



ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η γονιδιακή αρχιτεκτονική της ΑΤΡσυνθάσης στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

The genetic architecture of ATP synthase in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*)



Τερλεμές Γιώργος του Δημητρίου

Λάρισα, 2022

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Μούτου Αικατερίνη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Θεολογία Σαραφίδου Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Σταμάτης Διδάκτωρ, Ειδικό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π), Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών κ. Αικατερίνη Μούτου για την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου, όσο και για την βοήθεια και καθοδήγηση της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο, την Αικατερίνη Κατριτζόγλου και την Αλεξία Φυτσιλή για την συνεχή βοήθεια τους όπως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την όμορφη συνεργασία και το θερμό κλίμα.

Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που άνοιξαν τα σπίτια τους και με φιλοξένησαν μετά τον σεισμό, ξεκινώντας ξανά με τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο και την Αικατερίνη Κατριτζόγλου όσο και την Έλενα Γιαλινάκη, την Έλενα Κόντου και τον Δημήτρη Ράλλη. Καθώς και τον αδερφό μου Νίκο Τερλεμέ για την βοήθεια και στήριξη που μου προσέφερε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής την κ. Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της φαινοτυπικής πολυπλοκότητας είναι ο γονιδιωματικός διπλασιασμός. Δύο γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος είναι κοινοί για τα σπονδυλωτά, και ευθύνονται για την δημιουργία ενός πλουραλισμού στη τύχη των γονιδίων και των λειτουργιών αυτών. Ένας επιπλέον γύρος διπλασιασμού συνέβη πριν περίπου 350 εκατομμύρια χρόνια στη βάση της γενεαλογίας των τελεόστεων. Ένα από τα είδη στα οποία η διερεύνηση του αποτυπώματος του τρίτου διπλασιασμού του γονιδιώματος έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από επιστημονική σκοπιά, είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) καθώς αποτελεί ένα είδος με ποικίλες προσαρμογές και με υψηλή εμπορική αξία. Είναι επομένως σημαντικό να προσδιοριστούν τα στάδια, οι μηχανισμοί, τα γονίδια και μια ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ιχθυδίου. Ένας από τους κυρίαρχους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια.

Επιπρόσθετα, οι τελεόστεοι είναι οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τον φαινότυπο τους ως απόκριση στις μεταβολές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Συνεπώς, είναι σημαντικό να βρεθούν στοιχεία για το πως η θερμοκρασία επηρεάζει την οξειδωτική φωσφορυλίωση ειδικά με την συνεχή αύξηση της θερμοκρασίας των θαλασσών, λόγω του φαινομένου του θερμοκηπίου και της κλιματικής αλλαγής.

Τα αποτελέσματα στο σύνολο των γονιδίων συνηγορούν πως η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων. Με διαφορετικό τρόπο για παράδειγμα το στάδιο της εκκόλαψης επηρεάστηκε περισσότερο από τα υπόλοιπα. Συγκρίσεις έγιναν σε τρία επίπεδα: μεταξύ παραλόγων γονιδίων, για κάθε αναπτυξιακό στάδιο για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης καθώς επίσης και μεταξύ των προτύπων έκφρασης των αναπτυξιακών σταδίων στις θερμοκρασίες 14, 17, 20°C. Όσον αφορά τα παράλογα εκφράζονται στο σύνολο των σταδίων, σε όλες τις θερμοκρασίες ανάπτυξης σε διαφορετικά επίπεδα το καθένα.

Abstract

One of the basic mechanisms in the evolution of complex phenotypes is whole genome duplication. The two rounds of whole genome duplication that are common for all vertebrates created a plethora of different "fates" and functions for the duplicated genes. One additional round of duplication took place 350 million years ago in the base of the teleost genealogy. One of the most interesting species to examine the effects of this duplication is the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as it is very adaptable and with high commercial value.

For that reason, it is crucial to identify the stages, mechanism, genes and a plethora of factors that affect the growth of this fish. The most prevalent mechanism for energy production is oxidative phosphorylation which occurs in the mitochondria. Additionally, teleosts have the ability to alter their phenotype in response to temperature changes. It is deemed essential to find the way which the temperature affect the oxidative phosphorylation especially with sea temperature rising in response to climate change.

The present study indicated that increase in temperature affect developmental stages in different ways, for example the developmental stage of hatching was affected more than others. Comparisons were made at three levels: between the two paralogs of each gene examined, for each developmental stage and for 3 temperatures 14, 17, 20 °C. The paralogs were expressed in every stage and in each temperature.

Περιεχόμενα

Abstract.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Το λαβράκι.....	9
1.1.1 Συστηματική κατάταξη και χαρακτηριστικά.....	9
1.1.2 Γεωγραφική κατανομή και βιότοπος.....	10
1.1.3 Οικονομική αξία.....	11
1.2 Αναπτυξιακά στάδια στους τελεόστεους.....	13
1.2.1 Αυγό (egg stage) και εκκόλαψη (hatching).....	13
1.2.2 Έναρξη τροφοληψίας (first feeding).....	13
1.2.3 Κάμψη της νωτοχορδής (flexion).....	14
1.2.4 Μετα-κάμψη (postflexion) και μεταμόρφωση (metamorphosis).....	14
1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	16
1.3.1. Μιτοχόνδριο.....	17
1.3.2. Χαρακτηριστικά μιτοχονδρίου.....	17
1.3.3. Ενδοσυμβίωση και συνεξέλιξη.....	19
1.3.4. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα.....	19
1.4.1. Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	21
1.4.2. Αναπνευστική αλυσίδα.....	21
1.4.3. Δομή του σύμπλοκου V.....	22
1.4.4. Συναρμολόγηση του συμπλόκου V.....	23
1.4.5 Τρόπος λειτουργίας.....	25
1.5 Διπλασιασμός γονιδιώματος.....	27
1.5.1 Γονιδίωμα τελεόστεων και τρίτος γύρος διπλασιασμού.....	27
1.5.2 Εξελικτική “μοίρα” των παράλογων γονιδίων.....	30
1.6 Θερμοκρασία.....	31

1.7 Σκοπός.....	32
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Συλλογή και προσδιορισμός δειγμάτων.....	34
2.2 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA.....	34
2.3. Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης – Real time PCR.....	35
2.3.1 Γονίδια αναφοράς (Housekeeping genes)	36
2.3.2 Γονίδια στόχοι.....	37
2.3.3 Σχεδιασμός εκκινητών	37
2.3.4 Πρωτόκολλο της Real-time PCR.....	38
2.3.5 Πρότυπη καμπύλη και υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης.....	39
2.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	40
2.5. Φυλογενετική Ανάλυση	41
2.5.1 Ανάκτηση αλληλουχιών από την βάση δεδομένων ENSEMBL.....	41
2.5.2 Στοιχίση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	42
2.5.3 Ανάλυση γειτονικού γονιδιωματικού περιβάλλοντος.....	42
3. Αποτελέσματα	43
3.1 Database mining εύρεση ομόλογων.....	43
3.2 Φυλογενετικά δέντρα και ανάλυση τοπολογίας.....	43
.....	44
3.2.1 ATP5F1A	45
3.2.2 ATP5F1B	46
3.2.3. ATP5MEA.....	47
3.3 Επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.....	48
3.3.1 Έκφραση γονιδίου <i>atp5f1a1</i>	48
3.3.2 Έκφραση γονιδίου <i>atp5f1a2</i>	50
3.3.3 Έκφραση γονιδίου <i>atp5f1b1</i>	52

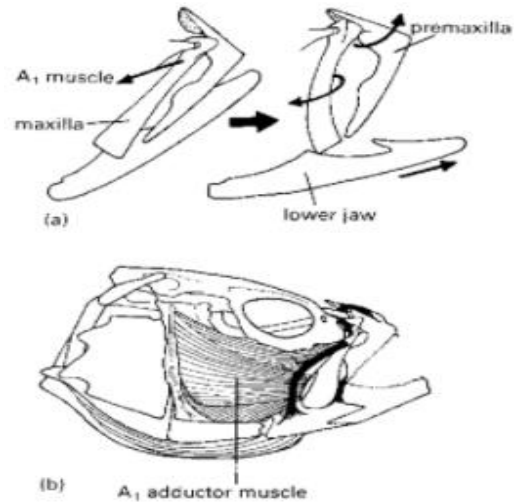
3.3.4 Έκφραση γονιδίου <i>atp5f1b2</i>	54
3.3.5 Έκφραση γονιδίου <i>atp5mea1</i>	56
3.3.6 Έκφραση γονιδίου <i>atp5mea2</i>	58
3.4 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων γονιδίων.....	61
3.4.1 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων ATP5F1A1 – ATP5F1A2	61
3.4.2 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων ATP5F1B1 – ATP5F1B2.....	61
3.4.3 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων ATP5MEA1 – ATP5MEA2	62
4 Συζήτηση	63
Συμπεράσματα.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67
Παραθέματα	71
4.1 ATP5F1A1	71
4.2 ATP5F1A2	75
4.3 ATP5F1B1	79
4.4 ATP5F1B2	83
4.5 ATP5MEA1	87
4.6 ATP5MEA2	91

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το λαβράκι

1.1.1 Συστηματική κατάταξη και χαρακτηριστικά

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) κατατάσσεται στους τελεόστεους, την πολυπληθέστερη ομάδα σπονδυλωτών η οποία αριθμεί παραπάνω από 30.000 είδη. Οι τελεόστεοι είναι μια υπερτάξη των ακτινοπτερύγιων που αποτελεί το 95 % της ομοταξίας αυτής (Πίνακας 1). Τα σπονδυλωτά που ανήκουν στους τελεόστεους έχουν τεραστία ποικιλομορφία. Ένα κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η μορφολογία της σιαγόνας τους, η αλλαγή αυτή τους επιτρέπει να εξωθούν το στόμα τους ώστε να πιάνουν τροφή (Εικόνα 1) (Michael, 2014). Συγκεκριμένα η μορφολογία του σώματος του λαβρακιού είναι κυκλικό και επίμηκες με πλατύ στόμα και μυτερά δόντια (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Οι κινήσεις και οι περιστροφές που επιτρέπουν το στόμα των τελεόστεων να επεκτείνεται (Michael J, 2014).

Πίνακας 1 : Συστηματική κατάταξη του είδους *Dicentrarchus labrax*

Βασίλειο	Φύλο	Ομοταξία	Υφομοταξία	Τάξη	Γένος	Είδος
Ζώα	Χορδωτά	Ακτινοπτερύγια	Τελεόστεοι	Περκόμορφα	Δικέντραρχος	<i>D.labrax</i>
Animalia	Chordate	Actinopterygii	Teleosts	Perciformes	Dicentrarchus	<i>D.labrax</i>

Η απόχρωση του είναι σκούρα ασημί στην πλάτη και ανοίγει όσο πλησιάζει στην κοιλιά. Τα νεαρά φέρουν μαύρες κηλίδες στην πάνω πλευρά του σώματος τους (Εικόνα 2). Το μέγεθος του κυμαίνεται αναμεσα στα 40 – 65 εκατοστά με συνηθέστερα τα 50 εκατοστά, με το μέγιστο καταγεγραμμένο μήκος να έχει φτάσει στα 103 cm. Το βάρος ενός ενήλικου κυμαίνεται μεταξύ 5-7 κιλά με το μεγαλύτερο καταγεγραμμένο βάρος να φτάνει τα 12 Kg και το γηραιότερο ψάρι να έχει φτάσει την ηλικία των 30 ετών

(<https://www.fishbase.de/>). Η βέλτιστη θερμοκρασία για να μεγαλώσει ένα λαβράκι είναι 22-24 °C, μπορεί όμως να επιβιώσει σε θερμοκρασίες ανάμεσα σε 5-28 °C. Τα ενήλικα λαβράκια αναπαράγονται σεξουαλικά με εξωτερική γονιμοποίηση. Η αναπαραγωγική περίοδος διαρκεί από τον Δεκέμβριο μέχρι τον Μάρτιο. Η θερμοκρασία αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για τη χρονική έναρξη και τη θέση πραγματοποίησης της ωοτοκίας, επειδή τα αυγά του λαβρακιού σπάνια βρίσκονται εκεί όπου το νερό είναι ψυχρότερο από 8,5-9,0 °C ή σε νερό θερμότερο από 15 °C. Κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας, κάθε ώριμο ενήλικο θηλυκό μπορεί να παράγει μεταξύ ενός τετάρτου και μισού εκατομμυρίου αυγών ανά κιλό σωματικού βάρους. Το γονιμοποιημένο ωάριο λαβρακιού εκκολάπτεται μεταξύ 4 και 9 ημερών μετά τη γονιμοποίηση, ανάλογα με τη θερμοκρασία της θάλασσας. Οι προτιμότερες θερμοκρασίες για ωοτοκία είναι περίπου 13-15 °C. Το λαβράκι μπορεί να αναπαραχθεί μια φορά μέσα στην διάρκεια ενός έτους (Kendall et al., 1984).



Εικόνα 2: Απεικόνιση του είδους *Dicentrarchus labrax*

1.1.2 Γεωγραφική κατανομή και βιότοπος

Το λαβράκι είναι ένα ευρύαλο ψάρι που έχει την δυνατότητα να ζει σε νερά με διαφορετικά επίπεδα αλατότητας. Έχει την δυνατότητα να ζει σε περιοχές που η αλατότητα ξεκινάει από 3 ‰ μέχρι και περιοχές που ξεπερνούν το 30‰. Αυτό, σε συνδυασμό με την ανοχή του στην διακύμανση της θερμοκρασίας, καθιστά το λαβράκι ικανό να ζήσει σε διάφορα ενδιαιτήματα όπως: παράκτια ύδατα, εκβολές ποταμών, λιμνοθάλασσες και λιμάνια. Προς την ενήλικη φάση της ζωής του επιλέγει κυρίως βαθύτερα νερά που μπορούν να φτάσουν και 100 μέτρα, ενώ τα νεότερα ιχθύδια μπορούν να βρεθούν και σε νερά με βάθος μόλις 10 μέτρα. Το λαβράκι χωρίζεται σε δύο γενετικά ξεχωριστές γενεαλογίες όπου η μία καταλαμβάνει περιοχές του βορειοανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού (Νορβηγία προς Μαρόκο, Κανάριοι Νήσοι και Σενεγάλη) και η άλλη τη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα. Το λαβράκι

απουσιάζει από τη Λευκή, τη Βαλτική και την Κασπία θάλασσα και τη θάλασσα του Μπάρεντς. Αυτές οι γενεαλογίες συναντώνται μεταξύ τους, και υβριδοποιούνται φυσικά στη θάλασσα του Αλμποράν (Εικόνα 3). Εντοπίζεται γεωγραφικά μεταξύ των συντεταγμένων 72 ° Β - 11 ° Β, 19 ° Δ - 42 ° Α (Tine et al., 2014) (<https://www.fao.org/>).



Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή λαβρακιού (<https://www.iucnredlist.org/species/135606/4159287>)

1.1.3 Οικονομική αξία

Η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα είναι ένας από τους μεγαλύτερους κλάδους απασχόλησης με 12.000 άμεσα και έμμεσα εργαζομένους (ΣΕΘ, 2020). Η Ελλάδα μάλιστα κατέχει μια από τις ψηλότερες θέσεις παγκοσμίως στην παραγωγή μεσογειακών ειδών, και την μεγαλύτερη στην Ευρωπαϊκή Ένωση με τα κύρια είδη παραγωγής να είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) που αντιστοιχούν στο 96% των πωλήσεων, και μόνο το 4%, αντιστοιχεί σε όλα τα υπόλοιπα εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη, όπως το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), ο κρانيός (*Argyrosomus Regius*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση αλλά και συγκεκριμένα στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια μεγάλη αύξηση στην παραγωγή ψαριών προερχόμενη από τις ιχθυοκαλλιέργειες ενώ έχει μειωθεί η ποσότητα που προέρχεται από την αλιεία (Πίνακας 2). Η Ελλάδα ήταν η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα και εξαγωγέας της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2014, με 42.557 τόνους να προέρχονται από ιχθυοκαλλιέργειες και μόλις 348 τόνους να προέρχονται από αλιεία. Το 2019 υπήρξε σημαντική αύξηση στην ιχθυοκαλλιέργεια με την παραγωγή να αγγίζει τους 55.200 τόνους. Άλλες χώρες που ξεχωρίζουν στην παραγωγή λαβρακιού είναι η Ισπανία, Ιταλία, Τουρκία, Αίγυπτος και η Κροατία που έχει διπλασιάσει την παραγωγή της τα τελευταία χρόνια (European Commission & EUMOFA, 2019) (ΣΕΘ, 2020).

Ένας από τους λόγους που υπάρχει τόσο μεγάλη αύξηση τα τελευταία χρόνια οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην επέκταση και το άνοιγμα νέων επιχειρήσεων στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας. Το 1985 στην Ελλάδα υπήρχαν 12 πάρκα με παραγωγή 100 τόνων και το 2020 είναι σε λειτουργία 300 ιχθυοπαραγωγικά πάρκα, με ετήσια παραγωγή για το λαβράκι και την τσίπουρα πάνω από 100.000 τόνους. Δεν μπορούμε όμως να παραβλέψουμε την τεράστια επίδραση που είχε στον κλάδο αυτό, η πρόοδος της βιολογίας και της επιστήμης γενικότερα, καθώς κατανοήθηκαν και βελτιώθηκαν οι συνθήκες στις οποίες τα ψάρια εκτρέφονται (Πίνακας 3) (Darias et al., 2008).

Πίνακας 2: Αύξηση της ιχθυοκαλλιέργειας λαβρακιού στην Ευρώπη (European Commission & EUMOFA, 2019)

Years	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Greece	34.760	35.036	33.631	39.884	37.089	35.805	34.920	32.142	36.600	42.557
Spain	9.152	9.740	12.655	11.491	17.548	14.455	14.945	16.722	18.600	22.956
Italy	8.505	6.813	6.714	6.457	6.672	6.896	6.330	5.724	5.800	6.800
Croatia	2.800	2.700	2.800	2.800	2.775	2.453	2.826	3.215	4.488	5.310
France	3.240	4.163	1.253	2.337	2.452	2.321	2.428	2.244	2.156	2.200
Cyprus	740	752	703	1198	1.495	1.100	1.422	1.817	1.726	1.517
Portugal	1.192	1.070	420	397	461	531	575	455	295	403
Other	105	170	480	617	560	368	429	506	97	109
Totals	60.494	60.443	58.656	65.180	69.052	63.929	63.875	62.825	69.763	81.852

Πίνακας 3: Αγορά και παραγωγή για το 2016 (European Commission & EUMOFA, 2019)

MS	Aquaculture (t)	Fisheries (t)	Imports (t lwe)	Exports (t lwe)	Apparent market (t lwe)	Consumption per capita (kg)
Italy	6 800	355	26 502	2 535	31 122	0,513
Spain	23 445	580	9 440	8 175	25 290	0,545
France	1 928	2 735	6 112	1 135	9 640	0,145
Greece	42 557	348	717	35 035	8 587	0,796
United Kingdom	0	538	6 914	309	7 143	0,109
Portugal	450	408	6 324	148	7 034	0,680
Germany	0	0	3 974	2 133	1 841	0,022
Croatia	5 291	8	167	3 870	1 596	0,381
Belgium	0	23	2 326	1 722	627	0,056
Cyprus	1 442	1	153	1 051	545	0,643
Other MS	39	852	7 472	4 834	3 529	0,023
EU 28	81 952	5 848	70 101	60 947	96 954	0,190

1.2 Αναπτυξιακά στάδια στους τελεόστεους

1.2.1 Αυγό (egg stage) και εκκόλαψη (hatching)

Η ζωή ενός λαβρακιού ξεκινά με την σύντηξη των αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Μόλις γονιμοποιηθεί το ωάριο, γίνεται ο σχηματισμός του ζυγωτού και ξεκινά η εμβρυϊκή ανάπτυξη και καταλήγει στην εκκόλαψη του αυγού για την οποία συνηθώς χρειάζονται τέσσερις με εννιά ημέρες. Αυτό είναι το πρώτο στάδιο και ονομάζεται το στάδιο του αυγού (egg stage). Κατά την εκκόλαψη έχουν μέγεθος περίπου 4mm, βάρος 0,3-0,4 mg και μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικό βαθμό ανάπτυξης ανάλογα με το μέγεθος του λεκιθικού σάκου. Αφού γίνει η εκκόλαψη, τα νεαρά ψάρια μετακινούνται παράκτια στον πρώτο μήνα τους, προς τα θερμότερα νερά, προτιμώντας κυρίως εκβολές ποταμών. Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται έλλειψη χρωματισμού του οφθαλμού, διαφοροποιημένων πτερυγίων αλλά το στόμα δεν είναι λειτουργικό (Kendall et al., 1984).

1.2.2 Έναρξη τροφοληψίας (first feeding)

Ένα από τα κομβικότερα στάδια στην ανάπτυξη του ιχθυδίου είναι η περίοδος μεταξύ του ανοίγματος του στόματος και της αρχής της πρόσληψης εξωγενούς τροφής. Το στάδιο αυτό κρίνεται σημαντικό, καθώς η προνύμφη δεν έχει την δυνατότητα να καταναλώσει εξωγενή τροφή όταν γίνεται το πρώτο

άνοιγμα του στόματος. Το γαστρεντερικό σύστημα είναι στοιχειωδώς λειτουργικό καθώς δεν είναι ακόμα καλά ανεπτυγμένο, ο λεκιθικός σάκος ωστόσο είναι ακόμα άφθονος σε θρεπτικά κυρίως λιπίδια που μπορούν να απορροφηθούν με ευκολία, διατηρώντας έτσι έναν αναπόσπαστο ρόλο στην θρέψη του ιχθυοειδίου (Deplano et al., 1991). Μετά την πρώτη πρόσληψη τροφής το γαστρεντερικό σύστημα του ψαριού είναι καλύτερα ανεπτυγμένο. Εμφανίζει καλύτερη απορρόφηση θρεπτικών, κυρίως λιπίδια. Έχει φανεί ότι ακόμα και σε περιβάλλοντα με υψηλή συγκέντρωση τροφής υπάρχουν ποσοστά πάνω από 70% θνησιμότητας των προνυμφών. Η περίοδος ξεκινάει από το άνοιγμα του στόματος την έκτη ημέρα μέχρι την δέκατη ημέρα που το ψάρι έχει εξαντλήσει τον λεκιθικό σάκο και τρέφεται εξ ολοκλήρου από εξωγενή πηγή τροφής, όπως το πλαγκτόν (Deplano et al., 1991) .

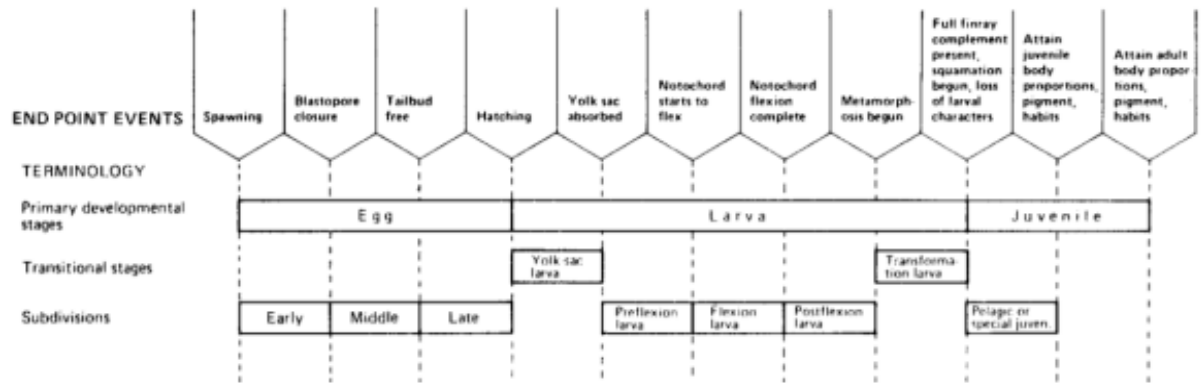
Τα ποσοστά επιβίωσης των προνυμφών εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα της τροφής σε επαρκή ποσότητα και ποιότητα κατά την ολοκλήρωση του σταδίου εξάντλησης των αποθεμάτων της λεκίθου. Εδώ παρατηρούνται αυξημένες εξελικτικές πιέσεις καθώς απαιτείται σωστή διαχείριση της αποθήκης ενέργειας, του λεκιθικού σάκου για επιβίωση και εύρεση εξωγενούς τροφής (China & Holzman, 2014) .

1.2.3 Κάμψη της νωτοχορδής (flexion)

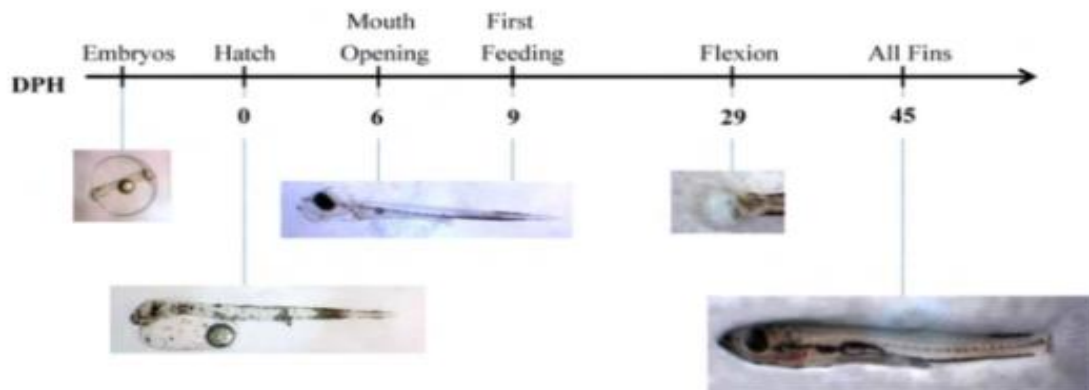
Η κάμψη της νωτοχορδής είναι από τα σημαντικότερα στάδια στην ανάπτυξη των περισσότερων ψαριών, συμβαίνει περίπου την εικοστή ένατη ημέρα όσον αφορά το λαβράκι. Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται η κάμψη της νωτοχορδής η ανάπτυξη του ουριαίου πτερυγίου, αλλαγές στο σώμα και στο σχήμα. Μπορούμε να χωρίσουμε τις προνύμφες σε προνύμφες προ-κάμψης (prerflexion), κάμψης (flexion) και μετά κάμψης (postflexion). Όταν η προνύμφη περάσει από το στάδιο της προ-κάμψης στο στάδιο της κάμψης ξεκινάει μια σειρά μεγάλων αλλαγών. Παρατηρείται αλλαγή στο σώμα και στο σχήμα του ιχθυοειδίου, όπως αύξηση των πτερυγίων και κυρίως των θωρακικών που είναι ιδιαίτερα εμφανή. Παράλληλα παρατηρείται μεγάλη ανάπτυξη του εντέρου και της σπονδυλικής στήλης.

1.2.4 Μετα-κάμψη (postflexion) και μεταμόρφωση (metamorphosis)

Μετά την ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής, η προνύμφη περνά στο στάδιο της ενηλικίωσης που περιλαμβάνει την ολοκλήρωση των πτερύγιων και περαιτέρω μεταβολών που θα πραγματοποιηθούν μέχρι να υπάρξει αναπαραγωγική ωριμότητα. Η μεταμόρφωση λαμβάνει μέρος ανάμεσα στο στάδιο αυτό και στο postflexion που ολοκληρώνεται όταν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά μέσα και έξω γίνουν πανομοιότυπα με αυτά ενός νεαρού λαβρακιού. Τα αναπτυξιακά στάδια διαχωρίζονται βάσει των μεγάλων μορφολογικών και φυσιολογικών μετατροπών που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια τους (Εικόνα 4, Εικόνα 5).



Εικόνα 4 : Ορολογία των αναπτυξιακών σταδίων (Kendall et al., 1984).



Εικόνα 5: Ανάπτυξη μετά την εκκόλαψη βάσει των ημερών (Tsalafouta et al., 2015).

1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

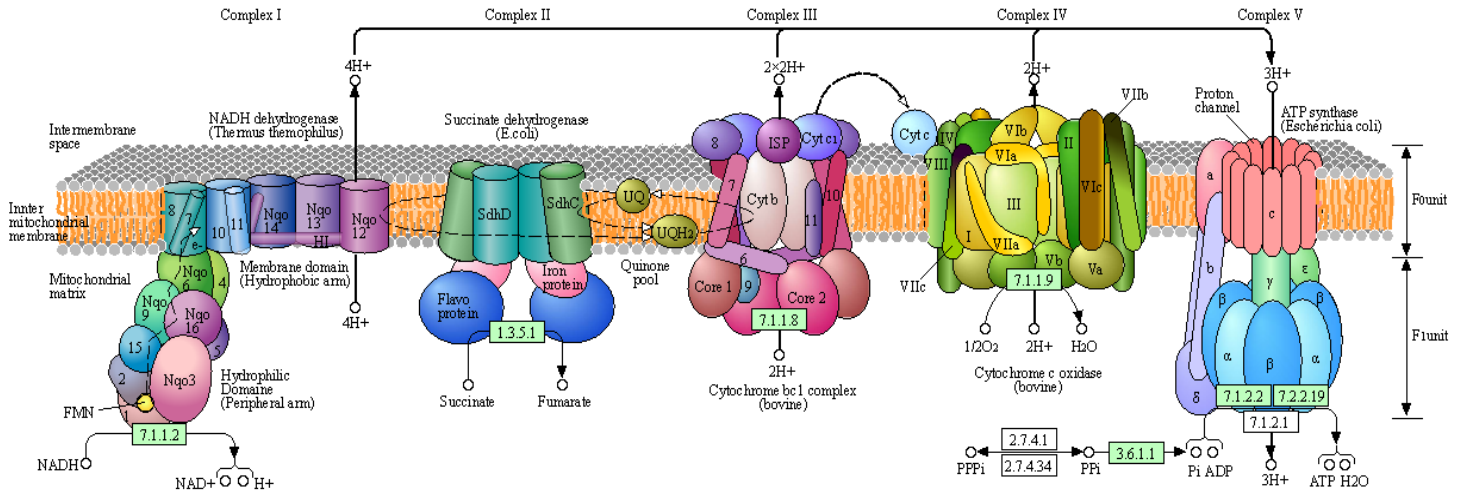
Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διαδικασία παραγωγής ενέργειας με την μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) για όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω της αποικοδόμησης υδατανθράκων ή λιπιδίων και καλύπτει το 80% της ανάγκης του οργανισμού για ATP. Η κύρια λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι να παράγει ανηγμένο νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, (NADH) και φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, (FADH₂) μέσω της οξείδωσης του ακέτυλο-συνενζύμου A (ακέτυλο-coA). Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, τα ηλεκτρόνια από το NADH και FADH₂ είναι αναγκαία για να επιτευχθεί η αναγωγή μοριακού οξυγόνου προς νερό. Η ροή ηλεκτρονίων είναι μια πολύ εξώεργη αντίδραση η οποία αποδίδει ενέργεια (Berg, 2012). Ταυτόχρονα με την μεταφορά ηλεκτρονίων προκαλείται και μια μετατόπιση πρωτονίων από την μήτρα του μιτοχονδρίου προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Τα πρωτόνια αυτά χρησιμοποιούνται για την σύνθεση ATP από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανο φωσφορικό (Εικόνα 6) (Para et al., 2012).

Μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα είχε γίνει ήδη γνωστό πως κατά την διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συμβαίνει σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη το οξυγόνο μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων φορέων. Άγνωστος ωστόσο παρέμενε ο μηχανισμός εκμετάλλευσης αυτής της ενέργειας για παραγωγή ATP. Αρχικές υποθέσεις έκαναν λόγο για την άμεση μετατροπή του ADP σε ATP με απευθείας μεταφορά των φωσφορικών ομάδων υψηλής ενέργειας, από κάποιο ενδιάμεσο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπως ήταν γνωστό ότι συμβαίνει στη γλυκόλυση.

Το 1960 ο Peter Mitchell διατύπωσε μία πρόταση για έναν εντελώς διαφορετικό μηχανισμό ενεργειακής σύζευξης όπου θα του χάριζε το Νόμπελ χημείας το 1978. Η πρόταση του Mitchell δεν έβαζε στο επίκεντρο του μηχανισμού τα ενδιάμεσα μόρια υψηλής ενέργειας αλλά την ηλεκτροχημική διαβάθμιση μεταξύ των δύο πλευρών μιας μεμβράνης. Αυτή η διαβάθμιση θα οδηγούσε τελικά στην σύνθεση ATP. Το μοντέλο αυτό ονομάστηκε «χημειωσμητική υπόθεση» και η θεμελιώδης νέα ιδέα που εισήγαγε ήταν ότι το ενδιάμεσο που επιτελούσε τη σύζευξη της μεταφοράς ηλεκτρονίων με τη σύνθεση ATP δεν ήταν κάποιο συγκεκριμένο μόριο αλλά μία ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Η βαθμίδωση δημιουργείται ως αποτέλεσμα της μεταφοράς ηλεκτρονίων και η αντίστροφη ροή των πρωτονίων μέσα από τη μεμβράνη προς την ενεργειακά ευνοούμενη κατεύθυνση είναι συνδεδεμένη με τη σύνθεση του ATP.

Συμπερασματικά, η ροή ηλεκτρονίων και η σύνθεση ATP είναι βιοχημικά διαφορετικά συστήματα που συνδέονται μόνο μέσω της πρωτονιοκινητής δύναμης. Η διαδικασία παραγωγής ATP παρουσία οξυγόνου καλείται αερόβια αναπνοή και λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (Cooper & Hausman, 2021).

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION



Εικόνα 6: Η Οξειδωτική φωσφορυλίωση, τα σύμπλοκα και οι υπομονάδες τους (<https://www.cusabio.com/pathway/Oxidative-Phosphorylation.html>)

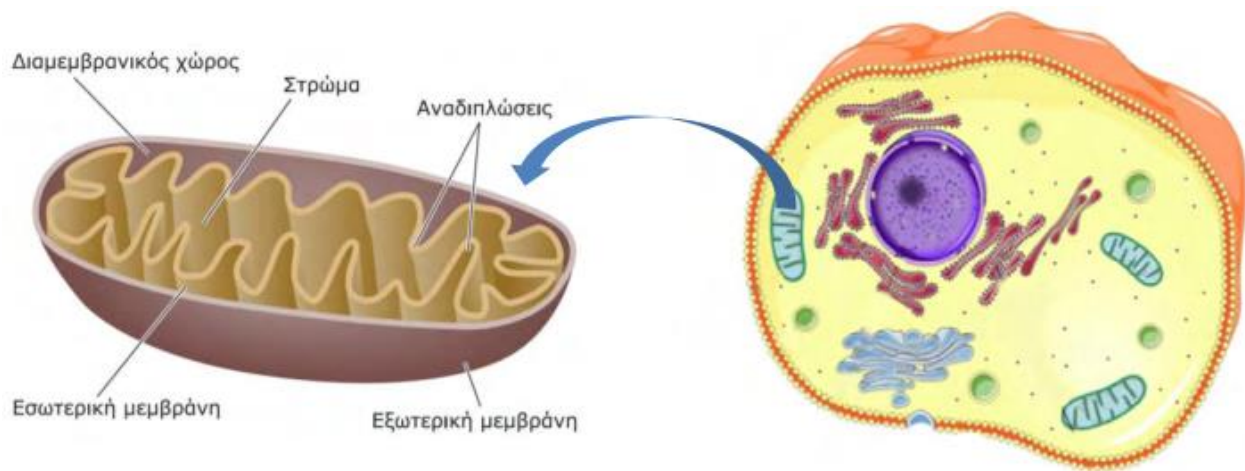
1.3.1. Μιτοχόνδριο

Το μιτοχόνδριο είναι το ενεργειακό οργανίδιο του κυττάρου, το οποίο χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά των τροφών είναι δυνατόν να παράγει ενέργεια την οποία θα μπορέσει να χρησιμοποιήσει το κύτταρο για τις δραστηριότητες του. Περίπου το 80-90% της ενεργειακής απαίτησης του κυττάρου και κατά συνέπεια του οργανισμού, καλύπτεται από τα μιτοχόνδρια. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων που εμφανίζονται μέσα στο κύτταρο δεν είναι σταθερός, αλλάζει ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τις ενεργειακές του απαιτήσεις, μπορεί να κυμαίνεται από μερικές εκατοντάδες έως και αρκετές χιλιάδες μιτοχόνδρια. (Sherwood L, 2016)

1.3.2. Χαρακτηριστικά μιτοχονδρίου

Το σύνηθες μέγεθος των μιτοχονδρίων είναι μήκος 2 μm και διάμετρος 0,5 μm, δίνοντας τους ωοειδές σχήμα παρόμοιο με αυτό των βακτηρίων (Berg, 2012). Στο εσωτερικό τους παρατηρούνται δύο συστήματα μεμβρανών τα οποία ανακαλυφθήκαν με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από τους George Palade και Fritjof Sjöstrand. Στο εσωτερικό δηλαδή παρατηρούμε μια εσωτερική μεμβράνη, μια εξωτερική μεμβράνη και τον ενδιάμεσο διαμεμβρανικό χώρο (Berg, 2012). Η εσωτερική μεμβράνη εμφανίζεται να περιέχει πολυάριθμες αναδιπλώσεις που ονομάζονται μιτοχονδριακές ακρολοφίες, ο

αριθμός τους είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον ρυθμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και εκτείνονται στο εσωτερικό ή στο στρώμα του οργανιδίου. Η εσωτερική μεμβράνη περιέχει ένα εμφανώς αυξημένο αριθμό πρωτεϊνών. Περισσότερο από 70% οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και την μεταφορά μεταβολιτών μεταξύ κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων. Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι το γεγονός πως για τα περισσότερα ιόντα και μικρά μόρια είναι αδιαπέραστη. Αυτό την καθιστά ικανή για την δημιουργία της διαβάθμισης πρωτονίων που θα ωθήσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε παραγωγή ATP. Αντιθέτως, η εξωτερική μεμβράνη περιέχει μεγάλο αριθμό πορινών που δημιουργούν ελεύθερα περατούς διάυλους για μόρια με μέγεθος μικρότερο των 1.000 Dalton (Da) (Cooper & Hausman , 2021) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 : Απεικόνιση της διαμερισματοποίησης του μιτοχονδρίου και της θέσης του στο κύτταρο.

Τα μιτοχόνδρια δεν είναι συνηθισμένα οργανίδια και εμφανίζουν μεγάλες διαφορές από τα οργανίδια που παρατηρούμε μέσα σε ένα ζωικό κύτταρο. Μια από τις μεγαλύτερες διαφορές είναι το γεγονός ότι περιέχουν δικό τους γονιδίωμα και παράγουν δικά τους μεταφορικά ριβονουκλεϊκά οξέα (tRNA), ριβοσωμικά ριβονουκλεϊκά οξέα (rRNA) και ορισμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Η λειτουργία του μιτοχονδρίου είναι άμεσα συνδεδεμένη με την συνεργασία και τον συνδυασμό πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και πρωτεϊνών που κωδικοποιεί το ίδιο το mtDNA και μεταφράζονται μέσα στο οργανίδιο. Ο συνδυασμός πρωτεϊνών προερχομένων από τα δυο γονιδιώματα μπορεί να

επιτευχθεί μόνο με την χρήση ειδικών σημάτων στόχευσης που κατευθύνουν πρωτεΐνες από την εξωτερική μεμβράνη στα διαφορετικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου διαμέσου υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου. Οι υποδοχείς αποτελούν τμήμα ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο ονομάζεται τρανσλοκάση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ή σύμπλοκο Tom. Επίσης, υπάρχει το σύμπλοκο Tim, τρανσλοκάση της εσωτερικής μεμβράνης που επιτρέπει στις πρωτεΐνες που είναι σημασμένες με σήμα που οδηγεί στο στρώμα του μιτοχονδρίου να μεταφερθούν εκεί. Απαραίτητη για τη μεταφορά των πρωτεϊνών είναι η συμμετοχή μοριακών συνοδών (Cooper & Hausman, 2021) .

1.3.3. Ενδοσυμβίωση και συνεξέλιξη

Η συνεργασία των γονιδιωμάτων συμβαδίζει με την θεωρία της ενδοσυμβίωσης και συνεξέλιξης όπου ερμηνεύει την προέλευση του μιτοχονδρίου ως βακτήριο. Το συμβάν της ενδοσυμβίωσης έλαβε χώρα όταν ένας ελεύθερος οργανισμός ικανός για οξειδωτική φωσφορυλίωση εγκολλώθηκε από κάποιου είδους κύτταρο, η φύση του οποίου αλλά και οι συνθήκες υπό τις οποίες συνέβη η συμβίωση διχάζουν την επιστημονική κοινότητα ακόμη και σήμερα (Poole & Gribaldo, 2014). Η διπλή μεμβράνη του μιτοχονδρίου, το κυκλικό DNA του και ο ειδικός μηχανισμός μιτοχονδριακής μεταγραφής και μετάφρασης συνηγορούν υπέρ αυτού του ενδεχόμενου. Το γονιδίωμα με την μεγαλύτερη ομοιότητα με το μιτοχονδριακό είναι εκείνο του βακτηρίου *Rickettsia prowazekii*. Το γονιδίωμα αυτού του οργανισμού περιέχει περισσότερα από 1 εκατομμύριο ζεύγη βάσεων και αποτελείται από 834 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτή η σχέση μονιμοποιήθηκε όταν βακτηριακό κύτταρο έχασε το δικό του DNA, πράγμα που το κατέστησε ανίκανο να ζει ανεξάρτητα, ενώ το κύτταρο ξενιστής έγινε εξαρτώμενο από την παραγωγή ATP του βακτηρίου. Κατά την διάρκεια της συνεχούς συνεργασίας των δύο οργανισμών πολλά γονίδια μεταφέρθηκαν από το μιτοχόνδριο στον πυρήνα του κυττάρου (Berg, 2012).

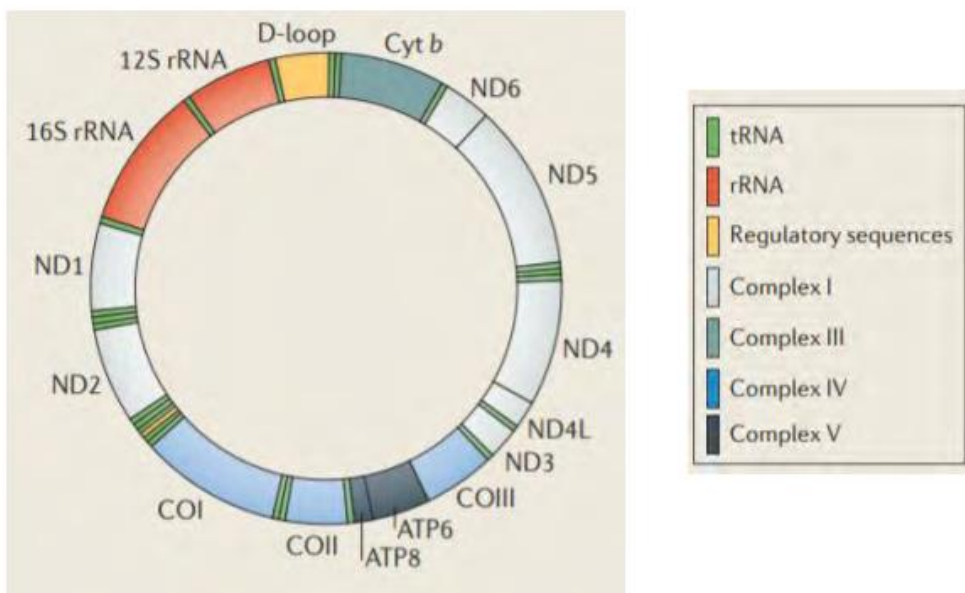
1.3.4. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι συνήθως κυκλικό και μπορεί να υπάρχει περισσότερες από μια φορές μέσα σε ένα οργανίδιο. Το μέγεθος του δεν είναι σταθερό σε όλους τους οργανισμούς και αλλάζει ανάλογα με το είδος του οργανισμού που βρίσκεται, για παράδειγμα στα περισσότερα ζώα συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου το μιτοχονδριακό γονιδίωμα περιέχει περίπου 16 kb, ενώ των ζυμομυκήτων περίπου 80 kb και των φυτών πάνω από 200 kb, τα οποία όπως βλέπουμε είναι σημαντικά μεγαλύτερα. Ο κύριος ρόλος των περισσότερων μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων είναι η παραγωγή μικρού αριθμού πρωτεϊνών οι οποίες συνήθως παίζουν κομβικό ρολό στο σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα κωδικοποιούν όλα τα rRNA και το μεγαλύτερο μέρος

από τα tRNA που χρειάζονται για να μεταφραστούν οι αντίστοιχες κώδικες αλληλουχίες (Cooper & Hausman , 2021).

Στα μιτοχόνδρια των μεταζώων κωδικοποιούνται 13 πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων καθώς και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, δύο μόρια rRNA (16S και 12S) και 22 μόρια tRNA, τα οποία μεταφράζουν τις 13 πρωτεΐνες από το γονιδίωμα του οργανιδίου αυτού (Εικόνα 8) (Zhang & Broughton, 2013). Ένα τεράστιο ποσοστό των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, πάνω από 95% του συνολικού αριθμού περίπου 1.500 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και μεταφράζονται σε ελεύθερα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα και μέσω σηματοδοτικών αμινοξικών αλληλουχιών εισέρχονται στο μιτοχόνδριο ως πλήρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς και για όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των μιτοχονδρίων καθώς και με την αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA (Cooper & Hausman, 2021) .

Το μιτοχονδριακό DNA μπορεί να υποστεί μεταλλάξεις και να τροποποιηθεί κάτι που μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στον οργανισμό. Όλα σχεδόν τα μιτοχόνδρια του γονιμοποιημένου ωάριου προέρχονται από το ωοκύτταρο και όχι από το σπερματοζωάριο. Με αυτό το τρόπο και οι μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά από τη μητέρα (Cooper & Hausman , 2021).



Εικόνα 8: Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Mishra & Chan, 2014)

1.4.1. Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση συμμετέχουν 5 σύμπλοκα, 4 από αυτά δημιουργούν την αναπνευστική αλυσίδα, υπεύθυνη για την δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων (σύμπλοκα I-IV) με το τελευταίο σύμπλοκο (σύμπλοκο V) να είναι η ATPσυνθάση που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ATP αξιοποιώντας την διαβάθμιση πρωτονίων.

- σύμπλοκο I : Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q
- σύμπλοκο II : Αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q
- σύμπλοκο III : Οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c
- σύμπλοκο IV : Οξειδάση του κυτοχρώματος c
- σύμπλοκο V : ATP συνθάση

1.4.2. Αναπνευστική αλυσίδα

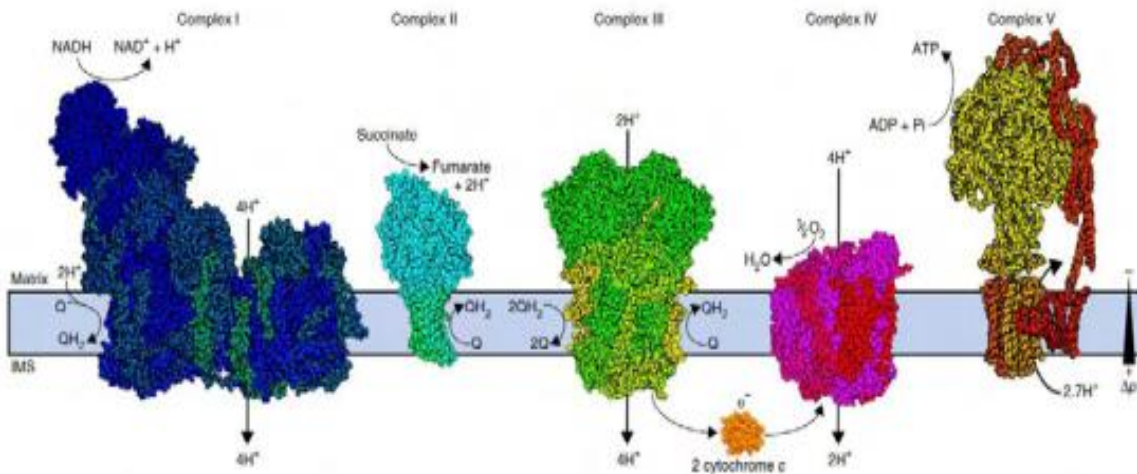
Ο Keilin το 1966 ήταν ο πρώτος που όρισε την αναπνευστική αλυσίδα, μετά την ανακάλυψη των κυτοχρωμάτων a,b,c, ως οξειδοαναγωγικών φορέων σε αερόβιους οργανισμούς που συνδέουν διαδοχικά την ενεργοποιημένη αφυδρογονάση του Wieland με το ένζυμο ενεργοποίησης οξυγόνου του Warburg (Para et al., 2012). Η αλυσίδα αυτή χρησιμοποιεί τα ηλεκτρόνια των NADH και FADH₂ τα οποία μεταφέρει στο μοριακό οξυγόνο. Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ισούται με $\Delta G^{\circ} = -52,5 \text{ kcal/mol}$. Μόνο με την χρήση των οξειδοαναγωγικών φορέων και της διέλευσης των ηλεκτρονίων από αυτούς, μπορεί να γίνει εκμεταλλεύσιμη η ελεύθερη ενέργεια. Οι φορείς βρίσκονται οργανωμένοι σε τέσσερα σύμπλοκα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων που αποτελούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ή αλλιώς την αναπνευστική αλυσίδα (Cooper & Hausman, 2021).

Αρχικά το σύμπλοκο I και II λαμβάνουν ηλεκτρόνια από αναγωγικά ισοδύναμα (NADH, FADH₂) που προέρχονται από τον κύκλο του Krebs και μεταφέρονται στην ουβικινόνη. Μια υδρόφοβη κινόννη, που διαθέτει την δυνατότητα να διαχέεται ελεύθερα εντός της εσωτερικής μεμβράνης και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο III. Γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο IV μέσω μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης (κυτόχρωμα c) που είναι συνδεδεμένη στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης. Αφού μεταφερθούν τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο IV εκεί θα γίνει η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Παράλληλα με την διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων τα σύμπλοκα I, III, IV μεταφέρουν πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο.

Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων που μεταφέρεται στην αλυσίδα, δέκα συνολικά πρωτόνια περνούν από το μιτοχονδριακό στρώμα στο διαμεμβρανικό χώρο. Τέσσερα από αυτά προέρχονται από το σύμπλοκο I. Τέσσερα πρωτόνια απελευθερώνονται στο διαμεμβρανικό χώρο και το σύμπλοκο III, δύο από αυτά αντλεί από το στρώμα και δύο ακόμη πρωτόνια προέρχονται από το συνένζυμο Q που έχει μεταφέρει από τα σύμπλοκα I ή III. Το σύμπλοκο IV αν και αντλεί τέσσερα πρωτόνια, δύο από αυτά θα χρησιμοποιηθούν για την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό και τα υπόλοιπα δύο θα περάσουν στην απέναντι πλευρά της μεμβράνης (Εικόνα 9).

Λιγότερα μόρια ATP σχηματίζονται από την οξείδωση του FADH₂ παρά από την οξείδωση του NADH καθώς η αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q, σε αντίθεση με την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q, δεν αντλεί πρωτόνια από την μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη (Berg, 2012).

Η πρωτονιακή διαβάθμιση που προκύπτει κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης, από την αναπνευστική αλυσίδα (σύμπλοκο I-IV), θα χρησιμοποιηθεί αργότερα από το σύμπλοκο V για την παραγωγή ATP (Zhang & Broughton, 2013).



Εικόνα 9 : Ενζυμικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Letts & Sazanov, 2017).

1.4.3. Δομή του σύμπλοκου V

Το σύμπλοκο V είναι ένα μεγάλο και πολύπλοκο ένζυμο, μπορεί να χωριστεί σε δύο υποσύμπλοκα (F₁ και F₀) το κάθε ένα με διακριτό ρόλο και δομή. Στα θηλαστικά μαζί αποτελούνται από 16 υπομονάδες συνολικού μοριακού βάρους 550 kDa, και τα δύο περιέχουν περιστροφικές και στατικές υπομονάδες

(Εικόνα 10). Το υδρόφοβο διαμεμβρανικό υποσύμπλοκο F_0 εντοπίζεται βυθισμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αποτελείται από έναν δακτύλιο με δέκα έως δεκατέσσερις υπομονάδες c ανάλογα το είδος του οργανισμού, στο εξωτερικό αυτού του δακτυλίου θα βρούμε μια υποομάδα a η οποία συνδέεται με 2 υπομονάδες b και μια d . Εσωτερικά συνδέεται με τις υπομονάδες γ και δ που δημιουργούν μια μορφή coiled-coil που δρα ως “άξονας/ρότορα”. Η στοιχειομετρία της F_0 είναι $1a:1b:c10-13$.

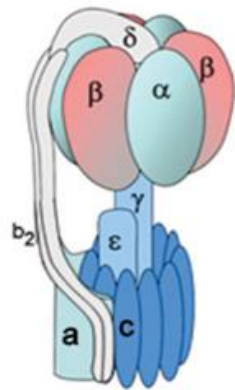
Το F_1 υποσύμπλοκο αποτελείται από πέντε κύριες υπομονάδες με στοιχειομετρία $\alpha_3\beta_3\gamma:\delta:\epsilon$ που προεκβάλουν στη μιτοχονδριακή μήτρα. Οι τρεις α -υπομονάδες και τρεις β -υπομονάδες διατάσσονται εναλλάξ, σχηματίζοντας έναν κύλινδρο $(\alpha\beta)_3$ γύρω από τον “άξονα” των υπομονάδων ($\gamma\delta\epsilon$) που ενώνουν τα δύο υποσύμπλοκα μεταξύ τους και συγκεκριμένα με την καταλυτική περιοχή των $(\alpha\beta)$ με τον c δακτύλιο. Οι α - και β -υπομονάδες έχουν παρόμοια τριτοταγή δομή, όπως αναμένεται από την ομοιότητά τους στην ακολουθία τους (Masasuke Yoshida et al., 2001, Muench et al., 2011).

1.4.4. Συναρμολόγηση του συμπλόκου V

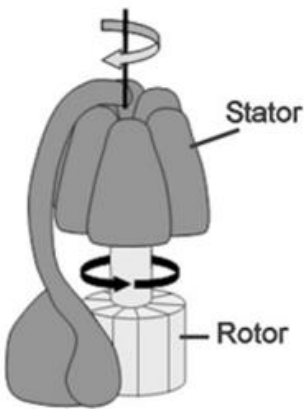
Οι βασικές υπομονάδες των F_1 (α, β, γ) και F_0 (a, b, c) συναρμολογούνται ξεχωριστά για να συνδυαστούν σε άλλες υπομονάδες για να σχηματίσουν το λειτουργικό σύμπλοκο (Para et al., 2012). Το υποσύμπλεγμα F_1 , αποτελούμενο από τρία αντίγραφα της α υπομονάδας/ ATP5FA1, και τριών β υπομονάδων/ ATP5F1B μαζί με τις κεντρικές υπομονάδες του “άξονα” γ /ATP5F1C, δ /ATP5F1D και ϵ /ATP5F1E, συναρμολογείται με τη βοήθεια των μοριακών συνοδών ATPAF1/ATP11 και ATPAF2/ATP12, τα οποία δεσμεύουν ATP5F1B και ATP5FA1, αντίστοιχα.

Ο δακτύλιος c , κωδικοποιημένος από ATP5MC1, ATP5MC2 και ATP5MC3, συναρμολογείται στη μεμβράνη, ο περιφερειακός σκελετός επίσης προσυναρμολογείται και ενώνεται με τις κυλινδρικές υπομονάδες c και το υποσύμπλοκο F_1 , αφότου αυτά ενωθούν μεταξύ τους. Ο περιφερειακός σκελετός ενσωματώνεται σε δύο βήματα: πρώτες οι υπομονάδες b / ATP5PB, d / ATP5PD, F_6 / ATP5PF και OSCP/ ATP5PO και στη συνέχεια οι υπομονάδες e / ATP5ME, g / atp5I και f / ATP5MF. Στα αρχικά αυτά στάδια η πρωτεΐνη αναστολέα IF1 συνδέεται με τα ενδιάμεσα που δημιουργούνται κατά την συναρμολόγηση και αναστέλλει την λειτουργία του υποσύμπλοκου F_1 σαν ATPase. Η πρωτεΐνη αυτή απελευθερώνεται με την εισαγωγή των δύο υπομονάδων που κωδικοποιούνται από mtDNA. Στις περιπτώσεις στις οποίες λείπουν τα a /MT-ATP6 και $A6L$ /MT-ATP8, το προηγούμενο ενδιάμεσο θα συσσωρευτεί, κάτι που δείχνει ξανά την σημαντική συνεργασία των δυο γονιδιωμάτων. Η αλληλεπίδραση των τελευταίων υπομονάδων σταθεροποιείται με τις $8L$ /MLQ/C14ORF2 και τις περιφερειακές υποομάδες DAPIT/USMG5 με την

ενσωμάτωση τους θα τελειώσει η συναρμολόγηση του συμπλόκου V (Εικόνα 11) (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018).

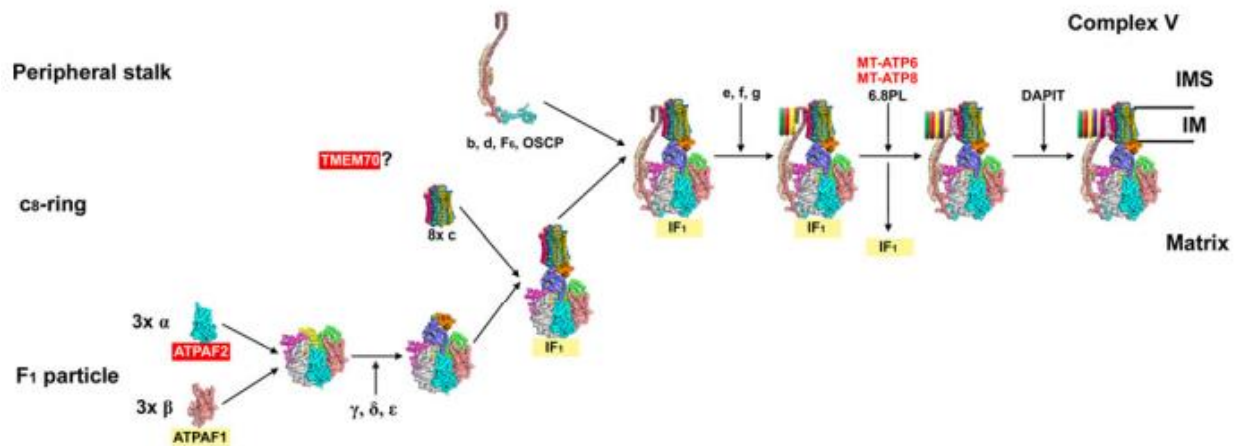


F₁F₀-ATPase



F ₁ F ₀ -ATPase (<i>E. coli</i>)	F ₁ F ₀ -ATPase (bovine mitochondria)	Domain	Motor component	Situation/function
β	β	V ₁ /A ₁ /F ₁	Stator	Catalysis; torque generation
α	α	V ₁ /F ₁	Stator	Catalysis/regulation; torque generation
—	—	V ₁	Stator	Stator linkage; regulatory function
γ	γ	V ₁ /A ₁ /F ₁	Rotor	Axle of the rotary motor
δ ^b	OSCP	V ₁ /A ₁ /F ₁	Stator	Fixing static membrane subunit <i>a</i> with respect to the (AB) ₃ motor
—	—	V ₁ /A ₁	Rotor	Axle of the rotor. Possible regulatory function, imposing direction of rotation?
ε ^c	δ ^b	F ₁	Rotor	Rotor axle; inhibition of ATP hydrolysis when Δμ _{H⁺} low
—	ε ^c	F ₁	Rotor	Axle of the rotary motor
<i>b</i>	<i>b</i>	V ₁ /F ₀	Stator	Linkage between ATP hydrolysing and proton pumping components of the stator
—	—	V ₁	Stator	Inhibition of ATP turnover by membrane-detached V ₁
<i>a</i>	<i>a</i>	V _a /A _a /F ₀	Stator	Static element of the membrane ion pump. Transmembrane cation movement
<i>c</i>	<i>c</i>	V _a /A _a /F ₀	Rotor	Rotor element of the membrane ion pump. Transmembrane cation movement
—	—	V _a /A _a	Rotor	Coupling between axle and ion pump elements of the rotor.
—	<i>d</i>	F ₁	Stator	Linkage between ATPase and cation pump components of the stator
—	—	V ₀	Stator?	Not known
—	F ₆	F ₁	Stator	Linkage between ATPase and cation pump components of the stator
—	A6L	F ₀	Stator	Cation translocation?
—	ε, f, g, i/j	F ₀	Stator	Oligomerisation state (hence stability)?

Εικόνα 10: Απεικόνιση της οργάνωσης των υπομονάδων του συμπλόκου V μαζί με την λειτουργία τους. (Muench et al., 2011)



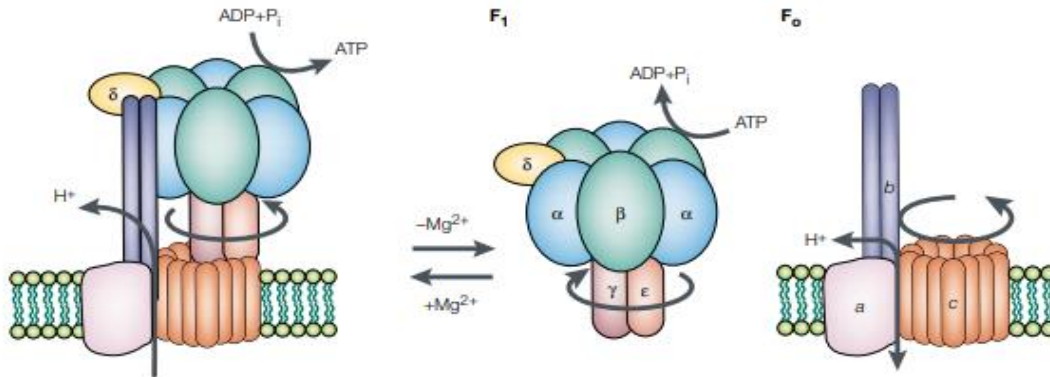
Εικόνα 11: Συναρμολόγηση του συμπλόκου V (Signes & Fernandez-Vizarra, 2018)

1.4.5 Τρόπος λειτουργίας

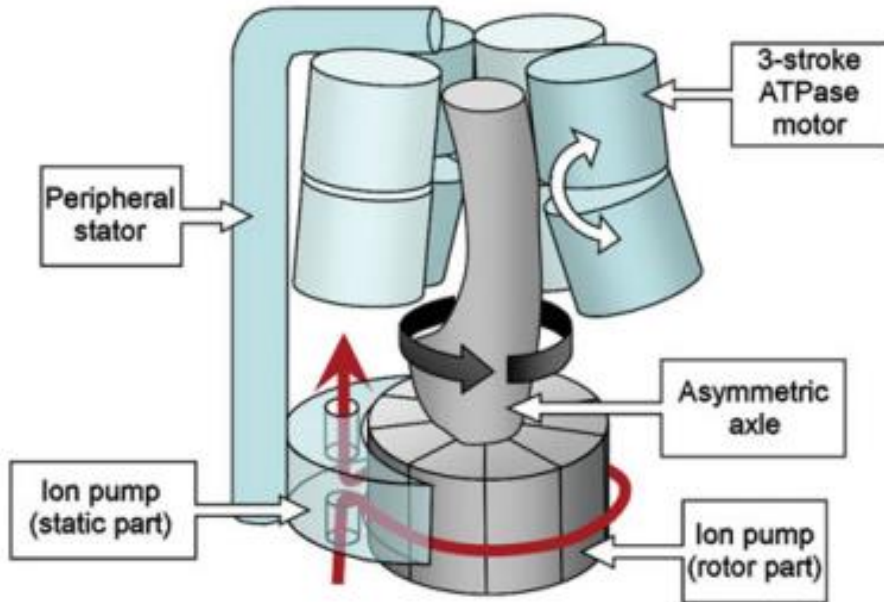
Το υποσύμπλοκο F_1 μπορεί να δράσει και ως ATP συνθάση και ως ATP υδρολάση αυτό καθορίζεται από την φορά περιστροφής της υπομονάδας γ καθώς αυτή προκαλεί τις αλλαγές στις καταλυτικές υπομονάδες β του υποσυμπλόκου F_1 . Όταν βρίσκεται σε σύνδεση με το F_0 , τότε η φορά περιστροφής και κατά συνέπεια η λειτουργία του F_1 καθορίζονται από την υποομάδα c και τελικά από την φορά των πρωτονίων. Όταν τα πρωτόνια έχουν φορά διέλευσης από τον διαμεμβρανικό χώρο προς την μήτρα τότε θα έχουμε παραγωγή ATP, σε αντίθετη περίπτωση ή αν το υποσύμπλοκο ήταν ελεύθερο, θα είχαμε υδρόλυση ATP και αντίστροφη περιστροφή της γ υπομονάδας (Εικόνα 12) (Masasuke Yoshida et al., 2001).

Αν παρατηρήσουμε την κίνηση της υπομονάδας γ , θα δούμε ότι βάσει της θέσης της, οι υπομονάδες β μπορούν να αποκτήσουν 3 μορφές: ανοιχτή, κλειστή και ενδιάμεση μορφή. Στην ανοιχτή τους μορφή, ανταλλάσσουν ελευθέρως συστατικά από το ενεργό τους κέντρο με το εξωτερικό περιβάλλον (ATP, ADP, Pi), στην ενδιάμεση μορφή το ADP και ο ανόργανος φώσφορος (Pi) βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά δεν μπορούν να υποστούν ενζυμικές αλλαγές, ούτε όμως να αποδεσμευτούν και να μεταφερθούν στην μήτρα του μιτοχονδρίου. Τέλος, στην κλειστή τους μορφή το δεσμευμένο ADP και Pi, συνδέονται λόγω της αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης, από ενδιάμεση σε κλειστή και γίνεται η σύνθεση του ATP. Η επιστροφή σε ανοιχτή μορφή οδηγεί στην έξοδο του ATP προς το κυτταρόπλασμα. Επομένως το σύμπλοκο μπορούμε να πούμε ότι αποτελείται από μια μονάδα αγωγής πρωτονίων (F_0) που θέτει σε κίνηση μια καταλυτική μονάδα την F_1 (Εικόνα 13). Για κάθε 3 πρωτόνια που μεταφέρονται στην μήτρα

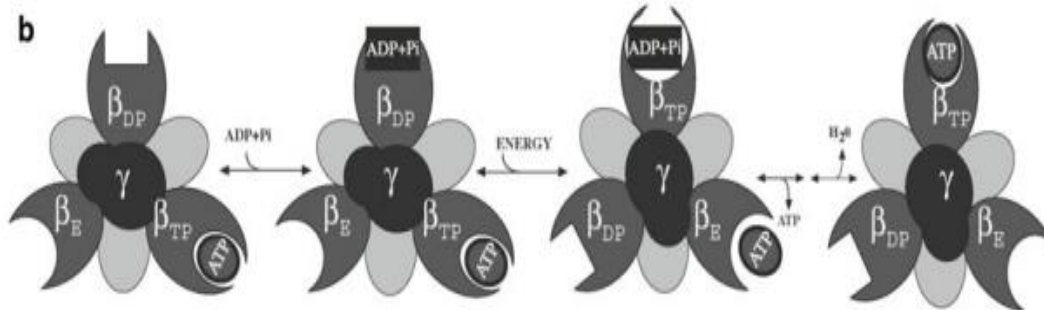
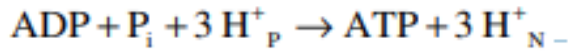
του μιτοχονδρίου, σχηματίζεται και ένα μόριο ATP από τα σύμπλοκα δημιουργώντας την τελική αντίδραση (Εικόνα 14) (Masasuke Yoshida et al., 2001).



Εικόνα 12: Απεικόνιση της λειτουργίας του υποσύμπλοκου F_1 σε ελεύθερη μορφή και συζευγμένο με το F_0 (Masasuke Yoshida et al., 2001).



Εικόνα 13 : Απλοποιημένο μοντέλο λειτουργίας των υπομονάδων (Papa et al., 2012).



Εικόνα 14 : Απεικόνιση των τριών δομών της υπομονάδας β και της στοιχειομετρικής εξίσωσης παραγωγής ATP (Para et al., 2012) (Masasuke Yoshida et al., 2001).

1.5 Διπλασιασμός γονιδιώματος

1.5.1 Γονιδίωμα τελεόστεων και τρίτος γύρος διπλασιασμού

Η εξέλιξη πολλών γενεολογιών κατά την ιστορία της ζωής στην γη, έχει επηρεαστεί από πολλά διαφορετικά γεγονότα. Ένα από τα πολύ σημαντικά είναι ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος. Ο τρόπος που μπορεί να προκύψει ένα γεγονός αυτού του είδους, είναι με κάποιο λάθος που να οδηγήσει στην μη ελάττωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων κατά την μείωση. Είναι απαραίτητο οι μεταλλάξεις να συμβούν στην γαμετική σειρά των γονέων ώστε να κληρονομηθούν. Μπορεί όμως να συμβούν και σε κάποια από τα πολύ αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης. Σημαντικό είναι να σημειώσουμε, ότι είναι πολύ σπάνια γεγονότα και συνήθως τέτοιου είδους πολυπλοειδίες δεν επιβιώνουν. Ο Susumu Ohno ήταν ο πρώτος που διατύπωσε την ιδέα του διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (wgd = whole genome duplication) βασιζόμενος τόσο σε συγκρίσεις καρυότυπων και των μεγεθών γονιδιωμάτων, όσο και στην παρατήρηση ότι οι τετραπλοειδίες εμφανίζονται φυσικά σε ψάρια και αμφίβια .

Ένας τέτοιος διπλασιασμός έχει συμβεί στην αρχή της γενεαλογίας των τελεόστεων, στην οποία συμπεριλαμβάνεται το λαβράκι. Ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος οδηγεί στο σχηματισμό δύο πανομοιότυπων αντιγράφων κάθε γονιδίου τα οποία ονομάζονται παράλογα και είναι τουλάχιστον αρχικά, πανομοιότυπα και λειτουργικά όμοια.

Μια υπόθεση που αναφέρεται σε τέτοιο είδος διπλασιασμού, είναι η υπόθεση 2R (2 Round hypothesis) και αναφέρεται σε 2 γύρους διπλασιασμού (1R-2R) με την κυρίαρχη άποψη να τους τοποθετεί:

1R στον κοινό προγονό των αγνάθων σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων.

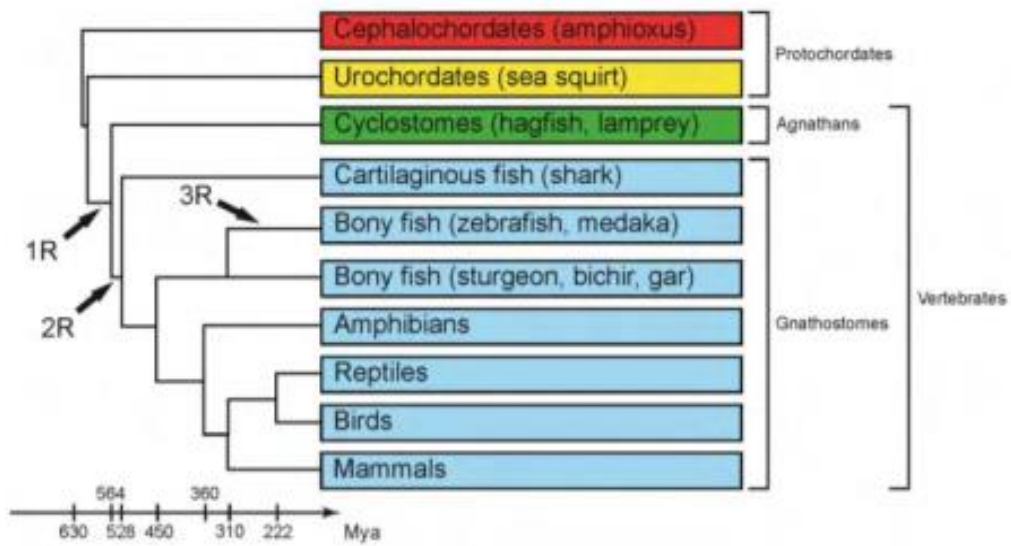
2R στον κοινό πρόγονο γναθοστομάτων.

Συμπερασματικά, η υπόθεση 2R προβλέπει την ύπαρξη τεσσάρων παράλογων για κάθε αρχικό ορθόλογο των κεφαλοχορδωτών στο γονιδίωμα των σπονδυλωτών (Εικόνα 15). Ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος καλύπτεται πράγματι από τέσσερα παράλογα που αποτελούν ομόλογα των κεφαλοχορδωτών, ισχυρή ένδειξη υπάρξης της υπόθεσης 2R (Kasahara, 2007).

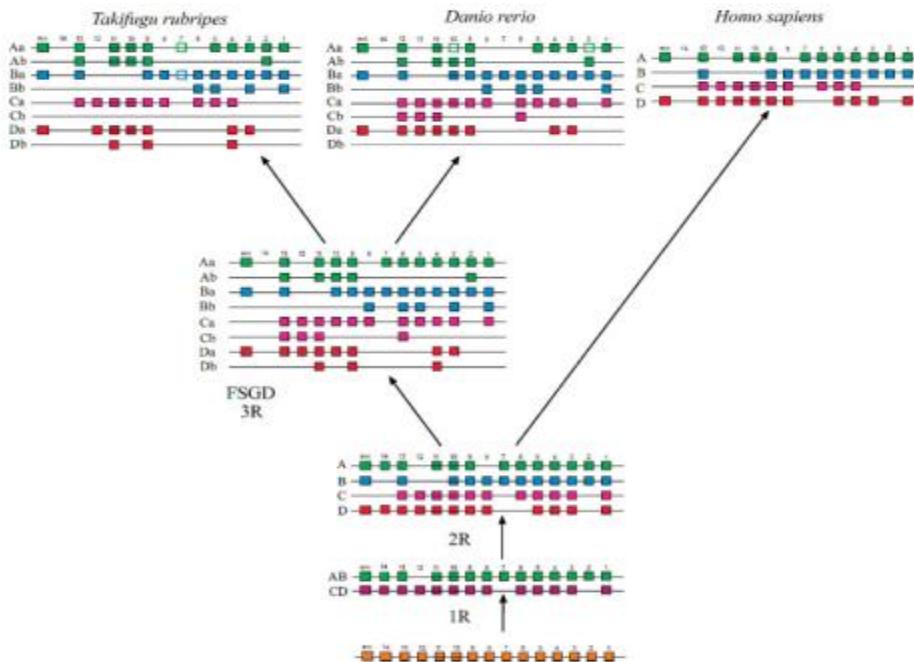
Πλέον υπάρχουν πολλά στοιχεία που δείχνουν ότι ένα τέτοιο γεγονός, συνέβη στην αρχή της γενεαλογίας των τελεόστεων. Ο τρίτος αυτός διπλασιασμός έλαβε την ονομασία (Teleost-specific Genome Duplication → TSGD) (Εικόνα 15). Κάτι που χρονολογικά θα τον τοποθετούσε περίπου 350 εκατομμύρια χρόνια πριν, κατά τα τέλη της Δεβόνιας περιόδου, στη γενεαλογία των ακτινοπτερυγίων, αλλά όχι σε αυτή των σπονδυλωτών της ξηράς. Το αποτέλεσμα είναι αρχικά στους τελεόστεους να παρατηρούνται οκτώ αντίγραφα του προγονικού γονιδιώματος, σε σύγκριση με τα τέσσερα που κατέχουν τα τετράποδα και οι σαρκοπτερύγιοι (Εικόνα 16).

Ο WGD οδηγεί στο διπλασιασμό όλων των γονιδίων και των χρωμοσωμάτων. Παρόλα αυτά, λόγω των αναδιατάξεων που υφίστανται τα χρωμοσώματα, και το γεγονός ότι συμπεριφέρονται δυναμικά ανά την εξέλιξη, αυτό έχει σαν πιθανό αποτέλεσμα ο αριθμός των χρωμοσωμάτων να μειωθεί. Η απλοειδής σειρά των χρωμοσωμάτων αποτελούνταν από 12-13 χρωμοσώματα πριν τον TGD, οπότε μετά τον διπλασιασμό περιμένουμε 24-26 χρωμοσώματα στην απλοειδή σειρά, και όντως πάνω από το 50 % των τελεόστεων παρατηρείται πως έχουν αυτόν τον αριθμό στις απλοειδείς σειρές τους, ένδειξη πως ο αριθμός των χρωμοσωμάτων παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος κατά την διάρκεια της εξέλιξης των περισσότερων ειδών (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Μελέτη που διεξήχθη στα γονίδια HOX, αποκάλυψε επτά συστάδες HOX στο zebrafish σε αντίθεση με τις τέσσερις που βρέθηκαν στα τετράποδα. Τα διπλασιασμένα γονίδια HOX έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς τελεόστεους. Ήταν όμως ασαφές εάν τα γονίδια ήταν διπλασιασμένα σε όλους τους τελεόστεους. Μετά από την ανακάλυψη συντηρημένης συνταϊνικότητας συστάδων HOX (Εικόνα 16) και άλλων γονιδίων σε ένα μεγάλο αριθμό τελεόστεων αλλά και η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος αποτέλεσαν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία ώστε οι αμφιβολίες για την καθολικότητα του τρίτου γύρου διπλασιασμού των τελεόστεων να εξανεμιστούν και να επιβεβαιωθεί το TGD.



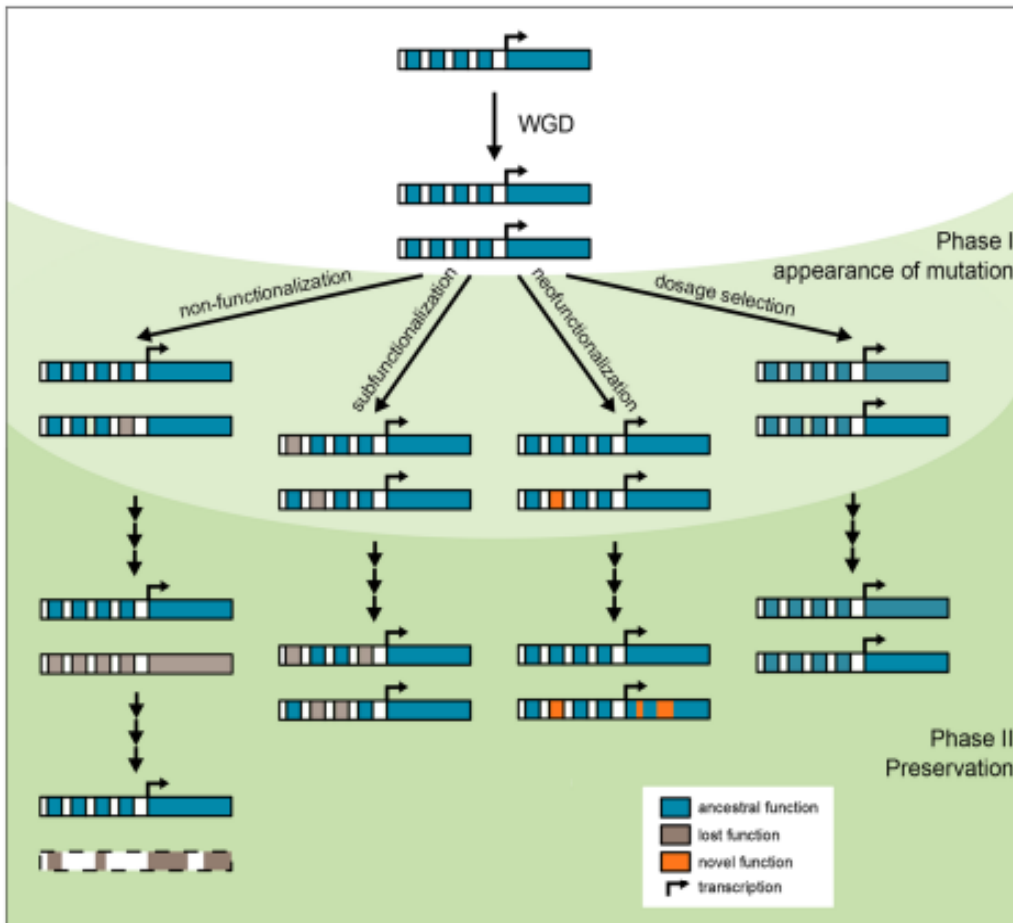
Εικόνα 15 : Χρονική κλίμακα της υπόθεσης 1-2R και 3R (Kasahara, 2007).



Εικόνα 16: Εξέλιξη συστάδων Hox γονιδίων. (Glasauer & Neuhauss, 2014).

1.5.2 Εξελικτική “μοίρα” των παράλογων γονιδίων

Από την στιγμή του διπλασιασμού ενός γονιδίου, ανεξάρτητα από τον μηχανισμό, το ζεύγος παραλόγων που δημιουργείται, αν και τα δυο γονίδια ξεκινούν με ίδια αλληλουχία και λειτουργία, δεν θα έχουν πάντα την ίδια “μοίρα”. Η συσσώρευση τυχαίων μεταλλάξεων μαζί με τις εξελικτικές πιέσεις που ασκούνται στα γονίδια θα καθορίσουν την τελική τους λειτουργία (Εικόνα 17).



Εικόνα 17 : Η μοίρα των διπλασιασμένων γονιδίων (Glasauer & Neuhauss, 2014).

1) Απώλεια λειτουργίας

Το συχνότερο φαινόμενο για ένα διπλασιασμένο γονίδιο, είναι η απώλεια λειτουργίας. Ο λόγος που είναι το συνηθέστερο φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι είναι πιο πιθανό να συμβούν

βλαβερές παρά ωφέλιμες μεταλλάξεις. Έτσι η συσσώρευση αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να οδηγήσει στην εξάλειψη των δομικών συστατικών του γονιδίου και να απενεργοποιηθεί/χαθεί (Zhang, 2003).

2) Επιμερισμός λειτουργίας

Εκτός της περίπτωσης που η έκφραση δυο όμοιων γονιδίων είναι ωφέλιμη, σπάνια θα διατηρήσουν και τα δυο παράλογα ίδια λειτουργία. Ο επιμερισμός λειτουργίας είναι ένα πολύ ενδιαφέρον φαινόμενο, όπου τα θυγατρικά γονίδια υιοθετούν κομμάτια της λειτουργίας του προγονικού γονιδίου, με αποτέλεσμα τα δυο παράλογα μαζί να συνεχίσουν να εκτελούν την αρχική λειτουργία. Τα δύο αυτά γονίδια θα σταθεροποιηθούν στο γονιδίωμα, καθώς η απώλεια ενός θα επηρέαζε την βασική γονιδιακή λειτουργία.

3) Απόκτηση νέας λειτουργίας

Εκτός από την απώλεια ή την διατήρηση της αρχικής λειτουργίας, ένα από τα παράλογα γονίδια μπορεί να αναπτύξει μια καινούργια λειτουργία. Αυτό απαιτεί το ένα γονίδιο να διατηρήσει τις ιδιότητες του προγονικού, έτσι το δεύτερο θα μπορεί να εμφανίσει την νέα λειτουργία. Κάτι που χρειάζεται ποικίλους αριθμούς αντικαταστάσεων αμινοξέων, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός πως ευεργετικές μεταλλάξεις εμφανίζονται με χαμηλότερο ρυθμό, είναι λογικό ότι η δημιουργία νέας λειτουργίας είναι πιο σπάνιο φαινόμενο από τα προηγούμενα δύο (Glasauer & Neuhauss, 2014).

4) Διατήρηση λειτουργίας και στα δυο παράλογα

Ένας ενδιαφέρον μηχανισμός διατήρησης λειτουργίας και των δυο παραλόγων, ονομάζεται ισορροπία γονιδιακής δόσης (gene dosage effect). Μετά από ένα WGD η έκφραση όλων των γονιδίων είναι αυξημένη, η στοιχειομετρία των προϊόντων για αυτό τον λόγο όμως παραμένει σταθερή, κάτι κομβικό για την διατήρηση αρκετών γονιδίων (Glasauer & Neuhauss, 2014). Μεταγραφικοί παράγοντες παρατηρείται πως έχουν υψηλότερη διατήρηση μετά από ένα συμβάν WGD, πάρα από διπλασιασμό ενός γονιδίου λόγω της ανισορροπίας έκφρασης που προκαλεί ο μονός διπλασιασμός (Edger & Pires, 2009).

1.6 Θερμοκρασία

Όπως προαναφέρθηκε το λαβράκι μπορεί να ζήσει σε νερά με ευρείες θερμοκρασίες (5°-28°C) στο στάδιο των αβγών όμως εμφανίζεται μια πολύ πιο μικρή ανοχή σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Έρευνες έχουν δείξει, ότι η αλλαγή στην θερμοκρασία εκκόλαψης των αυγών μπορεί να παρουσιάσει μεγάλες

αλλαγές στην ανάπτυξη των ιχθυδίων, με ένα από τα βασικότερα μοτίβα που εμφανίζονται, να είναι η ταχύτερη εκκόλαψη με τη αύξηση της θερμοκρασίας, με σύνηθες αποτέλεσμα το μικρότερο μέγεθος καθώς και διαφορές όπως το φύλο. Σε σχετική έρευνα δημιουργήθηκαν 3 ομάδες με διαφορετικές θερμοκρασίες εκκόλαψης και παρατηρήθηκαν στατιστικές διάφορες μεταξύ των ποσοστών αρσενικών και θηλυκών που προέκυψαν από κάθε ομάδα αυγών (Koumoundouros et al., 2001. Pavlidis et al., 2000). Ακόμα σε παρεμφερείς μελέτες λαβράκια που αναπτύχθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες (20°C) φάνηκε να έχουν πιο συχνή εμφάνιση σκελετικών δυσμορφιών (Boglione et al., 2013; Georgakopoulou et al., 2007; Sfakianakis et al., 2006). Γενικότερα έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, ανάλογα με την θερμοκρασία στην οποία έχουν μεγαλώσει τα αυγά και οι προνύμφες (Kourkouta et al., 2021, Klimogianni et al., 2004).

1.7 Σκοπός

Συνοψίζοντας το λαβράκι είναι ένας πολύ ενδιαφέρον οργανισμός, και αναπτυξιακά με τις διαφορές που δημιουργούνται ανάλογα με τις θερμοκρασίες που μεγαλώνει, και εξελικτικά καθώς ανήκει στους τελεόστεους που εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων προσαρμογών αλλά και του ειδικού διπλασιασμού που έχει προκύψει στην γενολογία τους. Το λαβράκι είναι ένας πολύ σημαντικός οργανισμός για την οικονομία, ιδιαίτερα για χώρες της Μεσογείου όπως η Ελλάδα.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να εντοπιστούν γονίδια του συμπλόκου V της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία αποτελεί τον κύριο μηχανισμό παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο και κατ' επέκταση για τον οργανισμό, τα οποία έχουν υποστεί TSGD και έχουν διατηρηθεί και τα δύο παράλογα, και να μελετηθεί η λειτουργία τους σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, καθώς και σε ομάδες που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες εκκόλαψης .

Η υπερθέρμανση του πλανήτη είναι ένα αρκετά μελετημένο ζήτημα, που επηρεάζει την κοινωνία και κυρίως το περιβάλλον μας. Τα τελευταία 50 χρόνια οι ωκεανοί έχουν απορροφήσει το 90 % της θερμότητας που έχει προσαχθεί στο κλιματικό σύστημα (Bindoff et al., 2007). Αυτό αποτελεί και τον λόγο που και η μέση θερμοκρασία αλλά και οι ανωμαλίες στην θερμοκρασία των θαλασσών του πλανήτη αυξάνονται διαρκώς. Από το 1910 μέχρι το 2021 η θερμοκρασία ανεβαίνει με ρυθμό 0,14°C ανά δεκαετία και υπολογίζεται ότι μέχρι το 2100 η μέση θερμοκρασία θα έχει αυξηθεί κατά 1-4 βαθμούς .(Laffoley et al., 2016). Όπως έχει αναφερθεί η ιδανική θερμοκρασία για τα αυγά του λαβρακιού είναι 13°-15° βαθμούς. Είναι λογική λοιπόν η ανησυχία για την επίδραση που θα έχει η αύξηση αυτή, στην ζωή και ανάπτυξη των ψαριών και συγκεκριμένα στο λαβράκι. Η παρούσα μελέτη στα πλαίσια της πτυχιακής

εργασίας εξέτασε τις αλλαγές στην έκφραση των γονίδιων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι θερμοκρασίες αυτές ξεκινάνε από χαμηλές (14°C), περιλαμβάνου φυσιολογικές (17°C) έως πολύ υψηλές (20°C) με σκοπό να απεικονίσουν την επίδραση που μπορεί να έχει η αύξηση της θερμοκρασίας στα ψάρια αυτά.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα στάδια 2.1 και 2.2 εκτελέστηκαν από μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας πριν την έναρξη της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

2.1 Συλλογή και προσδιορισμός δειγμάτων

Τα ψάρια υποβλήθηκαν σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες 14, 17, 20 °C από την αρχή του σταδίου της επιβολής έως την κατανάλωση του λεκιθικού σάκου. Όλες οι ομάδες διατηρήθηκαν σε ίδιες συνθήκες εκτροφής και θερμοκρασίας εκτροφής (20 °C) έως το τέλος της δοκιμής (18–19 mm TL). Ο εγκλιματισμός των αυγών από τη θερμοκρασία ωοτοκίας (17 °C) στις θερμοκρασίες δοκιμής και στη συνέχεια στην κοινή θερμοκρασία (20 °C) ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε με ρυθμό 0,5 και 0,2 °C/h, αντίστοιχα. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο μέχρι τη μεταμόρφωση. Όλα τα αυγά προέρχονταν από την ίδια αυθόρμητη αναπαραγωγή γεννητόρων. Η αρχική πυκνότητα εκτροφής ήταν 115 αυγά/L (Πίνακας 4). Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ) στην Κρήτη. Στο πείραμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (Kourkouta et al., 2021)

Πίνακας 4 :Αριθμός δειγμάτων ανά στάδιο και θερμοκρασία

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	HATCHING (EH)	1ST FEEDING (FF)	FLEXION (FL)	END OF LARVA REARING (ELR)	MID METAMORHOSIS (MM)
14 °C	8	12	12	12	12
17°C	8	12	12	12	12
20°C	7	12	12	12	12

2.2 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

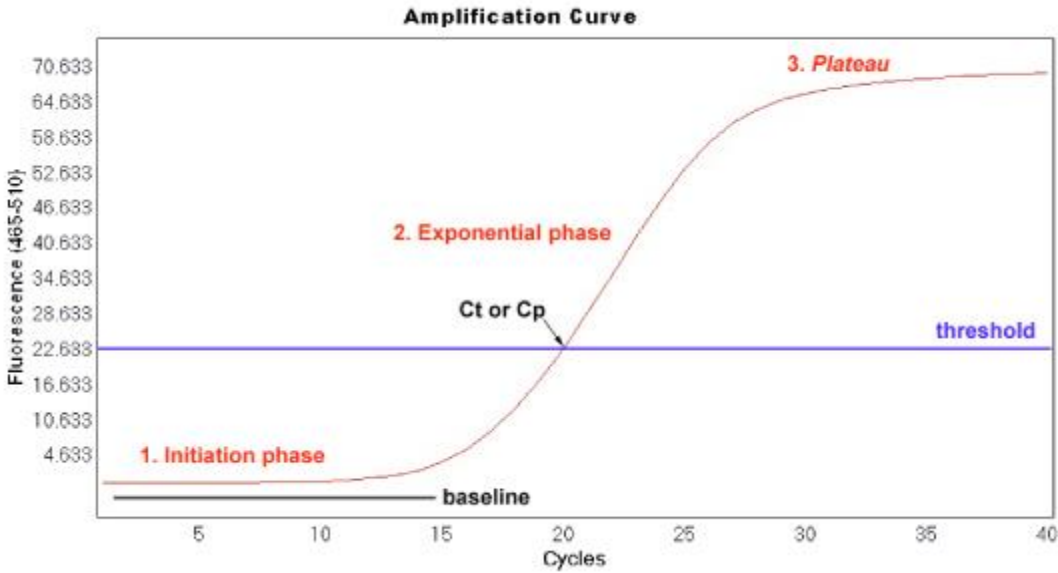
Η απομόνωση του ολικού RNA από τα ιχθύδια διεξάχθηκε με την χρήση του εμπορικού kit E.Z.N.A total RNA kit (Omega) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα, η σύνθεση του cDNA

πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κιτ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor της Thermo Fisher Scientific. Η απομόνωση mRNA και η σύνθεση του cDNA έγινε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή του αντίστοιχου kit.

2.3. Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης – Real time PCR

Η qPCR είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων και ο κύριος λόγος είναι η μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια που προσφέρει. Η τεχνική αυτή είναι πολύ κοντά με την συμβατική PCR καθώς η διαφορά τους είναι η ανίχνευση και καταμέτρηση των προϊόντων μιας PCR σε πραγματικό χρόνο κατά την διάρκεια ενός κύκλου, για αυτό χρησιμοποιούνται τα εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με πολύπλοκα συστήματα κατόπτρων και φίλτρων που διαβάζουν τον φθορισμό των χρωστικών που έχουν ενσωματωθεί στα υπό μελέτη δείγματα. Η αντίδραση βασίζεται στο ένζυμο DNA πολυμεράση που μπορεί να αντιγράψει τμήματα DNA τα οποία θα οριστούν μέσω των εκκινήτων καθώς η DNA πολυμεράση δεν είναι ικανή να ξεκινήσει μόνη της την αντιγραφή ενός τμήματος χωρίς ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων για να ξεκινήσει η ενίσχυση αυτή. Η πολυμεράση για να είναι λειτουργική χρειάζεται περιβάλλον συγκεκριμένης αλατότητας και pH, για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με σκοπό την οριοθέτηση των συνθηκών. Επιπλέον για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαραίτητη είναι η προσθήκη νουκλεοτιδίων και νερού για την αραιώση των συστατικών στις κατάλληλες τελικές συγκεντρώσεις τους. Η παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο γίνεται με χρήση μιας χρωστικής, στην συγκεκριμένη περίπτωση SYBERGREEN, η οποία προσδένεται και φθορίζει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (522 nm) εκλεκτικά μόνο στο δίκλωνο DNA τα οποία είναι ευθέως ανάλογα της αρχική ποσότητας του cDNA, λόγω αυτού είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση του αρχικού προϊόντος.

Η αντίδραση εμφανίζει τρεις φάσεις: την αρχική φάση όπου η χρωστική δεν παράγει ή παράγει ελάχιστο φθορισμό, την λογαριθμική φάση όπου γίνεται και η μέτρηση του φθορισμού. Το συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού ονομάζεται κατώφλι φθορισμού (Ct), στο πείραμα αυτό το κατώφλι ορίστηκε 70000, είναι κοινό για όλα τα υπό μελέτη δείγματα. Τέλος, παρατηρείται και το στάδιο πλατό στο οποίο ολοκληρώνεται η αντίδραση, το οποίο σημαίνει ότι έχει σταματήσει η ενίσχυση του DNA λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων είτε φθοράς της πολυμεράσης (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: τα τρία στάδια της PCR, η καμπύλη ενίσχυσης με κόκκινο χρώμα και το κατώφλι φθορισμού με μπλε (Behlke & Berghof-Jäger, 2019).

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε και κανονικοποιήθηκε με την βοήθεια γονιδίων αναφοράς, ένας τρόπος που ονομάζεται σχετική κανονικοποίηση. Μια άλλη επιλογή είναι η απόλυτη κανονικοποίηση στην οποία γίνεται ποσοτικοποίηση, βάσει μιας πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να προσδιοριστεί (Behlke & Berghof-Jäger, 2019; Martin Filion, 2016).

2.3.1 Γονίδια αναφοράς (Housekeeping genes)

Στα ποσοτικά πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Q-PCR) εισάγονται συγκεκριμένα σφάλματα λόγω μικρών διαφορών στην αρχική ποσότητα του RNA, της ποιότητας του RNA ή των διαφορών στην αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA και της ενίσχυσης PCR. Ένας τρόπος για να μειωθούν οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που δεν προκύπτουν από βιολογικές διαφορές στην έκφραση, γίνεται μέσω της βοήθειας γονιδίων αναφοράς. Τα γονίδια αυτά θα πρέπει να είναι ιδιόσυστατα ενεργά, να εκφράζονται δηλαδή σε σταθερό επίπεδο μεταξύ διαφορετικών ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, και τα επίπεδα έκφρασής τους θα πρέπει επίσης να παραμένουν σχετικά σταθερά σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και κατά την διάρκεια πραγματοποίησης του πειράματος. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τα γονίδια στόχους υποβάλλονται σε κανονικοποίηση με γνώμονα

τα αποτελέσματα των γονιδίων αναφοράς. Η επιλογή έγινε με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία και αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε μέσω Real-Time PCR (Arya et al., 2005).

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα:

actb : Ανήκει σε οικογένεια γονιδίων που παράγουν διαφορετικές ακτίνες. Οι πρωτεΐνες αυτές κτίζουν δίκτυα από ινίδια που σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό, ο οποίος είναι κομβικός για την σταθερότητα του κυττάρου. Οι περισσότερες ακτίνες βρίσκονται σε μυϊκά κύτταρα αλλά η ακτίνη β εντοπίζεται σε κύτταρα ολόκληρου του σώματος και παίζει μεγάλο ρόλο στο τελικό σχήμα των κυττάρων αυτών και τις κινήσεις τους.

- *rpl13* (Ribosomal Protein L13): Κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη που αποτελεί συστατικό της υπομονάδας 60S του ριβοσώματος. Η πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια ριβοσωμικών πρωτεϊνών L13E και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα.

2.3.2 Γονίδια στόχοι

Τα γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα:

- *atp5f1a1* και το παράλογο *atp5f1a2*
- *atp5f1b1* και το παράλογο *atp5f1b2*
- *atp5mea1* και το παράλογο *atp5mea2*

2.3.3 Σχεδιασμός εκκινητών

Για την έναρξη οποιαδήποτε PCR αντίδρασης είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και για τα γονίδια ενδιαφέροντος και για τα γονίδια αναφοράς. Για τον σχεδιασμό εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Primer 3 στο οποίο εισάγεις την αλληλουχία του γονιδίου και το πρόγραμμα σχεδιάζει ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (Untergasser et al., 2012). Οι αλληλουχίες των εκκινητών στην συνέχεια εισήχθησαν στο πρόγραμμα Beacon Designer έτσι ώστε να ελεγχθεί ο σχηματισμός διμερών τα οποία οδηγούν σε ψευδή αποτελέσματα (Beacon Designer 5.10, 2006). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST για να εξακριβωθεί πως οι εκκινητές υβριδίζονται μόνο στο συγκεκριμένο γονίδιο και όχι και σε άλλα σημεία του γονιδιώματος του λαβρακιού (Ye et al., 2012). Από τα παραπάνω δεδομένα έγινε η επιλογή του ζεύγους εκκινητών για κάθε γονίδιο, οι αλληλουχίες των οποίων φαίνονται στον (Πίνακα 5).

Πίνακας 5: Αλληλουχίες και συγκεντρώσεις εκκινητών

ΓΟΝΙΔΙΟ	FW	RV	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>ATPF1A1</i>	AAGAACCTACACACAGCCCG	ACGACCAGTCTCCTCCAAGT	300 nM
<i>ATP5F1A2</i>	CTACGCTGGTGTCTAGAGGTC	CATGCCGTCAGCCTTGATTG	Fw100 nM rv150 nM
<i>ATP5FB1</i>	GCTGGTGTACGGACAGATGA	CACAGCAGAGGGGATACGAC	150 nM
<i>ATP5F1B2</i>	AGGGCGGAAAGATTGGTCTG	TCATTTCCCTCACGGGTTCCG	200 nM
<i>ATP5MEA1</i>	GCTGCTCGGCGTCTTCTAT	GCCAGTTGTTTGTAATGCGT	200 nM
<i>ATP5MEA2</i>	TTGCTGGAATCATCTACGGC	GCTCATCCCGAACCTTCTTCT	200 nM
<i>ACTB</i>	AAGCAGGAGTATGATGAGTC	<i>GAAGTTGTTGGGCGTTG</i>	<i>FW300 nM RV 150nM</i>
<i>RPL13</i>	GAAGGCATCAACATCTCC	CTCTGAAGTGGTAAGGTC	<i>FW200 nM RV 250nM</i>

2.3.4 Πρωτόκολλο της Real-time PCR

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή ABI ONEPLUS και η προβολή των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό StepOne™ Software (40).

Κάθε αντίδραση είχε τελική ποσότητα 10 μL.

Τα συστατικά των αντιδράσεων ήταν τα ακόλουθα:

α) SYBR Green I (αρχική συγκέντρωση 2x → τελική συγκέντρωση 1x)

β) cDNA με αραίωση 1/10

γ) ειδικοί εκκινητές (10 pmol/μl)

δ) H₂O μέχρι τελικής ποσότητας 10μl.

Οι αντιδράσεις περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε εκκινητή ώστε να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση στην αντίδραση. Αναλυτικότερα οι ποσότητες των συστατικών ανάλογα με τις διαφορές στη συγκέντρωση των εκκινητών διαφαίνονται στον (Πίνακα 6).

Πίνακας 6. Οι όγκοι των συστατικών κάθε αντίδρασης ανάλογα με την συγκέντρωση των εκκινητών

	Για συγκέντρωση 300 nM/μL	Για συγκέντρωση 150 nM/μL	Για συγκέντρωση 200 nM/μL	Για συγκέντρωση Fw300 nM/μL Rv150 nM/μL	Για συγκέντρωση Fw200 nM/μL Rv250 nM/μL	Για συγκέντρωση Fw100 nM/μL Rv150 nM/μL
SYBER GREEN	5,00 μl	5,00 μl	5,00 μl	5,00 μl	5,00 μl	5,00 μl
cDNA	2,00 μl	2,00 μl	2,00 μl	2,00 μl	2,00 μl	2,00 μl
Forward primer	0,3 μl	0,15 μl	0,2 μl	0,3 μl	0,2 μl	0,1 μl
Reverse Primer	0,3 μl	0,15 μl	0,2 μl	0,15 μl	0,25 μl	0,15 μl
H2O	2,4 μl	2,7 μl	2,6 μl	2,55 μl	2,55 μl	2,75 μl

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης του θερμοκυκλοποιητή ήταν το εξής:

- Αποδιάταξη στους 95 °C για 10:00 λεπτά
- 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος αποτελείται από 00:15 sec στους 95,0 °C και 01:00 min στους 60°C)

Τέλος, το στάδιο της καμπύλης διαχωρισμού (00:15 sec στους 95,0°C και 01:00 min στους 50,0 °C), ώστε να επαληθευτεί η ενίσχυση ενός μόνο προϊόντος.

2.3.5 Πρότυπη καμπύλη και υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης

Θεωρητικά κατά την εκθετική φάση σε κάθε κύκλο υπάρχει διπλασιασμός του προϊόντος. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δεν είναι δυνατό, γι' αυτό καθιστά αναγκαίο τον προσδιορισμό της απόδοσης της αντίδρασης, έτσι ώστε να υπάρχει ακρίβεια στον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.

Για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης ελήφθη από όλα τα δείγματα 1 μl και σχηματίστηκε ένα συλλεκτικό δείγμα (pool), που στη συνέχεια υποβλήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις 1/5,

1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/100 και 1/200. Οι αραιώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση της καλύτερης συγκέντρωσης εκκινητών για κάθε γονίδιο μέσω της πραγματοποίησης πρότυπων καμπυλών. Ο προσδιορισμός της κλίσης της πρότυπης καμπύλης είναι απαραίτητος για την εύρεση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης μέσω της εξίσωσης:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1.$$

Ως βέλτιστη συγκέντρωση εκκινητών θεωρήθηκε αυτή όπου η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης κυμαίνονταν μεταξύ 95 και 105%. Επιπλέον, για να γίνουν δεκτές οι τιμές της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης πρέπει το R2 της πρότυπης καμπύλης να είναι μεγαλύτερο ή ίσο από 0,985. Με βάση τις παραπάνω παραμέτρους υπολογίστηκε η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης κάθε γονιδίου (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 : οι αποδόσεις των αντιδράσεων

Γονίδια housekeeping	Απόδοση των αντιδράσεων
<i>Actb</i>	99,1
<i>rpl13a</i>	100,4

Γονίδια ενδιαφέροντος	Απόδοση των αντιδράσεων
<i>atp5f1a1</i>	104,2
<i>atp5f1a2</i>	99,4
<i>atp5f1b1</i>	97,9
<i>atp5f1b2</i>	100,3
<i>atp5mea1</i>	104,6
<i>atp5mea2</i>	99,9

2.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στη συνέχεια αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν στατιστικά μέσω του υπολογιστικού φύλλου Microsoft excel 365 (Microsoft Corporation, 2018). Αρχικά, προσδιορίστηκε το R0 από τον τύπο

$$R0 = \text{Threshold} \backslash (1 + \text{efficiency})^{ct}$$

τόσο στα γονίδια ενδιαφέροντος όσο και στα ιδιοσυστάτα ενεργά γονίδια (housekeeping genes). Για τα γονίδια αναφοράς υπολογίστηκε ο γεωμετρικός μέσος για κάθε δείγμα ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως

παράγοντας κανονικοποίησης (nf) ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα σχετικής έκφρασης (Ro/nf) των γονιδίων ενδιαφέροντος.

Στην συνέχεια έγινε χρήση της γλώσσας προγραμματισμού Python και συγκεκριμένα, των βιβλιοθηκών Pandas και Scipy, για να υπολογιστούν περιγραφικά στατιστικά (μέση τιμή, διάμεσος, τυπική απόκλιση, κλπ.) και να παρουσιαστούν τα δεδομένα με την μορφή θηκογράμματος (box-plot), τα θηκογράμματα σχεδιάστηκαν με την χρήση του υπολογιστικού φύλλου Microsoft excel 365. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις για κάθε γονίδιο: 1) μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ανά θερμοκρασία, 2) μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών ανά αναπτυξιακό στάδιο και τέλος 3) μεταξύ των δυο παράλογων γονιδίων ανά περίπτωση. Τέλος, για να διαπιστωθεί ποιες από τις παρατηρούμενες διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος Wilcoxon signed-rank test (Rey & Neuhäuser, 2011).

2.5. Φυλογενετική Ανάλυση

2.5.1 Ανάκτηση αλληλουχιών από την βάση δεδομένων ENSEMBL

Προκειμένου να μελετηθεί η εξέλιξη των γονιδίων και η λειτουργία τους στην οξειδωτική φωσφορυλίωση των τελεόστεων, τα γονιδιώματα αρκετών ψαριών διερευνήθηκαν για ομολογίες των κωδικών γονιδίων για τις υπομονάδες του σύμπλοκο V: ATP συνθάση χρησιμοποιώντας τις ανθρώπινες ακολουθίες ως αλληλουχίες επερώτησης. Εξερευνήθηκαν συνολικά εννέα γονιδιώματα τελεόστεων, συμπεριλαμβανομένων των *Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, *Poecilia formosa*, *Xiphophorus maculatus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Sparus aurata* (τσουπούρα), *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι), *Seriola lalandi dorsalis*, *Seriola dumerili*, *Takifugu rubripes*, και *Tetraodon nigroviridis*. Οι έρευνες περιελάμβαναν επίσης τα γονιδιώματα του *Callorhinchus milii*, ενός ψαριού αντιπροσωπευτικού των βασικών σπονδυλωτών γενεαλογιών, του *Lepisosteus oculatus*, του βασικού εκπροσώπου των σαρκοπτερύγιων την κοιλάκανθο *Latimeria chalumnae*, και επίσης τρία τετράποδα, το ποντίκι (*Mus musculus*), το κοτόπουλο (*Gallus gallus*) και τον άνθρωπο (*Homo sapiens*) για συγκρίσεις. Τα ομόλογα γονίδια αναγνωρίστηκαν με βάση την ομοιότητα ακολουθίας χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST και η ταυτότητά τους επιβεβαιώθηκε από το αμοιβαίο BLAST ενάντια στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

2.5.2 Στοιχισή αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική αλληλουχία, εκτός από τις περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατό ένα ξεκάθαρο συμπέρασμα λόγω μικρού μεγέθους της ακολουθίας πεπτιδίων ή οποιουδήποτε άλλου λόγου που θα οδηγούσε σε χαμηλό φυλογενετικό σήμα οπότε και έγινε η χρήση της ακολουθίας (CDS) nucleotide coding domain sequences. Η πολλαπλή στοιχισή των νουκλεοτιδικών ή πεπτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αλγορίθμου MAFT (Kato et al. 2002) και ακολούθησε επεξεργασία της στοιχισής. Τα είδη από τα οποία ελήφθησαν ακολουθίες μικρού μήκους ή/και ακολουθίες χαμηλής ποιότητας αφαιρέθηκαν από την ανάλυση. Η επεξεργασμένη στοιχισή νουκλεοτιδίων υποβλήθηκε στο MEGAX (Kumar et al. 2018) για να ανακτήσει το καλύτερο μοντέλο υποκατάστασης νουκλεοτιδίων που θα εξηγούσε καλύτερα την εξέλιξη των γονιδιακών οικογενειών. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μεθόδους μέγιστης πιθανότητας (ML) και neighbor joining (NJ). Και για τις δυο προσεγγίσεις ML, NJ το MEGAX χρησιμοποιήθηκε για την αναπαράσταση φυλογενετικών δέντρων και τα κλαδιά που παρήχθησαν αξιολογήθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας 100 αντίγραφα bootstrap (Rifaldo et al., 2020).

2.5.3 Ανάλυση γειτονικού γονιδιωματικού περιβάλλοντος

Για την αξιολόγηση του επιπέδου διατήρησης του γειτονικού γονιδιωματικού περιβάλλοντος (δηλαδή της γύρω γονιδιωματικής περιοχής) για τα γονίδια ενδιαφέροντος, γονίδια ανοδικά και τα καθοδικά από τη θέση αυτών, χαρακτηρίστηκαν σε διάφορα είδη με χρήση του Genomicus (Nguyen et al. 2018) και με βάση την αναζήτηση ομολογιών με τη χρήση του εργαλείου Biomart. Ως αναφορές χρησιμοποιήθηκαν τα γονιδιώματα του ανθρώπου, stickleback και λαβρακιού (Kinsella et al. 2011).

3. Αποτελέσματα

3.1 Database mining εύρεση ομόλογων

Με χρήση του HUGO Gene Nomenclature Committee εντοπίσαμε τα γονίδια ενδιαφέροντος στον άνθρωπο και μέσω της βάσης δεδομένων Ensembl βρέθηκαν τα ορθόλογα αυτών των γονιδίων καθώς και τα παράλογα για κάθε είδος τελεόστεων, αυτό έγινε μέσω reciprocal blast. Στον Πίνακα 8 φαίνονται τα είδη στην πρώτη στήλη, καθώς και τα ονόματα των γονιδίων του ανθρώπου στην πρώτη γραμμή, μετά αναγράφεται ο αριθμός ομόλογων που βρέθηκαν σε κάθε είδος. Παρατηρούμε πως τα γονίδια ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5ME, ATP5MF, ATP5MG, ATP5MK, ATP5PD, ATP5PF, ATP5IF1 παρουσιάζουν περισσότερα από ένα ομόλογα γονίδια στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής, ακολουθήσε φυλογενετική ανάλυση μέσω της δημιουργίας δέντρων καθώς και ανάλυση γονιδιωματικής τοπολογίας στα γονίδια ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5ME ώστε να προσδιοριστεί η προέλευση του διπλασιασμού.

3.2 Φυλογενετικά δέντρα και ανάλυση τοπολογίας

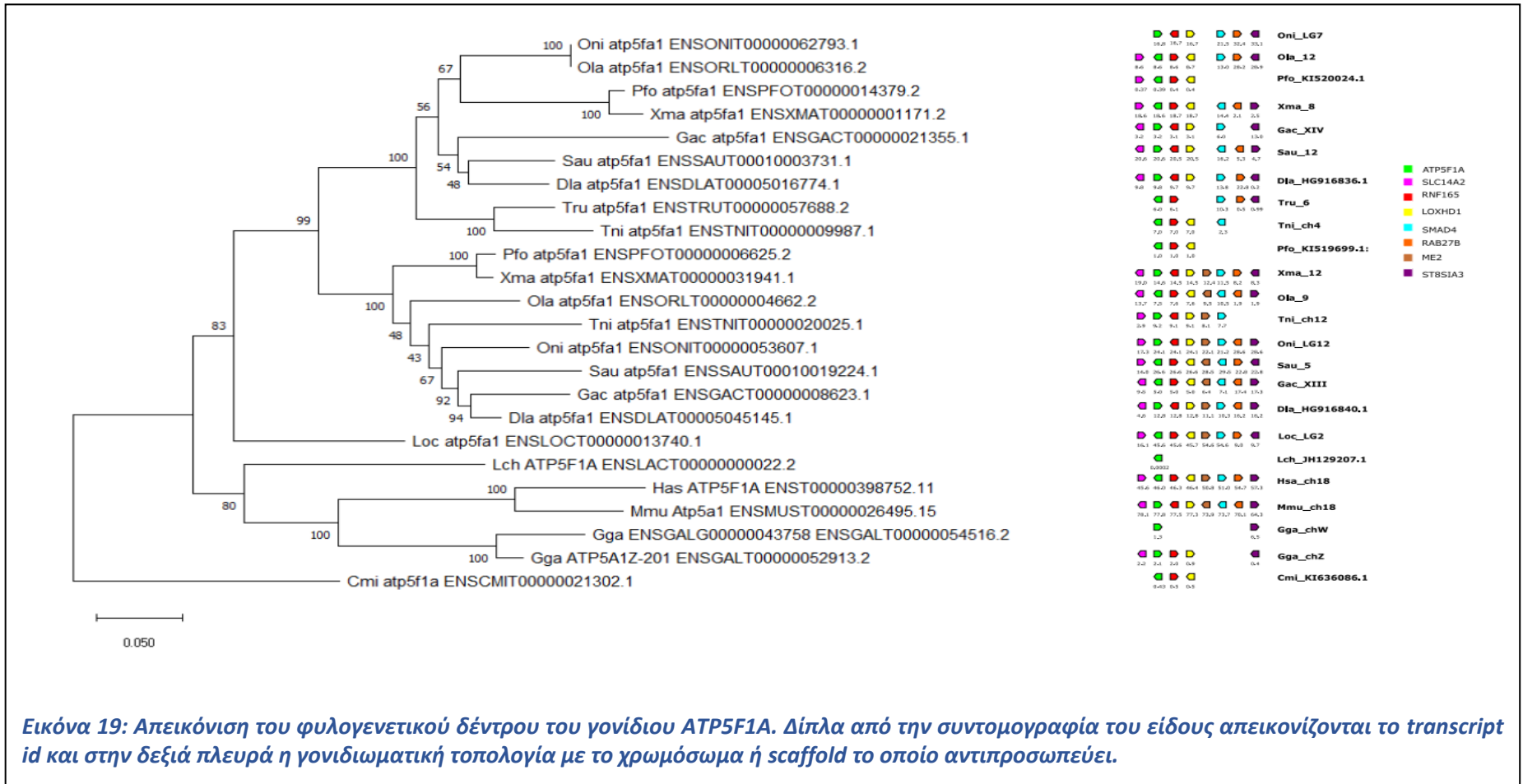
Τα φυλογενετικά δέντρα και των τριών οικογενειών γονιδίων όπως έχει αναφερθεί, κατασκευάστηκαν με την χρήση δυο διαφορετικών αλγορίθμων. Και με τους δύο παρατηρήθηκε παρόμοια τοπολογία.

Παρατηρώντας τα τρία δέντρα (Εικόνα 19-21) βλέπουμε ένα κόμβο διπλασιασμού στην βάση της γενεαλογίας των τελεόστεων και στην πλειοψηφία ως εξω-ομάδα εντοπίζεται το spotted gar με ένα γονίδιο, στην περίπτωση του ATP5MEA. Η έλλειψη του spotted gar οφείλεται σε κακής ποιότητας αλληλουχία, επίσης παρατηρείται ένα γονίδιο στην ομάδα των τετράποδων όσο και στην κοιλάκανθο και στο Elephant shark. Αυτή η τοπολογία συνάδει με TSGD προέλευση του διπλασιασμού. Διπλασιασμοί που εμφανίζονται σε άλλες ομάδες εκτός τελεόστεων προέκυψαν από αλλά γεγονότα διπλασιασμού.

Για να επαληθευθεί η υπόθεση ότι ο διπλασιασμός προήλθε από TSGD πραγματοποιήθηκε και ανάλυση τοπολογίας της γονιδιωματικής περιοχής των γονιδίων ενδιαφέροντος, στην οποία διαφάνηκε διατήρηση της γονιδιακής περιοχής μεταξύ ψαριών και τετράποδων. Ακόμα αναγνωριστήκαν και διπλασιασμοί για γονίδια στην κοντινή γονιδιωματική περιοχή για πολλά μέλη των τελεόστεων

3.2.1 ATP5F1A

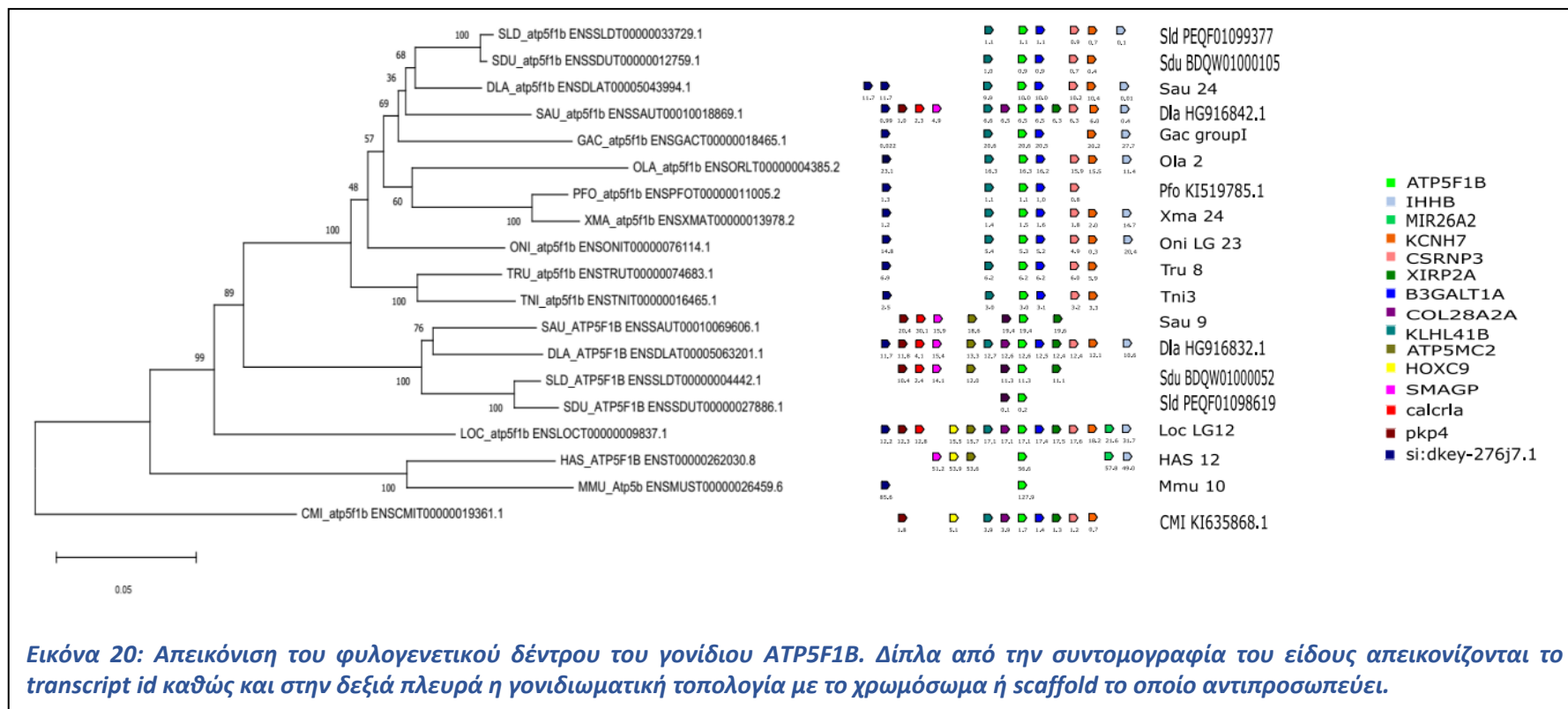
Για το γονίδιο ATP5F1A (Εικόνα 19), όλα τα γονίδια που παρατηρήθηκαν στην γονιδιωματική περιοχή του ανθρώπου παρατηρήθηκαν και στο spotted gar. Στην μια γονιδιωματική περιοχή των περισσότερων τελεόστων βρέθηκαν όλα τα γονίδια της ανθρώπινης περιοχής στην δεύτερη περιοχή χαρακτηρίζεται από την έλλειψη του γονίδιου ME2. Δεν βρέθηκε ομολογία στην περιοχή της κοιλάκανθου λόγω του μικρού μεγέθους του scaffold.



Εικόνα 19: Απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του γονίδιου ATP5F1A. Δίπλα από την συντομογραφία του είδους απεικονίζονται το transcript id και στην δεξιά πλευρά η γονιδιωματική τοπολογία με το χρωμόσωμα ή scaffold το οποίο αντιπροσωπεύει.

3.2.2 ATP5F1B

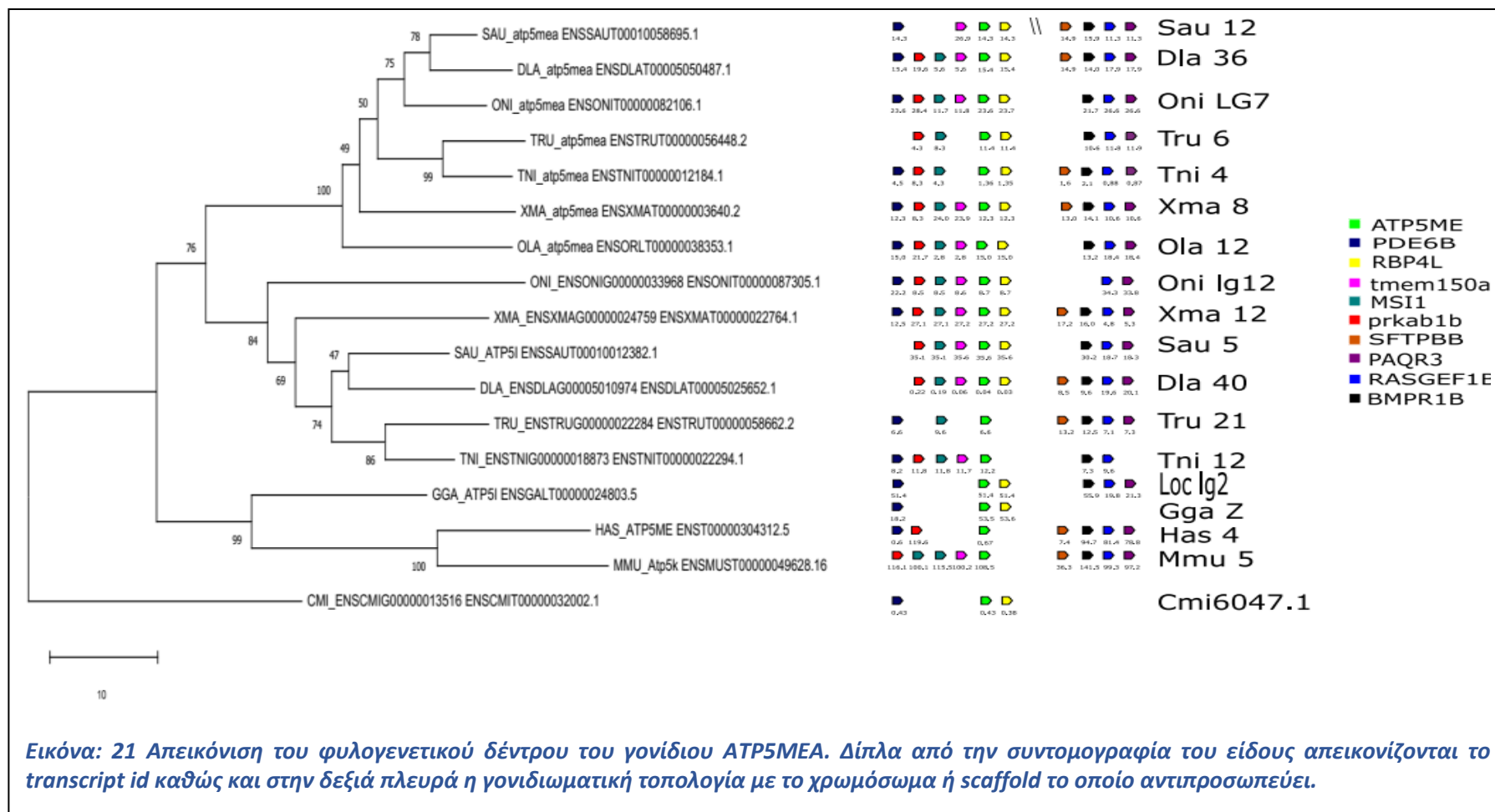
Στο γονίδιο ATP5F1B εννιά από τα δεκατέσσερα γονίδια του spotted gar εντοπίζονται και στην γονιδιωματική περιοχή του elephant shark και πέντε από τα δεκατέσσερα στην περιοχή του ανθρώπου. Στην περιοχή του ATP5F1B βλέπουμε καλά συντηρημένα τα γονίδια *pkp4*, *calcr1a*, *SMAGP*, *ATP5MC2*, *COL28A2A*, *XIRP2A*, ενώ τα γονίδια *B3GALT1A*, *KLHL41B*, *si:dkey-276j.1*, *CSRNP3*, *KCNH7*, *IHHB* στην περιοχή *atp5f1b*. Με το λαβράκι να εμφανίζει συντήρηση όλων των παραπάνω και στις δύο περιοχές. Στην τσιπούρα παρατηρείται και διπλασιασμός του *si:dkey-276j.1* στην περιοχή *atp5f1b* ειδικώς για την γενολογία της τσιπούρας. Στην δημιουργία του δέντρου ήταν απαραίτητη η χρήση των *Seriola lalandi dorsalis*, *Seriola dumerilii* ώστε να ενισχυθεί το φυλογενετικό σήμα καθώς ο διπλασιασμός βρισκόταν μόνο σε δύο από τους τελεόστεους. Η επιλογή έγινε διότι ανήκουν στην ίδια τάξη και με το λαβράκι και με την τσίπουρα (περκόμορφα). (Εικόνα 20)



Εικόνα 20: Απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του γονιδίου ATP5F1B. Δίπλα από την συντομογραφία του είδους απεικονίζονται το transcript id καθώς και στην δεξιά πλευρά η γονιδιωματική τοπολογία με το χρωμόσωμα ή scaffold το οποίο αντιπροσωπεύει.

3.2.3 ATP5MEA

Στην γονιδιωματική περιοχή του γονίδιου ATP5ME του ανθρώπου παρατηρούμε επτά γονίδια που βρίσκονται και στους τελεόστεους και έξι στο spotted gar. Μέσα στην γενεολογία των τελεόστεων παρατηρείται πολύ σημαντική διατήρηση και στις δύο γονιδιωματικές περιοχές, με τουλάχιστον επτά στα δέκα γονίδια παρόντα σε όλα τα είδη. Παρατηρούμε και ένα διπλασιασμό MSI1 στην περιοχή του ποντικιού, ο διπλασιασμός και το γονίδιο αυτό δεν εμφανίζεται σε αλλά τετράποδα. (Εικόνα 21)



Εικόνα: 21 Απεικόνιση του φυλογενετικού δέντρου του γονίδιου ATP5MEA. Δίπλα από την συντομογραφία του είδους απεικονίζονται τα transcript id καθώς και στην δεξιά πλευρά η γονιδιωματική τοπολογία με το χρωμόσωμα ή scaffold το οποίο αντιπροσωπεύει.

3.3 Επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων

Σε όλα τα γονίδια που μελετήθηκαν διαπιστώθηκαν αλλαγές στην έκφραση τόσο μεταξύ αναπτυξιακών σταδίων στην ίδια θερμοκρασία, όσο και μεταξύ των ίδιων σταδίων στις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης οι οποίες μελετήθηκαν στο εν λόγω πείραμα. Επιπλέον, αλλαγές στην έκφραση παρατηρήθηκαν μεταξύ και των παραλόγων όπου έγινε σύγκριση μεταξύ αναπτυξιακών σταδίων στην ίδια θερμοκρασία και ελέγχθηκε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση τους. Οι αγκύλες ορίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των συγκρινόμενων καταστάσεων και οι «*» αντικατοπτρίζουν τις τιμές του p-value. Αναλυτικά, ισχύει:

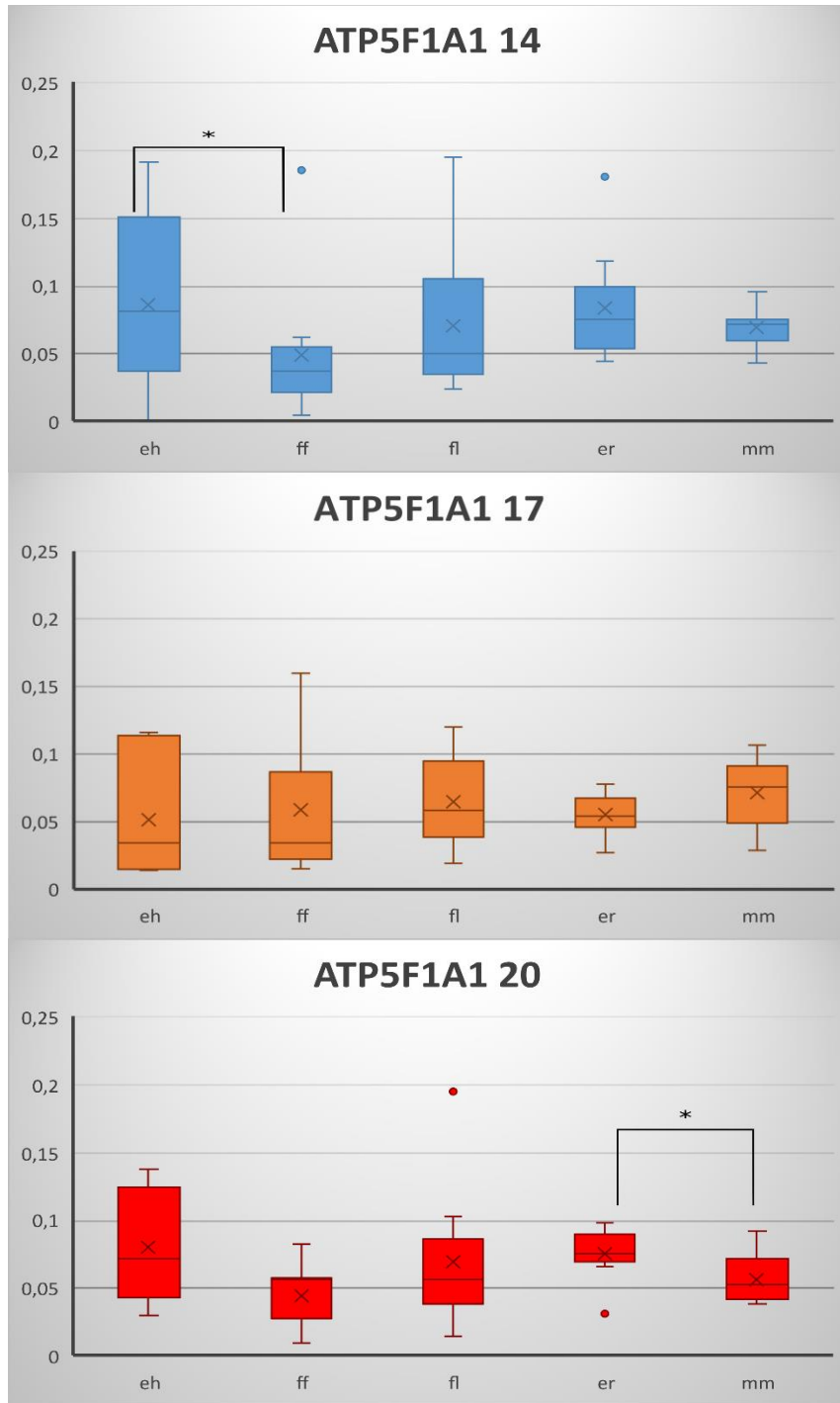
* → $0,05 > p\text{-value} > 0,01$

** → $0,01 > p\text{-value} > 0,001$

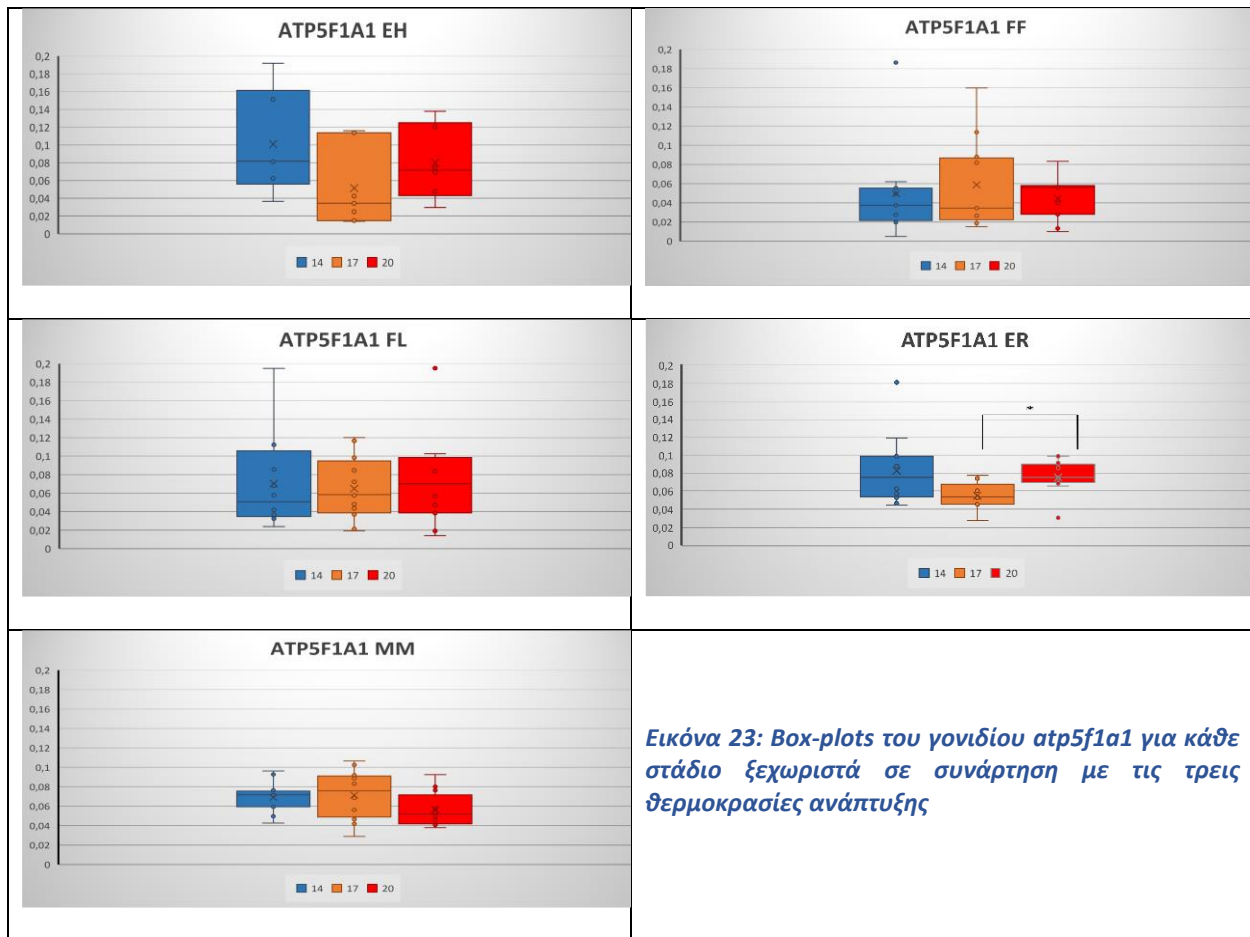
*** → $< 0,001$

3.3.1 Έκφραση γονιδίου *atp5f1a1*

Στην Εικόνα 22 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *atp5f1a1* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 14, 17 και 20°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε κάθε θερμοκρασία. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *atp5f1a1*. Στατιστικά σημαντικές πτώσεις σημειώθηκαν μεταξύ EH και FF στους 14°C, ELR και MM στους 20°C. Με την αλλαγή της θερμοκρασίας το στάδιο του ELR φαίνεται να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική άνοδο μεταξύ 17 και 20 βαθμών. Εικόνα (23).

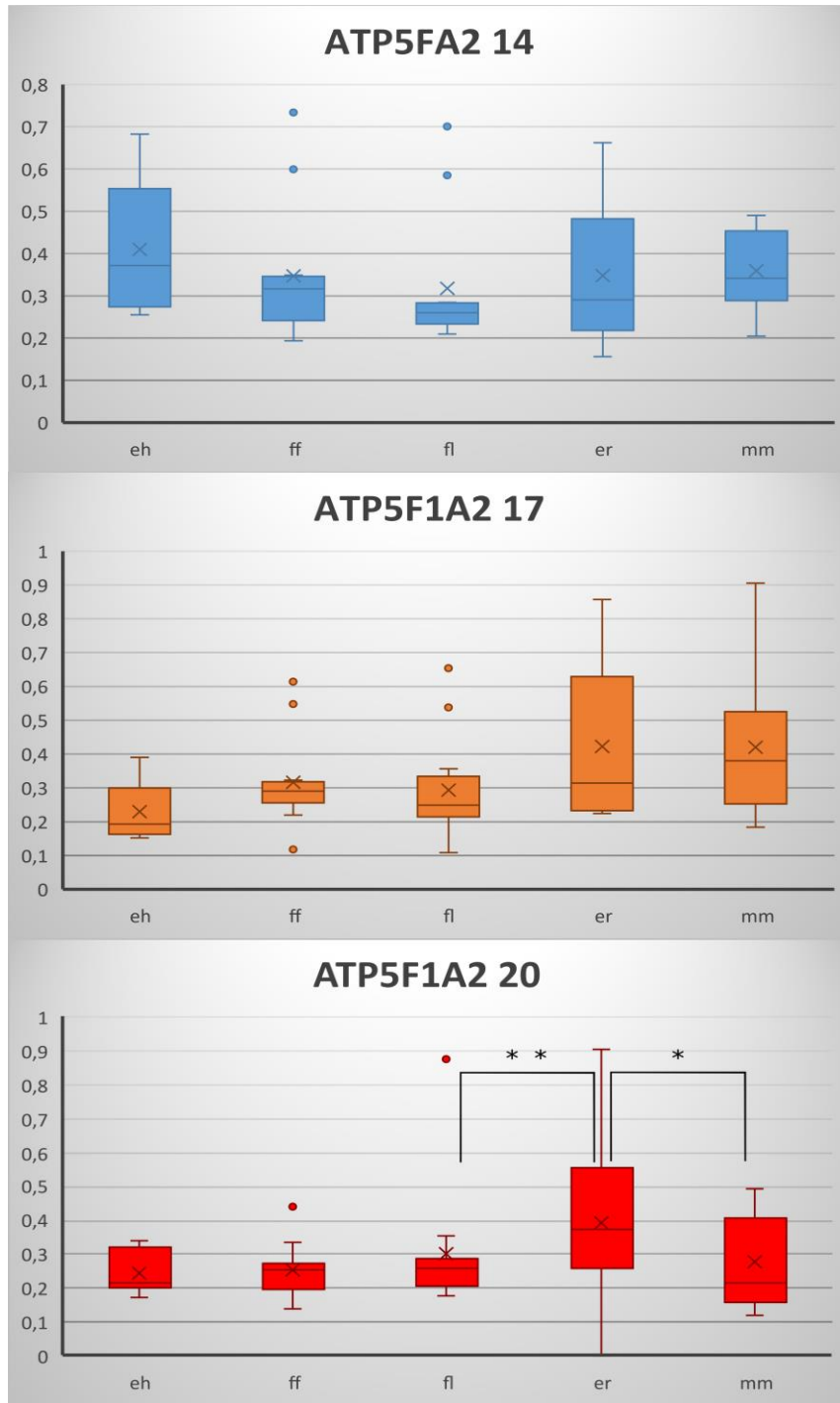


Εικόνα 22: Βox-plots για την έκφραση του γονιδίου *atp5f1a1* σε πέντε αναπτυξιακά στάδια και τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης

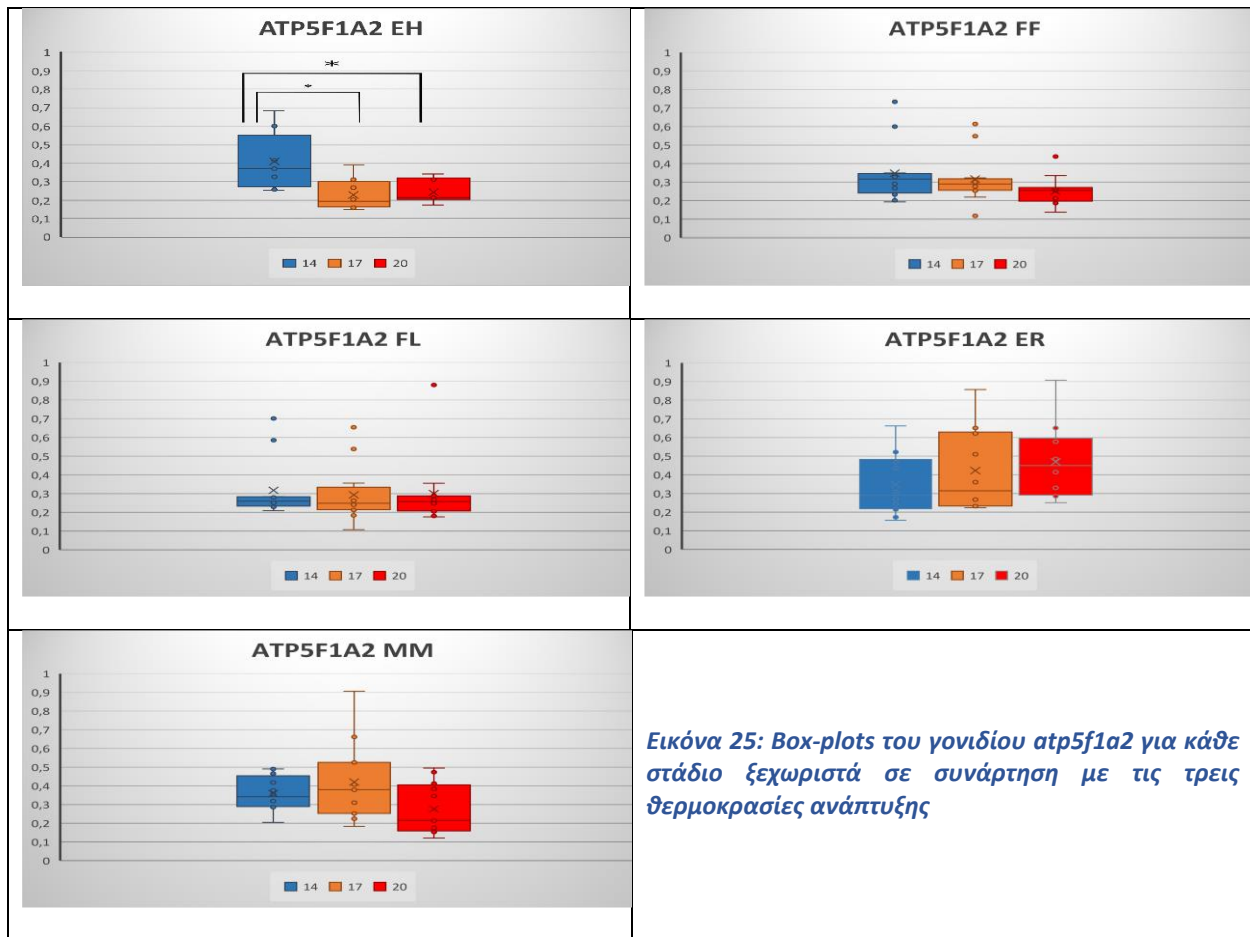


3.3.2 Έκφραση γονιδίου atp5f1a2

Στην Εικόνα 24 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *atp5f1a2* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 14, 17 και 20°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε κάθε θερμοκρασία. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *atp5f1a2*. Στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μεταξύ των σταδίων FF και ELR, η οποία ακολουθήθηκε από στατιστικά σημαντική πτώση στα ELR και MM στους 20°C. Επίσης, το στάδιο EH εμφανίζει στατιστικά σημαντική πτώση στην έκφραση μεταξύ των 14°C και των υπολοίπων θερμοκρασιών (Εικόνα 25).

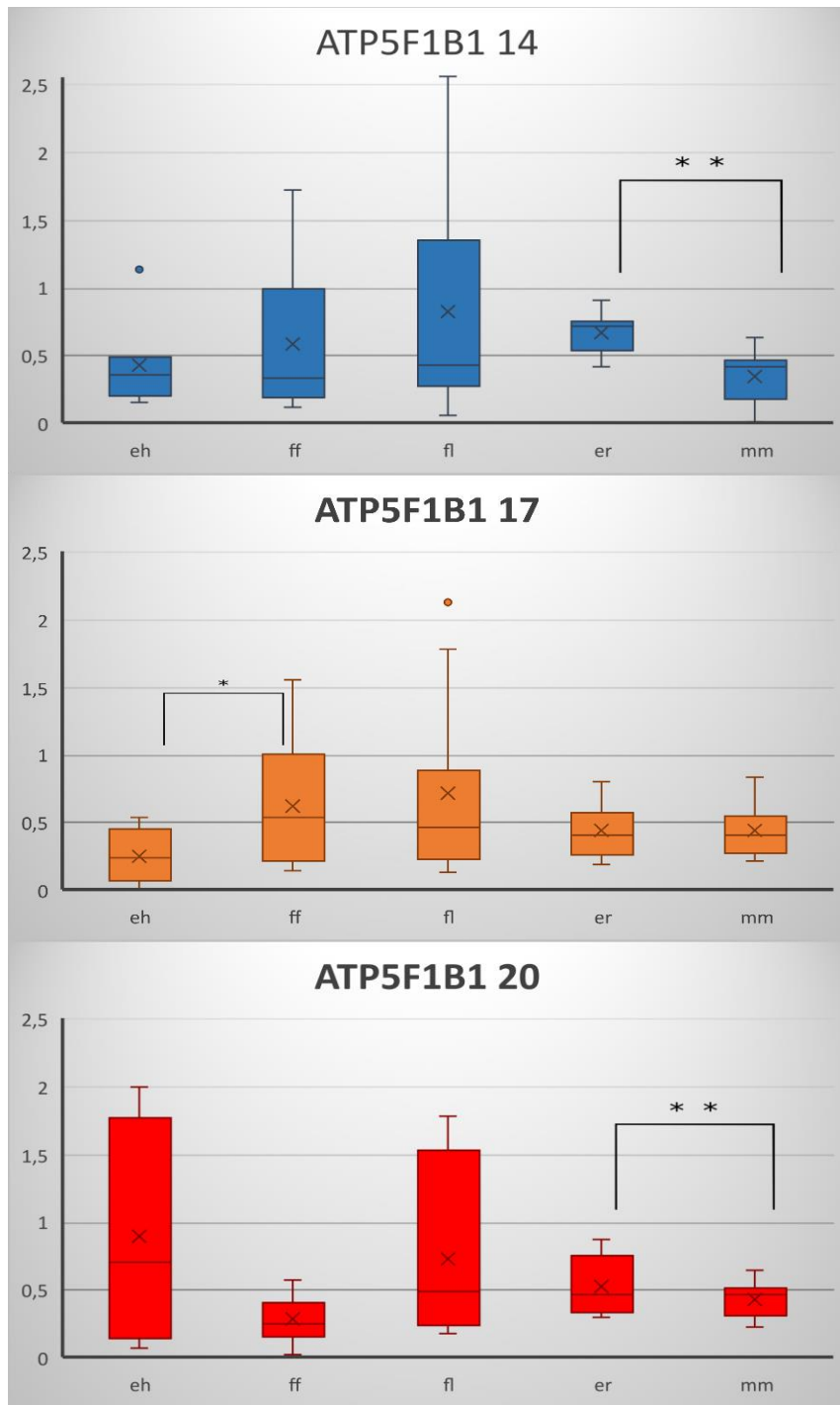


Εικόνα 24: Βox-plots για την έκφραση του γονιδίου *atr5f1a2* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης

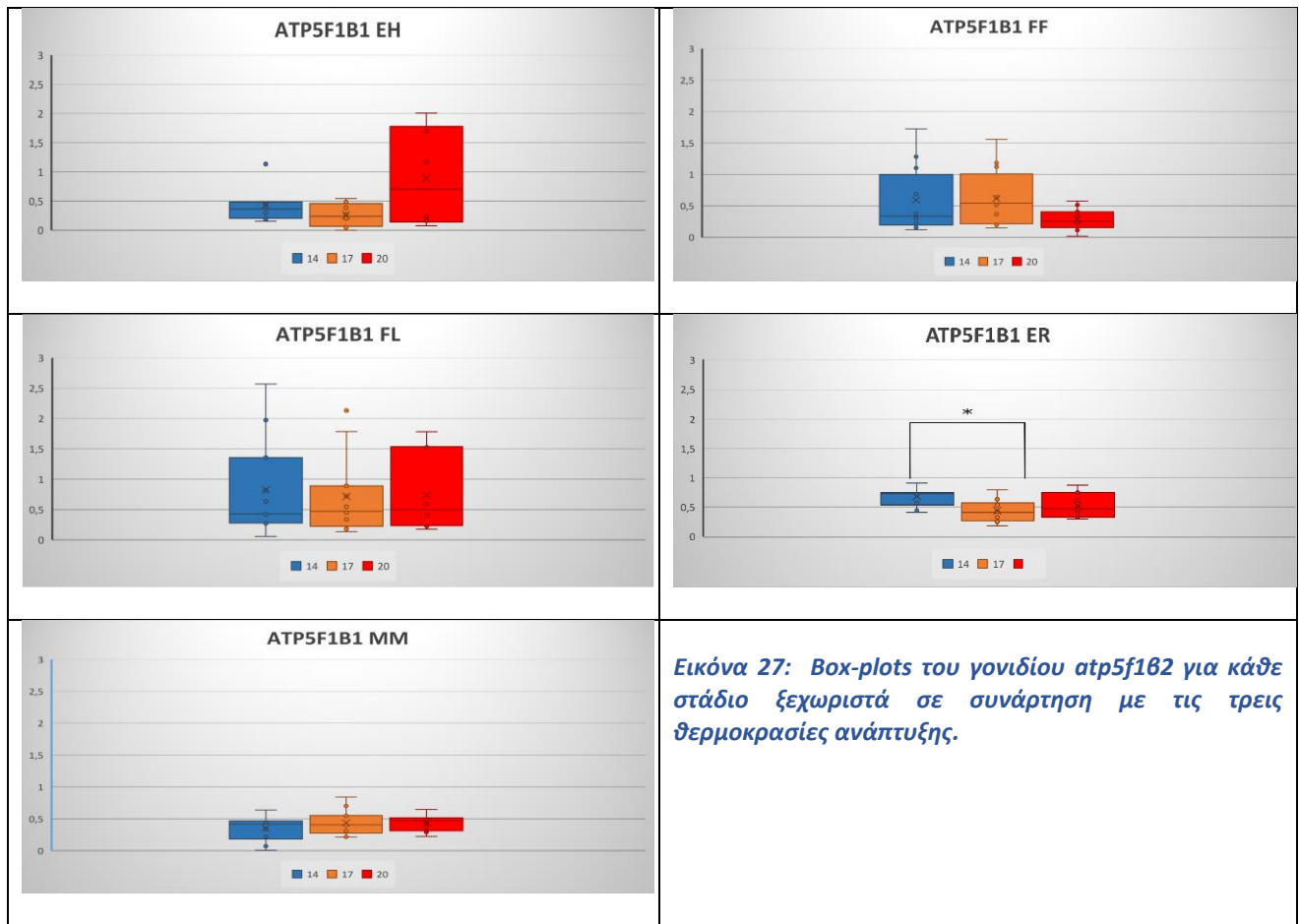


3.3.3 Έκφραση γονιδίου *atp5f1b1*

Στην (Εικόνα 26) απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση το γονιδίου *atp5f1b1* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 14, 17 και 20°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο για κάθε θερμοκρασία. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *atp5f1b1*. Στατιστικά σημαντική πτώση παρατηρήθηκε στους 14°C και 20°C μεταξύ των σταδίων ELR και MM. Στους 17°C εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση μεταξύ των σταδίων EH και FF. Το στάδιο ELR εμφάνισε επίσης πτώση μεταξύ των θερμοκρασιών 14°C - 17°C (Εικόνα 27) .



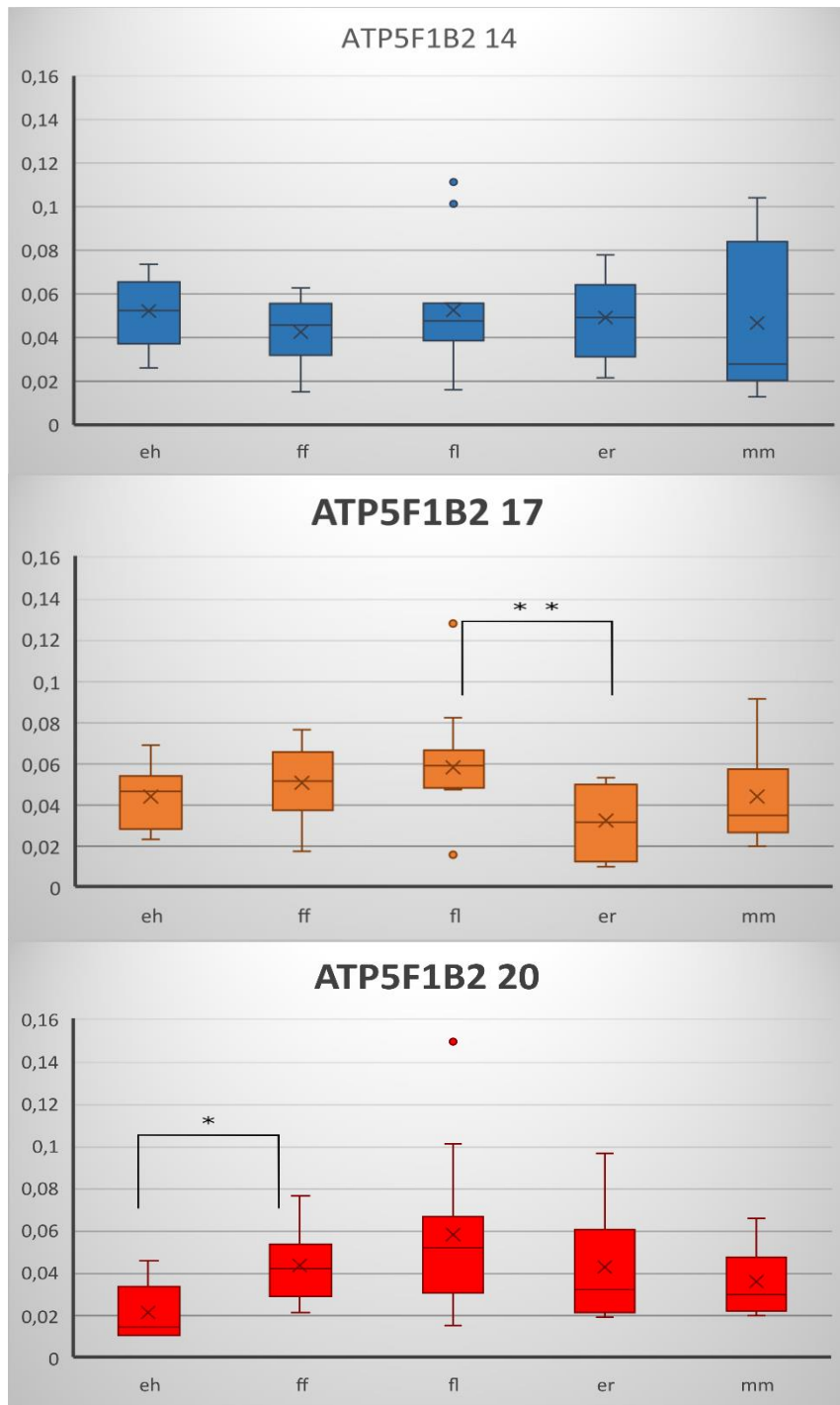
Εικόνα 26: Βox-plots για την έκφραση του γονιδίου ATP5F1B1 στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



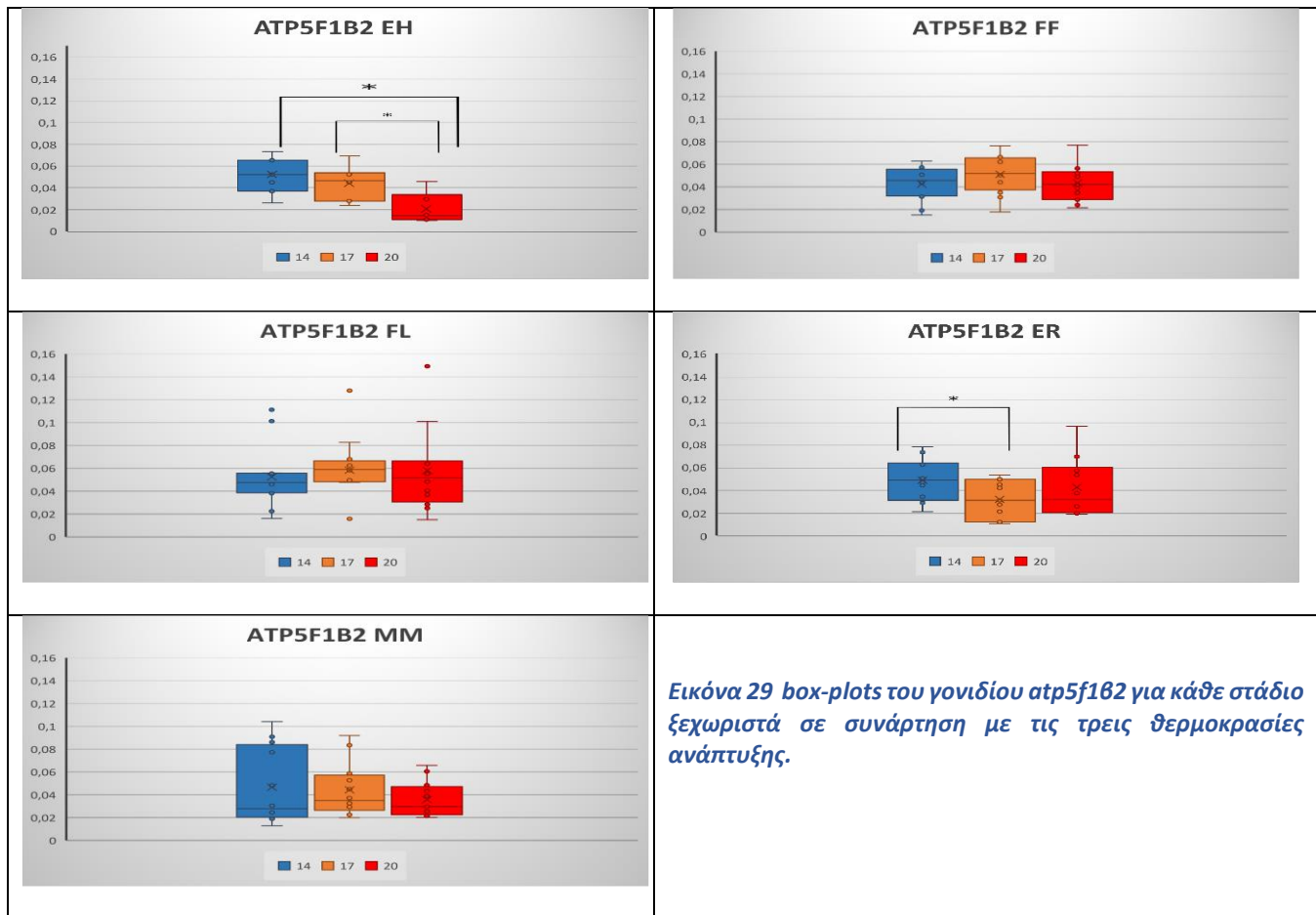
Εικόνα 27: Box-plots του γονιδίου *atp5f1b2* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης.

3.3.4 Έκφραση γονιδίου *atp5f1b2*

Στην (Εικόνα 28) απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *atp5f1b2* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 14, 17 και 20°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο για κάθε θερμοκρασία. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *atp5f1b2*. Στους 14°C δεν παρατηρούμε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, αντίθετα στους 17 °C παρατηρείται πτώση μεταξύ FL και ELR και στους 20°C άνοδος μεταξύ EH και FF. Στο EH εμφανίζεται σταθερή μείωση, με την μικρότερη έκφραση να παρατηρείται στους 20°C, η οποία είναι και στατιστικά σημαντική σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες. Στατιστικά σημαντική είναι και η μείωση στο ELR μεταξύ 14°C -17°C βαθμών (Εικόνα 29).



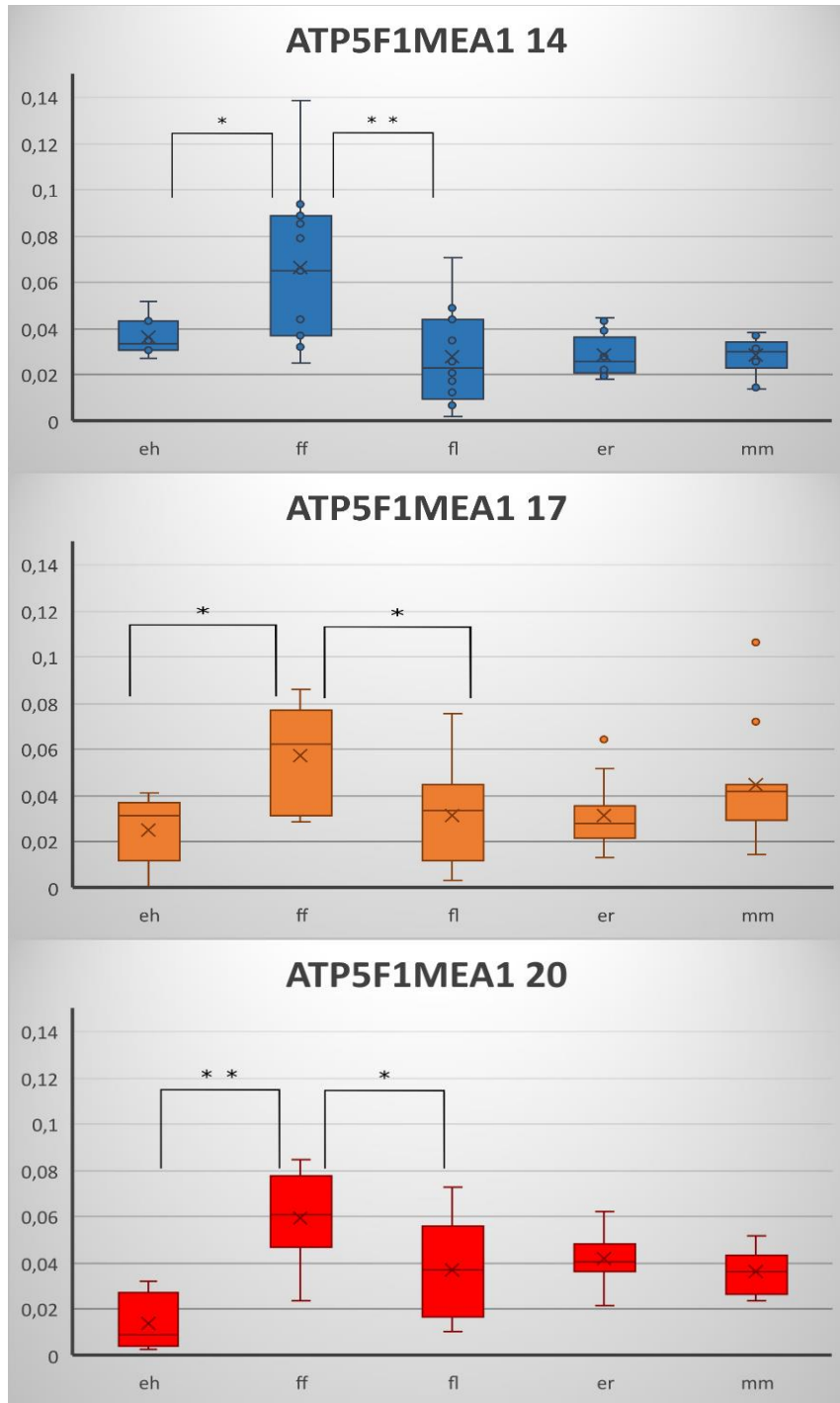
Εικόνα 28 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *atp5f1b2* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης.



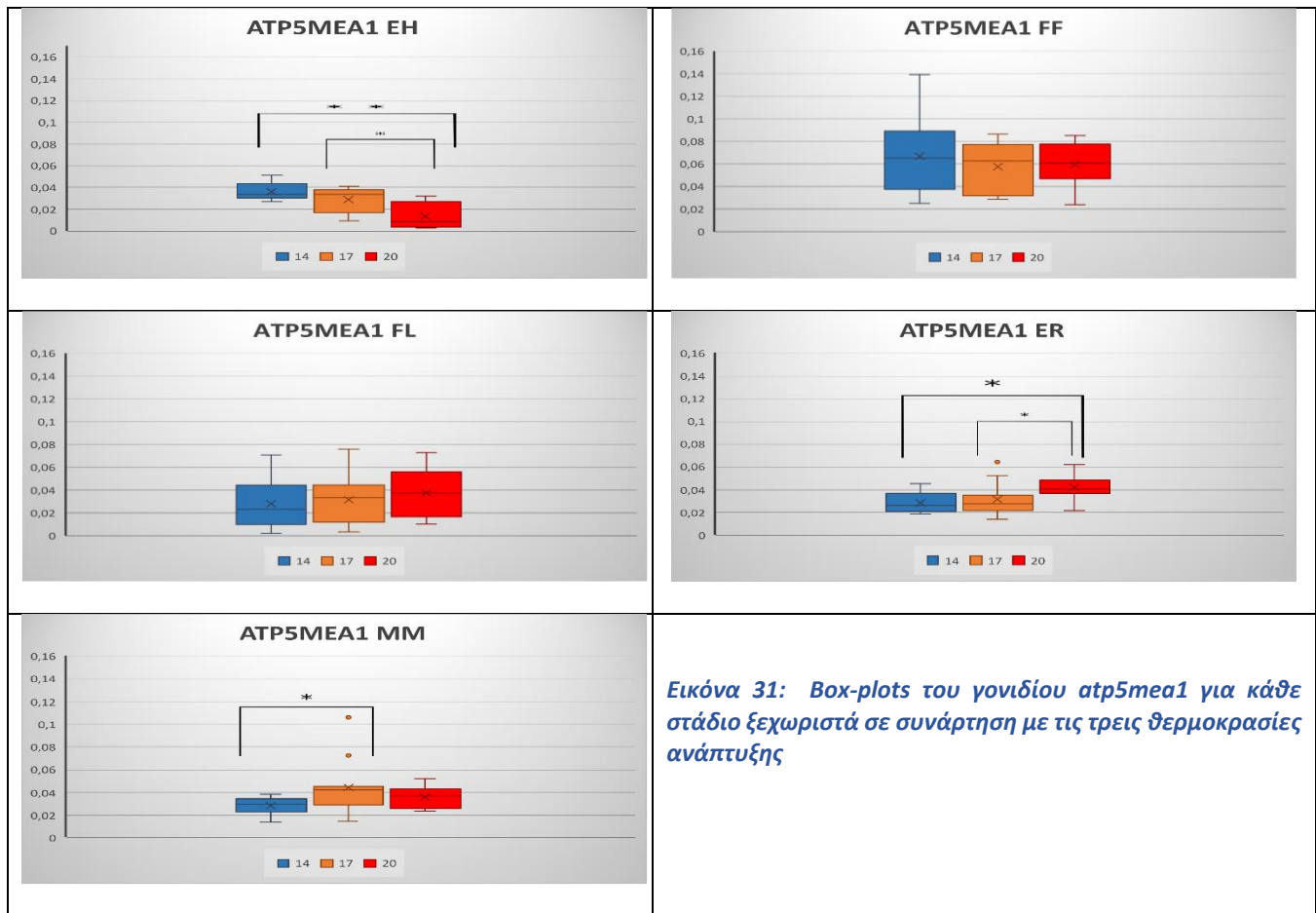
Εικόνα 29 box-plots του γονιδίου *atp5f1b2* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης.

3.3.5 Έκφραση γονιδίου *atp5mea1*

Στην (Εικόνα 30) απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *atp5mea1* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 14, 17 και 20°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε στο στάδιο FF και στις τρεις θερμοκρασίες. Στο οντογενετικό πρότυπο έκφρασης και στις τρεις θερμοκρασίες του *atp5mea1*, παρατηρούμε το ίδιο μοτίβο μεταξύ των σταδίων EH, FF και FL, με το FF να παρουσιάζει την μεγαλύτερη έκφραση με αύξηση μεταξύ EH και FF και μείωση μεταξύ FF και FL. Το στάδιο EH εμφανίζει μείωση μεταξύ των θερμοκρασιών με την μικρότερη έκφραση να εμφανίζεται στους 20°C όπου είναι και στατιστικά σημαντική σε σχέση με τις άλλες, σε αντίθεση το ELR εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξησή στους 20°C. Τέλος, το MM εμφανίζει αύξηση μεταξύ των 14°C και 17°C (Εικόνα 31).



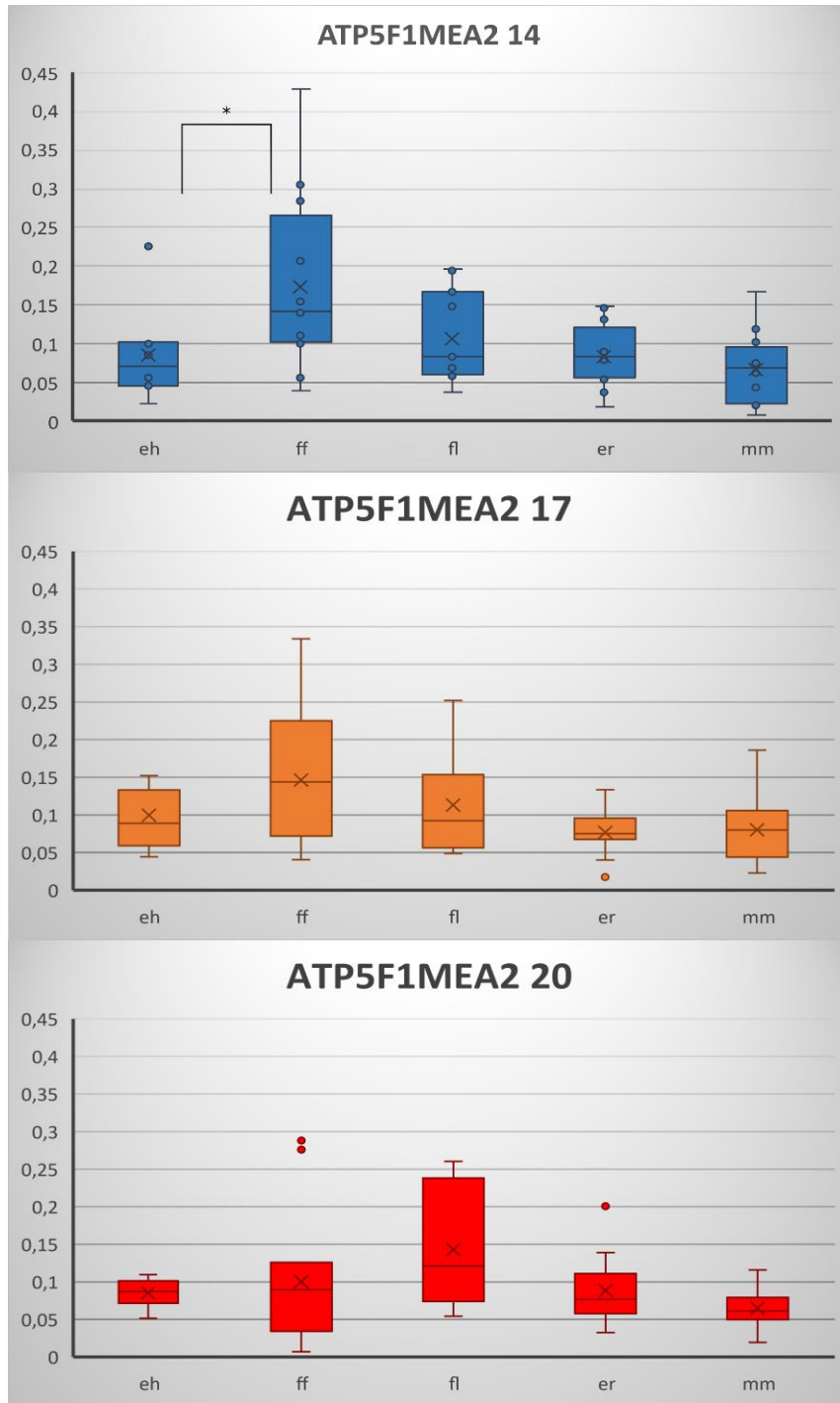
Εικόνα 30: Βox-plots για την έκφραση του γονιδίου atp5mea1 στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης.



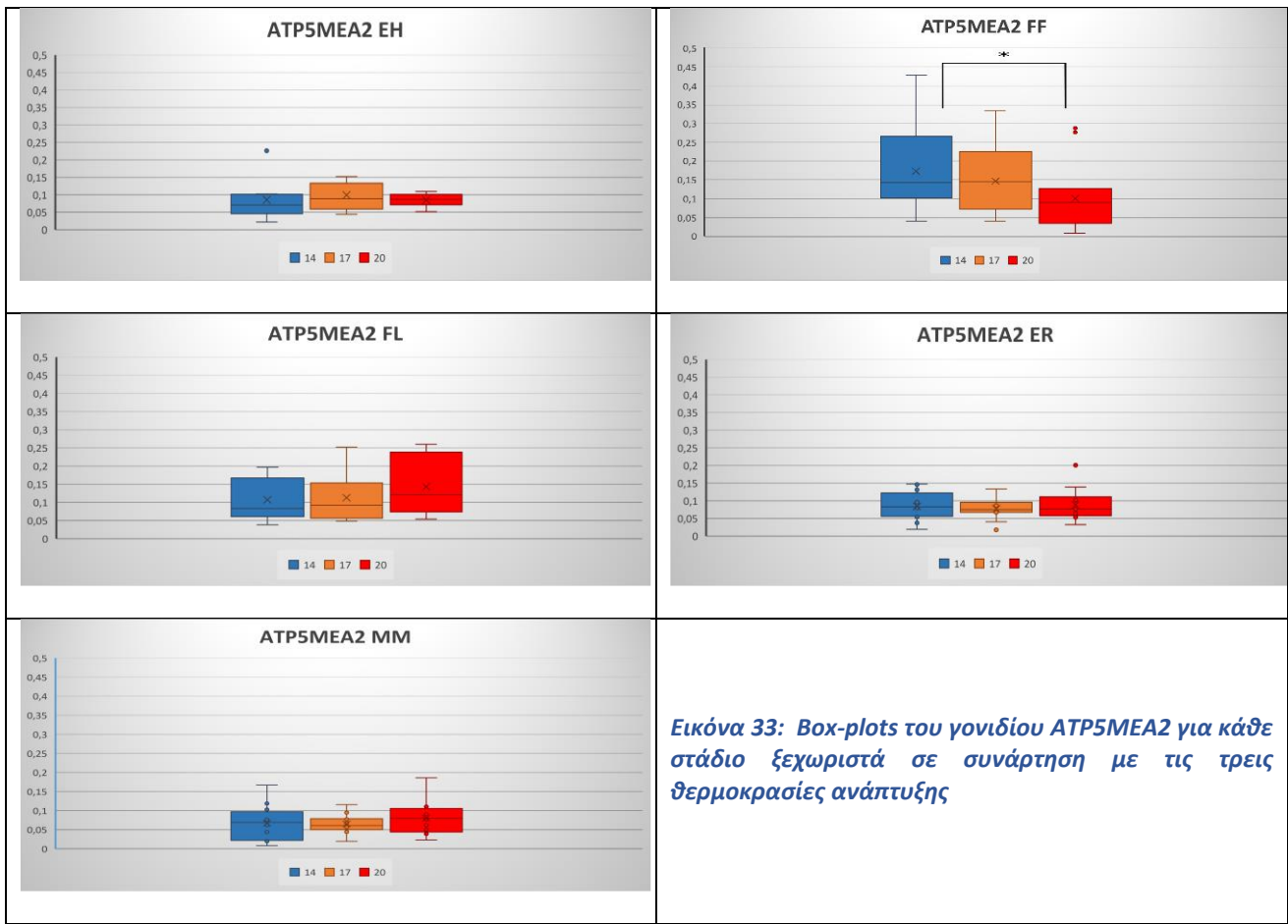
Εικόνα 31: Βox-plots του γονιδίου *atp5mea1* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

3.3.6 Έκφραση γονιδίου *atp5mea2*

Στην (Εικόνα 32) απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου *atp5mea2* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 14, 17 και 20°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο για κάθε θερμοκρασία. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *atp5mea2*. Το στάδιο FF εμφανίζει την μεγαλύτερη έκφραση εκτός των 20°C. Σε αυτή την θερμοκρασία εμφανίζει την μικρότερη έκφραση του με στατιστικά σημαντική διαφορά από τους 14°C που είναι η μεγαλύτερη (Εικόνα 33).



Εικόνα 32: Box-plots για την έκφραση του γονιδίου *ATP5MEA1* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης.



Εικόνα 33: Βox-plots του γονιδίου ATP5MEA2 για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

3.4 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων γονιδίων

Για την σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων γονιδίων υπολογίστηκαν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ του κάθε σταδίου ανάπτυξης στην ίδια θερμοκρασία.

3.4.1 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων ATP5F1A1 – ATP5F1A2

Πίνακας 9. Απεικόνιση των τιμών του p-value για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα ATP5F1A1 – ATP5F1A2

Θερμοκρασία	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Metamorphosis
14 °C	0.001	0	0	0	0
17 °C	0.001	0	0	0	0
20 °C	0.003	0	0	0	0

3.4.2 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων ATP5F1B1 – ATP5F1B2

Πίνακας 10 Απεικόνιση των τιμών του p-value για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα ATP5F1B1 – ATP5F1B2

Θερμοκρασία	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Metamorphosis
14 °C	0.001	0	0	0	0.003
17 °C	0.027	0	0	0	0
20 °C	0.003	0	0	0	0

3.4.3 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων ATP5MEA1 – ATP5MEA2

Πίνακας 11 Απεικόνιση των τιμών του p-value για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα ATP5MEA1 – ATP5MEA2. Με έντονη γραφή απεικονίζονται τα στάδια στα οποία μεταξύ των σταδίων δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων.

Θερμοκρασία	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Metamorphosis
14 °C	0.027	0.002	0	0	0.075
17 °C	0.001	0.009	0	0.001	0.026
20 °C	0.003	0.568	0	0.001	0.003

4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ύπαρξη ομολόγων των ανθρωπίνων γονιδίων του συμπλόκου V της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και τα παράλογα τους. Περαιτέρω μελετήθηκε η έκφραση των παραλόγων *atp5f1a1-atp5f1a2*, *atp5f1b1-atp5f1b2* και *atp5mea1-atp5mea2* σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση των γονιδίων αυτών σε ψάρια που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού, από το στάδιο της επιβολής έως της κατανάλωσης του λεκιθικού σάκου. Το ζεύγος παραλόγων *atp5f1b1-atp5f1b2* είναι ομόλογο του γονιδίου ATP5F1B του ανθρώπου που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα β, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια κωδικοποιούν ρυθμιστικές υπομονάδες, συγκεκριμένα τα *atp5f1a1-atp5f1a2* την υπομονάδα α και τέλος τα *atp5mea1-atp5mea2* την υπομονάδα ε. Μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης και της ανάλυσης συνταϊνικότητας αποδείχθηκε η 3R προέλευση των παραλόγων από τον ειδικό για την γενεαλογία των τελεόστων, διπλασιασμό του γονιδιώματος.

Παράλογα γονίδια

Η πρώτη παρατήρηση είναι το γεγονός ότι έχουμε έκφραση όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν στο σύνολο των θερμοκρασιών και αναπτυξιακών σταδίων, συμπεραίνοντας λοιπόν πως και τα έξι γονίδια έχουν διατηρηθεί εξελικτικά και δεν έχουν μετατραπεί σε ψευδογονίδια. Αφότου διαπιστώθηκε ότι υπάρχει έκφραση όλων των παραλόγων γονιδίων έγιναν συγκρίσεις για κάθε ζεύγος, μεταξύ κάθε αναπτυξιακού σταδίου, και διαφορετικής θερμοκρασίας ανάπτυξης και υπολογίστηκαν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης τους. Παρατηρήθηκε πως και στα τρία ζεύγη παραλόγων, ανεξαρτήτως συνθήκων, ένα από τα δυο παράλογα εμφάνιζε σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση.

Από τα 3 ζεύγη τα γονίδια με την μεγαλύτερη έκφραση ήταν τα:

atp5f1a2

atp5f1b1

atp5mea2

Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε κάθε στάδιο και σε κάθε θερμοκρασία από το παράλογο τους, εκτός από το γονίδιο *atp5mea2* στα στάδια FF και MM και στις θερμοκρασίες 20°C και 14 °C αντίστοιχα, στα οποία δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά με το γονίδιο

atp5mea1. Η αλλαγή αυτή, ειδικά στους 20°C όπου υπάρχει παραπλήσια έκφραση μεταξύ των δυο παράλογων, μπορεί να οφείλεται σε έκφραση του γονιδίου σε θερμικό στρες στο συγκεκριμένο στάδιο.

Διαφορετικές Θερμοκρασίες (14, 17, 20 °C) για κάθε αναπτυξιακό στάδιο

Στο σύνολο των γονιδίων, οι διαφορές στην θερμοκρασία δεν οδηγούν σε διαφορετική έκφραση στα περισσότερα στάδια, με το στάδιο του FL να μην εμφανίζει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά σε κανένα γονίδιο και τα στάδια MM και FF να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα γονίδια *atp5mea1* και *atp5mea2* αντίστοιχα. Συμπερασματικά, σε αυτά τα τρία στάδια η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζει λιγότερο το νεαρό ιχθύδιο όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας. Το στάδιο ELR εμφανίζει αλλαγή σε τέσσερα γονίδια. Σε δυο από αυτά (*atp5f1a1*, *atp5mea1*) η μέγιστη έκφραση βρίσκεται στους 20°C, σε αντίθεση με τα παράλογα *atp5f1b1* και *atp5f1b2* που εμφανίζουν μείωση της έκφρασης στους 17°C και σταθεροποίηση στους 20°C. Συνοπτικά, παρατηρούνται δυο διαφορετικές αποκρίσεις της έκφρασης ως προς την θερμοκρασία.

Εξαιρέση αποτελεί το στάδιο της εκκόλαψης το οποίο εμφανίζει την ίδια απόκριση στην αύξηση της θερμοκρασίας στα 3 από τα 6 γονίδια. Συγκεκριμένα, στα γονίδια *atp5f1a2*, *atpf1b2* και *atp5mea1* εμφανίζεται μείωση στην έκφραση με την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης, σε αυτό το στάδιο εμφανίζονται και οι περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Αυτό υποδηλώνει πως η θερμοκρασία επηρεάζει περισσότερο το νεαρό ιχθύδιο όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας στο χρονικό σημείο αυτό (Εικόνα 25, Εικόνα 29, Εικόνα 31).

Οντογενετικά πρότυπα έκφρασης στις θερμοκρασίες 14, 17, 20 °C

Τα περισσότερα γονίδια έδειξαν μικρές ή μη στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά το οντογενετικό πρότυπο έκφρασης σε σχέση με την αλλαγή της θερμοκρασίας, όπως το γονίδιο *atp5mea2* που εμφανίζει αλλαγή στους 20°C αλλά όχι στατιστικά σημαντική και το γονίδιο *atp5mea1* που δεν εμφανίζει καμία μεταβολή στο πρότυπο ή στα επίπεδα έκφρασης του. Εξαιρέση αποτελεί το γονίδιο *atp5f1b2* που εμφανίζει αλλαγή στο μοτίβο και στο επίπεδο της έκφρασης του. Από μια σχετικά σταθερή έκφραση σε όλα τα στάδια στους 14°C, με την αύξηση της θερμοκρασίας τα στάδια EH και ELR εμφάνισαν μείωση στην έκφραση. Λόγω αυτής της συμπεριφοράς, το στάδιο FL στους 20°C εμφανίζει ελαφρώς μεγαλύτερη έκφραση από τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια σε αυτή την θερμοκρασία χωρίς όμως να

είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 28, Εικόνα 29). Στην πλειονότητα των αναπτυξιακών σταδίων στα περισσότερα γονίδια στους 20°C παρατηρήθηκαν οι χαμηλότερες τιμές έκφρασης.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης τριών ζευγών παράλογων γονιδίων *atp5f1a1-2*, *atp5f1b1-2*, *atp5mea12* σε ψάρια που εκτράφηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης έως την κατανάλωση του λεκιθικού σάκου. Ύστερα η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή, δείγματα συλλέχθηκαν για πέντε αναπτυξιακά στάδια (Hatching, 1st feeding, flexion, end of larvae rearing και mid metamorphosis).

Αρχικά τα αποτελέσματα κατέδειξαν την έκφραση όλων των παραλόγων. Σε συνδυασμό με την ομοιότητα της αλληλουχίας, της δευτεροταγούς δομής, της ύπαρξης σηματοδότησης για την είσοδο στα μιτοχόνδρια (δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα) και την πολυπλοκότητα του συμπλόκου θεωρήθηκε πιο πιθανός τρόπος διατήρησης και των δυο παραλόγων ο επιμερισμός της λειτουργίας (subfunctionalization). Για επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η έκφραση ομολόγου, κάτω από συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας, συγγενικού είδους που δεν έχει υποστεί 3R διπλασιασμό. Σχετικό πείραμα πραγματοποιήθηκε σε παράλογα γονίδια της οικογένειας τελεόστεων (Cyprinidae /Κυπρινίδες) σε κατάσταση υποξίας. Η σύγκριση έγινε με συγγενικό είδος από εξω-ομάδα των τελεόστεων το μοναδικό γονίδιο του οποίου θεωρήθηκε ως “πατρικό”. Η απόκριση του “πατρικού” γονιδίου και ενός παραλόγου ταυτίζονταν, ενώ το δεύτερο παράλογο είχε διαφοροποιήσει το προφίλ της έκφρασης του (Rytkönen et al., 2013).

Τα δεδομένα έδειξαν πως η θερμοκρασία δημιούργησε μικρές μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων. Πιθανός λόγος για την χαμηλή μεταβολή αυτή είναι η σημαντικότητα του συγκεκριμένου βήματος στην παραγωγή ενεργείας. Πιθανώς να ασκούνται ισχυρές εξελικτικές πιέσεις για τη διατήρηση της λειτουργίας του συμπλόκου. Όπως ειπώθηκε προηγουμένως φάνηκε να υπάρχει πτώση στην έκφραση των γονιδίων στην θερμοκρασία των 20°C. Ιδιαίτερη μεταβολή φάνηκε να συμβαίνει στο στάδιο EH το οποίο είχε τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές με μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα στάδια. Μελέτη και των υπολοίπων διπλασιασμένων γονιδίων του συμπλόκου αυτό θα μας βοηθήσει να καταλάβουμε τον τρόπο που η θερμοκρασία επηρεάζει το συγκεκριμένο στάδιο.

Σε έρευνα που διεξήχθη στον σολωμό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) εμφανίστηκε μείωση στην μυογένεση μέσω αλλαγής του προτύπου μεθυλίωσης του DNA σε αυξημένη θερμοκρασία (Burgerhout et al., 2017).

Επίσης, αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης του DNA ως απόκριση στην αύξηση της θερμοκρασίας έχει καταδειχθεί και στο λαβράκι (Anastasiadi et al., 2017; Beemelmanns et al., 2021). Η αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορετική έκφραση των γονιδίων στην αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών.

Περισσότερα δεδομένα για τα πρότυπα μεθυλίωσης, τον αριθμό μιτοχονδρίων σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο και την μεταβολή αυτού θα μας οδηγήσουν σε ασφαλέστερα συμπεράσματα για το τρόπο που ο μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επηρεάζεται στο κάθε αναπτυξιακό στάδιο από την επίδραση της θερμοκρασίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anastasiadi, D., Díaz, N., & Piferrer, F. (2017). Small ocean temperature increases elicit stage-dependent changes in DNA methylation and gene expression in a fish, the European sea bass. *Scientific Reports*, 7(1), 12401. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10861-6>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Beemelmans, A., Ribas, L., Anastasiadi, D., Moraleda-Prados, J., Zanuzzo, F. S., Rise, M. L., & Gamperl, A. K. (2021). DNA Methylation Dynamics in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Challenged With High Temperature and Moderate Hypoxia. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.604878>
- Behlke, M., & Berghof-Jäger, K. (2019). *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology*. Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781912530243>
- Bindoff, N. L., Artale, V., Cazenave, A., Gregory, J. M., Willebrand, J., Artale, V., Gregory, J., Gulev, S., Hanawa, K., le Quéré, C., Levitus, S., Nojiri, Y., Shum, C., Talley, L., Unnikrishnan, A., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., ... Tignor, M. (n.d.). *Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level Coordinating Lead Authors: Lead Authors: This chapter should be cited as*.
- Beacon Designer 5.10 Manual, (2006), Copyright. PREMIER Biosoft Internationa
- Burgerhout, E., Mommens, M., Johnsen, H., Aunsmo, A., Santi, N., & Andersen, Ø. (2017). Genetic background and embryonic temperature affect DNA methylation and expression of myogenin and muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PLOS ONE*, 12(6), e0179918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179918>
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P. E., Moren, M., Fontagné, S., & Koumoundouros, G. (2013). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: Main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1111/raq.12016>
- China, V., & Holzman, R. (2014). Hydrodynamic starvation in first-feeding larval fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8083–8088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323205111>
- Cooper G.M, & Hausman R.E. (2021). *Το Κύτταρο: Μια Μοριακή Προσέγγιση*. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- Darias, M. J., Zambonino-Infante, J. L., Hugot, K., Cahu, C. L., & Mazurais, D. (2008). Gene expression patterns during the larval development of european sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) by microarray analysis. *Marine Biotechnology*, 10(4), 416–428. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9078-1>
- Deplano, M., Diaz, J. P., Connes, R., Kentouri-Divanach, M., & Cavalier, E. (1991). Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Marine Biology* (Vol. 108).
- Edger, P. P., & Pires, J. C. (2009). Gene and genome duplications: The impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Research* (Vol. 17, Issue 5, pp. 699–717). <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9055-9>

European Commission. Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries., & EUMOFA. (2019). *Seabass in the EU : price structure in the supply chain for seabass : focus on Greece, Croatia and Spain : case study.*

Georgakopoulou, E., Angelopoulou, A., Kaspiris, P., Divanach, P., & Koumoundouros, G. (2007). Temperature effects on cranial deformities in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 23(1), 99–103. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00810.x>

Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. In *Molecular Genetics and Genomics* (Vol. 289, Issue 6, pp. 1045–1060). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>

KASAHARA, M. (2007). The 2R hypothesis: an update. *Current Opinion in Immunology*, 19(5), 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.009>

Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>

Kendall A.W, Ahlstroman E.H, & Moser D.H.G. (1984). *Early Life History Stages of Fishes and Their Characters, In: Cohen: Ontogeny, Systematics Phylogeny.*

Kinsella, R. J., Kahari, A., Haider, S., Zamora, J., Proctor, G., Spudich, G., Almeida-King, J., Staines, D., Derwent, P., Kerhornou, A., Kersey, P., & Flicek, P. (2011). Ensembl BioMart: a hub for data retrieval across taxonomic space. *Database*, 2011(0), bar030–bar030. <https://doi.org/10.1093/database/bar030>

Klimogianni, A., Koumoundouros, G., Kaspiris, P., & Kentouri, M. (2004). Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*. *Marine Biology*, 145(5), 1015–1022. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1382-y>

Koumoundouros, G., Divanach, P., Anezaki, L., & Kentouri, M. (2001). Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology*, 139(5), 817–830. <https://doi.org/10.1007/s002270100635>

Kourkouta, C., Printzi, A., Geladakis, G., Mitrizakis, N., Papandroulakis, N., & Koumoundouros, G. (2021). Long lasting effects of early temperature exposure on the swimming performance and skeleton development of metamorphosing Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Scientific Reports*, 11(1), 8787. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88306-4>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Laffoley, D., & Baxter, J. M. (2016). *IUCN GLOBAL MARINE AND POLAR PROGRAMME Explaining Ocean Warming: Causes, scale, effects and consequences.*

Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(10), 800–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>

Martin Fillion. (2016). *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology.* Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190197>

Masasuke Yoshida, Eiro Muneyuki, & Toru Hisabori. (2001). *ATP SYNTHASE — A MARVELLOUS ROTARY ENGINE OF THE CELL.*

Michael J, B. (2014). *Vertebrate Palaeontology* (4th ed.). Wiley-Blackwell.

Mishra, P., & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>

Muench, S. P., Trinick, J., & Harrison, M. A. (2011). Structural divergence of the rotary ATPases. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44(3), 311–356. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000338>

Nguyen, N. T. T., Vincens, P., Roest Crolius, H., & Louis, A. (2018). Genomicus 2018: karyotype evolutionary trees and on-the-fly synteny computing. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D816–D822. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1003>

Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., de Rasmio, D., Signorile, A., & Petruzzella, V. (2012). The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 942, 3–37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1

Pavlidis, M., Koumoundouros, G., Steriotti, A., Somarakis, S., Divanach, P., & Kentouri, M. (2000). Evidence of Temperature-Dependent Sex Determination in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* (Vol. 287).

Rey, D., & Neuhauser, M. (2011). Wilcoxon-Signed-Rank Test. In *International Encyclopedia of Statistical Science* (pp. 1658–1659). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2_616

GeneCardsR The human gene database <https://www.genecards.org/>

Rifaldo, Y., Mandasari, D. A., Rahmawati, D. N., Krisdayana, R., Salehah, F., Retnaningtyas, R. W., Suhadi, & Listyorini, D. (2020). Phylogenetic study of Changeable Hawk-eagle (*Nisaetus cirrhatus*) based on cytochrome-c oxidase subunit I (COI) gene as one of the conservation efforts in genetic diversity. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 590(1), 012009. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/590/1/012009>

Rytkönen, K. T., Akbarzadeh, A., Miandare, H. K., Kamei, H., Duan, C., Leder, E. H., Williams, T. A., & Nikinmaa, M. (2013). SUBFUNCTIONALIZATION OF CYPRINID HYPOXIA-INDUCIBLE FACTORS FOR ROLES IN DEVELOPMENT AND OXYGEN SENSING. *Evolution*, 67(3), 873–882. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01820.x>

Sfakianakis, D. G., Georgakopoulou, E., Papadakis, I. E., Divanach, P., Kentouri, M., & Koumoundouros, G. (2006). Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 254(1–4), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.028>

Sherwood L. (2016). *Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου: από τα κύτταρα στα συστήματα*. Ακαδημαϊκές εκδόσεις.

Signes, A., & Fernandez-Vizarra, E. (2018). Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 62, Issue 3, pp. 255–270). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170098>

Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P. A., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R. S. T., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F. A. M., Bargelloni, L., Power, D. M., Bonhomme, F., ... Reinhardt, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications*, 5, 5770. <https://doi.org/10.1038/ncomms6770>

ThermoFischer scientific, StepOne™ Software v2.3, Available at:
<https://www.thermofisher.com/>

Tsalafouta, A., Papandroulakis, N., & Pavlidis, M. (2015). Early life stress and effects at subsequent stages of development in European sea bass (*D. labrax*). *Aquaculture*, *436*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.042>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

Zhang, F., & Broughton, R. E. (2013). Mitochondrial–Nuclear Interactions: Compensatory Evolution or Variable Functional Constraint among Vertebrate Oxidative Phosphorylation Genes? *Genome Biology and Evolution*, *5*(10), 1781–1791. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt129>

Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: An update. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 18, Issue 6, pp. 292–298). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)

Berg J.M. (2012). *BIOXHMEIA*. . Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

Ετήσια έκθεση ΣΕΘ 2020 <https://www.fgm.com.gr/>

Παραθέματα

4.1 ATP5F1A1

Πίνακας 12 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A1 στους 14°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 14 °C	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.191	0.186	0.194	0.180	0.096
ελάχιστη	0.036	0.004	0.023	0.044	0.042
διάμεσος	0.081	0.037	0.050	0.075	0.071
μέση τιμή	0.100	0.049	0.070	0.083	0.068
τυπική απόκλιση	0.058	0.048	0.049	0.039	0.015

Πίνακας 13 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A1 στους 17°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.115	0.159	0.120	0.077	0.106
ελάχιστη	0.014	0.015	0.019	0.027	0.028
διάμεσος	0.034	0.034	0.058	0.054	0.075
μέση τιμή	0.051	0.058	0.064	0.055	0.071
τυπική απόκλιση	0.044	0.046	0.034	0.015	0.025

Πίνακας 14 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A1 στους 20°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.137	0.083	0.195	0.098	0.092
ελάχιστη	0.029	0.009	0.014	0.030	0.037
διάμεσος	0.071	0.056	0.070	0.075	0.052
μέση τιμή	0.079	0.044	0.071	0.075	0.056
τυπική απόκλιση	0.041	0.022	0.048	0.018	0.017

Πίνακας 15 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A1 στο αναπτυξιακό στάδιο Hatching ανά θερμοκρασία

Hatching	14	17	20
μέγιστη	0.191	0.115	0.137
ελάχιστη	0.036	0.014	0.029
διάμεσος	0.081	0.034	0.071
μέση τιμή	0.100	0.051	0.079
τυπική απόκλιση	0.058	0.044	0.041

Πίνακας 16 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A1 στο αναπτυξιακό στάδιο 1st feeding ανά θερμοκρασία

1st feeding	14	17	20
μέγιστη	0.186	0.159	0.083
ελάχιστη	0.004	0.015	0.009
διάμεσος	0.037	0.034	0.056
μέση τιμή	0.049	0.058	0.044
τυπική απόκλιση	0.048	0.046	0.022

Πίνακας 17 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A1 στο αναπτυξιακό στάδιο Flexion ανά θερμοκρασία

Flexion	14	17	20
μέγιστη	0.194	0.120	0.195
ελάχιστη	0.023	0.019	0.014
διάμεσος	0.050	0.058	0.070
μέση τιμή	0.070	0.064	0.071
τυπική απόκλιση	0.049	0.034	0.048

Πίνακας 18 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *ATP5F1A1* στο αναπτυξιακό στάδιο *End of larvae rearing* ανά θερμοκρασία

End of larvae rearing	14	17	20
μέγιστη	0.180	0.077	0.098
ελάχιστη	0.044	0.027	0.030
διάμεσος	0.075	0.054	0.075
μέση τιμή	0.083	0.055	0.075
τυπική απόκλιση	0.039	0.015	0.018

Πίνακας 19 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *ATP5F1A1* στο αναπτυξιακό στάδιο *Mid Metamorphosis* ανά θερμοκρασία

Mid Metamorphosis	14	17	20
μέγιστη	0.096	0.106	0.092
ελάχιστη	0.042	0.028	0.037
διάμεσος	0.071	0.075	0.052
μέση τιμή	0.068	0.071	0.056
τυπική απόκλιση	0.015	0.025	0.017

4.2ATP5F1A2

Πίνακας 20 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στους 14°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 14 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.682	0.734	0.700	0.662	0.490
ελάχιστη	0.254	0.193	0.209	0.155	0.204
διάμεσος	0.371	0.316	0.260	0.290	0.341
μέση τιμή	0.409	0.347	0.317	0.347	0.359
τυπική απόκλιση	0.154	0.160	0.155	0.161	0.090

Πίνακας 21 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στους 17°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.389	0.613	0.654	0.856	0.905
ελάχιστη	0.151	0.117	0.107	0.223	0.183
διάμεσος	0.192	0.289	0.248	0.314	0.380
μέση τιμή	0.229	0.316	0.293	0.422	0.420
τυπική απόκλιση	0.085	0.135	0.154	0.223	0.210

Πίνακας 22 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στους 20°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.338	0.438	0.879	0.907	0.495
ελάχιστη	0.172	0.137	0.175	0.250	0.120
διάμεσος	0.213	0.254	0.257	0.449	0.215
μέση τιμή	0.243	0.251	0.299	0.469	0.276
τυπική απόκλιση	0.065	0.077	0.189	0.203	0.136

Πίνακας 23 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στο αναπτυξιακό στάδιο Hatching ανά θερμοκρασία

Hatching	14	17	20
μέγιστη	0.682	0.389	0.338
ελάχιστη	0.254	0.151	0.172
διάμεσος	0.371	0.192	0.213
μέση τιμή	0.409	0.229	0.243
τυπική απόκλιση	0.154	0.085	0.065

Πίνακας 24 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στο αναπτυξιακό στάδιο 1st feeding ανά θερμοκρασία

1st feeding	14	17	20
μέγιστη	0.734	0.613	0.438
ελάχιστη	0.193	0.117	0.137
διάμεσος	0.316	0.289	0.254
μέση τιμή	0.347	0.316	0.251
τυπική απόκλιση	0.160	0.135	0.077

Πίνακας 25 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στο αναπτυξιακό στάδιο Flexion ανά θερμοκρασία

Flexion	14	17	20
μέγιστη	0.700	0.654	0.879
ελάχιστη	0.209	0.107	0.175
διάμεσος	0.260	0.248	0.257
μέση τιμή	0.317	0.293	0.299
τυπική απόκλιση	0.155	0.154	0.189

Πίνακας 26 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στο αναπτυξιακό στάδιο *End of larvae rearing (ER)* ανά θερμοκρασία

End of larva rearing	14	17	20
μέγιστη	0.662	0.856	0.907
ελάχιστη	0.155	0.223	0.250
διάμεσος	0.290	0.314	0.449
μέση τιμή	0.347	0.422	0.469
τυπική απόκλιση	0.161	0.223	0.203

Πίνακας 27 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1A2 στο αναπτυξιακό στάδιο *Mid Metamorphosis* ανά θερμοκρασία

Mid Metamorphosis	14	17	20
μέγιστη	0.490	0.905	0.495
ελάχιστη	0.204	0.183	0.120
διάμεσος	0.341	0.380	0.215
μέση τιμή	0.359	0.420	0.276
τυπική απόκλιση	0.090	0.210	0.136

4.3 ATP5F1B1

Πίνακας 28 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B1 στους 14Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 14 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	1.133	1.723	2.567	0.906	0.638
ελάχιστη	0.151	0.119	0.056	0.412	0.008
διάμεσος	0.361	0.336	0.428	0.723	0.419
μέση τιμή	0.425	0.590	0.825	0.673	0.351
τυπική απόκλιση	0.314	0.522	0.805	0.153	0.196

Πίνακας 29 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B1 στους 17Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.543	1.558	2.131	0.799	0.842
ελάχιστη	0	0.148	0.133	0.187	0.212
διάμεσος	0.237	0.541	0.469	0.405	0.404
μέση τιμή	0.256	0.616	0.714	0.436	0.436
τυπική απόκλιση	0.200	0.451	0.659	0.194	0.194

Πίνακας 30 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B1 στους 20Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	2.005	0.576	1.783	0.868	0.644
ελάχιστη	0.076	0.018	0.175	0.293	0.221
διάμεσος	0.703	0.254	0.496	0.467	0.472
μέση τιμή	0.892	0.289	0.736	0.525	0.431
τυπική απόκλιση	0.849	0.168	0.635	0.205	0.124

Πίνακας 31 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B1 στο αναπτυξιακό στάδιο Hatching ανά θερμοκρασία

Hatching	14	17	20
μέγιστη	1.133	0.543	2.005
ελάχιστη	0.151	0	0.076
διάμεσος	0.361	0.237	0.703
μέση τιμή	0.425	0.256	0.892
τυπική απόκλιση	0.314	0.200	0.849

Πίνακας 32 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B1 στο αναπτυξιακό στάδιο 1st feeding ανά θερμοκρασία

1st feeding	14	17	20
μέγιστη	1.723	1.558	0.576
ελάχιστη	0.119	0.148	0.018
διάμεσος	0.336	0.541	0.254
μέση τιμή	0.590	0.616	0.289
τυπική απόκλιση	0.522	0.451	0.168

Πίνακας 33 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B1 στο αναπτυξιακό στάδιο Flexion ανά θερμοκρασία

Flexion	14	17	20
μέγιστη	2.567	2.131	1.783
ελάχιστη	0.056	0.133	0.175
διάμεσος	0.428	0.278	0.496
μέση τιμή	0.825	0.469	0.736
τυπική απόκλιση	0.805	0.659	0.635

Πίνακας 34 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *ATP5F1B1* στο αναπτυξιακό στάδιο *End of larvae rearing* ανά θερμοκρασία

End of larvae rearing	14	17	20
μέγιστη	0.906	0.799	0.868
ελάχιστη	0.412	0.187	0.293
διάμεσος	0.723	0.405	0.467
μέση τιμή	0.673	0.436	0.525
τυπική απόκλιση	0.153	0.194	0.205

Πίνακας 35 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *ATP5F1B1* στο αναπτυξιακό στάδιο *Mid Metamorphosis* ανά θερμοκρασία

Mid Metamorphosis	14	17	20
μέγιστη	0.638	0.842	0.644
ελάχιστη	0.008	0.212	0.221
διάμεσος	0.419	0.404	0.472
μέση τιμή	0.351	0.436	0.431
τυπική απόκλιση	0.196	0.194	0.124

4.4 ATP5F1B2

Πίνακας 36 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στους 14Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 14 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.073	0.062	0.111	0.077	0.104
ελάχιστη	0.026	0.015	0.016	0.021	0.012
διάμεσος	0.052	0.045	0.047	0.049	0.027
μέση τιμή	0.052	0.042	0.052	0.049	0.046
τυπική απόκλιση	0.017	0.014	0.027	0.018	0.033

Πίνακας 37 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στους 17Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.069	0.076	0.127	0.053	0.091
ελάχιστη	0.023	0.017	0.015	0.010	0.019
διάμεσος	0.046	0.051	0.058	0.031	0.034
μέση τιμή	0.043	0.051	0.058	0.032	0.044
τυπική απόκλιση	0.015	0.017	0.029	0.016	0.023

Πίνακας 38 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στους 20Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.045	0.076	0.149	0.096	0.065
ελάχιστη	0.010	0.021	0.015	0.019	0.020
διάμεσος	0.014	0.042	0.051	0.032	0.029
μέση τιμή	0.021	0.043	0.058	0.042	0.035
τυπική απόκλιση	0.013	0.016	0.036	0.025	0.015

Πίνακας 39 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στο αναπτυξιακό στάδιο Hatching ανά θερμοκρασία

Hatching	14	17	20
μέγιστη	0.073	0.069	0.045
ελάχιστη	0.026	0.023	0.010
διάμεσος	0.052	0.046	0.014
μέση τιμή	0.052	0.043	0.021
τυπική απόκλιση	0.017	0.015	0.013

Πίνακας 40 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στο αναπτυξιακό στάδιο 1st feeding ανά θερμοκρασία

1st feeding	14	17	20
μέγιστη	0.062	0.076	0.076
ελάχιστη	0.015	0.017	0.021
διάμεσος	0.045	0.051	0.042
μέση τιμή	0.042	0.051	0.043
τυπική απόκλιση	0.014	0.017	0.016

Πίνακας 41 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στο αναπτυξιακό στάδιο Flexion ανά θερμοκρασία

Flexion	14	17	20
μέγιστη	0.111	0.127	0.149
ελάχιστη	0.016	0.015	0.015
διάμεσος	0.047	0.058	0.051
μέση τιμή	0.052	0.058	0.058
τυπική απόκλιση	0.027	0.029	0.036

Πίνακας 42 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στο αναπτυξιακό στάδιο End of larvae rearing ανά θερμοκρασία

End of larvae rearing	14	17	20
μέγιστη	0.077	0.053	0.096
ελάχιστη	0.021	0.010	0.019
διάμεσος	0.049	0.031	0.032
μέση τιμή	0.049	0.032	0.042
τυπική απόκλιση	0.018	0.016	0.025

Πίνακας 43 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5F1B2 στο αναπτυξιακό στάδιο Mid Metamorphosis ανά θερμοκρασία

Mid Metamorphosis	14	17	20
μέγιστη	0.104	0.091	0.065
ελάχιστη	0.012	0.019	0.020
διάμεσος	0.027	0.034	0.029
μέση τιμή	0.046	0.044	0.035
τυπική απόκλιση	0.033	0.023	0.015

4.5 ATP5MEA1

Πίνακας 44 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στους 14Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 14 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.051	0.139	0.070	0.045	0.038
ελάχιστη	0.027	0.025	0.002	0.018	0.014
διάμεσος	0.033	0.064	0.023	0.026	0.030
μέση τιμή	0.036	0.066	0.028	0.028	0.028
τυπική απόκλιση	0.008	0.034	0.020	0.009	0.008

Πίνακας 45 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στους 17Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.040	0.086	0.075	0.064	0.106
ελάχιστη	0.009	0.028	0.003	0.013	0.014
διάμεσος	0.033	0.062	0.033	0.027	0.042
μέση τιμή	0.028	0.057	0.031	0.031	0.044
τυπική απόκλιση	0.011	0.022	0.022	0.014	0.025

Πίνακας 46 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στους 20Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.031	0.085	0.072	0.062	0.051
ελάχιστη	0.003	0.023	0.010	0.021	0.023
διάμεσος	0.008	0.060	0.037	0.040	0.036
μέση τιμή	0.013	0.059	0.037	0.041	0.036
τυπική απόκλιση	0.012	0.019	0.020	0.011	0.009

Πίνακας 47 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στο αναπτυξιακό στάδιο Hatching ανά θερμοκρασία

Hatching	14	17	20
μέγιστη	0.051	0.040	0.031
ελάχιστη	0.027	0.009	0.003
διάμεσος	0.033	0.033	0.008
μέση τιμή	0.036	0.028	0.013
τυπική απόκλιση	0.008	0.011	0.012

Πίνακας 48 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στο αναπτυξιακό στάδιο 1st feeding ανά θερμοκρασία

1st feeding	14	17	20
μέγιστη	0.139	0.086	0.085
ελάχιστη	0.025	0.028	0.023
διάμεσος	0.064	0.062	0.060
μέση τιμή	0.066	0.057	0.059
τυπική απόκλιση	0.034	0.022	0.019

Πίνακας 49 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στο αναπτυξιακό στάδιο Flexion ανά θερμοκρασία

Flexion	14	17	20
μέγιστη	0.070	0.075	0.072
ελάχιστη	0.002	0.003	0.010
διάμεσος	0.023	0.033	0.037
μέση τιμή	0.028	0.031	0.037
τυπική απόκλιση	0.020	0.022	0.020

Πίνακας 50 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στο αναπτυξιακό στάδιο End of larvae rearing ανά θερμοκρασία

End of larvae rearing	14	17	20
μέγιστη	0.045	0.064	0.062
ελάχιστη	0.018	0.013	0.021
διάμεσος	0.026	0.027	0.040
μέση τιμή	0.028	0.031	0.041
τυπική απόκλιση	0.009	0.014	0.011

Πίνακας 51 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA1 στο αναπτυξιακό στάδιο Mid Metamorphosis ανά θερμοκρασία

Mid Metamorphosis	14	17	20
μέγιστη	0.038	0.106	0.051
ελάχιστη	0.014	0.014	0.023
διάμεσος	0.030	0.042	0.036
μέση τιμή	0.028	0.044	0.036
τυπική απόκλιση	0.008	0.025	0.009

4.6 ATP5MEA2

Πίνακας 52 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στους 14Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 14 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.226	0.040	0.196	0.147	0.167
ελάχιστη	0.021	0.428	0.038	0.018	0.008
διάμεσος	0.070	0.141	0.083	0.082	0.068
μέση τιμή	0.085	0.173	0.107	0.084	0.066
τυπική απόκλιση	0.063	0.113	0.058	0.041	0.047

Πίνακας 53 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στους 17Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.152	0.333	0.251	0.133	0.186
ελάχιστη	0.044	0.040	0.048	0.017	0.022
διάμεσος	0.088	0.143	0.092	0.074	0.079
μέση τιμή	0.099	0.146	0.112	0.076	0.080
τυπική απόκλιση	0.040	0.091	0.065	0.030	0.043

Πίνακας 54 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στους 20 Co ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 Co	Hatching	1st feeding	Flexion	End of larvae rearing	Mid Metamorphosis
μέγιστη	0.109	0.287	0.260	0.200	0.115
ελάχιστη	0.051	0.006	0.054	0.032	0.019
διάμεσος	0.086	0.089	0.121	0.076	0.061
μέση τιμή	0.085	0.100	0.143	0.088	0.065
τυπική απόκλιση	0.020	0.097	0.076	0.048	0.026

Πίνακας 55 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στο αναπτυξιακό στάδιο Hatching ανά θερμοκρασία

Hatching	14	17	20
μέγιστη	0.226	0.152	0.109
ελάχιστη	0.021	0.044	0.051
διάμεσος	0.070	0.088	0.086
μέση τιμή	0.085	0.099	0.085
τυπική απόκλιση	0.063	0.040	0.020

Πίνακας 56 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στο αναπτυξιακό στάδιο 1st feeding ανά θερμοκρασία

1st feeding	14	17	20
μέγιστη	0.428	0.333	0.287
ελάχιστη	0.040	0.040	0.006
διάμεσος	0.141	0.143	0.089
μέση τιμή	0.173	0.146	0.100
τυπική απόκλιση	0.113	0.091	0.097

Πίνακας 57 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στο αναπτυξιακό στάδιο Flexion ανά θερμοκρασία

Flexion	14	17	20
μέγιστη	0.196	0.251	0.260
ελάχιστη	0.038	0.048	0.054
διάμεσος	0.083	0.092	0.121
μέση τιμή	0.107	0.112	0.143
τυπική απόκλιση	0.058	0.065	0.076

Πίνακας 58 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στο αναπτυξιακό στάδιο End of larvae rearing ανά θερμοκρασία

End of larvae rearing	14	17	20
μέγιστη	0.147	0.133	0.200
ελάχιστη	0.018	0.017	0.032
διάμεσος	0.082	0.074	0.076
μέση τιμή	0.084	0.152	0.088
τυπική απόκλιση	0.041	0.030	0.048

Πίνακας 59 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του ATP5MEA2 στο αναπτυξιακό στάδιο Mid Metamorphosis ανά θερμοκρασία

Mid Metamorphosis	14	17	20
μέγιστη	0.167	0.186	0.115
ελάχιστη	0.008	0.022	0.019
διάμεσος	0.068	0.079	0.061
μέση τιμή	0.066	0.080	0.065
τυπική απόκλιση	0.047	0.043	0.026