οποίες απαντώνται συνήθως σε μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την νευρική και εγκεφαλική ανάπτυξη, είναι παρούσες στο *hoxa2a* της κοινής γλώσσας. Η περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη διακόπτεται ακριβώς στο μέσον της από ένα κατάλοιπο προλίνης. Η παρουσία της προλίνης σταθεροποιεί την περιοχή από αυξομειώσεις του μήκους της και επομένως της μεταλλαξιμότητάς της, μέσω της την ευνοϊκής δράσης της φυσικής επιλογής. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της περιοχής πλούσιας σε γλουταμίνη και η ύπαρξή της αποκλειστικά στο *hoxa2b* της κοινής γλώσσας, νέους λειτουργικούς ρόλους σε σχέση με τα ορθόλογα των υπολοίπων ειδών. Είναι επιτακτική η περαιτέρω έρευνα σε επίπεδο πολυμορφισμού των υπολοίπων μεταγραφικών παραγόντων με ρυθμιστικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, για την καλύτερη κατανόηση των λειτουργιών της φυσιολογικής ανάπτυξης των πρώτων σταδίων. Ορισμένες μορφές πολυμορφισμού φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο. Ο πολυμορφισμός των διαδοχικών επαναλήψεων (TRP) χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβλητότητα και μεταλλαξιμότητα σε ότι αφορά το μήκος των επαναλήψεων, επηρεάζοντας τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών καθώς και τα

επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για σύντομες χρονικές περιόδους. Η σχέση των περιοχών αυτών με τη μεθυλίωση του DNA σε συνθήκες καταπόνησης, τις καθιστά υποψήφιες για την μελέτη της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ιδιαίτερα για τα εκτρεφόμενα είδη σε συνθήκες αιχμαλωσίας και καταπόνησης όπως η κοινή γλώσσα. Η μελέτη του πολυμορφισμού σε σημαντικά γονίδια στόχους που επηρεάζουν την ανάπτυξη και φυσιολογική λειτουργία και βιωσιμότητα, ήδη από τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης και επιλογής, για την παραγωγή περισσότερων και υγιέστερων ιχθυδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η γονιδιακή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων (*hox*) και των γονιδίων υπεύθυνων για τη σύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας.

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών ο μεγαλύτερος περιοριστικός παράγοντας είναι η ασταθής και ευμετάβλητη ποιότητα των παραγόμενων ωών που εμποδίζει την επιτυχή μαζική παραγωγή νεαρών ιχθυδίων (Lund et al., 2008). Η ωοπαραγωγή και ωοτοκία πολλών θαλασσιών ειδών, περιλαμβανομένης και της “γλώσσας η κοινή”, *Solea solea*, βασίζεται κυρίως στη αλίευση και εκτροφή άγριων γεννητόρων. Εντούτοις, η παραγωγή ωών από γεννήτορες εκτρεφόμενους εξολοκλήρου στην αιχμαλωσία, είναι εξαιρετικά περιορισμένη και προσπάθειες να ελεγχθεί ο βιολογικός τους κύκλος δεν έφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα, παρήχθησαν λιγότερα και χαμηλής βιωσιμότητας ωά (Palstra et al., 2015; Parma et al., 2015; Morais et al., 2014; Lund et al., 2008; Baynes et al., 1993; Devauchelle et al., 1987).

Οι αιτίες που επηρεάζουν την ποιότητα των ωών εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, φυσιολογίας, θρέψης καθώς και του βαθμού ευζωίας των συνθηκών εκτροφής (Lund et al., 2008). Το πρότυπο έκφρασης ορισμένων γονιδίων, στα αρχικά στάδια της ζωής, όπως τα ομοιοτικά (*hox*), ενδεχομένως να σχετίζεται ισχυρά με την ποιότητα και βιωσιμότητα των ωών και των νυμφών.

2.1.1 Ομοιοτικά γονίδια (*hox* genes)

Είναι γνωστό πως τα ομοιοτικά γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης όλων των οργανισμών με αμφίπλευρη συμμετρία, όπως των σπονδυλωτών, στον καθορισμό της μορφολογίας του σώματος και των εσωτερικών και εξωτερικών δομών τους κατά μήκος του προσθοπίσθιου άξονα (Casaca et al., 2014; Lemons & McGinnis, 2006; Deschamps et al., 1999). Στους τελεόστεους, τα ομοιοτικά γονίδια είναι κατανεμημένα σε επτά ή οκτώ γραμμικές

συστοιχίες ή ομάδες (clusters), με ίδιο προσανατολισμό, ως αποτέλεσμα διαδοχικών διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (**Εικόνα 1.1**). Ταξινομούνται σε 13 παράλογες ομάδες (paralog groups), σύμφωνα με την ομολογία των αλληλουχιών τους και τη θέση τους στη συστοιχία, αλλά κάθε συστοιχία δεν παρουσιάζει και τα 13 παράλογα ομοιοτικά γονίδια (Amores et al. 2004; Casaca et al. 2014; Ladam & Sagerström 2014; Lemons & McGinnis 2006; Maconochie et al. 1996; Soshnikova 2014). Η θέση κάθε ομοιοτικού γονιδίου κατά μήκος της συστοιχίας, παρέχει τρεις σημαντικές ιδιότητες: i) την περιοχή έκφρασης του γονιδίου κατά μήκος του προσθοπίσθιου άξονα, ii) τη χρονική στιγμή της ενεργοποίησης της έκφρασής τους και, iii) το φαινόμενο της ιεραρχικής κυριαρχίας των οπίσθιων γονιδίων στα πρόσθια ανάλογά τους, όταν αυτά συνεκφράζονται (συνυπάρχουν). Για παράδειγμα, τα ομοιοτικά γονίδια που βρίσκονται κοντύτερα στο 3' άκρο της συστοιχίας, όπως οι παράλογες ομάδες 1 και 2, εκφράζονται νωρίς στην ανάπτυξη και στις πρόσθιες περιοχές (κεφάλι, φαρυγγικά τόξα), ενώ αυτά που βρίσκονται κοντύτερα στο 5' άκρο, όπως οι παράλογες ομάδες 11, 12 και 13, εκφράζονται αργότερα και στις οπίσθιες περιοχές του εμβρύου (άκρα, πτερύγια, ουρά). Όταν δύο ομοιοτικά γονίδια διαφορετικών παράλογων ομάδων εκφράζονται στην ίδια περιοχή ταυτόχρονα, τότε η έκφραση του γονιδίου που βρίσκεται εγγύτερα στο άκρο 5' κυριαρχεί εις βάρος του άλλου του οποίου η έκφραση αναστέλλεται (Lewis, 1978; Krumlauf, 1994; Mallo & Alonso, 2013; Casaca et al., 2014; Soshnikova, 2014; Gaunt, 2015).

2.1.2 Σύνθεση εικοσιδυοεξαενοϊκού οξέος (DHA)

Τα λιπίδια και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας (LC-PUFA), όπως τα εικοσιδυοεξαενοϊκό (DHA), αραχιδονικό (ARA) και εικοσιπενταενοϊκό (EPA) οξέα συνιστούν καθοριστικούς παράγοντες στην εμβρυογένεση και στα αρχικά στάδια της ζωής, καθώς η παρουσία τους είναι σημαντική για την φυσιολογική ανάπτυξη των εμβρύων και των νυμφών (Hauville et al., 2015; Figueiredo, 2012; Tocher, 2010). Η σύσταση των ωών των ιχθύων σε λιπαρά οξέα, εξαρτάται από τη διατροφή των γεννητόρων και είναι ευαίσθητη στις διατροφικές αλλαγές (Tocher, 2010). Μελέτες έδειξαν ότι στη κοινή γλώσσα και στο καλκάνι (turbot), η περιεκτικότητα των ωών σε

DHA ήταν υψηλότερη σε αυτά που προέρχονταν από άγριους γεννήτορες με φυσική ωτοκία σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που είχαν ως προέλευση εκτρεφόμενους γεννήτορες οι οποίοι σιτίζονταν με σύμπηκτα (pellets) (Lund et al., 2008; Silversand et al., 1996). Επίσης, τα ωά γεννήτορων που εκτρέφονταν με διαφορετικά σιτηρέσια, ενώ εμφάνισαν διαφορές ως προς τα επίπεδα των λιπαρών οξέων και τη σύστασή τους, ωστόσο τα επίπεδα του DHA παρέμειναν μεταξύ τους συγκρίσιμα. Επιπλέον, η παρουσία του συσχετίζεται θετικά με τη γρήγορη ανάπτυξη των οπτικών και νευρικών ιστών, στους ιχθύς κατά τα νυμφικά στάδια (Tocher, 2010). Αυτά τα ευρήματα, συνηγορούν στον βασικό ρόλο που έχει το DHA στην ανάπτυξη των εμβρύων και των νυμφών, καθώς και την ύπαρξη μηχανισμών της φυσικής επιλογής ώστε να διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής (Tocher, 2010).

Σε όλα τα υπάρχοντα είδη ιχθύων, δύο είδη ενζύμων εμπλέκονται στη σύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων: οι Δ-λιπο-ακυλο-αποκορεσμάσες (Δ-LAA ή ΔFAD) και οι επιμηκυνάσες (ELOVL) (Monroig et al., 2011; Tocher, 2003). Η σύνθεση αρχίζει με τον αποκορεσμό (προσθήκη διπλών δεσμών) των απαραίτητων λιπαρών οξέων (ΑΛΟ ή ΕFΑ), όπως το α-λινολενικό οξύ (ΑLΑ) ή το λινολεϊκό οξύ (LΟΑ), τα οποία προέρχονται αποκλειστικά από τη δίαιτα, με τη δράση του ενζύμου Δ6LAA ή Δ6FAD. Στους ιχθύς των γλυκών υδάτων, η σύνθεση του DHA με ενδιάμεσο προϊόν το EPA επιτυγχάνεται με τη δράση των ενζύμων Δ6FAD και Δ5FAD, έχοντας ως αρχικό υπόστρωμα το ΑLΑ. Αντιθέτως, στους θαλάσσιους ιχθύς, η έλλειψη του ενζύμου Δ5FAD, προϊδεάζει για την απώλεια της ικανότητας σύνθεσης του DHA ως απόρροια της εξελικτικής προσαρμογής των θαλασσιών ιχθύων, λόγω της αφθονίας του DHA στο θαλάσσιο περιβάλλον και της εύκολης πρόσληψής του μέσω της τροφικής αλυσίδας. (Morais et al., 2012; Tocher, 2003). Ωστόσο, μόλις πρόσφατα, ενδείξεις για ένα εναλλακτικό βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης του DHA που περιλαμβάνει τη δράση των ενζύμων Δ4FAD και ELOVL5, ανακαλύφθηκε και ταυτοποιήθηκε στο συγγενικό είδος *Solea senegalensis*. Η σύνθεση του DHA γίνεται απευθείας παρουσία των δύο παραπάνω ενζύμων, έχοντας ως αρχικό υπόστρωμα το EPA (Bonacic et al., 2016; Morais, et al., 2015, 2014, 2012).

2.1.3 Στόχος εργασίας

Η “γλώσσα η κοινή”, είναι είδος στόχος για την Ευρωπαϊκή βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας, λόγω της υψηλής ζήτησης και της εμπορικής της αξίας. Επιπλέον, η υπεραλίευση που οδηγεί στην μείωση των αλιευτικών αποθεμάτων και η ανάγκη του κλάδου των υδατοκαλλιέργειών για επέκταση και αύξηση του μεριδίου της αγοράς με την εισαγωγή νέων ειδών, καθιστά το συγκεκριμένο είδος σημαντικό (Imsland et al., 2003; Parma et al., 2015; Bjørndal et al., 2016). Η παραγωγή γλώσσας εκτροφής παραμένει περιορισμένη και βασίζεται κυρίως σε άγριους αλιευμένους γεννήτορες (Lund et al., 2008) και λιγότερο σε γεννήτορες πρώτης γενιάς. Ειδικότερα, οι γεννήτορες πρώτης γενιάς παρουσιάζουν υψηλή μεταβλητότητα της ποσότητας και ποιότητας των παραγόμενων ωών, που είναι ένας από τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες της εκτροφής της γλώσσας. Πρόσφατα, οι Palstra et al., 2015, έδειξαν ότι είναι εφικτή η αναπαραγωγή γεννητόρων γλώσσας πρώτης γενιάς σε συνθήκες εκτροφής.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ενώ τα ομοιοτικά γονίδια στη διάρκεια της εξέλιξης απέκτησαν νέες λειτουργίες, η κινητήριος δύναμη της μορφογένεσης είναι κυρίως η ρύθμιση της γονιδιακής τους έκφρασης (Prince, 2002). Το παρόν κεφάλαιο εστιάζει στη μελέτη του προτύπου έκφρασης ορισμένων ομοιοτικών γονιδίων με σημαίνοντα ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη της γλώσσας. Σκοπός ήταν i) να εκτιμηθεί η χρονική συγγραμμικότητα, δηλαδή να καθοριστεί ο χρόνος έναρξης και η μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων του 3' άκρου, *hoxa1a*, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxb1a*, *hoxb1b* και του 5' άκρου, *hoxa13a*, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (0-96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και πριν την εκκόλαψη), ii) να εντοπιστούν πιθανές διαφορές στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ ομάδων (batches) ωών με διαφορετική προέλευση γεννητόρων, άγριων (P) και πρώτης γενιάς (G1), στις 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και iii) τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, *Δ4fad* και *elov15*, που εμπλέκονται στη σύνθεση του ακόρεστου λιπαρού οξέος, μακριάς αλυσίδας, DHA με υπόστρωμα το EPA, σε ωά 48 ωρών μετά τη γονιμοποίηση και σε νύμφες μιας ημέρας μετά την εκκόλαψη, με διαφορετική προέλευση γεννητόρων, P και G1.

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, οι δύο ομάδες γεννητόρων, P και G1, ήρθαν σε ωοτοκία σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, καλοκαίρι και χειμώνα, αντίστοιχα. Σκοπός ήταν η επιμήκυνση της περιόδου ωοτοκίας και η συνεχή παραγωγή ιχθυδίων καθ' όλο το έτος.

Η χρονική στιγμή, 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, επιλέχθηκαν ως σημείο αναφοράς και σύγκρισης των διαφορετικών ομάδων ωών, επειδή μετά τις 48 ώρες η θνησιμότητα είναι μηδενική και επιπλέον, σ' αυτή τη χρονική στιγμή ανιχνεύεται η έκφραση και των έξι προς εξέταση γονιδίων.

Τα πρότυπα έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων θα βοηθήσουν στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών της εμβρυϊκής ανάπτυξης της γλώσσας με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης εκτροφής της μέσω της ποσοτικής και ποιοτικής βελτίωσης των ωών. Η μείωση της θνησιμότητας και ο περιορισμός των ασθενειών και των δυσμορφιών των επόμενων αναπτυξιακών σταδίων, αλλά που οι αιτίες τους έχουν ως αφετηρία τα πρώιμα στάδια της ζωής, θα μειώσει το συνολικό κόστος παραγωγής του είδους καθιστώντας το ανταγωνιστικό και επικερδές (Bjørndal et al., 2016).

2.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Διαχείριση γεννητόρων

Τα δείγματα προήλθαν από δύο ομάδες γεννητόρων, μία ομάδα αποτελούμενη από άγριους, αλιευμένους γεννήτορες (P) και μια ομάδα με γεννήτορες πρώτης γενιάς (G1), που μεγάλωσαν σε συνθήκες εκτροφής. Αμφότερες οι ομάδες αποτελούνταν από $N_P=38$ και $N_{G1}=43$ άτομα με αναλογία θηλυκών : αρσενικών, 21:17 και 24:19, αντίστοιχα. Οι συνθήκες εκτροφής και ωοτοκίας ήταν όμοιες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε από τους Blonk et al. 2009. Για τους γεννήτορες P, η περίοδος ωοτοκίας διήρκησε από τον Ιούνιο μέχρι τα τέλη Αυγούστου του έτους 2014, ενώ για τους γεννήτορες G1, από τον Ιανουάριο μέχρι το Μάρτιο του έτους 2015. Για την ομάδα γεννητόρων P, καταγράφηκαν 32 ωοτοκίες και αντίστοιχα για την ομάδα G1, 35. Ως κριτήριο για την ποιότητα και βιωσιμότητα των ωών, χρησιμοποιήθηκε η ικανότητα να διατηρούν τη πλευστότητα τους. Για τα ωά που κατακρημνίζονται στον

πυθμένα, θεωρείται ότι έχει διακοπεί η ανάπτυξή τους και είναι νεκρά (Lund et al., 2008). Εκτός από την διαφορετική περίοδο ωτοκίας των δύο ομάδων γεννητόρων, οι συνθήκες μεταχείρισής τους, καθώς και οι συνθήκες εκκόλαψης των ωών, ήταν οι ίδιες.

2.2.2 Διαχείριση των ωών

Τρεις παρτίδες ωών που είχαν διατηρήσει την πλευστότητά τους από εκάστη ομάδα γεννητόρων, τοποθετήθηκαν σε κωνικές δεξαμενές εκκόλαψης 80 L, οι οποίες τροφοδοτούταν από κλειστό κύκλωμα ανακύκλωσης θαλασσινού νερού και σύστημα αερισμού. Το παρεχόμενο θαλασσινό νερό, αποστειρώθηκε με την εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας και η θερμοκρασία ορίστηκε και διατηρήθηκε στους 10 °C. Η εκκόλαψη ξεκίνησε στις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και ολοκληρώθηκε στις 120 ώρες για όλες τις ομάδες που εξετάστηκαν.

2.2.3 Δειγματοληψία ωών

Για τη μέτρηση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων κατά τα εμβρυϊκά στάδια και μέχρι την εκκόλαψή τους (0-96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση), μια ομάδα ωών προερχόμενη από την ωτοκία των άγριων γεννητόρων (P), χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέοντα ωά συλλέχθηκαν σε χρόνους 0, 6, 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Για κάθε χρονική στιγμή, έξι βιολογικές επαναλήψεις συλλέχθηκαν, καθεμιά από αυτές αποτελούταν από ομάδα (pool) τριών ωών. Όλα τα δείγματα εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό, τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια erpendorf που περιείχαν συντηρητικό διάλυμα RNAlater και διατηρήθηκαν στους -24 °C έως την απομόνωση του RNA.

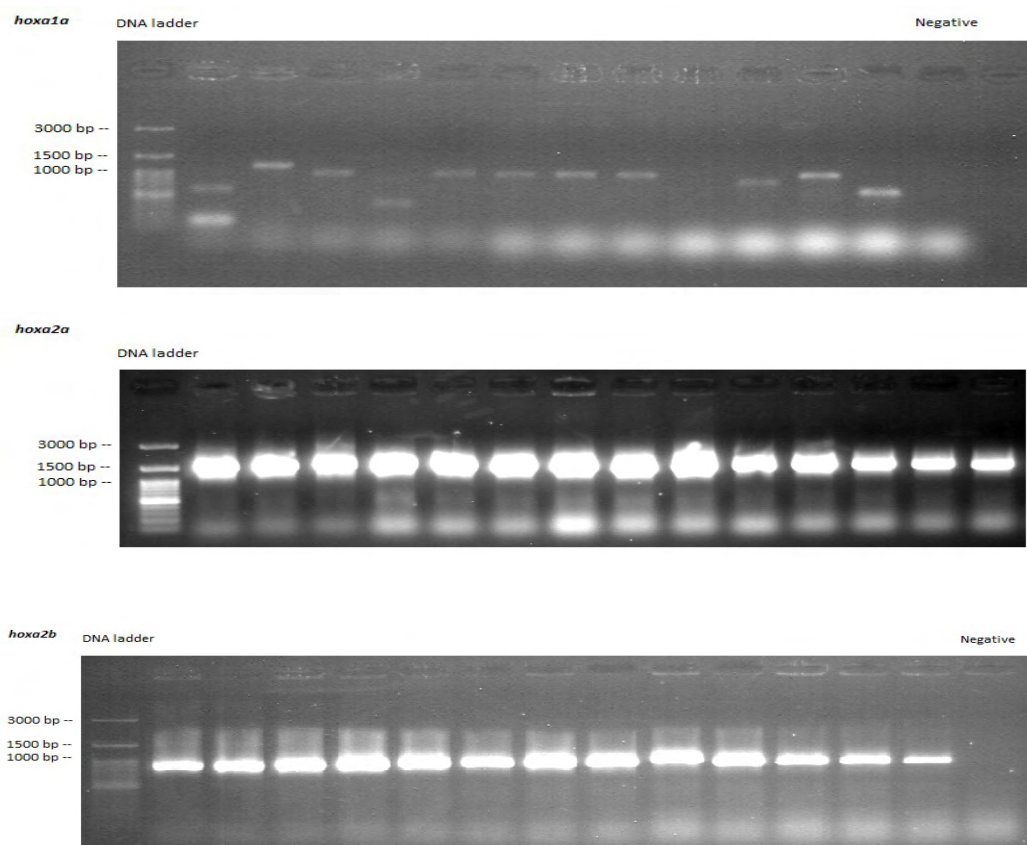
Για τη μελέτη σύγκρισης του προτύπου έκφρασης σε έμβρυα και νύμφες, των ομοιοτικών γονιδίων καθώς και των γονιδίων που συμμετέχουν στην σύνθεση του DHA, *hoxa1a*, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxb1a*, *hoxb1b*, *hoxa13a* και *Δ4fad*, *elov15*, αντίστοιχα, μεταξύ των δύο ομάδων γεννητόρων P και G1, συλλέχθηκαν τρεις βιολογικές επαναλήψεις. Για τη σύγκριση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων, συλλέχθηκαν έμβρυα 48 ωρών μετά τη γονιμοποίηση, ενώ για τα γονίδια, *Δ4fad* και *elov15*, εκτός από τα ωά των 48 ωρών συλλέχθηκαν επιπλέον και νύμφες μιας ημέρας μετά την εκκόλαψή τους. Κάθε

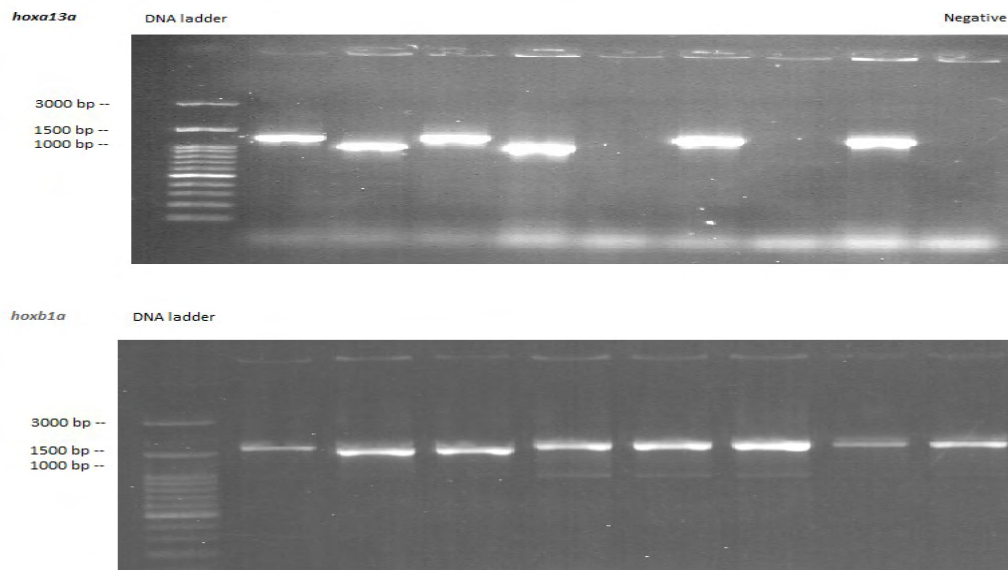
συλλεχθέν δείγμα περιείχε ομάδα τριών ωών ή τριών νυμφών, και ακολουθήθηκε η διαδικασία της προηγούμενης παραγράφου μέχρι την τελική απομόνωση του RNA.

2.2.4 Κλωνοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων

Λεπτομερώς η διαδικασία της κλωνοποίησης αναφέρεται εκτενώς στο **Κεφάλαιο 1.2.4**. Συμπληρωματικά αναφέρεται ότι μετά την ανάπτυξη των αποικιών, ακολούθησε PCR, τα προϊόντα των οποίων ελέγχθηκαν για το αναμενόμενο μέγεθος, σε πήκτωμα αγαρόζης, **Εικόνα 2.1**. Επιλέχθηκαν 10-20 αποικίες για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο, οι οποίες μετά την απομόνωση του πλασμιδίου, δόθηκαν για αλληλούχηση.

Εικόνα 2.1





Προϊόντα PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι αποικίες ελέγχθηκαν για την ένθεση του προϊόντος PCR με το αναμενόμενο μέγεθος σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα πλασμίδια με το κατάλληλο μέγεθος προϊόντων, όπως αναφέρεται στον **Πίνακα 1.1**, απομονώθηκαν και δόθηκαν για αλληλούχηση.

2.2.5 Απομόνωση-εξαγωγή RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από κάθε βιολογική επανάληψη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της σειράς αντιδραστηρίων, Nucleospin® TriPrep (MACHEREY- NAGEL), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσότητα και ποιότητα του εξαχθέντος RNA μετρήθηκε με τη χρήση της συσκευής φασματοσκοπίας NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, DE., USA) και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, αντίστοιχα.

2.2.6 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

Για την ποσοτική αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR), ένα νέο σύνολο εκκινητών σχεδιάστηκε. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, τα μήκη των προϊόντων και οι θερμοκρασίες υβριδισμού, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.1**. Για κάθε δείγμα, ποσότητα 500 ng ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA), με τη σειρά αντιδραστηρίων PrimeScript™ RT reagent kit (Perfect Real Time – Takara), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε τελικό όγκο 10μL και διαδοχική αραίωση στα 200 μL. Αρνητικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ενδεχόμενης επιμόλυνσης από γενωμικό DNA. Εκτός των βιολογικών επαναλήψεων,

για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις, ο μέσος όρος των οποίων χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων. Ο τελικός όγκος ανά αντίδραση ήταν 20 μ L, και περιείχε όγκο, 5 μ L cDNA, συγκέντρωση εκάστου εκκινητή, 2 μ M και όγκο, 10 μ L κύριου διαλύματος (master mix) της σειράς αντιδραστηρίων KAPA SYBER® FAST qPCR Master Mix (2X) Universal (KAPA BIOSYSTEMS). Ως υποψήφια γονίδια αναφοράς ελέγχθηκαν, η ουμπικουιτίνη (*ub*), η ριβοσωμική πρωτεΐνη S4 (*rps4*), ο παράγοντας επιμήκυνσης 1 άλφα (*Ef1a*) και η βήτα-ακτίνη (*beta-actin* ή *act-b*). Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη συσκευή Chromo4 Real time PCR (BioRad, Hercules, CA, USA) και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, με κύκλο δύο σταδίων, ορίστηκαν ως εξής: αρχικό στάδιο μετουσίωσης, 95 $^{\circ}$ C για 3 min, ακολούθησαν 35 κύκλοι αποτελούμενοι από ένα στάδιο μετουσίωσης στους 95 $^{\circ}$ C για 3 s, και ένα στάδιο υβριδισμού/επιμήκυνσης 20 s σε θερμοκρασία ανάλογη με το ζεύγος εκκινητών.

Μετά την ενίσχυση των μεταγράφων και για την επιβεβαίωση ύπαρξης ενός μοναδικού προϊόντος, εφαρμόστηκε η ανάλυση των καμπυλών τήξης, με βαθμιδωτή αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0,5 $^{\circ}$ C ανά 2 s, από τους 60 έως τους 90 $^{\circ}$ C, και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ένα και μοναδικό προϊόν επιβεβαιώθηκε μέσω της ομοιομορφίας των καμπυλών τήξης και του μοναδικού ίχνους στο πήκτωμα αγαρόζης. Το λογισμικό πρόγραμμα "Opticon Monitor" (BioRad), χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των κύκλων ποσοτικοποίησης (quantification cycles, Cq). Ο αλγόριθμος "Normfinder" (Andersen et al., 2004) εφαρμόστηκε για τον έλεγχο και την επιλογή του γονιδίου αναφοράς. Ως καταλληλότερο γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε η ριβοσωμική πρωτεΐνη S4 (*rps4*), επειδή παρουσίασε την πιο σταθερή έκφραση κατά τα εμβρυϊκά και νυμφικά στάδια σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία.

2.2.7 Στατιστικές αναλύσεις

Για τις περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις οι οποίες όμως δεν αφορούν στην εκτίμηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης, όλα τα δεδομένα σχετιζόμενα με τους κύκλους ποσοτικοποίησης (Cq), μετασχηματίστηκαν (autoscaled) σύμφωνα με τον (Kubista et al., 2006). Οι ομοιότητες των προτύπων έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων,

σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές (0, 6, 24, 48, και 96 ωρών μετά τη γονιμοποίηση), εκτιμήθηκε μέσω της ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) και σχεδιάστηκε το αντίστοιχο δενδρόγραμμα με τη μέθοδο της απλής συνένωσης (single linkage) και της απόστασης Pearson. Επιπλέον, λόγω της καταγραφής υψηλών συντελεστών συσχέτισης (correlation coefficients) και χαμηλής τιμής της ορίζουσας του πίνακα συσχέτισης (correlation determinant) και με σκοπό να εκτιμήσουμε την εξάρτηση (dependency) και το βαθμό οργάνωσης της χρονικής έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων, δύο χρονικά διαστήματα, από 24 έως 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και από 48 έως 96 ώρες, επιλέχθηκαν, και αντίστοιχα, τρία κριτήρια συσχέτισης εξετάστηκαν (Halkos & Tsilika, 2018): Η ορίζουσα του πίνακα συσχέτισης, ο συντελεστής διόγκωσης της διακύμανσης (Variance Inflation factor, VIF) και έλεγχο συγγραμμικότητας (collinearity diagnostics) με τον υπολογισμό του αριθμού κατάστασης (condition number). Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) για τη σύγκριση των προτύπων έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων με προέλευση τους γεννήτορες P και G1. Ως χρόνος, επιλέχθηκαν οι 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, επειδή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή εκφράζονται όλα τα υπό εξέταση ομοιοτικά γονίδια και επιπλέον η εμβρυϊκή θνησιμότητα πέραν αυτού του χρονικού σημείου, είναι μηδαμινή. Για τη ανάλυση κυρίων συνιστωσών, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο Minitab (version 14, Minitab Ltd, Coventry, UK). Αντίστοιχα, για τις στατιστικές αναλύσεις συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (version 23, IBM, New York, USA). Για την μέτρηση της σχετικής γονιδιακής έκφρασης, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό REST 2009 (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl et al., 2002).

Πίνακας 2.1

Οι αλληλουχίες για το σχεδιασμό των εκκινητών, θερμοκρασίες υβριδισμού και μέγεθος προϊόντων PCR για τα ζεύγη εκκινητών qPCR

Target gene / GenBank Accession number	Primer's name	Priming sequences (5' – 3')	Product length (bp)	T (°C) annealing
<i>hoxa1a</i> / KX235355	qPCR-hoxA1aF qPCR-hoxA1aR	GCTTGTTGTTACCTCTGTCT CCTGACCTGCCTGTCTTTG ²	95	61.4
<i>hoxa2a</i> / KX235356	qPCR-hoxA2aF qPCR-hoxA2aR	ACCTGCCAACCTCCACTG CCACTGCTCTCCTCGATCTC	88	61.4
<i>hoxa13a</i> / KX235358	qPCR-hoxA13aF qPCR-hoxA13aR	TGCTGCCTATGGAGACTTAC CACCGTGTCTGGTATGGA ²	125	59.4
<i>hoxa2b</i> / KX235357	qPCR-hoxA2bF qPCR-hoxA2bR	CTGACTCCTCTCCGCTCTAC GTTGGTGTAGGCAGTCTCA	98	61.4
<i>hoxa1a</i> / KX235359	qPCR-hoxB1aF qPCR-hoxB1aR	CCGCCAAGACAGTGAAG ² TTGCTGAAGTGGAACTCCTT	119	60.2
<i>hoxa1b</i> / unigene360987 ¹	qPCR-hoxB1bF qPCR-hoxB1bR	GGATTCAGAGCATGTGGAGGAAGT ACGGCTGTTTTCCGGAGGATTTCT ²	78	59.4
<i>Δ4fad</i> / unigene345003 ¹	qPCR-Δ4fadF qPCR-Δ4fadR	ACCAGCATCAACACCAGTA TAGCAGTAGAAGTAGCGAAGATAA	154	61.4
<i>elovl5</i> / unigene32360 ¹	qPCR-elovl5F qPCR-elovl5R	TGAACTGGATACCCTGCGGC ACGGCTGGGATGGCAGAG	103	61.4
<i>act-b</i> / unigene224282 ¹	qPCR-act-bF qPCR-act-bR	GCATCACACCTTCTACAA ACATAATCTGGGTCATCTTC ²	113	60.0
<i>ef1a</i> / HM246511 ¹	qPCR-ef1aF qPCR-ef1aR	TCGGAGTCAACAAGATGGA CAGAGATGGGCACAAAGG	135	60.0
<i>rps4</i> / GAAQ01019940	qPCR-rps4F qPCR-rps4	CCGGAGGTGCTAACTTGGGT TGTGCTGTCTTGACGTGGA	92	60.2
<i>ubq</i> / GAAQ01003061	qPCR-ubqF qPC-RubqR	CGATGAGACCACCACGCAGA GACGCACACTGTCCGACTAC	78	60.2

¹ Accession number of Solea DB, (*Solea solea* v1.0) http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/soleadb_ifapa/

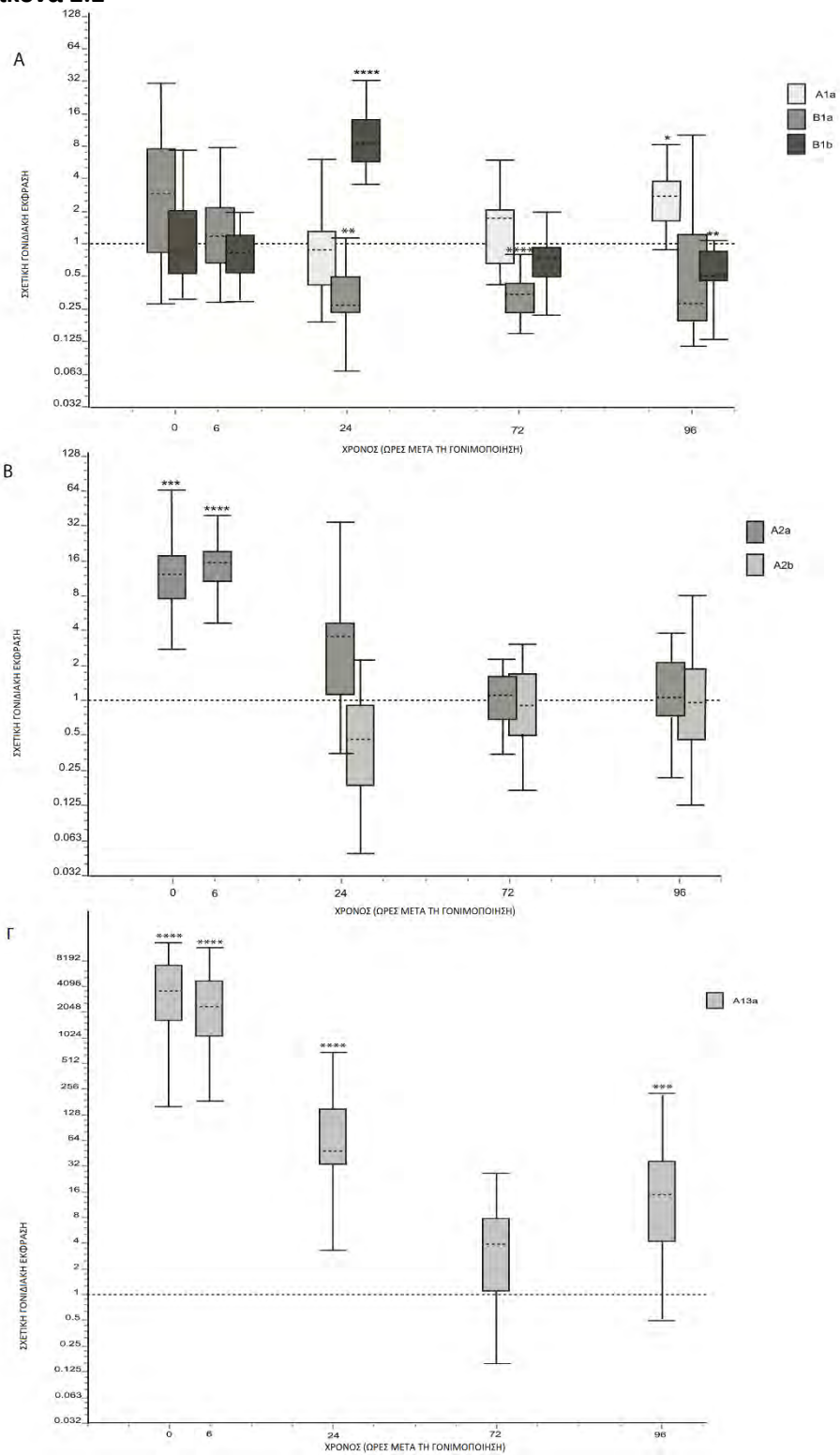
²Primers are designed to the exons' boundaries

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1 Χρονική έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων σε έμβρυα με προέλευση τους γεννήτορες P.

Η έκφραση του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa1a* ανιχνεύτηκε σε μετρήσιμα επίπεδα για πρώτη φορά στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και παρέμεινε σταθερή έως και τις 48 ώρες. Μια σημαντική αύξηση της έκφρασης παρατηρήθηκε στη συνέχεια με τη μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (**Εικόνα 2.2A**). Αντίθετα, το *hoxa2a* φαίνεται να εκφράζεται ήδη από τις 0 ώρες, αλλά μια σημαντική κάμψη στην έκφρασή του παρατηρήθηκε στην χρονική περίοδο μέχρι και τις 48 ώρες (**Εικόνα 2.2B**). Όπως το *hoxa1a*, η έκφραση του *hoxa2b* μετρήθηκε σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και οι μεταβολές στην έκφρασή του μέχρι και τις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, δεν μεταβλήθηκαν στατιστικώς σημαντικά (**Εικόνα 2.2A & B**). Αξιοσημείωτη ήταν η έκφραση του *hoxa13a* ήδη από την αρχή, στις 0 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, που ακολουθήθηκε από σημαντική πτώση μέχρι και τις 48 ώρες. Σημαντική αυξορρύθμιση εμφάνισε για το χρονικό διάστημα, από 48 έως και 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (**Εικόνα 2.2Γ**). Αναφορικά με το ομοιοτικό γονίδιο *hoxb1a*, το χρονικό πρότυπο έκφρασής του παρουσίασε σημαντική μείωση στις 24 και 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, συγκρινόμενο με την έκφραση των 48 ωρών, ενώ για τις 0 ώρες, το επίπεδο έκφρασής του ήταν παρόμοιο με αυτό των 48 ωρών (**Εικόνα 2.2A**). Το δενδρόγραμμα που σχεδιάστηκε σύμφωνα με την ανάλυση κατά συστάδες, παρουσίασε τρεις ξεχωριστές ομάδες, σύμφωνα με τα χρονικά πρότυπα έκφρασης όλων των ομοιοτικών γονιδίων (**Εικόνα 2.3**). Ομοιότητες στα πρότυπα έκφρασης παρατηρήθηκαν μεταξύ 0 και 6, μεταξύ 24 και 96, και μεταξύ 48 και 72 ωρών μετά τη γονιμοποίηση.

Εικόνα 2.2



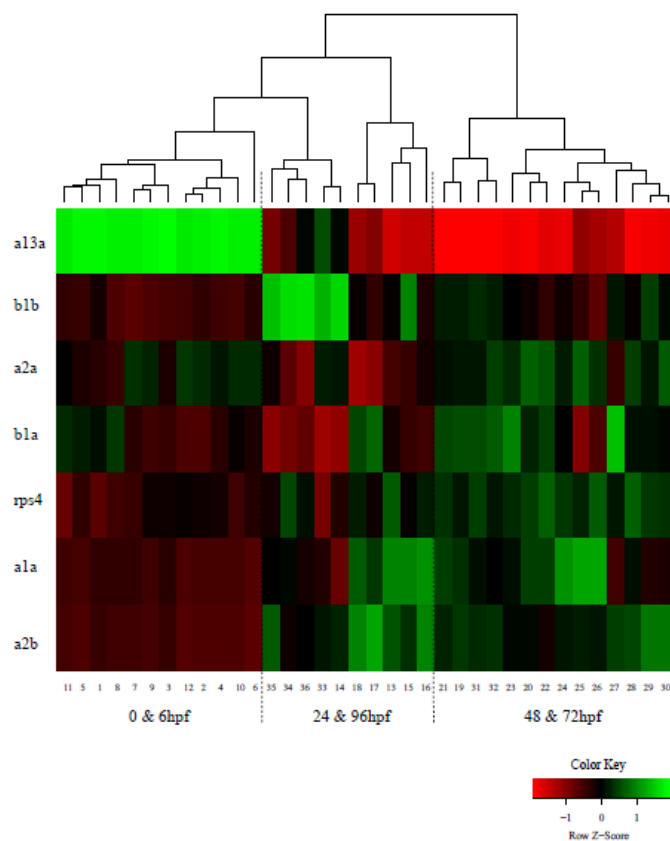
Α: PG1 (*hoxa1a*, *hoxb1a* & *hoxb1b*) σχετική γονιδιακή έκφραση ως προς τις 48 hpf (0-96hpf)

Β: PG2 (*hoxa2a* & *hoxa2b*) σχετική γονιδιακή έκφραση ως προς τις 48 hpf (0-96hpf)

Γ: *hoxa13a* σχετική γονιδιακή έκφραση ως προς τις 48 hpf (0-96hpf)

Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει τις 48 ώρες

Εικόνα 2.3



Ανάλυση των παρατηρήσεων ανά συστάδες (οι μετρήσεις των δειγμάτων παρουσιάζονται στον Χ άξονα). Τρεις διαφορετικές ομάδες σχηματίστηκαν. Ομοιότητες των προτύπων έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων παρουσιάστηκαν μεταξύ των παρατηρήσεων 0 και 6 hpf, 24 και 96 hpf, 48 και 72 hpf.

Αναφορικά με την έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων για το χρονικό διάστημα 24-96 ωρών μετά τη γονιμοποίηση, υψηλή συσχέτιση (συντελεστές συσχέτισης $>0,7$) μεταξύ ζευγών ομοιοτικών γονιδίων παρατηρήθηκε με εξαίρεση το *hoxa13a* (**Πίνακας 2.2Α**). Ο **Πίνακας 2.2Β** παρουσιάζει τις τιμές του συντελεστή διόγκωσης διακύμανσης (VIF) οι οποίες είναι μεγαλύτερες του 10, και κατά συνέπεια δηλώνει συγγραμμικότητα στην έκφραση για τα γονίδια: *hoxa2a*, *hoxa2b* και *hoxb1a*. Αντίστοιχα, από τον **Πίνακα 2.2 Γ**, που περιγράφει συνοπτικά τον έλεγχο συγγραμμικότητας, φαίνεται ότι τα γονίδια *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxb1b* και οριακά το *hoxb2a* βρίσκονται υπό σοβαρή γραμμική εξάρτηση (severe linear dependency). Αυτό συμβαίνει γιατί στην τελευταία σειρά του πίνακα εμφανίζονται τιμές $>0,50$ που αντιστοιχούν σε τιμή δείκτη ή αριθμού

κατάστασης (condition index or number) = 15,60 Επιπλέον, τιμές της ορίζουσας του πίνακα συσχέτισης >0,0001 δηλώνει μη σοβαρό πρόβλημα συγγραμμικότητας, ενώ στα αποτελέσματά μας, η αντίστοιχη τιμή είναι 0,0000103. Αντίστοιχα, για το χρονικό διάστημα 48-96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Πίνακας 2.2Α',Β',Γ'), υψηλότερη τιμή για το δείκτη κατάστασης (32,8) και υψηλότερες τιμές του δείκτη VIF, για όλα τα ομοιοτικά γονίδια εκτός του *hoxa13a*, καθώς και χαμηλότερη τιμή για την ορίζουσα του πίνακα συσχέτισης ($17 \cdot 10^{-7}$), παρατηρήθηκαν.

Πίνακας 2.2. Στατιστικοί έλεγχοι της χρονικής έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων. Α: πίνακας των συντελεστών συσχέτισης της έκφρασης των *hox* γονιδίων για περίοδο 24-96 hpf, Α': πίνακας των συντελεστών συσχέτισης της έκφρασης των *hox* γονιδίων για περίοδο 48-96 hpf, Β: Τιμές VIF, Β': Τιμές VIF για την περίοδο 48-96 hpf, Γ: Έλεγχος συγγραμμικότητας για την περίοδο 24-96 hpf, Γ': Έλεγχος συγγραμμικότητας για την περίοδο 48-96 hpf.

2.2 A: 24-96 hpf						A': 24-96 hpf						
1,000						a1a	1,000					
0,899	1,000					a2a	0,951	1,000				
0,898	0,911	1,000				a2b	0,866	0,963	1,000			
0,502	0,685	0,556	1,000			b1a	0,719	0,756	0,772	1,000		
0,860	0,850	0,950	0,405	1,000		b1b	0,768	0,882	0,933	0,577	1,000	
0,664	0,877	0,711	0,730	0,674	1,00	a13a	0,908	0,973	0,984	0,719	0,929	1,00
a1a	a2a	a2b	b1a	b1b	a13a	a1a	a2a	a2b	b1a	b1b	a13a	

2.2 B: 24-96 hpf				B': 24-96 hpf			
	Sig.	Collinearity Statistics			Sig.	Collinearity Statistics	
		Tolerance	VIF			Tolerance	VIF
(Constant)	0,000			(Constant)	0,000		
Zscore(a1a)	0,000	0,111	9,047	Zscore(a1a)	0,163	0,041	24,666
Zscore(a2a)	0,326	0,035	28,237	Zscore(a2a)	0,495	0,017	57,511
Zscore(a2b)	0,348	0,041	24,210	Zscore(a2b)	0,371	0,009	114,374
Zscore(a13a)	0,612	0,311	3,215	Zscore(a13a)	0,576	0,182	5,494
Zscore(b1a)	0,568	0,063	15,766	Zscore(b1a)	0,307	0,078	12,894
Zscore(b1b)	0,004	0,115	8,688	Zscore(b1b)	0,118	0,012	82,498

2.2 Γ: 24-96 hpf

Dimension	Eigenvalue	Condition index	Variance Proportions						
			Constant	Zscore (a1a)	Zscore (a2a)	Zscore (a2b)	Zscore (a13a)	Zscore (b1a)	Zscore (b1b)
1	4,767	1,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
2	1,000	2,183	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,784	2,466	0,00	0,01	0,00	0,00	0,22	0,01	0,02
4	0,242	4,440	0,00	0,05	0,00	0,01	0,35	0,00	0,27
5	0,150	5,641	0,00	0,35	0,02	0,04	0,08	0,11	0,00
6	0,039	11,095	0,00	0,37	0,31	0,26	0,24	0,38	0,09
7	0,020	15,598	0,00	0,22	0,67	0,69	0,10	0,49	0,61

2.2 Γ': 48-96 hpf

Dimension	Eigenvalue	Condition index	Variance Proportions						
			Constant	Zscore (a1a)	Zscore (a2a)	Zscore (a2b)	Zscore (a13a)	Zscore (b1a)	Zscore (b1b)
1	5,258	1,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,000	2,293	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,462	3,375	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,04	0,00
4	0,221	4,877	0,00	0,10	0,00	0,00	0,09	0,07	0,00
5	0,037	11,077	0,00	0,14	0,02	0,05	0,10	0,84	0,06
6	0,017	17,632	0,00	0,15	0,64	0,00	0,02	0,00	0,22
7	0,005	32,800	0,00	0,60	0,33	0,95	0,42	0,05	0,72

2.3.2 Σύγκριση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων μεταξύ εμβρύων διαφορετικής προέλευσης

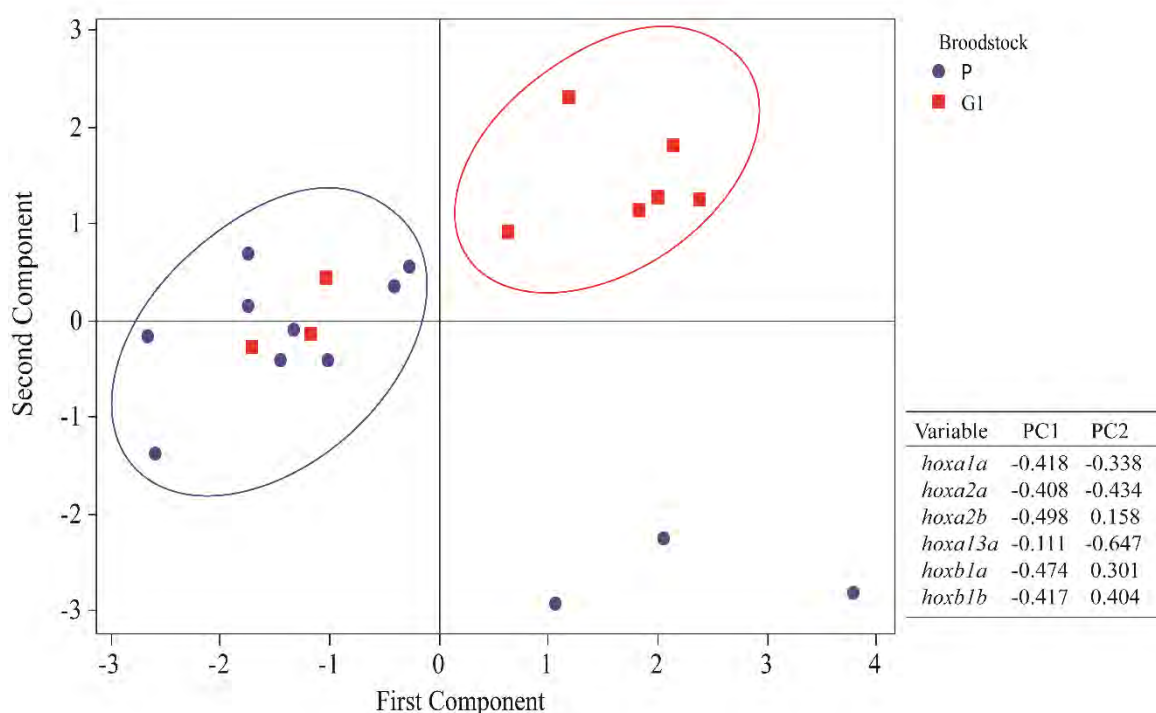
Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών, της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων στις 48 ώρες, μεταξύ δύο ομάδων ωών με διαφορετική προέλευση, P και G1, κατέδειξε μεταξύ τους διαχωρισμό (**Εικόνα 2.4**). Η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει το 57,9% της συνολικής διακύμανσης, ενώ η δεύτερη, το 32,8%. Οι εκτιμώμενες συσχετίσεις (reproduced correlations) κατέδειξαν μικρά κατάλοιπα (residues) για όλα τα ζεύγη των ομοιοτικών γονιδίων, με εξαίρεση το ζεύγος *hoxa1a* – *hoxa13a*. Τα ομοιοτικά γονίδια *hoxb1a*, *hoxb1b* και *hoxa2b*, είχαν θετική συνεισφορά στην πρώτη, κύρια συνιστώσα, ενώ τα υπόλοιπα, *hoxa1a*, *hoxa2a* και *hoxa13a*, στη δεύτερη.

Η σύγκριση κατά ζεύγη της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων (**Πίνακας 2.3**), στις 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, μεταξύ των ομάδων ωών με την ίδια προέλευση (P ή G1), έδειξε ότι η ομάδα με προέλευση τους γεννήτορες P, παρουσίασε περισσότερες

στατιστικώς σημαντικές διαφορές, που αφορούσαν σχεδόν σε όλα τα γονίδια, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxa13a*, *hoxb1a* και *hoxb1b*. Οι αντίστοιχες ομάδες με προέλευση τους γεννήτορες G1, έδειξαν μια πιο σταθερή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων, με εξαίρεση τα γονίδια *hoxa1a*, *hoxa2b* και *hoxb1b*. Ειδικότερα, τις ισχυρότερες μεταβολές στην έκφραση ($p < 0,005$), καταγράφηκαν για την ομάδα P, και αφορούσαν στα γονίδια *hoxa13a*, *hoxb1a* και *hoxb1b*.

Επιπρόσθετα, η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων P και G1, κατέδειξε την αυξορρύθμιση της έκφρασης των *hoxb1a* και *hoxb1b* στην ομάδα G1 (Εικόνα 2.5).

Εικόνα 2.4



Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών του προτύπου της γενετικής έκφρασης των γονιδίων *hox* στις 48 hpf: Δύο ξεχωριστές ομάδες (P & G1). Η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει το 57,9% της συνολικής διακύμανσης, ενώ η δεύτερη, το 32,8%.

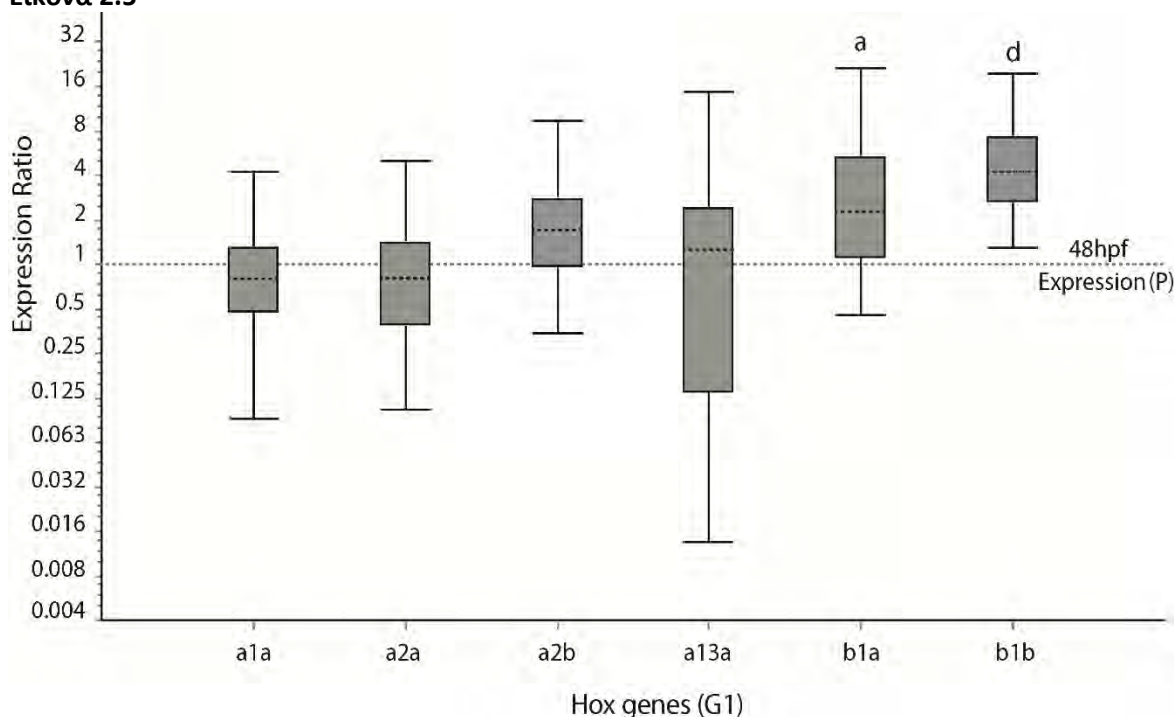
Πίνακας 2.3

Σύγκριση ανά ζεύγη παρτίδων του προτύπου έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων ανά προέλευση (P ή G1)

	Batches	<i>hoxa1a</i>	<i>hoxa2a</i>	<i>hoxa2b</i>	<i>hoxa13</i>	<i>hoxb1a</i>	<i>hoxb1b</i>
P	1 vs 2	↗1,638	↘1,415	↘3,333*	↘1,103	↘3,234**	↘1,913*
	1 vs 3	↗2,937	↗3,352*	↘3,191*	↗31,409***	↘9,249***	↘4,572***
	2 vs 3	↗1,753	↗4,743	↗1,097	↗34,629	↘2,86****	↘2,442****
G1	1 vs 2	↗1,063	↘1,225	↗1,345	↘1,304	↗1,311	↗1,183
	1 vs 3	↘1,637*	↘1,577	↘1,192	↘2,498	↗1,529	↗1,839*
	2 vs 3	↗1,741	↗1,208	↗1,603*	↗1,916	↘1,116	↘1,555*

(*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,005$, (****) $P < 0,001$

P: Άγριοι, G1: Πρώτης γενιάς

Εικόνα 2.5

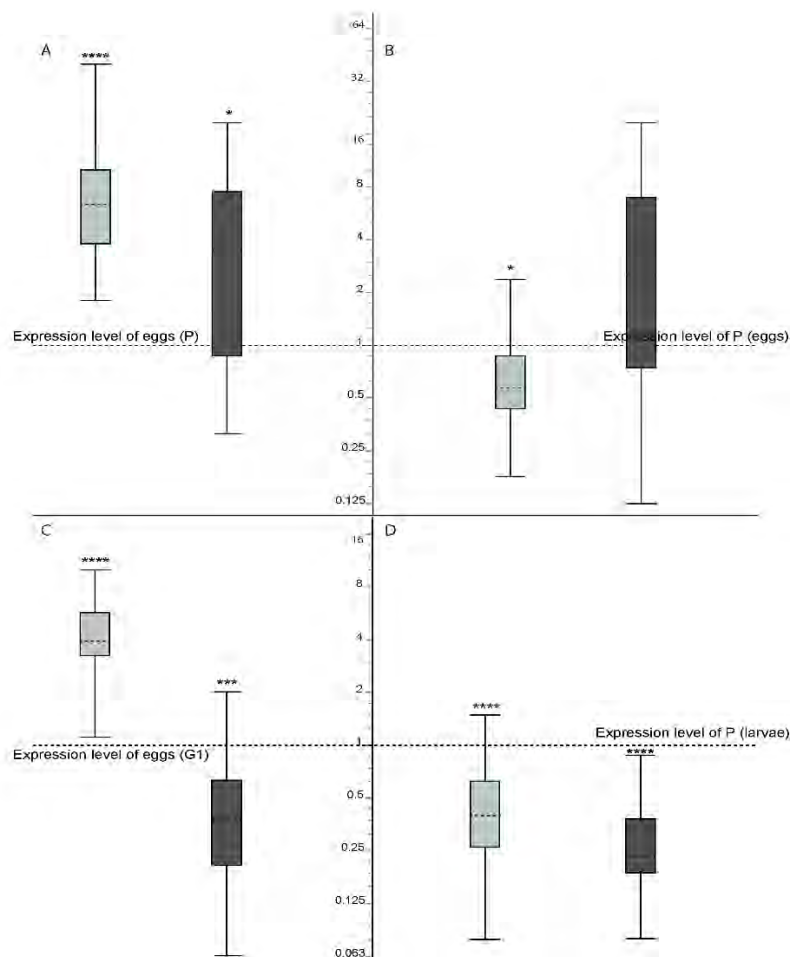
Σχετική γονιδιακή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων μεταξύ εμβρύων με διαφορετική προέλευση (P και G1) στις 48hpf. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει το επίπεδο έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων στα έμβρυα με προέλευση τους γεννήτορες P. (a) $P < 0,05$, (d) $P < 0,005$. 2.3.4 Η έκφραση των Δ4 λιπο-ακυλ-αποσατουράσης (Δ4fad) και επιμυκηνάσης (elov15)

Η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση του DHA, έδειξε ότι είναι παρόμοια στα έμβρυα με διαφορετική προέλευση (P ή G1), όταν αυτή μετρήθηκε σε δείγματα 48 ωρών μετά τη γονιμοποίηση (Εικόνα 2.6B). Ωστόσο, αναφορικά με την έκφραση των παραπάνω γονιδίων σε σύμφες μιας ημέρας μετά την εκκόλαψη, έδειξαν

αμφότερες οι γονιδιακές τους εκφράσεις να αυξορρυθμίζονται σε αυτές με προέλευση τους γεννήτορες P (Εικόνα 2.6D).

Η αντίστοιχη σύγκριση μεταξύ εμβρύων και νυμφών, ξεχωριστά για κάθε ομάδα γεννητόρων, έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές (Εικόνα 2.6A, C). Η έκφραση του γονιδίου *Δ4fad*, αυξορρυθμίζεται στις νύμφες σε σχέση με τα έμβρυα, και στις δύο περιπτώσεις, P και G1, ενώ αυτή του γονιδίου *elov15*, αυξορρυθμίζεται στις νύμφες P και μειορρυθμίζεται στις αντίστοιχες G1.

Εικόνα 2.6



Σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των: *Δ4fad* (ανοιχτό χρώμα) and *elov15* (σκούρο χρώμα). A: P, ωά vs νύμφες, B: Ωά, P vs G1, C: G1, ωά vs νύμφες D: Νύμφες, P vs G1. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,005$, (****) $P < 0,001$

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σημαντική παράμετρος στην καλλιέργεια της γλώσσας (*Solea solea*), είναι η ποιότητα των ωών και νυμφών με προέλευση από αλιευμένους άγριους γεννήτορες και μετατοπισμένες χρονικά περιόδους ωοτοκίας για λόγους μαζικής παραγωγής σε όλη τη διάρκεια του έτους. Η μετατόπιση χρονικά της περιόδου ωοτοκίας, προϋποθέτει την εκτροφή γεννητόρων σε ελεγχόμενες συνθήκες. Κατάλληλοι υποψήφιοι γεννήτορες αυτού του είδους, είναι άτομα τα οποία έχουν μεγαλώσει εξολοκλήρου σε συνθήκες εκτροφής, ήδη από τα νυμφικά στάδια. Η παραγωγή σταθερής ποιότητας ωών και νυμφών από αυτούς τους γεννήτορες παραμένει ακόμα ένα σοβαρό πρόβλημα. Τα χαρακτηριστικά της ποιότητας των ωών αφορούν παραμέτρους όπως, το ποσοστό γονιμοποίησης, το μέγεθος του ωού, η εμβρυϊκή και νυμφική θνησιμότητα, η φυσιολογική ανάπτυξη κ.α. (Lund et al., 2008; Vallin & Nissling, 2000). Τελευταία, επετεύχθη η αναπαραγωγή ατόμων πρώτης γενιάς, εκτρεφόμενων εξολοκλήρου στην αιχμαλωσία και προερχόμενα από άγριους γεννήτορες (Palstra et al., 2015). Με σκοπό να ανιχνεύσουμε διαφορές στην ανάπτυξη εμβρύων γλώσσας με διαφορετική προέλευση, από άγριους γεννήτορες ή από γεννήτορες πρώτης γενιάς, εξετάσαμε το πρότυπο έκφρασης δύο κατηγοριών γονιδίων: τα ομοιοτικά γονίδια (*hoxa1a*, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxa13a*, *hoxb1a* & *hoxb1b*, που σχετίζονται με το σχέδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης, με έμφαση στο τελεγκέφαλο και στη νωτιαία χορδή, και σε γονίδια που σχετίζονται με την σύνθεση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας (LC-PUFA), όπως το DHA, τα *Δ4fad* και *elovl5*.

2.4.1 Χρονική έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων

Η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων *hoxa2a*, *hoxb1a*, *hoxb1b* & *hoxa13a*, ανιχνεύτηκε ήδη από τα πρώτα στάδια (0 ώρες μετά τη γονιμοποίηση), ενώ η έκφραση των υπολοίπων, *hoxa1a* & *hoxa2b*, μετρήθηκε από τις 24 ώρες. Η ανίχνευση του *hoxa13a* ήδη από τους πρώτους χρόνους, φαίνεται να αποκλίνει από το πρότυπο έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων που αναφέρει πως τα ομοιοτικά γονίδια του 5' άκρου, εκφράζονται αργότερα από τα αντίστοιχα του 3' άκρου (Gaunt, 2015) ή ενδεχομένως τα μετάγραφα να έχουν μητρική προέλευση, όπως ισχυρίζονται οι

(Jakovlić & Wang, 2016), σε εργασία που αφορούσε το *Megalobrama amblycephala*. Ωστόσο τα χαμηλά επίπεδα σε έμβρυα 72 ωρών και η ακόλουθη αυξορρύθμιση στις 96 ώρες, φαίνεται να ακολουθεί το σύνθητες πρότυπο έκφρασής του. Η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων είναι μια δυναμική διαδικασία με συνεχείς χρονικές και τοπικές μεταβολές, η οποία μπορεί να διαφοροποιηθεί ακόμα και στο ίδιο μεταμερές (Krumlauf, 1994). Συνήθως, τα αρχικά πρότυπα έκφρασης, μεταβάλλονται χρονικά και χωρικά όσο εκτυλίσσονται τα στάδια της εμβρυϊκής μορφογένεσης (Graham et al., 1991). Η δράση των ομοιοτικών γονιδίων ρυθμίζει όλα τα στάδια της ανάπτυξης και λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: κατά το πρώτο στάδιο της εδραίωσής τους, πρωτεϊνικά σηματοδοτικά μόρια, που καλούνται μορφογόνα, μέσω της χωρικής βαθμίδωσης της συγκέντρωσής τους επιτυγχάνουν την κατά τόπους ρύθμιση συγκεκριμένων ομοιοτικών γονιδίων. Κατά το δεύτερο στάδιο, της διατήρησής τους, εμπλέκεται ο μηχανισμός ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της χρωματίνης, γνωστός και ως μηχανισμός αλληλεπίδρασης του πολυσυνδυαστικού συμπλόκου πρωτεϊνών (Polycomb, Pc) και της ομάδας πρωτεϊνών του τριθώρακος (Trithorax, Trx) (Gaunt, 2015).

Οι στατιστικές αναλύσεις, που βασίζονται στους πίνακες συσχέτισης (correlation matrices), στις τιμές του συντελεστή διόγκωσης διακύμανσης (VIF), και στον έλεγχο συγγραμμικότητας (collinearity test), και αναφορικά με το πρότυπο έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων για δύο χρονικές περιόδους, 24-96 και 48-96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, κατέδειξαν ισχυρή συσχέτιση και συντονισμό μεταξύ όλων εκτός του *hoxa13a*, ιδιαίτερα για τη δεύτερη χρονική περίοδο, 48-96 ώρες. Επιπλέον η ανάλυση κατά συστάδες, για την συνολική εμβρυϊκή περίοδο, έδειξε ότι τα πρότυπα έκφρασης είναι χωρισμένα σε τρεις ομάδες. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων είναι εξαιρετικά συγχρονισμένη και το πρότυπό τους μεταβάλλεται στο χρόνο ως εξής: 1) παρόμοιο πρότυπο έκφρασης έχουν τα δύο πρώτα στάδια των 0 και 6 ωρών, 2) για τις 24 ώρες το πρότυπο φαίνεται να διαφοροποιείται, 3) ενώ τα πρότυπα έκφρασης στις 48 και 72 ώρες εμφανίζουν την ίδια τάση, 4) τέλος το πρότυπο έκφρασης των 96 ωρών φαίνεται να επιστρέφει σε αυτό που παρατηρήθηκε στις 24 ώρες.

Στο *Mus musculus* και στον *Xenopus laevis*, τρία γονίδια της παράλογης ομάδας 1 έχουν ταυτοποιηθεί, *hoxa1*, *hoxb1* και *hoxd1*, ενώ στους τελεόστεους ο αριθμός τους ποικίλει. Στο *Oryzias latipes* και στο *Tetraodon nigroviridis*, επίσης τρία γονίδια της παράλογης ομάδας 1 έχουν ταυτοποιηθεί, *hoxa1a*, *hoxb1a* και *hoxb1b*. Στο *Danio rerio* ένα επιπλέον είναι παρόν, το *hoxc1a*, ενώ στο σολομό έχουν εντοπιστεί εννιά λειτουργικά (Mungprakdee et al., 2008). Το πρότυπο έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων της παράλογης ομάδας 1, της γλώσσας, είναι παρόμοιο με αυτό του *Danio rerio*, των οποίων η έκφραση των *hoxb1a* και *hoxb1b* εκκινεί στις 8 και 9 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, αντίστοιχα, ενώ η έκφραση του *hoxa1a* στις 20 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Prince, 2002; McClintock et al., 2001; Prince et al., 1998). Είναι αξιοσημείωτο γεγονός ότι στον ιχθύ ζέβρα, τα *hoxb1a* και *hoxb1b* έχουν παρόμοιους ρόλους με τα *hoxb1* και *hoxa1* στο *Mus musculus*. Το *hoxb1a* εκφράζεται στο τέταρτο ρομβομερές (r4) του τελεγκέφαλου, ενώ το *hoxb1b* είναι απαραίτητο για την οργάνωση του τελεγκέφαλου σε τομείς (segments) (McClintock et al., 2002). Αντίθετα, η αργότερη έκφραση του *hoxa1a* εντοπίστηκε στον πρόσθιο τελεγκέφαλο (r1-r3) και στην κοιλιακή περιοχή του μεσεγκέφαλου, υπονοώντας κατάλοιπο από ένα αρχέγονο χαρακτηριστικό (McClintock et al., 2002). Επιπλέον, στον ιχθύ ζέβρα, η πρωτεΐνη Meis3 συνεργάζεται με την ομοιοτική πρωτεΐνη HoxB1b για την ενεργοποίηση στον τελεγκέφαλο την έκφραση των πρωτεϊνών HoxB1a και Krox20 (Schulte & Frank, 2014). Πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης αμφότερων *hoxb1a* και *hoxb1b* ομοιοτικών γονιδίων, οδηγούν σε συρρίκνωση ή σε έλλειψη των ρομβομερών r4 και r5 (McClintock et al., 2001).

Σχετικά με το πρότυπο έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων της παράλογης ομάδας 2 στη γλώσσα, τα δύο γονίδια, *hoxa2a* και *hoxa2b*, παρουσίασαν διαφορετικούς χρόνους ενεργοποίησης, αλλά η έκφρασή τους εμφάνισε το ίδιο μοτίβο από τις 48 έως τις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στους τελεόστεους, η δράση των παράλογων ομάδων 2 είναι σημαντικός παράγοντας τόσο για την ανάπτυξη του τελεγκέφαλου όσο και των φαρυγγικών τόξων (PA). Ο αριθμός των γονιδίων της παράλογης ομάδας 2 καθώς και τα πρότυπα έκφρασής του διαφέρουν σημαντικά από είδος σε είδος ακόμα και στα πιο συγγενικά, υποδηλώνοντας μια όχι και τόσο ξεκάθαρη

λειτουργία τους (Le Pabic et al., 2010; Davis et al., 2008; Le Pabic et al., 2007; Scemama et al., 2006, 2002; Hunter & Prince, 2002; Prince, et al., 1998). Στην παρούσα εργασία αποδείξαμε την ύπαρξη και δράση τουλάχιστον δύο μελών της παράλογης ομάδας 2, των *hoxa2a* και *hoxa2b*, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη της γλώσσας.

Στο *Oreochromis niloticus* και στο *Morone saxatilis*, έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια της παράλογης ομάδας 2, *hoxa2a*, *hoxa2b* και *hoxb2a*, από τα οποία το *hoxa2a* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των φαρυγγικών τόξων. Στον ιχθύ ζέβρα, το *hoxa2a* απουσιάζει, ενώ αμφότερα *hoxa2b* και *hoxb2a* εμφανίζουν διαφορετικές λειτουργίες ως προς τα ορθόλογά τους (Le Pabic et al., 2010). Η παρατηρούμενη διαφορετική γονιδιακή σύσταση της παράλογης ομάδας 2, ακόμα και σε στενώς συγγενικά είδη, είναι η περίπτωση όπου γονίδια μιας παράλογης ομάδας αποκλίνουν γενετικά, με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται το πρότυπο έκφρασής τους με συνέπεια να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

Η πρώιμη ανίχνευση του *hoxa13a* ήδη από τα πρώτα στάδια (0-12 hpf), καταγράφηκε στην παρούσα εργασία, η έκφραση του οποίου μειορρυθμίστηκε σημαντικά στις 6, 24 και 48 hpf. Αντίστοιχα δεδομένα της ποσοτικής αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης, στον ιχθύ ζέβρα, έδειξε ότι σε πολύ πρώιμα στάδια (6-18 hpf), η έκφραση του *hoxa13a* δεν ήταν ανιχνεύσιμη. Αντίθετα, πλήρης έκφραση του καταγράφηκε στην αναπτυσσόμενη ουρά και στα θωρακικά πτερύγια στις 24 και 48 hpf (Ahn & Ho, 2008). Το *hoxa13a* είναι μέλος της παράλογης ομάδας 13 και μαζί με τα υπόλοιπα γονίδια των ομάδων 9, 10, 11 και 12, εκφράζονται αργότερα και σε περισσότερο οπίσθια μέρη των εμβρύων των σπονδυλωτών τα οποία είναι απαραίτητα για τον σχεδιασμό των άκρων, της ουράς, των θωρακικών πτερυγίων, και γενετικών οργάνων (Casaca et al., 2014; Neijts et al., 2014; Crow et al., 2009; Ahn & Ho, 2008; Takamatsu et al., 2007; Thummel et al., 2004; Carpenter, 2002; Deschamps et al., 1999). Στον ιχθύ ζέβρα, η αποσιώπηση του *hoxa13a* έδειξε φαινοτυπικές αποκλίσεις όπως, κάμψη της ουράς, μειωμένο ή απόντα λεκιθικό σάκο, επιμήκυνση και μικροκεφαλία (Crow et al., 2009). Στα σπονδυλωτά, τα πρόσθια μέρη σχηματίζονται νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη η οποία συνεχίζει να εκτείνεται από την οπίσθια ζώνη ανάπτυξης, οδηγώντας έτσι στην επιμήκυνση του σώματος μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Ο Neijts 2014 ισχυρίστηκε ότι τα ομοιοτικά γονίδια της παράλογης ομάδας 13 είναι υποψήφια για την επιβράδυνση της κατά μήκος αύξησης με επακόλουθο τον τερματισμό της οπίσθιας ανάπτυξης. Η πρόωρη έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων της παράλογης ομάδας 13, είναι γνωστό ότι διαταράσσει την ανάπτυξη της οπίσθιας ζώνης, κατά τα εμβρυϊκά στάδια, ως συνέπεια της ιεραρχικής κυριαρχίας των γονιδίων της παράλογης ομάδας 13 εις βάρος των υπολοίπων γονιδίων που βρίσκονται εγγύτερα στο 3' άκρο (Neijts et al., 2014). Εναλλακτικά, η πρόωρη ανίχνευση μεταγράφων του *hoxa13a* στο ζυγωτό, ενδεχομένως να είναι μητρικής προέλευσης, όπως παρατηρήθηκε στο *Megalobrama amblycephala* και αντίστοιχα για το *hoxc12a*, στο *Danio rerio*, υποδηλώνοντας έναν τελείως διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης των ομοιοτικών γονιδίων και ένα διαφορετικό ρόλο στον εμβρυϊκό σχεδιασμό κατά μήκος του προσθοπίσθιου άξονα (Jakovlić & Wang, 2016; Thummel et al., 2004).

2.4.2 Σύγκριση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων στις 48 hpf μεταξύ P και G1 γεννητόρων

Η σύγκριση ανά ζεύγη, ομάδων ωών με την ίδια προέλευση γεννητόρων, έδειξε σημαντικά πιο έντονες διαφορές στην έκφρασή τους για την ομάδα με προέλευση τους P γεννήτορες σε σχέση με την ομάδα των G1 γεννητόρων. Οι διαφορές αυτές ήταν εντονότερες στα *hoxb1a* και *hoxb1b*, ενώ ηπιότερες μεταβολές αφορούσαν και στα υπόλοιπα ομοιοτικά γονίδια.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σχετικής γονιδιακής έκφρασης, μεταξύ εμβρύων με διαφορετική προέλευση γεννητόρων, P και G1, παρατηρήθηκαν διαφορές, διαχωρίζοντας τις δύο ομάδες ως προς την έκφραση των γονιδίων *hoxb1a* και *hoxb1b*, τα οποία εμφάνισαν αυξορρυθμισμό στην ομάδα των εμβρύων G1. Επιπλέον, η ανάλυση κυρίων συνιστωσών περιέγραψε ικανοποιητικά το διαχωρισμό και την κατάταξη των δειγμάτων στις δύο ομάδες P και G1. Η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων *hoxb1a*, *hoxb1b* και *hoxa2b* φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην κατάταξη και ομαδοποίηση των εμβρύων στις κατηγορίες P και G1. Όπως προαναφέρθηκε, τα γονίδια της παράλογης ομάδας 1 συμμετέχουν στις αναπτυξιακές διαδικασίες του τελεγκέφαλου, καθώς και στην ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων της παράλογης

ομάδας 2. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η μελέτη του προτύπου έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό των ων γλώσσας λόγω της προέλευσής τους, από γεννήτορες P ή G1.

2.4.3 Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας (LC-PUFA)

Όπως έχει προηγουμένως καταγραφεί, στο είδος *Solea senegalensis* (Bonacic et al., 2016; Morais et al., 2015, 2014, 2012), η καινοφανής δράση της Δ4 λιπο-ακυλ-αποσατουράσης, υποδηλώνει τη σύνθεση του DHA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το EPA. Ομοίως, στην παρούσα εργασία έχει καταγραφεί η δράση του παραπάνω ενζύμου και για το είδος, *Solea solea*. Τα ωά της γλώσσας με προέλευση γεννητόρων P και G1, παρουσιάζουν έκφραση του ενζύμου της Δ4 λιπο-ακυλ-αποσατουράσης η οποία αυξορρυθμίζεται στις νύμφες της μιας ημέρας μετά την εκκόλαψη (dph) και για τις δύο ομάδες. Αντίστοιχα, η έκφραση του γονιδίου της επιμηκυνάσης (*elov15*), εμφάνισε αυξορρυθμισμό στις νύμφες με προέλευση τους γεννήτορες P, ενώ μειορρυθμίστηκε στις νύμφες G1. Ωστόσο, η σύγκριση της έκφρασης των δύο ενζύμων μεταξύ ων των δύο ομάδων, έδειξε ότι δε διαφέρουν σημαντικά. Σημαντική μειορρυθμισμό αμφότερων των γονιδίων παρατηρήθηκε κατά τη σύγκριση νυμφών με διαφορετική προέλευση στην ομάδα G1.

Είναι αξιοσημείωτο ότι στα ωά της γλώσσας της Σενεγάλης, παρατηρήθηκε η έκφραση μόνο του γονιδίου της επιμηκυνάσης, ενώ η έκφραση της αποσατουράσης έλαβε χώρα αποκλειστικά στις νύμφες (Morais et al., 2012). Προηγούμενες μελέτες κατέγραψαν ότι και στα δύο είδη γλώσσας, η σύσταση σε DHA και EPA στα ωά, παραμένει αμετάβλητη στις άρτι εκκολαφθείσες νύμφες (Morais et al., 2012; Lund et al., 2008; Lund, 2007). Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφραση της αποσατουράσης στις νύμφες, είναι ένδειξη της υψηλής ζήτησης σε DHA, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των πρώτων σταδίων. Τα πρώτα στάδια χαρακτηρίζονται από γρήγορη ανάπτυξη και την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, προετοιμάζοντας τον οργανισμό για τα επόμενα στάδια της μεταμόρφωσης (Bonacic et al., 2016; Hauville et al., 2015; Morais et al., 2012). Αμφότερα τα λιπαρά οξέα, DHA & EPA, μπορούν να αξιοποιηθούν

είτε ως πηγές ενέργειας (Tocher, 2003) είτε ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης με επίπτωση στον μεταβολισμό (Jump, 2004).

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες, το προφίλ των λιπαρών οξέων των ωών μεταξύ άγριων γεννητόρων και γεννητόρων πρώτης γενιάς ξεχωρίζει σαφώς τις δύο ομάδες και επομένως φαίνεται να είναι μια πολύ ακριβής μέθοδος για το διαχωρισμό και ταυτοποίηση της προέλευσης των ωών. Το προφίλ των λιπαρών οξέων και στις δύο κατηγορίες είναι σταθερά διαφορετικό κατά την περίοδο της ωοτοκίας. Επιπλέον, η συνολική σύσταση σε λιπαρά οξέα (TFA) ή το προφίλ είναι παρόμοια σε παρτίδες ωών με υψηλή ή χαμηλή βιωσιμότητα που προέρχονται από άγριους γεννήτορες. Αυτό δείχνει ότι η σύσταση σε λιπαρά οξέα στα ωοκύτταρα μπορεί να παραμείνει σχετικά ανεπηρέαστη από παράγοντες όπως τη χαμηλή πρόσληψη τροφής ή την καταπόνηση λόγω αιχμαλωσίας και συνεπώς η σύσταση των λιπαρών οξέων καθορίζεται πριν την περίοδο ωοτοκίας. Επίσης, και τα επίπεδα του DHA παραμένουν σταθερά, εντός ορίων που διαφοροποιούνται από είδος σε είδος. Έτσι, στο καλκάνι και στην κοινή γλώσσα, τα επίπεδα του DHA ήταν σχεδόν παρόμοια μεταξύ ωών με προέλευση άγριους ή εκτρεφόμενους γεννήτορες (Lund et al., 2008; Tocher, 2003). Επιπλέον, οι Parma et al. 2015, έδειξαν ότι στην κοινή γλώσσα, τα επίπεδα του DHA διατηρούνται σημαντικά σε σχέση με το EPA και ότι το διατροφικό status πριν και κατά τη διάρκεια της λεκιθογένεσης (vitellogenesis) είναι σημαντικό για τον καθορισμό της σύστασης των ωών της γλώσσας σε λιπαρά οξέα. Το γεγονός ότι η έκφραση της αποσατουράσης παρατηρήθηκε μόνο στα ωά της *Solea solea* και όχι στη *Solea senegalensis*, ενδεχομένως να υποδηλώνει την μεγαλύτερη ανάγκη για DHA, είτε ως πηγή ενέργειας είτε ως ρυθμιστή της γονιδιακής έκφρασης της εμβρυογένεσης της κοινής γλώσσας (Parma et al., 2015; Morais et al., 2014, 2012; Lund et al., 2008).

Τέλος, η έκφραση των ενζύμων της αποσατουράσης και επιμηκυνάσης στη κοινή γλώσσα, προσδιορίστηκε κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων ανάπτυξης των εμβρύων και των νυμφών. Οι σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση τους μεταξύ εμβρύων των 48 hpf και άρτι εκκολαφθεισών νυμφών υποδηλώνουν υψηλότερες απαιτήσεις για DHA στα νυμφικά στάδια απ' ό,τι στα εμβρυϊκά. Το βιοχημικό μονοπάτι της Δ4 αποσατουράσης και της επιμηκυνάσης 5, που χρησιμοποιεί

ως αρχικό υπόστρωμα το EPA, ενεργοποιείται με σκοπό τη σύνθεση / συσώρευση των κατάλληλων ποσοτήτων DHA που είναι αναγκαία για την εμβρυϊκή ή νυμφική ανάπτυξη (Morais et al., 2012). Μεγαλύτερη ενεργοποίηση της σύνθεσης DHA με την αυξορρύθμιση της έκφρασης των παραπάνω ενζύμων, παρατηρήθηκε στις νύμφες με προέλευση τους γεννήτορες P. Ενώ σε επίπεδο εμβρύων οι δύο ομάδες παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης, εντούτοις σε επίπεδο νυμφών, φαίνεται να διαφοροποιούνται σημαντικά.

2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Όπως έδειξαν ο Palstra et al, 2015, οι εκτρεφόμενοι ιχθύες πρώτης γενιάς μπορούν να αναπαραχθούν επιτυχώς. Στην παρούσα εργασία, έχει παρουσιαστεί ότι η πρόωρη έκφραση του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa13a*, ενδεχομένως να επιτελεί σημαντικό ρόλο που να οδηγεί στην πρόωρη διακοπή της ανάπτυξης των εμβρύων της γλώσσας οδηγώντας σε υψηλή θνησιμότητα ή απλώς τα μετάγραφα να είναι μητρικής προέλευσης. Παρουσιάστηκε επίσης ότι η έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων της παράλογης ομάδας 1 της γλώσσας ήταν παρόμοια με την έκφραση στον ιχθύ ζέβρα, και ότι τα γονίδια *hoxa2a* και *hoxa2b* είναι μέλη της παράλογης ομάδας 2. Επιπρόσθετα, σημαντικές διαφορές στην έκφραση των *hoxb1a* και *hoxb1b* παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο ομάδων εμβρύων με διαφορετική προέλευση γεννητόρων, P και G1. Ένα νέο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης DHA, που περιλαμβάνει τα ένζυμα Δ4 λιπο-ακυλο-αποσατουράση και επιμηκυνάση 5 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο είδος *Solea solea*, η ενεργοποίηση του οποίου καταγράφηκε τόσο σε εμβρυϊκό επίπεδο, όσο και σε νυμφικό. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση παραγόντων που επηρεάζουν το πρότυπο έκφρασης των προρρηθέντων ομοιοτικών γονιδίων της εργασίας. Τα παρόντα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι το έναυσμα για την κατανόηση των μοριακών και βιοχημικών διαδικασιών, που εμπλέκονται στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ποιότητας των ωών και της μείωσης της εμβρυϊκής θνησιμότητας, κυρίως μέσω της επιλεκτικής αναπαραγωγής και των πρωτοκόλλων εκτροφής, λόγω του γεγονότος ότι γενετικοί παράγοντες και περιβάλλον επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση. Οι τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς

δίνουν νέες δυνατότητας και προοπτικές για μια πιο ολιστική διερεύνηση των γονιδιακών δικτύων που ενεργοποιούνται κατά τα διαφορετικά, πρώιμα, στάδια ανάπτυξης. Προς αυτή τη κατεύθυνση, η περαιτέρω εξέταση-σύγκριση των μεταγραφωμάτων μεταξύ εμβρύων που προέρχονται από διαφορετικές ωτοκίες θα βοηθήσει την κατανόηση των σημαντικών γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο με απώτερο σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής και τη μείωση του κόστους εκτροφής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Οπτική Απεικόνιση των Προτύπων της Γονιδιακής Έκφρασης. Μια Υπολογιστική Προσέγγιση με CAS Λογισμικό

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη διάρκεια των ετών, οι βάσεις επιστημονικών δεδομένων και μετρήσεων από τη θεωρητική τους σύλληψη μέχρι σήμερα, εξελίχθηκαν από μικρά αρχεία κειμένου και γραφικές αναπαραστάσεις, σε οπτικές απεικονίσεις, και σήμερα περιλαμβάνουν γενετικές βάσεις που αφορούν κυρίως στα γονιδιώματα και στο μεταγραφώματα των ζωικών οργανισμών.

Ο όγκος της πληροφορίας που μας παρέχουν οι τεχνολογίες νέας γενιάς και η πολυπλοκότητα του ίδιου του φαινομένου της ζωής, λόγω των ιδιοτήτων των νουκλεϊκών οξέων και του υψηλού επιπέδου πολυπλοκότητας που παρατηρείται (γενετικού ή φαινοτυπικού), απαιτεί μια ολιστική προσέγγιση για την κατανόηση και ερμηνεία των βιολογικών φαινομένων.

Μια σειρά υπολογιστικών προσεγγίσεων έχει εφαρμοσθεί σε βιολογικά δεδομένα για να διευκολυνθεί η ανάλυση τους και να επιτευχθεί μια πιο προσιτή και διαισθητική χρήση τους. Οι προσεγγίσεις αυτές χρησιμοποιούν μεγάλη ποικιλία από γλώσσες προγραμματισμού, λογισμικά πακέτα, διαδικτυακές εφαρμογές. Ενδεικτικά αναφέρονται οι Perl (Lang et al., 2015), Python (Bohler et al., 2015), PHP και Java (Koch et al., 2015), FuncTree (Uchiyama et al., 2015). Η υπολογιστική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση του Mathematica αναφέρεται βιβλιογραφικά από τους Allen 2013 & Vilar & Saiz 2010.

Γραφικές απεικονίσεις προτύπων γονιδιακής έκφρασης και γονιδιακών δικτύων έχουν αναφερθεί από τους (Uchiyama et al., 2015), (Lang et al., 2015), (Koch et al., 2015), (Bohler et al., 2015). Απεικονίσεις σχετικές με βιολογικά δεδομένα παρουσιάζονται από τους (Fails et al., 2006). Μια σειρά από απεικονίσεις με τις ίδιες σχηματικές αναπαραστάσεις που χρησιμοποιούνται στην παρούσα ενότητα, για ένα

πλήθος εφαρμογών που δεν σχετίζονται με το βιολογικό τομέα, έχουν παρουσιαστεί στις εργασίες: (Halkos & Tsilika, 2014, 2015, 2016).

Το παρόν κεφάλαιο εστιάζει στην οπτικοποίηση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης και συγκεκριμένα δεδομένων qRT-PCR. Η μέθοδος της οπτικής απεικόνισης εφαρμόζεται σε μεταγραφικά δεδομένα (transcriptional data) με σκοπό την εξαγωγή και/ή να επαλήθευση και πληρέστερης απεικόνισης/αναπαράστασης των συμπερασμάτων της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης. Ο απώτερος στόχος είναι ο εύκολος και οπτικός εντοπισμός των διαφορών μεταξύ πολύπλοκων μοριακών προτύπων γονιδιακής έκφρασης που προκύπτουν κυρίως από τη σύγκριση διαφορετικών μεταχειρίσεων. Γι' αυτό το λόγο, δημιουργήθηκε ένα υπολογιστικό πλαίσιο για την εισαγωγή των μεταγραφικών δεδομένων στη διεπιφάνεια (interface) ενός συστήματος υπολογιστικής άλγεβρας (CAS λογισμικού) και ακολούθησε η επεξεργασία τους μέσω μιας ποιοτικής προσέγγισης. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, χρησιμοποιήθηκε ένα κυρίαρχο CAS λογισμικό, το Mathematica, όπου τα μεταγραφικά δεδομένα, συγκεκριμένα οι μέσες τιμές C_t , μετατράπηκαν σε στατικές και δυναμικές εικόνες επιδεχόμενες βιολογικής ερμηνείας. Ειδικότερα, στο υπολογιστικό περιβάλλον του Mathematica, δημιουργήθηκαν επαναλαμβανόμενα στερεότυπα αποτελούμενα από πολύχρωμα πλαίσια που αναπαριστούν την ένταση της γονιδιακής έκφρασης. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργήθηκε μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για τη σύνθεση και παρουσίαση δεδομένων qRT-PCR. Οι προγραμματιστικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν διαμόρφωσαν τρία διαφορετικά απεικονιστικά σχήματα: i) στατικές εικόνες της έκφρασης των γονιδίων μεμονωμένα, ως οπτικό ζητούμενο, ii) οπτικές αναπαραστάσεις με συγκριτικό χαρακτήρα με δυνατότητα διάδρασης από τον χρήστη και, iii) αριθμητική παράθεση των δεδομένων χρησιμοποιώντας τις δυναμικές επιλογές απεικόνισης του Mathematica.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από μέρος των πειραματικών μετρήσεων του προηγούμενου κεφαλαίου (2.2.6 & 2.3.1). Τα υπολογιστικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται, οπτικοποιούν συγκρίσεις της γονιδιακής έκφρασης με δυνατότητες ελέγχου των παραμέτρων όπως π.χ. η προέλευση ωτοκίας (P ή G1). Η παρούσα ποιοτική προσέγγιση των δεδομένων επιτυγχάνει ξεκάθαρες

οπτικές συγκρίσεις γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των μεταχειρίσεων, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Το παρόν κεφάλαιο εξετάζει δύο μελέτες περιπτώσεων. Στην **πρώτη μελέτη περίπτωσης** (Ενότητα 2.2.6 & 2.3.2) γίνεται οπτική σύγκριση της έκφρασης των έξι ομοιοτικών γονιδίων σε έμβρυα (ωά) με διαφορετική προέλευση (P ή G1) στις 48 ώρες μετά την ωοτοκία. Στη **δεύτερη μελέτη περίπτωσης** (Ενότητα 2.2.6 & 2.3.1), εξετάζεται το οπτικό πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς, με την προσθήκη αυτή τη φορά της χρονικής έκφρασης στις 32 και 56 ώρες μετά την ωοτοκία, καθώς και το οπτικό πρότυπο της έκφρασης των έξι ομοιοτικών γονιδίων σε χρόνους 32, 48 και 56 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στη δεύτερη μελέτη περίπτωσης, στα δεδομένα (τιμές C_t) έγινε επιπλέον επεξεργασία σύμφωνα με (Kubista et al., 2006)

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ & ΔΕΔΟΜΕΝΑ

3.2.1 Περιγραφή των δεδομένων

3.2.1.1 1^η Μελέτη Περίπτωσης (1st Case Study)

Στην παρούσα μελέτη, τα δεδομένα, όπως περιγράφονται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο (2.2.6 & 2.3.2), αφορούν έξι διαφορετικές παρτίδες ωοτοκίας (ωά), τρεις (παρτίδες) ανά ομάδα γεννητόρων (P & G1), του είδους *Solea solea*. Έξι γονίδια στόχοι της οικογένειας *hox* (*a1a*, *a2a*, *a2b*, *a13a*, *b1a*, & *b1b*) που σχετίζονται με τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου απομονώθηκαν και η έκφρασή τους εκτιμήθηκε 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι ομάδες ωοτοκίας των γεννητόρων G1, συμβολίζονται με: «5», «7», «9», και αντίστοιχα τα οι ομάδες των γεννητόρων P, συμβολίζονται με: «E», «E2», «E3».

3.2.1.2 2^η Μελέτη Περίπτωσης (2nd Case Study)

Ομοίως, τα πειραματικά δεδομένα αντλούνται από το προηγούμενο κεφάλαιο (2.2.6 & 2.3.1). Στην ανάλυση των δεδομένων συμπεριλήφθηκαν και αξιοποιήθηκαν στους υπολογισμούς, οι χρόνοι 32 και 56 ώρες μετά την ωοτοκία. Για την οπτικοποίηση των προτύπων της έκφρασης τόσο των τεσσάρων γονιδίων αναφοράς (β-ακτίνη *act-b*, παράγοντας επιμήκυνσης 1α *ef1a*, ριβοσωμική πρωτεΐνη S4, *rps4* και ουμπικουιτίνη *ub*)

για χρόνους, 0, 6, 24, 32, 48, 56, 72, 96 ώρες μετά την ωστοκία, όσο και για την έκφραση των έξι ομοιοτικών γονιδίων (*hoxa1a*, *a2a*, *a2b*, *a13a* *b1a* & *b1b*), χρησιμοποιήθηκαν προσαρμοσμένης (autoscaled data) και μη-προσαρμοσμένης (unscaled ή raw data) κλίμακας δεδομένα (Kubista et al., 2006). Για τιμές C_t μεγαλύτερες του 30, που είναι η χαμηλότερη τιμή εμφάνισης διμερισμού των εκκινητών (primer-dimer), η γονιδιακή έκφραση ορίστηκε ίση με το μηδέν.

3.2.2 Μέθοδοι

Το πρώτο βήμα της υπολογιστικής προσέγγισης που ακολουθείται, είναι η μεταφόρτωση των πειραματικών δεδομένων. Τα πειραματικά δεδομένα τοποθετούνται σε μια σειρά από πίνακες διαστάσεων $1 \times n$ (πίνακες γραμμής), όπου (n) το πλήθος των παρατηρήσεων. Κάθε κελί του πίνακα παριστάνει τη μέση τιμή C_t των τριών τεχνικών επαναλήψεων που αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Οι συναρτήσεις του Mathematica δημιουργούν γραφικά αποτελέσματα, στα οποία, τα κελιά των πινάκων εμφανίζονται ως έγχρωμα ή μαυρόασπρα στοιχεία με διακριτή σειρά.

Στα μαυρόασπρα στιγμιότυπα, το άσπρο χρώμα των στοιχείων συμβολίζει την απουσία γονιδιακής έκφρασης ενώ η γκρι σκίαση με τη βαθμίδωση των αποχρώσεων της δηλώνει διάφορα επίπεδα, με τα σκουρόχρωμα να αντιστοιχούν σε υψηλότερες τιμές. Για παράδειγμα, ο πίνακας (0, 500, 1000, 10000), απεικονίζεται με τη βοήθεια της συνάρτησης ArrayPlot του Mathematica με το γραφικό της **Εικόνας 3.1**.

Εικόνα 3.1. Βαθμίδωση σε άσπρο-μαύρο

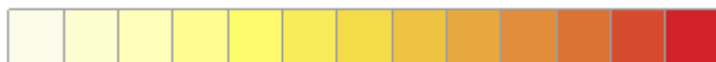


Οπτικοποίηση ενός πίνακα γραμμής (row matrix) (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13)

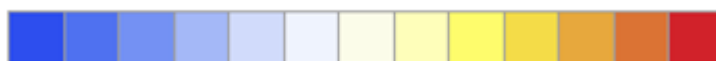
Εναλλακτικά, μπορούμε να δημιουργήσουμε έγχρωμα στιγμιότυπα χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση MatrixPlot, όπου το κάθε έγχρωμο στοιχείο

δηλώνει/αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Στο χρωματικό πρότυπο που αντιστοιχεί σε κάθε μεταχείριση, ένα ανοιχτόχρωμο στοιχείο δηλώνει/αντιπροσωπεύει χαμηλή έκφραση του γονιδίου ενώ στοιχεία με πιο έντονα χρώματα δηλώνουν συγκριτικά υψηλότερη έκφραση του γονιδίου (**Εικόνα 3.2 A & B**).

Εικόνα 3.2. Χάρτης θερμοκρασίας, χρωματική βαθμίδωση



(A) Οπτικοποίηση ενός πίνακα γραμμής (row matrix) (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,1)



(B) Οπτικοποίηση ενός πίνακα γραμμής (row matrix) (-6,-5,-4,-3,-2,-1,0,1,2,3,4,5,6)

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.3.1 1η Μελέτη Περίπτωσης (1st Case Study)²

Οι κώδικες που ακολουθούν έχουν γραφεί στη γλώσσα προγραμματισμού του Mathematica (v. 10). Με την εισαγωγή τους στο περιβάλλον του Mathematica επιτυγχάνεται η καταγραφή των δεδομένων qRT-PCR καθώς και η μετατροπή των τιμών που συνδέονται με κάθε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης (C_t τιμές) σε κατάλληλες αποχρώσεις χρωμάτων ή του γκρι.

Τα δεδομένα της μελέτης περίπτωσης που εξετάζεται εισάγονται σε πίνακες γραμμή με επτά κελιά: πρόκειται για τις τιμές C_t από τις E , E2 , E3 , 5 , 7 , 9 γραμμές του **Πίνακα 3.1**. Στην εσωτερική αναπαράσταση του Mathematica, πρόκειται για μεταβλητές που ορίζονται από τον χρήστη ως εξής:

$e:=\{27.7,26.4,23.99,29.17,24.52,22.29,18.22\};$

² The first case study has been included in the Wolfram Library Archive <http://library.wolfram.com/infocenter/Articles/9384/> for its application of Wolfram Technology (Subject: Science > Biology)

$e2:=\{25.98,24.35,23.7,26.12,24.62,20.55,16.46\};$

$e3:=\{28.29,25.39,26.93,24.11,28.24,24.9,19.46\};$

$n5:=\{29.68,27.6,25.27,28.99,26.03,21.94,19.93\};$

$n7:=\{27.61,24.95,23.43,26.19,24.71,19.93,17.79\};$

$n9:=\{30.57,27.75,25.87,29.32,25.69,21.1,19.74\};$

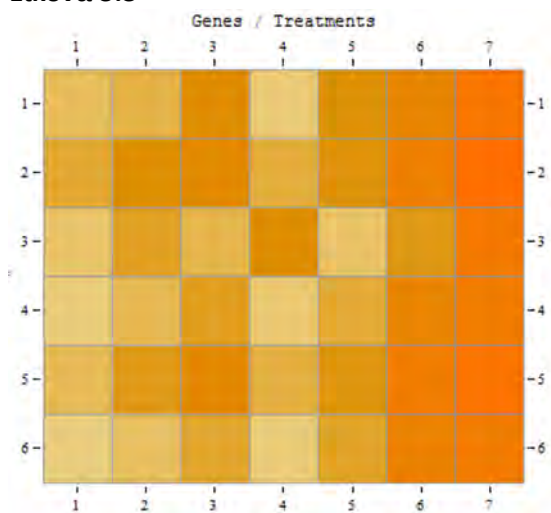
Πίνακας 3.1

	<i>a1a</i>	<i>a2a</i>	<i>a2b</i>	<i>a13a</i>	<i>b1a</i>	<i>b1b</i>	Αναφοράς: <i>rps4</i>
E	27,70	26,40	23,99	29,17	24,52	22,29	18,22
E2	25,98	24,35	23,70	26,54	24,62	20,86	16,46
E3	28,29	25,39	26,93	24,11	28,24	24,90	19,46
5	29,68	27,60	25,27	28,55	26,03	21,94	19,93
7	27,61	24,95	23,43	25,84	24,71	19,93	17,79
9	30,06	27,75	25,87	29,32	25,69	21,10	19,74

Τιμές C_i των ομοιοτικών γονιδίων (στήλες) ανά μεταχείριση (σειρές)

Το δεύτερο υπολογιστικό βήμα αποδίδει οπτικά τα δεδομένα, **Εικόνα 3.3**. Για την εμφάνιση της επιθυμητής χρωματικής έντασης έγινε χρήση των αντίστροφων τιμών C_i :

Εικόνα 3.3



Χρωματική αναπαράσταση των αντίστροφων τιμών C_i του Πίνακα 1

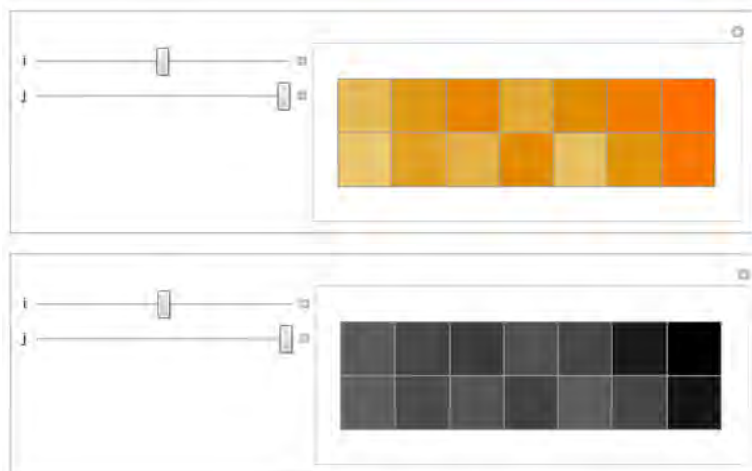
```
Labeled[MatrixPlot[{1/e, 1/e2, 1/e3, 1/n5, 1/n7, 1/n9}, FrameTicks -> All, Mesh -> True,
Frame -> True, FrameStyle -> Opacity[0], FrameTicksStyle -> Opacity[1], {"Genes /
Treatments"}, Top]]
```

```
Manipulate[MatrixPlot[{{1/n5, 1/n7, 1/n9}[[i]], {1/e, 1/e2, 1/e3}[[j]]}, FrameTicks ->
None, Mesh -> True, Frame -> True, FrameStyle -> Opacity[0], FrameTicksStyle ->
Opacity[1]], {i, 1, 3, 1}, {j, 1, 3, 1}]
```

```
Manipulate[ArrayPlot[{{1/n5, 1/n7, 1/n9}[[i]], {1/e, 1/e2, 1/e3}[[j]]},
FrameTicks -> None, Mesh -> True, Frame -> True, FrameStyle -> Opacity[0],
FrameTicksStyle -> Opacity[1]], {i, 1, 3, 1}, {j, 1, 3, 1}]
```

Η **Εικόνα 3.4** απεικονίζει την χρήση δυναμικών επιλογών οπτικοποίησης στο Mathematica, συγκρίνοντας ζεύγη αποτελούμενα από οποιαδήποτε προέλευση (P ή G1), σε δύο διαφορετικές χρωματικές εκδοχές.

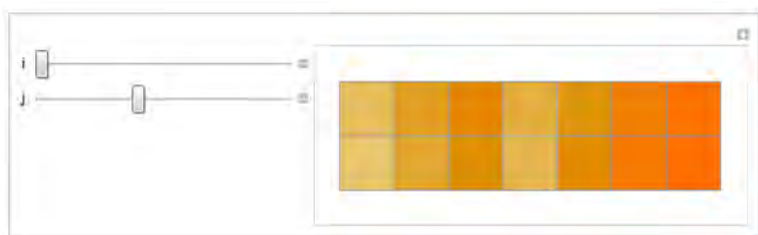
Εικόνα 3.4



Ένα στιγμιότυπο στο *Mathematica*: συγκρίνοντας την έκφραση των γονιδίων ανάλογα με την ομάδα προέλευσης

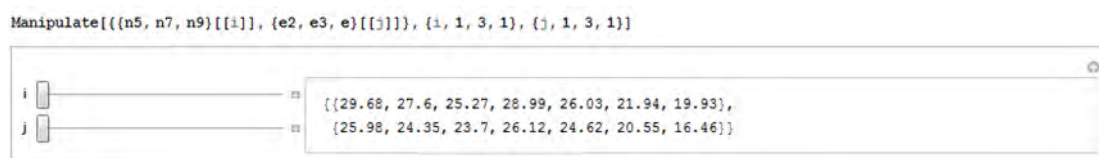
Η **Εικόνα 3.5** απεικονίζει την χρήση δυναμικών επιλογών οπτικοποίησης στο Mathematica, συγκρίνοντας όλες τις μεταχειρίσεις (P ή G1) μεταξύ τους, ανά δύο.

```
Manipulate[ MatrixPlot[{{1/n5, 1/n7, 1/n9, 1/e, 1/e2, 1/e3}[[i]], {1/n5, 1/n7,
1/n9, 1/e, 1/e2, 1/e3}[[j]]}, FrameTicks -> None, Mesh -> True, Frame -> True,
FrameStyle -> Opacity[0], FrameTicksStyle -> Opacity[1]], {i, 1, 6, 1}, {j, 1, 6, 1}]
```

Εικόνα 3.5

Ένα στιγμιότυπο στο *Mathematica*: συγκρίνοντας τις ομάδες “5” και “9”

Στην **Εικόνα 3.6** αποδίδεται η άμεση δημιουργία μιας δυναμικής διεπιφάνειας που επιτρέπει να μεταβάλλονται οι μεταχειρίσεις ανά προέλευση ωστοκίας (P ή G1), όταν παραβάλλονται και συγκρίνονται αριθμητικά διαφορετικές μεταχειρίσεις ανά δύο. Η **Εικόνα 3.6** αποδίδει τιμές από το C_t σύνολο δεδομένων του **Πίνακα 3.1**.

Εικόνα 3.6

Ένα στιγμιότυπο στο *Mathematica*: συγκρίνοντας τη μεταχείριση “5” (G1) με τη μεταχείριση E2” (P).

3.3.2 2^η Μελέτη Περίπτωσης (2nd Case Study)³

3.3.2.1 Οπτικοποίηση της χρονικής έκφρασης των υποψήφιων γονιδίων αναφοράς

Για την περίπτωση της έκφρασης των γονιδίων αναφοράς και την επιλογή εκείνου με τη μικρότερη διακύμανση στην έκφρασή του, η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια της προηγούμενης μελέτης. Αν και διαφορετικοί τρόποι χρωματικών απεικονίσεων του πίνακα δεδομένων qRT-PCR (**Εικόνα 3.7**), που αντιστοιχούν στη διαφορετική έκφραση των τεσσάρων υποψήφιων γονιδίων αναφοράς μπορούν να δημιουργηθούν, οι τάσεις και τα χρωματικά πρότυπα, διατηρούνται.

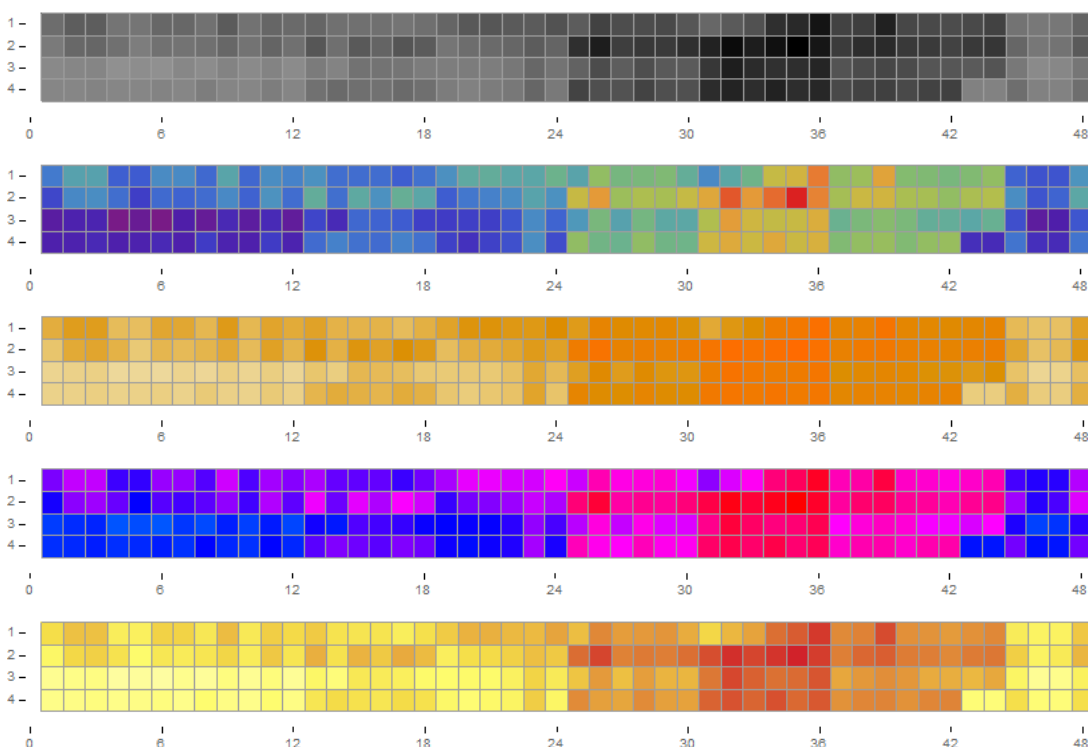
³ The second case study has been included in the Wolfram Library Archive <http://library.wolfram.com/infocenter/Articles/9574/> for its application of Wolfram Technology (Subject: Science > Biology)

Εικόνα 3.7

Hours	0hpf						6hpf						24hpf						32hpf					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
act-b	20,87	18,89	18,83	21,96	22,13	20	20,04	21,53	18,64	21,61	19,91	20,42	19,75	21,32	21,35	21,38	21,98	21,16	19,76	18,31	18,09	18,54	18,55	17,6
ef1a	22,97	20,34	19,93	21,3	23,4	21,45	21,77	21,37	20,1	21,82	19,67	21,36	18,08	21,24	18,34	19,72	17,58	18,56	22,09	20,93	20,48	19,98	18,71	19,72
rps4	25,84	25,09	24,93	27,42	26,62	27,45	25,4	26,46	24,65	25,99	24,96	26,23	23,07	24,94	21,56	21,77	22,07	23,33	23,52	23,35	23,38	22,36	20,06	21,72
ub	25,22	25,08	24,64	25,22	25,08	24,64	25,24	23,53	25,04	25,24	23,53	25,04	21,41	20,5	21,17	21,41	20,5	21,17	23,25	24,11	23,27	22,57	19,89	22,78

Μέρος των δεδομένων, τιμές C_t , των υποψήφιων γονιδίων αναφοράς, όπως παρουσιάζονται σε λογιστικό φύλλο

Εικόνα 3.8

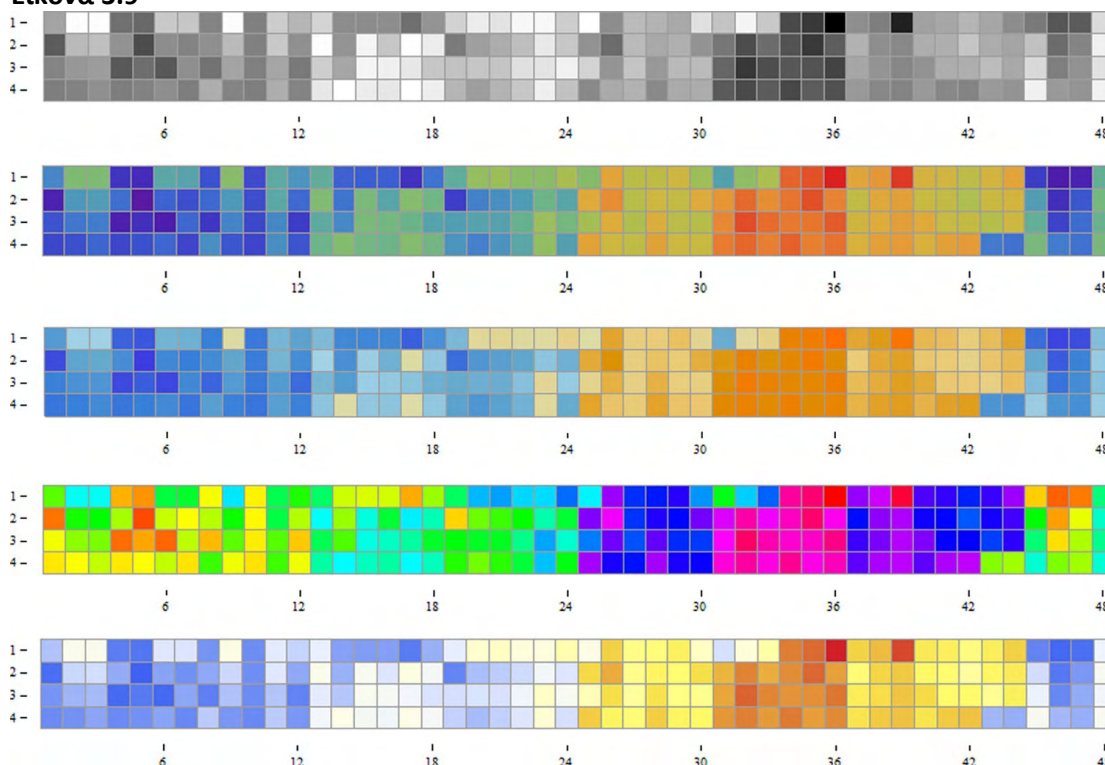


Έξοδος αποτελεσμάτων στο *Mathematica*, μη-προσαρμοσμένης κλίμακας δεδομένα (unscaled data): διαφορετικές εκδοχές του ίδιου γραφήματος δίνουν μια γενική εικόνα της έκφρασης των τεσσάρων υπό μελέτη υποψήφιων γονιδίων αναφοράς (γραμμές): 1. *act-b*, 2. *ef1a*, 3. *rps4* και 4. *ub* στις χρονικές στιγμές 0,6,24,32,48,56,72,96 ώρες μετά την ωτοκία (στήλες 6, 12, 18, 24,30,36,42 και 48). Κάθε απόχρωση αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Οι σκοτεινές ή έντονες αποχρώσεις αντιστοιχούν σε υψηλές τιμές. Το γονίδιο *act-b*, εμφανίζει το λιγότερο μεταβαλλόμενο χρωματικό πρότυπο.

Στην **Εικόνα 3.8** δημιουργείται στο *Mathematica* ένα χρωματικό πρότυπο της έκφρασης τεσσάρων γονιδίων αναφοράς σε ωά γλώσσας για τα χρονικά διαστήματα 0, 6, 24, 32, 48, 56, 72 και 96 ωρών μετά την ωτοκία. Τα γονίδια αναφοράς αντιστοιχούν στις γραμμές των μητρωικών απεικονίσεων της **Εικόνας 3.8** ενώ οι έξι επαναλήψεις των χρονικών διαστημάτων 0, 6, 24, 32, 48, 56, 72 και 96 ωρών μετά την ωτοκία αντιστοιχούν στις αντίστοιχες στήλες (6, 12, 18,..., 48). Τα γονίδια αναφοράς είναι σημαντικά για την κανονικοποίηση των δεδομένων qRT-PCR. Τα δεδομένα που

χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν προσαρμοσμένα σε κλίμακα. Τα χρωματισμένα πλαίσια κάθε γραμμής δηλώνουν διαφορετικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Η γραμμή που παρουσιάζει την ελάχιστη διακύμανση χρώματος έχει και σταθερότητα στη γονιδιακή έκφραση. Έτσι, το γονίδιο με το πιο ομοιόμορφο χρωματικό στερεότυπο (μοτίβο) εντοπίζεται ως το καλύτερο υποψήφιο γονίδιο αναφοράς. Όταν τα δεδομένα προσαρμόζονται σε κλίμακα (autoscaled data), τα χρωματικά πρότυπα των τεσσάρων γονιδίων αναφοράς, αλλάζουν. Τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης απεικονίζονται με διαφορετικό χρωματισμό λόγω των αρνητικών τιμών που εμφανίζονται λόγω της προσαρμογής των δεδομένων σε κλίμακα. Στιγμιότυπα στην **Εικόνα 3.9**, όπως και στην **Εικόνα 3.8**, εντοπίζουν το γονίδιο *act-b* ως υποψήφιο γονίδιο αναφοράς. Οι τελευταίες οπτικές αναπαραστάσεις των **Εικόνων 3.8 & 3.9** δημιουργήθηκαν αξιοποιώντας την επιλογή γραφικών «Temperature map» που είναι ενσωματωμένη στη συνάρτηση «MatrixPlot» στη Mathematica.

Εικόνα 3.9



Έξοδος αποτελεσμάτων στο *Mathematica*, προσαρμοσμένης κλίμακας δεδομένα (scaled data): διαφορετικές εκδοχές του ίδιου γραφήματος δίνουν μια γενική εικόνα της έκφρασης των τεσσάρων υπό μελέτη υποψήφιων γονιδίων αναφοράς (γραμμές): 1. *act-b*, 2. *ef1a*, 3. *rps4* και 4. *ub* στις χρονικές στιγμές 0,6,24,32,48,56,72,96 ώρες μετά την ωτοκία (στήλες 6, 12, 18, 24,30,36,42 και 48). Κάθε απόχρωση αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο επίπεδο γονιδιακής

έκφρασης. Οι σκοτεινές ή έντονες αποχρώσεις αντιστοιχούν σε υψηλές τιμές. Το γονίδιο *act-b*, εμφανίζει το λιγότερο μεταβαλλόμενο χρωματικό πρότυπο.

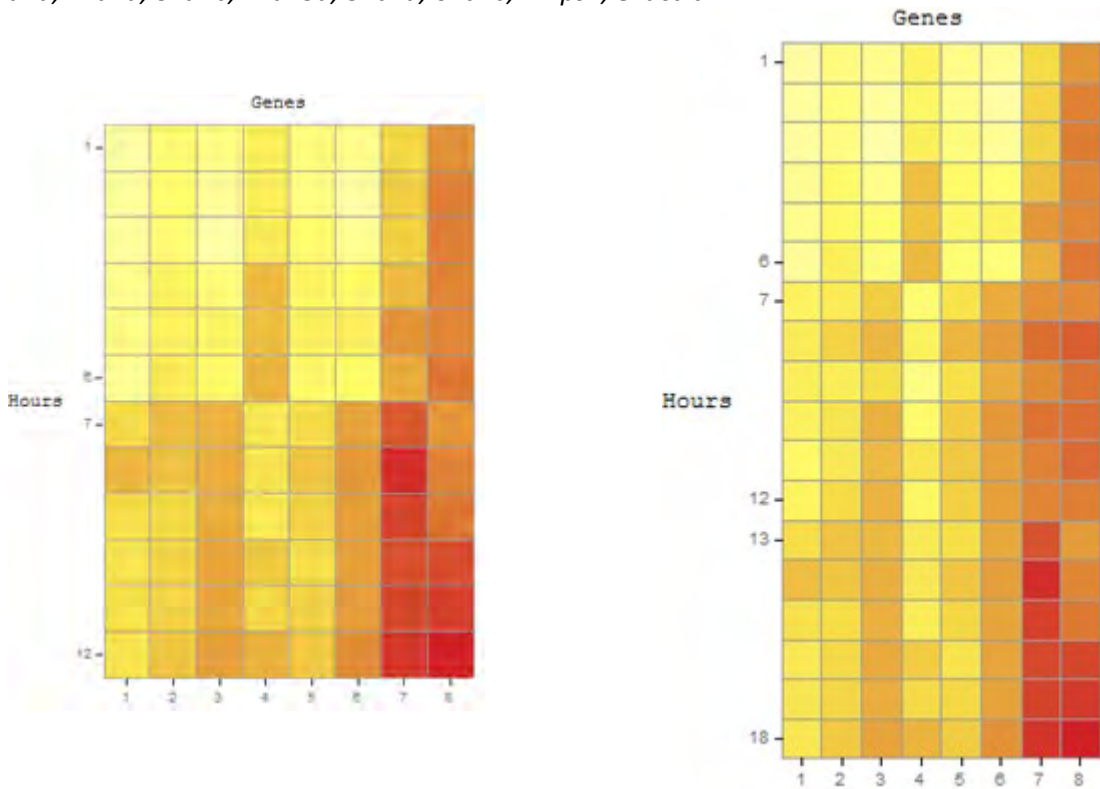
3.3.2.2 Οπτικοποίηση της χρονικής έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων

Τα μη προσαρμοσμένα σε κλίμακα (unscaled) δεδομένα, έξι ομοιοτικών γονιδίων και δύο γονιδίων αναφοράς, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**. Οι αντίστροφες τιμές C_t χρησιμοποιήθηκαν για μια σειρά ενεργειών των δομοστοιχείων (modules) του λογισμικού της Mathematica, όπου προέκυψαν συγκριτικές οπτικοποιήσεις της γονιδιακής έκφρασης, τόσο σε σταθερή (**Εικόνα 3.10**), όσο και σε δυναμική εκδοχή (**Εικόνα 3.11**).

Πίνακας 3.2: Πίνακας δεδομένων τιμών C_t , έξι βιολογικών επαναλήψεων: γραμμή 32-*i* αντιστοιχεί σε *i*-επαναλήψεις στις 32 hrf ενώ οι γραμμές 48-*i*, 56-*i* αντιστοιχούν σε *i*-επαναλήψεις στις 48 & 56 hrf, $i=1,\dots,6$.

	<i>a1a</i>	<i>a2a</i>	<i>a2b</i>	<i>a13a</i>	<i>b1a</i>	<i>b1b</i>	<i>rps4</i>	<i>act-b</i>
321	31.75	28.61	29.46	26.24	29.41	30.52	23.51	19.76
322	31.55	28.34	31.29	26.63	29.42	31.69	23.34	18.31
323	31.58	28.74	32.34	25.58	28.59	30.76	23.37	18.09
324	30.55	27.11	29.32	22.37	27.18	27.8	22.36	18.54
325	29.55	26.77	27.72	22.48	26.65	26.03	19.96	18.55
326	31.05	25.73	28.01	21.98	27.92	28.17	21.61	17.6
481	26.17	24.92	23.00	27.83	23.89	21.47	19.4	18.7
482	24.94	23.24	21.85	25.92	21.8	20.09	17.03	16.15
483	25.46	25.18	23.7	28.91	23.85	21.47	18.82	17.15
484	26.00	24.11	21.69	27.71	22.98	19.99	17.19	17.01
485	26.84	24.77	21.99	24.51	22.81	20.56	18.41	16.78
486	26.34	23.53	21.74	26.61	23.05	20.35	18.47	18.00
561	23.63	22.38	21.87	24.83	23.78	21.16	15.26	20.11
562	22.3	22.7	21.65	24.58	22.74	20.37	13.56	18.49
563	23.84	23.56	21.64	25.00	23.42	20.86	14.39	17.49
564	24.77	23.45	21.36	22.92	23.86	20.8	14.74	14.67
565	24.56	23.41	21.58	23.47	23.42	20.61	14.58	14.29
566	24.74	22.82	20.86	21.77	22.86	19.57	13.94	12.97

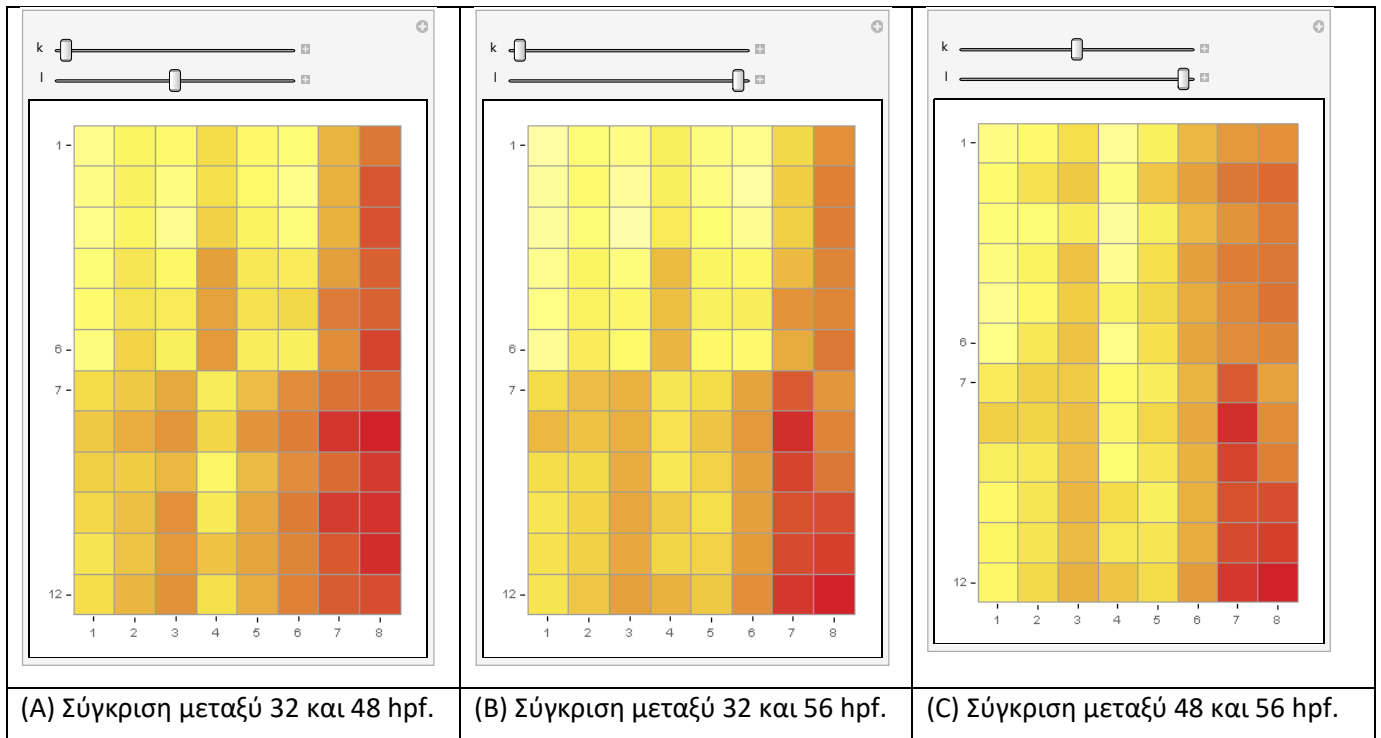
Εικόνα 3.10. Ένταση της γονιδιακής έκφρασης. Η αρίθμηση των γονιδίων είναι σύμφωνα με τον Πιν. 1: 1. *a1a*, 2. *a2a*, 3. *a2b*, 4. *a13a*, 5. *b1a*, 6. *b1b*, 7. *rps4*, 8. *act-b*



(A) Οι γραμμές 1-6 αντιστοιχούν σε έξι επαναλήψεις στις 32 hrf. Οι γραμμές 7-12 αντιστοιχούν σε έξι επαναλήψεις στις 56 hrf.

(B) Οι γραμμές 1-6 αντιστοιχούν σε έξι επαναλήψεις στις 32 hrf. Οι γραμμές 7-12 αντιστοιχούν σε έξι επαναλήψεις στις 48 hrf. Οι γραμμές 13-18 αντιστοιχούν σε έξι επαναλήψεις στις 56 hrf.

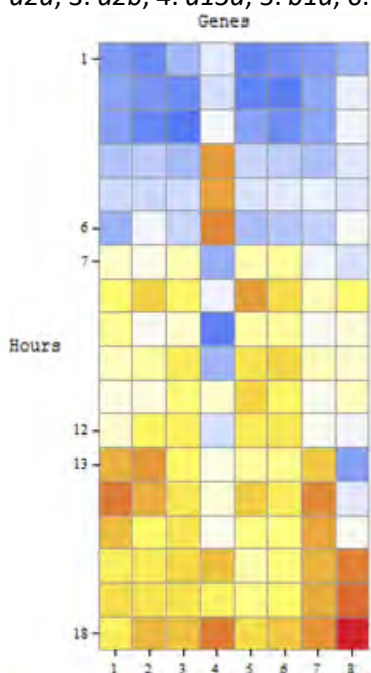
Εικόνα 3.11. Σύγκριση ανά ζεύγη των προτύπων έκφρασης των γονιδίων σε όλους τους χρόνους. $k, l \in \{1, 2, 3\}$ όπου $1 \rightarrow 32$ hpf, $2 \rightarrow 48$ hpf, $3 \rightarrow 56$ hpf. Έξι βιολογικές επαναλήψεις ανά χρόνο έκφρασης



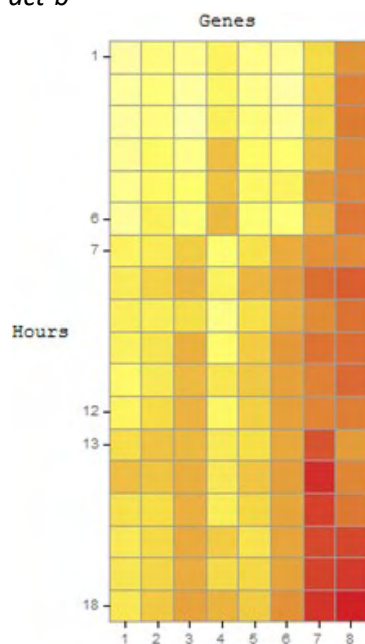
Στις **Εικόνες 3.11 & 3.12A-C**, παρουσιάζονται έξι βιολογικές επαναλήψεις για κάθε χρονική στιγμή. Οι διαφορετικές απεικονίσεις που παράγονται αντιστοιχούν σε πίνακες δεδομένων qRT-PCR, της έκφρασης έξι ομοιοτικών γονιδίων (*hox*) και δύο γονιδίων αναφοράς, στις 32, 48 και 56 ώρες μετά την ωτοκία. Κάθε έγχρωμο στοιχείο αναπαριστά ένα διαφορετικό επίπεδο έκφρασης. Η **Εικόνα 3.11**, αναπαριστά τη δυνατότητα δυναμικής οπτικοποίησης των δεδομένων, συγκρίνοντας ανά ζεύγη τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για τους χρόνους 32, 48 και 56 hpf. Με τις κυλιόμενους ράβδους επιλέγονται οι μεταχειρίσεις που θα συγκριθούν. Στα οπτικά παράγωγα των προσαρμοσμένων σε κλίμακα δεδομένων (autoscaled) (**Εικόνα 3.12A, C**), παρατηρούνται τρία ξεχωριστά χρονικά πρότυπα έκφρασης. Στις 32 ώρες, τα πλαίσια με κυανές αποχρώσεις, αντιστοιχούν σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης, ενώ στις 48 και 56 ώρες, τα πλαίσια αλλάζουν βαθμιαία τον χρωματισμό τους σε πορτοκαλί αποχρώσεις, υποδηλώνοντας μια αύξηση των επιπέδων έκφρασης όσο προχωρά ο χρόνος, για τα περισσότερα υπό εξέταση γονίδια. Στα μη-προσαρμοσμένα σε κλίμακα δεδομένα, στις

Εικόνες 3.10, 3.11, 3.8B, 3.8D, τα τρία χρωματικά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των 32, 48 και 56 ωρών μετά την ωτοκία, είναι εξίσου παρόντα, όπως και στα προσαρμοσμένα σε κλίμακα δεδομένα. Ωστόσο, οι σημαντικές χρωματικές μεταβολές μεταξύ των 48 και 56 ωρών μετά την ωτοκία (**Εικόνα 3.11C**), είναι λιγότερο διακριτές. Στην **Εικόνα 3.10B**, η περιοχή με τα ανοιχτόχρωμα φωτεινά πλαίσια, αντιστοιχεί στις 32 ώρες, ενώ οι περιοχές με τις σκουρόχρωμες αποχρώσεις, στις 48 ώρες και οι ακόμα πιο σκοτεινές, στις 56 ώρες. Στη σύγκριση ανά ζεύγη, όπου παρουσιάζονται έξι βιολογικές επαναλήψεις, στην **Εικόνα 3.11 A – C**, οι χρωματικές διαφορές είναι εμφανείς τόσο μεταξύ 32 και 48 ωρών, όσο και μεταξύ 32 και 56 ωρών μετά την ωτοκία. Μοναδική εξαίρεση, είναι το ομοιοτικό γονίδιο *hoxa13a*, του οποίου η έκφραση είναι μεγαλύτερη στις 32 ώρες, ενώ μειορρυθμίζεται στις 48 και αυξορρυθμίζεται στις 56 hrf.

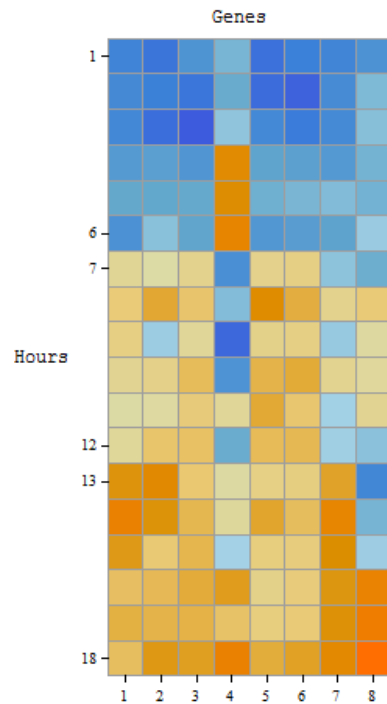
Εικόνα 3.12. Γονιδιακή έκφραση προσαρμοσμένων δεδομένων vs μη-προσαρμοσμένων δεδομένων. Τα γονίδια αριθμούνται με τη σειρά όπως αυτή δίνεται στον Πίν. 2: 1. *a1a*, 2. *a2a*, 3. *a2b*, 4. *a13a*, 5. *b1a*, 6. *b1b*, 7. *rps4*, 8. *act-b*



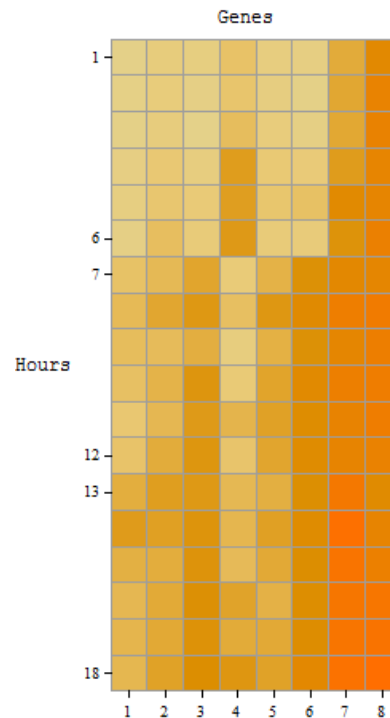
(A) Προσαρμοσμένα δεδομένα, λογαριθμικές τιμές C_t σε χρωματισμούς θερμικού χάρτη.



(B) Μη-προσαρμοσμένα δεδομένα, αντίστροφες τιμές C_t σε χρωματισμούς θερμικού χάρτη.



(C) Προσαρμοσμένα δεδομένα, λογαριθμικές τιμές Ct, σε προεπιλεγμένους χρωματισμούς.



(D) Μη-προσαρμοσμένα δεδομένα, αντίστροφες τιμές Ct, σε προεπιλεγμένους χρωματισμούς.

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να συνδέσει άμεσα τις βιολογικές λειτουργίες όπως η γονιδιακή έκφραση, με τον τρόπο απεικόνισής τους. Εδώ προτείνεται ένα υπολογιστικό πλαίσιο στο περιβάλλον ενός ισχυρού συστήματος υπολογιστικής άλγεβρας, του Mathematica, για τη δημιουργία οπτικών αναπαραστάσεων. Οι υπολογιστικοί κώδικες δημιουργούν στιγμιότυπα των προτύπων της γονιδιακής έκφρασης με αυτοεπεξηγηματική περιγραφή, σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους που χρησιμοποιούν διαγράμματα, δείκτες και αριθμούς. Η προτεινόμενη υπολογιστική προσέγγιση δύναται να αποτυπώσει οπτικά, σε στατικές και δυναμικές εικόνες, εν δυνάμει γονιδιακά ζεύγη ή δίκτυα, και πιθανώς να αναδείξει – ερμηνεύσει λανθάνουσες (υποκρύπτουσες) συνδέσεις ή αλληλεπιδράσεις. Οι υπολογιστικοί κώδικες και η εφαρμογή τους σε συγκεκριμένη πειραματική μελέτη η οποία αφορά σε γονίδια που εμπλέκονται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του είδους «γλώσσα η κοινή» (*Solea solea*), αποτελούν μια μεθοδολογική συμβολή στην

απεικόνιση των προτύπων της γονιδιακής έκφρασης. Κάνουν χρήση των ενσωματωμένων μητρικών συναρτήσεων του Mathematica και δημιουργούν μια διεπιφάνεια που αυτοματοποιεί τη δημιουργία οπτικών αναπαραστάσεων δεδομένων qRT-PCR για διαφορετικά γονίδια στόχους και μεταχειρίσεις. Η ποιοτική προσέγγιση που προτείνεται εφαρμόστηκε σε πραγματικές εκτιμώμενες τιμές που σχετίζονται με την ανάπτυξη του είδους *Solea solea* στα πρώτα στάδια της ζωής του. Οι παραγόμενες οπτικές αναπαραστάσεις αποδεικνύουν ότι η παρούσα υπολογιστική προσέγγιση επιτρέπει συγκρίσεις άμεσα και αποτελεσματικά και μπορεί να καθορίσει στρατηγικές διαχωρισμού. Παρουσιάζονται αναπαραστάσεις με διαφορετικές χρωματικές επιλογές και κάποια συμπεράσματα για την επιλογή αποτελεσματικών συνδυασμών χρωμάτων μπορούν να εξαχθούν. Η αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων είναι απολύτως εφικτή με οποιαδήποτε δεδομένα αφού οι υπολογιστικοί κώδικες είναι διαθέσιμοι.

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα προσαρμοσμένα σε κλίμακα πειραματικά δεδομένα, τιμές C_t , έδειξαν ένα πιο έντονο οπτικό πρότυπο μεταξύ των σταδίων των 32, 48 και 56 ωρών μετά την ωτοκία, σε σύγκριση με τα μη-προσαρμοσμένα δεδομένα (**Εικόνα 3.12**). Αυτή η διαφορά ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι μαζί με τα προσαρμοσμένα δεδομένα είναι σημαντικό να τυποποιηθούν (standardize) και οι κατανομές των προτύπων της γονιδιακής έκφρασης, επειδή βασίζονται σε σχετικές μεταβολές, ενώ τα μη-προσαρμοσμένα δεδομένα, αναφέρονται στο μέγεθος της μεταβολής της έκφρασης. Η διαφορική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (Pfaffl et al., 2002), έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην έκφραση όταν συγκρίνουμε τα πρότυπα των 32 και 56 ωρών, αλλά όχι μεταξύ των 48 και 56 ωρών. Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να περιγράφεται καλύτερα από τα οπτικά πρότυπα που χρησιμοποιούν μη-προσαρμοσμένα σε κλίμακα δεδομένα (**Εικόνα 3.12B, D**) και οφείλεται στη χρήση των γονιδίων αναφοράς που χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των δεδομένων της διαφορικής ανάλυσης, των οποίων η έκφραση δεν παραμένει σταθερή, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.8**. Τέλος, η ανίχνευση μεταγράφων του ομοιοτικού γονιδίου *hoxa13a*, στις 32 hrf ενδεχομένως να συνηγορεί στην άποψη ότι το εν λόγω γονίδιο δεν είναι μητρικής προέλευσης, εξαιτίας του μεγάλου χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί από την ωτοκία, αλλά εκφράζεται ως αποτέλεσμα απορρύθμισης των

ομοιοτικών γονιδίων που οδηγεί στον πρόωρο τερματισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η μειορρύθμιση της έκφρασής του στις 36 και 48 hpf σε σχέση με τους αρχικούς χρόνους 0 και 6 hpf, ενδεχομένως να σχετίζεται με τη μη καταμέτρηση ατόμων των 24 και 48 hpf, των οποίων η εμβρυϊκή ανάπτυξη διακόπηκε και τα ωά κατακρημνίστηκαν λόγω της πρόωρης έκφρασής του.

3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Αυτή η μελέτη είναι συμβατή με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα στις αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης και επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη ενός εργαλείου που επιτρέπει την εισαγωγή δεδομένων qRT-PCR στο υπολογιστικό περιβάλλον της Mathematica με σκοπό να απεικονίσει με ακρίβεια το μέγεθος των απόλυτων ή / και σχετικών μεταβολών στην γονιδιακή έκφραση, χρησιμοποιώντας τόσο μη προσαρμοσμένα σε κλίμακα όσο και προσαρμοσμένα σε κλίμακα δεδομένα με μια ποικιλία οπτικών στιγμιότυπων. Σχετικά με τον προγραμματισμό, χρησιμοποιήθηκαν οι ενσωματωμένες λειτουργίες μήτρας της “Mathematica” για τη δημιουργία διεπαφής με σκοπό να αυτοματοποιήσει τη διαδικασία δημιουργίας ευκόλως κατανοητών και αισθητικά ελκυστικών αναπαραστάσεων των δεδομένων qRT-PCR. Η ποιοτική προσέγγιση εφαρμόστηκε σε εμπειρικό επίπεδο, με πραγματικές τιμές που σχετίζονται με τη γονιδιακή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια του είδους *Solea solea*, με θετικά αποτελέσματα. Περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία σε ένα τομέα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, που έχει εφαρμογή στην όσο το δυνατόν καλύτερη και αντιπροσωπευτικότερη απεικόνιση των επιστημονικών δεδομένων. Το μεγάλο μέγεθος της επιστημονικής πληροφορίας και η πολυπλοκότητα των συνδέσεων και των δικτύων που αναπτύσσονται όλο και περισσότερο μεταξύ τους (π.χ. γονιδιακά δίκτυα, βιοχημικά μονοπάτια, οικοσυστήματα, κτλ), οδηγούν στην ανάπτυξη μεθόδων για την καλύτερη και ρεαλιστικότερη αναπαράσταση των πολύπλοκων βιολογικών δεδομένων και δικτύων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Μελέτη του μεταγραφώματος με Τεχνικές Αλληλούχησης Νέας Γενιάς (NGS) – Φυσιολογικά άτομα vs άτομα με αμφιχρωματισμό

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αξιοσημείωτη χρωματική ποικιλότητα που παρατηρείται στους ιχθύς, περιλαμβάνει απλούς χρωματισμούς, όπως το ασημί χρώμα, πιο σύνθετους, με περισσότερα και εντονότερα χρώματα, και σε άλλους λιγότερο έντονους. Οι τελευταίοι, έχουν ως σκοπό το δύσκολο εντοπισμό του είδους και την απόκρυψή του, μιμούμενοι τις αποχρώσεις του περιβάλλοντος (Burton, 1998). Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν τα πλατύψαρα και ειδικότερα η γλώσσα (*Solea solea*).

Η μεταμορφωμένη γλώσσα, παρουσιάζει μια κατώτερη «τυφλή» πλευρά, χρωματισμένη με ανοιχτό (λευκό) χρώμα, και μία ανώτερη «οφθαλμική» πλευρά, με σκούρο, φαιοκαστανό χρωματισμό. Η παρατηρούμενη χρωματική ασυμμετρία φαίνεται να διαμορφώνεται και να συγχρονίζεται κατά το στάδιο της μετακίνησης – μετανάστευσης του ενός οφθαλμού στην ανώτερη - οφθαλμική πλευρά (Washio et al., 2013). Εικάζεται ότι το πρότυπο χρωματισμού των πλατυψάρων προέρχεται από το πρωτόγονο πλατύψαρο *Psettodes*, το οποίο παρουσιάζει φαρδιές, κάθετες, ραβδώσεις (Burton, 1998).

Στα εκτρεφόμενα πλατύψαρα, όπως η γλώσσα, διαταραχές στο χρωματισμό είναι συνηθισμένες και περιγράφονται με τον όρο «δυσχρωμίες» (malpigmentation) (Isojima et al., 2013; Guillot et al., 2012; Lund et al., 2010; Vizcaíno-Ochoa et al., 2010; Imsland et al., 2006; Bolker et al., 2005; Yamanome et al., 2005; Bolker, 2000; Venizelos & Benetti, 1999;). Οι δυσχρωμίες είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τις ανωμαλίες χρωματισμού στην τυφλή και οφθαλμική πλευρά του ιχθύ, οι οποίες υποδιαιρούνται σε τρεις κατηγορίες: 1) πλήρης ή μερικός αλμπινισμός (ψευδοαλμπινισμός ή υπομελάνωση) που αφορά στην οφθαλμική πλευρά, 2) Αμφιχρωματισμός, όταν και η τυφλή πλευρά εμφανίζει τον ίδιο χρωματισμό της οφθαλμικής πλευράς, και 3) κηλίδωση ή υπερμελάνωση, όταν σε τμήματα της τυφλής

πλευράς εμφανίζεται χρωματισμός παρόμοιος με την οφθαλμική πλευρά (Bolker et al., 2005).

Απόκλιση από το φυσιολογικό χρωματισμό έχει επίπτωση στην επιβίωση του είδους στο θαλάσσιο περιβάλλον, καθώς και στην τιμή πώλησης των εκτρεφόμενων ατόμων (Bolker, 2000). Ανωμαλίες στο χρωματισμό παρατηρούνται σπάνια στους άγριους πληθυσμούς πλατυψάρων και στη *Solea solea*, (Venizelos & Benetti, 1999; Akyol & Şen, 2012). Η *Solea solea* όπως και η *Solea senegalensis*, είναι είδη που παρουσιάζουν πολυπλοκότητα κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης και δυσκολίες στην αποκοπή που συνδέονται με χρωματικές και σκελετικές ανωμαλίες (Conceição et al., 2007).

Στα αμνιωτά, ο ενήλικος χρωματισμός εξαρτάται από την προγραμματισμένη διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων τα οποία περιέχουν μελανίνη και συνεισφέρουν στα χρωματισμό της κεράτινης στοιβάδας και κατά συνέπεια του δέρματος, των τριχών και των φτερών. Αντίθετα, οι τελεόστεοι και άλλα εκτοδερμικά σπονδυλωτά, αναπτύσσουν μια ποικιλία κυττάρων, γνωστών και ως χρωματοφόρων, τα οποία εμπεριέχουν ενδοκυτταρικές τις διάφορες χρωστικές. Τα περισσότερο μελετημένα κύτταρα είναι: 1) τα μαύρα μελανοφόρα, τα οποία εμπεριέχουν μελανίνη, ομόλογα με τα μελανοκύτταρα των αμνιωτών, 2) Τα κίτρινο-πορτοκαλί ξανθοφόρα, που εμπεριέχουν πτεριδίνες και καροτονοειδή, 3) τα ιριδίζοντα ιριδοφόρα, που εμπεριέχουν ανακλώμενα δισκία πλούσια σε πουρίνες, υπεύθυνα για τους λευκούς και ασημένιους χρωματισμούς, 4) Τα λαμπερώς κίτρινα λευκοφόρα, που εμπεριέχουν πτεριδίνες, καροτενοειδή, καθώς και εναποθέσεις ανακλώμενων κρυστάλλων. Η ποικιλία των χρωματοφόρων είναι μεγάλη και περιλαμβάνει επιπλέον τα ερυθροφόρα, τα κυανοφόρα κ.α. (Parichy & Spiewak, 2015).

Το βασικό σχέδιο χρωματισμού στα πλατύψαρα βασίζεται στον αριθμό και στην κατανομή τριών ειδών κυττάρων: στα σκούρα μελανοφόρα, στα ξανθοφόρα και στα ιριδοφόρα. Και οι τρεις τύποι κυττάρων προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία (neural crest) και μεταναστεύουν σε όλο το έμβρυο κατά τα στάδια της οντογένεσης. Η φυσιολογική ανάπτυξη του χρωματισμού, εξαρτάται τόσο από γενικούς μηχανισμούς

όσο και από το περιβάλλον των ιστών που διαφοροποιούνται τα χρωστικά κύτταρα (Guillot et al., 2012; Bolker et al., 2005). Στα πλατύψαρα η ανάπτυξη του χρωματισμού τους περιλαμβάνει δύο στάδια: 1) Κατά τη διάρκεια των εμβρυϊκών και νυμφικών σταδίων ανάπτυξης, τα πρόδρομα κύτταρα-βλαστοκύτταρα (stem cells) μεταναστεύουν και στις δύο πλευρές, τυφλή και οφθαλμική, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε νυμφικά μελανοφόρα, 2) κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης τα νυμφικά μελανοφόρα κύτταρα εξαφανίζονται και νέα ώριμα χρωματοφόρα κύτταρα σχηματίζονται και εγκαθίσταται. Αυτή τη φορά, τα ώριμα μελανοφόρα απαντώνται μόνο στην οφθαλμική πλευρά. Η εμφάνιση των χρωματικών δυσμορφιών φαίνεται να συμβαίνει κατά το δεύτερο στάδιο (Bolker et al., 2005, 2000). Αυτή η χρωμική ασυμμετρία που εμφανίζεται μετά το στάδιο της μεταμόρφωσης, εικάζεται ότι οφείλεται στην ασυμμετρική παρουσία και έκφραση των παραγόντων που ελέγχουν τη διαφοροποίηση των πρόδρομων χρωματοφόρων, την επιβίωσή και τη διάδοσή τους. Η μη φυσιολογική λειτουργία αυτών των μηχανισμών, ενδεχομένως να οδηγεί στην εμφάνιση ανωμαλιών χρωματισμού, όπως ο ψευδοαλμπινισμός και η υπερμελάνωση (Guillot et al., 2012). Η χρωματική ποικιλομορφία που παρατηρείται οφείλεται σε ποσοτικές διαφοροποιήσεις είτε της πυκνότητας είτε της μορφολογίας των χρωστικών κυττάρων, ειδικά των μελανοφόρων. Σε ανοιχτόχρωμες επιδερμίδες τα μελανοφόρα είναι διάσπαρτα και συρρικνωμένα, ενώ σε σκούρες επιφάνειες, είναι περισσότερα και πιο εκτεταμένα (Bolker et al., 2005).

Στη χωματίδα της Αμερικής (*Pleuronectes americanus*), η απόκριση των μελανοφόρων για το χρωματικό σχεδιασμό, είναι νευρικός ελεγχόμενη ενώ των ξανθοφόρων ελέγχεται από την υπόφυση. Οι α-αδρενεργικοί υποδοχείς μεσολαβούν για την συγκέντρωση των μελανοφόρων κυττάρων σε αντίθεση με τους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς που μεσολαβούν για τη διάχυσή και διασπορά τους (Burton, 1998). Μετά τη μεταμόρφωση, τα περισσότερα πλατύψαρα όπως η *Solea solea*, έχουν μια ανοιχτόχρωμη (ωχρή) κάτω-τυφλή πλευρά πλούσια σε ιριδοφόρα κύτταρα, και μια σκουρόχρωμη πάνω-οφθαλμική πλευρά που περιλαμβάνει μελανοφόρα, ξανθοφόρα, ερυθροφόρα και ιριδοφόρα κύτταρα (στο δέρμα). Η οφθαλμική πλευρά, περιέχει επίσης μια ποικιλία από σχέδια και χρώματα τα οποία είναι χαρακτηριστικά για κάθε

είδος (Burton, 1998). Αυτή η ραχιαιοκοιλιακή χρωμική πολικότητα, επιτυγχάνεται μέσω του παράγοντα αναστολής της μελανοποίησης ή μελανισμού (Melanization Inhibitor Factor-MIF) που εμποδίζει την διαφοροποίηση των μελανοβλαστών και προωθεί τη διάδοση των ιριδοφόρων κυττάρων στην κοιλιακή περιοχή. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε στους ιχθύς η πρωτεΐνη ASIP1 ως ο αντίστοιχος παράγοντας MIF (Guillot et al., 2012).

Ο αμφιχρωματισμός και ο πλήρης αλπινισμός, χαρακτηρίζονται ως υψηλού επιπέδου σχεδιαστικά σφάλματα που σχετίζονται με το διαχωρισμό των πλευρών (αριστερά/δεξιά), ενώ η κηλίδωση και η υπομελάνωση αντιπροσωπεύουν περισσότερο τοπικές διαταραχές. Εικάζεται ότι οι αιτίες των σοβαρών ανωμαλιών στο χρωματισμό είναι κυρίως περιβαλλοντικές (διατροφικές) παρά γενετικής φύσης (Bolker et al., 2005). Ο αμφιχρωματισμός είναι πράγματι ένα αναπτυξιακό φαινόμενο: συμβαίνει σε συγκεκριμένο σημείο της οντογένεσης (κατά τη μεταμόρφωση), είναι μη αναστρέψιμος και εμπλέκει όλες τις δομές του δέρματος και της επιδερμίδας καθώς και την πυκνότητα των μελανοφόρων. Η εμφάνιση και η έκταση του αμφιχρωματισμού, επηρεάζεται από παράγοντες που επιδρούν στο σύνολο του σωματικού σχεδιασμού και όχι μόνο τοπικά. Αντίθετα, η κηλίδωση εμφανίζεται και σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα, επηρεάζεται κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι αναστρέψιμη (Bolker et al., 2005).

Έχει επιβεβαιωθεί ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το αραχιδονικό (ARA), το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το DHA, είναι υπεύθυνα τόσο για την αύξηση και ανάπτυξη όσο και για το χρωματισμό των νυμφών των θαλάσσιων ιχθύων. Ενώ φαίνεται ο αλπινισμός δεν σχετίζεται με το ARA που λαμβάνεται μέσω τροφής, οι υπόλοιπες μορφές δυσχρωμιών φαίνεται να σχετίζονται θετικά. Για την κοινή γλώσσα (*Solea solea*), θεωρείται ότι τόσο ο χρωματισμός όσο και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ατόμου, καθορίζονται νωρίς από το λεγόμενο «παράθυρο χρωματισμού». Ως «παράθυρο χρωματισμού» ορίζεται εκείνη η περίοδος της οντογένεσης (νυμφικά στάδια), όπου οι διατροφικοί παράγοντες, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον χρωματισμό (Lund et al. 2007). Συγκεκριμένα, υψηλά επίπεδα ARA και υψηλές αναλογίες σε σχέση με το EPA, στη διατροφή των πρώτων σταδίων των νυμφών και πριν τη μεταμόρφωση

στη *Solea senegalensis*, συνδέονται με ανωμαλίες στο χρωματισμό (Bogliano, Wishkerman, Darias, de la Iglesia, Estévez, et al., 2014). Η χορήγηση υψηλών επιπέδων ARA σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, όχι μόνο έχει επίδραση σε χρωματικές ανωμαλίες, αλλά επηρεάζει επίσης την πυκνότητα των μελανοφόρων και την χροιά του δέρματος τόσο στα φυσιολογικά άτομα όσο και σε αυτά που παρουσιάζουν ψευδοαλμπινισμό. Κύρια αιτία θεωρούνται οι επιγενετικοί παράγοντες (Bogliano et al., 2014). Τα υψηλά επίπεδα ARA στη διατροφή των νυμφών, δεν επηρεάζουν τη σωματική τους αύξηση, παρά μόνο το χρωματισμό. Στη *Solea senegalensis*, τα υψηλά επίπεδα ARA συνδέονται επίσης με αύξηση των προσταγλανδίνων τύπου II (PGE₂), τον ψευδοαλμπινισμό, και κρανιακές δυσμορφίες, που αφορούν κυρίως οφθαλμικές διαταραχές (Bogliano et al., 2014). Στη *Solea solea*, ωχρότητα εμφανίστηκε σε νυμφικό στάδιο, σε άτομα τα οποία δεν χορηγήθηκε ARA ως διατροφικό συμπλήρωμα. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι δεν έχουν παρατηρηθεί άτομα τα οποία εμφανίζουν ταυτόχρονα υπερμελάνωση και υπομελάνωση, δηλαδή ταυτόχρονες χρωματικές ανωμαλίες και στις δύο πλευρές, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι ο ίδιος μηχανισμός είναι υπεύθυνος για τον χρωματισμό και των δύο πλευρών (Lund et al., 2010). Για το ίδιο είδος (*Solea solea*), οι προσταγλανδίνες τύπου 2 (PG₂) φαίνονται να συνδέονται με υπομελάνωση. Επιπλέον, για τις λάρβες στις οποίες χορηγήθηκε ARA εμφάνισαν υστέρηση στη διαφοροποίηση των χρωστικών κυττάρων, εκφυλισμό, ακόμα και κυτταρική λύση κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης και μετά. Αυτό δείχνει ότι η συγκεκριμένη χρωματική ανωμαλία, επάγεται βιοχημικά (Lund et al., 2010).

Ο βαθμός χρωματισμού της τυφλής πλευράς (υπερμελάνωση ή κηλίδωση), έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με περιβαλλοντικούς και εξωτερικούς παράγοντες, όπως το χρώμα των δεξαμενών (Yamanome et al., 2005). Το λευκό βάθος (φόντο) φαίνεται να διεγείρει την συγκεντρωτική ορμόνη της μελανίνης (MCH) στην οποία οφείλεται η λευκή απόχρωση του σώματος. Η MCH, είναι ένα πεπτίδιο που παράγεται στον υποθάλαμο και η έκκρισή του συνδέεται με την αύξηση πρόσληψης της τροφής και αύξησης του σωματικού βάρους (Yamanome et al., 2005). Η υψηλή ιχθυοπυκνότητα φαίνεται να οδηγεί σε υπερμελάνωση της τυφλής πλευράς στο χιράμι ή πράσινη χωματίδα (olive flounder) σε ποσοστό έως και 95%. Η έκφραση της MCH ήταν

σημαντικά μικρότερη στα άτομα με υπερμελάνωση σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ αντίστοιχα, τα επίπεδα των προοπιομελανοκορτινών I και II (POMC) ήταν υψηλότερα. Οι POMC είναι πεπτίδια που εκκρίνονται από την υπόφυση και σε αντίθεση με τη MCH φαίνεται να επάγουν την υπερμελάνωση (Kang & Kim, 2012). Η ανοιχτόχρωμη προσαρμογή σε συνθήκες περιβάλλοντος, επάγεται από την υψηλή συγκέντρωση της ορμόνης, MCH ενώ η έκθεση σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα την αναστέλλει. Συμπερασματικά, η γονιδιακή έκφραση της MCH σχετίζεται με την ανοιχτόχρωμη προσαρμογή και την υπερμελάνωση και επηρεάζεται από το χρώμα του βάρθους (φόντο) και την ιχθυοπυκνότητα (Kang et al., 2014). Στην τιλάπια, η προσαρμογή και η ανάπτυξη σε σκουρόχρωμο (μαύρο) περιβάλλον, ενεργοποιεί την ορμόνη διέγερσης μελανοκυττάρων (α -MSH) και η μακροχρόνια χορήγησή της, διέγειρε την ανάπτυξη των μελανοφόρων κυττάρων. Τα έως τώρα δεδομένα συνηγορούν ότι η μη σωστή ρύθμιση του συστήματος χρωματισμού, που περιλαμβάνει τις ορμόνες MCH και α -MSH και των υποδοχέων τους, μπορεί να είναι και η αιτία εμφάνισης κηλιδώσεων ή υπερμελάνωσης της τυφλής πλευράς (Yamanome et al., 2005).

Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου ήταν να εξεταστεί η διαφορά του μεταγραφώματος σε επίπεδο γονιδίων και βιολογικών διαδρομών που αυτά συμμετέχουν, μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ατόμων που παρουσιάζουν αμφιχρωματισμό, δηλαδή πλήρως χρωματισμένη την τυφλή πλευρά τους. Η ανάλυση του μεταγραφώματος έγινε με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) και εκ νέου συναρμογή του μεταγραφώματος. Τα μετάγραφα που παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ($FDR < 0,05$) στην έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων, ομοπαράτέθηκαν με αυτά του *Danio rerio* (ensemble db), ταυτοποιήθηκαν λειτουργικά και κατατάχθηκαν σε κατηγορίες γονιδιακής οντολογίας. Η βάση δεδομένων "Reactome" χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των βιολογικών διαδρομών.

4.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Δειγματοληψία

Η μεταχείριση των ιχθυδίων ήταν σύμφωνη με την Οδηγία 86/609 της ΕΕ περί «προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς». Η εκτροφή των γεννητόρων, η ωοτοκία και η εκτροφή των νυμφών και ιχθυδίων *Solea solea*, έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του IMARES (τώρα, WMR), Ijmoude, The Netherlands. Μετά την εκκόλαψη στις 15/7 (ωοτοκία 10 Ιουλίου 2014), οι νύμφες ισομοιράστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες και μεταφέρθηκαν σε ξεχωριστές πολυεστερικές δεξαμενές 300 L, κυβικού σχήματος και ανοιχτόχρωμου-καφέ χρωματισμού. Το θαλασσινό νερό ανακυκλώνονταν μέσω αντλιών με μέσο ρυθμό ανανέωσης τις 4 h, (μετά την 7^η μέρα (21/7), τις 3 h), σε ειδικό σύστημα διήθησης που περιλάμβανε μηχανικό, βιολογικό, χημικό και UV φίλτρα. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 12 °C με άνοδο 1 °C ανά ημέρα, μέχρι την 6^η μέρα, και κατόπιν διατηρήθηκε σταθερή στους 17 °C, ενώ η αλατότητα ήταν στα 34,3 psu και το pH στο 7,7. Κατά τα πρώτα στάδια, από την 4^η μέρα 18/7, ξεκίνησε το τάισμα και από την 8^η ημέρα μετά την εκκόλαψη 22/7, οι νύμφες τρέφονταν με εμπλουτισμένη αρτέμια (δύο φορές την ημέρα από τις 23/7, 9^η μέρα). Από την 7^η μέρα (21/7) εφαρμόστηκε τεχνητός φωτισμός (12 ώρες μέρα, 12 ώρες νύχτα). Από την 15^η μέρα (28/7), η αλατότητα μειώθηκε σταδιακά στα 26 psu. Η δειγματοληψία των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε κατά τη χρονική στιγμή που εμφανίστηκαν άτομα με αμφιχρωματισμό (ολικός χρωματισμός της τυφλής πλευράς), την 24^η μέρα μετά την εκκόλαψη. Τρία ιχθύδια με φυσιολογικό χρωματισμό και τρία με αμφιχρωματισμό συλλέχθηκαν από κάθε δεξαμενή, τοποθετήθηκαν στον πάγο, και αφού εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό, τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά φιαλίδια Falcon 50 mL συμπληρωμένα με RNA-later. Αποθηκεύτηκαν στους -24 °C μέχρι την εξαγωγή και απομόνωση του ολικού RNA.

4.2.2 Αλληλούχηση mRNA

Τρία δείγματα προερχόμενα από ιχθύδια με φυσιολογικό χρωματισμό και τρία αντίστοιχα με αμφιχρωματισμό, χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή ολικού RNA, με τη

χρήση της σειράς αντιδραστηρίων, Nucleospin TriPrep (Macherey- Nagel, Germany), σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή. Κάθε δείγμα αποτελούταν από 10 µL ομογενοποιημένου ιστού τριών ιχθυδίων. Αναλυτικά, τρία ιχθύδια, αφού εκπλύθηκαν με αποσταγμένο νερό τοποθετήθηκαν ολόκληρα σε φιαλίδια erpendorf και ομογενοποιήθηκαν χειρωνακτικά, με τη χρήση μηχανικώς περιστρεφόμενου εμβόλου. 10 µL ομογενοποιημένου ιστού χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή RNA και περαιτέρω ανάλυση. Συνολικά, έξι δείγματα (τρία με φυσιολογικό χρωματισμό και τρία με αμφιχρωματισμό) στάλθηκαν στη ServiceXS / GenomeScan B.V., Leiden, The Netherlands για την προετοιμασία βιβλιοθηκών και αλληλούχηση. Η σειρά αντιδραστηρίων «NEBNext Ultra Directional RNA library Prep Kit for Illumina» (NEB #E7420S/L) χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για την περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων. Η απομόνωση του mRNA από το ολικό RNA έγινε με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων ολιγο-dT. Μετά τον κερματισμό (κατάτμηση) του mRNA, cDNA συντέθηκε και προσδέθηκαν οι προσαρμογείς αλληλούχησης. Η ποιότητα και ο εμπλουτισμός (yield) των προϊόντων επεξεργασίας εκτιμήθηκε με βιοαναλυτή Fragment analyzer. Το μέγεθος των προϊόντων ήταν σύμφωνα με την αναμενόμενη κατανομή μεγέθους (μεταξύ 300-500 bp). Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με illumina cBot και HiSeq 2500 (San Diego, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα για τις έξι δημιουργηθείσες βιβλιοθήκες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων: NCBI Sequence Read Archive (study accession no PRJNA324631). Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.1** όλα τα δείγματα πληρούν τις προϋποθέσεις αλληλούχησης.

Πίνακας 4.1 Περίληψη παραμέτρων αλληλούχησης.

SXS_ID	Συγκέντρωση (nM)	Εμπλουτισμός (Yield) (Mb)	Clusters (#)	Ποιότητα (%>Q30)
102742-001-013	12,88	10.933	43.384.410	89,44
102742-001-014	8,11	5.001	19.849.094	90,59
102742-001-015	12,08	8.701	34.527.051	90,73
102742-001-016	10,67	5.328	21.143.511	88,56
102742-001-017	16,60	5.041	20.003.654	90,88
102742-001-018	15,61	5.227	20.743.687	89,82

4.2.3 Ανάλυση βιοπληροφορικής

4.2.3.1 Προ-επεξεργασία μικρο-αναγνώσεων (reads)

Η αλληλούχηση απέδωσε 159.651.407 μικρο-αναγνώσεις συζευγμένων άκρων (pair ends), μέσου μήκους 125 bp. Πραγματοποιήθηκε αρχικός ποιοτικός έλεγχος με τη χρήση του λογισμικού FastQC v. 0.11.3 (Andrews, 2010) και ακολούθησαν τα κάτωθι στάδια καθαρισμού, καθένα από οποία συνοδεύτηκε εκ νέου από ποιοτικό έλεγχο:

i) Αφαίρεση των μικρο-αναγνώσεων χαμηλής ποιότητας με το λογισμικό πρόγραμμα PRINSEQ v.0.20.4 (Schmieder & Edwards, 2011) και παραμέτρους που ορίστηκαν ως εξής: `-trim_qual_right/left 20 & -trim_tail_right/left 5`.

ii) Αποκοπή (trimming) των προσαρμογών ή εκκινητών από τις μικρο-αναγνώσεις με το λογισμικό πρόγραμμα cutadapt v.1.7.1 (Martin, 2011).

iii) Εκ νέου αφαίρεση των χαμηλής ποιότητας μικρο-αναγνώσεων με το λογισμικό PRINSEQ v.0.20.4 και με ορισθείσες παραμέτρους: `-min_len 90, -min_qual_mean 30, entropy -lc_threshold 50` και `-trim_tail_right/left 5`.

iv) Επανάληψη του σταδίου (ii).

v) Αφαίρεση του ριβοσωμικού RNA με την εφαρμογή του λογισμικού προγράμματος sortMeRNA v.2.0 (Korylova et al., 2012).

Μετά τα παραπάνω διαδοχικά στάδια επεξεργασίας παρέμειναν 123.676.932 μικρο-αναγνώσεις με συζευγμένα άκρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη συναρμογή του μεταγραφώματος.

4.2.3.2 Συναρμογή του μεταγραφώματος και λειτουργική ερμηνεία των αλληλουχιών

Για την συναρμογή του μεταγραφώματος (transcriptome assembly), συγκεντρώθηκαν όλες οι ελεγχθείσες μικρο-αναγνώσεις και ως λογισμικό συναρμογής (assembler) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο, Trinity v.2.0.6 με προορισθείσα παράμετρο, `kmer: 25` (Haas et al., 2013). Το προσχέδιο του μεταγραφώματος που δημιουργήθηκε, ελέγχτηκε για μεταγραφώματα που δεν υποστηρίζονταν από τις μικρο-

αναγνώσεις και τα οποία αφαιρέθηκαν με τη χρήση ενός αρχείου δέσμης ενεργειών (script) της perl, το align_and_estimate_abundance.pl, το οποίο βασίστηκε στα προγράμματα Bowtie2 και RSEM του πακέτου Trinity. Ως παράμετροι με βέλτιστα αποτελέσματα ορίστηκαν, --fpkm_cutoff 0.2 και --isopct_cutoff=1.

Για τη βελτιστοποίηση των επόμενων αναλύσεων πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος και η αφαίρεση των πλεοναζόντων μεταγραφημάτων με τη χρήση του λογισμικού CDHIT (Li & Godzik, 2006).

Με σκοπό τη λειτουργική τους ερμηνεία (annotation), τα ελεγχθέντα μεταγραφήματα ομοπαράτέθηκαν αρχικά (blastx), με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων «nr» του NCBI, με ορισθέν ανώφλι $e=10^{-6}$ και στη συνέχεια (blastn), με νουκλεοτιδική βάση δεδομένων, που προέκυψε από τη συλλογή mRNAs των ακτινοπτερύγιων *Astyanax mexicanus*, *Cynoglossus semilaevis*, *Gadus morhua*, *Gasterosteus oculatus*, *Lepisosteus oculatus*, *Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, *Poecilia Formosa*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Solea solea*, *Solea senegalensis* and *Xiphophorus maculatus* με ορισθέν ανώφλι $e=10^{-9}$.

Η πληρότητα και αρτιότητα του μεταγραφώματος εκτιμήθηκε με το πρόγραμμα CEGMA v.2.5 (Parra et al., 2007) και επιλέχθηκαν τα μετάγραφα με χαμηλές τιμές e ($e < 10^{-30}$) και υψηλή επικάλυψη (>70%) για να απαρτίσουν το μεταγράψωμα αναφοράς. Για την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης, οι μικρο-αναγνώσεις στοιχήθηκαν με τα μετάγραφα αναφοράς των δύο μεταχειρίσεων και των τριών βιολογικών επαναλήψεων, με το λογισμικό πρόγραμμα Bowtie2, και η σχετική γονιδιακή έκφραση εκτιμήθηκε με το αντίστοιχο λογισμικό DESeq2 (Love et al., 2014). Ως όρια για τον χαρακτηρισμό των γονιδίων με διαφορετική έκφραση ορίστηκαν, η τιμή έκφρασης $|\log_2FC| > 1$ και η σημαντικότητα, FDR (Benjamini-Hochberg False Discovery Rate) $< 0,05$. Τα μετάγραφα με διαφορά στην έκφραση, ομοπαράτέθηκαν με αυτά του *Danio Rerio* (blastn, $e < 10^{-9}$) με σκοπό την κατάταξή τους στις κατηγορίες της γονιδιακής οντολογίας (gene ontology), μέσω του λογισμικού πακέτου Cytoscape v.3.2.1. και του λογισμικού BINGO v.3.0.3 με έλεγχο της υπεργεωμετρικής κατανομής, με σημαντικότητα FDR $< 0,05$ (Maere et al., 2005).

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1 Ποιοτική ανάλυση-στατιστικά στοιχεία

Από τις 159.651.407 μικρο-αναγνώσεις συζευγμένων άκρων (pair ends), μέσου μήκους 125 bp της αλληλούχησης, και μετά από σχολαστική και αυστηρή ποιοτική επεξεργασία, προέκυψαν 123.676.932 υψηλής ποιότητας μικρο-αναγνώσεις με συζευγμένα άκρα, με μήκος 100-110 bp, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη εκ νέου συναρμογή του μεταγραφώματος (de novo transcriptome assembly). Η πλήρης συναρμογή του μεταγραφώματος απέδωσε πρωτόλεια 381.106 μοναδικές μονάδες συναρμογής – αλληλουχίες μεταγράφων (contigs). Μετά την αφαίρεση των μεταγραφημάτων που δεν υποστηρίζονταν από τις μικρο-αναγνώσεις, μέσω των προγραμμάτων Bowtie2 και RSEM του πακέτου TRINITY (142.918 contigs), και την εφαρμογή του προγράμματος CD-HIT για την μείωση των επαναλαμβανομένων αλληλουχιών, παρέμειναν 85.932 αλληλουχίες, με σύνολο βάσεων, 70.243.227, τιμή N50, 1.563 bp και μέγιστο μήκος μεταγραφώματος, 29.649 bp. Η ανάλυση της συναρμογής του μεταγραφώματος (αξιολογήθηκε με το λογισμικό CEGMA v.2.5), έδειξε ότι ταυτοποιούνται 214 από τις 248 πρωτεΐνες αναφοράς (core proteins) (86,29%), ως πλήρεις (με μήκος ομοπαράθεσης >70% του μήκους των πρωτεϊνών αναφοράς). Επιπλέον, κατά μέσο όρο εντοπίστηκαν δύο ορθόλογα ανά πρωτεΐνη αναφοράς και το ποσοστό των ευκαρυωτικών γονιδίων αναφοράς (CEGs) που είχαν περισσότερα από ένα ορθόλογο γονίδιο ήταν 50%. Με σκοπό τη λειτουργική τους ερμηνεία, τα ελεγχθέντα μεταγραφήματα (85.932) ομοπαράτέθηκαν (blastx) με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων «nr» του NCBI και αντιστοιχήθηκαν με 56.179 αλληλουχίες από τις οποίες 33.878 μοναδικές στη *Solea solea*. Τα μοναδικά μετάγραφα ήταν περισσότερο συγγενικά με τα είδη, *Larimichthys crocea* 7.898 (23,31%), *Stegastes partitus* 6.406 (18,91%), *Cynoglossus semilaevis* 4.696 (13,86%), *Oreochromis niloticus* 2.011 (5,94%), *Notothenia coriiceps* 1.903 (5,62%) *Neolambrologus brichardi* 884 (2,61%) *Maylandia zebra* 809 (2,39%) όπως περιγράφονται στον παρακάτω **Πίνακα 4.2** αναλυτικά.

Πίνακας 4.2 Συναρμογή του μεταγραφώματος του είδους *Solea solea* και η συγγένεια των μεταγραφημάτων.

A/A	Επιστημονική ονομασία	Πλήθος μεταγράφων	Ποσοστό (%)
1	<i>Larimichthys crocea</i>	7.898	23,31%
2	<i>Stegastes partitus</i>	6.406	18,91%
3	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	4.696	13,86%
4	<i>Oreochromis niloticus</i>	2.011	5,94%
5	<i>Notothenia coriiceps</i>	1.903	5,62%
6	<i>Neolambrologus brichardi</i>	884	2,61%
7	<i>Maylandia zebra</i>	809	2,39%
8	<i>Haplochromis burtoni</i>	705	2,08%
9	<i>Austofundulus limnaeus</i>	678	2,00%
10	<i>Puntamilia nyererei</i>	626	1,85%
11	<i>Fundulus heteroclitus</i>	593	1,75%
12	<i>Nothobranchius furzeri</i>	579	1,71%
13	<i>Takifugu rubripes</i>	550	1,62%
14	<i>Oryzias latipes</i>	484	1,43%
15	<i>Cyprinodon variegatus</i>	470	1,39%
16	<i>Xiphophorus maculatus</i>	386	1,14%
17	<i>Dicentrarchus labrax</i>	341	1,01%
18	<i>Poecilia reticulata</i>	328	0,97%

4.3.2 Γονιδιακή έκφραση

Συνολικά, 233 μετάγραφα του *Solea solea*, καταγράφηκαν να εμφανίζουν διαφορική γονιδιακή έκφραση μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων ($|\log_2FC| > 1$ και $FDR < 0,05$), ατόμων φυσιολογικών και αμφιχρωματικών. Από αυτά, μετά την

ομοπαράθεση με το είδος *Danio rerio*, ταυτοποιήθηκαν και κατατάχθηκαν στις κατηγορίες γονιδιακής οντολογίας 158 γονίδια, **Πίνακας 4.3 & Εικόνα 4.1**

Πίνακας 4.3 Λειτουργική ερμηνεία των μεταγράφων με διαφορές στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων ($|\log_2FC| > 1$ και $FDR < 0,05$).

A/A	ENSEMBL_GENE_ID	Name
1	ENSDARG00000058558	leucine zipper, putative tumor suppressor family member 3b(lzts3b)
2	ENSDARG00000100851	gephyrin b(gphnb)
3	ENSDARG00000003938	replication protein A1(rpa1)
4	ENSDARG00000010042	dynamamin 1a(dnm1a)
5	ENSDARG00000099399	thyroid hormone responsive(thrsp)
6	ENSDARG00000061918	complexin 2(cplx2)
7	ENSDARG00000062116	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like b(ctdsplb)
8	ENSDARG00000074745	zmp:0000000760(zmp:0000000760)
9	ENSDARG00000061817	kinesin family member 1Aa(kif1aa)
10	ENSDARG00000015059	dishevelled associated activator of morphogenesis 1a(daam1a)
11	ENSDARG00000001676	glycoprotein M6Bb(gpm6bb)
12	ENSDARG00000097539	si:ch211-39f2.3(si:ch211-39f2.3)
13	ENSDARG00000014792	leucine rich repeat containing 4Bb(lrcc4bb)
14	ENSDARG00000057571	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)(pgam2)
15	ENSDARG00000102702	leucine-rich repeat neuronal protein 3-like (LOC100535105)
16	ENSDARG00000034215	RAB42, member RAS oncogene family a(rab42a)
17	ENSDARG00000007824	calmodulin binding transcription activator 1b(camta1b)
18	ENSDARG00000036086	integrin, alpha 11a(itga11a)
19	ENSDARG00000058323	transmembrane BAX inhibitor motif containing 1(tmbim1)
20	ENSDARG00000029524	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1b(impdh1b)
21	ENSDARG00000036830	keratin 91(krt91)
22	ENSDARG00000057590	si:ch1073-396h14.1(si:ch1073-396h14.1)
23	ENSDARG00000104937	protein tyrosine phosphatase, receptor type D(ptprd)
24	ENSDARG00000025301	glial fibrillary acidic protein(gfap)
25	ENSDARG00000098344	RAB18B, member RAS oncogene family(rab18b)
26	ENSDARG00000006456	platelet-derived growth factor receptor-like(pdgfrl)
27	ENSDARG00000017314	zgc:92041(zgc:92041)
28	ENSDARG00000069888	claudin a(cldna)
29	ENSDARG00000004527	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)(pin4)
30	ENSDARG00000042948	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5aa(dnajc5aa)
31	ENSDARG00000060345	apolipoprotein Da, duplicate 1(apoda.1)
32	ENSDARG00000074524	contactin associated protein 1(cntnap1)
33	ENSDARG00000025206	synaptotagmin IIa(syt2a)
34	ENSDARG00000057016	cell division cycle 14Ab(cdc14ab)
35	ENSDARG00000041430	bone morphogenetic protein 2b(bmp2b)

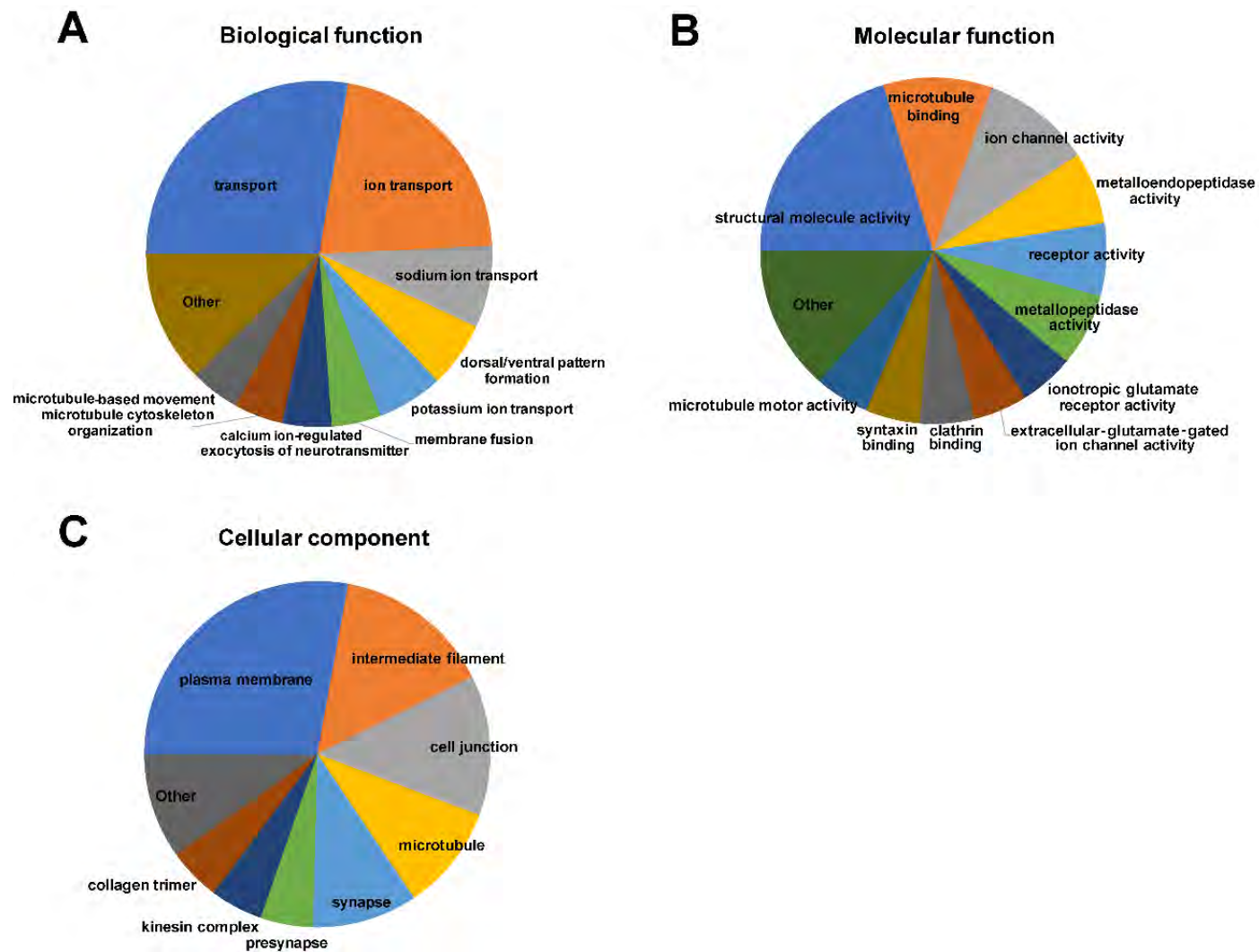
36	ENSDARG00000015554	zic family member 2 (odd-paired homolog, Drosophila), a(zic2a)
37	ENSDARG00000034817	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1b(asah1b)
38	ENSDARG00000015931	si:ch211-214j24.9(si:ch211-214j24.9)
39	ENSDARG00000004472	alpha tubulin acetyltransferase 1(ata1)
40	ENSDARG00000092731	major histocompatibility complex class I UKA(mhc1uka)
41	ENSDARG00000036584	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5(st8sia5)
42	ENSDARG00000040628	zgc:110333(zgc:110333)
43	ENSDARG00000099203	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2a polypeptide(atp1b2a)
44	ENSDARG00000056206	Ca/calmodulin-dependent prot. kin. (CaM kinase) II gamma 2(camk2g2)
45	ENSDARG00000036832	type I cytokeratin, enveloping layer, like(cyt1)
46	ENSDARG00000004358	guanine nucleotide bind. prot. (G protein), beta polypeptide 3a(gnb3a)
47	ENSDARG00000057575	purine nucleoside phosphorylase 4a(pnp4a)
48	ENSDARG00000060434	microtubule-associated protein 1B(map1b)
49	ENSDARG00000018259	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3a polypeptide(atp1a3a)
50	ENSDARG000000104267	periostin, osteoblast specific factor b(postnb)
51	ENSDARG00000000503	syntaxin 1B(stx1b)
52	ENSDARG00000052765	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2b(gria2b)
53	ENSDARG00000070173	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2a(gria2a)
54	ENSDARG00000042837	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3b polypeptide(atp1b3b)
55	ENSDARG00000076321	collagen type XXVIII alpha 1 a(col28a1a)
56	ENSDARG00000053476	lipase, hepatic a(lipca)
57	ENSDARG000000102558	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific, cone, gamma(pde6h)
58	ENSDARG00000073764	si:ch211-113j14.1(si:ch211-113j14.1)
59	ENSDARG00000036834	keratin 92(krt92)
60	ENSDARG00000077721	lysine-rich nucleolar protein 1(knop1)
61	ENSDARG000000103034	cysteine-rich venom protein natrin-1-like(LOC100536500)
62	ENSDARG00000042245	myosin, light chain 13(my13)
63	ENSDARG00000094752	retinal pigment epithelium-specific protein 65b(rpe65b)
64	ENSDARG00000067727	im:7142702(im:7142702)
65	ENSDARG000000100450	bloodthirsty-related gene family, member 21(btr21)
66	ENSDARG00000029692	RUN and FYVE domain containing 3(rufy3)
67	ENSDARG00000023445	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3b(atp2b3b)
68	ENSDARG000000100753	CD36 antigen-like(LOC564077)
69	ENSDARG00000068589	vimentin(LOC572200)
70	ENSDARG00000020609	synaptosomal-associated protein, 25a(snap25a)
71	ENSDARG00000077082	angiotensin II receptor-associated protein(agr2p)
72	ENSDARG00000027963	CaM kinase-like vesicle-associated a(camkva)
73	ENSDARG00000057317	nexilin (F actin binding protein)(nexn)
74	ENSDARG00000002970	synovial sarcoma translocation, chromosome 18 (H. sapiens)(ss18)
75	ENSDARG00000038574	secretogranin II (chromogranin C), b(scg2b)
76	ENSDARG00000097528	si:dkey-7j14.5(si:dkey-7j14.5)
77	ENSDARG00000035338	tubulin polymerization-promoting protein family member 2(tppp2)

78	ENSDARG00000069518	aquaporin 3b(aqp3b)
79	ENSDARG00000023228	visinin-like 1a(vsnl1a)
80	ENSDARG00000101687	microtubule-associated protein 4-like(LOC100001114)
81	ENSDARG00000105490	rabphilin 3A homolog (mouse), b(rph3ab)
82	ENSDARG00000027984	glutathione S-transferase zeta 1(gstz1)
83	ENSDARG00000059601	microtubule-associated protein 1Aa(map1aa)
84	ENSDARG00000078859	G0/G1 switch 2(g0s2)
85	ENSDARG00000100573	si:ch211-255a21.1(si:ch211-255a21.1)
86	ENSDARG00000027740	adenylate cyclase activating polypeptide 1b(adcyap1b)
87	ENSDARG00000104945	synuclein, beta(sncb)
88	ENSDARG00000061436	collagen, type VI, alpha 2(col6a2)
89	ENSDARG00000062531	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3(mapk8ip3)
90	ENSDARG00000078416	zinc finger E-box binding homeobox 2b(zeb2b)
91	ENSDARG00000030614	synaptotagmin Ia(syt1a)
92	ENSDARG00000042014	cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1(cyp11c1)
93	ENSDARG00000015174	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a1b(atp6v0a1b)
94	ENSDARG00000060532	ADAM metallopeptidase domain 22(adam22)
95	ENSDARG00000074561	si:dkey-175a17.3(si:dkey-175a17.3)
96	ENSDARG00000018032	sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha subunit b(scn8ab)
97	ENSDARG00000069484	DAB2 interacting protein a(dab2ipa)
98	ENSDARG00000045676	calumenin a(calua)
99	ENSDARG00000087247	K voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2 a(kcnab2a)
100	ENSDARG00000074866	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5(ptpn5)
101	ENSDARG00000067964	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 5(slc6a5)
102	ENSDARG00000078018	si:dkey-79d12.4(si:dkey-79d12.4)
103	ENSDARG00000027828	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1a(grin1a)
104	ENSDARG00000102415	scinderin like a(scinla)
105	ENSDARG00000062494	olfactomedin-like 1(olfml1)
106	ENSDARG00000021351	neurofilament, medium polypeptide a(nefma)
107	ENSDARG00000098936	kinesin family member 5A, a(kif5aa)
108	ENSDARG00000063133	solute carrier family 4, NaHCO ₃ transporter, member 10a(slc4a10a)
109	ENSDARG00000010052	ndrg family member 3b(ndrg3b)
110	ENSDARG00000105083	chromodomain helicase DNA binding protein 5(chd5)
111	ENSDARG00000062750	si:ch73-74h11.1(si:ch73-74h11.1)
112	ENSDARG00000105188	si:dkey-76i15.1(si:dkey-76i15.1)
113	ENSDARG00000069265	matrilin 3b(matn3b)
114	ENSDARG00000009281	dynamamin 1b(dnm1b)
115	ENSDARG00000076679	retinoic acid induced 1(rai1)
116	ENSDARG00000061647	neurexin 1a(nrxn1a)
117	ENSDARG00000053201	zgc:172323(zgc:172323)
118	ENSDARG00000054723	si:ch211-242b18.1(si:ch211-242b18.1)
119	ENSDARG00000079204	ADAM metallopeptidase domain 11(adam11)

120	ENSDARG00000005775	sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha subunit a(scn8aa)
121	ENSDARG00000101535	collagen, type X, alpha 1b(col10a1b)
122	ENSDARG00000059596	CAP-GLY domain containing linker protein 2(clip2)
123	ENSDARG00000075015	heme-binding protein soul5(soul5)
124	ENSDARG00000062096	peptidase M20 domain containing 1, tandem duplicate 2(pm20d1.2)
125	ENSDARG00000002031	TOX high mobility group box family member 4 a(tox4a)
126	ENSDARG00000097576	zgc:92912(zgc:92912)
127	ENSDARG00000055455	glycoprotein M6Aa(gpm6aa)
128	ENSDARG00000104771	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)(timm44)
129	ENSDARG00000104401	YME1-like 1b(yme1l1b)
130	ENSDARG00000063433	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2(atp2b2)
131	ENSDARG00000057484	serine/arginine-rich splicing factor 2a(srsf2a)
132	ENSDARG00000005762	collagen, type XIV, alpha 1a(col14a1a)
133	ENSDARG00000035329	calpain, small subunit 1 a(capns1a)
134	ENSDARG00000076027	kinesin family member 5C(kif5c)
135	ENSDARG00000056910	neurofascin homolog (chicken) b(nfascb)
136	ENSDARG00000090872	si:dkey-276j7.1(si:dkey-276j7.1)
137	ENSDARG00000007654	N-ethylmaleimide-sensitive factor a(nsfa)
138	ENSDARG00000034670	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2(ube2e2)
139	ENSDARG00000092947	type I cytokeratin, enveloping layer(cyt1)
140	ENSDARG00000102690	regulating synaptic membrane exocytosis 2b(rims2b)
141	ENSDARG00000067509	solute carrier family 24 (Na/K/Ca exchanger), member 4b(slc24a4b)
142	ENSDARG00000028542	si:ch211-114c12.2(si:ch211-114c12.2)
143	ENSDARG00000011956	distal-less homeobox 4a(dlx4a)
144	ENSDARG00000045316	MAP7 domain containing 2b(map7d2b)
145	ENSDARG00000056178	dermatopontin(dpt)
146	ENSDARG00000105182	N-terminal asparagine amidase (ntan1)
147	ENSDARG00000099487	si:ch73-233f7.7 (PCDHGC3)
148	ENSDARG00000091783	si:dkeyp-71f10.5
149	ENSDARG00000100089	calcium/calmodulin-dep. prot. kinase (CaM kinase) II beta 2 (camk2b2)
150	ENSDARG00000102009	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta (ppp2r2d)
151	ENSDARG00000103435	sorbin and SH3 domain containing 1 (sorbs1)
152	ENSDARG00000098203	APC down-regulated 1 (APCDD1)
153	ENSDARG00000103841	Chromosome 25: 23,392,431-23,397,900 (CU024870.1)
154	ENSDARG00000099947	Scaffold KN149855.1: 6,271-9,010 (CABZ01109019.1)
155	ENSDARG00000036086	integrin, alpha 11a (itga11a)
156	ENSDARG00000068989	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1 (gabra1)
157	ENSDARG00000090009	si:ch73-167i17.7
158	ENSDARG00000014232	si:dkey-121j17.5

Με έντονη (bold) γραφή παρουσιάζονται τα γονίδια με μειορρύθμιση στα άτομα με αμφιχρωματισμό σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Εικόνα 4.1



Κατάταξη στις τρεις κατηγορίες της γονιδιακής οντολογίας ($P < 0.05$), A: Βιολογική Λειτουργία, B: Μοριακή Λειτουργία και C: Συστατικό του Κυττάρου.

Από τα 233 μετάγραφα της *Solea solea*, τα 161 εμφάνισαν αυξορρύθμιση και τα 72 μειορρύθμιση στα άτομα με αμφιχρωματισμό. Αντίστοιχα, από τα 158 μετάγραφα που ταυτοποιήθηκαν με τα γονίδια του *Danio rerio*, τα 94 αυξορρυθμίστηκαν ενώ 64 μειορρυθμίστηκαν. Στον **Πίνακα 4.4**, παρουσιάζονται τα μετάγραφα με τις μεγαλύτερες μεταβολές στην έκφραση.

Πίνακας 4.4 Κατάταξη των μεταγράφων που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες αυξομειώσεις στην έκφραση, στα άτομα με αμφιχρωματισμό.

ID	log2FC	Name
ENSDARG00000062116	2,67	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like b(ctdsplb)
ENSDARG00000057484	2,07	serine/arginine-rich splicing factor 2a(srsf2a)
ENSDARG00000101687	1,92	microtubule-associated protein 4-like(LOC100001114)
ENSDARG00000098936	1,67	kinesin family member 5A, a(kif5aa)
ENSDARG00000076679	1,59	retinoic acid induced 1(rai1)
ENSDARG00000067964	1,56	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 5(slc6a5)
ENSDARG00000063133	1,53	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10a(slc4a10a)
ENSDARG00000058558	1,52	leucine zipper, putative tumor suppressor family member 3b(lzts3b)
ENSDARG00000045316	1,51	MAP7 domain containing 2b(map7d2b)
ENSDARG00000060434	1,47	microtubule-associated protein 1B(map1b)
ENSDARG00000061647	1,47	neurexin 1a(nrxn1a)
ENSDARG00000005775	1,45	sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha subunit a(scn8aa)
ENSDARG00000042014	1,45	cytochrome P450, family 11, subfamily C, polypeptide 1(cyp11c1)
ENSDARG00000052765	1,45	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2b(gria2b)
ENSDARG00000056206	1,45	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma 2(camk2g2)
ENSDARG00000042837	1,44	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3b polypeptide(atp1b3b)
ENSDARG00000018259	1,43	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 3a polypeptide(atp1a3a)
ENSDARG00000100089	1,42	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta 2 (camk2b2)
ENSDARG00000057016	1,40	cell division cycle 14Ab(cdc14ab)
ENSDARG00000103435	1,40	sorbin and SH3 domain containing 1 (sorbs1)
ENSDARG00000002031	1,37	TOX high mobility group box family member 4 a(tox4a)
ENSDARG00000068989	1,37	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1 (gabra1)
ENSDARG00000023445	1,37	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3b(atp2b3b)
ENSDARG00000078416	-2,93	zinc finger E-box binding homeobox 2b(zeb2b)
ENSDARG00000035338	-2,86	tubulin polymerization-promoting protein family member 2(tppp2)
ENSDARG00000098344	-2,78	RAB18B, member RAS oncogene family(rab18b)
ENSDARG00000001676	-2,69	glycoprotein M6Bb(gpm6bb)
ENSDARG00000058323	-1,92	transmembrane BAX inhibitor motif containing 1(tmbim1)
ENSDARG00000092947	-1,87	type I cytokeratin, enveloping layer(cyt1)
ENSDARG00000003938	-1,74	replication protein A1(rpa1)
ENSDARG00000017314	-1,63	zgc:92041(zgc:92041)
ENSDARG00000078859	-1,60	G0/G1 switch 2(g0s2)

ENSDARG00000104267	-1,55	periostin, osteoblast specific factor b(postnb)
ENSDARG00000028542	-1,53	si:ch211-114c12.2(si:ch211-114c12.2)
ENSDARG00000062494	-1,52	olfactomedin-like 1(olfml1)
ENSDARG00000101535	-1,50	collagen, type X, alpha 1b(col10a1b)
ENSDARG00000011956	-1,46	distal-less homeobox 4a(dlx4a)
ENSDARG00000104771	-1,45	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)(timm44)
ENSDARG00000029524	-1,40	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 1b(impdh1b)
ENSDARG00000077721	-1,40	lysine-rich nucleolar protein 1(knop1)
ENSDARG00000034670	-1,36	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2(ube2e2)
ENSDARG00000103034	-1,33	cysteine-rich venom protein natrin-1-like (LOC100536500)
ENSDARG00000004358	-1,31	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3a(gnb3a)
ENSDARG00000067727	-1,30	im:7142702(im:7142702)
ENSDARG00000035329	-1,27	calpain, small subunit 1 a(capns1a)
ENSDARG000000094752	-1,27	retinal pigment epithelium-specific protein 65b(rpe65b)
ENSDARG00000015059	-1,27	dishevelled associated activator of morphogenesis 1a(daam1a)

Η ανάλυση των μεταγράφων στην αξιολογημένη βάση βιολογικών δικτύων (pathways - μονοπατιών), “Reactome” (Fabregat et al., 2016), έδειξε είκοσι σημαντικά βιολογικά μονοπάτια με τιμές FDR, μεταξύ $1,02 \cdot 10^{-4}$ και $2,81 \cdot 10^{-11}$, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5**

Πίνακας 4.5 Τα κύρια μονοπάτια που ανιχνεύτηκαν με βάση τα 158 ταυτοποιημένα μετάγραφα για το *Danio rerio*, στη βάση δεδομένων “Reactome”

A/A	Pathway identifier	Pathway name	FDR
1	R-DRE-438066	Unblocking of NMDA receptor, glutamate binding and activation	2,81E-11
2	R-DRE-936837	Ion transport by P-type ATPases	3,47E-10
3	R-DRE-6805567	Keratinization	3,97E-10
4	R-DRE-6809371	Formation of the cornified envelope	3,97E-10
5	R-DRE-446107	Type I hemidesmosome assembly	4,83E-09
6	R-DRE-5578775	Ion homeostasis	2,09E-08
7	R-DRE-442755	Activation of NMDA receptor and postsynaptic events	4,01E-08
8	R-DRE-399710	Activation of AMPA receptors	8,50E-07
9	R-DRE-112314	Neurotransmitter receptors and postsynaptic signal transmission	8,50E-07
10	R-DRE-416993	Trafficking of GluR2-containing AMPA receptors	3,49E-06
11	R-DRE-399719	Trafficking of AMPA receptors	3,49E-06
12	R-DRE-399721	Glutamate binding, activation of AMPA receptors and synaptic plasticity	3,49E-06
13	R-DRE-983712	Ion channel transport	3,86E-06
14	R-DRE-112315	Transmission across Chemical Synapses	5,62E-06
15	R-DRE-5576891	Cardiac conduction	2,24E-05
16	R-DRE-442729	CREB phosphorylation through the activation of CaMKII	2,70E-05
17	R-DRE-442982	Ras activation upon Ca ²⁺ influx through NMDA receptor	3,53E-05
18	R-DRE-397014	Muscle contraction	8,81E-05
19	R-DRE-1266738	Developmental Biology	8,81E-05
20	R-DRE-5682910	LGI-ADAM interactions	1,02E-04

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συναρμογή του μεταγραφώματος είναι μια χρήσιμη μέθοδος για τη μελέτη των δεδομένων αλληλούχησης, ειδικά για οργανισμούς που δεν χρησιμοποιούνται ως μοντέλα, όπως η είναι η *Solea solea* και των οποίων το γονιδίωμα δεν έχει ακόμα αναλυθεί και καταγραφεί με της νέας γενιάς τεχνικές αλληλούχησης. Στην παρούσα εργασία, η συναρμογή του μεταγραφώματος έγινε ανεξάρτητα από το γονιδίωμα του είδους. Η ομοιότητα με τα είδη *Larimichthys crocea* (23,31%), *Stegastes partitus* (18,91%) και *Cynoglossus semilaevis* (13,86%), θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ώστε τα παραπάνω γονιδιώματα να χρησιμοποιηθούν ως γονιδιώματα αναφοράς για την καλύτερη λειτουργική ταυτοποίηση των γονιδίων και των μεταγράφων της γλώσσας. Η σύγκριση της εκ νέου συναρμογής του μεταγραφώματος της *Solea solea*, με ομόλογες αλληλουχίες, μέσω του λογισμικού CEGMA v.2.5, έδειξε ότι το μεταγράψωμα είναι πλήρες και ακριβές.

Σύμφωνα με την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων “Reactome”, από τα είκοσι διαφορετικά μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν τα 158 ταυτοποιημένα μετάγραφα, τα δέκα από αυτά, σχετίζονται με λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, τέσσερα με αναπτυξιακές λειτουργίες, τρία με μυϊκή και καρδιακή λειτουργία, δύο με μεταφορά μικρών μορίων και ένα με την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων.

Αναφορικά με το νευρικό σύστημα, σημαντικό ρόλο έχουν οι υποδοχείς των νευροδιαβιβαστών και η μετάδοση του σήματος στη μετασυναπτική περιοχή. Οι νευροδιαβιβαστές απελευθερώνονται στη συναπτική σχισμή από τους προσυναπτικούς νευρώνες και δεσμεύονται από ειδικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού κέντρου (post-synaptic terminal). Αυτοί οι υποδοχείς είναι είτε ιοντικά κανάλια, είτε υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με την πρωτεΐνη G, οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα από τη μετασυναπτική μεμβράνη στο σώμα των νευρικών κυττάρων (Sheng, 2002).

Η διαδρομή, δέσμευση του γλουταμινικού οξέος – ενεργοποίηση των υποδοχέων AMPA (άλφα-άμινο-ύδροξυ-5-μεθύλ-4-ισοξαζόλη-προπριονικό οξύ) –

πλαστικότητα των συνάψεων, φαίνεται να επηρεάζεται στα άτομα με αμφιχρωματισμό. Η μετάδοση της διέγερσης μέσω των συνάψεων στον εγκέφαλο, πραγματοποιείται από τους υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος μέσω της ενεργοποίησης αμφότερων ιονοτρόπων και μεταβοτρόπων υποδοχέων. Οι ιονοτρόποι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος διαιρούνται σε τρεις υποτύπους (subtypes) ή υποκατηγορίες, σύμφωνα με τις ξεχωριστές φυσιολογικές τους ιδιότητες και τις διαφορές τους ως προς τους συνδέτες (ligands), τους NMDA (N-μεθύλ D-ασπαρτικό οξύ), τους AMPA και τους υποδοχείς του καϊνικού οξέος (Cull-Candy et al., 2006; Lee, 2006; Kessels & Malinow, 2009). Είναι ιοντικά κανάλια του γλουταμινικού οξέος και η σηματοδότηση ξεκινά με την εισροή ιόντων. Αποτελούνται από υπομονάδες με διαφορετικές δομές που ξεχωρίζουν με βάση τη σύνδεση του αγωνιστή (agonist binding). Οι μεταβοτρόποι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών G-συζευγμένων, με αργή δράση. Η γρήγορη διάδοση της συναπτικής διέγερσης πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων AMPA (Cull-Candy et al., 2006; Lee, 2006; Kessels & Malinow, 2009). Αυτοί οι υποδοχείς αποτελούνται από τέσσερις υπομονάδες, GluR1, GluR2, GluR3 και GluR4, οι οποίες συνδυάζονται για να σχηματίσουν τετραμερή. Η μετασυναπτική διάδοση του σήματος περιλαμβάνει τη δέσμευση του συνδέτη (γλουταμινικό οξύ/AMPA) με τον υποδοχέα AMPA, που έχει ως αποτέλεσμα την εισροή ιόντων Na^+ η οποία προκαλεί την εκπόλωση της μεμβράνης. Σε κατάσταση δυναμικού ηρεμίας, οι υποδοχείς NMDA φράσσονται (blocked) από ιόντα Mg^{++} . Αυτοί ενεργοποιούνται με την εκπόλωση της μεμβράνης και τη σύνδεση τους με το γλουταμινικό οξύ και τη γλυκίνη αφού πρώτα έχει προηγηθεί η ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων (που προκαλούν την εκπόλωση). Οι υποδοχείς NMDA είναι διαπερατοί στα ιόντα Ca^{++} και η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{++} η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αυξορρύθμιση των υποδοχέων AMPA στις συνάψεις που προκαλούν μακράς διάρκειας διέγερση του μετασυναπτικού δυναμικού (Excitatory Post-Synaptic Potential, EPSP), το οποίο είναι η βάση για το σχηματισμό δυναμικού μακράς διάρκειας (Long term Potentiation, LTP) (Cull-Candy et al., 2006; Lee, 2006; Kessels & Malinow, 2009). Το δυναμικό μακράς διάρκειας συνεισφέρει στη συναπτική πλαστικότητα. Το σθένος (strength) των συνάψεων

ενισχύεται είτε μέσω της φωσφορυλίωσης είτε λόγω της αλλαγής του τύπου των υποδοχέων. Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων AMPA αλλάζει τη θέση τους, ενισχύει την αγωγιμότητα των καναλιών και αυξάνει την πιθανότητα ανοίγματός τους.

Όπως προαναφέρθηκε, η επαναλαμβανόμενη προσυναπτική δραστηριότητα προκαλεί μακράς διάρκειας αλλαγές στη μετασυναπτική διάδοση των σημάτων, μεταβάλλοντας τον τύπο και τον αριθμό των υποδοχέων AMPA. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται σε μηχανισμούς διακίνησης (trafficking) οι οποίοι κατά βάση ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση των υπομονάδων GluR1/GluR2 (Kessels & Malinow, 2009).

Ο υποδοχέας GluR1 έχει τέσσερις θέσεις φωσφορυλίωσης. Η σερίνη στη θέση 818 (S818) φωσφορυλιέται από την PKC (Protein Kinase C) και είναι απαραίτητη για το δυναμικό μακράς διάρκειας. Η σερίνη στη θέση 831 (S831) φωσφορυλιέται από την καλμοντουλινοεξαρτώμενη πρωτεΐνη κινάση II (Calmodulin-dependent protein Kinase II, CaMKII), η οποία αυξάνει την μεταφορά-παράδοση των υποδοχέων στις συνάψεις και επιπλέον αυξάνει την αγωγιμότητα των καναλιών. Η θρεονίνη στη θέση 840 (T840) εμπλέκεται στο δυναμικό μακράς διάρκειας. Η σερίνη στη θέση 845 (S845) φωσφορυλιέται από την πρωτεΐνη κινάση A (PKA), η οποία ρυθμίζει το άνοιγμα των καναλιών (Lee, 2006).

Το δυναμικό μακράς διάρκειας προκαλεί μείωση των υποδοχέων AMPA είτε μέσω της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα GluR2 στο κατάλοιπο της σερίνης στη θέση 880, είτε μέσω της αποφωσφορυλίωσης του υποδοχέα GluR1 από την πρωτεΐνη φωσφατάση1, και τις πρωτεΐνες φωσφατάση 2A και 2B (καλσινευρίνη) (Kessels & Malinow, 2009).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επηρεάζεται τόσο η διακίνηση των υποδοχέων AMPA, όσο και των υποδοχέων που περιέχουν την υπομονάδα GluR2. Η διακίνηση των υποδοχέων που φέρουν την υπομονάδα GluR2, κυριαρχείται από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνη-πρωτεΐνη οι οποίες ρυθμίζονται μέσω της φωσφορυλίωσης. Υπό συνθήκες επαναλαμβανόμενης προσυναπτικής δραστηριότητας υπάρχει απομάκρυνση των υποδοχέων που στερούνται της υπομονάδας GluR2 και επιλεκτική ενσωμάτωση στις

συνάψεις των υποδοχέων AMPA που περιέχουν την υπομονάδα GluR2. Στη διαδικασία αυτή της επιλεκτικής αντικατάστασης των υποδοχέων AMPA, εμπλέκονται η πρωτεΐνη που αλληλοεπιδρά με την C κινάση (Protein Interacting with C Kinase, PICK) και η πρωτεΐνη NSF (N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion Protein) με ρόλους την διανομή και μεταφορά στη συναπτική περιοχή (Liu & Cull-Candy, 2005; Kropf et al., 2008) των υποδοχέων AMPA που περιέχουν την υπομονάδα GluR2. Η δράση της πρωτεΐνης NSF με ιδιότητες ΑΤΡάσης, αποσπά την πρωτεΐνη PICK από την υπομονάδα GluR2, διατηρώντας τους υποδοχείς στη κυτταρική μεμβράνη (σύναψη). Σημειωτέων, ότι οι υποδοχείς που φέρουν την υπομονάδα GluR2 ανακυκλώνονται συνεχώς από τα κυτταρικά ενδοσωμάτια στις συνάψεις και αντίστροφα. Σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκονται οι πρωτεΐνες PICK και GRIP (Glutamate receptor interacting protein) όπου ανταγωνίζονται για τη σύνδεση με την υπομονάδα GluR2 στο C-τελικό άκρο καθώς και η PKC (Lu & Ziff, 2005).

Τα αποτελέσματα της εργασίας φαίνεται να σχετίζονται άμεσα και με την ενεργοποίηση των υποδοχέων AMPA. Οι υποδοχείς είναι λειτουργικά διαπερατοί ή μη διαπερατοί στα ιόντα Ca^{++} , ανάλογα με τη σύσταση των υπομονάδων. Η διαπερατότητα στα ιόντα ασβεστίου καθορίζεται από την ύπαρξη της υπομονάδας GluR2 η οποία υφίσταται μετα-μεταγραφική τροποποίηση με την αλλαγή του καταλοίπου γλουταμίνης (Q) στον πόρο σε αργινίνη (R). Οι υποδοχείς AMPA διαπερατοί στα ιόντα ασβεστίου, επιτρέπουν επίσης τη διέλευση μόνο ιόντων νατρίου (Na^{+}). Γενικά, οι γλουταμινεργικοί νευρώνες περιέχουν υποδοχείς μη διαπερατούς στα ιόντα ασβεστίου. Ωστόσο, ορισμένες συνάψεις περιέχουν ανάμεικτα διαπερατούς και μη-διαπερατούς υποδοχείς AMPA (Mosbacher et al., 1994). Οι υπομονάδες GluR1-4 κωδικοποιούνται από τέσσερα γονίδια, ωστόσο λόγω του εναλλακτικού ματίσματος μπορεί να δημιουργηθούν διαφορετικές ως προς το μήκος λειτουργικές υπομονάδες (ισομορφές flip-flop), δηλαδή, μακριές και βραχείς δομές (τύποι) των υπομονάδων GluR1 και 2. Η υπομονάδα GluR4 έχει μόνο μακρύ τελικό άκρο και η υπομονάδα GluR3, μόνο βραχύ. Εκτός από διαφορές στο μήκος του τελικού άκρου, οι ισομορφές flip/flop εμφανίζουν αλλαγές που οφείλονται στην ανταλλαγή των εξωνίων που κωδικοποιούν την τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης, προς το C-τελικό άκρο. Οι

ισομορφές αυτές, καθορίζουν το λόγο (rate) «αποαισθητοποίησης» / «επαναισθητοποίησης» (desensitization/resensitization), καθώς και το ρυθμό κλεισίματος του καναλιού (πόρου). Τα ομομερή ή ετερομερή των υποδοχέων που απαρτίζονται από τις υπομονάδες GluR1-4, δημιουργούν ένα σύνολο υποδοχέων AMPA με διαφορετικές λειτουργίες και ιδιότητες (Pei et al., 2007; Mosbacher et al., 1994;).

Εκτός από την ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων, η ανάλυση μέσω της βάσης δεδομένων “Reactome”, έδειξε και την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA, και των συνοδών μετασυναπτικών γεγονότων. Όπως προαναφέρθηκε, οι υποδοχείς NMDA είναι μια κατηγορία των ιονοτρόπων υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος που ενεργοποιούνται από τον αγωνιστή του γλουταμινικού οξέος, το N-μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ. Η ενεργοποίησή τους περιλαμβάνει το άνοιγμα των ιοντικών πόρων που επιτρέπουν την εισροή ιόντων ασβεστίου. Αυτή η κατηγορία υποδοχέων είναι στο επίκεντρο των αλλαγών που σχετίζονται με το σθένος των συνάψεων και τη συναπτική πλαστικότητα και συνδέονται με τη μάθηση και τη μνήμη. Ένα χαρακτηριστικό τους γνώρισμα που τους διαφοροποιεί από τους υπόλοιπους υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος είναι ότι απαιτούν διπλή ενεργοποίηση, μέσω του μεταβολής του δυναμικού και την πρόσδεση συνδέτη. Όταν η μεμβράνη βρίσκεται σε δυναμικό ηρεμίας, οι υποδοχείς NMDA είναι φραγμένοι από ιόντα μαγνησίου (Mg^{++}). Αυτή η τασο-εξαρτώμενη φραγή, αναστέλλεται από την εκπόλωση της μετασυναπτικής μεμβράνης από την εισροή ιόντων Na^+ και από την εκροή ιόντων K^+ από το κύτταρο. Τα ιόντα Mg^{++} αποβάλλονται από τον υποδοχέα ο οποίος είναι έτοιμος να δεχθεί τους συνδέτες. Σύμφωνα με τα δεδομένα της εργασίας, η εκπόλωση της μεμβράνης μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση των υποδοχέων AMPA μη διαπερατών σε ιόντα Ca^{++} οι οποίοι όμως διευκολύνουν την εισροή ιόντων Na^+ , τα οποία με τη σειρά τους συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA. Αντίστοιχα, η συνδετο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση απαιτεί την συν-ενεργοποίηση δύο συνδετών, του γλουταμινικού οξέος και της γλυκίνης. Επιπλέον, οι υποδοχείς NMDA ενεργοποιούνται μόνο με ταυτόχρονη ενεργοποίηση των προ- και μετα-συναπτικών κυττάρων. Με την ενεργοποίησή των παραπάνω υποδοχέων επιτρέπεται η εισροή ιόντων Ca^{++} και ξεκινά ένας καταρράκτης

μοριακών σηματοδοτήσεων που εμπλέκονται στη διαδικασία της μάθησης και της μνήμης.

Από τα δεδομένα προκύπτει η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των υποδοχέων NMDA και της εισροής ιόντων Ca^{++} μέσω της πρωτεΐνης RasGRF (παράγοντας Ras απελευθέρωσης νουκλεοτιδίων γουανίνης, Ras Guanine nucleotide Releasing Factor). Η δέσμευση της RasGRF με το σύμπλοκο Ca^{++} /καλμοντουλίνης, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{++} οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras με ρόλο την ανταλλαγή GDP (διφωσφορική γουανοσίνη) σε GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη) (Krapivinsky et al., 2003).

Από την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA στο μετασυναπτικό νευρώνα ξεκινά η διαδρομή, ιόντα Ca^{++} – ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης – ενεργοποίηση της πρωτεΐνης κινάση A (PKA) – φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της CREB (πρωτεΐνη απόκρισης στο κυκλικό-AMP, Cyclic-AMP Response Element Binding protein) επαγόμενης μεταγραφής (Miyamoto, 2006). Σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της CREB διαδραματίζει η κινάση CaMKII, καθώς η φωσφορυλίωση του κατάλοιπου σερίνης στη θέση 133 της πρωτεΐνης CREB από την CaMKII. Αυτό το γεγονός πυροδοτεί τη μεταγραφή μιας ομάδας γονιδίων που οδηγούν στη σύνθεση πρωτεϊνών και σε μακράς διάρκειας αλλαγές στις συνάψεις στο πλαίσιο της συναπτικής πλαστικότητας (Wu & McMurray, 2001).

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα της ανάλυσης διαδρομών (μονοπατιών), φαίνεται να επηρεάζεται μια σημαντική διεργασία που αφορά στην αναπτυξιακή βιολογία των συνάψεων και συγκεκριμένα στις αλληλεπιδράσεις της οικογένειας πρωτεϊνών LGI (απενεργοποιημένες πρωτεΐνες του γλοιώματος, πλούσιες σε λευκίνη, leucine-rich glioma inactivated) με την οικογένεια πρωτεϊνών ADAM (μία δισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση, a disintegrin and metalloproteinase). Ο σχηματισμός των συνάψεων και η ωρίμανσή τους απαιτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των προσυναπτικών και μετασυναπτικών νευρώνων. Σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις μεσολαβούν διάφορες ομάδες συναπτογόνων (synaptogenic) πρωτεϊνών (Kegel et al., 2013). Ο αρχικός σχηματισμός των συνάψεων απαιτεί τόσο τη σύνδεση των

εκκρινόμενων πρωτεϊνών στους προσυναπτικούς και μετασυναπτικούς υποδοχείς όσο και την άμεση σύνδεση μεταξύ των προσυναπτικών και μετασυναπτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Μια κατηγορία μορίων που παίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις για την ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος είναι η οικογένεια πρωτεϊνών LGI. Αυτές είναι εκκριτικές συναπτογόνες πρωτεΐνες που αποτελούνται από μια επαναλαμβανόμενη περιοχή, πλούσια σε λευκίνη και από μια περιοχή που στον άνθρωπο σχετίζεται με την επιληψία, περιοχή EPTP (epitemprin) (Gu, 2002). Αμφότερες οι πρωτεϊνικές περιοχές εμπλέκονται με αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνη-πρωτεΐνη. Γενετικές και βιοχημικές ενδείξεις υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός δράσης των LGI πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη σύνδεσή τους με ένα υποσύνολο υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας που ανήκουν στην οικογένεια ADAM (ADAM11, ADAM22 & ADAM23). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών, μεσολαβώντας στη συναπτική μετάδοση και στην μυελινοποίηση (myelination) (Seals & Courtneidge, 2003; Novak, 2004; Kegel et al., 2013). Η ισομορφή LGI1 είναι κι αυτή μια εκκριτική πρωτεΐνη που αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας ADAM. Αν και μεταλλάξεις της συνδέονται στον άνθρωπο με την επιληψία, ωστόσο η ακριβής λειτουργία της στο ΚΝΣ παραμένει ασαφής. Φαίνεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετάδοσης σημάτων στις διεγερτικές συνάψεις και στην ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας (Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, 2006; Xie et al., 2015). Η LGI1 συνδέεται ταυτόχρονα με τις εξωκυτταρικές περιοχές των πρωτεϊνών ADAM22 και ADAM23 μέσω της περιοχής EPTP, ενισχύοντας και σταθεροποιώντας τις διεγερτικές συνάψεις (Fukata et al., 2010). Η σύνδεση με την ADAM23, ρυθμίζει το «ψαλίδισμα» των δενδριτών και στην απαλοιφή των συνάψεων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Owuor et al., 2009; Zhou et al., 2009). Αντίστοιχα, η LGI1 και η ADAM22 σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη PSD95 (πρωτεΐνη μετασυναπτικής πύκνωσης, postsynaptic density protein 95). Η τελευταία συνδέεται με την πρωτεΐνη σαργαζίνη, διαμεμβρανική ρυθμιστική υπομονάδα του υποδοχέα AMPA, που είναι σημαντική για τη διακίνηση και για τον έλεγχο εισόδου του υποδοχέα AMPA (Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, 2006). Η σύνδεση της LGI1 ταυτόχρονα με τις ADAM23 και ADAM22, φέρνει κοντά

της προ- και μετασυναπτικές μεμβράνες, σταθεροποιώντας τες και ενισχύοντας τη νευροδιαβίβαση (Fukata et al., 2010). Η πρωτεΐνη ADAM11 είναι απαραίτητη για την καθαυτού νευρωνική λειτουργία. Μύες με ανεπάρκεια στην ADAM11 εμφάνισαν προβλήματα στη μάθηση, στο συντονισμό των κινήσεών τους και σε νοητικές αποκρίσεις (Takahashi et al., 2006a; Takahashi et al., 2006b).

Τέλος, η ισομορφή LGI3 εκφράζεται στα περιφερικά νεύρα και αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες ADAM22, ADAM 23 και την *syntaxin1* (συνταξίνη1) στο προσυναπτικό σύμπλοκο SNARE (SNAP/RE, Soluble NSF Attachment Protein/Receptor). Η παρούσα έχει πολλαπλούς ρόλους, όπως την επαγωγή της αύξησης των νευριτών και τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών AKT (protein kinase B) και FAK (focal adhesion kinase), που είναι υπεύθυνες για τη μεταγωγή των σημάτων (Park et al., 2010). Επίσης, προάγει την ενδοκυττάρωση του βήτα-αμυλοειδούς και της συνταξίνης1 (Okabayashi & Kimura, 2010, 2008; Kimura et al., 2007).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σημαντική συμμετοχή έχουν τα μετάγραφα που αφορούν στα ιοντικά κανάλια και ιδιαίτερα στη μεταφορά ιόντων μέσω του ΑΤΡασών του τύπου «P» (atp2b2, atp2b3b, atp1a3a, atp1b2a, atp1b3b & camk2g2). Οι ΑΤΡάσες τύπου «P» (E1 -E2 ΑΤΡάσες) είναι μια μεγάλη ομάδα που σχετίζεται εξελικτικά με αντλίες ιόντων που απαντώνται στα βακτήρια, στα αρχαία και στους ευκαρυώτες. Καταλύουν την αυτοφωσφορυλίωση ενός συντηρημένου καταλοίπου ασπαρτικού οξέος εντός της αντλίας. Όλες φαίνεται να μετασχηματίζονται μεταξύ τουλάχιστον δύο διαμορφώσεων, E1 και E2. Πολλά μέλη από αυτή την οικογένεια πρωτεϊνών, μεταφέρουν ένα μεγάλο εύρος κατιόντων (Kühlbrandt, 2004). Κύρια επίδραση των προαναφερθέντων ΑΤΡασών παρουσιάζεται στην ιοντική ομοιόσταση και όπως περιγράφεται στη βάση δεδομένων “Reactome”, παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιακή λειτουργία.

Μια διαδικασία που φαίνεται να διαφοροποιείται μεταξύ των φυσιολογικών ατόμων και ατόμων με αμφιχρωματισμό είναι και η διαδικασία της κερατινοποίησης. Οι κερατίνες είναι οι σημαντικότερες δομικές πρωτεΐνες της επιδερμίδας των σπονδυλωτών και αποτελούν το 85% ενός πλήρους διαφοροποιημένου

κερατινοκυττάρου. Οι κερατίνες ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων που σχηματίζουν α-έλικας, συσπειρωμένα διμερή, τα οποία συνδέονται πλευρικώς και από άκρη εις άκρη για να σχηματίσουν ινίδια με διάμετρο περίπου 10 nm. Τα ινίδια κερατίνης είναι ετεροπολυμερή που αποτελούνται ισόποσα από κερατίνες οξικού τύπου I και κερατίνες βασικού/ουδέτερου τύπου II (Fuchs, 1995). Στον άνθρωπο υπάρχουν 54 γονίδια κερατίνης (Schweizer et al., 2006). Αυτά Έχουν εξαιρετικά πρότυπα έκφρασης, που σχετίζονται με το είδος του επιθηλίου και το στάδιο διαφοροποίησης. Τα ινίδια κερατίνης διατρέχουν το κυτταρόπλασμα και συνδέονται με άλλες μεμβρανικές δομές (Waschke, 2008). Αυτό αντανακλά την κύρια λειτουργία τους, δηλαδή να διατηρούν τη μηχανική σταθερότητα του κυττάρου και του επιθηλιακού ιστού (Moll et al., 2008). Επιπλέον, διαφορές παρατηρήθηκαν και κατά τα στάδια σχηματισμού του κεράτινου περιβλήματος (cornified envelope, CE) και ιδιαίτερα κατά τον πολυμερισμό των ενδιάμεσων ινιδίων φιλαγκρίνης (fillagrin, FLG) και κερατίνης. Αυτό το στάδιο διευκολύνει την κατακάθιση και διεύρυνση-πλάτεμα των κυττάρων στο εξωτερικό της επιδερμίδας και τη δημιουργία φολίδων (squamous) (Mack et al., 1993; Gruber et al., 2011). Ανωμαλίες κατά το σχηματισμό του κεράτινου περιβλήματος σχετίζονται με δυσλειτουργίες φραγής και δομικά ελαττώματα στις συνδέσεις των δεσμοσωμάτων (Candi et al., 2005). Για τα ελαττώματα στα δεσμοσώματα, υπεύθυνη είναι η πρωτεΐνη PERP (p53 effector related to PMP-22), που εκφράζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Attardi et al., 2000; Ihrie et al., 2005).

4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Υπάρχουν κυρίως δύο υποθέσεις οι οποίες εξηγούν τις αιτίες των χρωστικών ανωμαλιών, κυρίως τον αλμπινισμό, στα πλατύψαρα: i) Η διατροφική ανεπάρκεια κυρίως σε βιταμίνη Α, εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ (DHA) και φωσφολιπίδια που έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των ορμονικών μονοπατιών (Kanazawa, 1993) και ii) Η κατά τόπους αποτυχία διαφοροποίησης ή η έκτοπη διαφοροποίηση των μελανοφόρων και λοιπών χρωστικών κυττάρων (Bolker, 2000).

Αμφότερες οι υποθέσεις, θέτουν ως κύρια ερωτήματα: «Πως εγκαθίσταται η πλευρική ασυμμετρία»; «Πως τα ίδια σηματοδοτικά μόρια, όπως οι ορμόνες,

ερμηνεύονται διαφορετικά σε τοπικό επίπεδο»; «Μπορεί η διαφορετική ιστολογική ταυτότητα μεταξύ της τυφλής και της οφθαλμικής πλευράς να ελέγχει άμεσα την διαφοροποίηση των χρωστικών κυττάρων»; Εναλλακτικά, αν η χρωματική ανάπτυξη χρειάζεται ένα ορμονικό έναυσμα, πρέπει να υπάρχει κατάντι, ένας μηχανισμός που να μεταφράζει την πληροφορία με διαφορετικό τρόπο για την κάθε πλευρά (Bolker, 2000).

Στο παρόν κεφάλαιο, συγκρίναμε τα μεταγραφώματα δύο ομάδων, φυσιολογικά άτομα με άτομα αμφίπλευρα χρωματισμένα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα άτομα με αμφιχρωματισμό παρουσιάζουν αποκλίνουσα λειτουργία κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος σε επίπεδο συνάψεων, καθώς και των ιοντικών καναλιών που επηρεάζουν την μυϊκή και καρδιακή λειτουργία. Αυτό που καταγράφηκε ήταν οι επιπτώσεις των χρωματικών ανωμαλιών, καθώς και η στενή σύνδεση των χρωματικών κυττάρων με την ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων και του νευρικού συστήματος, όπως αναφέρεται στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία.

Ο χρωματισμός είναι μια οργανογενετική διαδικασία η οποία διαταράσσεται εύκολα. Οι μη κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να επηρεάζουν την ποιότητα των ωών και επομένως τη φυσιολογική ανάπτυξη των χρωματοφόρων κυττάρων των απογόνων. Κάθε περιβαλλοντική καταπόνηση, κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, θα μπορούσε να επηρεάζει το χρωματισμό. Ωστόσο, ο ρόλος του στρες κατά τα στάδια ανάπτυξης του χρωματισμού παραμένει άγνωστος (Venizelos & Benetti, 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Τελικά Συμπεράσματα & Προοπτικές

Ορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες των πρώτων σταδίων της ζωής. Στο παρόν πόνημα, μελετώντας την έκφραση και τον πολυμορφισμό σε ορισμένα ομοιοτικά γονίδια, καταδείχτηκε ότι το ομοιοτικό γονίδιο *hoxa2b* σχετίζεται σημαντικά με τη εμβρυϊκή βιωσιμότητα παρουσιάζοντας υψηλή συχνότητα πολυμορφισμού και σημαντική εξελικτική απόκλιση με το παράλογό του *hoxa2a*, υποδηλώνοντας μια τάση λειτουργικής διαφοροποίησης. Σε συνδυασμό οι δύο αυτές παρατηρήσεις, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι πρωτοεμφανιζόμενες νέες δομικές και λειτουργικές ιδιότητες έχουν σημαντικό ρόλο στις αναπτυξιακές διαδικασίες της *Solea solea*. Επιπλέον, η πρώιμη ανίχνευση του *hoxa13a*, ενδεχομένως να συντελεί στην πρόωρη διακοπή των αναπτυξιακών λειτουργιών των εμβρύων οδηγώντας στη θνησιμότητα. Από την ανάλυση κυρίων συνιστωσών, καταγράφηκε ότι το πρότυπο έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων στις 48 hpf διαφέρει ανάλογα με την προέλευσή τους, δηλαδή από άγριους αλιευμένους γεννήτορες (P) ή από γεννήτορες πρώτης γενιάς (G1). Ένα νέο βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης DHA, που περιλαμβάνει τα ένζυμα Δ4-λιπο-ακυλ-αποσατουράση και επιμηκυνάση5 μελετήθηκε, η ενεργοποίηση του οποίου καταγράφηκε τόσο σε εμβρυϊκό, όσο και σε νυμφικό επίπεδο. Η ποιοτική προσέγγιση, μέσω της οπτικοποίησης των δεδομένων της γονιδιακής έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια είχε ως στόχο την αντιπροσωπευτικότερη απεικόνιση των επιστημονικών δεδομένων σε συμφωνία με τις στατιστικές και ποσοτικές αναλύσεις. Τέλος, η σύγκριση μεταγραφώματος μεταξύ, φυσιολογικών ατόμων, με αμφίπλευρα χρωματισμένα άτομα έδειξε ότι τα άτομα με αμφιχρωματισμό παρουσιάζουν αποκλίνουσα λειτουργία, κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος σε επίπεδο συνάψεων, καθώς και διαφορές στην έκφραση των ιοντικών καναλιών που επηρεάζουν την μυϊκή και καρδιακή λειτουργία.

Η μελέτη του πολυμορφισμού σε επίπεδο μεμονωμένων γονιδίων (αλληλόμορφα & γονότυποι) και σε επίπεδο απλοτύπων θα μπορούσε να δώσει

σημαντικές πληροφορίες για την καταγραφή «επιβλαβών» αλλαγών που οδηγούν στη θνησιμότητα ή σε μειωμένη βιωσιμότητα και εφαρμογή αυτής της γνώσης σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Ιδιαίτερο ρόλο έχουν οι διαδοχικές επαναλήψεις (TRP) οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή μεταλλαξιμότητα σε ότι αφορά το μήκος των επαναλήψεων, επηρεάζοντας τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών καθώς και τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για σύντομες χρονικές περιόδους και η σχέση τους με τους μηχανισμούς μεθυλίωσης του DNA σε συνθήκες καταπόνησης. Επιπλέον, τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι τα ομοιοτικά γονίδια, θα μπορούσαν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την σωστή ανάπτυξη των εμβρύων *Solea solea*, ώστε να καταστεί όσο το δυνατό αποδοτικότερη η εκτροφή διαφορετικών ομάδων γεννητόρων, ιδιαίτερα γεννητόρων πρώτης γενιάς, με δυνατότητα αναπαραγωγής καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, μειώνοντας το κόστος παραγωγής και «συγχρονίζοντας» τις συνθήκες εκτροφής με τους βιολογικούς ρυθμούς του είδους. Τέλος, οι τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς, καθιστούν ολοένα και πιο εύκολη την ολιστική προσέγγιση και μελέτη των προτύπων έκφρασης όλων των βιοχημικών και μοριακών δικτύων και τον εντοπισμό κρίσιμων διαφορών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η σύνδεση ενός χαρακτηριστικού, όπως είναι ο χρωματισμός, που εμφανίζεται σε ύστερο στάδιο από την εμβρυογένεση, με την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος που συντελείται κυρίως κατά τα πρώτα στάδια της ζωής, συνηγορούν ώστε ο χρωματισμός είναι μια οργανογενετική διαδικασία η οποία διαταράσσεται εύκολα από τις συνθήκες κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια κάνοντας επιτακτική την ανάγκη διερεύνησης του ρόλου της καταπόνησης κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής.

Τα αποτελέσματα του παρόντος πονήματος, φιλοδοξούν να συνεισφέρουν στο κλάδο των υδατοκαλλιεργειών και ειδικότερα στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης που εφαρμόζονται στα είδη υψηλής εμπορικής αξίας όπως ο σολομός, η πέστροφα, ο κυπρίνος η τιλάπια και ελπίζουμε σύντομα στη γλώσσα. Οι πρόσφατες επιστημονικές εξελίξεις που αφορούν στην αναπαραγωγή υδρόβιων οργανισμών, σε αντιδιαστολή με τις παραδοσιακές μεθόδους ζωικής παραγωγής, έχουν ως στόχο την παραγωγή πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας για την ανθρωπότητα. Η παρούσα εργασία θα

μπορούσε να επικεντρώσει το ενδιαφέρον των εκτροφών και των επιστημόνων να ασχοληθούν επισταμένως για το ρόλο που διαδραματίζει ο γενετικός πολυμορφισμός και η γονιδιακή έκφραση των ομοιοτικών γονιδίων *hox* στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια της *Solea solea*. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι μεγαλύτερες απώλειες που παρατηρούνται κατά την εκτροφή της γλώσσας είναι στα πρώτα εμβρυϊκά στάδια και κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης του είδους. Η παρούσα μελέτη στόχευσε στη γονιδιακή έκφραση και πολυμορφισμό σημαντικών γονιδίων, που δρουν ως παράγοντες μεταγραφής και επηρεάζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού κατά τα πρώτα στάδια της ζωής. Η ανακάλυψη γενετικών δεικτών που συνδέονται με επιθυμητά χαρακτηριστικά και αυξημένη βιωσιμότητα, θα μπορούσε να οδηγήσει σε εξοικονόμηση χρόνου και χρήματος στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης και στην κατανόηση των λόγων υψηλής θνησιμότητας των εμβρύων, νυμφών και ιχθυδίων γλώσσας κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους μέσω της μελέτης της γονιδιακής τους έκφρασης. Επομένως, οι γενετικοί δείκτες θα μπορούσαν να εφαρμοστούν συνεργικά με φαινοτυπικές παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη βιωσιμότητας των ωών και των αποθεμάτων, ιδιαίτερα σε οργανισμούς που στοχεύουν σύντομα να εισαχθούν στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας. Η επιλογή ατόμων με επιθυμητά χαρακτηριστικά θα μπορούσε να συνεισφέρει στην αναπαραγωγική ικανότητα του είδους και κατά συνέπεια στη μείωση του κόστους, βελτιώνοντας την ανταγωνιστικότητα του κλάδου με την εισαγωγή περισσότερων ειδών προς εκτροφή.

Επιπρόσθετα, τα προβλήματα στο χρωματισμό είναι συνηθισμένα στην εκτροφή των πλατυψάρων, μειώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο την αγοραστική αξία των ιχθύων και αυξάνοντας τον κίνδυνο της εξόντωσης των ιχθυδίων που απελευθερώνονται για την ενίσχυση των άγριων αποθεμάτων. Η επιτυχία των επιχειρήσεων υδατοκαλλιέργειας απαιτεί τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης και της υγείας των ψαριών σε όλα τα στάδια της ζωής τους. Αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος σε διάφορους τομείς, ωστόσο, τα αναπτυξιακά ελαττώματα που αφορούν στο χρωματισμό και απαντώνται συνήθως στα εκκολαπτήρια είναι συνηθισμένα. Με την

παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς για τη σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ φυσιολογικά χρωματισμένων ατόμων γλώσσας και άτομα με υπερμελάνωση, καταδείξαμε τα κύρια βιοχημικά και μοριακά μονοπάτια τα οποία φαίνονται να επηρεάζονται. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να εστιάσουν κυρίως στο ρόλο των ιοντικών καναλιών και των προαναφερθέντων στην παρούσα εργασία νευρικών συνάψεων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahn, D. & Ho, R.K. (2008). Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish: Implications for the evolution of vertebrate paired appendages. *Developmental Biology*, 322: 220–233.
- Akam, M. (1998). Hox genes in arthropod development and evolution. *Biological Bulletin*, 195: 373–374.
- Akyol, O. & Şen, H. (2012). First record of abnormal pigmentation in a wild common sole, *Solea solea* L., from the Aegean Sea. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36: 727–729.
- Albà, M.M., Santibáñez-Koref, M.F. & Hancock, J.M. (1999). Conservation of polyglutamine tract size between mice and humans depends on codon interruption. *Molecular biology and evolution*, 16: 1641–1644.
- Amemiya, C.T., Prohaska, S.J., Hill-Force, A., Cook, A., Wasserscheid, J., Ferrier, D.E.K., et al. (2008). The amphioxus Hox cluster: Characterization, comparative genomics, and evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 310: 465–477.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., et al. (1998). Zebrafish Hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, 282: 1711–1714.
- Amores, A., Suzuki, T., Yan, Y., Amores, A., Suzuki, T., Yan, Y., et al. (2004). Developmental Roles of Pufferfish Hox Clusters and Genome Evolution in Ray-Fin Fish. *Genome Research* 14: 1-10.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. & Ørntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64: 5245–5250.
- Andrews, S. (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W. & Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, in a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes and Development*, 14: 704–718.
- Baynes, S.M., Howell, B.R. & Beard, T.W. (1993). A review of egg production by captive sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, 24: 171–180.

- Bjørndal, T., Guillen, J. & Imsland, A. (2016). The potential of aquaculture sole production in Europe: Production costs and markets. *Aquaculture Economics & Management*, 20: 109–129.
- Blonk, R.J.W., Komen, J., Kamstra, A., Crooijmans, R.P.M.A. & van Arendonk, J.A.M. (2009). Levels of inbreeding in group mating captive broodstock populations of Common sole, (*Solea solea*), inferred from parental relatedness and contribution. *Aquaculture*, 289: 26–31. Elsevier B.V.
- Boglino, A., Wishkerman, A., Darias, M.J., de la Iglesia, P., Andree, K.B., Gisbert, E. & Estévez, A. (2014). Senegalese sole (*Solea senegalensis*) metamorphic larvae are more sensitive to pseudo-albinism induced by high dietary arachidonic acid levels than post-metamorphic larvae. *Aquaculture*, 433: 276–287.
- Boglino, A., Wishkerman, A., Darias, M.J., de la Iglesia, P., Estévez, A., Andree, K.B. & Gisbert, E. (2014). The effects of dietary arachidonic acid on Senegalese sole morphogenesis: A synthesis of recent findings. *Aquaculture*, 432: 443–452.
- Bohler, A., Eijssen, L.M.T., van Iersel, M.P., Leemans, C., Willighagen, E.L., Kutmon, M., et al. (2015). Automatically visualise and analyse data on pathways using PathVisioRPC from any programming environment. *BMC bioinformatics*, 16: 267.
- Boldogkői, Z. (2004). Gene network polymorphism is the raw material of natural selection: The selfish gene network hypothesis. *Journal of Molecular Evolution*, 59: 340–357.
- Bolker, J.A. (2000). Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology*, 56: 1029–1052.
- Bolker, J.A., Hakala, T.F. & Quist, J.E. (2005). Pigmentation development, defects, and patterning in summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Zoology*, 108: 183–193.
- Bonacic, K., Campoverde, C., Sastre, M., Hachero-Cruzado, I., Ponce, M., Manchado, M., et al. (2016). Mechanisms of lipid metabolism and transport underlying superior performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) larvae fed diets containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 450: 383–396.
- Burton, D. (1998). The chromatic biology of flatfish (Pleuronectidae). *Italian Journal of Zoology*, 65: 399–403.
- Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6: 328–340.
- Carpenter, E.M. (2002). Hox genes and spinal cord development. *Developmental Neuroscience*,

24: 24–34.

Casaca, A., Santos, A.C. & Mallo, M. (2014). Controlling Hox gene expression and activity to build the vertebrate axial skeleton. *Developmental Dynamics*, 243: 24–36.

Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., et al. (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 268: 64–81.

Crow, K.D., Amemiya, C.T., Roth, J. & Wagner, G.P. (2009). Hypermutability of HOXA13A and functional divergence from its paralog are associated with the origin of a novel developmental feature in zebrafish and related taxa (Cypriniformes). *Evolution*, 63: 1574–1592.

Cull-Candy, S., Kelly, L. & Farrant, M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 16: 288–297.

Davis, A., Scemama, J.L. & Stellwag, E.J. (2008). Japanese medaka Hox paralog group 2: Insights into the evolution of Hox PG2 gene composition and expression in the osteichthyes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 310: 623–641.

Deschamps, J., Akker, E., Forlani, S., De Graaff, W., Oosterveen, T., Roelen, B. & Roelfsema, J. (1999). Initiation, establishment and maintenance of Hox gene expression patterns in the mouse. *International Journal of Developmental Biology*, 43: 635–650.

Devauchelle, N., Alexandre, J.C., Le Corre, N. & Letty, Y. (1987). Spawning of sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture*, 66: 125–147.

Duboule, D. (1998). Vertebrate Hox gene regulation: Clustering and/or colinearity? *Current Opinion in Genetics and Development*, 8: 514–518.

Edgar, R.C. (2009). Muscle. *BMC Bioinformatics* 10: 396. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-396>.

Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567.

Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Garapati, P., Gillespie, M., Hausmann, K., Haw, R., et al. (2016). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 44: D481–D487.

Fails, J.A., Karlson, A., Shahamat, L. & Shneiderman, B. (2006). A visual interface for multivariate

- temporal data: Finding patterns of events across multiple histories. In IEEE Symposium on Visual Analytics Science and Technology 2006, VAST 2006 - Proceedings pp. 167–174.
- Faux, N. (2012). Single amino acid and trinucleotide repeats function and evolution. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 769: 26–40.
- Faux, N.G., Bottomley, S.P., Lesk, A.M., Irving, J.A., Morrison, J.R., De La Banda, M.G. & Whisstock, J.C. (2005). Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. *Genome Research*, 15: 537–551.
- Faux, N.G., Huttley, G.A., Mahmood, K., Webb, G.I., De La Banda, M.G. & Whisstock, J.C. (2007). RCPdb: An evolutionary classification and codon usage database for repeat-containing proteins. *Genome Research*, 17: 1118–1127.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Figueiredo, J. (2012). The Consumption of DHA during Embryogenesis as an Indicative of the Need to Supply DHA during Early Larval Development: A Review. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 3: 1–8.
- Fuchs, E. (1995). Keratins and the Skin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11: 123–154.
- Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, F.M. (2006) Epilepsy-Related Ligand/Receptor Complex LGI1 and ADAM22 Regulate Synaptic Transmission. *Science*, 313, 1792–1795.
- Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., et al. (2010) Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3799–3804.
- Galant, R. & Carroll, S.B. (2002) Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature*, 415: 910–913.
- Gaunt, S.J. (2015). The significance of Hox gene collinearity. *International Journal of Developmental Biology*, 59: 159–170.
- Gibson, G. & Hogness, D.S. (1996). Effect of polymorphism in the *Drosophila* regulatory gene *Ultrabithorax* on homeotic stability. *Science (New York, N.Y.)*, 271: 200–203.
- Graham, A., Maden, M. & Krumlauf, R. (1991). The murine Hox-2 genes display dynamic

- dorsoventral patterns of expression during central nervous system development. *Development*, 112: 255–264.
- Gruber, R., Elias, P.M., Crumrine, D., Lin, T.K., Brandner, J.M., Hachem, J.P., et al. (2011). Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *American Journal of Pathology*, 178: 2252–2263.
- Gu, Q. (2002). Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience*, 111: 815–835.
- Guillot, R., Ceinos, R.M., Cal, R., Rotllant, J. & Cerdá-Reverter, J.M. (2012). Transient Ectopic Overexpression of Agouti-Signalling Protein 1 (Asip1) Induces Pigment Anomalies in Flatfish. *PLoS ONE*, 7: 1–10.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., et al. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8: 1494–1512.
- Halkos, G.E. & Tsilika, K.D. (2014). Analyzing and visualizing the synergistic impact mechanisms of climate change related costs. *Applied Mathematics and Computation*, 246: 586–596.
- Halkos, G.E. & Tsilika, K.D. (2015). A Dynamic Interface for Trade Pattern Formation in Multi-regional Multi-sectoral Input-output Modeling. *Computational Economics*, 46: 671–681.
- Halkos, G.E. & Tsilika, K.D. (2016). Trading Structures for Regional Economies in CAS Software. *Computational Economics*, 48: 523–533.
- Halkos, G.E. & Tsilika, K.D. (2018). Programming Correlation Criteria with free CAS Software. *Computational Economics*, 52.
- Hannan, A.J. (2012). Tandem repeat polymorphisms: Mediators of genetic plasticity, modulators of biological diversity and dynamic sources of disease susceptibility. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 769: 1–9.
- Hauville, M.R., Rhody, N.R., Resley, M.J., Bell, J.G., Main, K.L. & Migaud, H. (2015). Comparative study of lipids and fatty acids in the liver, muscle, and eggs of wild and captive common snook broodstock. *Aquaculture*, 446: 227–235.
- Hunter, M.P. & Prince, V.E. (2002). Zebrafish hox paralogue group 2 genes function redundantly as selector genes to pattern the second pharyngeal arch. *Developmental Biology*, 247: 367–389.

- Ihrie, R.A., Marques, M.R., Nguyen, B.T., Horner, J.S., Papazoglu, C., Bronson, R.T., et al. (2005). *Perp* is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell*, 120: 843–856.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., et al. (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13: 379–408.
- Imsland, A.K., Wergeland, T., Jonassen, T.M. & Stefansson, S.O. (2006). Does malpigmentation improve growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)? *Aquaculture Research*, 37: 306–312.
- Isojima, T., Tsuji, H., Masuda, R. & Tagawa, M. (2013). Formation process of staining-type hypermelanosis in Japanese flounder juveniles revealed by examination of chromatophores and scales. *Fisheries Science*, 79: 231–242.
- Jakovlić, I. & Wang, W.M. (2016). Expression of Hox paralog group 13 genes in adult and developing *Megalobrama amblycephala*. *Gene Expression Patterns*, 21: 63–68.
- Jozefowicz, C., McClintock, J. & Prince, V. (2003). The fates of zebrafish Hox gene duplicates. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 3: 185–194.
- Jump, D.B. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 41: 41–78.
- Kanazawa, A. (1993). Nutritional Mechanisms Involved in the Occurrence of Abnormal Pigmentation in Hatchery-reared Flatfish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 162–166.
- Kang, D.Y. & Kim, H.C. (2012). Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 356–357: 14–21.
- Kang, D.Y., Kim, H.C. & Kang, H.S. (2014). The functional relevance of prepro-melanin concentrating hormone (pMCH) to skin color change, Blind-side malpigmentation and feeding of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries and Aquatic Science*, 17: 325–337.
- Kashi, Y., King, D. & Soller, M. (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in genetics : TIG*, 13: 74–78.
- Kegel, L., Aunin, E., Meijer, D. & Bermingham, J.R. (2013). LGI proteins in the nervous system. *ASN neuro*, 5: 167–181.

- Kessels, H.W. & Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron*, 61: 340-350.
- Kimura, N., Ishii, Y., Suzaki, S., Negishi, T., Kyuwa, S. & Yoshikawa, Y. (2007). A β upregulates and colocalizes with LGI3 in cultured rat astrocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27: 335–350.
- King, D.G. (2012). Evolution of simple sequence repeats as mutable sites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 769: 10-25.
- Koch, A., De Meyer, T., Jeschke, J. & Van Criekinge, W. (2015). MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data. *BMC genomics*, 16: 636.
- Kopylova, E., Noé, L. & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28: 3211–3217.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., Ivanov, A., Tyzio, R., Pellegrino, C., et al. (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*, 40: 775–784.
- Kropf, M., Rey, G., Glauser, L., Kulangara, K., Johnsson, K. & Hirling, H. (2008). Subunit-specific surface mobility of differentially labeled AMPA receptor subunits. *European Journal of Cell Biology*, 87: 763–778.
- Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78: 191–201.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95–125.
- Kühlbrandt, W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 5: 282–295.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Ladam, F. & Sagerström, C.G. (2014). Hox regulation of transcription: More complex(es). *Developmental Dynamics*, 243: 4–15.
- Lang, S., Ugale, A., Erlandsson, E., Karlsson, G., Bryder, D. & Soneji, S. (2015). SCExV: a webtool for the analysis and visualisation of single cell qRT-PCR data. *BMC Bioinformatics*, 16: 320.
- Lee, H.K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacology and Therapeutics*, 112:

810-832.

Lemons, D. & McGinnis, W. (2006). Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, 313: 1918–1922.

Lewis, E. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 277: 565–570.

Li, W. & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22: 1658–1659.

Liu, S.J. & Cull-Candy, S.G. (2005). Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca²⁺ permeability of AMPARs at cerebellar synapses. *Nature Neuroscience*, 8: 768–775.

Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15: 550.

Lu, W. & Ziff, E.B. (2005). PICK1 interacts with ABP/GRIP to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 47: 407–421.

Lund, I. (2007). The impact of dietary fatty acids in common sole larval (*Solea solea* L.) nutrition
PhD thesis by Ivar Lund.

Lund, I., Steinfeldt, S.J., Suhr, K.I. & Hansen, B.W. (2008). A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Nutrition*, 14: 544–555.

Lund, I., Steinfeldt, S.J. & Hansen, B.W. (2010). Influence of dietary arachidonic acid combined with light intensity and tank colour on pigmentation of common sole (*Solea solea* L.) larvae. *Aquaculture*, 308: 159–165.

Lund, I., Steinfeldt, S.J., Suhr, K.I. & Hansen, B.W. (2008). A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Nutrition*, 14: 544–555.

Mack, J.W., Steven, a C. & Steinert, P.M. (1993). The mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments. The ionic zipper hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, 232: 50–66.

Maconochie, M., Nonchev, S., Morrison, a & Krumlauf, R. (1996). Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annual review of genetics*, 30: 529–556.

Maere, S., Heymans, K. & Kuiper, M. (2005). BiNGO: A Cytoscape plugin to assess

- overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, 21: 3448–3449.
- Mallo, M. & Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development (Cambridge, England)*, 140: 3951–3963.
- Marchenko, Y. (2010) Haplotype analysis of case-control data using haplogit: New features. United Kingdom Stata Users' Group Meetings 2010 08, Stata Users Group.
- Marlétaz, F., Gyapay, G. & Le Parco, Y. (2010). High level of structural polymorphism driven by mobile elements in the Hox genomic region of the chaetognath *Spadella cephaloptera*. *Genome Biology and Evolution*, 2: 665–677.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17: 10.
- McClintock, J.M., Carlson, R., Mann, D.M. & Prince, V.E. (2001). Consequences of Hox gene duplication in the vertebrates: an investigation of the zebrafish Hox paralogue group 1 genes. *Development (Cambridge, England)*, 128: 2471–2484.
- McClintock, J.M., Jozefowicz, C., Assimacopoulos, S., Grove, E.A., Louvi, A. & Prince, V.E. (2003). Conserved expression of *Hoxa1* in neurons at the ventral forebrain/midbrain boundary of vertebrates. *Development Genes and Evolution*, 213: 399–406.
- McClintock, J.M., Kheirbek, M. a & Prince, V.E. (2002). Knockdown of duplicated zebrafish *hoxb1* genes reveals distinct roles in hindbrain patterning and a novel mechanism of duplicate gene retention. *Development (Cambridge, England)*, 129: 2339–2354.
- McEllin, J.A., Alexander, T.B., Tümpel, S., Wiedemann, L.M. & Krumlauf, R. (2015). Analyses of *fugu hoxa2* genes provide evidence for subfunctionalization of neural crest cell and rhombomere cis-regulatory modules during vertebrate evolution. *Developmental Biology*, 409: 530–542.
- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, a & Gehring, W.J. (1992). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature*, 308: 428–433.
- Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *Journal of pharmacological sciences*, 100: 433–442.
- Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. (2008). The human keratins: Biology and pathology.

Histochemistry and Cell Biology, 129: 705-733.

Monroig, O., Webb, K., Ibarra-Castro, L., Holt, G.J. & Tocher, D.R. (2011). Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture*, 312: 145–153.

Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L.E.C., Constenla, M., Costas, B., et al. (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 8: 227-263.

Morais, S., Castanheira, F., Martinez-Rubio, L., Conceição, L.E.C. & Tocher, D.R. (2012). Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: Ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with Δ^4 activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821: 660–671.

Morais, S., Mendes, A.C., Castanheira, M.F., Coutinho, J., Bandarra, N., Dias, J., et al. (2014). New formulated diets for *Solea senegalensis* broodstock: Effects of parental nutrition on biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids and performance of early larval stages and juvenile fish. *Aquaculture*, 432: 374–382.

Morais, S., Mourente, G., Martinez, A., Gras, N. & Tocher, D.R. (2015). Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and Δ^4 -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851: 588–597.

Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P.H. & Ruppertsberg, J.P. (1994). A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 266: 1059–1062.

Mungpakdee, S., Seo, H.-C. & Chourrout, D. (2008). Spatio-temporal expression patterns of anterior Hox genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene expression patterns : GEP*, 8: 508–514.

Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J. & Olsen, B.R. (1996). Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science (New York, N.Y.)*, 272: 548–551.

Neijts, R., Simmini, S., Giuliani, F., van Rooijen, C. & Deschamps, J. (2014). Region-specific regulation of posterior axial elongation during vertebrate embryogenesis. *Developmental Dynamics*, 243: 88–98.

- Nithianantharajah, J. & Hannan, A.J. (2007). Dynamic mutations as digital genetic modulators of brain development, function and dysfunction. *BioEssays*, 29: 525-535.
- Novak, U. (2004). ADAM proteins in the brain. *Journal of Clinical Neuroscience*, 11: 227-235.
- Okabayashi, S. & Kimura, N. (2008). Leucine-rich glioma inactivated 3 is involved in amyloid beta peptide uptake by astrocytes and endocytosis itself. *Neuroreport*, 19: 1175–1179.
- Okabayashi, S. & Kimura, N. (2010). LGI3 interacts with flotillin-1 to mediate APP trafficking and exosome formation. *Neuroreport*, 21: 606–610.
- Owuor, K., Harel, N.Y., Englot, D.J., Hisama, F., Blumenfeld, H. & Strittmatter, S.M. (2009). LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42: 448–457.
- Le Pabic, P., Scemama, J.L. & Stellwag, E.J. (2010). Role of Hox PG2 genes in Nile tilapia pharyngeal arch specification: Implications for gnathostome pharyngeal arch evolution. *Evolution and Development*, 12: 45–60.
- Le Pabic, P., Stellwag, E.J., Brothers, S.N. & Scemama, J.-L. (2007). Comparative analysis of Hox paralog group 2 gene expression during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryonic development. *Development genes and evolution*, 217: 749–758.
- Palstra, A.P., Blok, M.C., Kals, J., Blom, E., Tuinhof-Koelma, N., Dirks, R.P., et al. (2015). In- and outdoor reproduction of first generation common sole *Solea solea* under a natural photothermal regime: Temporal progression of sexual maturation assessed by monitoring plasma steroids and gonadotropin mRNA expression. *General and Comparative Endocrinology*, 221: 183–192.
- Parichy, D.M. & Spiewak, J.E. (2015). Origins of adult pigmentation: Diversity in pigment stem cell lineages and implications for pattern evolution. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 28: 31–50.
- Park, W.J., Lim, Y.Y., Kwon, N.S., Baek, K.J., Kim, D.S. & Yun, H.Y. (2010). Leucine-rich glioma inactivated 3 induces neurite outgrowth through akt and focal adhesion kinase. *Neurochemical Research*, 35: 789–796.
- Parma, L., Bonaldo, A., Pirini, M., Viroli, C., Parmeggiani, A., Bonvini, E. & Gatta, P.P. (2015). Fatty Acid Composition of Eggs and its Relationships to Egg and Larval Viability from Domesticated Common Sole (*Solea solea*) Breeders. *Reproduction in Domestic Animals*, 50: 186–194.

- Parra, G., Bradnam, K. & Korf, I. (2007). CEGMA: A pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. *Bioinformatics*, 23: 1061–1067.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pei, W., Huang, Z. & Niu, L. (2007). GluR3 flip and flop: Differences in channel opening kinetics. *Biochemistry*, 46: 2027–2036.
- Pendleton, J.W., Nagai, B.K., Murtha, M.T. & Ruddle, F.H. (1993). Expansion of the Hox gene family and the evolution of chordates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 6300–6304.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30: e36.
- Prince, V. (2002). The Hox Paradox: More complex(es) than imagined. *Developmental Biology*, 249: 1–15.
- Prince, V E, Joly, L., Ekker, M. & Ho, R.K. (1998). Zebrafish hox genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk. *Development*, 125: 407–420.
- Prince, V E, Moens, C.B., Kimmel, C.B. & Ho, R.K. (1998): Zebrafish hox genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, *valentino*. *Development (Cambridge, England)*, 125: 393–406.
- Prince, Victoria E., Price, A.L. & Ho, R.K. (1998). Hox gene expression reveals regionalization along the anteroposterior axis of the zebrafish notochord. *Development Genes and Evolution*, 208: 517–522.
- Richards, R.I. (2001). Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum Mol Genet*, 10: 2187-94.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo*, 4: 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Extraction with phenol: chloroform. In *Molecular cloning: A laboratory manual 3*. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scemama, J.L., Hunter, M., Mccallum, J., Prince, V. & Stellwag, E. (2002). Evolutionary divergence of vertebrate Hoxb2 expression patterns and transcriptional regulatory loci. *Journal of*

- Experimental Zoology, 294: 285–299.
- Scemama, J.L., Vernon, J.L. & Stellwag, E.J. (2006). Differential expression of *hoxa2a* and *hoxa2b* genes during striped bass embryonic development. *Gene Expression Patterns*, 6: 843–848.
- Schmieder, R. & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27: 863–864.
- Schulte, D. & Frank, D. (2014). TALE transcription factors during early development of the vertebrate brain and eye. *Developmental Dynamics*, 243: 99–116.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., et al. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology*, 174: 169–174.
- Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: Multidomain proteins with multiple functions. *Genes and Development*, 17: 7–30.
- Sheng, M. (2002). Postsynaptic Signaling and Plasticity Mechanisms. *Science*, 298: 776–780.
- Shoubridge, C. & Gecz, J. (2012). Polyalanine tract disorders and neurocognitive phenotypes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 769: 185–203.
- Silversand, C., Norberg, B. & Haux, C. (1996). Fatty-acid composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Marine Biology*, 125: 269–278.
- Soshnikova, N. (2014). Hox genes regulation in vertebrates. *Developmental Dynamics*, 243: 49–58.
- Takahashi, E., Sagane, K., Nagasu, T. & Kuromitsu, J. (2006a). Altered nociceptive response in ADAM11-deficient mice. *Brain Research*, 1097: 39–42.
- Takahashi, E., Sagane, K., Oki, T., Yamazaki, K., Nagasu, T. & Kuromitsu, J. (2006b). Deficits in spatial learning and motor coordination in ADAM11-deficient mice. *BMC neuroscience*, 7: 19.
- Takamatsu, N., Kurosawa, G., Takahashi, M., Inokuma, R., Tanaka, M., Kanamori, A. & Hori, H. (2007). Duplicated Abd-B class genes in medaka *hoxAa* and *hoxAb* clusters exhibit differential expression patterns in pectoral fin buds. *Development Genes and Evolution*, 217: 263–273.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 678–687.
- Tamura, K. & Kumar, S. (2002). Evolutionary distance estimation under heterogeneous

- substitution pattern among lineages. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 1727–1736.
- Thummel, R., Li, L., Tanase, C., Sarras, M.P. & Godwin, A.R. (2004). Differences in expression pattern and function between zebrafish *hoxc13* orthologs: Recruitment of *Hoxc13b* into an early embryonic role. *Developmental Biology*, 274: 318–333.
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107–184.
- Tocher, D.R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41: 717–732.
- Uchiyama, T., Irie, M., Mori, H., Kurokawa, K. & Yamada, T. (2015). FuncTree: Functional analysis and visualization for large-scale omics data. *PLoS ONE*, 10.
- Vallin, L. & Nissling, A. (2000). Maternal effects on egg size and egg buoyancy of Baltic cod, *Gadus morhua*. *Fisheries Research*, 49: 21–37.
- Venizelos, A. & Benetti, D.D. (1999). Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture*, 176: 181–188.
- Vilar, J.M.G. & Saiz, L. (2010). CplexA: A Mathematica package to study macromolecular-assembly control of gene expression. *Bioinformatics*, 26: 2060–2061.
- Vizcaíno-Ochoa, V., Lazo, J.P., Barón-Sevilla, B. & Drawbridge, M.A. (2010). The effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) on growth, survival and pigmentation of California halibut *Paralichthys californicus* larvae (Ayres, 1810). *Aquaculture*, 302: 228–234.
- Wagner, G.P., Takahashi, K., Lynch, V., Prohaska, S.J., Fried, C., Stadler, P.F. & Amemiya, C. (2005). Molecular evolution of duplicated ray finned fish *HoxA* clusters: Increased synonymous substitution rate and asymmetrical co-divergence of coding and non-coding sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 60: 665–676.
- Wang, Z., Yuan, L., Rossiter, S.J., Zuo, X., Ru, B., Zhong, H., et al. (2009). Adaptive evolution of *HoxD* genes in the origin and diversification of the cetacean flipper. *Molecular Biology and Evolution*, 26: 613–622.
- Waschke, J. (2008). The desmosome and pemphigus. *Histochemistry and Cell Biology*, 130: 21–54.
- Washio, Y., Aritaki, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Yokoi, H. & Suzuki, T. (2013). Ocular-Side Lateralization of Adult-Type Chromatophore Precursors: Development of Pigment Asymmetry in Metamorphosing Flounder Larvae. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 320: 151–165.

- Wu, X. & McMurray, C.T. (2001). Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the creb-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 1735–1741.
- Xie, Y.-J., Zhou, Liang, Jiang, N., Zhang, N., Zou, N., Zhou, Lin, et al. (2015). Essential roles of leucine-rich glioma inactivated 1 in the development of embryonic and postnatal cerebellum. *Scientific Reports*, 5: 7827.
- Xu, B. & Yang, Z. (2013). PamIX: A graphical user interface for PAML. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2723–2724.
- Yamanome, T., Amano, M. & Takahashi, A. (2005). White background reduces the occurrence of staining, activates melanin-concentrating hormone and promotes somatic growth in barfin flounder. *Aquaculture*, 244: 323–329.
- Yuko Hano, Akane Hayashi, Shoutaro Yamaguchi, and M.Y.S. (2001). Hox genes of the direct type developing sea urchin *Peronella japonica*. *Zoological Science*, 18: 353–359.
- Zhou, Y.-D., Lee, S., Jin, Z., Wright, M., Smith, S.E.P. & Anderson, M.P. (2009). Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nature medicine*, 15: 1208–1214.

Research Article

Menelaos Kavouras*, Emmanouil E. Malandrakis, Theodoros Danis, Ewout Blom, Konstantinos Anastassiadis, Panagiota Panagiotaki, Athanasios Exadactylos*

Hox genes polymorphism depicts developmental disruption of common sole eggs

<https://doi.org/10.1515/biol-2019-0061>

Received May 30, 2019; accepted November 22, 2019

Abstract: In sole aquaculture production, consistency in the quality of produced eggs throughout the year is unpredictable. *Hox* genes have a crucial role in controlling embryonic development and their genetic variation could alter the phenotype dramatically. In teleosts genome duplication led paralog *hox* genes to become diverged. Direct association of polymorphism in *hoxa1a*, *hoxa2a* & *hoxa2b* of *Solea solea* with egg viability indicates *hoxa2b* as a potential genetic marker. High Resolution Melt (HRM) analysis was carried out in 52 viable and 61 non-viable eggs collected at 54±6 hours post fertilization (hpf). Allelic and genotypic frequencies of polymorphism were analyzed and results illustrated a significantly increased risk for non-viability for minor alleles and their homozygous genotypes. Haplotype analysis demonstrated a significant recessive effect on the risk of non-viability, by increasing the odds of disrupting embryonic development up to three-fold. Phylogenetic analysis showed that the paralog genes *hoxa2a* and *hoxa2b*, are separated distinctly in two clades and presented a significant ω variation, revealing their diverged evolutionary rate.

Keywords: egg quality, embryonic development, *Hox* genes, polymorphism, reproduction

*Corresponding authors: Menelaos Kavouras, Athanasios

Exadactylos, Fytokou str, 38446, Volos, Greece, E-mail addresses: menelaoskavouras@gmail.com, exadact@uth.gr

Emmanouil E. Malandrakis, Theodoros Danis, Panagiota Panagiotaki, Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Fytokou str, Volos, Greece

Ewout Blom, Wageningen Marine Research, Wageningen University & Research, IJmuiden, The Netherlands

Konstantinos Anastassiadis, Biotechnology Centre (BIOTEC), TU Dresden, Dresden, Germany

1 Introduction

In aquaculture industry, *Solea solea* is considered as one of the most interesting and promising species for marine fish farming in Europe due to high market value and consumers demand. Rearing is mainly based on controlled reproduction of captive breeders [1]. The steady production of eggs either in quality and quantity all year round is necessary for successful mass production of juveniles [2, 3]. Despite the progress that has been achieved all these years on the rearing and welfare conditions of sole spawners [1, 3–7], manipulated broodstocks are still producing eggs which present variability both in quantity and quality, boosting the overall production cost of sole [8]. For that purpose, the availability of genetic markers to predict egg and stock viability is a very important parameter for selective breeding programs.

The factors that affect embryonic development and consequently sole egg quality include environmental conditions, physiology, nutrition and genetics [9]. *Hox* genes play a major role in controlling developmental mechanisms in all bilaterian organisms by the regionalization of the anteroposterior (A-P) axis associated with evolutionary mechanisms by introducing new body schemes in animal kingdom. They encode transcription factors involved in segmental partition and cell specificity and they were first described in fruit fly, *Drosophila melanogaster*. In teleosts, they are arranged in clusters, which vary from five to eight (Aa, Ab, Ba, Bb, Ca, Cb, Da, Db), as a result of three rounds whole genome duplication (“3R” hypothesis) and they are classified in 13 paralog groups (PG) [10, 11]. *Hox* genes are characterized by a well-conserved region called “homeobox” or “homeodomain” and also by temporal and spatial collinearity since the 3′-end genes are expressed earlier in the most anterior embryonic domains compared to their 5′-end counterparts. The number of clusters in teleosts suggests that the duplication event took place from 110 to over 300 Mya [12–19].

Hox gene expression is a major force either for the morphological evolution of a species, or physiological

***Hox* gene expression profiles during embryonic development of common sole**

**Menelaos Kavouras^{1,*}, Emmanouil E. Malandrakis¹, Eleni Golomazou¹,
Ioannis Konstantinidis¹, Ewout Blom², Arjan P. Palstra³,
Konstantinos Anastassiadis⁴, Panagiota Panagiotaki¹ and Athanasios Exadactylos¹**

¹ Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences,
University of Thessaly, Fytokou Str., Volos, Greece

² Wageningen Marine Research, Wageningen University & Research, IJmuiden, The Netherlands

³ Wageningen University & Research, Animal Breeding and Genomics,
Wageningen Livestock Research, Wageningen, The Netherlands

⁴ Biotechnology Centre (BIOTEC), TU Dresden, Dresden, Germany

Submitted: September 29, 2017. Final revision received: June 14, 2018. Accepted: July 9, 2018

Abstract

Common sole (*Solea solea*) aquaculture production is based mostly on wild-caught breeders. Recently, the successful reproduction of first-generation fish that were reared in captivity was accomplished. A consistent good quality and quantity of produced eggs throughout the year, and of next-generation broodstock, is important for reducing the overall cost of production. *Hox* genes play a pivotal role in normal embryonic development and alterations of their temporal expression level may be important for egg viability. Expression profile analysis of five *hox* genes (*hoxa1a*, *hoxa2a*, *hoxa2b*, *hoxb1a* and *hoxb1b*) involved in early embryonic development and of *hoxa13a*, which is involved in late stages, was carried out. Results revealed a premature and/or maternal expression of *hoxa13a* in sole embryos, and the detection of *hoxa2a* and *hoxa2b* genes as members of paralog group 2. Principal Component Analysis of *hox* gene expression in 54 ± 6 hours post fertilization embryos coming from wild-caught broodstock and a first-generation one reared in the hatchery, unveiled that these broodstocks are clearly distinct. In addition, their pairwise comparison revealed significant differences in the expression levels of *hoxb1a* and *hoxb1b* genes. *Hox* gene regulation during embryonic development could give valuable insight into rearing sole broodstocks with different origin in concert, and also into gaining a steady mass production of eggs, either in quality or quantity, all year round.

Keywords

Broodstock; egg quality; *homeobox* genes; reproduction; *Solea solea*

*) Corresponding author; e-mail: menelaoskavouras@gmail.com

A computer algebra system approach in gene expression analysis

Menelaos Kavouras

Department of Ichthyology and Aquatic Environment,
School of Agricultural Sciences,
University of Thessaly,
Fitokou str., 38446, Volos, Greece
Email: melios72@yahoo.gr

Kyriaki Tsilika*

Laboratory of Operations Research,
Department of Economics,
University of Thessaly,
Korai 43, 38333, Volos, Greece
Email: ktsilika@econ.uth.gr
*Corresponding author

Athanasios Exadactylos

Department of Ichthyology and Aquatic Environment,
School of Agricultural Sciences,
University of Thessaly,
Fitokou str., 38446, Volos, Greece
Email: exadact@apae.uth.gr

Abstract: The primary purpose of this study is to provide an immediate connection to analytics of biological functions and visualisation. We introduce a visual framework in the environment of a main computer algebra system (CAS), Mathematica, to picture variations and evolution schemes in gene expression. Our computational approach constructs snapshots for gene expression profiles, with the advantage of being selfevident, concise and clear. A variety of colours is employed, beyond the conventional heat map colours. We provide dynamic options to facilitate comparisons among treatments, several colour choices to perform reference gene selection tests and, thus reveal the variation of gene expression through time and/or among treatments, or genes. The performance of the programming techniques in selected case studies concerning genes involved in embryonic development of common sole (*Solea solea*), is presented. This work could assist researchers in biosciences with suggestions to specific gene expression mapping.

Keywords: gene expression profiles; common sole; visual analytics; mathematica computer software.