



ΛΑΡΙΣΑ 2021

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Η πρόωμη επίδραση της θερμοκρασίας στην οντογένεση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην τσιπούρα (*Sparus aurata*)»*

*“The early effect of temperature on the ontogeny of oxidative phosphorylation in *Sparus aurata*”*



ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

## 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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών κ. Αικατερίνη Μούτου για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου καθώς και για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο και την Αλεξία Φυτσίλη για την βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το θερμό κλίμα και την άψογη συνεργασία μαζί τους.

## Περίληψη

Ο γονιδιωματικός διπλασιασμός του συνόλου του γονιδιώματος αποτελεί ένα από τους κινητήριους μοχλούς της εξέλιξης αυξάνοντας την ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα των ειδών. Στα σπονδυλωτά έχουν πραγματοποιηθεί δύο γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος ενώ η γενεαλογία των τελεόστεων χαρακτηρίζεται από έναν επιπλέον γύρο διπλασιασμού. Στους τελεόστεους, ανήκει και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) στην οποία διερευνάται η επίπτωση του τρίτου γύρου διπλασιασμού καθώς αποτελεί ένα είδος με ιδιαίτερη εμπορική σημασία και εκτρέφεται ευρέως σε υδατοκαλλιέργειες σε όλη τη Μεσόγειο. Για το λόγο αυτό, αντικείμενο έρευνας αποτελεί η διασαφήνιση των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του νεαρού ιχθυδίου. Η παραγωγή ενέργειας και συγκεκριμένα η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μια διαδικασία η οποία επηρεάζει την ανάπτυξη όλων των οργανισμών. 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.

Στην παρούσα εργασία, διερευνάται ο τρόπος με τον οποίο η θερμοκρασία επηρεάζει την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην οντογένεση του είδους. Τα υπό μελέτη γονίδια είναι τέσσερα ζεύγη παράλογων γονιδίων, αποτέλεσμα του τρίτου γύρου διπλασιασμού του γονιδιώματος. Αναλυτικότερα, τα γονίδια ενδιαφέροντος είναι τα *uqcrha*, *uqcrhb*, *uqcr11a*, *uqcr11b*, *uqcrc2a*, *uqcrc2b*, *uqcifs1a* και *uqcifs1b* τα οποία κωδικοποιούν για υπομονάδες του συμπλόκου III και έχουν είτε καταλυτικό είτε ρυθμιστικό ρόλο.

Τα αποτελέσματα στο σύνολο των γονιδίων συνηγορούν πως η επίδραση της θερμοκρασίας επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων στην πλειονότητα των αναπτυξιακών σταδίων τα οποία ερευνήθηκαν. Συγκρίσεις έγιναν σε τρία επίπεδα: μεταξύ παράλογων γονιδίων, για κάθε αναπτυξιακό στάδιο για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης καθώς επίσης και μεταξύ των προτύπων έκφρασης των αναπτυξιακών σταδίων στις θερμοκρασίες 17, 20, 23°C. Όσον αφορά τα παράλογα εκφράζονται στο σύνολο των σταδίων, σε όλες τις θερμοκρασίες ανάπτυξης σε διαφορετικά επίπεδα το καθένα. Στους 23°C επίσης παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες ανάπτυξης για κάποια γονίδια με εξαίρεση το στάδιο end of larval rearing όπου τα επίπεδα έκφρασης ήταν υψηλότερα.

## Abstract

Whole genome duplication (WGD) is one of the driving forces of evolution, increasing the diversity and complexity of species. In vertebrates two rounds of WGD have taken place while the genealogy of teleosts is characterized by an additional round. Teleosts also includes sea bream (*Sparus aurata*), which is being investigated for its impact on the third round of WGD as it is a species of commercial importance and is widely cultivated in aquaculture throughout the Mediterranean. For this reason, the object of research is to clarify the factors that affect the development of juveniles. Energy production and in particular oxidative phosphorylation is a process that affects the growth of all organisms. In addition, teleosts are organisms that can modify their phenotype in response to changes in ambient temperature. Therefore, it is important to find evidence on how temperature affects oxidative phosphorylation.

In this project, we investigate the way in which temperature affects oxidative phosphorylation in the ontogeny of the species. The genes we studied are four pairs of paralogs genes, that are the result of the third round of WGD. The genes of interest are *uqcrha*, *uqcrhb*, *uqcr11a*, *uqcr11b*, *uqcrc2a*, *uqcrc2b*, *uqcrfs1a* and *uqcrfs1b* that they are coding for complex III subunits and they have either catalytic or regulatory role.

The results suggest that the effect of temperature affects the expression of genes in most of the developmental stages. Comparisons were made at three levels: between paralogs genes, for each developmental stage for the three growth temperatures, as well as between the expression patterns of the developmental stages at 17, 20, 23 ° C. As for the paralogs, they are expressed in all the stages, at all growth temperatures at different levels each. At 23 ° C, lower expression levels were also observed compared to other growth temperatures for some genes except for the “end of larval rearing” stage where expression levels were higher.

# Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή
  - 1.1 Υπό μελέτη είδος: Τσιπούρα – *Sparus aurata*
    - 1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά
    - 1.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση
    - 1.1.3 Αναπαραγωγή
    - 1.1.4 Οικονομική σημασία
  - 1.2 Αναπτυξιακά στάδια των τελεόστεων
  - 1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση
    - 1.3.1 Προέλευση, οργάνωση και λειτουργία μιτοχονδρίων
    - 1.3.2 Μιτοχονδριακό γονιδίωμα
    - 1.3.3 Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες του πυρηνικού γονιδιώματος
    - 1.3.4 Ο μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης
    - 1.3.5 Η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας
    - 1.3.6 Σύνθεση ATP – Σύμπλοκο V
    - 1.3.7 Δημιουργία υπερσυμπλόκων
  - 1.4 Το γονιδίωμα των τελεόστεων
    - 1.4.1 Οι τρεις γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος των τελεόστεων
    - 1.4.2 Οι επιπτώσεις των γύρων διπλασιασμού στο γονιδίωμα
  - 1.5 Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των τελεόστεων
  - 1.6 Σκοπός
2. Υλικά και μέθοδοι
  - 2.1 Συλλογή και προσδιορισμός δειγμάτων
  - 2.2 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA
  - 2.3 Προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος μέσω ποσοτικής PCR
    - 2.3.1 Αρχή της μεθόδου
    - 2.3.2 Σχεδιασμός εκκινητών
    - 2.3.3 Απόδοση αντίδρασης
    - 2.3.4 Γονίδια αναφοράς
    - 2.3.5 Πρωτόκολλο αντίδρασης
  - 2.4 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων
3. Αποτελέσματα
  - 3.1 έκφραση γονιδίου *uqcrha*
  - 3.2 έκφραση γονιδίου *uqcrhb*
  - 3.3 έκφραση γονιδίου *uqcrc2a*
  - 3.4 έκφραση γονιδίου *uqcrc2b*
  - 3.5 έκφραση γονιδίου *uqcr11a*
  - 3.6 έκφραση γονιδίου *uqcrc11b*
  - 3.7 έκφραση γονιδίου *uqcrfs1a*

- 3.8 έκφραση γονιδίου *uqcrfs1b*
- 3.9 σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων γονιδίων
  - 3.9.1 σύγκριση της έκφραση των παραλόγων *uqcrha – uqcrhb*
  - 3.9.2 σύγκριση της έκφραση των παραλόγων *uqcrc2a – uqcrc2b*
  - 3.9.3 σύγκριση της έκφραση των παραλόγων *uqcr11a – uqcr11b*
  - 3.9.4 σύγκριση της έκφραση των παραλόγων *uqcrfs1a – uqcrfs1b*
- 4. Συζήτηση
- 5. Συμπεράσματα
- 6. Βιβλιογραφία
- 7. Παράρτημα
  - 7.1 έκφραση γονιδίου *uqcrha*
  - 7.2 έκφραση γονιδίου *uqcrhb*
  - 7.3 έκφραση γονιδίου *uqcrc2a*
  - 7.4 έκφραση γονιδίου *uqcrc2b*
  - 7.5 έκφραση γονιδίου *uqcr11a*
  - 7.6 έκφραση γονιδίου *uqcrc11b*
  - 7.7 έκφραση γονιδίου *uqcrfs1a*
  - 7.8 έκφραση γονιδίου *uqcrfs1b*

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Υπό μελέτη είδος: Τσιπούρα-*Sparus aurata*

#### 1.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η τσιπούρα είναι ένα υποτροπικό ψάρι το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Sparidae. Έχει ωοειδές σχήμα σώματος συμπίεσμένο πλευρικά με καμπυλωτή πλάγια όψη κεφαλής, μικρά μάτια και μια μαύρη κηλίδα στην αρχή της πλευρικής γραμμής. Όσον αφορά το στόμα οι δύο γνάθοι εμφανίζουν διαφορετικό μέγεθος με την κάτω γνάθο να είναι μικρότερη. Το συνολικό χρώμα του σώματος είναι συνηθέστερα ασημί-γκρι ενώ στο κεφάλι υπάρχει και μια χαρακτηριστική χρυσή ζώνη ανάμεσα στα μάτια. Τέλος, το ουραίο πτερύγιο χαρακτηρίζεται από λευκό-γκρι χρώμα με μαύρους χρωματισμούς στα άκρα (Εικόνα 1) (2).



Εικόνα 1 Απεικόνιση του είδους *Sparus aurata*

#### 1.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση

Το είδος *Sparus aurata* απαντάται στη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (σπάνια), καθώς και στον Ανατολικό Ατλαντικό, από τα Βρετανικά Νησιά, στο Στενό του Γιβραλτάρ στο Πράσινο Ακρωτήριο και γύρω από τα Κανάρια Νησιά (Εικόνα 2).

Το περιβάλλον στο οποίο ζει μπορεί να είναι βραχώδης ή αμμώδης βυθός καθώς επίσης και η επιφάνεια της θάλασσας και βάθη περίπου 30 μέτρων. Ενήλικα ψάρια συναντώνται και σε βάθος μεγαλύτερο των 150 μέτρων. Το είδος είναι ευρύαλο, δηλαδή μπορεί να ζήσει σε νερά ποικίλης αλατότητας και έτσι απαντάται και σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες. Μετακινείται στην αρχή της άνοιξης σε παράκτιες περιοχές για αναζήτηση τροφής και ηπιότερων θερμοκρασιών φαινόμενο το οποίο ονομάζεται τροφική μετανάστευση. Ενώ στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφει στην ανοιχτή θάλασσα για λόγους αναπαραγωγής. Ζει είτε μοναχικά είτε σχηματίζοντας μικρές ομάδες και όσον αφορά τις διατροφικές συνήθειες είναι κυρίως σαρκοφάγο και τρέφεται με μικρότερα ψάρια και οστρακοειδή ενώ δυνητικά μπορεί να γίνει και φυτοφάγο (1).





Εικόνα 2 Γεωγραφική κατανομή του είδους *Sparus aurata* (1)

### 1.1.3 Αναπαραγωγή

Η τσιπούρα εμφανίζει πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό και τα ενήλικα άτομα γίνονται σεξουαλικά ώριμα ύστερα από δύο χρόνια όταν φτάσουν σε μέγεθος 20-35 εκατοστά. Στο στάδιο αυτό είναι λειτουργικά αρσενικά άτομα και όταν ξεπεράσουν σε μήκος τα 30 εκατοστά γίνονται θηλυκά (1, 2). Κατά τη διάρκεια της ανδρικής φάσης, η αμφιφυλόφιλη γονάδα έχει λειτουργικό όρχι, με ασύγχρονη σπερματογένεση, και μη λειτουργικές περιοχές των ωοθηκών ενώ η ανάπτυξη των ωοθηκών είναι επίσης ασύγχρονη (3). Η τσιπούρα στη Μεσόγειο αναπαράγεται μεταξύ του Οκτωβρίου και του Δεκεμβρίου όπου και μεταναστεύει σε μεγαλύτερα βάθη. Κατά την αναπαραγωγική διαδικασία τα θηλυκά παράγουν 20.000-80.000 αυγά, τα οποία έχουν σφαιρικό σχήμα και διάμετρο λίγο μικρότερη από 1 mm (1).

### 1.1.4 Οικονομική σημασία

Η τσιπούρα αποτελεί ένα είδος με υψηλή εμπορική αξία γεγονός που διαφαίνεται από την συστηματική εκτροφή σε ιχθυοκαλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα, η τσιπούρα βρίσκεται στην τρίτη θέση παραγωγής ως προς τον όγκο του παραγόμενου προϊόντος σε υδατοκαλλιέργειες στην ΕΕ με 91.964 τόνους ετησίως (2018) (Πίνακας 1). Ενώ βρίσκεται στην τέταρτη θέση ως προς την αξία των πωλήσεων η οποία ανέρχεται στα 434 εκατομμύρια ευρώ (2018) (Πίνακας 2). Το 2019, η Ελλάδα βρίσκονταν στη δεύτερη θέση παραγωγής τσιπούρας, πίσω από την Τουρκία, με ποσοστό 26% (Εικόνα 3) (9).

Πίνακας 1 Ετήσια παραγωγή σε όγκο των κύριων ειδών ψαριών που εκτρέφονται σε υδατοκαλλιέργειες (9)

Κύρια είδη ψαριών υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. το 2018 (όγκος)			
Είδος	Επιστημονική ονομασία	Τόνοι	% ετήσιας αύξησης
Σολομός Ατλαντικού	<i>Salmo salar</i>	179.314,00	-14,28
Ιριδιζούσα πέστροφα	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	174.987,39	-5,56
Τσιπούρα	<i>Sparus aurata</i>	91.964,14	-3,53
Λαβράκι	<i>Dicentrarchus labrax</i>	84.399,95	7,04
Κοινός Κυπρίνος	<i>Cyprinus carpio</i>	75.347,76	1,73
Γαλαζοπτερυγός τόνος Ατλαντικού	<i>Thunnus thynnus</i>	11.181,00	69,00
Καϊκάνι	<i>Psetta maxima</i>	8.395,38	-29,55
Κρανιός	<i>Argyrosomus regius</i>	7.052,43	14,10
Ιχθύες	<i>Osteichthyes</i>	6.732,80	-19,82
Αφρικάνικο γατόψαρο	<i>Clarias gariepinus</i>	6.687,28	-24,19
<b>Σύνολο 10 πρώτων ειδών</b>		<b>646.062,13</b>	<b>-5,64</b>
<b>Λοιπά είδη</b>		<b>49.823,05</b>	<b>6,27</b>
<b>Σύνολο στην Ε.Ε. (28)</b>		<b>695.885,18</b>	<b>-4,87</b>

πηγή: FAO, ΣΕΘ

Πίνακας 2 Ετήσια κέρδη από την παραγωγή των κυρίων ειδών που εκτρέφονται σε υδατοκαλλιέργειες (9)

Κύρια είδη ψαριών υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. το 2018 (αξία)			
Είδος	Επιστημονική ονομασία	Αξία (χιλιάδες €)	% ετήσιας αύξησης
Σολομός Ατλαντικού	<i>Salmo salar</i>	1.106.387,82	-8,39
Ιριδιζούσα Πέστροφα	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	573.872,99	-0,19
Λαβράκι	<i>Dicentrarchus labrax</i>	463.027,64	5,53
Τσιπούρα	<i>Sparus aurata</i>	434.085,30	-0,50
Κοινός Κυπρίνος	<i>Cyprinus carpio</i>	165.696,66	7,85
Γαλαζοπτερυγός τόνος Ατλαντικού	<i>Thunnus thynnus</i>	127.590,00	60,41
Καϊκάνι	<i>Psetta maxima</i>	59.744,53	-18,86
Ευρωπαϊκό χέλι	<i>Anguilla anguilla</i>	48.916,82	-11,01
Κρανιός	<i>Argyrosomus regius</i>	37.549,74	23,06
Ιχθύες	<i>Osteichthyes</i>	22.500,04	-17,37
<b>Σύνολο 10 πρώτων ειδών</b>		<b>3.039.371,54</b>	<b>-1,23</b>
<b>Λοιπά είδη</b>		<b>201.912,58</b>	<b>15,02</b>
<b>Σύνολο στην Ε.Ε. (28)</b>		<b>3.241.284,12</b>	<b>-0,35</b>

πηγή: FAO, ΣΕΘ



Εικόνα 3 Ποσοστό παραγωγής τσιπούρας σε διεθνές επίπεδο. (9)

## 1.2 Αναπτυξιακά στάδια των τελεόστεων

Μεταξύ της αναπαραγωγής και της ενσωμάτωσης στον ενήλικο πληθυσμό τα ψάρια υφίστανται δραματικές αλλαγές στην μορφολογία και στις συνήθειες τους. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το ψάρι που βρίσκεται σε πρωτογενές στάδιο ανάπτυξης μετατρέπεται σε ένα άτομο το οποίο σταδιακά αναπτύσσει τα ενήλικα χαρακτηριστικά του. Η διαδικασία αυτή μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια καθένα από τα οποία αντικατοπτρίζουν τόσο μορφολογικές όσο και λειτουργικές αλλαγές στην ζωή των ψαριών (Εικόνες 4,5) (4).

Το πρώτο στάδιο είναι το στάδιο του αυγού το οποίο περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα από την γονιμοποίηση του ωαρίου ως την εκκόλαψη (4). Η ζωή ξεκινά με τη σύντηξη ενός αρσενικού και ενός θηλυκού γαμέτη, προκύπτει το ζυγωτό και ξεκινά αμέσως η εμβρυική ανάπτυξη, η οποία τερματίζεται με την εκκόλαψη του αυγού που πραγματοποιείται 48 ώρες ύστερα από την γονιμοποίηση του ωαρίου (6). Μετά τη γονιμοποίηση το αναπτυσσόμενο αυγό αποτελεί ένα κλειστό σύστημα στο οποίο γίνεται ελεύθερη ανταλλαγή μόνο των αερίων της αναπνοής και θερμότητας. Δεν παρέχονται θρεπτικά συστατικά εξωγενώς και ως αποτέλεσμα της χαμηλής διαπερατότητας των επιφανειακών μεμβρανών μονό μια αμελητέα ποσότητα ουσιών και νερού ανταλλάσσονται. Το αυγό συνεπώς πρέπει να παρέχει όλες τις απαραίτητες ουσίες για την διατήρηση της ομοιόστασης και την εξασφάλιση της εμβρυικής ανάπτυξης. Η ενέργεια που είναι απαραίτητη παρέχεται γενικά από λιπίδια αλλά και από μια «δεξαμενή» ελεύθερων αμινοξέων, η οποία αποτελεί μια επιπρόσθετη ενδογενή πηγή ενέργειας και βρίσκεται στη λέκιθο (5).

Χρονικά το δεύτερο στάδιο ξεκινά με την εκκόλαψη του αυγού και το πέρας αυτού οριοθετείται με την έναρξη της μεταμόρφωσης. Το στάδιο αυτό επιπλέον χωρίζεται σε υποκατηγορίες: την προνύμφη λεκιθικού σάκου, το στάδιο πριν την κάμψη της νωτοχορδής (preflexion), το στάδιο της κάμψης (flexion) καθώς και το στάδιο μετά κάμψης (postflexion).

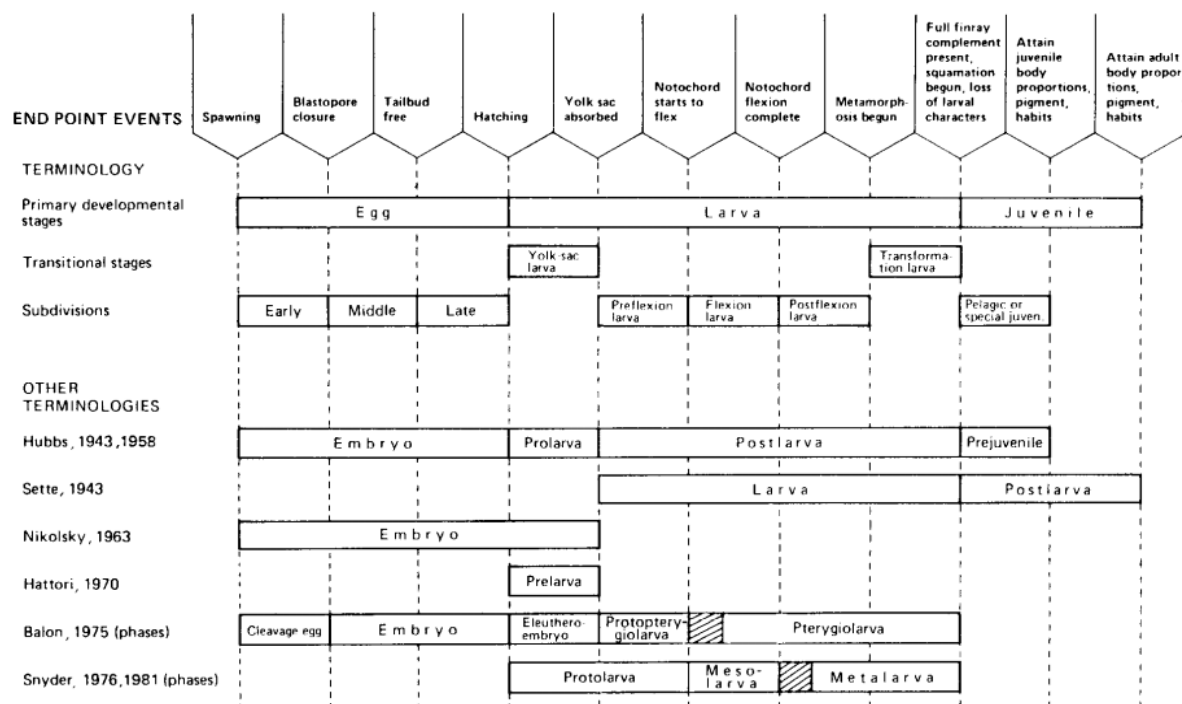
Όταν εκκολάπτεται το αυγό ύστερα από 48 ώρες μετά τη γονιμοποίησή του προκύπτει μια προνύμφη, η οποία έχει μήκος 2,6 mm και αποτελείται από 21 σωμαίτες. Για να επιβιώσει εξαρτάται από την λέκιθο της, η οποία βρίσκεται στο πρόσθιο και κοιλιακό μέρος του σώματος της. Τις πρώτες έξι μέρες η προνύμφη χρησιμοποιεί τη λέκιθο ως πηγή θρεπτικών συστατικών καθώς σε εκείνο το στάδιο στερείται λειτουργικού στόματος. Ταυτόχρονα το κυκλοφορικό, μυϊκό και πεπτικό σύστημα αναπτύσσονται και αρχίζουν να προετοιμάζονται για την πρώτη τροφοληψία (first feeding) η οποία είναι πλαγκτονικής μορφής. Στο χρονικό σημείο αυτό ασκούνται ισχυρές εξελικτικές πιέσεις καθώς πρέπει να συγχρονιστεί η εξάντληση της λεκίθου και η δυνατότητα λήψης εξωγενούς τροφής (4, 7, 8).

Στη συνέχεια ξεκινάει η περίοδος πριν την κάμψη της νωτοχορδής, η οποία αφορά στο διάστημα μεταξύ της εξάντλησης της λεκίθου ως την κάμψη της νωτοχορδής η οποία ακολουθείται από το στάδιο «κάμψης» κατά το οποίο ολοκληρώνεται η κάμψη της νωτοχορδής και τα πλευρικά οστά


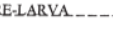





τοποθετούνται σε κατακόρυφη θέση. Τέλος, το στάδιο «μετακάμψης» συνοδεύεται από την ανάπτυξη του ουραίου πτερυγίου.

Το δεύτερο στάδιο χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη των πτερυγίων, αλλαγή στο σχήμα του σώματος και στις τεχνικές τροφοληψίας (4). Σταδιακά αρχίζουν να αναπτύσσονται τα όργανα. Την έκτη με ένατη ημέρα η κεφαλή έχει αναπτυχθεί σε μεγάλο βαθμό συγκριτικά με αυτή της νεοεκκολαπτόμενης προνύμφης. Το στόμα έχει ανοίξει και ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί στο μεγαλύτερο βαθμό ενώ το σύμπλεγμα εντέρου-παγκρέατος έχει αναπτυχθεί και είναι έτοιμο να διαχειριστεί πολύπλοκη εξωγενή τροφή. Τέλος, τα λέπια και τα θωρακικά πτερύγια έχουν αρχίσει να παίρνουν μορφή. Στην κατάσταση αυτή η προνύμφη δεν έχει δυνατότητα πλήρους κίνησης όμως μπορεί να διατηρήσει μια οριζόντια θέση ηρεμίας. Στην δέκατη πέμπτη με δέκατη όγδοη μέρα μετά την εκκόλαψη έχει ολοκληρωθεί η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου. Η προνύμφη αποκτά περισσότερες ικανότητες κίνησης απαραίτητες για την εύρεση τροφής.

Το τελευταίο στάδιο αποτελεί το στάδιο του ενήλικου ατόμου (juvenile stage) ή μεταπρονυμφικό στάδιο (post larval) το οποίο περιλαμβάνει και το μεταβατικό στάδιο της μεταμόρφωσης. Μορφολογικά το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από την αλλαγή του σώματος και των χαρακτηριστικών της προνύμφης έτσι ώστε να προκύψει το ενήλικο άτομο και συμβαίνει χρονικά 45 περίπου μέρες ύστερα από την εκκόλαψη του αυγού. Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιούνται δύο οντογενετικές διαδικασίες: απώλεια εξειδικευμένων προνυμφικών χαρακτήρων και σχηματισμός των χαρακτηριστικών των νεαρών-ενήλικων ατόμων. Με το πέρας του σταδίου έχει προκύψει μορφολογικά το ενήλικο άτομο στο οποίο θα επέλθουν περαιτέρω μεταβολές έτσι ώστε να γίνει σεξουαλικά ώριμο και έτοιμο για αναπαραγωγή (4,8).



Εικόνα 4 Η ορολογία των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης των τελεόστεων (4)

days and stages	mm length	n° somites	yolk sac	gut	alimention	swimming	caudal fin
HATCHING 	0 2.5	21					
PRE-LARVA 	1 2.6	22	present	not open mouth	/	first attempts of darting movements	
LARVA 	6 3.5	23	partially resorbed	open mouth	first attempts of feeding	active darting movements	
	9 3.7	24					↓
	15 3.9	24		development of gut and glands in progress	active feeding	continuous eel-like swimming plus darting movements	
	18 4.3	24					↓
	30 5.5	25	not present			continuous effective swimming improved by swim bladder	
METAMORPHOSIS 	45 8.1						
FRY 	60 14			functional gut	very active feeding		
	90 20					combined eel-like and hydrofoil swimming	
	150 28						

Εικόνα 5 Σχηματική αναπαράσταση που αποτυπώνει τις κύριες πτυχές των βασικών αναπτυξιακών σταδίων στο είδος *Sparus aurata* (8)

### 1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ως οξειδωτική φωσφορυλίωση ορίζεται η διαδικασία οξείδωσης θρεπτικών ουσιών για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο. Για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού κατά τη διάρκεια της ημέρας, η απαιτούμενη ποσότητα ATP καλύπτεται από τη συνεχή ανακύκλωση ADP σε ATP. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια τα οποία οξειδώνουν ενώσεις και συνθέτουν ATP και αποτελούν αναπόσπαστο κρίκο στην παραγωγή ενέργειας και συνεπώς στην επιβίωση και λειτουργία του κυττάρου (10).

#### 1.3.1 Προέλευση, οργάνωση και λειτουργία μιτοχονδρίων

##### Προέλευση

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν υποκυτταρικά οργανίδια με επίμηκες κυλινδρικό σχήμα. Είναι ημιαυτόνομα οργανίδια τα οποία πιθανόν έχουν προέλθει από συμβιωτική σχέση με το κύτταρο ξενιστή. Πιστεύεται πως πριν από εκατομμύρια χρόνια έλαβε χώρα ένα συμβάν ενδοσυμβίωσης μεταξύ ενός οργανισμού (βακτηριακός) με ικανότητα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ο οποίος

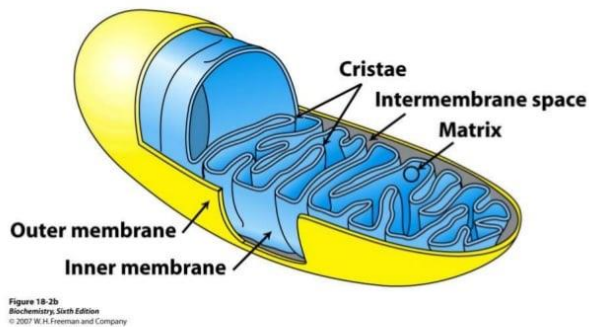
εγκολλώθηκε από ένα άλλο μεγαλύτερο κύτταρο. Αυτή η σχέση ενδοσυμβίωσης από παροδική έγινε μόνιμη και το βακτηριακό κύτταρο έχασε το μεγαλύτερο μέρος του γενετικού του υλικού, συνεπώς δεν μπορούσε πλέον να επιβιώνει ανεξάρτητα.

Η ταχύτατη ανάπτυξη της γονιδιωματικής τα τελευταία χρόνια και η συσσώρευση δεδομένων από την ανάλυση αλληλουχιών πολλών βακτηριακών και μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων έδωσαν στοιχεία για την προέλευση του αρχικού μιτοχονδρίου. Το γονιδίωμα με την μεγαλύτερη ομοιότητα με το μιτοχόνδριο είναι εκείνο του *Ricketta prowazeki* και πιστεύεται πως όλα τα σημερινά μιτοχόνδρια έχουν προκύψει από κάποιον πρόγονο του *R. prowazeki* ως αποτέλεσμα ενός και μόνο συμβάντος ενδοσυμβίωσης (11).

### Οργάνωση

Δομικά τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από δύο συστήματα μεμβρανών. Μια μεμβράνη η οποία περιβάλλει εξωτερικά τα μιτοχόνδρια και μια η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό και είναι αρκετά μεγαλύτερη καθώς εμφανίζει πτυχώσεις. Οι δύο μεμβράνες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη διαπερατότητα και τη χρηστικότητα τους. Η εξωτερική μεμβράνη φέρει στην επιφάνεια της πολλά μόρια μιτοχονδριακής πορίνης, μιας πρωτεΐνης που σχηματίζει πόρους και έτσι η μεμβράνη γίνεται διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα. Συνεπώς, ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ομοιάζει με το κυτταρόπλασμα σε ότι αφορά την κατανομή ιόντων και μικρών πολικών μορίων. Σε αντίθεση με την εξωτερική, η εσωτερική μεμβράνη εμφανίζει πολύ χαμηλή διαπερατότητα σε ιόντα και μικρά πολικά μόρια. Διαθέτει όμως ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών οι οποίες είτε συμμετέχουν στη οξειδωτική φωσφορυλίωση είτε στη μεταφορά μεταβολιτών (πυροσταφυλικό οξύ) στην μιτοχονδριακή μήτρα. Η χαμηλή διαπερατότητα της μεμβράνης είναι καθοριστικής σημασίας για την διατήρηση της διαβάθμισης των πρωτονίων η οποία δίνει την απαραίτητη ενέργεια για την πραγματοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Ως αποτέλεσμα της ύπαρξης δύο μεμβρανικών συστημάτων στα μιτοχόνδρια είναι ο σχηματισμός διακριτών διαμερισμάτων. Ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης που χαρακτηρίζεται ως διαμεμβρανικός και ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη και ονομάζεται μήτρα. Στη μήτρα πραγματοποιούνται μια σειρά αντιδράσεων που αφορούν κυρίως την παραγωγή ενέργειας. Στις αντιδράσεις αυτές συμπεριλαμβάνεται η οξείδωση λιπαρών οξέων καθώς και η πλειονότητα των αντιδράσεων του κύκλου του κιτρικού οξέος όχι όμως και η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη η οποία χάρη στις πτυχώσεις που φέρει δίνει τη δυνατότητα για την ταυτόχρονη πραγματοποίησή της αντίδρασης σε πολύ περισσότερες θέσεις από ότι η «απλή» μεμβράνη χωρίς ακρολοφίες (Εικόνα 6) (10, 11).



Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση μιτοχονδρίου (10)

### Λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια πραγματοποιούν τις περισσότερες διεργασίες για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο. Η παραγωγή ενέργειας ξεκινάει με τις αντιδράσεις της γλυκόλυσης, τη μετατροπή δηλαδή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω μίας σειράς αντιδράσεων η οποία δεν πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Μετά την παραγωγή του, το πυροσταφυλικό οξύ εισέρχεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου (μιτοχονδριακή μήτρα) και αρχικά οξειδώνεται σε ακετύλο-CoA και η ένωση αυτή εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στον κύκλο του κιτρικού οξέος το  $\text{NAD}^+$  και το  $\text{FADH}$  ανάγονται προς  $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$ . Τα μόρια αυτά στη συνέχεια επανοξειδώνονται μέσω των αντιδράσεων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Πέραν του πυροσταφυλικού οξέος στη μιτοχονδριακή μήτρα εισέρχονται και λιπαρά οξέα τα οποία οξειδώνονται σε ακετύλο-CoA και έπειτα ακολουθούν την ίδια καταβολική πορεία που περιεγράφηκε παραπάνω.

Συμπερασματικά, η άριστη και αποτελεσματική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι κρίσιμη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια δε θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν σε καμία περίπτωση στατικά οργανίδια καθώς συνεχώς συνενώνονται και διαιρούνται, ενώ επίσης τοποθετούνται και σε θέσεις υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων όπως είναι οι νευρικές απολήξεις. Βέβαια, ο ρόλος των συνεχών διαιρέσεων και συνενώσεων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί αλλά κύρια άποψη είναι πως εξυπηρετεί την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των μιτοχονδρίων (10, 11).

### 1.3.2 Μιτοχονδριακό γονιδίωμα

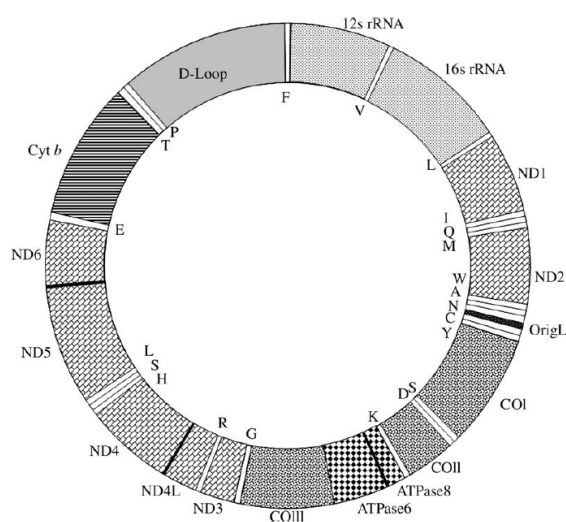
Τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια διότι διαθέτουν γενετικό υλικό. Το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων αποτελείται από αντίγραφα κυκλικών μορίων DNA (ομοιάζει με το βακτηριακό DNA). Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζωικών οργανισμών είναι μικρά, με μέγεθος περίπου 16kb, συγκριτικά με τα γονιδιώματα των μιτοχονδρίων των ζυμομυκήτων και των φυτών τα οποία έχουν μέγεθος περίπου 80kb και πάνω από 200kb αντίστοιχα.

Τα περισσότερα μιτοχονδριακά γονιδιώματα κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης καθώς και τα rRNA και tRNA που



είναι απαραίτητα για την μετάφραση των γονιδίων αυτών. Οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του πυρήνα και πιστεύεται πως αρχικά και αυτές εκφράζονταν στο μιτοχόνδριο. Τα tRNA που συναντώνται στο μιτοχόνδριο αναδεικνύουν τη χρήση ενός γενετικού κώδικα ο οποίος εμφανίζει μικρές διαφορές με το παγκόσμιο γενετικό κώδικα ο οποίος χρησιμοποιείται από όλους τους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Όπως το πυρηνικό γονιδίωμα έτσι και το γενετικό υλικό των μιτοχονδρίων μπορεί να τροποποιηθεί από μεταλλάξεις ο οποίες μπορούν να δράσουν καταστροφικά για το οργανίδιο. Η διαφορά με το πυρηνικό γενετικό υλικό είναι πως τα μιτοχόνδρια των γονιμοποιημένων ωαρίων προέρχονται από το ωοκύτταρο. Επομένως, οι μεταλλάξεις της γαμετικής σειράς στο μιτοχονδριακό DNA μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά από την μητέρα και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στη λειτουργικότητα του οργανιδίου (Εικόνα 7) (11,12).



Εικόνα 7 Χάρτης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (12)

### 1.3.3 Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες του πυρηνικού γονιδιώματος

Στον πυρήνα του κυττάρου εκφράζονται γονίδια που κωδικοποιούν τις περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες για την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Τα γονίδια αυτά φαίνεται πως έχουν μεταφερθεί από τον αρχικό προκαρυωτικό μιτοχονδριακό πρόγονο στο πυρηνικό γονιδίωμα μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες αυτές συντίθεται σε ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και έπειτα εισέρχονται στα μιτοχόνδρια ως πλήρεις πεπτιδικές αλυσίδες. Η διαδικασία αυτή θεωρείται αρκετά πολυπλοκότερη συγκριτικά με τη μεταφορά ενός πεπτιδίου από μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που προορίζονται για την μιτοχονδριακή μήτρα πρέπει να περάσουν δύο μεμβρανικά συστήματα. Για να επιτευχθεί αυτό οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες για την εισαγωγή τους στα μιτοχόνδρια στοχεύονται με αλληλουχίες οδηγούς. Αρχικά, οι αλληλουχίες αυτές προσδένονται σε υποδοχείς της εξωτερικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν μέρος του συμπλόκου Tom (τρανσλοκάση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης) το οποίο κατευθύνει την μεταφορά από



το κυτταρόπλασμα στον διαμεμβρανικό χώρο. Έπειτα, για την εισαγωγή των πρωτεϊνών στη μήτρα, αυτές μεταφέρονται στο σύμπλοκο Tim (τρανσλοκάση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης). Μετά την εισαγωγή των πρωτεϊνών στη μήτρα η αλληλουχία οδηγός αφαιρείται με πρωτεόλυση (11).

#### 1.3.4 Ο μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

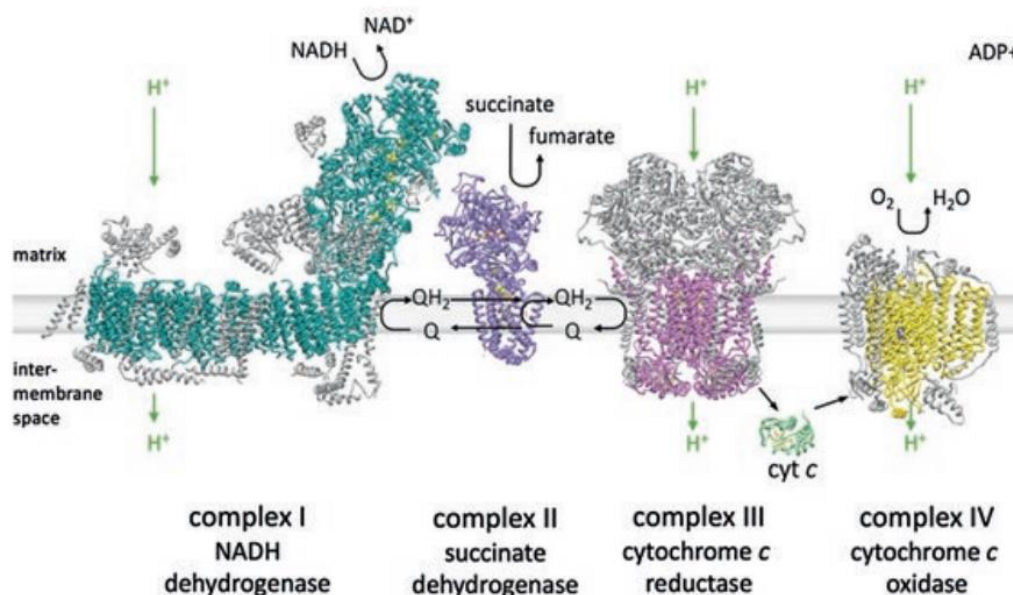
Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί τη διαδικασία παραγωγής ενέργειας σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς σε κυτταρικό επίπεδο. Λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και αποτελεί μια σειρά αντιδράσεων οξειδοαναγωγής οι οποίες δημιουργούν ροή ηλεκτρονίων από το NADH (νικοτιναμίδιο-αδένινο δινουκλεοτίδιο) και το FADH<sub>2</sub> (δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης) ως προς O<sub>2</sub> (μοριακό οξυγόνο). Η πραγματοποίηση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων απελευθερώνει ενέργεια που χρησιμοποιείται για να ωθήσει τη σύνθεση του ATP από το ADP. Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων που μεταφέρεται από το NADH στο O<sub>2</sub> αποδίδεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας, δηλαδή συνολικά  $\Delta G^{\circ} = -52,5 \text{ kcal/mol}$ . Για την εκμετάλλευση αυτού του ποσού ενέργειας, απαιτείται η σταδιακή παραγωγή της ενέργειας μέσω της διέλευσης των ηλεκτρονίων από μία σειρά οξειδοαναγωγικών φορέων. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει σε τέσσερα πρωτεϊνικά συμπλέγματα (σύμπλοκο I, II, III, IV) τα οποία αποτελούν την αναπνευστική αλυσίδα ή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων και τοποθετούνται χωρικά στην εσωτερική μεμβράνη αυτών. Στην ουσία, η ενέργεια που παράγεται με την ροή ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την άντληση πρωτονίων από τη μήτρα των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο διαφορά δυναμικού και βαθμίδωση pH. Όταν τα πρωτόνια επιστρέφουν στην μιτοχονδριακή μήτρα για να επέλθει ηρεμία περνούν μέσω ενός ενζυμικού συμπλέγματος (σύμπλοκο V) και παράγεται ATP.

Ο μηχανισμός σύζευξης της αναπνευστικής αλυσίδας με την παραγωγή ενέργειας από την σύνθεση ATP ονομάζεται χημειοσμωτική σύζευξη και εξασφαλίζεται από ένα πέμπτο πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης την ATP συνθάση (σύμπλοκο V). Η υπόθεση της χημειοσμωτικής σύζευξης προτάθηκε αρχικά από τον Peter Mitchell το 1961. Πιο συγκεκριμένα υποστήριξε πως το ATP δεν συντίθεται με απευθείας μεταφορά χημικών ομάδων υψηλής ενέργειας αλλά με τη χρήση ενέργειας που είναι αποθηκευμένη στη διαβάθμιση πρωτονίων μεταξύ δύο πλευρών μιας βιολογικής μεμβράνης. Αρχικά η υπόθεση του αντιμετωπίστηκε με σκεπτικισμό από τους επιστήμονες εκείνης της εποχής και χρειάστηκε να περάσουν πάνω από δέκα χρόνια και να συγκεντρωθούν πληθώρα πειραματικών δεδομένων υπέρ της χημειοσμωτικής σύζευξης ώστε τελικά να γίνει αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα (10, 11,13).

#### 1.3.5 Η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας

Η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από τέσσερα σύμπλοκα, τρεις αντλίες πρωτονίων και μια φυσική σύνδεση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Από το NADH, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο οξυγόνο μέσω μιας αλυσίδας τριών συμπλόκων: την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q

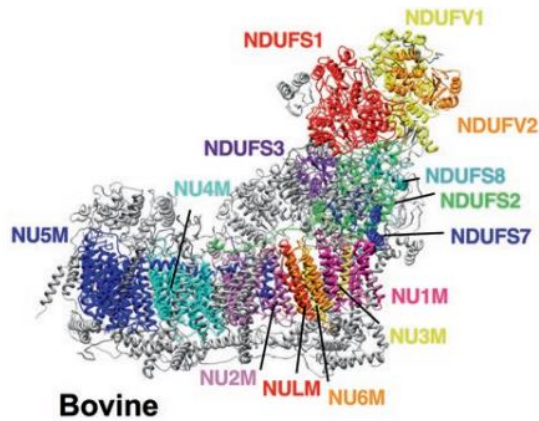
(σύμπλοκο I), την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III) και την οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Υπάρχει ένα ακόμα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο η αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικό-Q (σύμπλοκο II) το οποίο περιέχει το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογόνωση το οποίο παράγει  $FADH_2$  στον κύκλο το κιτρικού οξέος. Τα ηλεκτρόνια από το  $FADH_2$  στη συνέχεια εισέρχονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο II (Εικόνα 8) (14).



Εικόνα 8 Τα τέσσερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας (13)

### Σύμπλοκο I (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q)

Το σύμπλοκο I αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα γνωστά μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα και είναι το μεγαλύτερο από τα τέσσερα της αναπνευστικής αλυσίδας. Έχει σχήμα «L» και αποτελείται από δύο επιμήκεις βραχίονες. Ο υδρόφοβος βραχίονας βρίσκεται βυθισμένος στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και ο υδρόφιλος βραχίονας προεξέχει από την πλευρά της μήτρας. Το σύμπλοκο δομείται από 14 κύριες υπομονάδες, στα βακτήρια, 7 εκ των οποίων συναντώνται στον υδρόφιλο βραχίονα και οι υπόλοιπες στον υδρόφοβο. Οι υπομονάδες αυτές αντιπροσωπεύουν τον ελάχιστο πυρήνα του συμπλόκου που απαιτείται για μεταφορά ηλεκτρονίων και είναι όλες συντηρημένες στους ευκαρυώτες. Εκτός από τις βασικές υπομονάδες το σύμπλοκο περιέχει και έναν μεγάλο αριθμό βοηθητικών υπομονάδων οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν έως και το 50% της συνολικής μάζας του συμπλόκου και ο ρόλος τους είναι είτε ρυθμιστικός είτε συμμετέχουν στη βιογένεση του συμπλόκου (Εικόνα 9) (13, 14).



Εικόνα 9 Η δομή του συμπλόκου I (13)

Τα ηλεκτρόνια του NADH εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q. Αρχικά, το NADH προσδένεται στο σύμπλοκο και πραγματοποιείται μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στην ομάδα του φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FMN) του συμπλόκου, το οποίο βρίσκεται στην κορυφή του υδρόφιλου βραχίονα, σχηματίζοντας έτσι την ανηγμένη του μορφή. Από εκεί τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε μια σειρά από 7 σύμπλοκα σιδήρου-θείου τα οποία εκτείνονται σε μια απόσταση περίπου 90 Å έως την ουβικινόνη που βρίσκεται στον θύλακα σύνδεσης που σχηματίζεται από τις υπομονάδες NU1M, NDUFV2 και NDUFV7 στη βάση του υδρόφιλου βραχίονα (13)

Στον μεμβρανικό βραχίονα στη συνέχεια, εντοπίζονται 4 δομικά μοτίβα και είναι πιθανόν να μεταφέρουν ένα πρωτόνιο το καθένα ανά καταλυτικό κύκλο, από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Ο μηχανισμός άντλησης πρωτονίων δε χωρίζεται μόνο χωρικά αλλά πραγματοποιείται και με αξιοσημείωτη χρονική διαφορά. Βέβαια, ο ακριβής μηχανισμός της σύζευξης μεταξύ της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της άντλησης πρωτονίων εξακολουθεί να είναι η λιγότερο κατανοητή πτυχή του συμπλόκου I (10).

Η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο Q οδηγεί στον σχηματισμό του, τα αρνητικά φορτία του οποίου αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα του υδρόφιλου βραχίονα οδηγώντας σε αλλαγές οι οποίες αλλάζουν τις δομές των ελίκων και οδηγούν στην άντληση 4 ιόντων υδρογόνου. Τέλος, το Q<sup>2</sup> δέχεται δύο πρωτόνια από τη μήτρα και σχηματίζεται το QH<sub>2</sub> εγκαταλείποντας το ενζυμικό σύμπλοκο για τη δεξαμενή Q

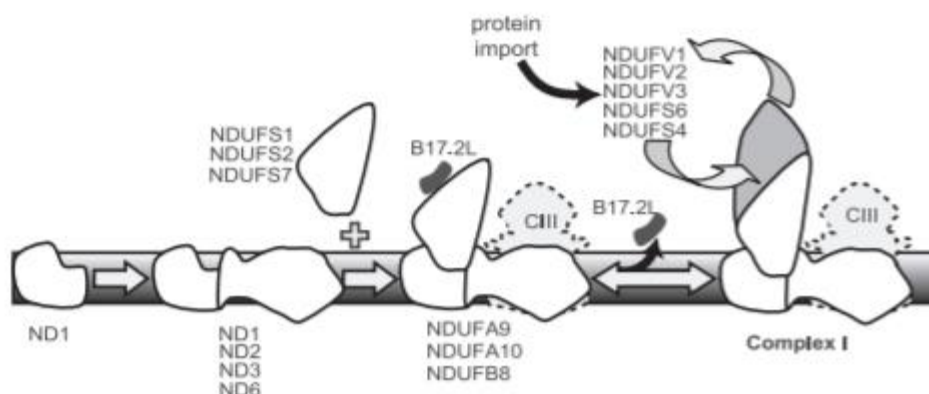
Συνολικά, το σύμπλοκο με βάση τα λειτουργικά του χαρακτηριστικά χωρίζεται σε τρία μέρη. Ο υδρόφιλος βραχίονας αποτελεί το στοιχείο Q (Q module) και N (N module) τα οποία αποτελούν δύο από τα 3 λειτουργικά μέρη του συμπλόκου. Το στοιχείο N αποτελείται από τις υπομονάδες NDUFV1, NDUFV1 και NDUFV2 και είναι το σημείο εισαγωγής των ηλεκτρονίων από το NADH στην αναπνευστική αλυσίδα. Το στοιχείο Q δομείται από τις υπομονάδες NDUFV2, NDUFV3, NDUFV7, NDUFV8 και δέχεται τα ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα σιδήρου θείου του στοιχείου N

και τα μεταφέρει στην ουβικινόνη. Τέλος, οι υπόλοιπες 7 υπομονάδες του πυρήνα του συμπλόκου δομούν το στοιχείο P, το οποίο περιλαμβάνει το μεμβρανικό βραχίονα και αποτελεί την περιοχή άντλησης των πρωτονίων στο σύμπλοκο (Πίνακας 3) (16).

Η *de novo* σύνθεση του συμπλόκου I πραγματοποιείται μέσω της συναρμολόγησης ενδιάμεσων συμπλόκων. Αρχικά, η NUM1 υπομονάδα η οποία κωδικοποιείται από το μιτοχondριακό γονιδίωμα ενώνεται με άλλες υπομονάδες είτε από το πυρηνικό είτε από το μιτοχondριακό γονιδίωμα, όπως η NDUFS2 και NDUFS7 και σχηματίζουν ενδιάμεσα σύμπλοκα συναρμολόγησης. Επίσης τα NDUFS4 και NDUFS6 απαιτούνται για τη συναρμολόγηση και τη σταθεροποίηση ενός τμήματος του συμπλόκου I που περιέχει έναν αριθμό υπομονάδων, συμπεριλαμβανομένων των NDUFV1, NDUFV2 και NDUFV3 (Εικόνα 10) (15).

Πίνακας 3 Οι κύριες υπομονάδες του συμπλόκου I σε διαφορετικούς οργανισμούς (16)

<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>T. thermophilus</i>	<i>P. denitrificans</i>	<i>E. coli</i>	comment	module
NDUFS1	75-kDa	NUAM	Nqo3	Nqo3	NuoG	2 [4Fe4S] 1 [2Fe2S]	N
NDUFV1	51-kDa	NUBM	Nqo1	Nqo1	NuoF	FMN; NADH; [4Fe4S]	N
NDUFS2	49-kDa	NUCM	Nqo4	Nqo4	NuoD	Q-binding	Q
NDUFS3	30-kDa	NUGM	Nqo5	Nqo5	NuoC		Q
NDUFV2	29-kDa	NUHM	Nqo2	Nqo2	NuoE	[2Fe2S]	N
NDUFS8	TYKY	NUIM	Nqo9	Nqo9	NuoI	2 [4Fe4S]	Q
NDUFS7	PSST	NUKM	Nqo6	Nqo6	NuoB	Q-binding; [4Fe4S]	Q
NU1M	ND1	NU1M	Nqo8	Nqo8	NuoH	mtDNA <sup>a</sup>	P <sub>P</sub>
NU2M	ND2	NU2M	Nqo14	Nqo14	NuoN	mtDNA	P <sub>P</sub>
NU3M	ND3	NU3M	Nqo7	Nqo7	NuoA	mtDNA	P <sub>P</sub>
NU4M	ND4	NU4M	Nqo13	Nqo13	NuoM	mtDNA	P <sub>D</sub>
NU5M	ND5	NU5M	Nqo12	Nqo12	NuoL	mtDNA	P <sub>D</sub>
NU6M	ND6	NU6M	Nqo10	Nqo10	NuoJ	mtDNA	P <sub>P</sub>
NULM	ND4L	NULM	Nqo11	Nqo11	NuoK	mtDNA	P <sub>P</sub>



Εικόνα 10 σχηματική αναπαράσταση της συναρμολόγησης του συμπλόκου I (15)

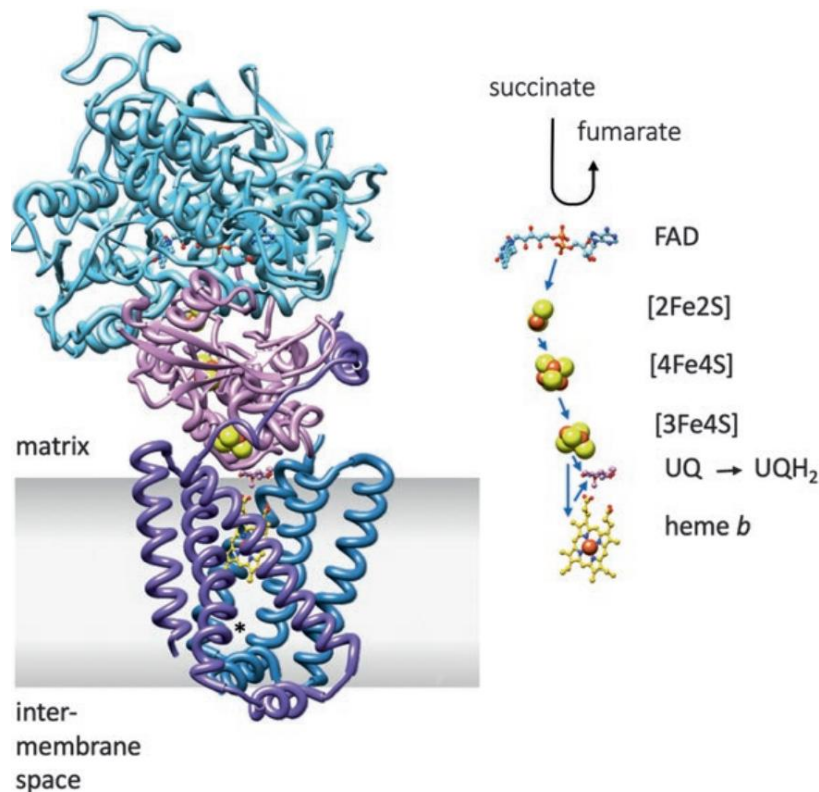
## Σύμπλοκο II (αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικό-O)

Το σύμπλοκο δύο είναι ένα ενδογενές ένζυμο το οποίο συναντάται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχondρίων. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας τα οποία εμφανίζουν επιπρόσθετες υπομονάδες στους ευκαρυώτες, το σύμπλοκο II έχει την ίδια σύσταση

στα μιτοχόνδρια και στους προκαρυώτες. Αποτελείται από δύο υδρόφιλες πρωτεΐνες, μια φλαβοπρωτεΐνη (Fr) που περιέχει έναν συμπαράγοντα FAD και μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου (Ir) καθώς και μια περιοχή αγκυροβόλησης στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, CybL και CybS, με μία ομάδα αίμης ενωμένη. Η επικράτεια της μεμβράνης είναι λιγότερο συντηρημένη από τις καταλυτικές υπομονάδες και μπορεί να αποτελείται από μία ή δύο πρωτεΐνες με μία, δύο ή καμία ομάδα αίμης. Η 68-kDa φλαβοπρωτεΐνη έχει αναδίπλωση Rossmann και περιέχει συμπαράγοντα FAD, ο δέκτης ηλεκτρονίων για το ηλεκτρικό. Η 29-kDa Ir πρωτεΐνη περιέχει τρία σύμπλοκα σιδήρου-θείου, ένα [2Fe-2S], [4Fe-4S] και [3Fe-4S], και αποτελεί τον πυρήνα του συμπλόκου. Συνδέεται με το Fr στη μία πλευρά και με τις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης της μεμβράνης στην άλλη. Όλες οι υπομονάδες του συμπλόκου κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA (Εικόνα 11) (13, 17).

Όσον αφορά τη συναρμολόγηση του συμπλόκου οι υπομονάδες προετοιμάζονται ξεχωριστά για την συνένωση με τη μεσολάβηση ειδικών πρωτεϊνών συνοδών. Για να είναι λειτουργικό το σύμπλοκο πρέπει να έχουν συναρμολογηθεί όλες οι υπομονάδες του (18).

Το σύμπλοκο II αποτελεί το σημείο εισόδου του FADH<sub>2</sub> στην αναπνευστική αλυσίδα. Το FADH<sub>2</sub> παράγεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος κατά την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό, αντίδραση η οποία καταλύεται από την ηλεκτρική αφυδρογονάση. Τα ηλεκτρόνια από το FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται σε κέντρα σιδήρου θείου και εν τέλη στην ουβικινόνη. Το σύμπλοκο II σε αντίθεση με τα άλλα τρία σύμπλοκα δεν αποτελεί αντλία πρωτονίων, συνεπώς κατά την μεταφορά των ηλεκτρονίων του FADH<sub>2</sub> στην QH<sub>2</sub> δεν μεταφέρονται πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο. Παράγεται έτσι λιγότερο ATP από την οξείδωση του FADH<sub>2</sub> σε σύγκριση με την οξείδωση του NADH. Τα ηλεκτρόνια από την QH<sub>2</sub> μεταφέρονται έπειτα στο σύμπλοκο III (Εικόνα 11) (13).



Εικόνα 11 Η δομή (αριστερά) του συμπλόκου II και η πορεία των ηλεκτρονίων (δεξιά) στο εσωτερικό του (13)

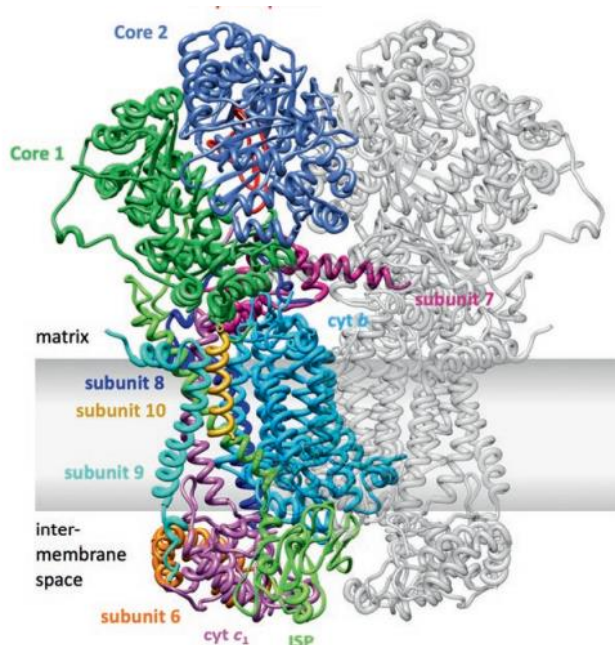
### Σύμπλοκο III (την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c)

Το σύμπλεγμα III είναι ένα συμμετρικό διμερές, με τρεις υπομονάδες που είναι υψηλά συντηρημένες από βακτήρια σε θηλαστικά και αποτελούν τον πυρήνα του συμπλόκου (Εικόνα 12). Οι συντηρημένες, καταλυτικά ενεργές υπομονάδες είναι το κυτόχρωμα b (cyt b), με δύο μόρια αίμης τύπου b (bL και bH χαμηλής και υψηλής συγγένειας αντίστοιχα) και το κυτόχρωμα c1 (cyt c1), με ένα μόριο αίμης τύπου c. Η προσθετική ομάδα αίμης των κυτοχρωμάτων είναι μια σιδηροπορφυρίνη IX. Το Cyt b είναι η μόνη πρωτεΐνη του συμπλόκου III η οποία κωδικοποιείται από το μιτοχondριακό γονιδίωμα και φιλοξενεί δύο ξεχωριστές θέσεις δέσμευσης της ουβικινόνης στις αντίθετες πλευρές της μεμβράνης (Q<sub>0</sub> και Q<sub>i</sub>) (19). Συντηρημένη είναι επίσης και μια πρωτεΐνη σιδήρου θείου, η UQCRFS1 (ISP) με ένα κέντρο 2Fe-2S που ονομάζεται κέντρο Rieske (13). Το ένα ιόν σιδήρου του κέντρου Rieske σχηματίζει σύμπλοκο συναρμογής με δύο αμινοξέα ιστιδίνης σταθεροποιώντας κατά αυτόν τον τρόπο το κέντρο στην ανοιχτή μορφή του. Συνεπώς αυξάνεται το αναγωγικό δυναμικό του έτσι ώστε να μπορεί να δεχθεί πιο εύκολα ηλεκτρόνια από το QH<sub>2</sub>. Εκτός από τις τρεις καταλυτικές υπομονάδες υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός υπομονάδων οι οποίες δεν συμμετέχουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων αλλά ούτε και στην άντληση πρωτονίων. Ο ρόλος τους αφορά στην συναρμολόγηση, σταθερότητα και ρύθμιση της ενεργότητας του συμπλόκου (10, 20).

Αναλυτικότερα το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων b και c1 σχηματίζει μια δομή με μέγεθος περίπου 140 kDa στα θηλαστικά και 13 πεπτιδικές αλυσίδες που οργανώνονται σε 11 υπομονάδες. Το

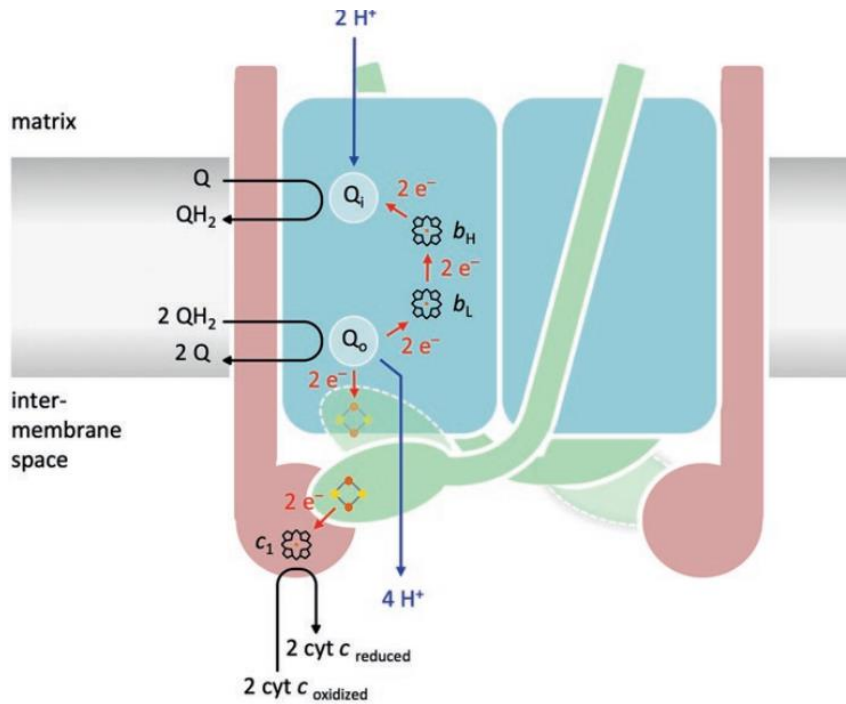


σύμπλοκο εμφανίζεται ως ένα ομοδιμερές σε σχήμα αχλαδιού όμως όσον αφορά τη λειτουργικότητα του εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο εάν τα μονομερή λειτουργούν συνεργατικά ή ανεξάρτητα (Εικόνα 12) (14).



Εικόνα 12 Η δομή του συμπλόκου III (13)

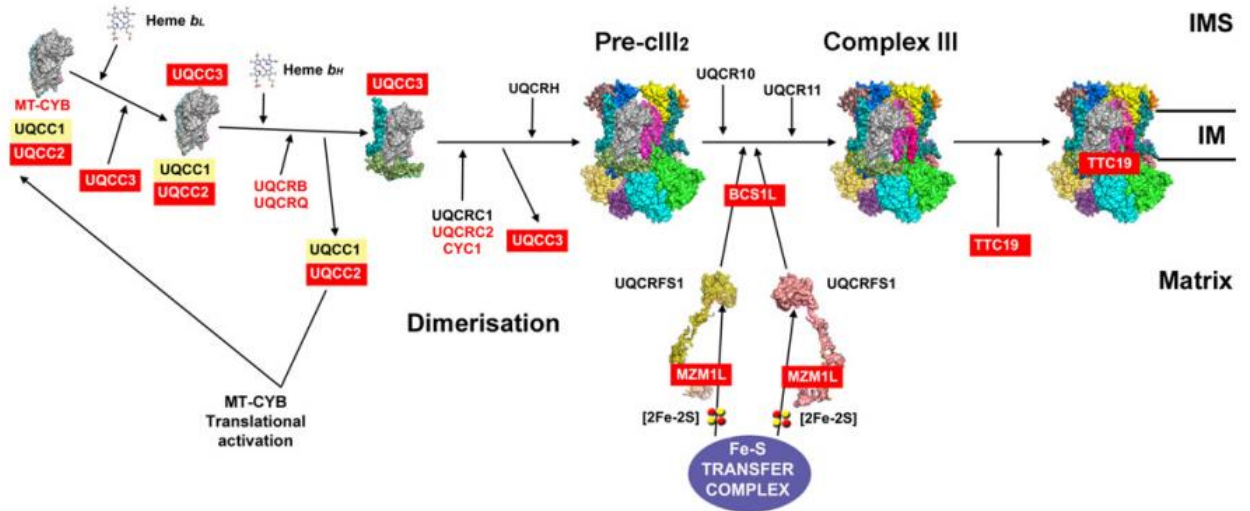
Τα μόρια ουβικινόλης που παρήχθησαν από τα σύμπλοκα I και II προωθούνται στο κυτόχρωμα c που είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη στο κυτόχρωμα c πραγματοποιείται από το σύμπλοκο III. Ο μηχανισμός αρχικά περιλαμβάνει την διαδοχική πρόσδεση δύο μορίων QH<sub>2</sub> στο σύμπλοκο. Κατά την πρόσδεση αυτή απελευθερώνονται δύο πρωτόνια στον διαμεμβρανικό χώρο και δύο ηλεκτρόνια. Το QH<sub>2</sub> προσδένεται στην πρώτη θέση σύνδεσης του κυτοχρώματος b (Q<sub>0</sub>) και τα ηλεκτρόνια ακολουθούν δύο διαφορετικές κατευθύνσεις. Στο πρώτο ήμισυ του κύκλου ένα ηλεκτρόνιο κατευθύνεται προς το κέντρο Rieske, έπειτα στο κυτόχρωμα c1 και τελικά προς ένα μόριο κυτοχρώματος c μετατρέποντας το στην ανηγμένη του μορφή. Το μόριο αυτό μπορεί να απομακρυνθεί από το ένζυμο συνεχίζοντας την πορεία του στην αναπνευστική αλυσίδα. Το δεύτερο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται μέσω της ομάδας αίμης του κυτοχρώματος b στη δεύτερη θέση σύνδεσης (Q<sub>i</sub>) και σχηματίζεται ένα ανιόν ρίζας ημικινόνης. Στο δεύτερο ήμισυ του κύκλου ένα δεύτερο μόριο QH<sub>2</sub> μεταφέρει το ένα ηλεκτρόνιο σε ένα άλλο μόριο κυτοχρώματος c και το άλλο ηλεκτρόνιο χρησιμοποιείται για την αναγωγή της ημικινόνης σε QH<sub>2</sub> με την πρόσληψη και δύο πρωτονίων. Η δεύτερη αυτή μεταφορά ηλεκτρονίων οδηγεί στην άντληση δύο πρωτονίων από τη μήτρα (Εικόνα 13) (10,13).



Εικόνα 13 Ο μηχανισμός της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο III (13)

Η συναρμολόγηση ξεκινά με τη σύνθεση του κυτοχρώματος b (MT-CYB στον άνθρωπο) από το μιτοχονδριακό ριβόσωμα και τη μεταφορά του στην εσωτερική μεμβράνη, με τη μεσολάβηση των Cbr3/UQCC1 και Cbr6/UQCC2. Μόλις ενσωματωθούν οι πρώτες δομικές υπομονάδες (UQCRB και UQCRQ), οι παράγοντες UQCC1-UQCC2 αποσυνδέονται και επιστρέφουν για να λειτουργήσουν ως μεταφραστικοί ενεργοποιητές του κυτοχρώματος b. Έπειτα στο σύμπλοκο που προέκυψε προστίθενται και οι υπομονάδες CYC1, UQCRH, UQCRC2 και UQCRC1 και πραγματοποιείται διμερισμός. Μετά τον διμερισμό προστίθεται η υπομονάδα UQCR10. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ωρίμανση του συμπλόκου η οποία συμβαίνει με την προσθήκη της πρωτεΐνης Rieske Fe-S (UQCRFS1) και της μικρότερης υπομονάδας (UQCR11) στο διμερές πρόδρομο σύμπλοκο III που έχει ήδη σχηματιστεί. Μετά την εισαγωγή στα μιτοχόνδρια, το UQCRFS1 δεσμεύεται και σταθεροποιείται στη μήτρα από τον παράγοντα LYRM7. Η ενσωμάτωση του UQCRFS1 στο πρόδρομο σύμπλοκο III μεσολαβείται από Bcs1. Το στάδιο αυτό θεωρείται κρίσιμο για την καταλυτική ενεργοποίηση του συμπλόκου. Τέλος, προστίθεται στο σύμπλοκο και η τελευταία υπομονάδα UQCR11 (Εικόνα 14) (18).



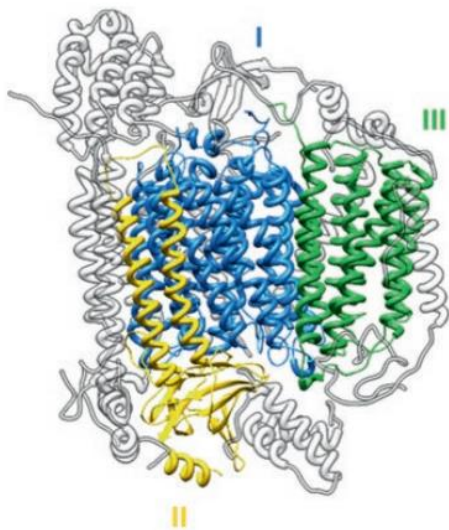


Εικόνα 14 Η συναρμολόγηση του συμπλοκου III (18)

### Σύμπλοκο IV (οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος c)

Το σύμπλοκο IV δομείται από 14 υπομονάδες στα θηλαστικά, τρεις από τις οποίες κωδικοποιούνται από το μιτοχondριακό γονιδίωμα. Αυτές είναι οι υπομονάδες I, II, III και συναντώνται επίσης και στο βακτηριακό ένζυμο. Η υπομονάδα I, βρίσκεται κυρίως στη διαμεμβρανική περιοχή, αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες χωρίς μεγάλο εξωμεμβρανικό μέρος ενώ περιέχει τρεις από τους τέσσερις συμπράγοντες του συμπλόκου, δύο ομάδες αίμης ( $\alpha$ ,  $\alpha_3$ ) και ένα ιόν χαλκού CuB. Ο τέταρτος συμπράγοντας αποτελείται από δύο ιόντα χαλκού CuA και συναντάται στην υπομονάδα II. Η υπομονάδα αυτή είναι αγκυροβολημένη στη μεμβράνη μέσω δύο διαμεμβρανικών ελίκων και διαθέτει και μια περιοχή στον διαμεμβρανικό χώρο στην οποία προσδένεται το κυτόχρωμα C. Η υπομονάδα III διαθέτει επτά διαμεμβρανικές έλικες, σταθεροποιεί τις άλλες δύο επικράτειες και δρα σαν αρχικός αποδέκτης πρωτονίων (Εικόνα 15).

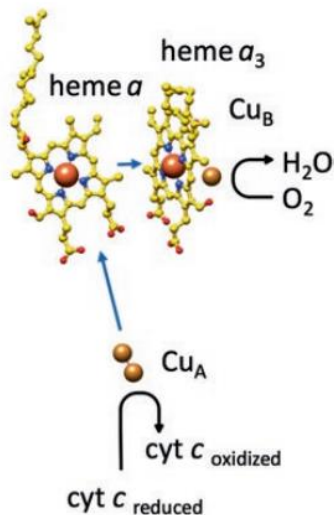
Πέραν των βασικών υπομονάδων το σύμπλοκο διαθέτει και βοηθητικές υπομονάδες οι οποίες καταστέλλουν έντονα τη δραστηριότητα του και έχουν θεμελιώδη ρόλο στη ρύθμιση. Η υπομονάδα IV είναι η μεγαλύτερη από τις βοηθητικές υπομονάδες και δεσμεύει το ATP, όντας υπεύθυνη για την αλλοστερική αναστολή του συμπλόκου εξαρτώμενη από ATP όταν η αναλογία ATP/ADP είναι υψηλή (13, 21).



Εικόνα 15 Η δομή του συμπλόκου IV (13)

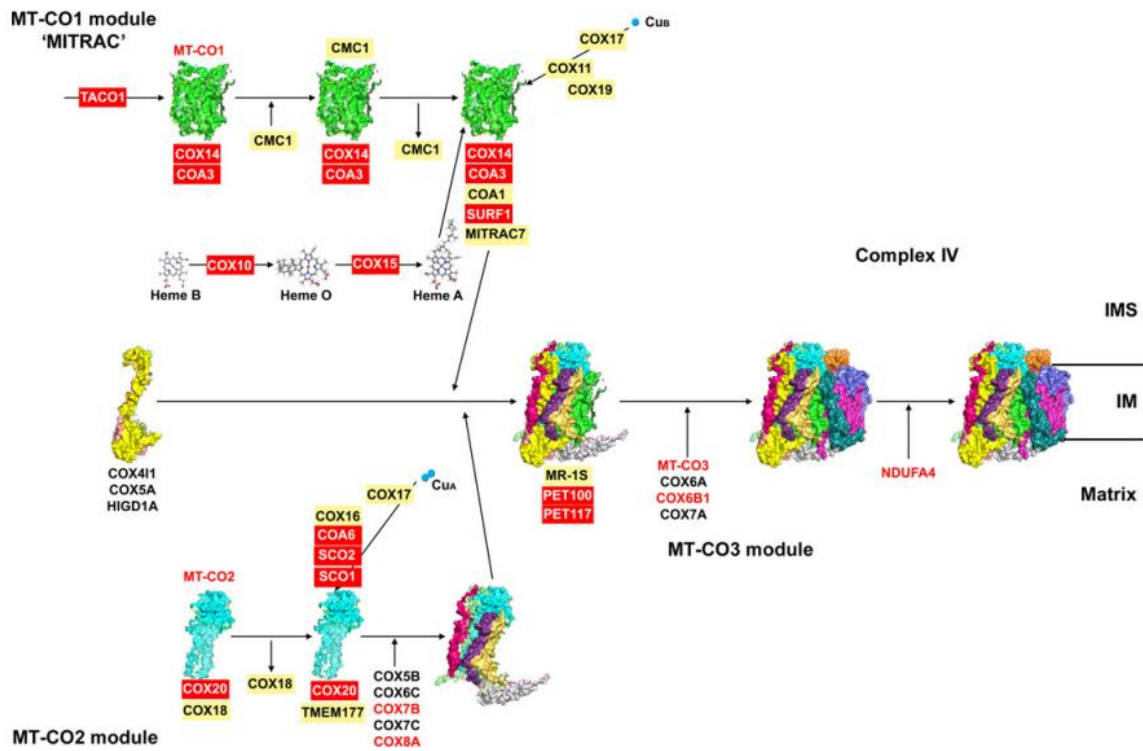
Το σύμπλοκο IV αποτελεί το τελευταίο συγκρότημα άντλησης πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας και είναι αυτό που επιτελεί την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα c στο μοριακό οξυγόνο (τελικό αποδέκτης). Για την πλήρη αναγωγή του οξυγόνου σε  $H_2O$  απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια ενώ η απαίτηση για μοριακό οξυγόνο σε αυτή την αντίδραση είναι αυτό που καθιστά τους οργανισμούς αερόβιους.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης τέσσερα μόρια κυτοχρώματος c προσδένονται διαδοχικά στο σύμπλοκο και το καθένα μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο. Αρχικά, δύο μόρια ανηγμένου κυτοχρώματος c μεταφέρουν διαδοχικά δύο ηλεκτρόνια, ένα στην αίμη  $a_3$  και ένα στο ιόν χαλκού CuB. Τα δύο κέντρα ανάγονται και είναι σε θέση να δεσμεύσουν ένα μόριο  $O_2$ , το οποίο με την πρόσδεση του σχηματίζει μια γέφυρα υπεροξειδίου. Έπειτα, δύο ακόμα μόρια ανηγμένου κυτοχρώματος c προσδένονται στην οξειδάση ακολουθώντας την ίδια πορεία και σε συνδυασμό με την άντληση δύο πρωτονίων διασπάται η γέφυρα υπεροξειδίου. Τέλος, η προσθήκη άλλων δύο πρωτονίων οδηγεί στην απελευθέρωση δύο μορίων ύδατος. Και τα τέσσερα πρωτόνια της αντίδρασης προέρχονται από την μιτοχονδριακή μήτρα, συνεισφέροντας έτσι στη βαθμίδωση της συγκέντρωσης πρωτονίων στις δυο πλευρές της μεμβράνης (Εικόνα 16) (10).



Εικόνα 16 Η πορεία των ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο IV (13)

Η συναρμολόγηση ξεκινά από το σύμπλεγμα I (MT-CO1) το οποίο αποτελεί τον κεντρικό κορμό γύρω από τον οποίο πρόκειται να σχηματιστεί το σύμπλοκο. Στη συναρμολόγηση του συμπλόκου συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες συνοδοί και παράγοντες συναρμολόγησης η οποίοι συμβάλλουν στην ωρίμανση και σταθεροποίηση του και είναι γνωστοί ως «MITRAC». Αρχικά, συνενώνονται οι υπομονάδες COX4I1 και COX5A και ακολούθως ο παράγοντας συναρμολόγησης CMC1 δεσμεύει και τις υπομονάδες COA3 COX14 και τις ενσωματώνει στο σύμπλοκο. Για την βιοσύνθεση της αίμης απαιτούνται οι υπομονάδες COX10 και COX15 ενώ για την ενσωμάτωση του κέντρου Cu<sub>B</sub> συμμετέχουν οι υπομονάδες COX11, COX17 και COX19. Στο σύμπλοκο II (MT-CO2) συναρμολογούνται οι υπομονάδες COX20, COX5B, COX6C, COX7C, COX8A και COX7B με τη συμβολή του παράγοντα συναρμολόγησης COX18. Για την ενσωμάτωση του κέντρου Cu<sub>A</sub> στο σύμπλοκο II συμμετέχουν οι παράγοντες δέσμευσης χαλκού COX17, SCO1 και SCO2 μαζί με COA6 και COX16. Τα σύμπλοκα I και II στη συνέχεια συναρμολογούνται μεταξύ τους ενώ τελευταίο ενώνεται το σύμπλοκο III (MT-CO3) μαζί με την πρωτεΐνη NDUFA4, που αρχικά θεωρήθηκε μέρος του συμπλόκου I (Εικόνα 17) (18).



Εικόνα 17 Σχηματική αναπαράσταση της συναρμολόγησης του συμπλόκου IV (18)

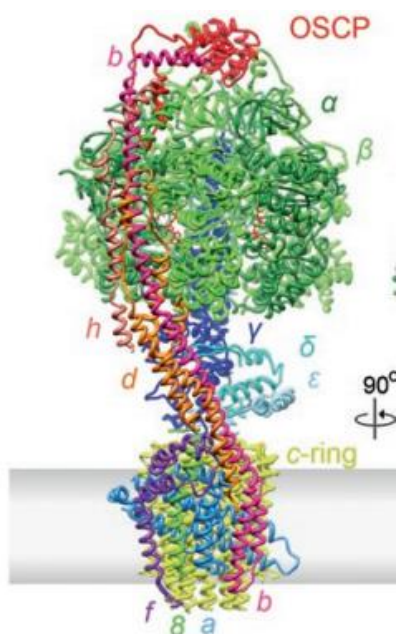
### 1.3.6 Σύνθεση ATP-Σύμπλοκο V

Μετά την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το NADH και FADH<sub>2</sub> στο μοριακό οξυγόνο το επόμενο βήμα για την παραγωγή ενέργειας είναι η σύνθεση ATP. Η ενέργεια η οποία αποθηκεύεται στη βαθμίδωση των πρωτονίων στις δυο πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP από ADP. Στο στάδιο αυτό, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στη μήτρα είναι λιγότερα από αυτά στο διαμεμβρανικό χώρο και για αυτό το λόγο έχουν την τάση να μετακινηθούν προς τη μήτρα ώστε να εξισωθούν οι συγκεντρώσεις εκατέρωθεν της μεμβράνης. Αυτή η ροή των ηλεκτρονίων είναι που πυροδοτεί το σύμπλοκο συνθάσης του ATP (10).

Η ATP συνθάση είναι ένα μεγάλο πολύπλοκο ένζυμο το οποίο χωρίζεται σε δύο επικράτειες (F<sub>0</sub> και F<sub>1</sub>). Το τμήμα F<sub>1</sub> είναι το καταλυτικό κέντρο, που αποτελείται από μια εναλλασσόμενη διάταξη τριών α και τριών β υπομονάδων, διατεταγμένων γύρω από την γ υπομονάδα. Οι α και β υπομονάδες είναι ομόλογες και έχουν την ίδια αναδίπλωση, αλλά μόνο η β υπομονάδα είναι καταλυτική. Έκτος από τις τρεις υπομονάδες το F<sub>1</sub> διαθέτει και τις υπομονάδες δ και ε η οποίες συμμετέχουν στη σύνδεση με την F<sub>0</sub>. Το τμήμα F<sub>0</sub> είναι μια υδρόφοβη επικράτεια η οποία διασχίζει την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το τμήμα αυτό αποτελεί τον διάυλο πρωτονίων και δομείται από 8 έως 14 υπομονάδες c. Επιπλέον υπάρχει και μια υπομονάδα a, η οποία βρίσκεται εξωτερικά του διαύλου. Η σύνδεση των δύο τμημάτων (F<sub>1</sub>, F<sub>0</sub>) πραγματοποιείται από τον κεντρικό μίσχο των υπομονάδων γ, ε και εξωτερικά μέσω δυο υπομονάδων b και δ του τμήματος F<sub>1</sub> (Εικόνα 18) (13).

Όλες οι υπομονάδες του συμπλόκου συμμετέχουν στην παραγωγή ATP. Σε κατάσταση ηρεμίας, όταν δηλαδή δεν υπάρχει διαβάθμιση πρωτονίων, ίσες περίπου ποσότητες ATP, ADP είναι προσδεμένες στο καταλυτικό κέντρο. Συνεπώς ο ρόλος της βαθμίδωσης της συγκέντρωσης πρωτονίων δε είναι η σύνθεση ATP αλλά η απελευθέρωση του από τη συνθήση. Το ένζυμο μπορεί να χωριστεί σε δύο λειτουργικές συνιστώσες. Την μονάδα που περιστρέφεται και η οποία αποτελείται από το δακτύλιο c και τον μίσχο αγ και την στατική μονάδα που περιέχει όλες τις άλλες υπομονάδες. Τα καταλυτικά κέντρα του ενζύμου είναι τρία και συγκεκριμένα οι τρεις β υπομονάδες οι οποίες αποτελούν μια διαφορετική καταλυτική λειτουργία ανά πάσα στιγμή. Η γ υπομονάδα που βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά των τριών β υπομονάδων περιστρέφεται αλλάζοντας την διαμόρφωση των τελευταίων. Στην στερεοδιαμόρφωση L (loose) δεσμεύεται ADP και Pi, στην στερεοδιαμόρφωση T (tight) η β υπομονάδα εμφανίζει πολύ υψηλή συγγένεια για το ATP που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση του από το ADP και Pi της προηγούμενης στερεοδιαμόρφωσης. Τέλος, στη στερεοδιαμόρφωση O (open) το ενεργό κέντρο έχει την ικανότητα να προσδένει και να απελευθερώνει νουκλεοτίδια αδενίνης.

Καταλήγοντας, η βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων και κατά συνέπεια η επιστροφή αυτών στην μιτοχονδριακή μήτρα, δημιουργεί την κινητήρια δύναμη για την περιστροφή της κινούμενης μονάδας η οποία με τη σειρά της επάγει τη σύνθεση ATP στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το σύμπλοκο V αποτελεί τον πιο μικροσκοπικό μοριακό κινητήρα που γνωρίζουμε (10, 13).



Εικόνα 18 Η δομή του συμπλόκου V (13)

### 1.3.7 Δημιουργία υπερσυμπλόκων

Τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας δομές υψηλότερης τάξης, οι οποίες έχουν ονομαστεί υπερσύμπλοκα. Τα υπερσύμπλοκα που προκύπτουν εμφανίζουν διάφορες στοιχειομετρίες. Τα σύμπλοκα I, III, IV είναι αυτά που συμμετέχουν κατά κύριο λόγο στη δημιουργία των υπερσυμπλόκων ενώ τα σύμπλοκα II και V δομούν ολιγομερή χωρίς αλληλεπίδραση με τα άλλα σύμπλοκα.

Η συναρμολόγηση των υπερσυμπλόκων μπορεί να εξηγηθεί με δύο πιθανούς μηχανισμούς. Ο πρώτος πιθανολογεί ότι τα επιμέρους σύμπλοκα συναρμολογούνται πλήρως προτού ενωθούν και σχηματίσουν τα υπερσύμπλοκα. Αυτός ο τρόπος δράσης θα επιτρέψει τη δυναμική συναρμολόγηση-διάσπαση των επιμέρους συμπλόκων για προσαρμογή στις διαφορετικές ενεργειακές απαιτήσεις. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποδεικνύουν την ταυτόχρονη συναρμολόγηση και δημιουργία υπερσυμπλόκων από τα διάφορα επιμέρους ένζυμα πριν από την ολοκλήρωση του σχηματισμού του κάθε συμπλόκου ξεχωριστά. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός πως η ωρίμανση του συμπλόκου I δεν ολοκληρώνεται αν δεν δεσμευτούν πρώτα τα σύμπλοκα III και IV σε ένα πρόδρομο σύμπλοκο. Επίσης, έχουν βρεθεί ατελώς συναρμολογημένα σύμπλοκα σε ιστούς από ασθενείς που μεταφέρουν μεταλλάξεις σε διαφορετικές δομικές υπομονάδες και παράγοντες συναρμολόγησης που εμπλέκονται στα τελευταία στάδια της συναρμολόγησης των συμπλόκων I και III (18).

## 1.4 Το Γονιδίωμα των τελεόστεων

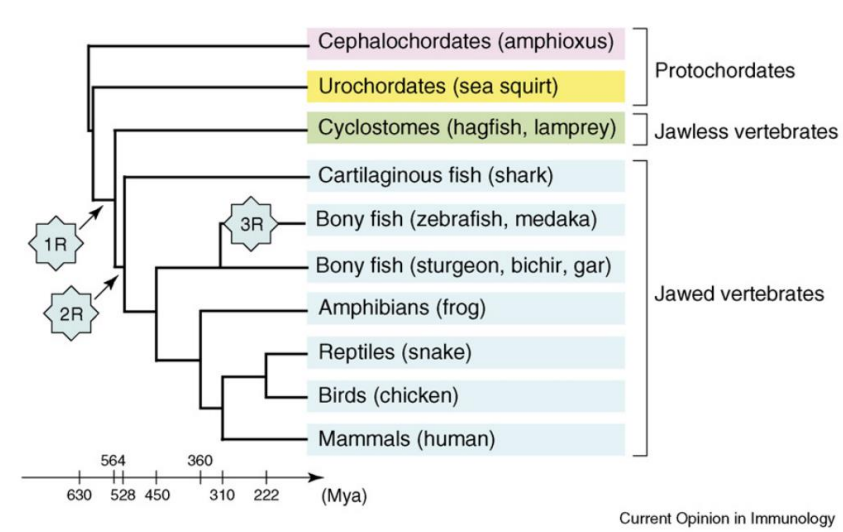
### 1.4.1 Οι τρεις γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος των τελεόστεων

Η τσιπούρα ταξινομικά ανήκει στους τελεόστεους στους οποίους έχουν πραγματοποιηθεί τρεις γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος. Η ιδέα για τον διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος προτάθηκε από τον Susumu Ohno και βασίστηκε κυρίως στη σύγκριση του μέγεθος του γονιδιώματος και των καρυότυπων σε διάφορους οργανισμούς, καθώς και η παρατήρηση ότι τα τετραπλοειδή είδη απαντώνται φυσικά σε ψάρια και αμφίβια (22, 26).

Ο πρώτος και ο δεύτερος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD) χαρακτηρίζονται ως 2R υπόθεση (2 Round hypothesis). Η υπόθεση 2R υποθέτει δύο γύρους WGD μετά την εμφάνιση των ουροχορδωτών και πριν από την εξάπλωση των γναθόστομων σπονδυλωτών στην αρχή της εξέλιξης των δευτεροστόμιων. Η επικρατούσα μορφή της υπόθεσης τοποθετεί τον πρώτο γύρο του WGD στο κοινό πρόγονο μεταξύ γναθόστομων και άγναθων σπονδυλωτών και το δεύτερο γύρο σε έναν κοινό πρόγονο των γναθόστομων σπονδυλωτών (Εικόνα 19).

Στοιχεία που επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση είναι η ύπαρξη συμπλεγμάτων (clusters) παράλογων γονιδίων σε περισσότερα από δύο χρωμοσώματα στα γονιδιώματα των γναθόστομων, ενώ τα γονιδιώματα των ουροχορδωτών περιέχουν μόνο ένα σύμπλεγμα των αντίστοιχων ομόλογων γονιδίων. Για παράδειγμα, το κεφαλοχορδωτό *Amphioxus* έχει ένα μόνο σύμπλεγμα HOX γονιδίων ενώ η ανθρώπινη οικογένεια γονιδίων HOX απαντάται σε τέσσερα συμπλέγματα, με το καθένα να συναντάται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (22).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν συσσωρευτεί στοιχεία ότι πολλά ψάρια έχουν ακόμα περισσότερα γονίδια από τους ανθρώπους γεγονός που οφείλεται στον διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος στην γενεαλογία των τελεόστεων και χαρακτηρίζεται ως ο τρίτος γύρος διπλασιασμού (3R). Ο διπλασιασμός αυτός χρονολογείται 350 εκατομμύρια χρόνια πριν στην αρχή της γενεαλογίας των τελεόστεων. Ο τρίτος γύρος διπλασιασμού οδήγησε αρχικά στην ύπαρξη οκτώ αντιγράφων κάθε γονιδίου συγκριτικά με το προγονικό γονιδίωμα των δευτεροστόμων. Στοιχεία που επιβεβαιώνουν την υπόθεση αυτή προκύπτουν από την μελέτη των γονιδίων HOX. Διπλασιασμός στα συμπλέγματα των γονιδίων HOX ανακαλύφθηκαν στο ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*), στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) και στο *Takifugu rubripes*, δεδομένα που υποδηλώνουν τον διπλασιασμό του γονιδιώματος στην αρχή της γενεαλογίας των τελεόστεων (23).



Εικόνα 19 Χρονική αναπαράσταση των διπλασιασμών του συνόλου του γονιδιώματος των σπονδυλωτών (WGD) (22)

#### 1.4.2 Οι επιπτώσεις των γύρων διπλασιασμού στο γονιδίωμα

Είναι προφανές ότι ο διπλασιασμός γονιδίων είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία πολυπλοκότητας και ότι οι WGD παρέχουν μεγάλες ποσότητες «πρώτων υλών» για εξελικτική προσαρμογή. Ωστόσο, είναι λιγότερο σαφές εάν ο WGD των τελεόστεων συνδέεται άμεσα με την εξελικτική επιτυχία και την εξάπλωση τους. Πρόσφατες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο WGD των τελεόστεων ήταν σημαντικός για τη δημιουργία ευελιξίας και είναι πιθανόν να



παρείχε στους τελεόστεους δυνατότητες διαφοροποίησης οι οποίες μπορεί να είναι αποτελεσματικές κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικών αλλαγών (24).

Ο διπλασιασμός του γονιδιώματος σημαίνει και κατ' επέκταση διπλασιασμός στο σύνολο των γονιδίων και των ρυθμιστικών περιοχών αυτού. Ο διπλασιασμός συμβαίνει σε ένα άτομο και μπορεί να διορθωθεί ή να χαθεί στον πληθυσμό, όπως μια σημειακή μετάλλαξη. Εάν ένα νέο αλληλόμορφο που περιέχει διπλά γονίδια είναι επιλεκτικά ουδέτερο, σε σύγκριση με τα προϋπάρχοντα αλληλόμορφα, εμφανίζει πολύ μικρή πιθανότητα να σταθεροποιηθεί σε διπλοειδή πληθυσμό. Αυτό υποδηλώνει ότι πολλά διπλά γονίδια θα χαθούν. Για αυτά όμως τα οποία θα παραμείνουν στον πληθυσμό η διαδικασία σταθεροποίησης είναι χρονοβόρα (25).

Τα διπλασιασμένα γονίδια που προκύπτουν ορίζονται ως παράλογα και η μοίρα τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης δεν είναι προκαθορισμένη: ένα από τα διπλασιασμένα γονίδια μπορεί να χαθεί και να χάσει τη λειτουργικότητά του, ή και τα δύο διπλασιασμένα γονίδια μπορεί να διατηρηθούν ουσιαστικά αμετάβλητα, ή και τα δύο διπλασιασμένα γονίδια μπορεί να αποκτήσουν αλλαγές έτσι ώστε η λειτουργία του προγονικού γονιδίου διαιρείται μεταξύ των διπλότυπων γονιδίων ή και τέλος ένα από τα διπλασιασμένα γονίδια μπορεί να αποκτήσει νέα λειτουργία (Εικόνα 20) (24).

#### *Απώλεια λειτουργίας του διπλασιασμένου γονιδίου*

Η αντιγραφή γονιδίων δημιουργεί λειτουργικό πλεονασμό και στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν συμφέρει να έχουμε δύο πανομοιότυπα γονίδια. Είναι πολύ πιθανότερο να συμβούν επιβλαβείς μεταλλάξεις από ό,τι ωφέλιμες. Σταδιακά, το γονίδιο που περιέχει μετάλλαξη ή μεταλλάξεις που αφορούν τη δομή και τη λειτουργία του γίνεται ψευδογονίδιο. Η δημιουργία ψευδογονιδίων είναι η πιο συχνή μοίρα των διπλασιασμένων γονιδίων. Μετά από μακρόχρονη εξέλιξη μερικών εκατομμυρίων χρόνων, τα ψευδογονίδια είτε θα διαγραφούν από το γονιδίωμα είτε θα αποκλίνουν τόσο πολύ από τα γονικά γονίδια έως ότου δεν θα είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους (25).

#### *Διατήρηση της λειτουργίας των διπλασιασμένων γονιδίων*

Η παρουσία διπλών γονιδίων είναι μερικές φορές ευεργετική επειδή παρέχονται επιπλέον ποσότητες πρωτεΐνης ή προϊόντων RNA. Αυτό ισχύει κυρίως για έντονα εκφρασμένα γονίδια τα προϊόντα των οποίων έχουν μεγάλη ζήτηση, όπως για παράδειγμα rRNA και ιστόνες. Ένας τρόπος διατήρησης κοινής λειτουργίας ύστερα από συμβάν διπλασιασμού είναι με γονιδιακή μετατροπή. Υπό συχνή γονιδιακή μετατροπή τα παράλογα γονίδια θα διατηρήσουν πολύ παρόμοιες ακολουθίες. Εναλλακτικά, ισχυρή φυσική επιλογή έναντι μεταλλάξεων που τροποποιούν το γονίδιο μπορεί να αποτρέψει την διαφοροποίηση των παράλογων γονιδίων (25).

#### *Μερική απώλεια λειτουργίας των διπλασιασμένων γονιδίων*

Εκτός αν η παρουσία μιας επιπλέον ποσότητας γονιδιακού προϊόντος δίνει πλεονέκτημα, δύο γονίδια με πανομοιότυπες λειτουργίες είναι απίθανο να διατηρηθούν σταθερά στο γονιδίωμα. Τα

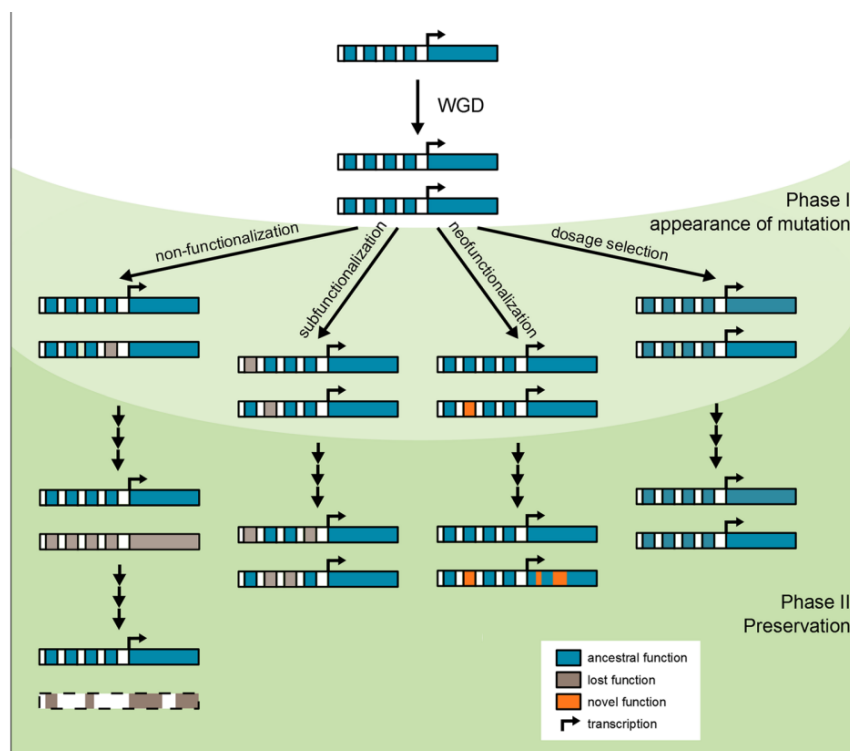


δύο αντίγραφα μπορούν να διατηρηθούν σταθερά όταν ορισμένες πτυχές των λειτουργιών τους διαφέρουν, όπου κάθε θυγατρικό γονίδιο υιοθετεί μέρος των λειτουργιών του προγονικού τους γονιδίου (27).

#### Απόκτηση νέας λειτουργίας σε ένα από τα διπλασιασμένα γονίδια

Ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα του διπλασιασμού των γονιδιωμάτων είναι η απόκτηση νέας λειτουργίας σε ένα από τα δύο αντίγραφα. Από τη στιγμή που υπάρχουν δύο αντίγραφα στο γονιδίωμα το ένα έχει τη δυνατότητα να συσσωρεύσει μεταλλάξεις. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η συσσώρευση ωφέλιμων μεταλλάξεων οι οποίες θα προσδώσουν μια νέα λειτουργία στον οργανισμό συμβαίνουν με πολύ χαμηλότερη συχνότητα από τις επιβλαβείς μεταλλάξεις που θα οδηγήσουν στην δημιουργία ψευδογονιδίων (28).

Όσον αφορά την διαδικασία παραγωγής ενέργειας στην τσιπούρα κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου της Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας έχει γίνει χαρτογράφηση του συμπλόκου III στο οποίο βρέθηκαν 4 οικογένειες γονιδίων *uqcr11*, *uqcrfs1*, *uqcrh*, *uqcrc2* οι οποίες διατηρούν δύο παράλογα για το κάθε γονίδιο (α και β), τα οποία προέκυψαν από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού του γονιδιώματος των τελεόστων.



Εικόνα 20 Η μοίρα των διπλασιασμένων γονιδίων (24)

## 1.5 Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των τελεόστεων

Τα ψάρια παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα να τροποποιούν τον φαινότυπό τους ως απάντηση σε μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες ιδιαίτερα στην πρώιμη οντογενετική περίοδο. Τέτοιου είδους φαινοτυπικές αποκρίσεις έχουν μεγάλη σημασία, τόσο από οικολογική σκοπιά όσο και για την εντατική εκτροφή τους. Ένας παράγοντας ο οποίος έχει καταδειχθεί πως επηρεάζει την ανάπτυξη των προνυμφών των ψαριών είναι η θερμοκρασία του νερού. Η τσίπουρα αποτελεί ένα είδος το οποίο χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασίας στο οποίο μπορεί να επιτευχθεί φυσιολογική ανάπτυξη και το οποίο κυμαίνεται από 16 έως 24 C<sup>0</sup>. Το είδος αυτό φαίνεται πως επηρεάζεται σε υψηλό βαθμό από τις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης μέσα στο εύρος αυτό οι οποίες τροποποιούν τον φαινότυπο του νεαρού ιχθυδίου (29, 30).

Οι πρώιμες θερμοκρασίες ανάπτυξης μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος του σώματος καθώς και την κολυμβητική ικανότητα των ιχθύων στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τους. Πιο συγκεκριμένα ψάρια τα οποία εκτρέφονται στους 17C<sup>0</sup> εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη κολυμβητική ικανότητα σε σχέση με ψάρια που αναπτύσσονται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες εντός του φυσιολογικού εύρους ανάπτυξης (31). Η κολυμβητική ικανότητα του ψαριού σε χαμηλές έως μεσαίες ταχύτητες είναι αποτέλεσμα της συστολής του ερυθρού μυός. Οι μυϊκές ίνες του ερυθρού μυός οι οποίες συναντώνται κατά μήκος των πλευρών συστέλλονται με αποτέλεσμα την κίνηση της ουράς. Η σύσπαση του μυός ενεργειακά βασίζεται στο ATP που παράγεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια ενώ είναι καλά αγγειοποιημένος για την μεταφορά της απαραίτητης ποσότητας οξυγόνου (32).

Επιπλέον, η θερμοκρασία επηρεάζει και το σχήμα του σώματος των νεαρών ιχθυδίων. Διαφοροποίηση παρατηρείται στα άτομα τα οποία εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες 22C<sup>0</sup> στο στάδιο μετά την κατανάλωση της λεκίθου συγκριτικά με τα άτομα τα οποία εκτέθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης. Η θερμοκρασία οδηγεί σε αλλαγή του φαινοτύπου μέσω της αναδιαμόρφωσης της δομής των μυών και των οστών. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες οδηγούν σε αυτές τις αλλαγές επηρεάζουν την μεταβολική δραστηριότητα του ιχθύος η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλομετρική ανάπτυξη διαφόρων οργάνων και σημείων του σώματος οδηγώντας στον παρατηρούμενο φαινότυπο (31). Την παραπάνω υπόθεση ενισχύει το γεγονός πως η θερμοκρασία του νερού μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης έχει μόνιμα αποτελέσματα στην κυτταρική του μυός του νεαρού ιχθυδίου (30).

Συνεπώς τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν πως η θερμοκρασία του νερού κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε βασικές λειτουργίες του ιχθύος. Κάποιες από αυτές τις λειτουργίες φαίνεται πως σχετίζονται με την μεταβολική δραστηριότητα του οργανισμού και συγκεκριμένα με την αερόβια διαδικασία παραγωγής ενέργειας.

## 1.6 Σκοπός

Η τσιπούρα αποτελεί ένα είδος με μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον το οποίο αποτυπώνεται και στην εκτεταμένη εκτροφή του σε ιχθυοκαλλιέργειες κυρίως στη Μεσόγειο. Η μελέτη διάφορων φυσιολογικών διαδικασιών έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την εξέλιξη του είδους και ταυτόχρονα μπορεί να συμβάλει στη βελτιστοποίηση των τεχνικών εκτροφής του. Επιπλέον, η υπερθέρμανση του πλανήτη και οι εποχιακές διαταραχές της θερμοκρασίας έχουν αυξήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για το πως επηρεάζονται οι ποικιλόθερμοι οργανισμοί όπως είναι και τα ψάρια στις διακυμάνσεις αυτές.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παραγωγή ενέργειας, μια διαδικασία ζωτικής σημασίας. Στην παρούσα εργασία μελετάται ο ρόλος μιας σειράς παράλογων γονιδίων του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, από το στάδιο του αυγού μέχρι τη μεταμόρφωση της προνύμφης, σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Σκοπός της εργασίας είναι αποσαφήνιση των σχέσεων μεταξύ των παράλογων γονιδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω και πως το καθένα από αυτά αποκρίνεται σε κυμαινόμενη θερμοκρασία ανάπτυξης στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Συλλογή και προσδιορισμός δειγμάτων

Εννέα ομάδες ψαριών υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (17, 20 και 23 C°) από την αρχή του σταδίου της επιβολής έως την κατανάλωση του λεκιθικού σάκου. Έπειτα, τα νεαρά ιχθύδια διατηρήθηκαν σε σταθερές θερμοκρασίες σίτισης μέχρι να φτάσουν σε μέγεθος 18-19 mm. Όλα τα αυγά προήλθαν από ενήλικα ψάρια σε αιχμαλωσία και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις στο πείραμα. Η θερμοκρασία του νερού προσαρμόστηκε στα επίπεδα δοκιμής χρησιμοποιώντας ψύκτες και θερμαντήρες και αυτόματο έλεγχο τους μέσω ηλεκτρονικών αισθητήρων (Eliwell, EE). Όσον αφορά της συνθήκες εκτροφής, ο κορεσμός οξυγόνου στο νερό ήταν  $5,8 \pm 1,0$  έως  $6,0 \pm 0,9$  mg/L-1, το pH  $7,8 \pm 0,3$ , η αλατότητα κυμάνθηκε από 35 ως 36 ‰ και η φωτοπερίοδος ήταν 18 ώρες φωτός και 6 σκοταδιού. Η εκτροφή προνυμφών πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) στην Κρήτη (29).

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο μέχρι τη μεταμόρφωση. Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν 8 δείγματα για κάθε στάδιο για κάθε μία από τις τρεις θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C° με εξαίρεση τα αυγά στα οποία η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 17 C° που αποτελεί και θερμοκρασία αναπαραγωγής των ενήλικών ψαριών. Τα δείγματα στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια μέχρι και το στάδιο 1<sup>st</sup> feeding αποτελούνταν από περισσότερα από ένα ιχθύδια μέχρι να συμπληρωθεί ο απαιτούμενος όγκος δείγματος. Όσον αφορά τα τελευταία στάδια όπου έγινε συλλογή, κάθε δείγμα αποτελούνταν από ένα ιχθύδιο. Αναλυτικά η συλλογή των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα 4. Μετά το πέρας της δειγματοληψίας τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε αντιδραστήριο RNAlater Reagent (Sigma-Aldrich, R0901) και φυλάχθηκαν στους -20 C° μέχρι την χρήση τους.

Πίνακας 4 Χάρτης δειγματοληψίας

Αναπτυξιακά στάδια	Θερμοκρασία (C°)	Αριθμός δειγμάτων
<b>Egg</b>	17	8
<b>HATCHING</b>	17	8
	20	8
	23	8
<b>1ST FEEDING</b>	17	8
	20	8
	23	8
<b>FLEXION</b>	17	8
	20	8

	23	8
<b>End of larvae rearing</b>	17	8
	20	8
	23	8
<b>Mid metamorphosis</b>	17	8
	20	8
	23	7

## 2.2 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

Από τα ιχθύδια που συλλέχθηκαν απομονώθηκε το ολικό mRNA χρησιμοποιώντας το εμπορικό προϊόν E.Z.N.A total RNA kit της Omega. Έπειτα, η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του σκευάσματος 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 Σχεδιασμός εκκινητών

Για την έναρξη του πειράματος απαραίτητος καθίσταται ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών για όλα τα γονίδια. Για τον σχεδιασμό εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Primer 3 στο οποίο εισάγεις την αλληλουχία του γονιδίου και το πρόγραμμα σχεδιάζει ζεύγος εκκινητών (35). Οι αλληλουχίες των εκκινητών στην συνέχεια εισήχθησαν στο πρόγραμμα Beacon Designer έτσι ώστε να ελεγχθεί ο σχηματισμός διμερών τα οποία οδηγούν σε ψευδή αποτελέσματα (36). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLAST για να εξακριβωθεί πως οι εκκινητές υβριδίζουν μόνο στο συγκεκριμένο γονίδιο και όχι και σε άλλα σημεία του γονιδιώματος της τσιπούρας (37). Από την συγκέντρωση δεδομένων από τα παραπάνω προγράμματα έγινε η επιλογή του ζεύγους εκκινητών για κάθε γονίδιο, οι αλληλουχίες των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 5.

*Πίνακας 5 οι αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν*

<b>GENE_NAME</b>	<b>Αλληλουχία του FW εκκινητή</b>	<b>Αλληλουχία του RV εκκινητή</b>
<i>ef1</i>	TCAAGGGATGGAAGGTTGAG	AGTTCCAATACCGCCGAT
<i>rpl13</i>	TCTGGAGGACTGTCAGGGGCA TGC	AGACGCACAATCTTAAGAGC AG
<i>rps18</i>	AGGGTGTGGCAGACGTTAC	GAGGACCTGGCTGTATTTGC
<i>uqcr11a</i>	CTATTCTGAGGGCGTGGGTG	TGTACGGCACATAGTCGAGA

<i>uqcr11b</i>	GCTCAGCAAAAATAATCGGTCA GA	TGAAGTGGACCAGGGCTACA
<i>uqcrfs1a</i>	GATATTGGGGAGCTGCGTGA	TGAAGCATCGTAGTGGGAGC
<i>uqcrfs1b</i>	TCCGATTTGCCACACAGAT	AGATTCGCTGCTGTCCTGAG
<i>uqcrha</i>	ATCCTCTTGATGCGATGCGA	TGGTCCCGAGCATGTAGGA
<i>uqcrhb</i>	TGGTGGACCCTTTAGAATCG	TCACGTTGTGGAAGAGCTTG
<i>uqcrc2a</i>	TTGCCAAAGCTACCACACAG	TCCGATACATTTCCCTCAGC
<i>uqcrc2b</i>	CTTCAGAGGGTTTGCTGGAG	CTCATCCACGAAGGGTGTTT

## 2.4 Προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος μέσω ποσοτικής PCR.

Το cDNA που προέκυψε από την παραπάνω επεξεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων *uqcrha*, *uqcrc2a*, *uqcr11a*, *uqcrfs1a* τα οποία συναντώνται στο σύμπλοκο III καθώς και τον παραλόγων των γονιδίων αυτών, *uqcrhb*, *uqcrc2b*, *uqcr11b*, *uqcrfs1b*.

### 2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η qPCR είναι μια μέθοδος η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια. Είναι ίδια με την συμβατική PCR όμως η παρακολούθηση της ενίσχυσης του προϊόντος πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο. Η αντίδραση βασίζεται στο ένζυμο DNA πολυμεράση όπου μπορεί να αντιγράφει τμήματα DNA τα οποία θα οριστούν. Η DNA πολυμεράση δεν ξεκινάει μόνη της την αντιγραφή ενός τμήματος καθώς χρειάζεται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων για να ξεκινήσει η ενίσχυση αυτή. Το ζεύγος αυτό είναι οι εκκινητές οι οποίοι καθορίζουν ποιο τμήμα πρόκειται να ενισχυθεί. Η πολυμεράση για να είναι λειτουργική χρειάζεται περιβάλλον συγκεκριμένης αλατότητας και pH για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με σκοπό την οριοθέτησή 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. Τέλος, για την παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο απαραίτητη είναι η προσθήκη κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η SYBERGREEN η οποία προσδένεται και φθορίζει εκλεκτικά μόνο στο δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (522 nm).

Θα μπορούσαμε να διαχωρίσουμε την αντίδραση σε τέσσερα στάδια. Αρχικά, στο πρώτο στάδιο η ενίσχυση του δίκλωνου προϊόντος είναι πολύ μικρή και έτσι ο φθορισμός που παράγεται από την ενσωμάτωση της SYBERGREEN δεν είναι ανιχνεύσιμος. Στο δεύτερο στάδιο, θεωρητικά σε κάθε κύκλο έχουμε διπλασιασμό του προϊόντος και παρατηρείται κατά συνέπεια μια εκθετική αύξηση

στον ανιχνεύσιμο φθορισμό. Το δεύτερο στάδιο δεν έχει μεγάλη διάρκεια και με το πέρας του έχουμε το στάδιο όπου παρατηρείται γραμμικότητα στην ενίσχυση του προϊόντος. Τέλος, η αντίδραση ολοκληρώνεται όταν η καμπύλη επιπεδώνεται και σταματάει η ενίσχυση του DNA. Αυτό συμβαίνει λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων και φθοράς της πολυμεράσης. Η μέτρηση του φθορισμού της αντίδρασης για το κάθε δείγμα πραγματοποιείται σε συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού το οποίο ονομάζεται κατώφλι φθορισμού (Ct) και αντιστοιχεί στην εκθετική φάση. Στον εν λόγω πείραμα κατώφλι ορίστηκε το 70000, κοινό για όλα τα υπό μελέτη δείγματα.

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των επιπέδων mRNA των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε συγκριτική ποσοτικοποίηση. Δηλαδή προσδιορίστηκε η έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων με βάση δύο ιδιόσυστατα ενεργά γονίδια (housekeeping genes) (33,34).

#### 2.4.2 Απόδοση αντίδρασης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω κατά την εκθετική φάση θεωρητικά σε κάθε κύκλο έχουμε διπλασιασμό του προϊόντος. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δεν είναι δυνατό και έτσι αναγκαία κρίνεται η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης ενίσχυσης έτσι ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια στα παραγόμενα αποτελέσματα.

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  $R^2$  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 6).

Πίνακας 6 Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών όπου έχουμε τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα για το κάθε γονίδιο

	Γονίδια	Συγκέντρωση εκκινητών (nM)	Efficiency %
<b>Housekeeping genes</b>	<i>ef1a</i>	200	101,397
	<i>rps18</i>	150	130,043
	<i>rpl13</i>	200	101,358
	<i>uqcrha</i>	150	103,260

<b>Genes of interest</b>	<i>uqcrhb</i>	250	101,944
	<i>uqcrc2a</i>	300	102,708
	<i>uqcrc2b</i>	150	101,029
	<i>uqcr11a</i>	150	98,120
	<i>uqcr11b</i>	350	97,050
	<i>uqcrfs1a</i>	300	96,299
	<i>uqcrfs1b</i>	300	98,124

### 2.4.3 Γονίδια αναφοράς

Για την συγκριτική ποσοτικοποίηση και τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος αναγκαία είναι η χρήση γονιδίων αναφοράς τα οποία θα είναι ιδιόσυστατα ενεργά στους υπό μελέτη οργανισμούς. Στο εν λόγω πείραμα ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τρία γονίδια και εν τέλη τα δύο με την πιο σταθερή έκφραση χρησιμοποιήθηκαν στην επακόλουθη ανάλυση.

Housekeeping genes: *ef1a* (Elongation factor 1-alpha) → Προάγει την εξαρτώμενη από GTP δέσμευση του αμινοάκυλο-tRNA στην θέση A των ριβοσωμάτων κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης της πρωτεΐνης (38)

*rpl13* (Ribosomal Protein L13a) → Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται αποτελεί παράγωγο της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S και η τοπολογία της είναι στο κυτταρόπλασμα (39).

*rps18* (40S ribosomal protein S18) → Βρίσκεται στην κορυφή της κεφαλής της υπομονάδας 40S του ριβοσώματος και έρχεται σε επαφή με πολλές α-έλικες του 18S rRNA (38).

Ύστερα από υπολογισμό της τυπικής απόκλισης το *rpl13* και το *rps18* θεωρήθηκαν, σε σύγκριση με το *ef1a*, ως τα γονίδια με την πιο σταθερή έκφραση στο σύνολο το δειγμάτων και επιλέχθηκαν για την συνέχιση του πειράματος.

### 2.4.4 Πρωτόκολλο αντίδρασης

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

Ο συνολικό όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μL και τα συστατικά της ήταν τα εξής:

- SYBR Green I, η οποία περιείχε εκτός από την φθορίζουσα ουσία όλα τα υπόλοιπα συστατικά για την πραγματοποίηση της αντίδρασης εκτός από τους εκκινητές. Η αρχική συγκέντρωση της SYBR Green I ήταν 2x και έγινε αραίωση με τελική συγκέντρωση 1x.
- Εκκινητές με συγκέντρωση 10 pmol/ μl.



- cDNA στο οποίο έγινε αραίωση 1/10.
- H<sub>2</sub>O ώστε να γίνει αραίωση των συστατικών της αντίδρασης και να συμπληρωθεί ο συνολικός όγκος των 10 μL.

Αναλυτικότερα η ποσότητες των συστατικών ανάλογα με τις διαφορές στη συγκέντρωση των εκκινητών διαφαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7 Οι όγκοι των συστατικών της αντίδρασης για κάθε διαφορετική συγκέντρωση εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα μας. Οι ποσότητες που διαφαίνονται παρακάτω είναι όλες σε μL.

	Για συγκέντρωση 150 nM/μL	Για συγκέντρωση 200 nM/μL	Για συγκέντρωση 250 nM/μL	Για συγκέντρωση 300 nM/μL	Για συγκέντρωση 350 nM/μL
SYBER GREEN	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
cDNA	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Forward primer	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35
Reverse Primer	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35
H <sub>2</sub> O	2,70	2,60	2,50	2,40	2,30

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης του θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκε είχε διάρκεια 1 ώρα περίπου. Αρχικά, το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αύξηση της θερμοκρασίας στους 95,0 C<sup>0</sup> για 10 min για την αποδιάταξη όλων των δίκλωνων μορίων. Στη συνέχεια, έχουμε 40 κύκλους ενίσχυσης του προϊόντος. Κάθε κύκλος αποτελείται από 15 sec στους 95,0 C<sup>0</sup> και 1 min στους 60,0 C<sup>0</sup>. Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η καμπύλη τήξης ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός μοναδικού προϊόντος ενίσχυσης. Στο στάδιο αυτό, για 15 sec η θερμοκρασία φτάνει στους 95,0 C<sup>0</sup> και έπειτα 1 min στους 50,0 C<sup>0</sup> με ταυτόχρονη ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται.

## 2.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στη συνέχεια αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν στατιστικά μέσω του υπολογιστικού φύλλου Microsoft excel 365 (41). Αρχικά, προσδιορίστηκε το R<sup>0</sup> από τον τύπο  $R0 = \frac{Threshold}{(1+efficiency)^{ct}}$  τόσο στα γονίδια ενδιαφέροντος όσο και στα ιδιοσύστατα ενεργά γονίδια (housekeeping genes). Έπειτα, προσδιορίστηκε ποια δύο από τα τρία housekeeping genes είναι τα πιο σταθερά όσον αφορά την έκφραση τους στα υπό εξέταση δείγματα (*rpl13*, *rps18*) μέσω υπολογισμού της τυπικής απόκλισης. Για αυτά τα γονίδια 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 υπολογιστήκαν περιγραφικά στατιστικά (μέση τιμή, διάμεσος, τυπική απόκλιση, κλπ.) και τα δεδομένα παρουσιάζονται με την μορφή θηκογράμματος (box-plot). 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 (42).

### 3. Αποτελέσματα

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 ερευνήθηκαν στο εν λόγω πείραμα. Επιπλέον, αλλαγές στην έκφραση παρατηρήθηκαν μεταξύ και των παραλόγων όπου έγινε σύγκριση των ίδιων αναπτυξιακών σταδίων στην ίδια θερμοκρασία και ελέγχθηκε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση τους.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν χρησιμοποιήθηκε η ίδια κλίμακα μεταξύ των παραλόγων για να γίνεται πιο εύκολα η σύγκριση αυτών με εξαίρεση τα παράλογα *uqcr11a* και *uqcr11b* όπου η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ήταν πολύ μεγάλη για να χρησιμοποιηθεί ίδια κλίμακα. Επίσης, οι αγκύλες ορίζουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των συγκρινόμενων καταστάσεων και οι «\*» αντικατοπτρίζουν τις τιμές του p-value. Αναλυτικά, ισχύει:

\* →  $0,05 > p\text{-value} > 0,01$

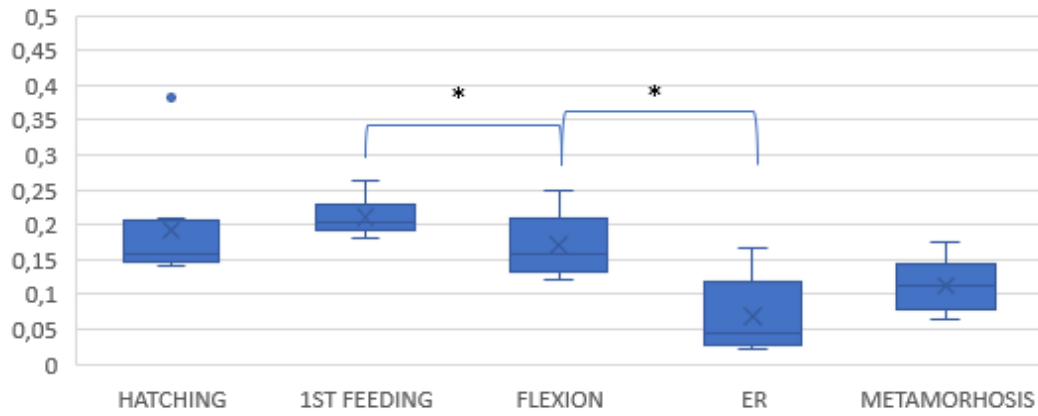
\*\* →  $0,01 > p\text{-value} > 0,001$

\*\*\* →  $< 0,001$

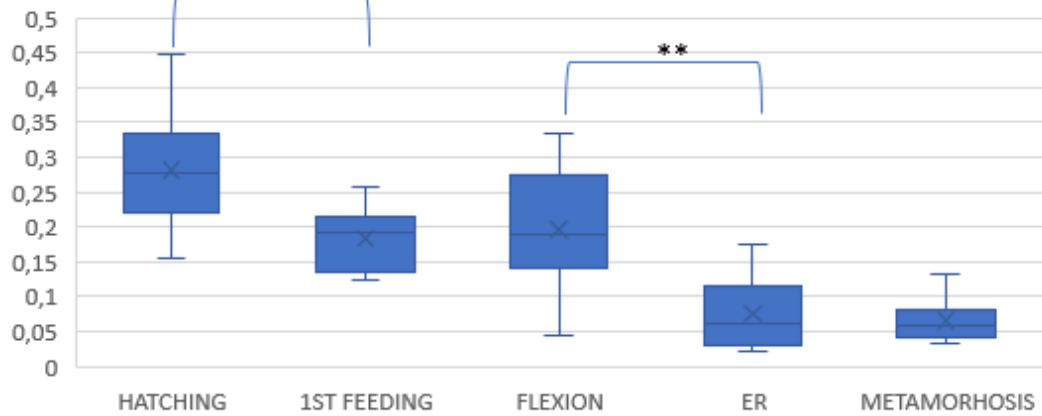
#### 3.1 Έκφραση γονιδίου *uqcrha*

Στις Εικόνα 21 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqcrha* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqcrha*. Ανάπτυξη στους 23°C οδήγησε στις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων και στην χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασίες σε όλα τα στάδια εκτός από το end of larval rearing (Εικόνα 22).

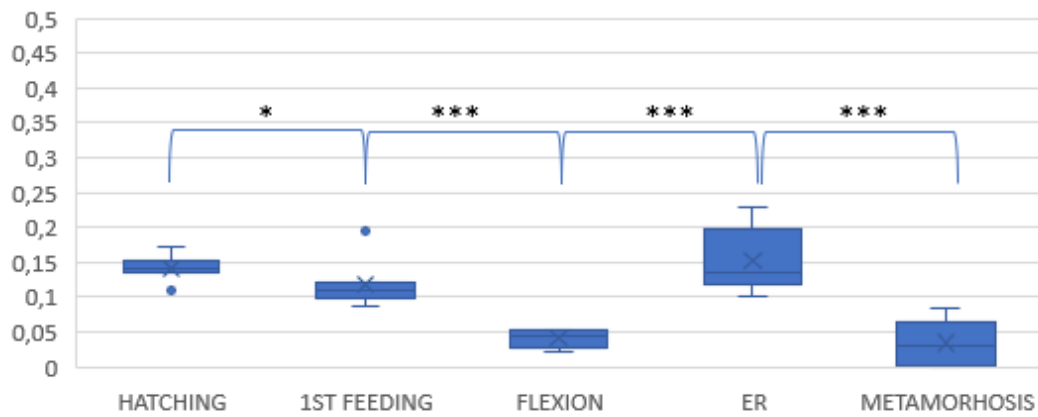
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (17)



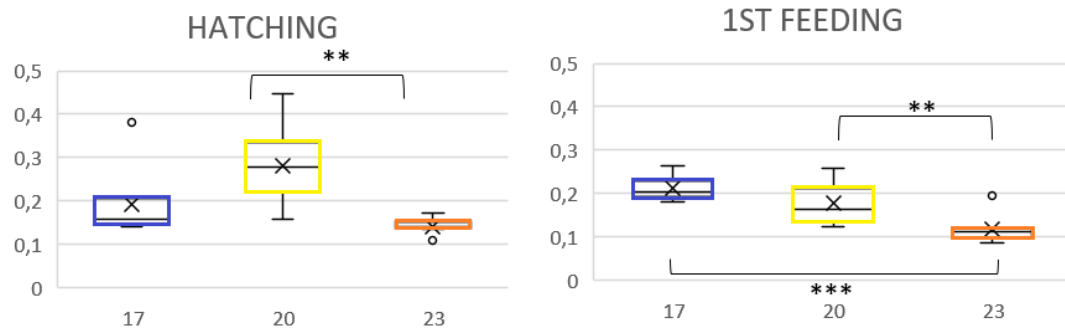
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (20)

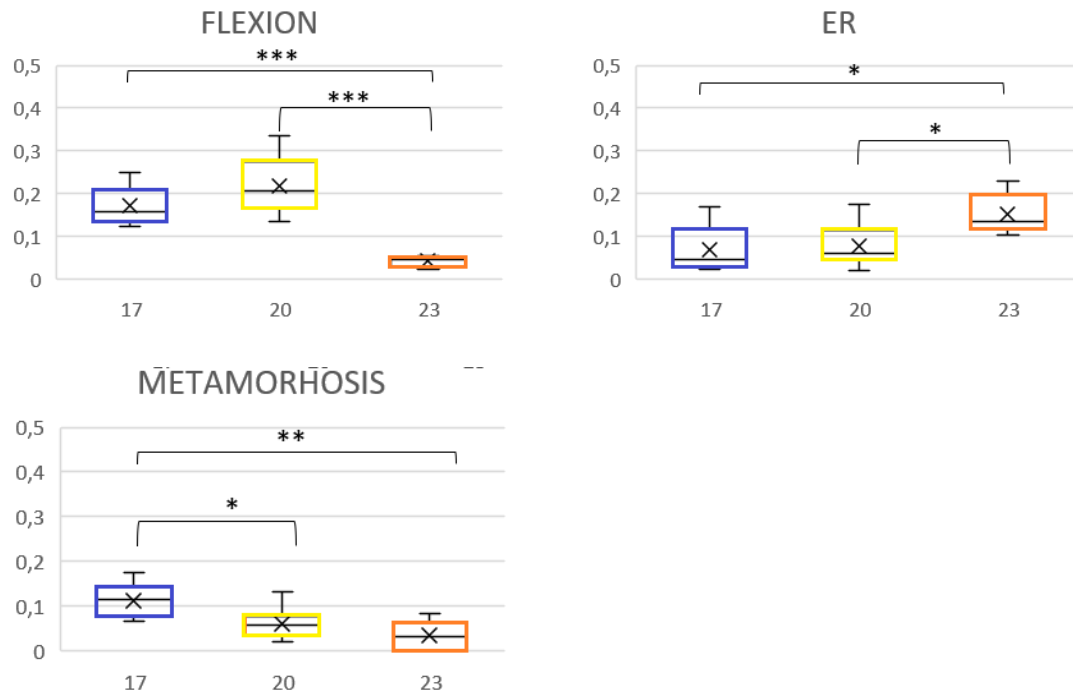


### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (23)



Εικόνα 21 box-plots για την έκφραση του γονιδίου ιερητα στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



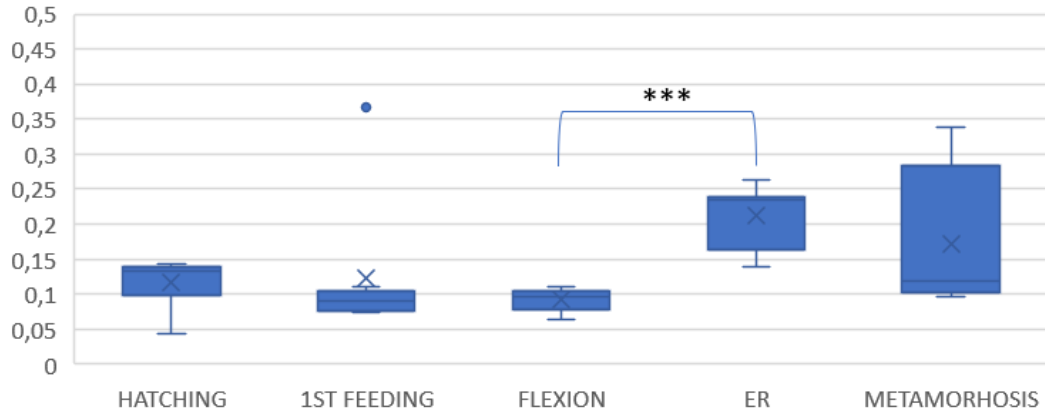
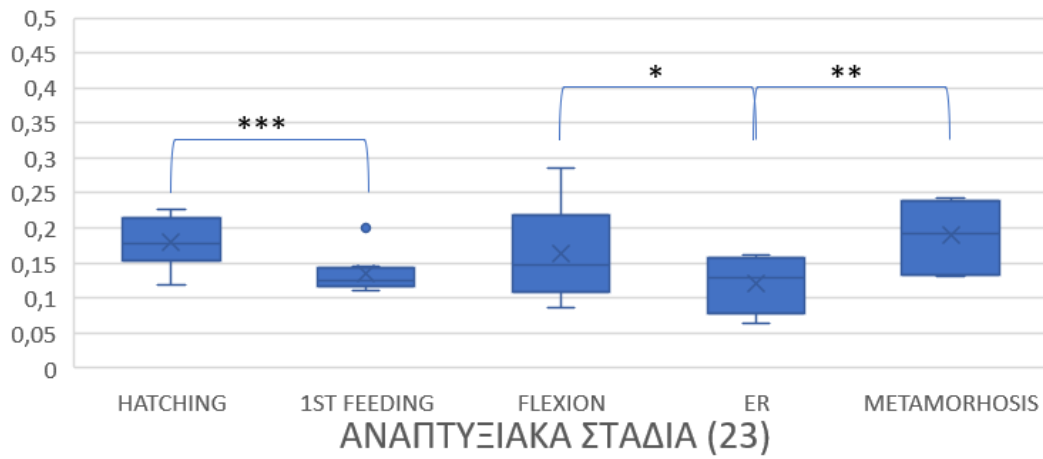
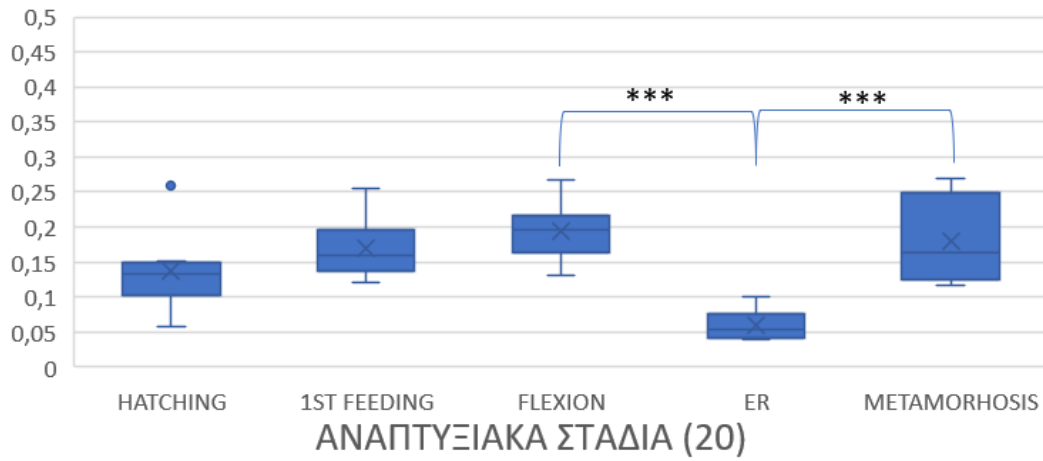


Εικόνα 22 box-plots του γονιδίου *uqcrha* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

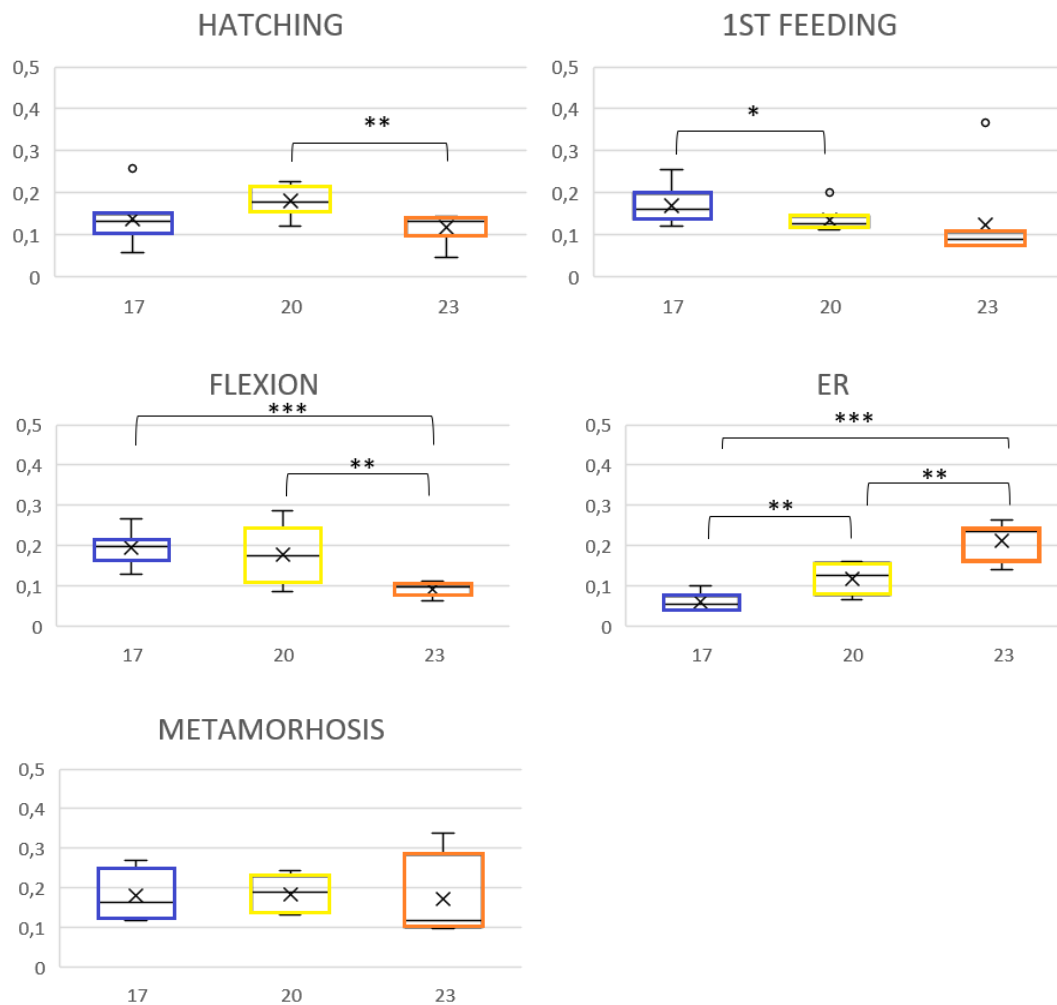
### 3.2 Έκφραση γονιδίου *uqcrhb*

Στην Εικόνα 23 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqcrhb* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqcrhb*. Ανάπτυξη στους 20°C οδήγησε στις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ενώ στους 23°C παρατήρηθηκε χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασίες σε όλα τα στάδια εκτός από το end of larval rearing (Εικόνα 24).

### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ 17



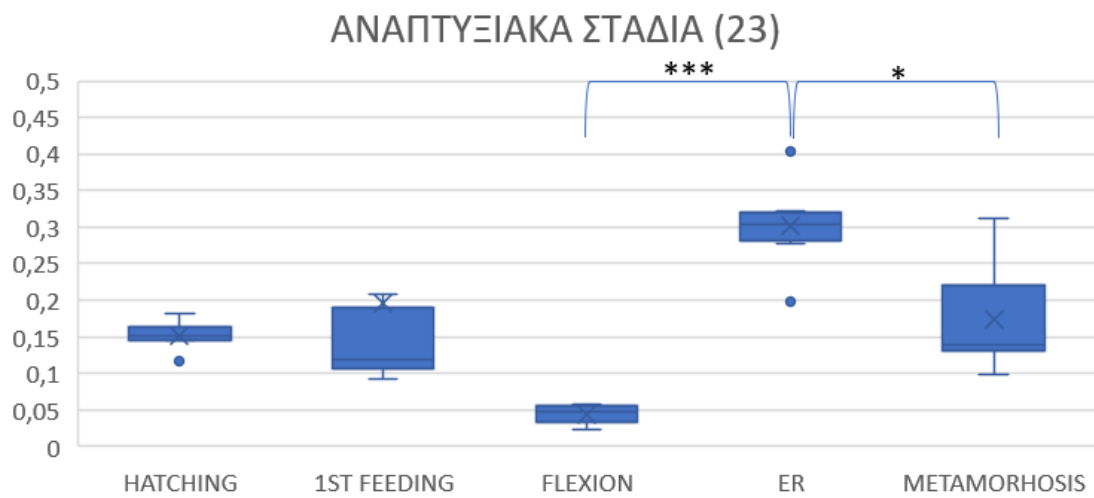
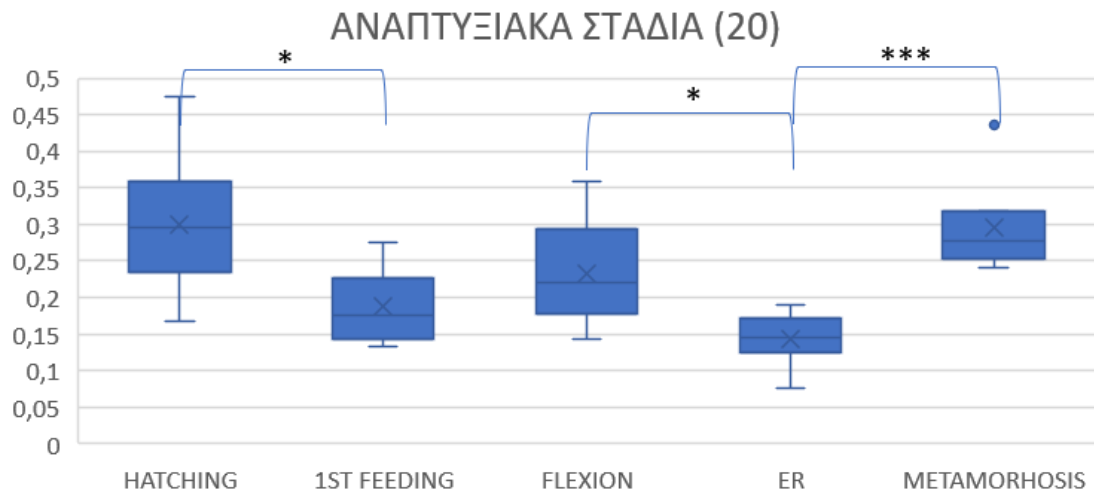
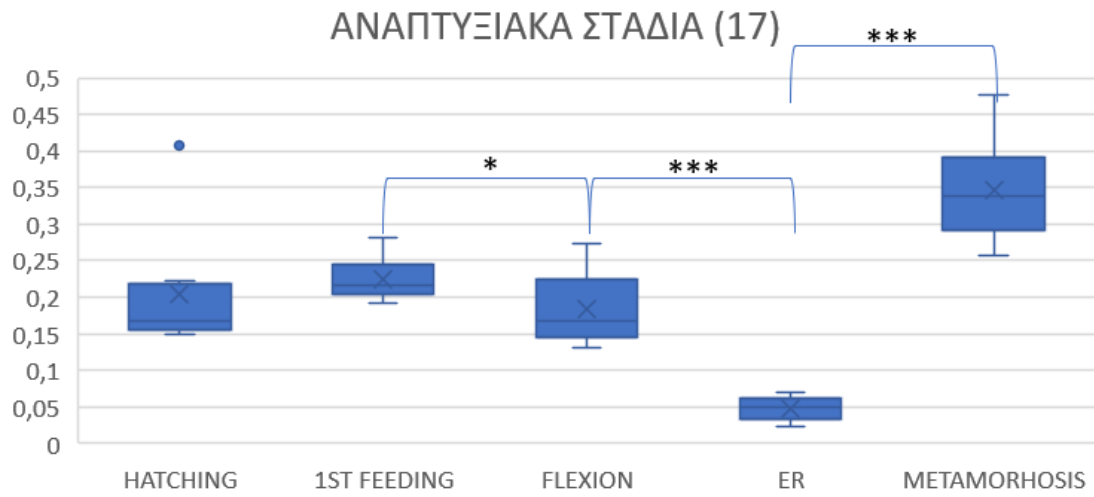
Εικόνα 23 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *uqr1b* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



Εικόνα 24 box-plots του γονιδίου *uqrchb* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

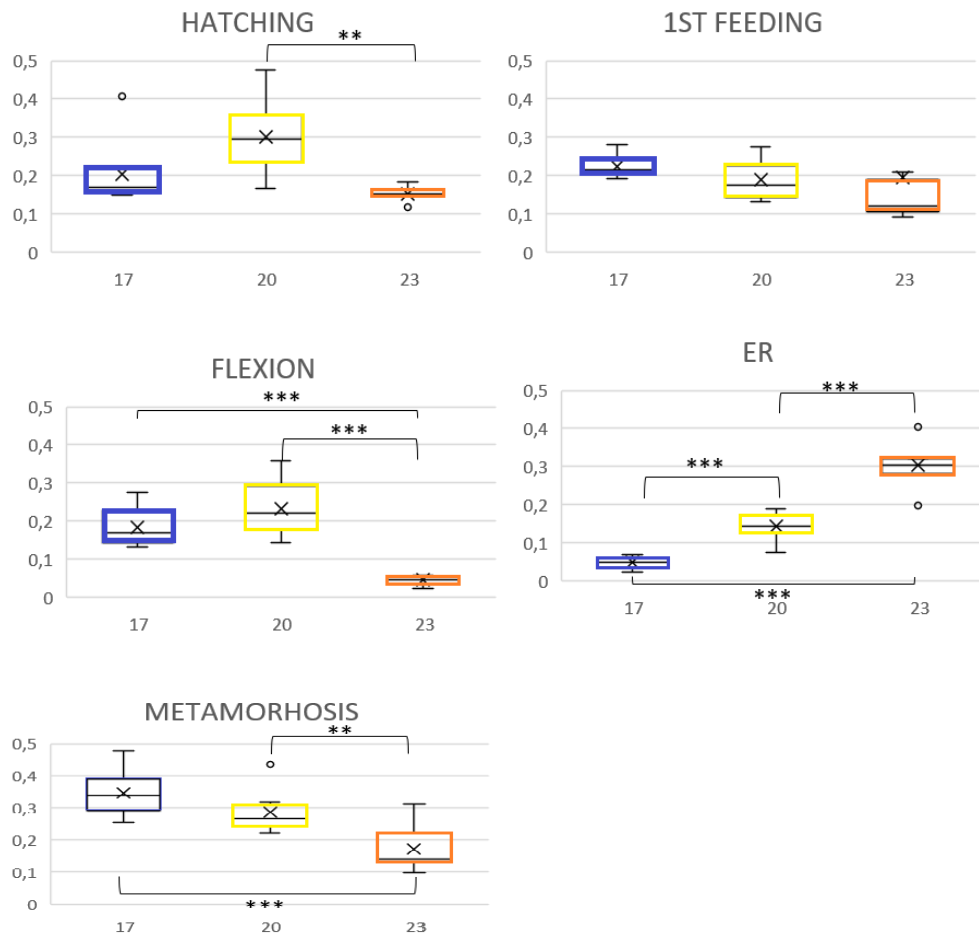
### 3.3 Έκφραση γονιδίου *uqcr2a*.

Στην Εικόνα 25 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqcr2a* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqcr2a*. Ανάπτυξη στους 23°C οδήγησε στην χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασίες σε όλα τα στάδια εκτός από το end of larval rearing (Εικόνα 26).



Εικόνα 25 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *uqcrc2a* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



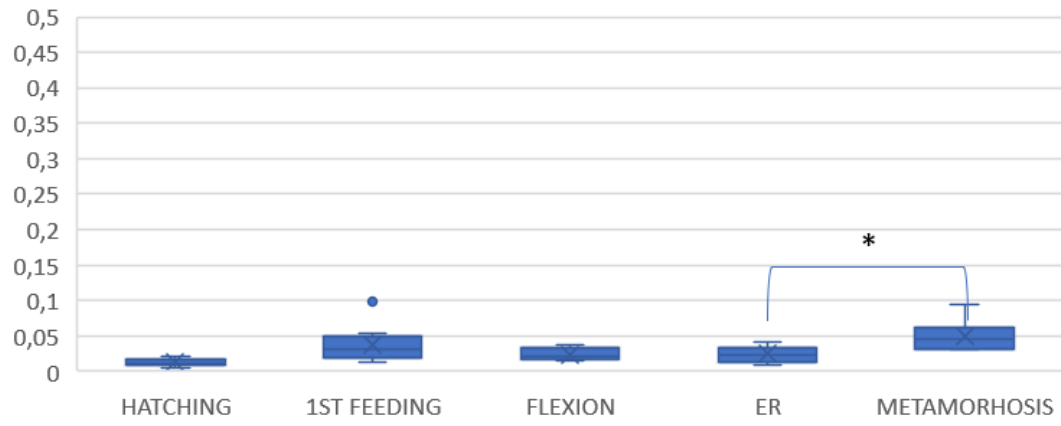


Εικόνα 26 box-plots του γονιδίου *uqrc2a* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

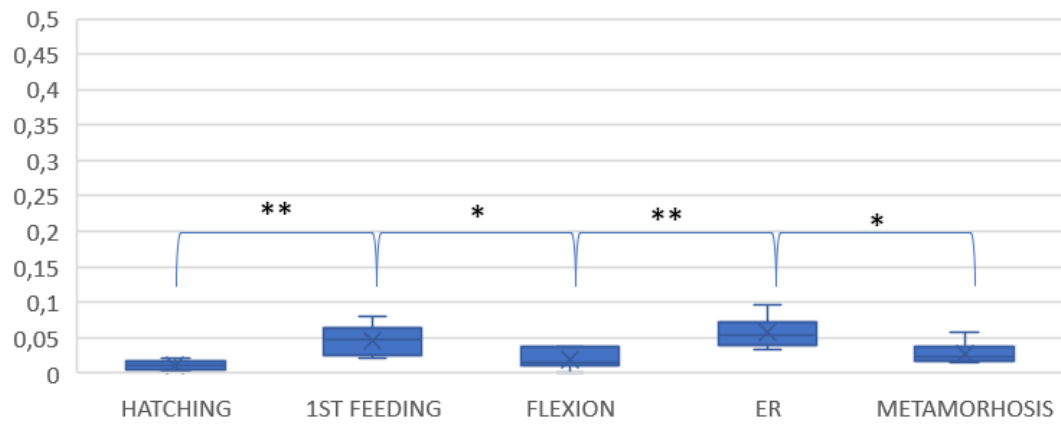
### 3.4 Έκφραση γονιδίου *uqrc2b*

Στην Εικόνα 27 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqrc2b* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqrc2b*. Ανάπτυξη στους 20°C οδήγησε στις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ενώ στο στάδιο end of larval rearing παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές έκφρασης. (Εικόνα 28).

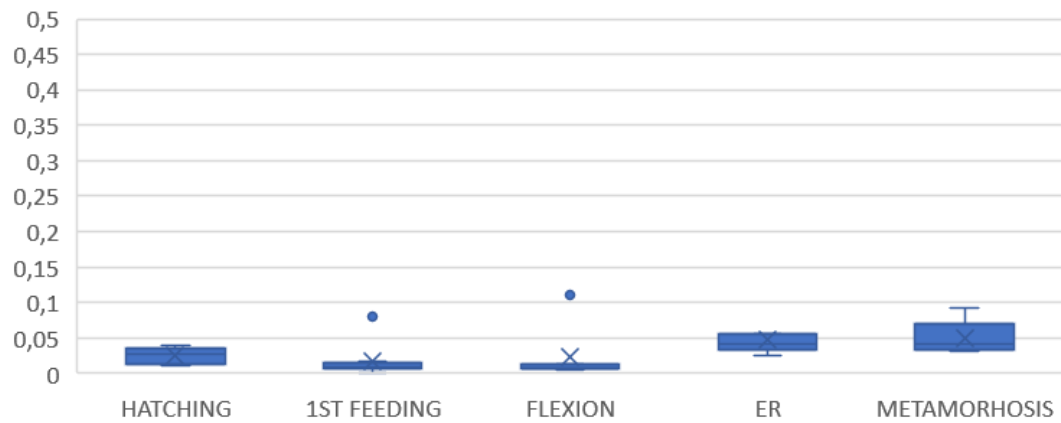
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (17)



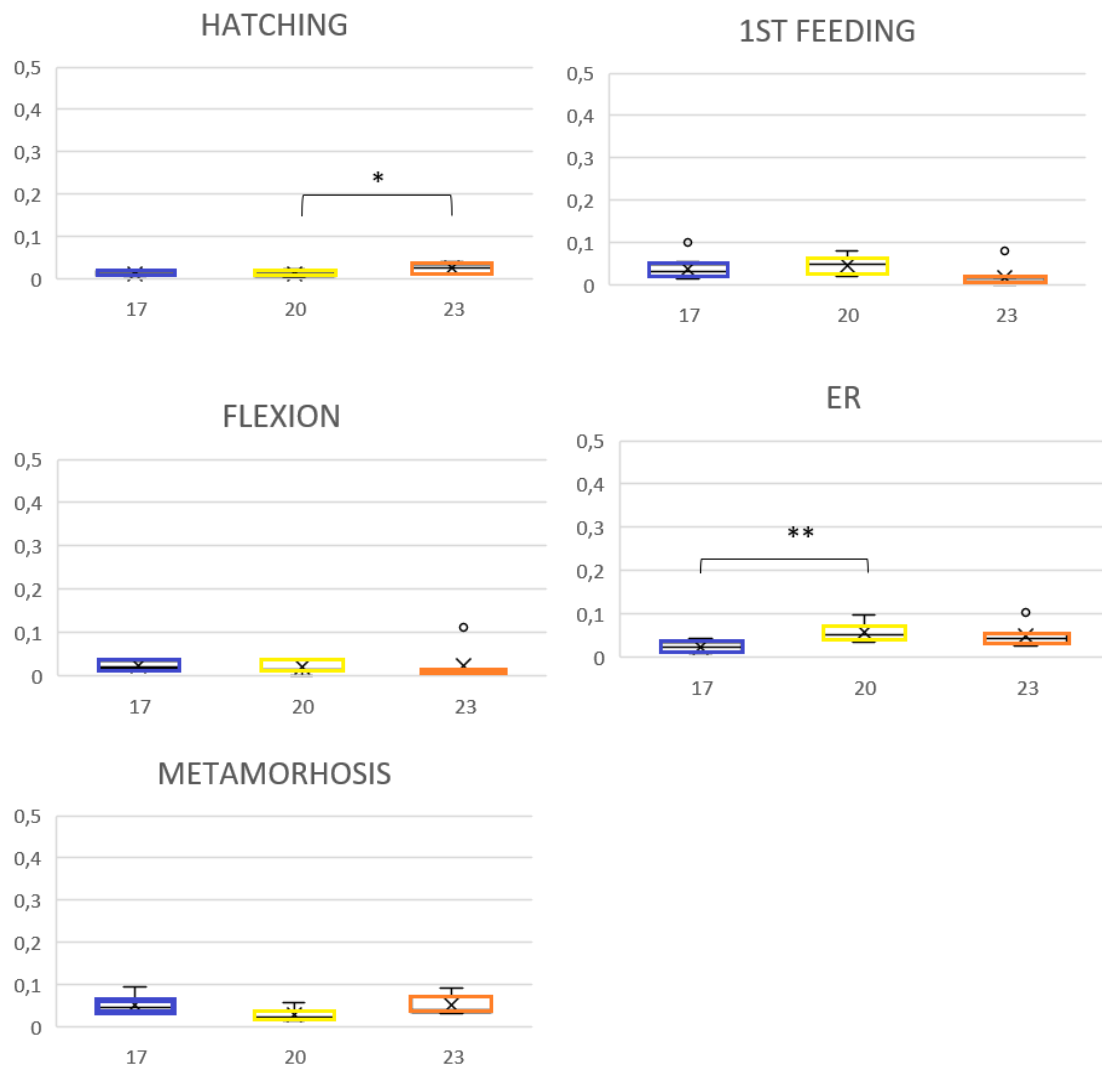
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (20)



### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (23)



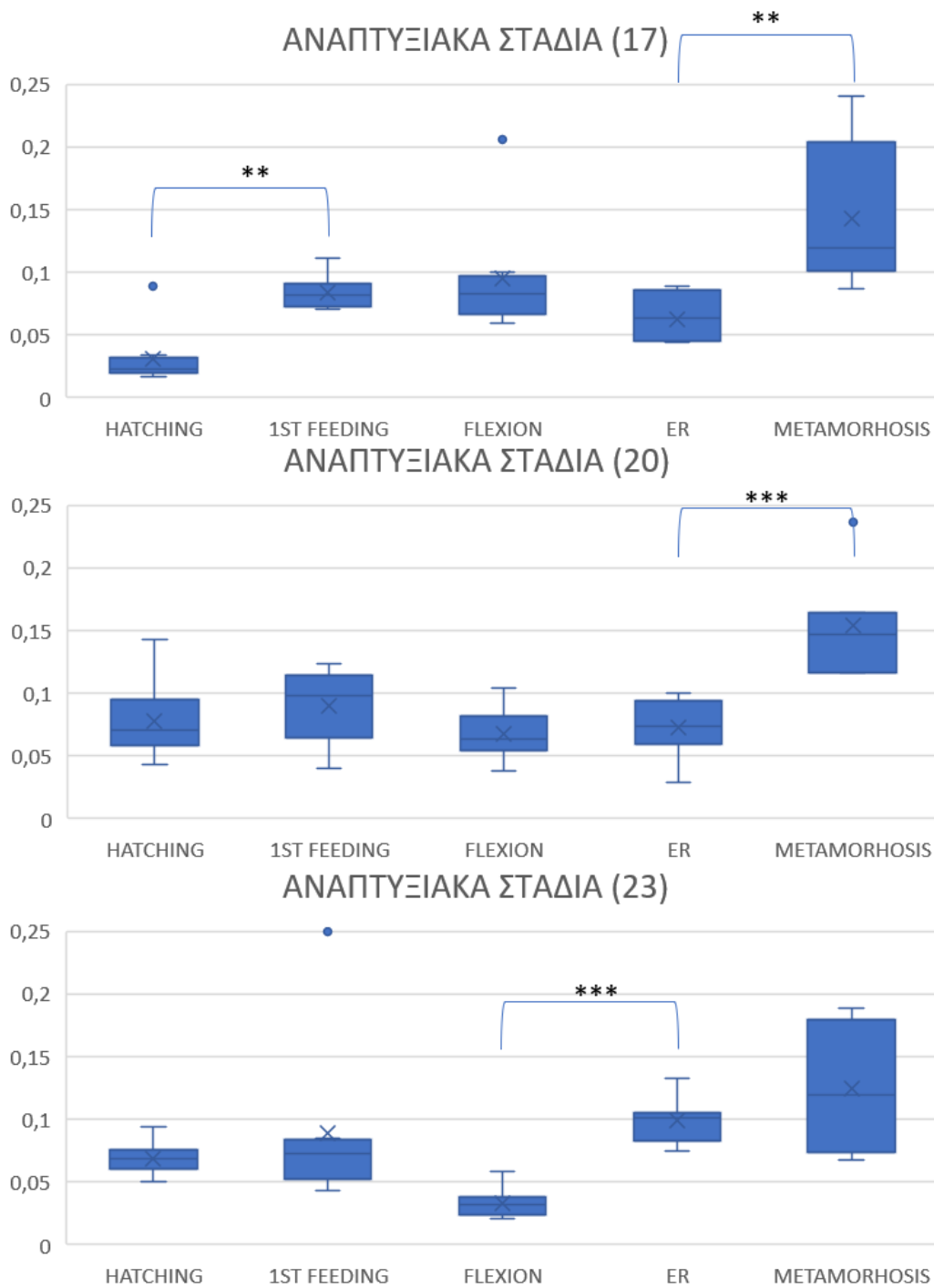
Εικόνα 27 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *uqcrc2b* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



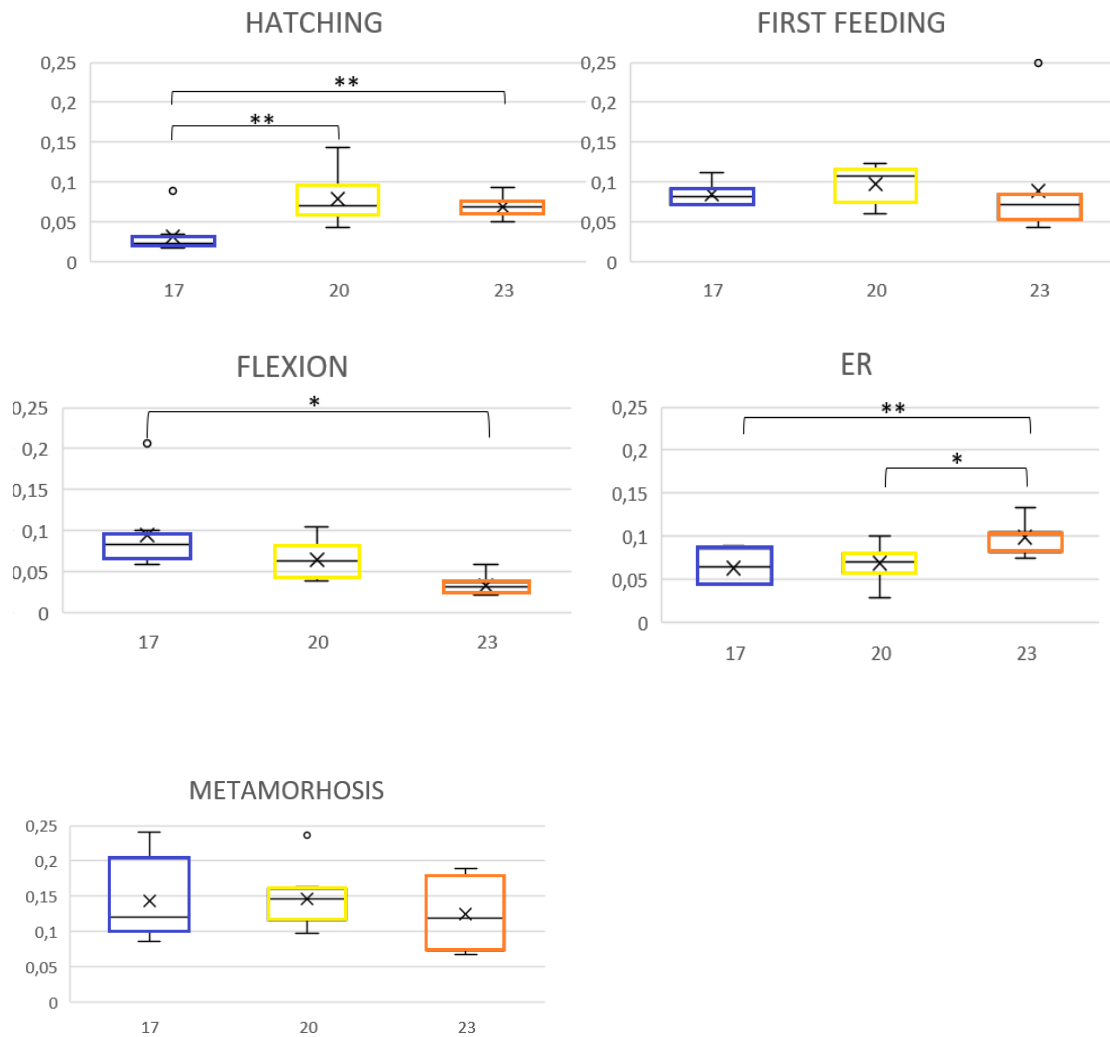
Εικόνα 28 box-plots του γονιδίου *uqcr2b* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

### 3.5 Έκφραση γονιδίου *uqcr11a*

Στην Εικόνα 29 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqcr11a* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqcr11a*. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές στο στάδιο metamorphosis και για τις τρεις θερμοκρασίες εκτροφής με περίπου ίσες τιμές έκφρασης (Εικόνα 30).



Εικόνα 29 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *ugr11a* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης

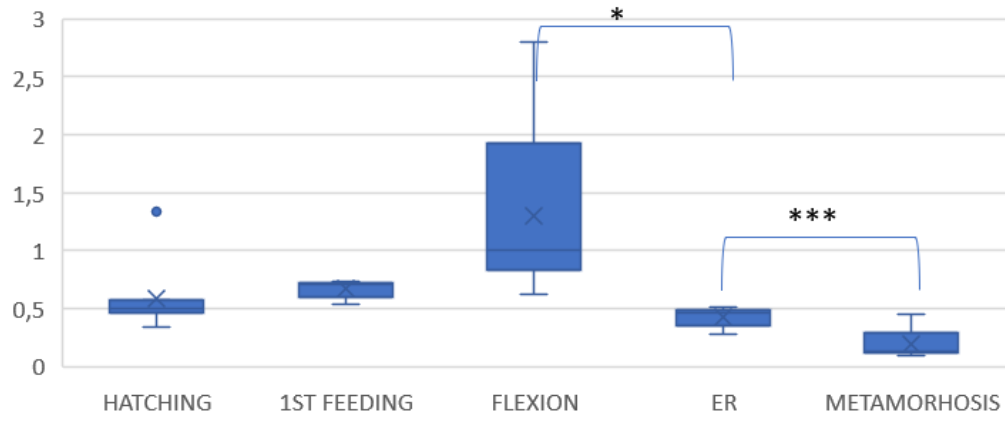


Εικόνα 30 box-plots του γονιδίου *uqcr11a* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

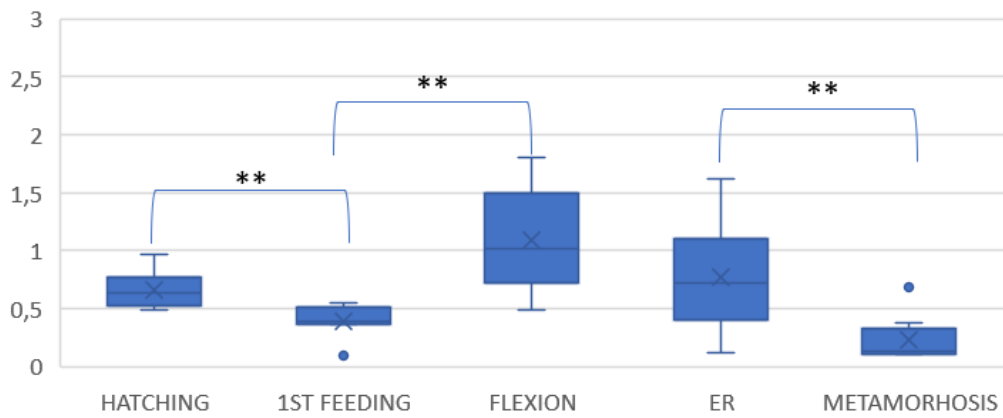
### 3.6 Έκφραση γονιδίου *uqcr11b*

Στην Εικόνα 31 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqcr11b* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqcr11b*. Ανάπτυξη στους 20°C οδήγησε στις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ενώ στο στάδιο metamorphosis παρατηρήθηκαν οι χαμηλότερες τιμές της έκφρασης του γονιδίου και στις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης (Εικόνα 32).

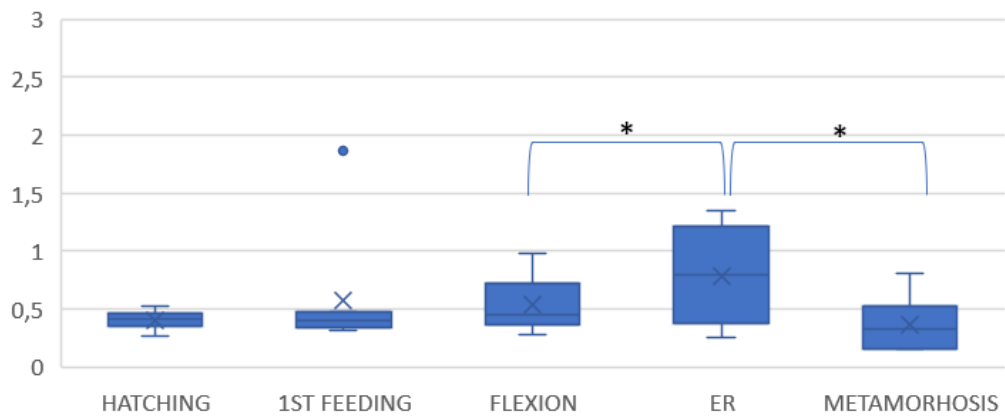
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (17)



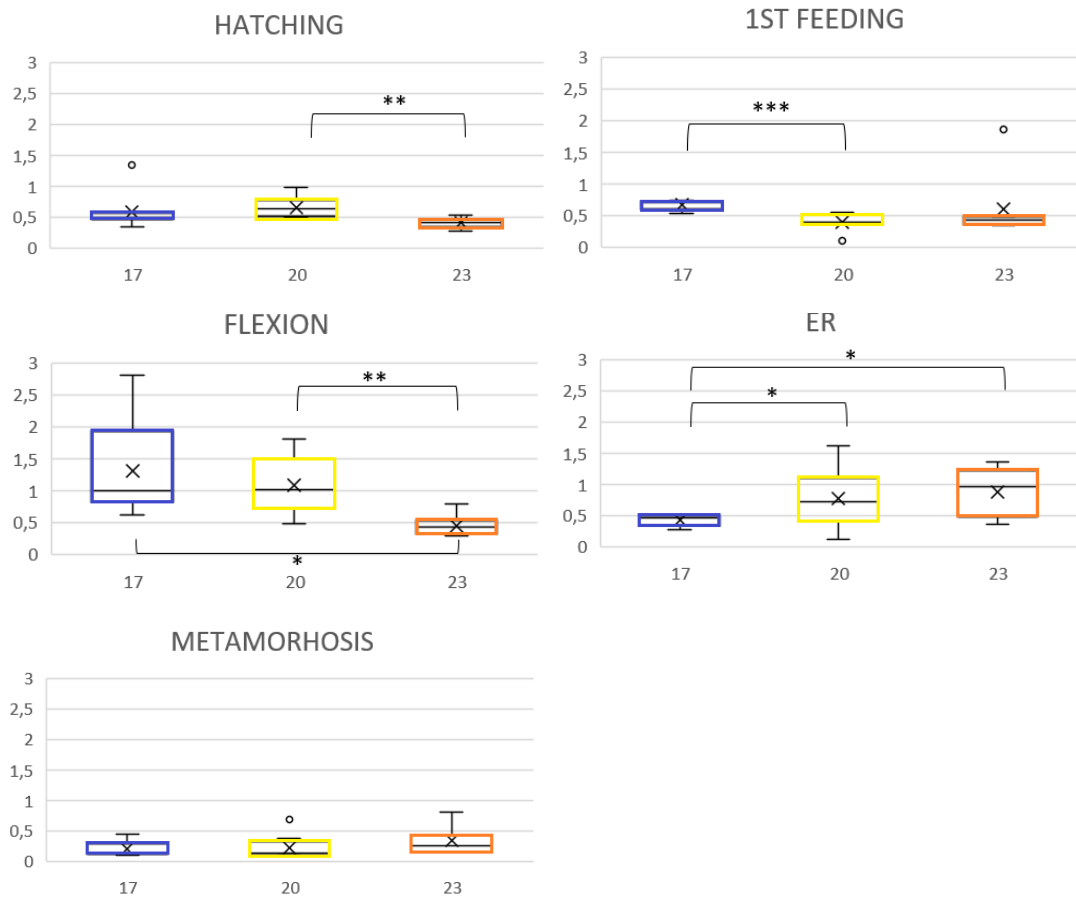
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (20)



### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (23)



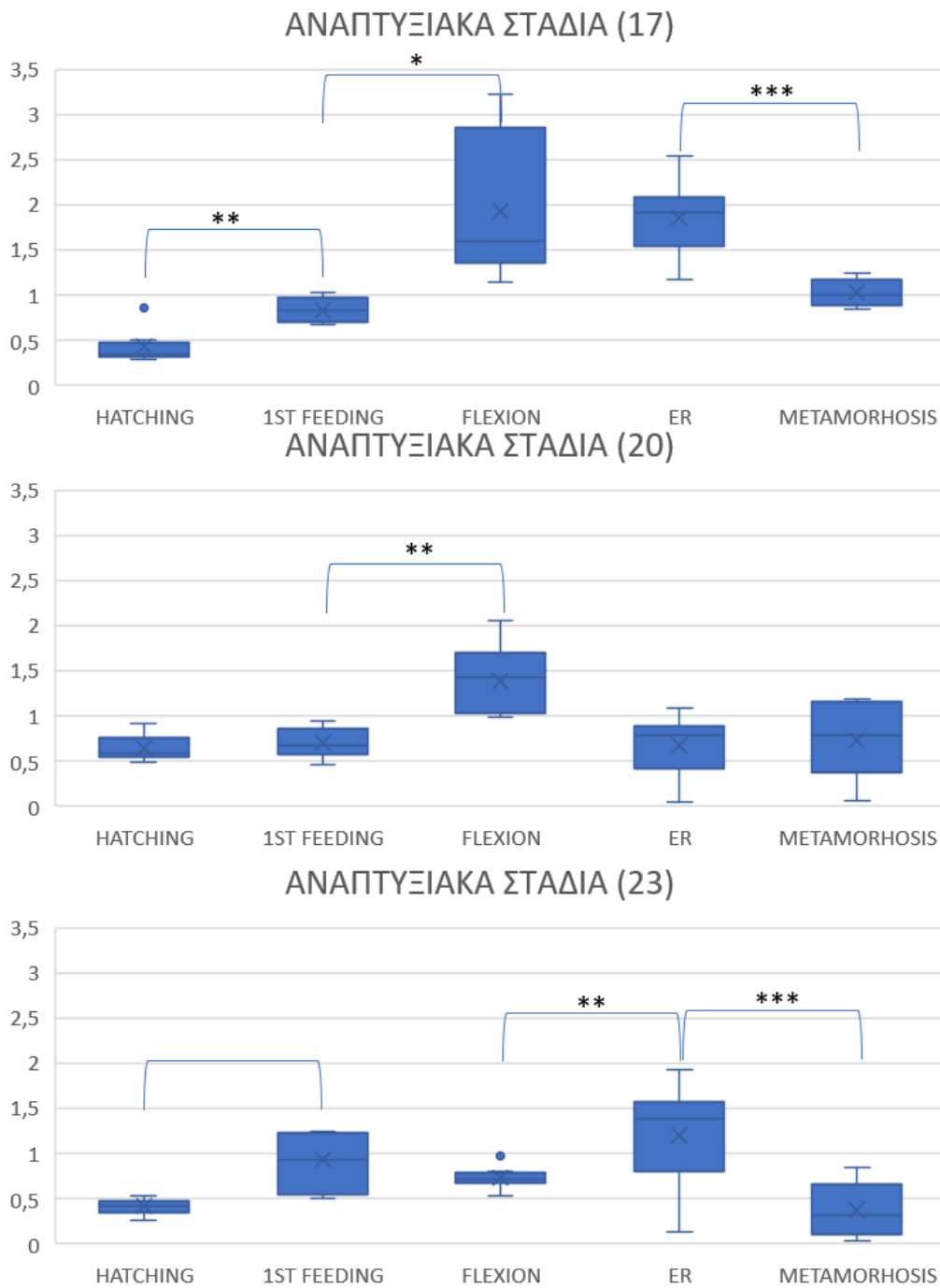
Εικόνα 31 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *uqr11b* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



Εικόνα 32 box-plots του γονιδίου *uqcr11b* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

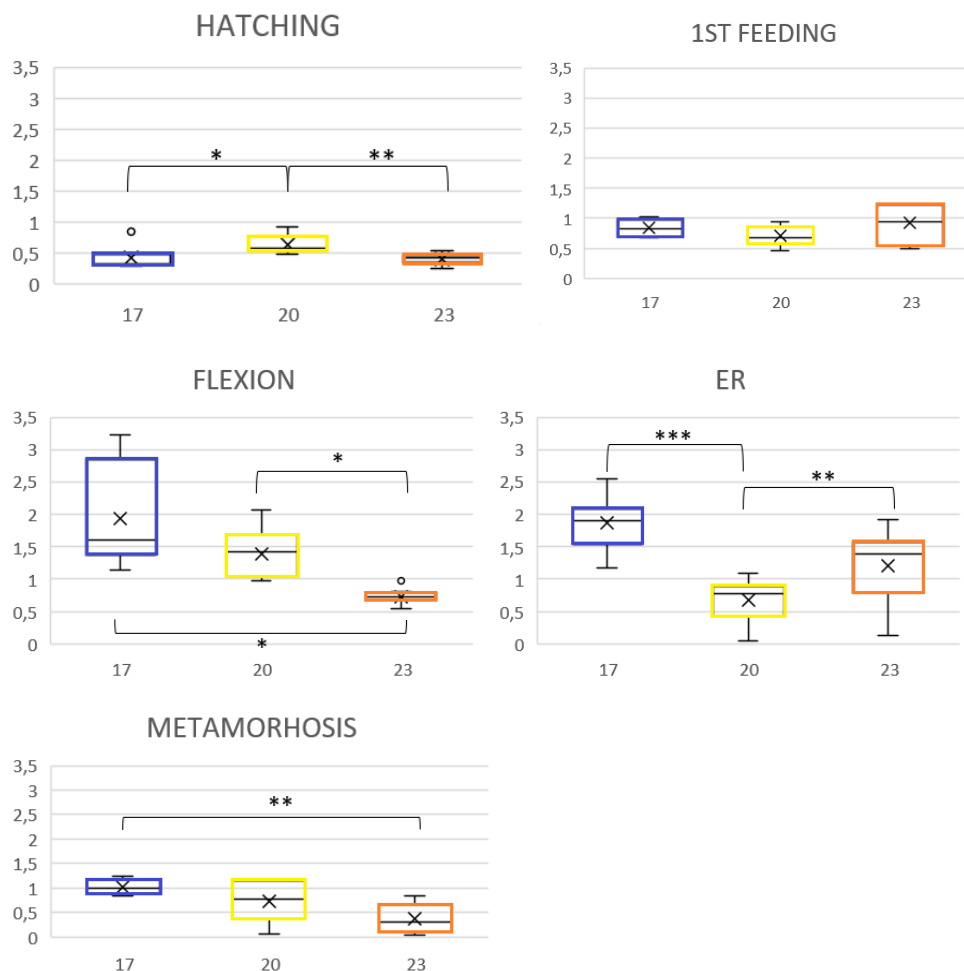
### 3.7 Έκφραση γονιδίου *uqcrfs1a*

Στην Εικόνα 33 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *uqcrfs1a* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *uqcrfs1a*. Ανάπτυξη στους 23°C οδήγησε στις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων και στην χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασίες σε όλα τα στάδια εκτός από το end of larval rearing ενώ στο 1<sup>st</sup> feeding και στις τρεις καταστάσεις είχαμε πανομοιότυπα επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 34).



Εικόνα 33 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *ucrf51a* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



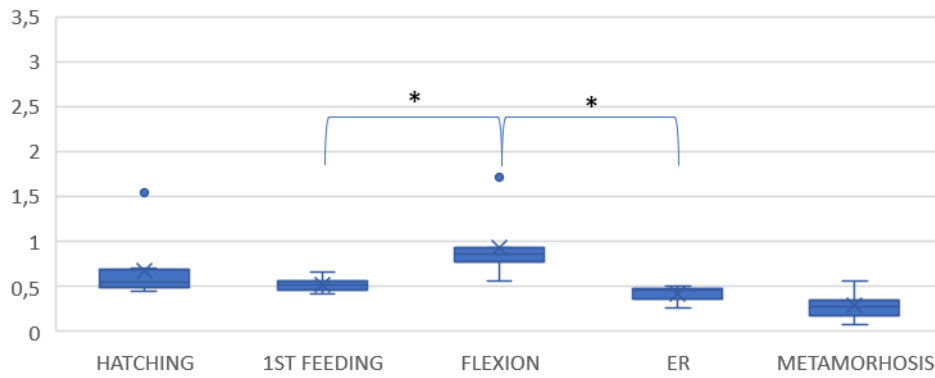


Εικόνα 34 box-plots του γονιδίου *ucrfs1a* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

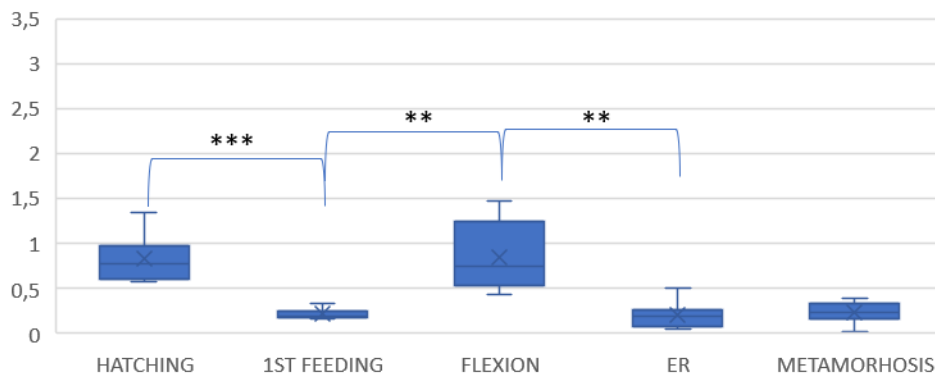
### 3.8 Έκφραση γονιδίου *ucrfs1b*

Στην Εικόνα 35 απεικονίζονται οι διαφορές στην έκφραση για το γονίδιο *ucrfs1b* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα. Η μέγιστη έκφραση του γονιδίου παρατηρήθηκε σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαφορετικές θερμοκρασίες είχαν σαν αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του οντογενετικού προτύπου έκφρασης του *ucrfs1b*. Ανάπτυξη στους 20°C οδήγησε στις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ενώ στους 23°C παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασίες στο σύνολο των σταδίων με εξαίρεση το στάδιο end of larval rearing ενώ και στο στάδιο 1<sup>st</sup> feeding τα επίπεδα ήταν παρόμοια με την ανάπτυξη στους 20°C (Εικόνα 36).

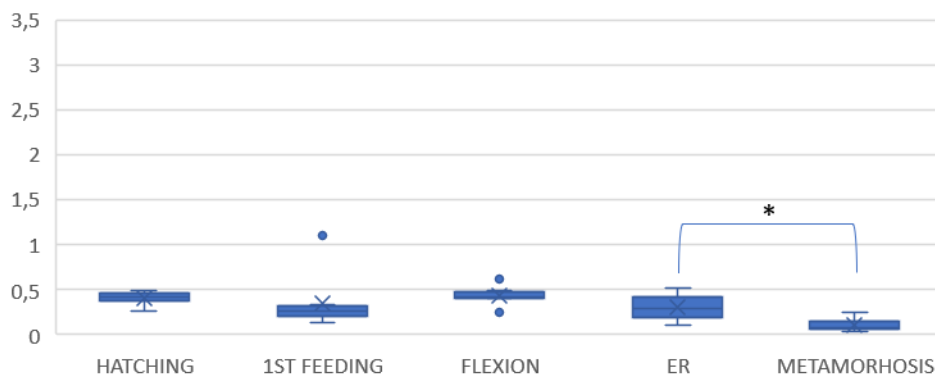
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (17)



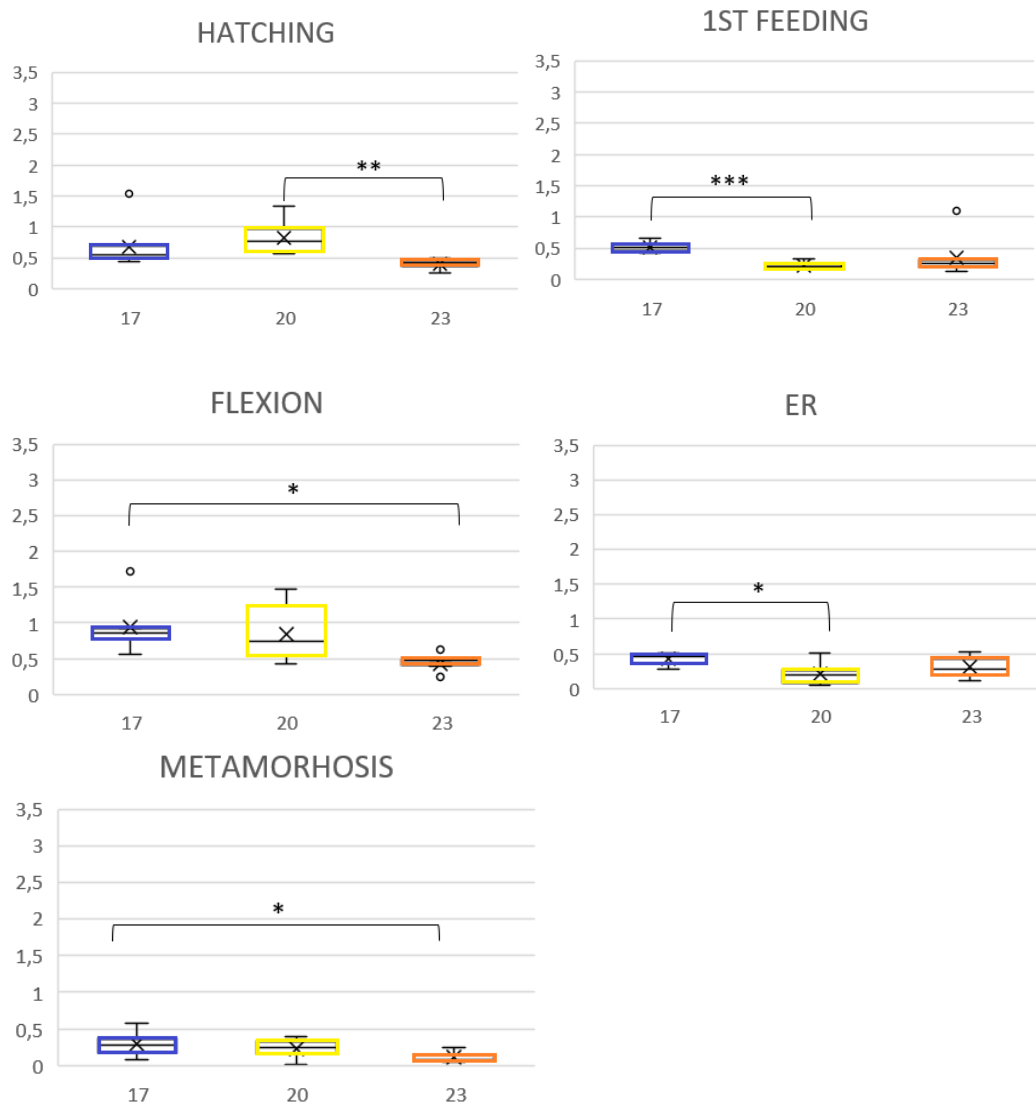
### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (20)



### ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (23)



Εικόνα 35 box-plots για την έκφραση του γονιδίου *uqcrfs1b* στα αναπτυξιακά στάδια στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης



Εικόνα 36 box-plots του γονιδίου *ucrfs1b* για κάθε στάδιο ξεχωριστά σε συνάρτηση με τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

### 3.9 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων γονιδίων

Για την σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων γονιδίων υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ του κάθε σταδίου ανάπτυξης στην ίδια θερμοκρασία.

#### 3.9.1 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων *ucrha* – *ucrhb* (Πίνακας 8)

Πίνακας 8 Απεικόνιση των τιμών του *p-value* για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα *ucrha* – *ucrhb*. Με έντονη γραφή απεικονίζονται τα στάδια στα οποία μεταξύ των σταδίων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων.

	<i>hatching</i>	<i>1st feeding</i>	<i>flexion</i>	<i>end of larval rearing</i>	<i>metamorphosis</i>
17	0,181	0,063	0,096	0,529	<b>0,028</b>
20	<b>0,028</b>	<b>0,029</b>	0,479	0,220	<b>0,000</b>
23	0,100	0,618	0,000	0,068	<b>0,017</b>

#### 3.9.2 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων *ucrc2a* – *ucrc2b* (Πίνακας 9)

Πίνακας 9 Απεικόνιση των τιμών του *p-value* για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα *uqcr2a – uqcr2b*. Με έντονη γραφή απεικονίζονται τα στάδια στα οποία μεταξύ των σταδίων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων

	<i>hatching</i>	<i>1st feeding</i>	<i>flexion</i>	<i>end of larval rearing</i>	<i>metamorphosis</i>
<b>17</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,011</b>	<b>0,000</b>
<b>20</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
<b>23</b>	<b>0,000</b>	0,075	0,268	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>

### 3.9.3 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων *uqcr11a – uqcr11b* (Πίνακας 10)

Πίνακας 10 Απεικόνιση των τιμών του *p-value* για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα *uqcr11a – uqcr11b*. Με έντονη γραφή απεικονίζονται τα στάδια στα οποία μεταξύ των σταδίων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων

	<i>hatching</i>	<i>1st feeding</i>	<i>flexion</i>	<i>end of larval rearing</i>	<i>metamorphosis</i>
<b>17</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>	0,317
<b>20</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	0,310
<b>23</b>	<b>0,000</b>	<b>0,048</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,061

### 3.9.4 Σύγκριση της έκφρασης των παραλόγων *uqcrfs1a – uqcrfs1b* (Πίνακας 11)

Πίνακας 11 Απεικόνιση των τιμών του *p-value* για την σύγκριση μεταξύ του κάθε σταδίου στην ίδια θερμοκρασία για τα παράλογα *uqcrfs1a – uqcrfs1b*. Με έντονη γραφή απεικονίζονται τα στάδια στα οποία μεταξύ των σταδίων υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων

	<i>hatching</i>	<i>1st feeding</i>	<i>flexion</i>	<i>end of larval rearing</i>	<i>metamorphosis</i>
<b>17</b>	0,133	<b>0,000</b>	<b>0,037</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
<b>20</b>	0,103	<b>0,000</b>	0,060	<b>0,000</b>	<b>0,047</b>
<b>23</b>	0,948	<b>0,014</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,070

## 4. Συζήτηση

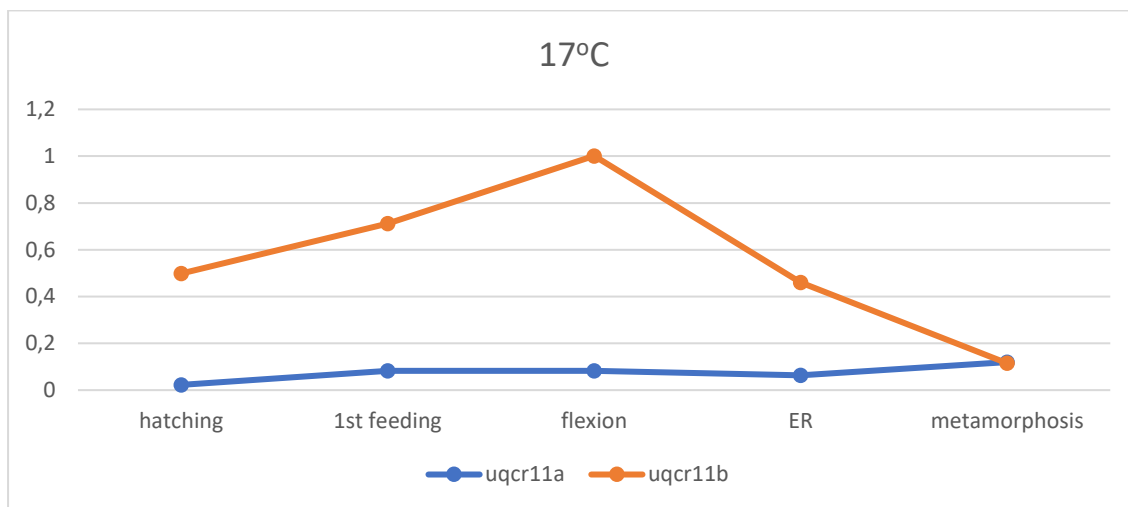
Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο λειτουργικός ρόλος μια σειράς γονιδίων του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του είδους *Sparus aurata* (τσιπούρα) κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού από το στάδιο της επιβολής μέχρι και την κατανάλωση του λεκιθικού σάκου. Μελετήθηκε πως η διαφοροποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών για σύντομο χρονικό διάστημα στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια επηρεάζει την οντογένεση των ψαριών μέχρι και το στάδιο της μεταμόρφωσης. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα *uqcrha*, *uqcrc2a*, *uqcr11a*, *uqcrfs1a* καθώς και τα παράλογα αυτών όπου έχουν προκύψει από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού του γονιδιώματος των σπονδυλωτών και τα οποία έχουν είτε ρυθμιστικό είτε καταλυτικό ρόλο στο σύμπλοκο III. Πιο συγκεκριμένα, το *uqcrfs1a* αποτελεί το μοναδικό γονίδιο με καταλυτικό ρόλο από τα υπό μελέτη γονίδια και σε συνδυασμό με το MT-CYB, CYC1 απαρτίζουν τους τρεις καταλυτικούς πυρήνες του συμπλόκου III (43).

### Παράλογα γονίδια

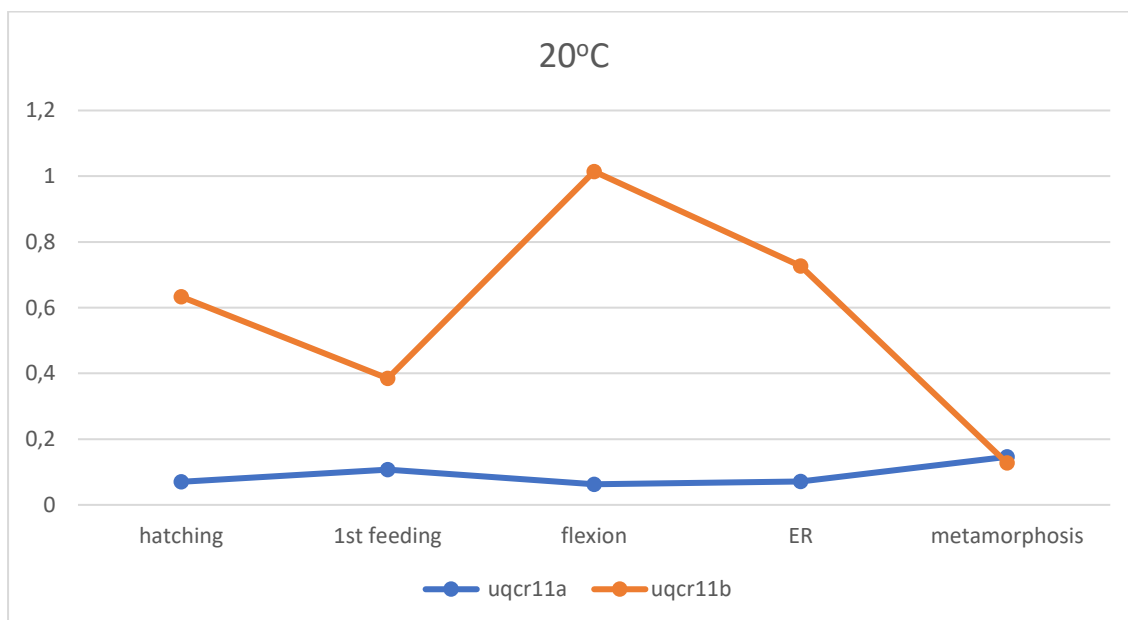
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ των παραλόγων γονιδίων τα οποία εκφράζονται όλα, σε κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης. Αναλυτικότερα, έγινε σύγκριση μεταξύ κάθε αναπτυξιακού σταδίου για κάθε διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης και υπολογίστηκαν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των γονιδίων. Για τα παράλογα *uqcrha* – *uqcrhb* δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδιακού προϊόντος στο σύνολο των θερμοκρασιών με εξαίρεση το στάδιο της μεταμόρφωσης. Όσον αφορά τα υπόλοιπα ζεύγη παραλόγων *uqcrc2a* – *uqcrc2b*, *uqcr11a* – *uqcr11b*, *uqcrfs1a* – *uqcrfs1b*, κατά κύριο λόγο οι διαφορές στην έκφραση του γονιδιακού προϊόντος σε όλα τα στάδια είναι στατιστικά σημαντικές με εξαίρεση το στάδιο της μεταμόρφωσης για τα παράλογα *uqcr11a* – *uqcr11b* και το στάδιο της εκκόλασης για τα παράλογα *uqcrfs1a* – *uqcrfs1b* στα οποία παρατηρήθηκαν παραπλήσια επίπεδα έκφρασης. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι όλα τα υπό εξέταση γονίδια έχουν συντηρηθεί εξελικτικά, δηλαδή ότι έχουν κρατήσει όλα τα χαρακτηριστικά ενός λειτουργικού γονιδίου και δεν έχουν μετατραπεί σε ψευδογονίδια μέσω της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων. Επιπλέον, από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, λαμβάνοντας υπόψη τα ποσοστά ομοιότητας της πεπτιδικής αλληλουχίας, τον βαθμό συντήρησης δευτεροταγών δομών, την ύπαρξη σηματοδοτικού πεπτιδίου για την είσοδο στο μιτοχόνδριο (δεν παρουσιάζονται δεδομένα) αλλά και την πολυπλοκότητα της δομής και συναρμολόγησης του συμπλόκου, φαίνεται απίθανο να έχει προκύψει εξελικτικά η εμφάνιση νέας λειτουργίας (neofunctionalization). Επίσης η παρατηρούμενη διαφορική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων, τουλάχιστον όσον αφορά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια ίσως υποδεικνύει διαφορές στην ρύθμιση της έκφρασης μεταξύ των παραλόγων γεγονός αποτελεί ένδειξη διαμερισματοποιημένης λειτουργίας (subfunctionalization) ως πιθανό εξελικτικό μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την διατήρηση των συγκεκριμένων γονιδίων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα παράλογα *uqcr11a* – *uqcr11b* όπου παρατηρήθηκε πως ενώ κατά τα αναπτυξιακά στάδια μέχρι και πριν την μεταμόρφωση είχαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους, στην μεταμόρφωση τα επίπεδα έκφρασης τους εξισοροπήθηκαν. Η κατάσταση αυτή παρατηρήθηκε και στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες όπως φαίνεται στις Εικόνες 37, 38, 39. Δεν έχουμε δεδομένα για το πως συνεχίζεται αυτό το μοτίβο έκφρασης μεταξύ των παραλόγων για τα επόμενα στάδια ανάπτυξης του ιχθυδίου, αν έχουμε δηλαδή αντιστροφή στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των παραλόγων ή αν τα παράλογα συνεχίζουν να εκφράζονται στο ίδιο επίπεδο. Μπορούμε να πούμε επίσης πως το παράλογο *uqcr11a* στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία ανάπτυξης ενώ η έκφραση του στο στάδιο της μεταμόρφωσης αυξάνεται χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφραση στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης. Είναι πιθανό, το *uqcr11b* να κωδικοποιεί για την εμβρυική ισομορφία και να αντικαθίσταται στο τέλος της ανάπτυξης από το

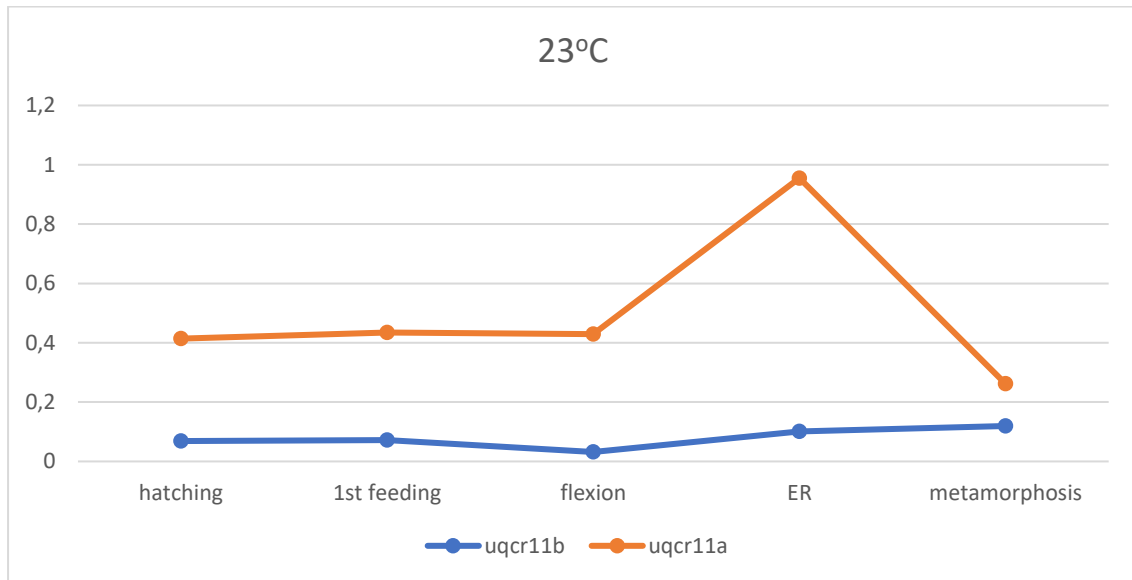
προϊόν το *uqcr11a*, που αποτελεί την ενήλικη μορφή. Αυτό το πρότυπο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ζεύγη παραλόγων στην οντογένεση στην τσιπούρα (44).



Εικόνα 37 απεικόνιση των μέσων τιμών έκφρασης των παραλόγων *uqcr11a* - *uqcr11b* στα πέντε αναπτυξιακά στάδια στους 17°C



Εικόνα 38 απεικόνιση των μέσων τιμών έκφρασης των παραλόγων *uqcr11a* - *uqcr11b* στα πέντε αναπτυξιακά στάδια στους 20°C



Εικόνα 39 απεικόνιση των μέσων τιμών έκφρασης των παραλόγων *uqcr11a* - *uqcr11b* στα πέντε αναπτυξιακά στάδια στους 23°C

#### Διαφορετικές Θερμοκρασίες (17, 20, 23°C) για κάθε αναπτυξιακό στάδιο

Από τα δεδομένα που προέκυψαν, έγινε εμφανές πως οι τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες στις οποίες αναπτύχθηκαν τα ιχθύδια οδηγούν σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στα ίδια αναπτυξιακά στάδια. Παρατηρήθηκε πως η θερμοκρασία επηρεάζει διαφορετικά το κάθε αναπτυξιακό στάδιο ενώ μεταξύ των παραλόγων στην πλειονότητα των αναπτυξιακών σταδίων η θερμοκρασία επηρέαζε με τον ίδιο τρόπο το πρότυπο έκφρασης τους. Εξαιρέση σε αυτό αποτελεί το στάδιο της μεταμόρφωσης όπου μεταξύ των παραλόγων *uqcrha* – *uqcrhb*, *uqcrc2a* – *uqcrc2b* και *uqcr11a* – *uqcr11b* δεν παρατηρείται κοινός τρόπος μεταβολής της έκφρασης των γονιδίων με τη μεταβολή της θερμοκρασίας.

Κοινά μοτίβα μεταβολής της έκφρασης στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο σε συνάρτηση με την θερμοκρασία παρατηρήθηκαν και μεταξύ μη παράλογων γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το στάδιο «end of larvae rearing» τα γονίδια *uqcrha*, *uqcrhb*, *uqcrc2a*, *uqcrc2b*, *uqcr11a* και *uqcr11b* εμφάνισαν κοινό προφίλ μεταβολής της έκφρασης τους σε συνάρτηση με την θερμοκρασία με τα χαμηλότερα επίπεδα να εντοπίζονται στους 17°C και να αυξάνονται προοδευτικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Διαφοροποίηση εμφανίζεται στο γονίδιο *uqcrc2b* όπου παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα έκφρασης στις θερμοκρασίες 20 και 23°C. Αντίθετα με ότι παρατηρήθηκε στα παραπάνω ρυθμιστικά γονίδια, το καταλυτικό γονίδιο *uqcrfs1a* και το παράλογο *uqcrfs1b* αυτού υιοθετούν ένα διαφορετικό πρότυπο όπου τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης συναντώνται στους 17°C. Επιπλέον, στο στάδιο αυτό εμφανίζονται και οι περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης σε όλα τα γονίδια γεγονός που υποδηλώνει πως η θερμοκρασία επηρεάζει περισσότερο το νεαρό ιχθύδιο όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας στο χρονικό σημείο αυτό.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο στάδιο της μεταμόρφωσης η διακύμανση των επιπέδων έκφρασης εξαιτίας των διαφορετικών θερμοκρασιών μειώνεται σε σημαντικό βαθμό συγκριτικά με ότι συμβαίνει στα προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια. Πιο συγκεκριμένα, στα γονίδια *uqcr11a*, *uqcr11b*, *uqcrhb* και *uqcrc2b* δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των γονιδίων στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης στο στάδιο αυτό. Φαίνεται δηλαδή ότι η θερμοκρασία σταματάει να επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο εκφράζονται τα γονίδια.

### Οντογενετικά πρότυπα έκφρασης στις θερμοκρασίες 17, 20 ,23C°

Από τα δεδομένα που προέκυψαν έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων μεταξύ αναπτυξιακών σταδίων για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 ,23C°, για να διαπιστωθεί αν η μεταβολή της θερμοκρασίας επηρεάζει τα πρότυπα έκφρασης μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων.

Παρατηρήθηκε ότι στους 23°C είχαμε τις χαμηλότερες τιμές έκφρασης στα γονίδια *uqcrha*, *uqcrhb*, *uqcrc2a*, *uqcrfs1a* και *uqcrc2b* στην πλειονότητα των αναπτυξιακών σταδίων. Γενικότερα, έχει βρεθεί πως οι τελεόστεοι αποκρίνονται στις υψηλές θερμοκρασίες του νερού μέσω έκκρισης στρεσογόνων ουσιών όπως είναι η κορτιζόλη (45). Η κορτιζόλη έχει χαρακτηριστεί ως ισχυρός επαγωγέας της ατροφίας των σκελετικών μυών επηρεάζοντας και με αυτόν τον τρόπο τον αριθμό των μιτοχονδρίων στον ιστό του αυτού (46).



## 5. Συμπεράσματα

Στο πείραμα πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων *uqcrha*, *uqcrc2a*, *uqcr11a*, *uqcrfs1a* καθώς και για τα παράλογα αυτών. Τα ψάρια εκτράφηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης μέχρι και το πέρας της κατανάλωσης του λεκιθικού σάκου. Ύστερα η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 20C° και συλλέχθηκαν δείγματα για τα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια (1<sup>st</sup> feeding, flexion, end of larvae rearing και metamorphosis). Τα δεδομένα κατέδειξαν σαφώς πως η θερμοκρασία στα αρχικά στάδια ανάπτυξης επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων.

Παρατηρήσαμε επίσης, πως η επίδραση της θερμοκρασίας άρχισε να εξασθενεί στο στάδιο της μεταμόρφωσης όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Για να επικυρώσουμε την υπόθεση αυτή μπορούμε να επαναλάβουμε το ίδιο πείραμα και να συλλέξουμε δείγματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ο τρόπος με τον οποίο η θερμοκρασία επηρεάζει τον φαινότυπο των ψαριών δεν είναι γνωστός όπως και η χρονική διάρκεια αυτής της ρύθμισης. Θα μπορούσε να πραγματοποιείται μέσω κάποιας επιγενετικής τροποποίησης επηρεάζοντας το πρότυπο μεθυλίωσης του γονιδιώματος. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί στο λαβράκι όπου η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει τον καθορισμό του φύλου μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων επηρεάζοντας τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *cyp19a1* (47). Επιπλέον, στοιχεία και από άλλα είδη που ανήκουν στους τελεόστεους καταδεικνύουν πως η θερμοκρασία επηρεάζει το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA. Πιο συγκεκριμένα στο ψάρι ζέβρα παρατηρήθηκε διαφορετική ρύθμιση των DNA μεθυλοτρανσφερασών (*dnmt*) σε διαφορετικές θερμοκρασίες εκτροφής κάτι που υποδηλώνει την επίδραση της θερμοκρασίας στην μεθυλίωση του DNA (48).

Τέλος, περισσότερα δεδομένα για τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων κι άλλων συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων καθώς και για τον αριθμό των μιτοχονδρίων και το πως αυτός ο αριθμός μεταβάλλεται σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο στους διαφορετικούς ιστούς θα μας δώσει ασφαλέστερα δεδομένα για το πως ο μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επηρεάζεται στο κάθε αναπτυξιακό στάδιο από την επίδραση της θερμοκρασίας.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaïskou, N., Magoulas, A., Rossi, A.R., Rye, M., Triantafyllidis, A., C.S. Tsigenopoulos, C.S., 2014. Gilthead seabream - *Sparus aurata*
2. Basurco, B., Lovatelli, A., García, B., 2011. Current Status of Sparidae Aquaculture, in: Pavlidis, M.A., Mylonas, C.C. (Eds.), *Sparidae*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 1–50. <https://doi.org/10.1002/9781444392210.ch1>
3. Zohar, Y., Abraham, M., Gordin, H., 1978. The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18, 877–882. <https://doi.org/10.1051/rnd:19780519>
4. 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*.
5. Ronnestad, I., Koven, W.M., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biology* 120, 187–196. <https://doi.org/10.1007/BF003496786>
6. Rahman, M., Miah, M., Taher, M., Hasan, M., 1970. Embryonic and larval development of guchibaim, *Mastacembelus pancalus* (Hamilton). *J Bangladesh Agric Univ* 7, 193–204. <https://doi.org/10.3329/jbau.v7i1.4984>
7. Aral, F., Sahnoz, E., Dogu, Z., 2011. Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish, in: Aral, F. (Ed.), *Recent Advances in Fish Farms*. InTech. <https://doi.org/10.5772/17687>
8. Patruno, M., Radaelli, G., Mascarello, F., Candia Carnevali, M.D., 1998. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anatomy and Embryology* 198, 487–504. <https://doi.org/10.1007/s004290050199>
9. Ετήσια έκθεση ΣΕΘ 2020 <https://www.fgm.com.gr/>
10. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L., 2012. *BIOΧΗΜΕΙΑ*. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
11. Cooper, G.M., Hausman, R.E., 2013. *Το κύτταρο: μια μοριακή προσέγγιση*. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
12. Brown, K.H., 2008. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *J Fish Biology* 72, 355–374. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01690.x>

13. Sousa, J.S., D'Imprima, E., Vonck, J., 2018. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes, in: Harris, J.R., Boekema, E.J. (Eds.), Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Springer Singapore, Singapore, pp. 167–227. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7)
14. Papa S., Martino P.L., Capitanio G., Gaballo A., Rasmø D., Signorile A., Petruzzella V., 2012. The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. In: Scatena R., Bottoni P., Giardina B. (eds) Advances in Mitochondrial Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 942. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1).
15. Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., 2007. Analysis of the Assembly Profiles for Mitochondrial- and Nuclear-DNA-Encoded Subunits into Complex I. Mol Cell Biol 27, 4228–4237. <https://doi.org/10.1128/MCB.00074-07>
16. Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., Zickermann, V., 2016. Structure and function of mitochondrial complex I. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, SI: Respiratory Complex I 1857, 902–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>
17. Hägerhäll, C., 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1320, 107–141. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00019-4)
18. Signes, A., Fernandez-Vizarra, E., 2018. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. Essays in Biochemistry 62, 255–270. <https://doi.org/10.1042/EBC20170098>
19. Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J., 1997. Crystal Structure of the Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex from Bovine Heart Mitochondria. Science 277, 60–66. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.60>
20. Iwata, S., 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex. Science 281, 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>
21. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S., 1996. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. Science 272, 1136–1144. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136>
22. Kasahara M., (2007), The 2R hypothesis: an update, Current Opinion in Immunology. Volume 19, Issue 5, Pages 547-552, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.009>.
23. Meyer, A., Van de Peer, Y., 2005. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). Bioessays 27, 937–945. <https://doi.org/10.1002/bies.20293>
24. Glasauer, S.M.K., Neuhauss, S.C.F., 2014. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. Mol Genet Genomics 289, 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>

25. Zhang, J., 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)
26. Ohno, S., 1970. The Enormous Diversity in Genome Sizes of Fish as a Reflection of Nature's Extensive Experiments with Gene Duplication. *Transactions of the American Fisheries Society* 99, 120–130. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1970\)99<120:TEDIGS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1970)99<120:TEDIGS>2.0.CO;2)
27. Irvine, S.Q., Carr, J.L., Bailey, W.J., Kawasaki, K., Shimizu, N., Amemiya, C.T., Ruddle, F.H., 2002. Genomic analysis of Hox clusters in the sea lamprey *Petromyzon marinus*. *J. Exp. Zool.* 294, 47–62. <https://doi.org/10.1002/jez.10090>
28. Conant, G.C., Wolfe, K.H., 2008. Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* 9, 938–950. <https://doi.org/10.1038/nrg2482>
29. 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. *Sci Rep* 11, 8787. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88306-4>
30. Loizides, M., Georgakopoulou, E., Christou, M., Iliopoulou, M., Papadakis, I., Katharios, P., Divanach, P., Koumoundouros, G., 2014. Thermally-induced phenotypic plasticity in gilthead seabream *Sparus aurata* L. (Perciformes, Sparidae). *Aquaculture* 432, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.002>
31. Koumoundouros, G., 2010. Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture Research*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 125–148.
32. Hachim, M., Rouyer, T., Dutto, G., Kerzerho, V., Bernard, S., Bourjea, J., McKenzie, D.J., 2021. Oxygen uptake, heart rate and activities of locomotor muscles during a critical swimming speed protocol in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J Fish Biol* 98, 886–890. <https://doi.org/10.1111/jfb.14621>
33. Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 257–260. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9)
34. 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, 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
35. 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, e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
36. Beacon Designer 5.10 Manual, (2006), Copyright. PREMIER Biosoft International

37. 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, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
38. The UniProt Consortium., 2021. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 49, D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
39. Powerful Gene Set Analysis | GeneAnalytics - Your Gene Set, In Context <https://geneanalytics.genecards.org/> (accessed 10.7.21).
40. ThermoFischer scientific, StepOne™ Software v2.3, Available at: <https://www.thermofisher.com/>
41. Microsoft Corporation, 2018. Microsoft Excel, Available at: <https://office.microsoft.com/excel>
42. Rey, D., Neuhäuser, M., 2011. Wilcoxon-Signed-Rank Test, in: Lovric, M. (Ed.), *International Encyclopedia of Statistical Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1658–1659. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2\\_616](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04898-2_616)
43. Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2015. Unraveling the Molecular Signatures of Oxidative Phosphorylation to Cope with the Nutritionally Changing Metabolic Capabilities of Liver and Muscle Tissues in Farmed Fish. *PLoS ONE* 10, e0122889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122889>
44. Georgiou, S., Alami-Durante, H., Power, D.M., Sarropoulou, E., Mamuris, Z., Moutou, K.A., 2016. Transient up- and down-regulation of expression of myosin light chain 2 and myostatin mRNA mark the changes from stratified hyperplasia to muscle fiber hypertrophy in larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Cell Tissue Res* 363, 541–554. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2254-0>.
45. Samaras, A., Papandroulakis, N., Lika, K., Pavlidis, M., 2018. Water temperature modifies the acute stress response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (1758). *Journal of Thermal Biology* 78, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.09.006>
46. Aedo, J.E., Maldonado, J., Aballai, V., Estrada, J.M., Bastias-Molina, M., Meneses, C., Gallardo-Escarate, C., Silva, H., Molina, A., Valdés, J.A., 2015. mRNA-seq reveals skeletal muscle atrophy in response to handling stress in a marine teleost, the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*). *BMC Genomics* 16, 1024. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2232-7>
47. Shen, Z.-G., Wang, H.-P., 2014. Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in Teleost fish. *Genet Sel Evol* 46, 26. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-26>
48. Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D.J., Craig, P.M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., Mennigen, J.A., 2018. Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 224, 210–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006>

## 7. Παράρτημα

### 7.1 Έκφραση γονιδίου *uqrha*

Στους Πίνακες 12, 13, 14 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqrha* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23C° αντίστοιχα.

Πίνακας 12 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrha* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,140	0,181	0,122	0,022	0,065
ελάχιστη	0,382	0,264	0,250	0,168	0,174
<b>διάμεσος</b>	<b>0,158</b>	<b>0,203</b>	<b>0,157</b>	<b>0,045</b>	<b>0,113</b>
μέση τιμή	0,192	0,211	0,171	0,069	0,112
τυπική απόκλιση	0,075	0,025	0,042	0,050	0,035

Πίνακας 13 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrha* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,156	0,124	0,134	0,020	0,021
ελάχιστη	0,446	0,258	0,333	0,176	0,133
<b>διάμεσος</b>	<b>0,277</b>	<b>0,164</b>	<b>0,212</b>	<b>0,061</b>	<b>0,057</b>
μέση τιμή	0,282	0,176	0,217	0,078	0,060
τυπική απόκλιση	0,082	0,043	0,062	0,047	0,032

Πίνακας 14 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrha* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,109	0,086	0,021	0,102	0,000
ελάχιστη	0,171	0,195	0,053	0,230	0,083
<b>διάμεσος</b>	<b>0,140</b>	<b>0,110</b>	<b>0,044</b>	<b>0,134</b>	<b>0,031</b>
μέση τιμή	0,141	0,118	0,041	0,152	0,03389
τυπική απόκλιση	0,016	0,0332	0,0113	0,043	0,030

Στους Πίνακες 15 – 19 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqrha* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 15 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrha* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,139	0,156	0,109
ελάχιστη	0,382	0,446	0,171
<b>διάμεσος</b>	<b>0,158</b>	<b>0,277</b>	<b>0,140</b>
μέση τιμή	0,191	0,281	0,141
τυπική απόκλιση	0,075	0,082	0,016

Πίνακας 16 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrha* στο στάδιο 1<sup>st</sup> feeding για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,180	0,124	0,086
ελάχιστη	0,263	0,258	0,195
<b>διάμεσος</b>	<b>0,202</b>	<b>0,164</b>	<b>0,110</b>
μέση τιμή	0,210	0,176	0,118
τυπική απόκλιση	0,025	0,043	0,033

Πίνακας 17 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrha* στο στάδιο flexion για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Flexion	17	20	23
μέγιστη	0,122	0,134	0,021
ελάχιστη	0,250	0,333	0,053
<b>διάμεσος</b>	<b>0,156</b>	<b>0,212</b>	<b>0,045</b>
μέση τιμή	0,170	0,217	0,041
τυπική απόκλιση	0,041	0,062	0,011

Πίνακας 18 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrha* στο στάδιο end of larvae rearing για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

End of larvae rearing	17	20	23
μέγιστη	0,021	0,020	0,102
ελάχιστη	0,167	0,176	0,230
<b>διάμεσος</b>	<b>0,045</b>	<b>0,060</b>	<b>0,134</b>
μέση τιμή	0,068	0,078	0,152
τυπική απόκλιση	0,050	0,047	0,042

Πίνακας 19 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrha* στο στάδιο metamorphosis για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Metamorphosis	17	20	23
μέγιστη	0,065	0,021	0,000
ελάχιστη	0,174	0,133	0,083
<b>διάμεσος</b>	<b>0,113</b>	<b>0,057</b>	<b>0,031</b>
μέση τιμή	0,112597	0,060709	0,033
τυπική απόκλιση	0,035	0,032	0,030

## 7.2 Έκφραση γονιδίου *uqcrhb*

Στους Πίνακες 20, 21, 22 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqcrhb* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα.



Πίνακας 20 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrhb* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,057	0,120	0,130	0,039	0,116
ελάχιστη	0,259	0,255	0,266	0,100	0,269
<b>διάμεσος</b>	<b>0,132</b>	<b>0,159</b>	<b>0,196</b>	<b>0,054</b>	<b>0,162</b>
μέση τιμή	0,137	0,169	0,194	0,059	0,180
τυπική απόκλιση	0,054	0,040	0,038	0,019	0,059

Πίνακας 21 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrhb* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,119	0,111	0,085	0,064	0,131
ελάχιστη	0,227	0,199	0,286	0,162	0,243
<b>διάμεσος</b>	<b>0,177</b>	<b>0,125</b>	<b>0,173</b>	<b>0,126</b>	<b>0,190</b>
μέση τιμή	0,179	0,136	0,177	0,119	0,184
τυπική απόκλιση	0,034	0,026	0,068	0,036	0,040

Πίνακας 22 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrhb* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,044	0,073	0,064	0,139	0,096
ελάχιστη	0,143	0,366	0,111	0,263	0,339
<b>διάμεσος</b>	<b>0,133</b>	<b>0,089</b>	<b>0,096</b>	<b>0,234</b>	<b>0,118</b>
μέση τιμή	0,117	0,122	0,092	0,211	0,171
τυπική απόκλιση	0,031	0,092	0,015	0,041	0,091

Στους Πίνακες 23 – 27 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqrhb* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 23 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrhb* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,057	0,119	0,044
ελάχιστη	0,299	0,227	0,143
<b>διάμεσος</b>	<b>0,132</b>	<b>0,177</b>	<b>0,133</b>
μέση τιμή	0,137	0,179	0,117
τυπική απόκλιση	0,054	0,033	0,032

Πίνακας 24 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrh*b στο στάδιο 1<sup>st</sup> feeding για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,120	0,111	0,073
ελάχιστη	0,254	0,199	0,366
<b>διάμεσος</b>	<b>0,159</b>	<b>0,125</b>	<b>0,089</b>
μέση τιμή	0,169	0,135	0,122
τυπική απόκλιση	0,040	0,026	0,092

Πίνακας 25 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrh*b στο στάδιο flexion για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Flexion	17	20	23
μέγιστη	0,130	0,085	0,064
ελάχιστη	0,266	0,285	0,111
<b>διάμεσος</b>	<b>0,196</b>	<b>0,174</b>	<b>0,096</b>
μέση τιμή	0,194	0,177	0,092
τυπική απόκλιση	0,039	0,068	0,015

Πίνακας 26 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrh*b στο στάδιο end of larvae rearing για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

End of larvae rearing	17	20	23
μέγιστη	0,038	0,064	0,139
ελάχιστη	0,100	0,161	0,263
<b>διάμεσος</b>	<b>0,054</b>	<b>0,126</b>	<b>0,234</b>
μέση τιμή	0,059	0,118	0,211
τυπική απόκλιση	0,019	0,036	0,042

Πίνακας 27 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrh*b στο στάδιο metamorphosis για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Metamorphosis	17	20	23
μέγιστη	0,116	0,131	0,097
ελάχιστη	0,269	0,242	0,339
<b>διάμεσος</b>	<b>0,162</b>	<b>0,190</b>	<b>0,118</b>
μέση τιμή	0,180	0,184	0,171
τυπική απόκλιση	0,059	0,040	0,091

### 7.3 Έκφραση γονιδίου *uqcr2a*

Στους Πίνακες 28, 29, 30 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqcr2a* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα.

Πίνακας 28 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2a* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,149	0,192	0,130	0,023	0,256
ελάχιστη	0,407	0,280	0,273	0,070	0,477
<b>διάμεσος</b>	<b>0,168</b>	<b>0,215</b>	<b>0,167</b>	<b>0,049</b>	<b>0,339</b>
μέση τιμή	0,204	0,224	0,184	0,048	0,346
τυπική απόκλιση	0,080	0,026	0,045	0,014	0,065

Πίνακας 29 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2a* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,166	0,132	0,144	0,075	0,222
ελάχιστη	0,475	0,275	0,359	0,189	0,436
<b>διάμεσος</b>	<b>0,295</b>	<b>0,175</b>	<b>0,219</b>	<b>0,144</b>	<b>0,265</b>
μέση τιμή	0,301	0,188	0,232	0,142	0,285
τυπική απόκλιση	0,087	0,046	0,066	0,032	0,063

Πίνακας 30 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2a* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,116	0,092	0,023	0,199	0,098
ελάχιστη	0,182	0,679	0,057	0,404	0,312
<b>διάμεσος</b>	<b>0,150</b>	<b>0,119</b>	<b>0,047</b>	<b>0,304</b>	<b>0,139</b>
μέση τιμή	0,151	0,195	0,044	0,302	0,172
τυπική απόκλιση	0,017	0,185	0,011	0,05	0,067

Στους Πίνακες 31 – 35 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *UQCRH11A* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 31 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2a* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,149	0,166	0,116
ελάχιστη	0,407	0,475	0,182
<b>διάμεσος</b>	<b>0,168</b>	<b>0,295</b>	<b>0,150</b>
μέση τιμή	0,204	0,300	0,151
τυπική απόκλιση	0,080	0,087759	0,017627

Πίνακας 32 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2a* στο στάδιο *1<sup>st</sup> feeding* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,193	0,132	0,092
ελάχιστη	0,281	0,275	0,679

<b>διάμεσος</b>	<b>0,216</b>	<b>0,175</b>	<b>0,120</b>
μέση τιμή	0,224	0,188	0,196
τυπική απόκλιση	0,027	0,046	0,186

Πίνακας 33 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2a* στο στάδιο flexion για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>Flexion</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>23</b>
μέγιστη	0,131	0,144	0,024
ελάχιστη	0,274	0,359	0,057
<b>διάμεσος</b>	<b>0,168</b>	<b>0,220</b>	<b>0,047</b>
μέση τιμή	0,184	0,233	0,044
τυπική απόκλιση	0,046	0,067	0,011

Πίνακας 34 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2a* στο στάδιο end of larvae rearing για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>End of larvae rearing</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>23</b>
μέγιστη	0,023	0,076	0,199
ελάχιστη	0,070	0,189	0,404
<b>διάμεσος</b>	<b>0,050</b>	<b>0,144</b>	<b>0,304</b>
μέση τιμή	0,048	0,143	0,303
τυπική απόκλιση	0,015	0,033	0,05

Πίνακας 35 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2a* στο στάδιο metamorphosis για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>Metamorphosis</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>23</b>
μέγιστη	0,256	0,222	0,098
ελάχιστη	0,478	0,437	0,312
<b>διάμεσος</b>	<b>0,339</b>	<b>0,266</b>	<b>0,140</b>
μέση τιμή	0,346	0,286	0,173
τυπική απόκλιση	0,066	0,063	0,067

#### 7.4 Έκφραση γονιδίου *uqrc2b*

Στους Πίνακες 36, 37, 38 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqrc2b* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23C° αντίστοιχα.

Πίνακας 36 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2b* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

<b>Θερμοκρασία 17 C°</b>	<b>Hatching</b>	<b>1<sup>st</sup> feeding</b>	<b>Flexion</b>	<b>End of larvae rearing (ER)</b>	<b>Metamorphosis</b>
μέγιστη	0,006	0,013	0,014	0,023	0,030
ελάχιστη	0,021	0,099	0,037	0,042	0,095
<b>διάμεσος</b>	<b>0,012</b>	<b>0,033</b>	<b>0,021</b>	<b>0,023</b>	<b>0,021</b>
μέση τιμή	0,013	0,038	0,024	0,024	0,050

τυπική απόκλιση	0,005	0,026	0,008	0,011	0,021
-----------------	-------	-------	-------	-------	-------

Πίνακας 37 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2b* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,004	0,020	0,000	0,034	0,015
ελάχιστη	0,022	0,081	0,037	0,097	0,058
<b>διάμεσος</b>	<b>0,012</b>	<b>0,048</b>	<b>0,015</b>	<b>0,053</b>	<b>0,024</b>
μέση τιμή	0,012	0,046	0,020	0,057	0,028
τυπική απόκλιση	0,006	0,020	0,013	0,020	0,014

Πίνακας 38 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2b* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,011	0,001	0,006	0,026	0,031
ελάχιστη	0,039	0,079	0,111	0,102	0,093
<b>διάμεσος</b>	<b>0,027</b>	<b>0,010</b>	<b>0,007</b>	<b>0,042</b>	<b>0,041</b>
μέση τιμή	0,0245	0,018	0,023233	0,049	0,050
τυπική απόκλιση	0,011	0,024	0,036	0,024	0,022

Στους Πίνακες 39 – 43 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqrc2b* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 39 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2b* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,005	0,004	0,011
ελάχιστη	0,021	0,022	0,039
<b>διάμεσος</b>	<b>0,012</b>	<b>0,012</b>	<b>0,027</b>
μέση τιμή	0,013	0,012	0,025
τυπική απόκλιση	0,005	0,006	0,011

Πίνακας 40 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc2b* στο στάδιο *1<sup>st</sup> feeding* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,013	0,020	0,001
ελάχιστη	0,099	0,081	0,079
<b>διάμεσος</b>	<b>0,033</b>	<b>0,048</b>	<b>0,010</b>
μέση τιμή	0,038	0,046	0,018
τυπική απόκλιση	0,026	0,020	0,024

Πίνακας 41 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2b* στο στάδιο *flexion* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Flexion	17	20	23
μέγιστη	0,014	0,000	0,006
ελάχιστη	0,037	0,037	0,111
<b>διάμεσος</b>	<b>0,021</b>	<b>0,015</b>	<b>0,007</b>
μέση τιμή	0,024	0,020	0,023
τυπική απόκλιση	0,008	0,013	0,036

Πίνακας 42 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2b* στο στάδιο *end of larvae rearing* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

End of larvae rearing	17	20	23
μέγιστη	0,023	0,034	0,026
ελάχιστη	0,042	0,097	0,102
<b>διάμεσος</b>	<b>0,023</b>	<b>0,053</b>	<b>0,042</b>
μέση τιμή	0,024	0,057	0,048
τυπική απόκλιση	0,011	0,020	0,024

Πίνακας 43 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr2b* στο στάδιο *metamorphosis* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Metamorphosis	17	20	23
μέγιστη	0,030	0,015	0,031
ελάχιστη	0,095	0,058	0,093
<b>διάμεσος</b>	<b>0,021</b>	<b>0,024</b>	<b>0,041</b>
μέση τιμή	0,050	0,028	0,050
τυπική απόκλιση	0,021	0,014	0,022

## 7.5 Έκφραση γονιδίου *uqcr11a*

Στους Πίνακες 44, 45, 46 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqcr11a* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23C° αντίστοιχα.

Πίνακας 44 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11a* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,017	0,071	0,059	0,044	0,120
ελάχιστη	0,089	0,111	0,206	0,088	0,240
<b>διάμεσος</b>	<b>0,022</b>	<b>0,082</b>	<b>0,082</b>	<b>0,064</b>	<b>0,120</b>
μέση τιμή	0,031	0,084	0,095	0,063	0,143
τυπική απόκλιση	0,022	0,013	0,044	0,017	0,05

Πίνακας 45 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11a* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,043	0,061	0,038	0,029	0,097
ελάχιστη	0,143	0,124	0,104	0,100	0,236
<b>διάμεσος</b>	<b>0,070</b>	<b>0,107</b>	<b>0,063</b>	<b>0,071</b>	<b>0,146</b>
μέση τιμή	0,078	0,097	0,064	0,068	0,147
τυπική απόκλιση	0,029	0,021	0,021	0,019	0,040

Πίνακας 46 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11a* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,050	0,042	0,021	0,074	0,067
ελάχιστη	0,094	0,250	0,058	0,133	0,188
<b>διάμεσος</b>	<b>0,069</b>	<b>0,072</b>	<b>0,032</b>	<b>0,101</b>	<b>0,119</b>
μέση τιμή	0,069	0,089	0,033	0,099	0,124
τυπική απόκλιση	0,012	0,062	0,011	0,017	0,046

Στους Πίνακες 47 – 51 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqrc11a* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 47 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11a* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,017	0,043	0,050
ελάχιστη	0,089	0,142	0,094
<b>διάμεσος</b>	<b>0,022</b>	<b>0,070</b>	<b>0,069</b>
μέση τιμή	0,031	0,078	0,069
τυπική απόκλιση	0,022	0,029	0,012

Πίνακας 48 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11a* στο στάδιο *1<sup>st</sup> feeding* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,071	0,061	0,043
ελάχιστη	0,111	0,124	0,250
<b>διάμεσος</b>	<b>0,082</b>	<b>0,107</b>	<b>0,072</b>
μέση τιμή	0,084	0,098	0,089
τυπική απόκλιση	0,013	0,021	0,062

Πίνακας 49 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11a* στο στάδιο *flexion* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Flexion	17	20	23
μέγιστη	0,059	0,038	0,021
ελάχιστη	0,206	0,104	0,058
<b>διάμεσος</b>	<b>0,082</b>	<b>0,063</b>	<b>0,032</b>

μέση τιμή	0,095	0,064	0,033
τυπική απόκλιση	0,044	0,021	0,011

Πίνακας 50 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11a* στο στάδιο *end of larvae rearing* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

End of larvae rearing	17	20	23
μέγιστη	0,044	0,028	0,075
ελάχιστη	0,088	0,100	0,133
<b>διάμεσος</b>	<b>0,064</b>	<b>0,071</b>	<b>0,101</b>
μέση τιμή	0,063	0,068	0,099
τυπική απόκλιση	0,017	0,019	0,017

Πίνακας 51 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11a* στο στάδιο *metamorphosis* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Metamorphosis	17	20	23
μέγιστη	0,120	0,097	0,067
ελάχιστη	0,240	0,236	0,188
<b>διάμεσος</b>	<b>0,120</b>	<b>0,146</b>	<b>0,119</b>
μέση τιμή	0,143	0,147	0,124
τυπική απόκλιση	0,054	0,040	0,046

## 7.6 Έκφραση γονιδίου *uqcr11b*

Στους Πίνακες 52, 53, 54 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqcr11b* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23°C αντίστοιχα.

Πίνακας 52 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11b* στους 17°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,342	0,535	0,620	0,281	0,096
ελάχιστη	1,338	0,739	2,802	0,508	0,316
<b>διάμεσος</b>	<b>0,498</b>	<b>0,712</b>	<b>1,001</b>	<b>0,461</b>	<b>0,115</b>
μέση τιμή	0,591	0,675	1,304	0,426	0,160
τυπική απόκλιση	0,290	0,071	0,719	0,077	0,075

Πίνακας 53 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11b* στους 20°C ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,491	0,093	1,014	0,116	0,103
ελάχιστη	0,972	0,548	1,807	1,615	0,376



<b>διάμεσος</b>	<b>0,633</b>	<b>0,385</b>	<b>1,014</b>	<b>0,727</b>	<b>0,127</b>
μέση τιμή	0,152	0,392	1,084	0,771	0,162
τυπική απόκλιση	0,152	0,133	0,415	0,440	0,089

Πίνακας 54 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11b* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,268	0,343	0,284	0,363	0,150
ελάχιστη	0,525	1,864	0,785	1,351	0,803
<b>διάμεσος</b>	<b>0,414</b>	<b>0,434</b>	<b>0,428</b>	<b>0,955</b>	<b>0,261</b>
μέση τιμή	0,406	0,593	0,450	0,871	0,348
τυπική απόκλιση	0,076	0,483	0,150	0,342	0,210

Στους Πίνακες 55 – 59 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqcr11b* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 55 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11b* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,342	0,491	0,268
ελάχιστη	1,338	0,972	0,525
<b>διάμεσος</b>	<b>0,498</b>	<b>0,633</b>	<b>0,414</b>
μέση τιμή	0,591	0,152	0,406
τυπική απόκλιση	0,290	0,152	0,076

Πίνακας 56 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11b* στο στάδιο *1<sup>st</sup> feeding* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,535	0,093	0,343
ελάχιστη	0,739	0,548	1,864
<b>διάμεσος</b>	<b>0,712</b>	<b>0,385</b>	<b>0,434</b>
μέση τιμή	0,675	0,392	0,593
τυπική απόκλιση	0,071	0,133	0,483

Πίνακας 57 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcr11b* στο στάδιο *flexion* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Flexion	17	20	23
μέγιστη	0,620	1,014	0,284
ελάχιστη	2,802	1,807	0,785
<b>διάμεσος</b>	<b>1,001</b>	<b>1,014</b>	<b>0,428</b>
μέση τιμή	1,304	1,084	0,450
τυπική απόκλιση	0,719	0,415	0,150

Πίνακας 58 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11b* στο στάδιο *end of larvae rearing* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

End of larvae rearing	17	20	23
μέγιστη	0,281	0,116	0,363
ελάχιστη	0,508	1,615	1,351
<b>διάμεσος</b>	<b>0,461</b>	<b>0,726</b>	<b>0,955</b>
μέση τιμή	0,426	0,771	0,871
τυπική απόκλιση	0,076	0,440	0,342

Πίνακας 59 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrc11b* στο στάδιο *metamorphosis* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Metamorphosis	17	20	23
μέγιστη	0,096	0,103	0,150
ελάχιστη	0,316	0,376	0,803
<b>διάμεσος</b>	<b>0,115</b>	<b>0,127</b>	<b>0,261</b>
μέση τιμή	0,160	0,162	0,348
τυπική απόκλιση	0,075	0,089	0,210

## 7.7 Έκφραση γονιδίου *uqrcfs1a*

Στους Πίνακες 60, 61, 62 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqrcfs1a* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23C° αντίστοιχα.

Πίνακας 60 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrcfs1a* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,291	0,680	1,138	1,177	0,846
ελάχιστη	0,860	0,828	3,227	2,543	1,245
<b>διάμεσος</b>	<b>0,344</b>	<b>0,828</b>	<b>1,598</b>	<b>1,910</b>	<b>1,005</b>
μέση τιμή	0,428	0,839	1,927	1,863	1,024
τυπική απόκλιση	0,175	0,129	0,733	0,388	0,147

Πίνακας 61 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrcfs1a* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,486	0,465	0,983	0,050	0,065
ελάχιστη	0,921	0,944	2,062	1,085	1,182
<b>διάμεσος</b>	<b>0,589</b>	<b>0,679</b>	<b>1,426</b>	<b>0,783</b>	<b>0,784</b>
μέση τιμή	0,644	0,705	1,393	0,681	0,738
τυπική απόκλιση	0,137	0,154	0,366	0,315	0,386

Πίνακας 62 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrf31a* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,260	0,498	0,540	0,131	0,034
ελάχιστη	0,539	1,238	0,969	1,925	0,847
<b>διάμεσος</b>	<b>0,421</b>	<b>0,935</b>	<b>0,723</b>	<b>1,381</b>	<b>0,315</b>
μέση τιμή	0,412	0,933	0,734	1,208	0,373
τυπική απόκλιση	0,082	0,292	0,114	0,526	0,288

Στους Πίνακες 63 – 67 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqcrf31a* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 63 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrf31a* στο στάδιο hatching για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Hatching	17	20	23
μέγιστη	0,291	0,486	0,260
ελάχιστη	0,860	0,921	0,539
<b>διάμεσος</b>	<b>0,344</b>	<b>0,589</b>	<b>0,421</b>
μέση τιμή	0,428	0,644	0,412
τυπική απόκλιση	0,175	0,137	0,082

Πίνακας 64 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrf31a* στο στάδιο 1<sup>st</sup> feeding για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

1 <sup>st</sup> feeding	17	20	23
μέγιστη	0,680	0,465	0,498
ελάχιστη	0,828	0,944	1,238
<b>διάμεσος</b>	<b>0,828</b>	<b>0,679</b>	<b>0,935</b>
μέση τιμή	0,839	0,705	0,933
τυπική απόκλιση	0,129	0,154	0,292

Πίνακας 65 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrf31a* στο στάδιο flexion για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Flexion	17	20	23
μέγιστη	1,138	0,983	0,540
ελάχιστη	3,227	2,062	0,969
<b>διάμεσος</b>	<b>1,598</b>	<b>1,426</b>	<b>0,723</b>
μέση τιμή	1,927	1,393	0,734
τυπική απόκλιση	0,733	0,366	0,114

Πίνακας 66 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrf31a* στο στάδιο end of larvae rearing για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

End of larvae rearing	17	20	23
μέγιστη	1,177	0,050	0,131
ελάχιστη	2,543	1,085	1,925

<b>διάμεσος</b>	<b>1,910</b>	<b>0,783</b>	<b>1,381</b>
μέση τιμή	1,863	0,681	1,208
τυπική απόκλιση	0,388	0,315	0,526

Πίνακας 67 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1a* στο στάδιο *metamorphosis* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>Metamorphosis</b>	17	20	23
μέγιστη	0,846	0,065	0,034
ελάχιστη	1,245	1,182	0,847
<b>διάμεσος</b>	<b>1,005</b>	<b>0,784</b>	<b>0,315</b>
μέση τιμή	1,024	0,738	0,373
τυπική απόκλιση	0,147	0,386	0,288

## 7.8 Έκφραση γονιδίου *uqcrfs1b*

Στους Πίνακες 68, 69, 70 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά για το γονίδιο *uqcrfs1b* για τα πέντε αναπτυξιακά στάδια σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης 17, 20 και 23C° αντίστοιχα.

Πίνακας 68 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στους 17C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 17 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,446	0,415	0,567	0,268	0,084
ελάχιστη	1,542	0,661	1,713	0,511	0,568
<b>διάμεσος</b>	<b>0,553</b>	<b>0,524</b>	<b>0,864</b>	<b>0,456</b>	<b>0,272</b>
μέση τιμή	0,680	0,524	0,936	0,421	0,294
τυπική απόκλιση	0,335	0,072	0,337	0,074	0,140

Πίνακας 69 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στους 20C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 20 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
μέγιστη	0,569	0,160	0,740	0,048	0,0189
ελάχιστη	1,345	0,334	1,474	0,502	0,389
διάμεσος	0,776	0,196	0,740	0,190	0,239
<b>μέση τιμή</b>	<b>0,243</b>	<b>0,215</b>	<b>0,844</b>	<b>0,203</b>	<b>0,229</b>
τυπική απόκλιση	0,243	0,053	0,363	0,133	0,111

Πίνακας 70 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στους 23C° ανά αναπτυξιακό στάδιο

Θερμοκρασία 23 C°	Hatching	1 <sup>st</sup> feeding	Flexion	End of larvae rearing (ER)	Metamorphosis
----------------------	----------	-------------------------	---------	----------------------------------	---------------

μέγιστη	0,258	0,140	0,250	0,111	0,036
ελάχιστη	0,489	1,107	0,622	0,519	0,249
διάμεσος	0,416	0,262	0,424	0,284	0,083
<b>μέση τιμή</b>	<b>0,406</b>	<b>0,351</b>	<b>0,433</b>	<b>0,302</b>	<b>0,107</b>
τυπική απόκλιση	0,068	0,291	0,096	0,127	0,068

Στους Πίνακες 71 – 75 φαίνονται τα περιγραφικά στατιστικά του γονιδίου *uqcrfs1b* για κάθε στάδιο ανάπτυξης ξεχωριστά στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 17, 20 και 23 C°.

Πίνακας 71 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στο στάδιο *hatching* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>Hatching</b>	17	20	23
μέγιστη	0,446	0,569	0,258
ελάχιστη	1,542	1,344	0,489
<b>διάμεσος</b>	<b>0,553</b>	<b>0,776</b>	<b>0,416</b>
μέση τιμή	0,680	0,243	0,406
τυπική απόκλιση	0,335	0,243	0,068

Πίνακας 72 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στο στάδιο *1st feeding* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>1<sup>st</sup> feeding</b>	17	20	23
μέγιστη	0,415	0,160	0,140
ελάχιστη	0,661	0,334	1,107
<b>διάμεσος</b>	<b>0,524</b>	<b>0,196</b>	<b>0,262</b>
μέση τιμή	0,524	0,215	0,351
τυπική απόκλιση	0,073	0,053	0,291

Πίνακας 73 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στο στάδιο *flexion* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>Flexion</b>	17	20	23
μέγιστη	0,567	0,740	0,250
ελάχιστη	1,713	1,474	0,622
<b>διάμεσος</b>	<b>0,863</b>	<b>0,740</b>	<b>0,424</b>
μέση τιμή	0,936	0,844	0,433
τυπική απόκλιση	0,337	0,363	0,096

Πίνακας 74 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqcrfs1b* στο στάδιο *end of larvae rearing* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

<b>End of larvae rearing</b>	17	20	23
μέγιστη	0,268	0,048	0,110
ελάχιστη	0,511	0,503	0,519
<b>διάμεσος</b>	<b>0,456</b>	<b>0,190</b>	<b>0,284</b>
μέση τιμή	0,421	0,203	0,302
τυπική απόκλιση	0,074	0,133	0,127

Πίνακας 75 περιγραφικά στατιστικά για την έκφραση του *uqrcfs1b* στο στάδιο *metamorphosis* για τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης

Metamorphosis	17	20	23
μέγιστη	0,084	0,019	0,036
ελάχιστη	0,569	0,389	0,249
<b>διάμεσος</b>	<b>0,272</b>	<b>0,239</b>	<b>0,083</b>
μέση τιμή	0,294	0,229	0,107
τυπική απόκλιση	0,140	0,111	0,068