

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

«Η επίδραση της κλιματικής αλλαγής στον κირκαδικό ρυθμό των ζώων- Το παράδειγμα των τελεόστεων και οι οικολογικές προεκτάσεις»

“The effect of climate change on animal circadian rhythms - the paradigm of teleosts and ecological implications”



ΦΥΤΣΙΑΗ ΑΛΕΞΙΑ – ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Λάρισα 2022

*«Η επίδραση της κλιματικής αλλαγής στον κίρκαδικό ρυθμό των ζώων-
Το παράδειγμα των τελεόστεων και οι οικολογικές προεκτάσεις»*

*“The effect of climate change on animal circadian rhythms - the
paradigm of teleosts and ecological implications”*

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Βιολογίας Σπονδυλωτών, Μούτου Αικατερίνης.



Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

- Μούτου Αικατερίνη

Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Σαραφίδου Θεολογία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Στάγκος Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Αικατερίνη Μούτου. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου από το 2020 μέχρι και σήμερα και παράλληλα να πραγματοποιήσω και την συγκεκριμένη εργασία, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση και εμπιστοσύνη της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο με τον οποίο συνεργάστηκα άριστα καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας, ο οποίος εάν και μελετά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και όπως λέει δεν έχει ασχοληθεί με τον κερκαδικό ρυθμό, με βοήθησε σε κάθε βήμα.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Επίκουρο καθηγητή Γονιδιωματικής, Εξέλιξης και Βιοποικιλότητας ή πιο απλά τον Θέμη που από την αρχή της ανάθεσης της εργασίας ήταν κάθε στιγμή πρόθυμος να με συμβουλέψει και να μου μάθει νέα πράγματα. Τον ευχαριστώ επίσης για την υπομονή και επιμονή του να προσπαθήσει να μου μάθει τον κόσμο της Βιοπληροφορικής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ραφαήλ Αγγελακόπουλο για τις χρήσιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας και την φιλική τους διάθεση.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής την κ. Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Στάγκο Δημήτριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κερκαδική ρυθμικότητα στη συμπεριφορά και το μεταβολισμό είναι ένα καθολικό φαινόμενο που έχει εντοπιστεί σε διαφορετικά είδη όπως μονοκύτταροι οργανισμοί, φυτά, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά. Η αναγκαιότητα της ύπαρξης της είναι αρκετά σαφής: η επιβίωση όλων αυτών των οργανισμών εξαρτάται από την προσαρμογή στις τακτικές αλλαγές του περιβάλλοντός τους, που ορίζονται κυρίως από την 24ωρη περίοδο περιστροφής της γης σε σχέση με τον ήλιο. Μεταβολές όπως η αύξηση της θερμοκρασίας ή η μεταβολή της φωτοπερίοδου, δύο αβιοτικών παράγοντων που έχουν άμεση σχέση με τις αλλαγές που προκαλεί η κλιματική αλλαγή, αποτελούν βασικούς παράγοντες που πιθανότατα επηρεάζουν την ρυθμικότητα. Οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν όλους τους οργανισμούς και μεταξύ αυτών και τους ιχθύες που είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δυο οργανισμοί, τσιπούρα και λαβράκι, με αυξημένο οικονομικό ενδιαφέρον λόγω της συστηματικής εκτροφής τους σε ιχθυοκαλλιέργειες τα τελευταία 25 χρόνια. Διερευνήθηκε η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης μιας σειράς γονιδίων που σχετίζονται με τον κερκαδικό ρυθμό, αρχικά με τεχνική αλληλούχησης του μεταγραφώματος και στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μέσω PCR πραγματικού χρόνου. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τέσσερα γονίδια του βασικού μηχανισμού του ρυθμού τα *clocka*, *arntl1a*, *arntl2*, *cry3a* και επιπλέον ένα γονίδιο που αποτελεί σήμα έναρξης της ταλάντωσης το *orn4a* και ένα γονίδιο που αποτελεί σήμα εξόδου του ρυθμού το *hry*. Στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και της ανάπτυξης στα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων αυτών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και πέντε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα γονίδια εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκρίσεις. Επιπλέον, δεν φαίνεται να υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο που ακολουθεί η έκφραση των γονιδίων ανάλογα με την αύξηση της θερμοκρασίας ή ανάλογη με την μετάβαση των σταδίων. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί με βάση τους προσαρμοστικούς μηχανισμούς των οργανισμών στις μεταβολές των θερμοκρασιών των ποικιλόθερμοι οργανισμοί και με βάση τις αναπτυξιακές μεταβολές και τις ενεργειακές απαιτήσεις.

ABSTRACT

Circadian rhythmicity in behavior and metabolism is a ubiquitous phenomenon in biology, documented in such diverse species as unicellular organisms, plants, invertebrates, and vertebrates. The reason is quite clear: the survival of all these organisms depends on adapting to the regular changes of their environment, defined mostly by the 24-hour period of earth's rotation relative to the sun. Changes on temperature or photoperiod, two abiotic factors that are directly related to the climate changes, are the key factors that are likely to affect at the rhythm. These changes affect all organisms, including fishes that are poikilotherm organisms.

In this study, two organism, *European sea bass* and *European sea bream* with increased economic interest due to their systematic rearing in fish farms in the last 25 years, were studied. The change in the expression levels of a series of genes related to the circadian rhythm was investigated, first by a transcriptome sequencing technique and then the expression levels were quantified by real-time PCR. Four genes of the basic mechanism of the rhythm were studied, *clocka*, *arntl1a*, *arntl2*, *cry3a*, and in addition, a gene that constitutes a rhythm input signal, *opn4a*, and a gene that constitutes a rhythm output signal, *npv*. The aim of the work was to study the effect of temperature and growth on the expression patterns of these genes. For this purpose, samples from three different temperatures and five early developmental stages were used.

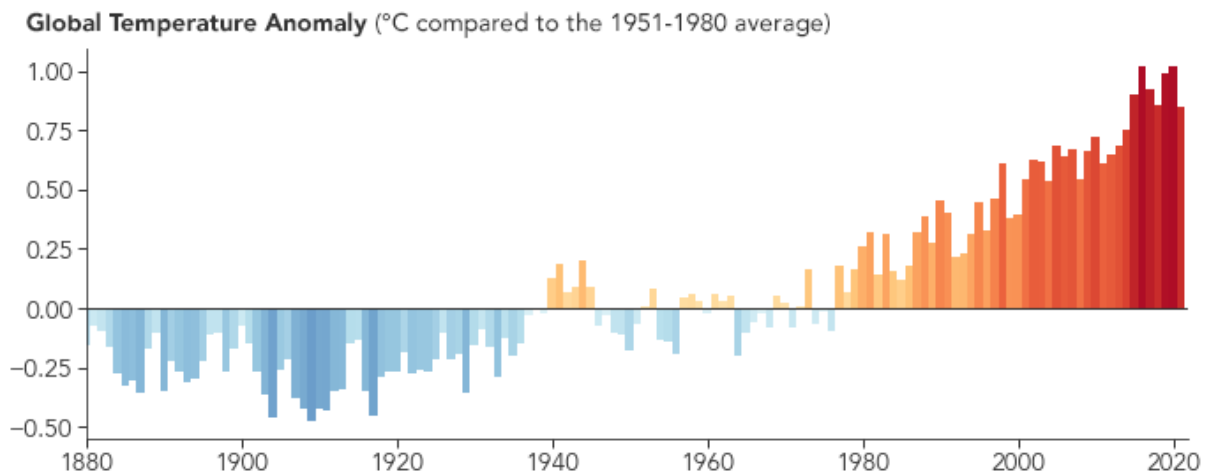
The results showed that all genes show statistically significant differences between the comparisons. Furthermore, there is no specific pattern that gene expression follows with increasing temperature or with stage transition. This could be interpreted based on the adaptive mechanisms of the organisms to the temperature changes of the poikilothermic organisms and based on the developmental changes and the energy requirements.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Η τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>) - γενικά χαρακτηριστικά.....	8
1.2 Το λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>) – γενικά χαρακτηριστικά.....	10
1.3 Αναπτυξιακά στάδια.....	12
1.4 Κλιματική αλλαγή και κίρκαδικός ρυθμός.....	14
1.5 Σημασία, οργάνωση, μοριακή βάση των κίρκαδικων ρολογιών	15
Οργάνωση του κίρκαδικού ρυθμού στα ψάρια.....	17
Μοριακή βάση του βιολογικού ρολογιού	20
Μεταφορά σήματος – έναρξη ταλάντωσης.....	22
Σήματα εξόδου	23
1.6 Αναπτυξιακά στάδια και εκκίνηση του ρολογιού	25
1.7 Σκοπός.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων	27
2.2 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA.....	29
2.3 Αλληλούχηση RNA (RNA – sequencing).....	30
2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων RNA-sequencing	30
2.5 PCR πραγματικού χρόνου (Real – time PCR).....	33
2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων Real – time PCR.....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1 RNA SEQUENCING – Τσιπούρα.....	41
3.2 Επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNASeq μέσω Real Time PCR.....	50
3.3 Σύνοψη.....	72
3.4 RNA SEQUENCING – Λαβράκι.....	74
3.5 Επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNASeq μέσω Real Time PCR.....	82
3.6 Σύνοψη.....	103
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	104
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	131
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	132
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	137

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κλιματική αλλαγή αποτελεί πιθανόν μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις που έχει να αντιμετωπίσει ο τομέας της υδατοκαλλιέργειας, καθώς φαίνεται να απειλεί την βιωσιμότητά της και την αειφορική παραγωγή (Brander et al., 2007). Πιο αναλυτικά, η μέση παγκόσμια θερμοκρασία έχει αυξηθεί σημαντικά από τη περίοδο της βιομηχανικής επανάστασης και η τελευταία δεκαετία ήταν η θερμότερη δεκαετία που έχει καταγραφεί. Από τα είκοσι θερμότερα χρόνια, τα δεκαεννιά έχουν συμβεί από το 2000 και μετέπειτα. Τα στοιχεία από την Υπηρεσία Κλιματικής Αλλαγής δείχνουν ότι το 2020 ήταν επίσης η θερμότερη χρονιά που έχει καταγραφεί για την Ευρώπη. Τα περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι αυτό οφείλεται στην αύξηση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που παράγονται από την ανθρώπινη δραστηριότητα. Η μέση παγκόσμια θερμοκρασία είναι σήμερα 0.95 έως 1.20 °C υψηλότερη από ότι στα τέλη του 19ου αιώνα. Οι επιστήμονες θεωρούν ως όριο με επικίνδυνες και καταστροφικές συνέπειες για το κλίμα και το περιβάλλον, την αύξηση κατά 2°C σε σύγκριση με τα προβιομηχανικά επίπεδα (Εικόνα 1) (Hoegh-Guldberg et al., 2018)



Εικόνα 1: μεταβολές της μέσης παγκόσμιας θερμοκρασίας (1880-2021) (Hoegh-Guldberg et al., 2018)

Τα δεδομένα γύρω από την κλιματική αλλαγή καθώς και η παγκόσμια ανησυχία για την επισιτιστική ασφάλεια οδήγησαν στη Συμφωνία του Παρισιού. Η Συμφωνία στοχεύει μακροπρόθεσμα στη σταθεροποίηση του ρυθμού της ανόδου της παγκόσμιας θερμοκρασίας σε επίπεδα κάτω των 2 βαθμών Κελσίου σε σχέση με τα προβιομηχανικά επίπεδα, προωθώντας τη

σταθεροποίηση της ανόδου κάτω του 1.5 βαθμού, καθώς αυτό θα μειώσει σημαντικά τους κινδύνους και τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής (Hoegh-Guldberg et al., 2018).

Οι μεταβολές στην ελαχίστη και μέγιστη θερμοκρασία δεν αφορούν μόνο την ατμοσφαιρική θερμοκρασία, αλλά και την θερμοκρασία των ωκεανών καθώς τα συστήματα αυτά είναι αλληλένδετα. Τα αλιεύματα αποτελούν σημαντικό παράγοντα της παγκόσμιας οικονομίας, είναι τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας και υπάρχει ανάγκη για αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής καθώς υπάρχει συνεχής αύξηση του πληθυσμού. Η επισιτιστική ασφάλεια και η αειφορία αποτελούν κύριους στόχους της στρατηγικής της Συμφωνίας του Παρισιού (Hoegh-Guldberg et al., 2018). Σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά και πιο ειδικά για την Ελλάδα, η τσιπούρα και το λαβράκι αποτελούν εκτρεφόμενα είδη με μεγάλη οικονομική σημασία, γεγονός που έχει κινήσει το ενδιαφέρον για την μελέτη των οργανισμών αυτών και των μηχανισμών που επηρεάζουν την ανάπτυξη τους. Οι μελέτες αυτές στοχεύουν στην αποσαφήνιση των μηχανισμών μέσω των οποίων επιδρά η κλιματική αλλαγή και η αύξηση της μέσης θερμοκρασίας στη λειτουργία των βιολογικών συστημάτων. Τα βιολογικά συστήματα είναι προσαρμοσμένα ώστε να αντιμετωπίζουν την αύξηση της θερμοκρασίας σε συγκεκριμένο εύρος (θερμοουδέτερη ζώνη), μέσω μιας σειράς μοριακών προσαρμογών. Εμφανίζουν, επομένως, μια θερμική πλαστικότητα το εύρος της οποίας διαφοροποιείται ανάλογα με τον οργανισμό και το ενδιαίτημά του. Το εύρος αυτό καθώς και οι επιπτώσεις της υπέρβασης των ορίων, είναι χρήσιμο να διερευνηθούν ώστε να χρησιμοποιηθεί η πληροφορία αυτή ως μια στρατηγική βελτίωσης των ιχθυοκαλλιεργειών, με στόχο την αντιμετώπιση των αρνητικών επιπτώσεων της κλιματικής αλλαγής. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των δύο ειδών τα καθιστούν ως χρήσιμα ερευνητικά μοντέλα και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη.

1.1 Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) - γενικά χαρακτηριστικά

Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)

Φύλο: Χορδωτά (*Chordata*)

Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (*Actinopterygii*)

Τάξη: Περκόμορφα (*Perciformes*)

Οικογένεια: Σπαρίδες (*Sparidae*)

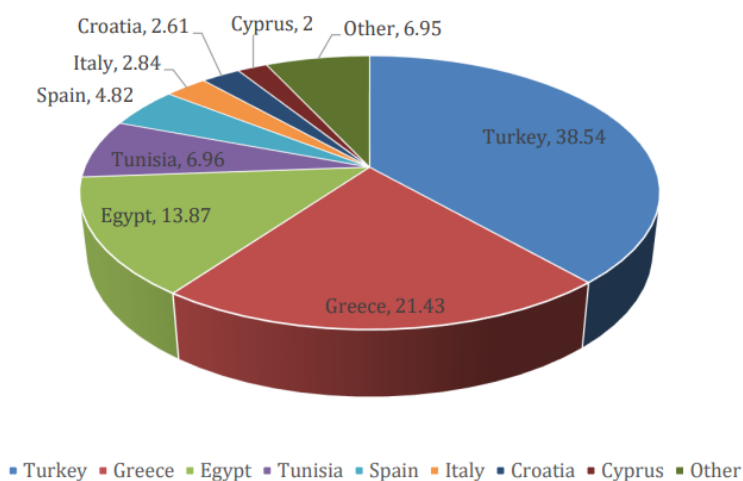
Γένος: *Sparus*



Είδος: *Sparus aurata*

Οικονομική σημασία

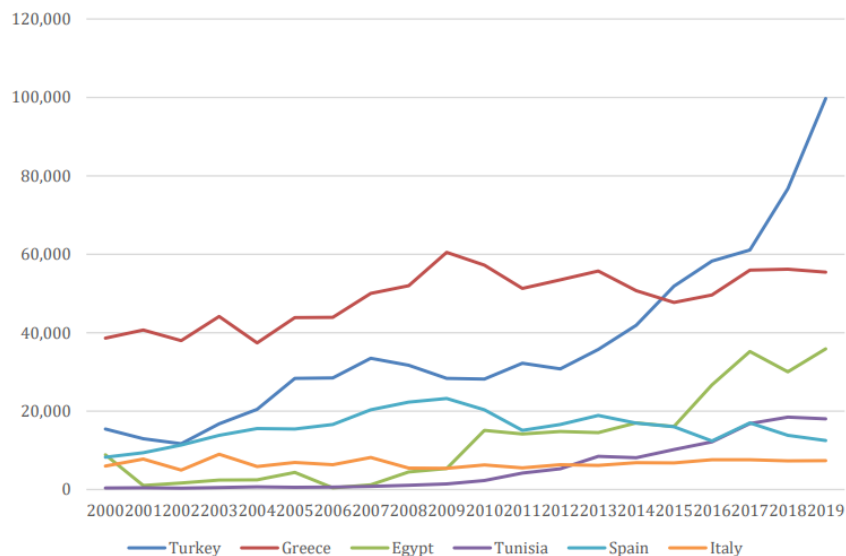
Η τσιπούρα βρίσκεται στη 33^η θέση παγκοσμίως ως είδος υδατοκαλλιέργειας. Κύρια χώρα παραγωγής είναι η Τουρκία με το 38.54% της παγκόσμιας παραγωγής και ακολουθεί η Ελλάδα με 21.43%. Η παραγωγή σε Ελλάδα και Ισπανία είναι σταθερή, ωστόσο η Αίγυπτος και η Τουρκία έχει αυξήσει σημαντικά την παραγωγή (Εικόνα 2). Ο κύριος εξαγωγέας παγκοσμίως είναι η Ελλάδα και ακολουθεί η Τουρκία, αν και η αξία των εξαγωγών της είναι πολύ μικρότερη από της Ελλάδας. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή της τσιπούρας έχει αυξηθεί από περίπου 87.303 τόνους το 2000 σε 258.754 τόνους το 2019 (Πίνακας 1, Εικόνα 3) (FAO, 2021).



Εικόνα 2: μερίδιο διαφορετικών χωρών στην παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας το 2019(%) (FAO, 2021)

Πίνακας 1: παραγωγή τσιπούρας 2019, 10 κορυφαίες χώρες παραγωγής παγκοσμίως (FAO, 2021)

Country	Production (Tonnes)	Share of global production (%)	Estimated ¹ production by numbers (millions)
Turkey	99,730	38.54	50 - 399
Greece	55,452	21.43	28 - 222
Egypt	35,880	13.87	18 - 144
Tunisia	18,017	6.96	9 - 72
Spain	12,475	4.82	6 - 50
Italy	7,350	2.84	4 - 29
Croatia	6,750	2.61	3 - 27
Cyprus	5,168	2	3 - 21
Israel	2,950	1.14	1 - 12
Albania	2,450	0.95	1 - 10



Εικόνα 3: παραγωγή τσιπούρας (τόνοι) για το χρονικό πλαίσιο 2000-2019, από τις έξι κορυφαίες χώρες παραγωγής (FAO, 2021)

1.2 Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) – γενικά χαρακτηριστικά

Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)

Φύλο: Χορδωτά (*Chordata*)

Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (*Actinopterygii*)

Τάξη: Περκόμορφα (*Perciformes*)

Οικογένεια: Μορονίδες (*Moronidae*)

Γένος: *Dicentrarchus*

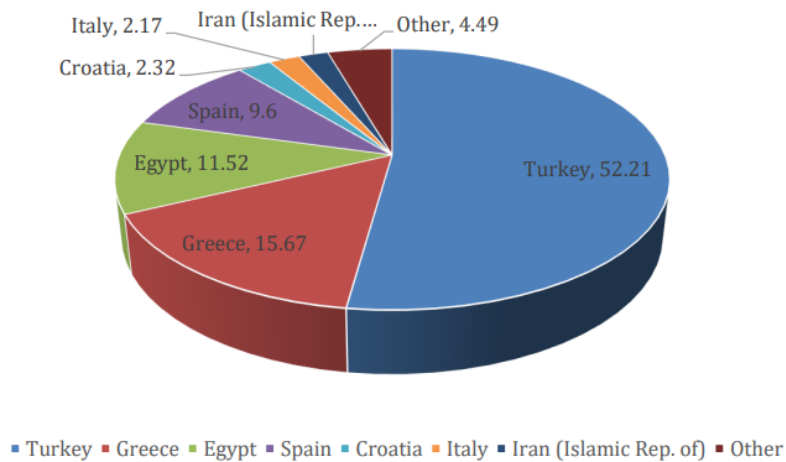
Είδος: *Dicentrarchus labrax*



Οικονομική σημασία

Το ευρωπαϊκό λαβράκι βρίσκεται στην 31^η θέση στην παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια των εκτρεφόμενων ψαριών. Ο κύριος παραγωγός είναι η Τουρκία που αντιπροσωπεύει το 52.21% της παγκόσμιας παραγωγής και ακολουθεί η Ελλάδα με 15.67% της συνολικής παραγωγής. Επιπλέον, ο κύριος εξαγωγέας παγκοσμίως είναι η Τουρκία και ακολουθεί η Ελλάδα, αν και η

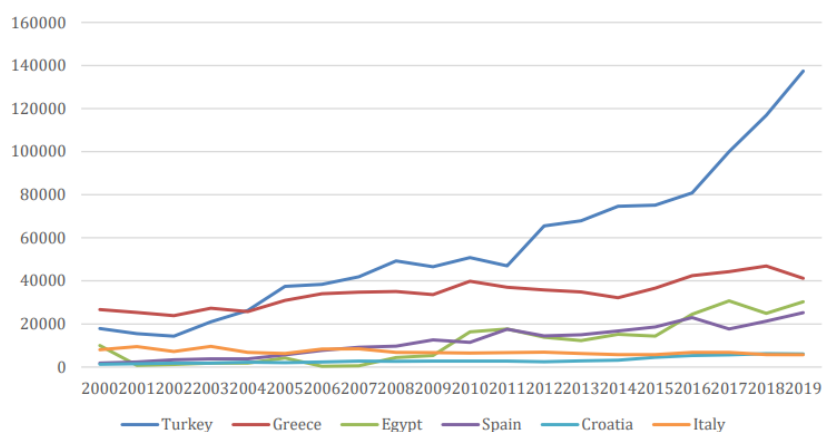
αξία των εξαγωγών της Τουρκίας είναι μικρότερη από την Ελλάδα (Εικόνα 4). Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής παγκοσμίως γίνεται σε θαλάσσια κλουβιά, αλλά η παραγωγή στην Αίγυπτο γίνεται σε χερσαίες λίμνες. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή στην Ευρώπη το 2019 ήταν περίπου 236.215 τόνοι (Πίνακας 2, Εικόνα 5) (FAO, 2021).



Εικόνα 4: μερίδιο διαφορετικών χωρών στην παγκόσμια παραγωγή λαβρακιού το 2019 (%) (FAO, 2021)

Πίνακας 2: παραγωγή λαβρακιού 2019 (FAO, 2021)

Country	Production (Tonnes)	Share of global production (%)	Estimated ¹ production by numbers (millions)
Turkey	137,419	52.21	55 - 550
Greece	41,237	15.67	16 - 165
Egypt	30,313	11.52	12 - 121
Spain	25,260	9.6	10 - 101
Croatia	6,100	2.32	2 - 24
Italy	5,720	2.17	2 - 23
Iran (Islamic Rep. of)	5,400	2.05	2 - 22
Tunisia	3,331	1.27	1 - 13
Cyprus	2,836	1.08	1 - 11
France	2,461	0.93	1 - 10



Εικόνα 5: παραγωγή λαβρακιού (τόνοι) για το χρονικό διάστημα 2000-2019 (FAO, 2021)

1.3 Αναπτυξιακά στάδια

Η τσιπούρα και το λαβράκι ανήκουν στην ίδια ταξινομική ομάδα (τελεόστεοι), επομένως, μοιράζονται κοινά πρότυπα ανάπτυξης με μικρές διαφορές, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στις θερμοκρασίες που επιλέγουν ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκονται και τις εποχές που επιλέγουν να αναπαραχθούν (Zanuy et al., 2001).

Ο διαχωρισμός των αναπτυξιακών σταδίων βασίζεται σε μορφολογικά, ιστολογικά και σχετικά με την φυσιολογία χαρακτηριστικά (Le Ruyet et al., 1993). Η ανάπτυξη του οργανισμού μπορεί να διακριθεί σε τρία βασικά στάδια. Πρώτο, το στάδιο του αυγού, περιλαμβάνει όλη τη διαδικασία από την γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη. Η ονομασία αυτή προτιμάται σε σχέση

με την «εμβρυική ανάπτυξη» καθώς υπάρχουν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το αυγό και όχι μόνο με το έμβρυο. Δεύτερο είναι το στάδιο της προνύμφης που αφορά την περίοδο μεταξύ της εκκόλαψης και της μεταμόρφωσης. Το τρίτο στάδιο, αυτό της ενηλικίωσης, περιλαμβάνει την έναρξη της μεταμόρφωσης και το εφηβικό στάδιο του ιχθυδίου μέχρι την επίτευξη αναπαραγωγικής ωριμότητας ως ενήλικο άτομο (Deplano et al., 1991).

Κατά την εκκόλαψη έχουν μέγεθος περίπου 2.5mm, βάρος 0.3-0.4 mg και μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικό βαθμό ανάπτυξης ανάλογα με το μέγεθος του λεκιθικού σάκου. Οι προνύμφες από αυγά με μικρούς λεκιθικούς σάκους είναι λιγότερο ανεπτυγμένες κατά την εκκόλαψη από εκείνες που εκκολάπτονται από αυγά με μεγαλύτερους. Οι προνύμφες αυτού του σταδίου συνήθως στερούνται λειτουργικότητας του στόματος, χρωματισμού του οφθαλμού, διαφοροποιημένων πτερυγίων και τρέφονται αποκλειστικά από την λέκιθο (Kendell et al., 1984).

Οι προνύμφες ανοίγουν το στόμα τους κατά την 5 ημέρα μετά την εκκόλαψη (Days Post Hatching, DPH), αλλά δεν καταναλώνουν εξ' ολοκλήρου εξωγενή τροφή. Υπάρχει μια μεταβατική περίοδος όπου τρέφονται ακόμα με λεκιθικά θρεπτικά και γίνεται προσπάθεια να τραφούν με εξωγενή τροφή. Αφού τελειώσει η λεκιθοτροφική φάση, το ιχθύδιο πρέπει να αναζητήσει άλλο είδος τροφής και από την 9 - 10 DPH τρέφεται αποκλειστικά από εξωγενή πηγή, η οποία είναι το πλαγκτόν. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου αναπτύσσονται σταδιακά όλο και περισσότερα χαρακτηριστικά του ενήλικου ατόμου (China et al., 2014).

Το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης παρουσιάζει διακριτές υποκατηγορίες:

- 1) Προνύμφη λεκιθικού σάκου: πρόκειται για το διάστημα μεταξύ εκκόλαψης και εξάντλησης του λεκιθικού σάκου.
- 2) Προνύμφη προ-κάμψης: αφορά την περίοδο από την εξάντληση του λεκιθικού σάκου μέχρι την ανοδική κάμψη της νωτοχορδής.
- 3) Προνύμφη κάμψης: από την ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής μέχρι τα πλευρικά οστά να φτάσουν στην κατακόρυφη θέση.
- 4) Προνύμφη μετά-κάμψης: από τον σχηματισμό του ουραίου πτερυγίου και εμφάνιση εξωτερικών μεριστικών χαρακτηριστικών όπως ακτινωτό πτερύγιο (Aral et al., 2011).

Στο τέλος του σταδίου της ανάπτυξης των προνυμφών, αυτές δύναται να περάσουν μέσω μιας απότομης μεταμόρφωσης στο στάδιο της νεανικής ηλικίας, ειδικά εάν υπάρχει μετακίνηση από ένα πελαγικό σε ένα βενθικό βιότοπο αλλιώς ο μετασχηματισμός είναι βαθμιαίος. Μορφολογικά αυτό το στάδιο της μεταμόρφωσης χαρακτηρίζεται από μεταβολές στη μορφή και το σχήμα του σώματος που από προνύμφη μεταβαίνει στην νεανική- ενήλικη ζωή. Δύο οντογενετικές διεργασίες συμβαίνουν κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου μετάβασης μεταξύ της προνύμφης και του νεαρού:

- 1) απώλεια εξειδικευμένων χαρακτηριστικών προνυμφών
- 2) επίτευξη χαρακτήρων ανηλίκων-ενήλικων.

Οι αλλαγές που συμβαίνουν περιλαμβάνουν το μοτίβο της χρωστικής, το σχήμα του σώματος, τη μετανάστευση πτερυγίων, σχηματισμό φωτοφόρων, απώλεια επίμηκων πτερυγίων και ακανθών της κεφαλής, μετανάστευση των ματιών και σχηματισμός λεπιών (Patruno et al., 1998).

1.4 Κλιματική αλλαγή και κερκαδικός ρυθμός

Ανάμεσα στους παράγοντες που φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ιχθύων είναι η κλιματική αλλαγή. Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τη σχέση μεταξύ της διάρκειας της ημέρας (φωτοπερίοδος) και της θερμοκρασίας προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας σε ένα δεδομένο γεωγραφικό πλάτος και αυξάνοντας τη συχνότητα των ακραίων καιρικών φαινομένων. Μεταξύ άλλων, η κλιματική αλλαγή εμπλέκεται και με αλλαγές στα κερκαδικά ρολόγια, δομές υψηλής σημασίας για την διατήρηση της ομοιόστασης και της φυσιολογικής λειτουργίας των οργανισμών.

Ο κύκλος φωτός-σκότους διέπει πολλές λειτουργίες των οργανισμών. Για παράδειγμα, επειδή κάποια ζώα μπορεί να θηρεύονται κατά τη διάρκεια της ημέρας, έχουν αναπτύξει νυχτερινή συμπεριφορά για να προστατεύονται. Επιπλέον, σε μεγάλα γεωγραφικά πλάτη οι ρυθμοί φωτός έχουν χρησιμεύσει ως παράγοντες πρόβλεψης εποχιακών μοτίβων για την θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μείωση της διάρκειας της ημέρας το φθινόπωρο, που σηματοδοτεί ότι οι θερμοκρασίες πρόκειται να μειωθούν και το αντίστροφο για την άνοιξη. Ωστόσο, η κλιματική αλλαγή επηρεάζει τη σχέση φωτοπεριόδου-θερμοκρασίας και έχει πιθανές αρνητικές συνέπειες στην ικανότητα των οργανισμών να αντιλαμβάνονται τις

μεταβολές και να προσαρμόζονται σε αυτές (Κατσαφάδος 2015). Είναι επομένως προφανές ότι οι μηχανισμοί χρονισμού στους οργανισμούς εξελίσσονται ή εμφανίζουν πλαστικότητα προκειμένου να συνεχίσουν να εξυπηρετούν τον σκοπό τους. Σε ένα δεδομένο γεωγραφικό πλάτος, η φωτοπερίοδος παραμένει αμετάβλητη ακόμη και όταν επηρεάζεται η θερμοκρασία. Συνεπώς, υποθέτοντας ότι οι αποκρίσεις στη θερμοκρασία μπορούν να ρυθμιστούν από εποχιακούς ρυθμούς, τα ενδογενή ρολόγια πρέπει να μπορούν να προσαρμόζονται στις αλλαγές στη σχέση φωτός-θερμοκρασίας, διαφορετικά οι αποκρίσεις λαμβάνουν χώρα σε ακατάλληλες συνθήκες φωτός / θερμοκρασίας και μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην αρμοστικότητα τους όπως για παράδειγμα, αναπαραγωγή σε ακατάλληλη εποχή (Prokkoala et al., 2018).

Η θερμοκρασία των ωκεανών σε μια συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την εποχή ή από έτος σε έτος ή ακόμη και από δεκαετία σε δεκαετία, εξαιτίας των διακυμάνσεων στα ωκεάνια ρεύματα και των ροών θερμότητας μεταξύ των ωκεανών και της ατμόσφαιρας. Η παγκόσμια μέση θερμοκρασία των ωκεανών σε βάθη κοντά στην επιφάνεια αυξήθηκε από το 1971 έως το 2012. Στα πρώτα 75 m των ωκεανών η τάση θέρμανσης είναι 0.11 [0.09 – 0.13]oC ανά δεκαετία. Η τάση αυτή μειώνεται από την επιφάνεια προς τα μέσα βάθη, αφού στα 200 m φτάνει τους 0.04oC ανά δεκαετία και λιγότερο από 0.02oC ανά δεκαετία στα 500 m. Οι θερμοκρασιακές ανωμαλίες διαδίδονται σε μεγαλύτερα βάθη μέσω διαφόρων διαδρομών, αλλά και από την ανάμειξη στην επιφάνεια των υδάτων (Κατσαφάδος 2015).

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. Για τα ψάρια, η θερμοκρασία είναι ο κύριος αβιοτικός παράγοντας που ελέγχει και περιορίζει την ανάπτυξη και τη φυσιολογία τους. Οι ακραίες θερμοκρασιακές επιπτώσεις στα ψάρια ποικίλλουν μεταξύ και εντός των διαφόρων ειδών ανάλογα με το μέγεθος του στρες και τους σχετικούς παράγοντες (Islam et al., 2021).

1.5 Σημασία, οργάνωση, μοριακή βάση των κερκιδίων ρολογιών

Το περιβάλλον του πλανήτη κυριαρχείται από κυκλικές αλλαγές, όπως τον κύκλο ημέρας - νύχτας, τις εποχές, τις παλίρροιες και τους σεληνιακούς κύκλους που καθοδηγούνται από τις γεωφυσικές ιδιότητες της Γης. Ανάλογα με τα ενδιατήματα ενός οργανισμού, αυτοί οι κύκλοι μπορεί να αποτελέσουν σημαντική απειλή για την επιβίωση του. Επομένως, κατά τη διάρκεια

της εξέλιξης, μια συχνή στρατηγική επιβίωσης που έχουν διατηρήσει τα φυτά και τα ζώα ήταν η ανάπτυξη μηχανισμών που επιτρέπουν την πρόβλεψη αυτών των τακτικών μεταβολών. Κεντρικό στοιχείο αυτής της στρατηγικής είναι οι ενδογενείς μηχανισμοί χρονισμού, με τους οποίους οι οργανισμοί μπορούν να προσαρμόσουν όλες τις μεταβολικές και συμπεριφορικές τους διεργασίες εκ των προτέρων και να κάνουν τα πάντα «στην ώρα τους». Ένα από τα πιο συχνά βιολογικά συστήματα χρονισμού είναι το κίρκαδικό ρολόι που επιτρέπει την πρόβλεψη του κύκλου ημέρας - νύχτας. Ο ρυθμός των 24 ωρών του ηλιακού φωτός - σκότους ήταν ένα προβλέψιμο χαρακτηριστικό σε όλη την εξελικτική ιστορία της ζωής στη Γη, και σχεδόν όλες οι μορφές ζωής έχουν προσαρμοστεί σε αυτόν τον ρυθμό. Έτσι, η ανταπόκριση στις αλλαγές στο φως είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της δημιουργίας ρυθμών στα ψάρια (Prokkoala et al., 2018).

Όπως κάθε ρολόι, ο μηχανισμός του κίρκαδικού ρολογιού μπορεί να συνεχίσει να «χτυπά» ή αλλιώς να ταλαντώνεται, ακόμα και κάτω από σταθερές συνθήκες, όπως σταθερό σκοτάδι και σταθερή θερμοκρασία. Ωστόσο, σε αυτή την τεχνητή κατάσταση παράγει ρυθμούς με περίοδο περίπου 24 ωρών (*circa* = about, *dia* = day → περίπου μια ημέρα). Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός που δημιουργείται από το ρολόι μετατοπίζεται προοδευτικά σε σχέση με τον κύκλο των 24 ωρών του εξωτερικού κόσμου και λέγεται «ελεύθερη λειτουργία». Επομένως, η πραγματική κατάσταση λειτουργίας ρολογιού, όπου υπάρχουν μεταβολές στις συνθήκες, περιλαμβάνει τακτική επαναφορά από περιβαλλοντικά σήματα, όπως φως και θερμοκρασία, ενδεικτικά της πραγματικής ώρας της ημέρας. Τα σήματα αυτά ονομάζονται πάροχοι ώρας (*zeitgebers*) και διασφαλίζεται μέσω αυτών ο συγχρονισμός του ρολογιού με τον φυσικό κύκλο ημέρας – νύχτας (Foulkes et al., 2016).

Κάθε κύτταρο στο σώμα μπορεί να περιέχει έναν ενδογενή μηχανισμό ρολογιού. Αν και ορισμένα κύτταρα μπορεί να ξεκινήσουν ταλαντώσεις μόνο ως απόκριση σε συγκεκριμένα εσωτερικά ή εξωτερικά σήματα, άλλα εμφανίζουν συνεχώς αυτή τη λειτουργία. Τα συνεχώς ταλαντούμενα κύτταρα και δομές που ειδικεύονται στην παροχή κίρκαδικών σημάτων σε ολόκληρο τον οργανισμό ονομάζονται *κεντρικοί ταλαντωτές*. Το πιο γνωστό από αυτά είναι ο υπερχιασματικός πυρήνας (*suprachiasmatic nucleus SCN*) του υποθαλάμου στα θηλαστικά. Οι αυτόνομες ταλαντώσεις που εμφανίζονται από περιφερειακά κύτταρα και ιστούς μπορεί να παραμείνουν ανεξάρτητες ή μπορούν να συγχρονιστούν μεταξύ τους και με τους κεντρικούς

ταλαντωτές, οργανώνοντας πολύπλοκα δίκτυα και μεταφέροντας πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες (Isorna et al., 2017).

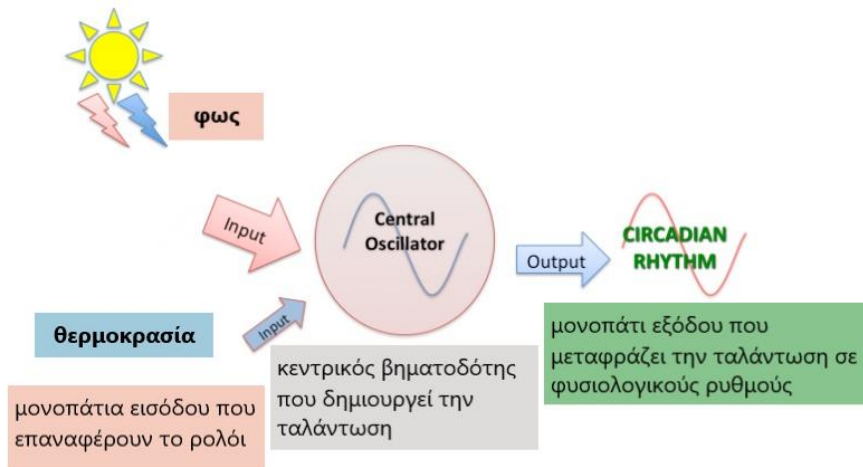
Οργάνωση του κερκαδικού ρυθμού στα ψάρια

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η σημασία αυτών των ρολογιών είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το πως οργανώνεται ένα τέτοιο σύστημα, ποια ερεθίσματα δέχεται, πως τα επεξεργάζεται, πως αποκρίνεται σε αυτά και μέσω ποιων μηχανισμών και μοριακών συστημάτων λειτουργεί.

Ένα απλοποιημένο σύστημα χρονισμού που λειτουργεί στα ψάρια απεικονίζεται στην Εικόνα 6. Αυτό το πολύ βασικό σύστημα περιλαμβάνει:

- περιβαλλοντικούς υποδοχείς (για παράδειγμα χρωστικές που απορροφούν το φως)
- βιοχημική - βιοφυσική οδό εισόδου (π.χ. θερμοκρασία)
- ρολόι ή αλλιώς πρωτεύων ταλαντωτής ή βηματοδότης
- μονοπάτια εξόδου που οδηγούν στην ταλάντωση φυσιολογικών διεργασιών (Zhdanova et al., 2006).

Στην πράξη, μπορεί να υπάρχουν περισσότερες από μία εξωτερικές εισροές όπως νερό, υγρασία, θόρυβος, θερμοκρασία, ανάλογα πάντα και τον οργανισμό. Τα μονοπάτια εισόδου ουσιαστικά είναι το πρώτο βήμα, το ερέθισμα, για να ξεκινήσει η ταλάντωση του ρολογιού. Ωστόσο, οι εξωτερικοί παράγοντες δεν «οδηγούν» τον ταλαντωτή, αλλά χρησιμεύουν ως συγχρονιστές των εμφανών ρυθμών («δείκτες» του ρολογιού). Η οδός εξόδου μπορεί να περιλαμβάνει ένα ρυθμιστικό κέντρο για συγκεκριμένες φυσιολογικές / συμπεριφορικές ρυθμικές διεργασίες. Επιπλέον, οι εξοδοί μπορούν να ανατροφοδοτήσουν το ρολόι και ίσως ακόμη και την είσοδο. Το μονοπάτι εξόδου ουσιαστικά μεταφράζει την ταλάντωση σε φυσιολογικούς ρυθμούς όπως είναι η κινητική δραστηριότητα, ορμονικοί, ενδοκρινικοί, μεταβολικοί και συμπεριφορικοί ρυθμοί. Επιπλέον, οι ταλαντώσεις αυτές επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και τους ρυθμούς αύξησης και ανάπτυξης (Zhdanova et al., 2006).



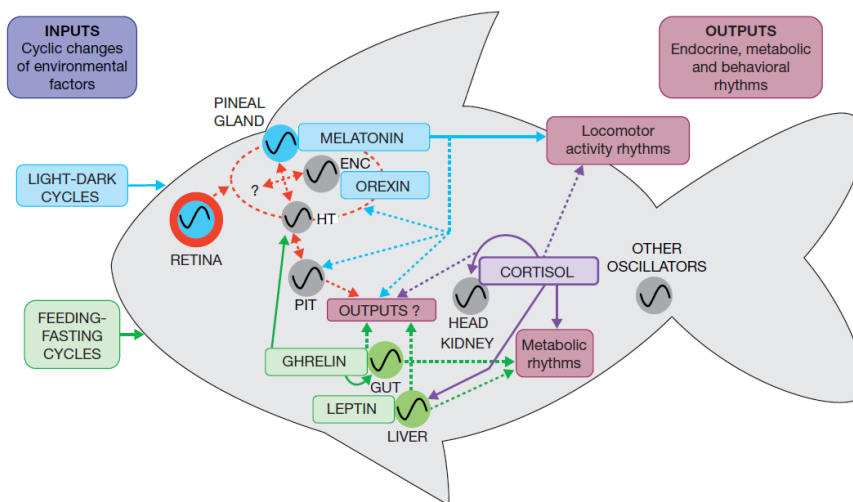
Εικόνα 6: μηχανισμός του κίρκαδικού ρολογιού (Kulczykowska et al., 2010)

Στα ψάρια, δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί η ύπαρξη μιας δομής κεντρικού ρολογιού, ανάλογης με το SCN των θηλαστικών. Ωστόσο, μια άλλη εξελικτικά διατηρημένη δομή, η επίφυση (pineal gland) κατέχει σημαντικό ρόλο στην κίρκαδική ρυθμικότητα των ψαριών μέσω της αυστηρά περιοδικής έκκρισης μελατονίνης. Η επίφυση είναι μια από τις πρώτες δομές του εγκεφάλου που σχηματίζεται στα ψάρια κατά την ανάπτυξή τους. Η πρωταρχική λειτουργία της επίφυσης στα ψάρια, είναι να παράγει και να απελευθερώνει μελατονίνη ως απόκριση στην κίρκαδική διέγερση και το φωτισμό. Τα επίπεδα μελατονίνης στο αίμα είναι υψηλότερα τη νύχτα από ότι κατά τη διάρκεια της ημέρας, το οποίο παρέχει πληροφορίες στον υπόλοιπο οργανισμό σχετικά με την ώρα της ημέρας και τη διάρκεια της νυχτερινής περιόδου. Η σύνθεση της επάγεται από εξωτερικά ερεθίσματα με κύριο το φως και από εσωτερικά σήματα που προέρχονται από τον κίρκαδικό ρυθμό. Στα περισσότερα είδη, η ρυθμική παραγωγή μελατονίνης περιλαμβάνει έναν κίρκαδιο βηματοδότη που βρίσκεται μέσα στα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων, έτσι ώστε η φωτοπερίοδος να συγχρονίζει το ρολόι, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί τη ρυθμική παραγωγή μελατονίνης. Η μελατονίνη αντιπροσωπεύει έτσι έναν ορμονικό δείκτη των κίρκαδικών ρολογιών της επίφυσης που βοηθά στο συγχρονισμό λειτουργιών και συμπεριφορών με παραλλαγές στις εξωτερικές ενδείξεις (Kulczykowska et al., 2010).

Τα ψάρια, διαθέτουν περιφερειακούς ταλαντωτές σε πολλούς ιστούς αν όχι σε όλους. Αυτό είναι γνωστό καθώς έχει τεκμηριωθεί η περιοδική έκφραση των γονιδίων του κίρκαδικού ρολογιού σε απομονωμένους ιστούς όπως στη καρδιά, στο ήπαρ και στους νεφρούς (Isorna et al., 2017). Αυτοί οι βηματοδότες, ανταποκρίνονται στο φως και έτσι μπορούν να επαναρυθμιστούν και να

παρασυρθούν ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες κερκαδικές δομές και το μονοπάτι ενεργοποίησης μέσω του αμφιβληστροειδούς. Επιπλέον, μπορούν να επηρεαστούν και από άλλα σήματα, εκτός του φωτός, όπως για παράδειγμα ο χρόνος ταΐσματος. Οι περιφερειακοί ταλαντωτές μπορούν είτε να διατηρήσουν παρόμοια φάση με τους υπόλοιπους ταλαντωτές ή να είναι εκτός φάσης μεταξύ τους ακόμα και δώδεκα ώρες. Ακόμη, ορισμένοι ταλαντωτές μπορεί να παραμείνουν αδρανείς, επιτρέποντας σε έναν άλλο ταλαντωτή να ορίσει τον κύριο ρυθμό, έως ότου αλλάξει η δραστηριότητα αυτού ή οι ειδικοί χρονοδότες ενεργοποιήσουν τα τοπικά ρολόγια (Idda et al., 2012).

Πιο αναλυτικά, ο αμφιβληστροειδής, η επίφυση και πιθανώς ορισμένοι φωτοϋποδοχείς του εν τω βάθει εγκεφάλου στοχεύουν άμεσα το φως, το οποίο στη συνέχεια συμπαρασύρει τα ενδογενή ρολόγια σε αυτές τις δομές. Άλλα όργανα που περιέχουν κερκαδικά ρολόγια, όπως το έντερο και το συκώτι, πιθανότατα στοχεύονται από σήματα που σχετίζονται με τη διατροφή ή το μεταβολισμό, τα οποία συγχρονίζουν κυρίως αυτούς τους ταλαντωτές με την ενεργειακή κατάσταση του οργανισμού. Ο νεφρός πιθανώς επηρεάζεται και από τα δύο εξωτερικά σήματα. Αυτά τα όργανα, απελευθερώνουν ορμόνες (μελατονίνη, ορμόνες της υπόφυσης, γκρελίνη, λεπτίνη και κορτιζόλη) με περιοδικό τρόπο, το οποίο μπορεί να παρέχει ένα χρονικό μήνυμα σε συγκεκριμένους ορμονικούς υποδοχείς, συνεισφέροντας και με αυτόν τον τρόπο στην κερκαδική λειτουργία. Στην Εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται το δίκτυο του κερκαδικού ρυθμού στα ψάρια (Εικόνα 7, Isorna et al., 2017).



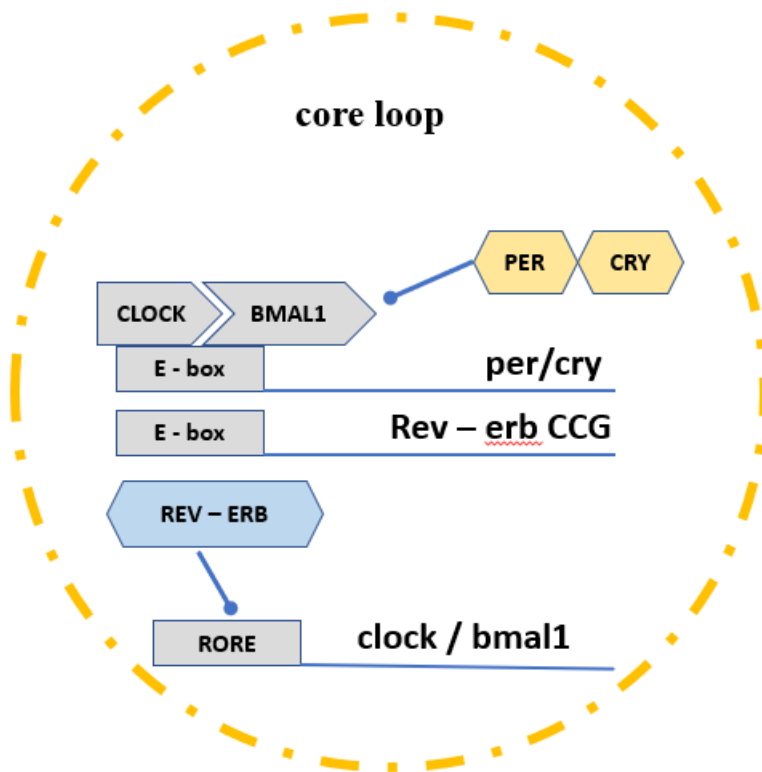
Εικόνα 7: δίκτυο ταλαντώσεων στα ψάρια (Isorna et al., 2017).

Μοριακή βάση του βιολογικού ρολογιού

Στους περισσότερους οργανισμούς, ο μηχανισμός ρολογιού αποτελείται από έναν πυρήνα, με βρόχους αρνητικής ανάδρασης που αλληλεπιδρούν (interconnected transcription translation negative feedback loops) και αποτελείται από γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του πυρήνα του ρολογιού.

Τα δύο βασικά γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του ρολογιού είναι το *clock* (circadian locomotor output cycles kaput) και το *bmal* (brain and muscle ARNT-like). Αυτοί είναι και οι δύο basic Helix-Loop-Helix (bHLH) μεταγραφικοί παράγοντες Per-ARNT-SIM (bHLH PAS) και σχηματίζουν ετεροδιμερή. μεταγραφικοί παράγοντες του βασικού τομέα έλικα – βρόχος – έλικα Per-ARNT-SIM (bHLH PAS) και σχηματίζουν ετεροδιμερή. Στη συνέχεια, συνδέονται με στοιχεία ενισχυτή κουτιού E (E-box) και επάγουν τη μεταγραφή. Οι ενισχυτές E-box εντοπίζονται στους προαγωγείς ενός ευρέος φάσματος γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των αρνητικών στοιχείων του μηχανισμού του πυρήνα του ρολογιού: γονίδια περιόδου (*per*) και κρυπτοχρώματα (*cry*).

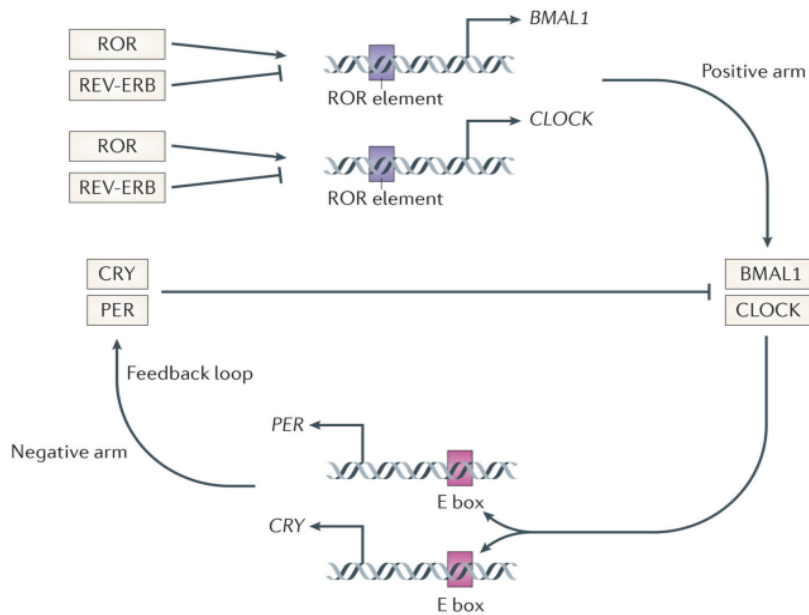
Με την ενεργοποίηση της έκφρασης των *per* και *cry* σχηματίζονται ετεροδιμερή και οι πρωτεΐνες PER και CRY μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με τα ετεροδιμερή CLOCK / BMAL, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησής τους και ρυθμίζουν αρνητικά την ενεργοποίηση που καθοδηγείται από το E-box. Ως αποτέλεσμα, η έκφραση των γονιδίων *per* και *cry* μειώνεται και τα επίπεδα αυτών των αρνητικών ρυθμιστών πέφτουν. Σε ένα κρίσιμο μειωμένο επίπεδο πρωτεϊνών PER και CRY, το CLOCK και το BMAL μπορούν και πάλι να κατευθύνουν την ενεργοποίηση και ο κύκλος μπορεί να επαναληφθεί. Όλη αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 24 ώρες για να ολοκληρωθεί ένας κύκλος και έχει ταυτοποιηθεί ως η κύρια γενετική πηγή της κίρκαδικής ρυθμικότητας (Εικόνα 9, Foulkes et al., 2016).



Εικόνα 9: μοριακή βάση του πυρήνα του ρολογιού (Foulkes et al., 2016)

Ωστόσο, είναι ξεκάθαρο ότι η μοριακή βάση του ρολογιού δεν είναι τόσο απλή. Το γονίδιο *bmal* εκφράζεται ρυθμικά υπό τον έλεγχο ενός δεύτερου «σταθεροποιητικού» βρόχου ανάδρασης που περιλαμβάνει τους δύο πυρηνικούς υποδοχείς που σχετίζονται με το ρετινοϊκό οξύ, τους REV-ERBa και RORa που επάγονται από τα γονίδια *nr1d1* και *nr1d2* αντίστοιχα. Το *ror* ενεργοποιεί τη μεταγραφή του *bmal1*, ενώ το *rev-erb* την καταστέλλει. Η έκφραση αυτών των γονιδίων ταλαντώνεται επίσης με κερκαδικό τρόπο με 12 ώρες εκτός φάσης μεταξύ τους.

Ο υποκινητής του *rev-erb* περιέχει επίσης ένα κουτί E, που επιτρέπει την άμεση ρύθμιση της μεταγραφής *nr1d1* και *nr1d2* από το BMAL1–CLOCK. Το PER2 έχει επίσης αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με το REV-ERB και ότι ρυθμίζει τη δραστηριότητά του (Εικόνα 10, Kojetin et al., 2014)



Εικόνα 10: βρόχος ανάδρασης των RORa, REV-ERBa (Kojetin et al., 2014)

Μεταφορά σήματος – έναρξη ταλάντωσης

Οι φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι μετατρέπουν το φως σε ηλεκτρικό σήμα, είναι τα κύρια στοιχεία για την φωτομεταβίβαση και για την έναρξη του ρολογιού. Δύο κύριοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση φωτός στα ψάρια. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την οπτική φωτοαντίληψη μέσω της αμφιβληστροειδύποθαλαμικής οδού από τον αμφιβληστροειδή χιτώνα στον εγκέφαλο, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία της εικόνας. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την μη οπτική φωτοαντίληψη στον εν τω βάθει εγκέφαλο και στους περιφερειακούς ιστούς. Η μη οπτική φωτοαντίληψη βασίζεται σε υποδοχείς που ανιχνεύουν το φως και εκτελεί διάφορες λειτουργίες που δεν σχηματίζουν Εικόνα στον αμφιβληστροειδή (Musilova et al., 2021). Η οικογένεια των γονιδίων *orn4* ή αλλιώς γνωστές και ως μελανοψίνες συγκεντρώνουν ενδιαφέρον σχετικά με ρόλο τους στη ρύθμιση του κερκαδικού ρυθμού. Πιο συγκεκριμένα, η μελανοψίνη είναι χρωστική ουσία που εκφράζεται σε γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή (RGCs) και έχει προταθεί ως υποψήφιος κερκαδικός φωτοϋποδοχέας. Τα RGCs που περιέχουν μελανοψίνη είναι εγγενώς φωτοευαίσθητα, αποτελούν μέρος της αμφιβληστροειδύποθαλαμικής οδού και περιέχουν νευροδιαβιβαστές που είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην κερκαδική απόκριση στο φως (Beaulé et al., 2003).

Η βιοχημική διαδικασία με την οποία ένα ερέθισμα με τη μορφή φωτονίων μετατρέπεται σε ηλεκτροχημικό σήμα αναφέρεται ως φωτομετατροπή. Ο καταρράκτης φωτομετατροπής ξεκινά με την απορρόφηση φωτονίων μέσω οπτικών χρωστικών, οι οποίες βρίσκονται στις μεμβράνες των εξωτερικών τμημάτων των κυττάρων φωτοϋποδοχέα. Οι οπτικές χρωστικές αποτελούνται από ένα χρωμοφόρο που συνδέεται ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη της εκάστοτε οψίνης μέσω ενός δεσμού βάσης Schiff. Οι οψίνες με την σειρά τους, αλλάζουν διαμόρφωση ως απόκριση στον επαγόμενο από φωτόνια ισομερισμό του χρωμοφόρου και ενεργοποιούν έναν ετεροτριμερή καταρράκτη σηματοδότησης μέσω των G πρωτεϊνών που περιλαμβάνει την επαγωγή γονιδίων για την έκφραση πρωτεϊνών φωτομετατροπής (Lamb et al., 2020).

Το επιθήλιο της επίφυσης περιέχει κύτταρα φωτοϋποδοχέων που μοιάζουν με τους φωτοϋποδοχείς του κώνου του αμφιβληστροειδούς, τόσο από δομική όσο και από λειτουργική άποψη. Οι φωτοϋποδοχείς δημιουργούν συνάψεις με γαγγλιακά κύτταρα που στέλνουν τους άξονές τους στον εγκέφαλο. Τα διάμεσα κύτταρα δημιουργούν τον τρίτο κύριο κυτταρικό τύπο του επιθηλίου της επίφυσης, που μοιάζει με απλοποιημένο αμφιβληστροειδή. Οι φωτοϋποδοχείς απελευθερώνουν τη νύχτα έναν διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στις συνάψεις με τα γαγγλιακά κύτταρα. Οι τελευταίοι μεταδίδουν με τη σειρά τους τις πληροφορίες στα εγκεφαλικά κέντρα. Αυτή η νευρική πληροφορία μεσολαβεί σε βραχυπρόθεσμες αποκρίσεις σε αλλαγές στον φωτισμό του περιβάλλοντος. Ένα δεύτερο μήνυμα - η μελατονίνη - παράγεται τη νύχτα από τους φωτοϋποδοχείς και απελευθερώνεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα. Το σήμα μελατονίνης παρέχει στον οργανισμό περιοδικές πληροφορίες (Kulczykowska et al., 2010). Επιπλέον, τα ένζυμα που ενεργοποιούνται από το φως, όπως οι οξειδάσες που περιέχουν φλαβίνη, μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση H_2O_2 στα κύτταρα κατά την έκθεση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός. Αυτό στη συνέχεια έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης MAPK. Η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού ενεργοποιητή, CREB (cAMP responsive element binding protein) καθώς και τα γεγονότα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που ακολουθούν καθοδικά του μονοπατιού, αντιπροσωπεύουν βασικά βήματα στην προκαλούμενη από το φως ενεργοποίηση των γονιδίων που συμμετέχουν στο βασικό μηχανισμό του ρολογιού. (Vatine et al., 2011)

Σήματα εξόδου

Το κερκάδιο σύστημα των ψαριών αποτελείται από ένα δίκτυο ταλαντωτών που είναι ευρέως κατανομημένοι σε ολόκληρο τον οργανισμό. Αυτοί οι ταλαντωτές παρασύρονται από σήματα εισόδου όπως οι κύκλοι φωτός-σκότους και τροφοδοσίας-νηστείας και θα πρέπει να συνδέονται για να παράγουν σήματα εξόδου με συντονισμένο τρόπο. Τα σήματα εξόδου σχετίζονται με την κινητική δραστηριότητα τους μεταβολικούς ρυθμούς και τον κυτταρικό κύκλο.

Τα μοτίβα κίνησης (κολυμβητική ικανότητα) είναι αρκετά ευέλικτα, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την διαθεσιμότητα της τροφής και έχει δειχθεί ότι ρυθμίζονται από ενδογενείς κερκαδικούς ρυθμούς. Η κολυμβητική ικανότητα φαίνεται να επηρεάζεται από εξωτερικά σήματα όπως είναι ο κύκλος ημέρας – νύχτας αλλά και από ενδογενή σήματα όπως ορμόνες του ενδοκρινικού συστήματος. Οι κύριες ορμόνες που επηρεάζουν τα μοτίβα κίνησης και τους μεταβολικούς ρυθμούς είναι: ορεξίνη, λεπτίνη, γκρελίνη και νευροπεπτίδιο Υ. Η ορεξίνη είναι ένα νευροπεπτίδιο που ρυθμίζει τη διέγερση, την εγρήγορση και την όρεξη. Πειράματα σε ψάρι ζέβρα έχουν δείξει ότι οι προνύμφες που υπερεκφράζουν την ορεξίνη είναι υπερδιεγερμένες και έχουν δραματικά μειωμένη ικανότητα έναρξης και διατήρησης ανάπαυσης τη νύχτα. Η λεπτίνη είναι ένα ανορεξιογόνο πεπτίδιο που ρυθμίζει την ενεργειακή ομοιόσταση. Δεδομένου του ρόλου της, η έκφραση της λεπτίνης αυξάνεται μετά τη σίτιση και μειώνεται μετά τη νηστεία, συμβάλλοντας σε μια κατάσταση μειωμένης όρεξης κατά την φάση αδράνειας. Η γκρελίνη και το νευροπεπτίδιο Υ, κύριοι ρυθμιστές της επιθυμίας για τροφή, εμφανίζουν ρυθμικότητα. Αύξηση στα επίπεδα των έκφρασης τους επάγει την όρεξη επιδρώντας στο βασικό μηχανισμό του ρολογιού ώστε τα συγκεκριμένα σήματα να επάγουν διαδικασίες για την σίτιση του οργανισμού, επιδρώντας έτσι και στα μοτίβα κίνησης (Isorna et al., 2017)

Επιπλέον, το ρολόι ελέγχει το χρόνο του κυτταρικού κύκλου σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών. Στην περίπτωση του ψαριού ζέβρα, η αντιγραφή του DNA (φάση S) συμβαίνει συνήθως αργά το βράδυ και η μίτωση λίγο πριν την αυγή. Το πως συμβαίνει αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση δύο πιθανούς μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός εξηγεί ότι το ρολόι δημιουργεί μια «πύλη» ή «παράθυρο» σε μια συγκεκριμένη ώρα της ημέρας όταν τα κύτταρα θα περάσουν από ένα ορισμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Ένας τέτοιος μηχανισμός φαίνεται να συμβαίνει σε οργανισμούς όπου το μήκος του κυτταρικού κύκλου είναι αρκετά μικρό, δηλαδή είναι σημαντικά μικρότερο από 24 ώρες. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι το κερκάδιο ρολόι συμπαράσχει τον κυτταρικό κύκλο αλλάζοντας τον ρυθμό μετάβασης των φάσεων έτσι ώστε η

περίοδος των δύο ταλαντωτών να γίνει ίση. Αυτός ο μηχανισμός φαίνεται να εμφανίζεται και σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών (Steindal et al., 2019)

1.6 Αναπτυξιακά στάδια και εκκίνηση του ρολογιού

Ένα θεμελιώδες ζήτημα αφορά το πότε και πώς σχηματίζεται το ρολόι κατά την ανάπτυξη στα σπονδυλωτά. Οργανισμός μοντέλο για την μελέτη του χρονικού πλαισίου ανάπτυξης του ρολογιού αποτελεί το ψάρι ζέβρα καθώς συγκεντρώνει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους οργανισμούς. Η καθιέρωση ρυθμών κατά την πρόωμη ανάπτυξη απαιτεί ξεκάθαρα την έκθεση σε περιβαλλοντικούς χρονοδότες όπως το φως και οι αλλαγές θερμοκρασίας. Δεν παρατηρούνται κερκάρδιοι ρυθμοί κατά το στάδιο του εμβρύου, όταν εκτρέφονται υπό σταθερή θερμοκρασία και σταθερό σκοτάδι (Vatine et al., 2011).

Οι παλμοί φωτός που χορηγούνται ήδη από το στάδιο του βλαστιδίου έως τα πρώιμα στάδια σωματογένεσης (4-16 ώρες μετά την γονιμοποίηση), πριν εμφανιστεί οποιοδήποτε κλασικό όργανο φωτοϋποδοχέα, είναι επαρκείς για να ορίσουν τη φάση του ταλαντωτή στην επίφυση. Επομένως, το φως μπορεί να ανιχνευθεί από μη εξειδικευμένα κύτταρα φωτοϋποδοχέα και στη συνέχεια αυτή η πληροφορία διατηρείται μέσω του γρήγορου πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων. Επιπλέον, η έκθεση στο φως μόνο μετά το στάδιο της μετάβασης του μεσοβλαστιδίου (mid-blastula transition), είναι αποτελεσματική στον καθορισμό της φάσης αυτών των ρυθμών. Με δεδομένο ότι αυτό το στάδιο συμπίπτει χρονικά με την έναρξη της γονιδιακής έκφρασης στο έμβρυο, υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της μεταγραφής μπορεί να είναι ένα κρίσιμο βήμα στην απόκριση στο φως. Σε συμφωνία με αυτή την πρόβλεψη, αυξήσεις που προκαλούνται από το φως στην έκφραση του mRNA του *per2* έχουν ανιχνευθεί ήδη από τα στάδια του βλαστιδίου και του γαστριδίου. Αυτό δείχνει ότι η μεταγραφή του γονιδίου *per2* που προκαλείται από το φως είναι ένα κρίσιμο βήμα στην ωρίμανση του ρολογιού κατά την εμβρυογένεση (Steindal et al., 2019).

Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι τα γονίδια *clock* όσο και τα *bmal* δείχνουν ρυθμική έκφραση σε επίπεδο mRNA σε ιστούς ενηλίκων ενώ αυτή η έκφραση απουσιάζει στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια. Ποσοτικοποίηση επιπέδων mRNA των *clock* και *bmal* εμφανίζεται για πρώτη φορά γύρω στην ημέρα 4 - 5 που συμπίπτει με την εμφάνιση άλλων βασικών εξόδων ρολογιού, όπως οι ρυθμοί κινητικής δραστηριότητας. Έτσι, φαίνεται να υπάρχουν θεμελιώδεις

αλλαγές στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που διέπουν τον μηχανισμό του βασικού ρολογιού κατά την ανάπτυξη (Idda et al., 2011).

1.7 Σκοπός

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

Ο κίρκαδικός ρυθμός είναι το βασικό βιολογικό σύστημα χρονοισμού που λειτουργεί ως στρατηγική επιβίωσης προκειμένου να προβλέπονται οι τακτικές μεταβολές λόγω των κυκλικών αλλαγών. Κεντρικό στοιχείο αυτής της στρατηγικής είναι οι ενδογενείς μηχανισμοί χρονοισμού, με τους οποίους οι οργανισμοί μπορούν να προσαρμόζονται στις συνθήκες. Στην παρούσα εργασία μελετάται η έκφραση μιας σειράς γονιδίων που συμμετέχουν στο κίρκαδικό ρολόι, στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, από το στάδιο του αυγού μέχρι τη μεταμόρφωση της προνύμφης, σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη ρύθμιση και την λειτουργία του κίρκαδικού ρολογιού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων

Τσιπούρα

Εννιά ομάδες ψαριών υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (17, 20, 23°C) από την αρχή της επιβολής έως και την κατανάλωση του λεκιθικού σάκου, ενώ κατά την γονιμοποίηση η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 17°C. Έπειτα, τα ιχθύδια διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία, 20°C, μέχρι να φτάσουν σε μέγεθος 18-19 mm. Όλα τα αυγά προήλθαν από ενήλικα ψάρια σε αιχμαλωσία και η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε σε τρεις δεξαμενές. Η θερμοκρασία του νερού ρυθμίστηκε στα επίπεδα δοκιμής χρησιμοποιώντας ψύκτες και θερμαντήρες και αυτόνομο έλεγχο με ηλεκτρονικούς αισθητήρες. Σχετικά με τις συνθήκες εκτροφής, ο κορεσμός οξυγόνου στο νερό ήταν 5.8 ± 1.0 έως 6.0 ± 0.9 mg/L⁻¹, το pH 7.8 ± 0.3 , η αλατότητα από 35 έως 36 ‰ και η φωτοπερίοδος ήταν 18 ώρες φως και 6 ώρες σκοτάδι. Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) στην Κρήτη.

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο μέχρι αυτό της μεταμόρφωσης. Πιο συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν 8 δείγματα για κάθε στάδιο για κάθε μία από τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (για λόγους ομαδοποίησης συνεχίστηκε ο χαρακτηρισμός με βάση την θερμοκρασία ακόμα και μετά την σταθεροποίηση αυτής στους 20°C), με εξαίρεση τα αυγά που είχαν εκτεθεί στους 17°C, που είναι η θερμοκρασία αναπαραγωγής των ενηλίκων ψαριών. Στα πρώτα στάδια μέχρι το στάδιο πρώτου ταΐσματος τα δείγματα αποτελούνταν από περισσότερα από ένα ιχθύδια μέχρι να συμπληρωθεί ο απαιτούμενος όγκος. Στα υπόλοιπα στάδια κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε ένα ιχθύδιο. Τα δείγματα στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε αντιδραστήριο RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, RNeasy) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την χρήση τους. Η συλλογή των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3) (Kourkouta et al., 2021).

Πίνακας 3: συλλογή δειγμάτων (τσιπούρα)

αναπτυξιακά στάδια	θερμοκρασία (°C)	αριθμός δειγμάτων	DPH
egg	17	8	-
hatching (EH)	17	8	0
	20	8	0
	23	8	0
first feeding (FF)	17	8	5
	20	8	3
	23	8	3
flexion (FL)	17	8	21
	20	8	18
	23	8	19
end of larvae rearing (ELR)	17	8	35
	20	8	34
	23	8	33
mid metamorphosis (MM)	17	8	46
	20	8	46
	23	8	46

Λαβράκι

Αντίστοιχα με την δειγματοληψία στην τσιπούρα, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και για το λαβράκι με την διαφορά ότι στο λαβράκι οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 14, 17, 20°C. Εννιά ομάδες ψαριών υποβλήθηκαν σε αυτές τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες από την αρχή της επιβολής έως και την κατανάλωση του λεκιθικού σάκου, ενώ κατά την γονιμοποίηση η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 14°C. Έπειτα, τα ιχθύδια διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία, 17°C. Η φωτοπερίοδος ήταν 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι και η ένταση του φωτός διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα.

Η συλλογή των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα 4 που ακολουθεί:

Πίνακας 4: συλλογή δειγμάτων (λαβράκι)

αναπτυξιακά στάδια	θερμοκρασία (°C)	αριθμός δειγμάτων	DPH
egg	14	8	-
hatching (EH)	14	8	0
	17	8	0
	20	7	0
first feeding (FF)	14	12	12
	17	12	9
	20	12	9
flexion (FL)	14	12	28
	17	12	28
	20	12	28
end of larvae rearing (ELR)	14	12	40
	17	12	40
	20	12	40
mid metamorphosis (MM)	14	12	49
	17	12	49
	20	12	49

Το πείραμα έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να μελετηθεί πως επιδρά η μεταβολή της θερμοκρασίας που πραγματοποιείται στα αρχικά στάδια, στην μετέπειτα ανάπτυξη και φυσιολογία του ιχθυδίου.

2.2 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κάθε δείγμα με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος E.Z.N.A total RNA kit (Omega) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η πέψη με DNάση είναι το επόμενο βήμα μετά την εκχύλιση του RNA που αποσκοπεί στην αποτελεσματικότερη απομάκρυνση του γενωμικού DNA, έτσι ώστε το δείγμα RNA που παραλαμβάνεται να είναι πλήρως απαλλαγμένο από τυχόν επιμόλυνση με γενωμικό DNA. Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DNA-free™ DNase treatment Kit της εταιρείας Invitrogen. Για την εκτίμηση της

συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA μετά τη χρήση της DNase χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το κάθε δείγμα και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm. Παράλληλα, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Το άθικτο ολικό RNA που ηλεκτροφορείται υπό αποδιατακτικές συνθήκες εμφανίζει διακριτές ζώνες 28S και 18S rRNA (ευκαρυωτικά δείγματα).

Ακολούθησε η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA. Το kit που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA είναι το High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) με την χρήση τυχαίων εκκινητών (random primers), η οποία πραγματοποιήθηκε παράλληλα για όλα τα δείγματα ώστε να εξασφαλιστεί η ίδια απόδοση της αντίδρασης.

2.3 Αλληλούχηση RNA (RNA – sequencing)

Από το RNA που συλλέχθηκε, έγιναν ισομοριακά πολυσυλλεκτικά δείγματα ανά στάδιο (FF, FL, MM) και ανά θερμοκρασία (λαβράκι 14, 17, 21oC, τσιπούρα 17, 20, 23oC) μέχρι τελικό όγκο τα 10 μl. Τα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρία Novogene προκειμένου να πραγματοποιηθεί αλληλούχηση με την τεχνολογία της Illumina, με σκοπό τον προσδιορισμό του μεταγραφώματος σε κάθε δείγμα.

2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων RNA-sequencing

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε σε γραμμή εντολών Bash σε περιβάλλον Ubuntu καθώς και με τη χρήση της γλώσσας προγραμματισμού R και των κατάλληλων στατιστικών πακέτων. Σκοπός της ανάλυσης ήταν να προσδιοριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των δυο παραγόντων (θερμοκρασία και αναπτυξιακό στάδιο) στο μεταγραφικό προφίλ των ιχθύων. Μέσω της ανάλυσης αυτής, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γονίδια-στόχοι με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση τους μέσω Real Time PCR.

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκαν volcano plots, διαγράμματα τα οποία μας παρέχουν πληροφορίες για τα γονίδια με την μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα με βάση τα κριτήρια που τέθηκαν. Επιπλέον, κατασκευάστηκαν ιστογράμματα μέσω των οποίων

είναι εύκολη και γρήγορη η παρατήρηση των διαφορών στα επίπεδα έκφρασης για τα γονίδια ενδιαφέροντος και η παρατήρηση πιθανών προτύπων έκφρασης.

Τέλος, για την ομαδοποίηση και την πληροφοριακή απεικόνιση των αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκαν Πίνακεςόπου επισημάνθηκαν οι συγκρίσεις που εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων και αντίστοιχα σημειώθηκαν και στα διαγράμματα ώστε να είναι επιπλέον πληροφοριακά.

Πιο αναλυτικά, τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

1. Αναζήτηση των γονιδίων που σχετίζονται με τον κερκαδικό ρυθμό σε βάσεις δεδομένων και μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης ώστε να δημιουργηθεί μια λίστα με όλα τα γονίδια ενδιαφέροντος.
2. Ανάλογα με την λειτουργία που επιτελούν αλλά και με βάση τους μηχανισμούς ρύθμισης τόσο του βασικού ρολογιού όσο και των επιμέρους δομών, έγινε διαχωρισμός των γονιδίων σε τρεις κύριες κατηγορίες. Τα βασικά γονίδια του πυρήνα του ρολογιού (core genes), τα ρυθμιστικά (regulatory genes) και τα συμπληρωματικά (accessory genes).
3. Επιπλέον, αναζητήθηκαν παράλογα γονίδια για όλα τα γονίδια των τριών κατηγοριών μέσω αναζήτησης στην βάση δεδομένων της Ensembl (<https://www.ensembl.org>), ώστε να ενσωματωθούν στην μελέτη. Στην ταξινομική ομάδα των τελεόστεων έχει συμβεί ένας επιπλέον γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σπονδυλωτά γνωστός και ως «τρίτος γύρος διπλασιασμού». Ο διπλασιασμός οδηγεί στο σχηματισμό δύο πανομοιότυπων αντιγράφων κάθε γονιδίου τα οποία ονομάζονται παράλογα και είναι τουλάχιστον αρχικά πανομοιότυπα και λειτουργικά όμοια (Kasahara et al., 2007).
4. Από το σύνολο των αρχείων του RNA sequencing προσδιορίστηκαν ποια από τα γονίδια ενδιαφέροντος είναι διαφορετικά εκφρασμένα στα δείγματα μας, θέτοντας ως κατώφλι στις τιμές p-adjusted να είναι μικρότερες από 0.05 και η απόλυτη τιμή του log fold change να είναι μεγαλύτερη από 0.6. Τα όρια αυτά διαμορφώθηκαν σύμφωνα με τον αλγόριθμο edgeR που είναι διαθέσιμος από το πακέτο Bioconductor στην R (Robinson et al., 2010). Το αρχείο που διαμορφώθηκε τελικά, ήταν και αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την υπόλοιπη ανάλυση των δεδομένων.

5. Στη συνέχεια έγινε αναζήτηση των πιθανών οντολογιών στις οποίες συμμετέχουν αυτά τα γονίδια μέσω της ιστοσελίδας του Gene Ontology (<http://geneontology.org>), για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος αυτών των γονιδίων στο κερκαδικό ρυθμό. Επιπλέον, αφού εντοπίστηκαν οι κύριες οντολογίες, έγινε σύγκριση των κοινών γονιδίων ανάμεσα στις οντολογίες, ώστε να αναζητηθούν πιθανοί κοινοί μηχανισμού ρύθμισης.

Για την υπόλοιπη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η γλώσσα προγραμματισμού R και μια σειρά από στατιστικά πακέτα.

6. Αρχικά, με την χρήση συγκεκριμένων στατιστικών πακέτων κατασκευάστηκαν τα volcano plots. Για την κατασκευή αυτών χρησιμοποιήθηκαν εντολές της base R και το πακέτο ggplot2 (Wickham., 2016). Οι αναλύσεις έγιναν διατηρώντας σταθερό κάθε φορά τον ένα παράγοντα, είτε την θερμοκρασία είτε το αναπτυξιακό στάδιο. Οι επισημάνσεις των 15 γονιδίων με την μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα έγινε με το πακέτο ggrepel (Slowikowski et al., 2021). Ο κώδικας που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 11:

```
library(ggplot2)
library(ggrepel)

de$diffexpressed <- "NO"
de$diffexpressed[de$logfc > 0.6 & de$p_adj < 0.05] <- "UP"
de$diffexpressed[de$logfc < -0.6 & de$p_adj < 0.05] <- "DOWN"
de$delabel <- NA
de$delabel[de$diffexpressed != "NO"] <- de$gene_name[de$diffexpressed != "NO"]
de <- de[order(de$p_adj),]
head(de,15)
options(ggrepel.max.overlaps = 12)

ggplot(data=de, aes(x=logfc, y=-log10(p_adj), col=diffexpressed, label=paste(delabel,comparison))) +
  geom_point() +
  theme_minimal() +
  scale_color_manual(values=c("blue", "black", "red")) +
  geom_vline(xintercept=c(-0.6, 0.6), col="red") +
  geom_hline(yintercept=-log10(0.05), col="red") + ggtitle(paste("Most significant genes ")) +
  geom_text_repel(data=head(subset(de,de$diffexpressed == "UP" | de$diffexpressed == "DOWN"),15))

pdf("volcano.pdf")

for (i in unique(de$comparison)) {
  a<-subset(de,de$comparison == i)
  print(i)
  print(ggplot(data=a, aes(x=logFC, y=-log10(p_adj), col=diffexpressed, label=paste(delabel))) +
    geom_point() +
    theme_minimal() +
    scale_color_manual(values=c("blue", "black", "red")) +
    geom_vline(xintercept=c(-0.6, 0.6), col="red") +
    geom_hline(yintercept=-log10(0.05), col="red") + ggtitle(paste("Most significant genes in ",i)) +
    geom_text_repel(data=head(subset(a,a$diffexpressed == "UP" | a$diffexpressed == "DOWN"),20)))
  Sys.sleep(0.2)
}
dev.off()
```

Εικόνα 11: κώδικας για δημιουργία των διαγραμμάτων volcano

7. Στην συνέχεια, κατασκευάστηκε ένας δυαδικός Πίνακας για όλα τα γονίδια υπό μελέτη, όπου εμφανίζονται συγκεντρωτικά οι συγκρίσεις στις οποίες τα γονίδια εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους (οι στατιστικά σημαντικές συγκρίσεις λαμβάνουν την τιμή 1, οι υπόλοιπες λαμβάνουν την τιμή 0). Τα πακέτα που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο βήμα είναι τα `maditr`, `dplyr` (Wickham et al., 2018) και `tidyr` (Wickham et al., 2022).
8. Τέλος, χρησιμοποιώντας τις κανονικοποιημένες αναγνώσεις (reads) με βάση το μέγεθος των γονιδίων και το μέγεθος της βιβλιοθήκης, (`fpkm`- Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions base pairs sequenced) κατασκευάστηκαν τα ιστογράμματα για τα γονίδια ενδιαφέροντος. Τα πακέτα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα `ggplot2` και `reshape2` (Wickham., 2007).

2.5 PCR πραγματικού χρόνου (Real – time PCR)

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNA Seq, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γονίδια με στατιστικά σημαντικές διαφορές, τα οποία μελετήθηκαν με τη χρήση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Για την έναρξη του πειράματος είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός των εκκινητών για τα γονίδια που μελετώνται. Για τον σχεδιασμό τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) (Untergasser et al., 2013), στο οποίο εισάγεται η αλληλουχία ενδιαφέροντος και το πρόγραμμα προχωρά στο σχεδιασμό ολογονουκλεοτιδίων ανά ζεύγη τα οποία αποτελούν τους δύο εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση. Οι εκκινητές που προέκυψαν ελέγχθηκαν για τον σχηματισμό διμερών και δευτεροταγών δομών μέσω του προγράμματος Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com>) (Beacon Designer 5.10 Manual, (2006). Τέλος, ελέγχθηκε ότι οι εκκινητές είναι ειδικοί μόνο για το υπό εξέταση γονίδιο μέσω της ομοπαράθεσης τους έναντι του γονιδιώματος του λαβρακιού, με την χρήση του αλγορίθμου BLAST (<https://www.ensembl.org>) (Ye., 2012).

Στον Πίνακα 5 που ακολουθεί εμφανίζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα γονίδια που μελετηθήκαν.

Πίνακας 5: αλληλουχίες εκκινητών

gene_name	forword primer	reverse primer
------------------	-----------------------	-----------------------

sa_ef1a	TCAAGGGATGGAAGGTTGAG	AGTTCCAATACCGCCGAT
sa_rpl13	TCTGGAGGACTGTCAGGGGCATGC	AGACGCACAATCTTAAGAGCAG
sa_rps18	AGGGTGTGGCAGACGTTAC	GAGGACCTGGCTGTATTTGC
sa_npy	GCCCAGAAGAGCAGAAGAGA	ACAGCAGGAACCCAGAGT
sa_clocka	GTACAGCAGCAGTCACAGGT	GGGTTGTGGCAGTGAAGGTA
sa_arntl1a	CAGAGGTGCATCCAACCCAT	CGGTCACAGCCGACTACAAA
sa_arntl2	GGCAGCAAAGTGTTGCGAA	ATCGTTTTCTCAACCAGC
sa_per2	AGGGAGAAAGGAGCAAGTGG	AACGCTCACAGACACAGGAC
sa_opn4a	TTCGTCTTCTTCTTGCCGCT	TGGATGCTGCCGTTGATCTT
sa_cry3a	AAGTGCATTATCGGCGTCC	ATCGGCTGAGTTGCTGGTAG
dla_actb	AAGCAGGAGTATGATGAGTC	GAAGTTGTTGGGCGTTTG
dla_rpl13	GAAGGCATCAACATCTCC	CTCTGAAGTGGTAAGGTC
dla_npy	CCTGCTGTGGGCACTACTCT	CAGGACTGGACCTCTTTCCA
dla_clocka	GTACAGCAGCAGTCACAGGT	GGGTTGTGGCAGTGAAGGTA
dla_arntl1a	CAGCCAACCCCTACACAGAG	ACCCACCACAAACAGGAAA
dla_arntl2	ACCCACAGAGTTCATCACGC	TAGCACGATGTCCCAAGCAG
dla_per2	GCCTTAACCCAACCTCTTGG	AACTGGCTCTGGGGTAAACG
dla_opn4a	TTGCGAGGTGTATGCGTTCT	CCGATGGATGTCAGAGGTC
dla_cry3a	CCTCTCGTGTGCGCTTTTC	GGTGTAGAAGAACTCCCGCC

Αρχή της μεθόδου

Αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με πολύπλοκα συστήματα κατόπτρων και φίλτρων που διαβάζουν τον φθορισμό των χρωστικών που έχουν ενσωματωθεί στα υπό μελέτη δείγματα. Βασίζεται στην ανίχνευση και καταμέτρηση των προϊόντων κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τα οποία είναι ευθέως ανάλογα της αρχική ποσότητας του νουκλεϊκού οξέος. Η ανίχνευση αυτή πραγματοποιείται με την βοήθεια μιας φθορίζουσας χρωστικής, της SYBR Green I στη συγκεκριμένη περίπτωση. Η χρωστική αυτή παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα και φθορίζει όταν ενσωματωθεί στο

δίκλωνο προϊόν της PCR. Έτσι η παραγωγή των προϊόντων της Q - PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό (Argya et al., 2005).

Ο υπολογισμός της σχετικής έκφρασης των γονιδίων βασίζεται στον προσδιορισμό της τιμής Ct ανά αντίδραση. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης στον οποίο η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει μία συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου.

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να είναι είτε απόλυτη, στην οποία γίνεται ποσοτικοποίηση βάσει μιας πρότυπης καμπύλης η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να προσδιοριστεί, είτε σχετική. Στη δεύτερη μέθοδο γίνεται μέτρηση της σχετικής συγκέντρωσης του γονιδίου ενδιαφέροντος σε άγνωστα δείγματα σε σύγκριση με ένα δείγμα ελέγχου με γονίδια αναφοράς. Στη παρούσα διπλωματική εργασία η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν σχετική και κανονικοποιήθηκε με την βοήθεια γονιδίων αναφοράς (Argya et al., 2005).

Γονίδια αναφοράς (housekeeping genes)

Στα ποσοτικά πειράματα Q-PCR εισάγονται συγκεκριμένα σφάλματα λόγω μικρών διαφορών στην αρχική ποσότητα του RNA, της ποιότητας του RNA ή των διαφορών στην αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA και της ενίσχυσης PCR. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ελέγχου των διαφορών, μεταξύ των δειγμάτων, που δεν οφείλονται σε βιολογικές επιδράσεις βασίζεται στη χρήση γονιδίων αναφοράς. Αυτά τα γονίδια θα πρέπει θεωρητικά να εκφράζονται σε σταθερό επίπεδο μεταξύ διαφορετικών ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, και τα επίπεδα έκφρασής τους θα πρέπει επίσης να παραμένουν σχετικά σταθερά σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και κατά την διάρκεια πραγματοποίησης του πειράματος. Με βάση αυτά, γίνεται η κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης που προκύπτουν από την Real-Time PCR (Argya et al., 2005).

Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν γονίδια με ιδιοστατικά χαρακτηριστικά και πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR προκειμένου να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα:

Τσιπούρα

1. RPL13 (Ribosomal Protein L13)

2. RPS18 (Ribosomal Protein S18)
3. EF1a (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1)

Λαβράκι

1. RPL13 (Ribosomal Protein L13)
2. ACTb (Actin beta)

Η έκφραση των παραπάνω γονιδίων ελέγχθηκε βάση του RefFinder και ήταν ιδιαίτερα σταθερή στα δείγματα που μελετήθηκαν.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και απόδοση

Για τον προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας του προϊόντος στα πειραματικά δείγματα καθώς και για την αξιολόγηση της απόδοσης (efficiency) της αντίδρασης κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη του γνωστού προϊόντος μέσω μιας σειράς διαδοχικών αραιώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στην πρότυπη καμπύλη επομένως απεικονίζεται ο λογάριθμος της συγκέντρωσης (άξονας x) στην αντίστοιχη τιμή Ct (άξονας y). Από αυτήν την πρότυπη καμπύλη, μπορούν να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με την απόδοση της αντίδρασης καθώς και για διάφορες παραμέτρους της αντίδρασης. Οι συγκεντρώσεις που επιλέγονται για την πρότυπη καμπύλη θα πρέπει να περιλαμβάνουν το αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων του στόχου στα πειραματικά δείγματα.

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι ένα μέτρο του πόσο καλά τα δεδομένα ταιριάζουν με την πρότυπη καμπύλη και αντικατοπτρίζει τη γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης και στην ιδανική περίπτωση, $R^2 = 1$.

Η κλίση της εκθετικής φάσης της αντίδρασης ενίσχυσης είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης.

Για να επιτευχθούν ακριβή αποτελέσματα, οι αντιδράσεις πρέπει να έχουν απόδοση μεγαλύτερη από 95% και μικρότερη από 105%. Η απόδοση υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Efficiency \%} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100$$

Στην ιδανική περίπτωση, η απόδοση (E) είναι 100%, που σημαίνει ότι το προϊόν διπλασιάζεται μετά από κάθε θερμικό κύκλο κατά την εκθετική ενίσχυση. Η πραγματική απόδοση μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την αντίδραση (Introduction to Quantitative PCR, 2007).

Συγκεκριμένα, από τα δείγματα cDNA λήφθηκε ποσότητα 1 μl από το καθένα και αναμείχθηκαν για την παραγωγή ενός συγκεντρωτικού δείγματος (pool). Στο pool πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις, σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης $C_1V_1=C_2V_2$ όπου ο τελικός όγκος για κάθε αραιώση ήταν τα 100μl.

1:5 → 42μl pool + 168μl H₂O

1:10 → 110 μl (1:5) + 110 μl H₂O

1:20 → 115 μl (1:10) + 115 μl H₂O

1:40 → 125 μl (1:20) + 125 μl H₂O

1:50 → 36 μl (1:40) + 144 μl H₂O

1:100 → 75 μl (1:50) + 75 μl H₂O

1:200 → 50 μl (1:100) + 50 μl H₂O

Οι αποδόσεις των αντιδράσεων ενίσχυσης των γονιδίων παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7.

Τσιπούρα

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις και αποδόσεις γονιδίων (τσιπούρα)

γονίδιο	συγκέντρωση εκκινητών (nM)	απόδοση (%)
ef1a	200	103.5
rpl13	200	99.2
rps18	200	103.6
npy	350	97.0
clocka	300	97.5
arntl1a	300	101.4
arntl2	fw 300 rv 250	101.2
per2	300	99.7
opn4a	200	100.0
cry3a	300	98.5

Λαβράκι

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις και αποδόσεις γονιδίων (λαβράκι)

γονίδιο	συγκέντρωση εκκινητών (nM)	απόδοση (%)
actb	150	100.1

rpl13	150	101.5
npy	fw 200 rv 300	103.3
clocka	200	96.3
arntl1a	200	101.5
arntl2	200	97.5
per2	150	98.4
opn4a	150	99.7
cry3a	200	98.4

Προετοιμασία αντίδρασης για τα δείγματα

Το πρώτο βήμα είναι η αραίωση των δειγμάτων cDNA. Στα συγκεκριμένα δείγματα έγινε αραίωση 1:20. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το master mix που περιείχε SYBR® Green I, ενέσιμο ύδωρ (ddH₂O), forward εκκινητή και reverse εκκινητή όπου για κάθε γονίδιο οι συγκεντρώσεις ήταν διαφορετικές και επελέγησαν βάσει της απόδοσης της αντίδρασης.

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται 8μl από το master mix και 2μl από το cDNA. Επίσης για κάθε δείγμα έγινε και μία επανάληψη προκειμένου το αποτέλεσμα που θα πάρουμε να είναι αξιόπιστο.

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής StepOne™ Real-Time PCR System της εταιρίας Applied Biosystems με τις εξής συνθήκες: δυο αρχικά στάδια αποδιάταξης, πρώτα στους 95οC για 5min, 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος περιλαμβάνει από 20sec στους 95οC και 20sec στους 60οC) ώστε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του κύριου προϊόντος, και τέλος, ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης τήξης (melting curve) (15sec στους 95οC, 1min στους 50οC και 15sec στους 95οC).

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται 8μl από το master mix και 2μl από το cDNA. Επίσης τα δείγματα αναλύονται σε 2 επαναλήψεις (duplicates) για κάθε δείγμα γίνεται και μία επανάληψη προκειμένου το αποτέλεσμα που θα πάρουμε να είναι αξιόπιστο και επαναλήψιμο. Πιο συγκεκριμένα, οι ποσότητες των συστατικών ανάλογα με τις διαφορές στη συγκέντρωση των εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 8:

Πίνακας 8: ποσότητες των επιμέρους συστατικών των αντιδράσεων

	συγκέντρωση	συγκέντρωση	συγκέντρωση	συγκέντρωση	συγκέντρωση
--	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

	200nM/μL	300nM/μL	150nM/μL	fw 200 rv 300 nM/μL	fw 300 rv 250 nM/μL
Sybr 2x	5	5	5	5	5
Forward primer	0.2	0.3	0.15	0.2	0.3
Reverse primer	0.2	0.3	0.15	0.3	0.25
H₂O	2.6	2.4	2.7	2.5	2.45
cDNA	2	2	2	2	2

Ανάλυση δεδομένων και κανονικοποίηση

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του αρχικού cDNA χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος Comparative Ct Method, (Čikoš et al., 2007). Σε αυτή τη μέθοδο το Ct προσδιορίζεται στο ίδιο επίπεδο φθορισμού για όλα τα δείγματα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού δείγματος και προσδιορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$R_0 = \text{Threshold} / (1 + \text{efficiency})^{Ct}$$

όπου:

- R_0 : το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA
- Efficiency: η απόδοση της αντίδρασης δια 100
- Ct: ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού στην εκθετική φάση της αντίδρασης.

Εξαιτίας της ευαισθησίας της Real-Time PCR και της εμφάνισης πειραματικού σφάλματος είναι πιθανό να υπάρχει απόκλιση των πειραματικών δεδομένων από δείγμα σε δείγμα. Συνεπώς, η χρήση των γονιδίων αναφοράς αμβλύνει τις διαφορές από δείγμα σε δείγμα. Η έκφραση των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Κανονικοποιημένη έκφραση} = R_0 \text{ γονιδίου στόχου} / \text{Παράγοντας Κανονικοποίησης}$$

Ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο γεωμετρικός μέσος της έκφρασης των δυο πιο σταθερών γονιδίων αναφοράς σε κάθε δείγμα (Vandesompele et al., 2002).

2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων Real – time PCR

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε σε περιβάλλον R με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών πακέτων. Η ανάλυση περιλάμβανε:

1. Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων με τη χρήση Shapiro test. Σε περίπτωση απόκλισης από την κανονική κατανομή (p value < 0.05) επιλέγονται μη παραμετρικά tests για την συνέχεια
2. Χρήση μη παραμετρικών test Kruskal-Wallis και post-hoc Dunn test, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των δυο παραγόντων (αναπτυξιακό στάδιο, θερμοκρασία) στην έκφραση των γονιδίων
3. Υπολογισμός περιγραφικών στατιστικά (μέση τιμή, διάμεσος, τυπική απόκλιση, κλπ.) και κατασκευή θηκογραμμάτων (box-plot).
4. Ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων ανά αναπτυξιακό στάδιο και θερμοκρασία με τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Spearman
5. Συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων (Real time PCR vs RNASeq) για την επικύρωση των αποτελεσμάτων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 RNA SEQUENCING – Τσιπούρα

Ακολουθώντας τα βήματα της ανάλυσης των δεδομένων του RNA sequencing προέκυψε μια σειρά από αποτελέσματα τα οποία μας οδήγησαν στην επιλογή των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην περαιτέρω μελέτη. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή ο κिरκαδικός ρυθμός αποτελεί ένα εκτεταμένο βιολογικό σύστημα με μια πολυπληθή σειρά γονιδίων να συμβάλουν στη δομή, λειτουργία και ρύθμιση αυτού. Τα γονίδια που συμμετέχουν στο κिरκαδικό ρυθμό βάση της βιβλιογραφίας σχετικά με τον ρόλο που κατέχουν χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: γονίδια του πυρήνα του βιολογικού ρολογιού, ρυθμιστικά γονίδια και συμπληρωματικά γονίδια. Από μία λίστα 250 γονιδίων περίπου που συμμετέχουν στον κिरκαδικό ρυθμό, έγινε επιλογή κάποιων που να πληρούν τα κριτήρια ώστε να μελετηθούν περαιτέρω. Επιλέχθηκαν για αρχή γονίδια που συμμετέχουν στον πυρήνα του ρολογιού και συμβάλουν στην έναρξη της ταλάντωσης του συστήματος. Επιπλέον, επιλέχθηκαν γονίδια που λειτουργούν ως σήματα έναρξης της ταλάντωσης του ρολογιού και γονίδια που λειτουργούν ως σήματα εξόδου για να γίνει αξιολόγηση των μεταβολών ανάλογα με το θερμοκρασιακό περιβάλλον και το οντογενετικό προφίλ.

Τσιπούρα

Κατηγοριοποίηση γονιδίων

Αναφορικά με τα γονίδια του πυρήνα (core) διακρίνονται σε τέσσερις υποκατηγορίες:

- circadian locomotor output cycles kaput (clock)
- Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like (arntl-like) or Brain and Muscle ARNT-Like 1 (bmal1)
- cryptochrome (cry)
- period (per)

Τα γονίδια που ανήκουν στην κάθε κατηγορία των core γονιδίων φαίνονται στους Πίνακες9, 10, 11 που ακολουθεί:

Πίνακας 9: γονίδια του βασικού πυρήνα του ρολογιού

	gene name	gene ID
--	------------------	----------------

clock και arntl-like ομάδες παράλογων γονιδίων	clocka	ENSSAUG00010001441
	arntl1a	ENSSAUG00010012423
	ARNTL	ENSSAUG00010021274
	arntl2	ENSSAUG00010021136
	ARNTL2	ENSSAUG00010013586
	npas2	ENSSAUG00010018036
	novel gene	ENSSAUG00010017149
	arnt2	ENSSAUG00010000770
	arnt2	ENSSAUG00010020009
	clockb	ENSSAUG00010025019

Πίνακας 10: cry γονίδια

	gene name	gene ID
cry	cry5	ENSSAUG00010015769
	cry-dash	ENSSAUG00010022353
	si:ch1073-390k14.1	ENSSAUG00010011861
	cry2	ENSSAUG00010019549
	cry3a	ENSSAUG00010004169
	cry1b	ENSSAUG00010001264
	cry1a	ENSSAUG00010012268

Πίνακας 11: period γονίδια

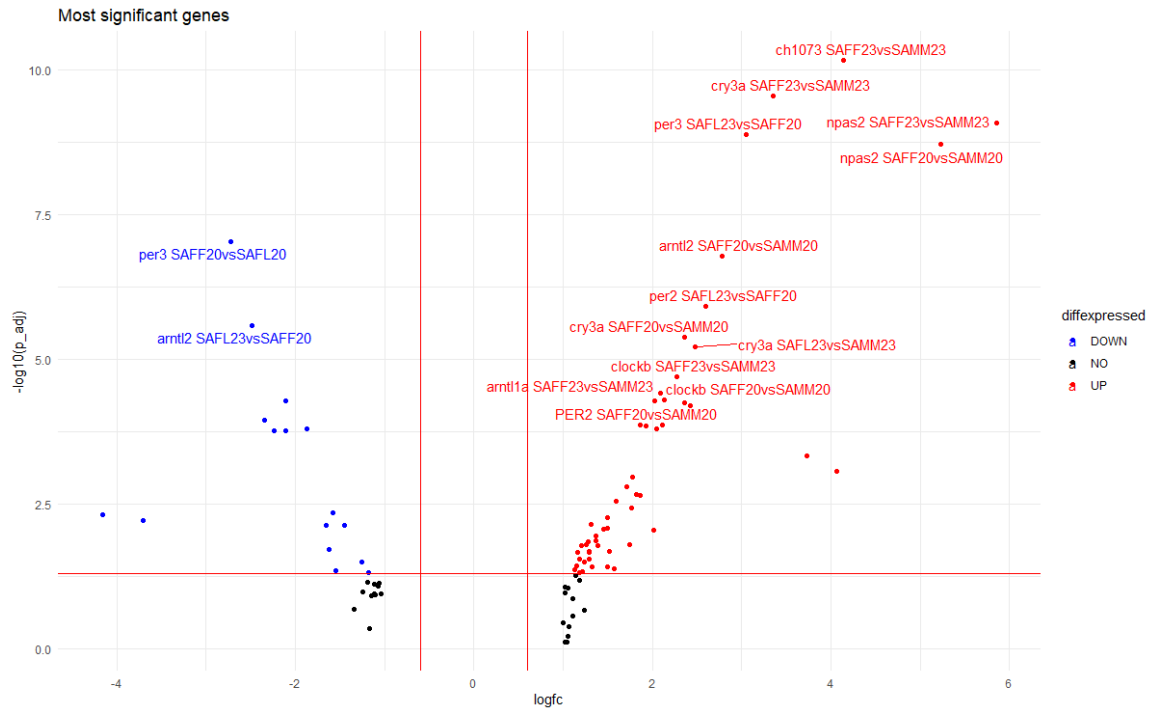
	gene name	gene ID
Period	per3	ENSSAUG00010011519
	per1b	ENSSAUG00010014015
	per2	ENSSAUG00010027189
	PER2	ENSSAUG00010010319

Γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση τους

Από αυτή την λίστα προσδιορίστηκαν τα γονίδια με στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως στη μεθοδολογία. Αυτά είναι τα ακόλουθα: *arnt2*, *cry5*, *cry1b*, *clockb*, *cry3a*, *npas2*, *PER2*, *ARNTL2*, *per3*, *cry-dash*, *ch1073*, *arntl2*, *cry1a*, *clocka*, *arntl1a*.

Διάγραμμα volcano

Για το σύνολο των συγκρίσεων κατασκευάστηκε το volcano με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια (Εικόνα 12). Εκτός από το όνομα του γονιδίου, επισημαίνεται και η σύγκριση στην οποία εντοπίζονται οι διαφορές. Στη Εικόνα 13 φαίνονται οι συγκρίσεις τα p-adjusted τα log fold change και το όνομα του γονιδίου.



Εικόνα 12: Διάγραμμα volcano για τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στη τσιπούρα

comparison	logfc	p_adj	gene_name
SAFF23vsSAMM23	4.145076	6.784996e-11	ch1073
SAFF23vsSAMM23	3.354114	2.761539e-10	cry3a
SAFF23vsSAMM23	5.852672	8.086340e-10	npas2
SAFL23vsSAFF20	3.056419	1.315464e-09	per3
SAFF20vsSAMM20	5.231487	1.931137e-09	npas2
SAFF20vsSAFL20	-2.719894	9.070378e-08	per3
SAFF20vsSAMM20	2.777433	1.653348e-07	arntl2
SAFL23vsSAFF20	2.598320	1.224057e-06	per2
SAFL23vsSAFF20	-2.484113	2.612217e-06	arntl2
SAFF20vsSAMM20	2.365657	4.107369e-06	cry3a
SAFL23vsSAMM23	2.483001	6.135561e-06	cry3a
SAFF23vsSAMM23	2.270591	1.957131e-05	clockb
SAFF23vsSAMM23	2.092779	3.755504e-05	arntl1a
SAFF20vsSAMM20	2.129638	5.034356e-05	clockb
SAFF20vsSAMM20	2.024181	5.255044e-05	PER2

Εικόνα 13: σύγκριση, log fold change και p-adjusted για τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια

Οντολογίες

Χρησιμοποιώντας ως οργανισμό μοντέλο το ψάρι ζέβρα και τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια έγινε αναζήτηση οντολογίων στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια αυτά ώστε να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή τους στον κερκαδικό ρυθμό. Τα GOs που προέκυψαν είναι τα ακόλουθα:

- entrainment of circadian clock by photoperiod (GO:0043153)
- circadian regulation of gene expression (GO:0032922)
- entrainment of circadian clock (GO:0009649)
- photoperiodism (GO:0009648)
- circadian rhythm (GO:0007623)
- regulation of circadian rhythm (GO:0042752)
- rhythmic process (GO:0048511)
- response to temperature stimulus (GO:0009266)

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα τα γονίδια που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση είναι τα ακόλουθα:

- *clocka*
- *cry3a*
- *per2*
- *arntl1a*
- *arntl2*

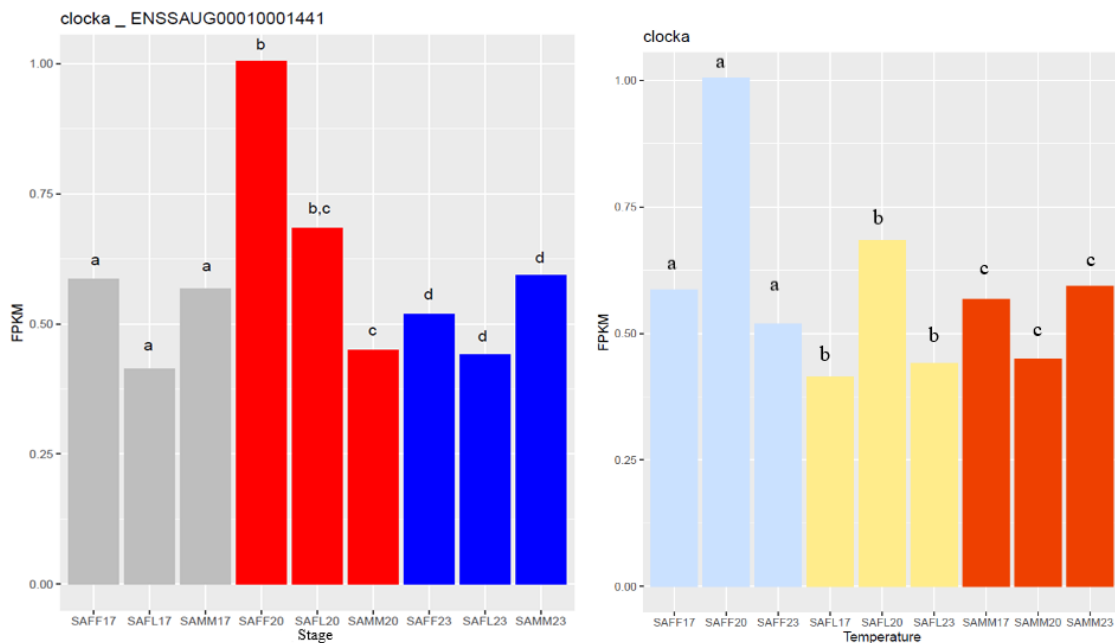
Ωστόσο, εκτός από τα γονίδια που σχετίζονται με τον βασικό πυρήνα του ρολογιού επιλέχθηκαν και δύο επιπλέον τα οποία είναι διαφορετικά εκφρασμένα στα δείγματα της τσιπούρας. Το ένα αποτελεί σήμα έναρξης του κερκαδικού ρυθμού και το δεύτερο χαρακτηρίζεται ως σήμα εξόδου.

- *orn4a*
- *nry*

Ιστογράμματα

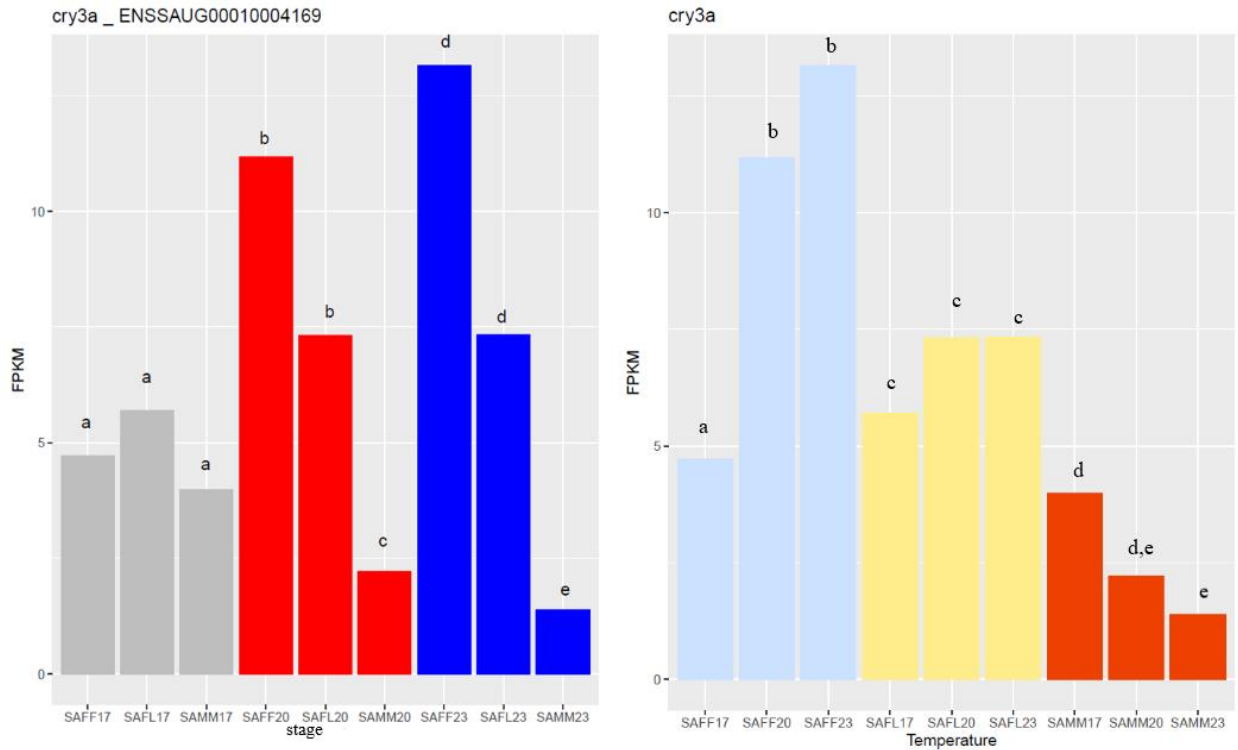
Για τα γονίδια αυτά κατασκευάστηκαν διαγράμματα που σκιαγραφούν τα επίπεδα έκφρασης. Δυο τρόποι απεικόνισης των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν με βάση τον σχεδιασμό του πειράματος. Ο πρώτος τρόπος διατηρεί σταθερή την θερμοκρασία και παρατηρούνται οι διαφορές στο επίπεδο των σταδίων και ο δεύτερος τρόπο το αντίστροφο. Επιπλέον, πάνω σε κάθε ιστόγραμμα υπάρχουν σημειωμένες οι συγκρίσεις που έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σύμφωνα με τους δυαδικούς πίνακες που σχεδιάστηκαν. Τα ιστογράμματα είναι οργανωμένα σε τριάδες (τρία αναπτυξιακά στάδια είτε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες) και διαφορετικά γράμματα σε κάθε ιστόγραμμα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

- *clocka*: Εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη θερμοκρασία των 20°C ανάμεσα στα στάδια FF και MM (αριστερά) ενώ δεν εντοπίζεται καμιά διαφορά ανάμεσα στις θερμοκρασίες (δεξιά) (Εικόνα 14).



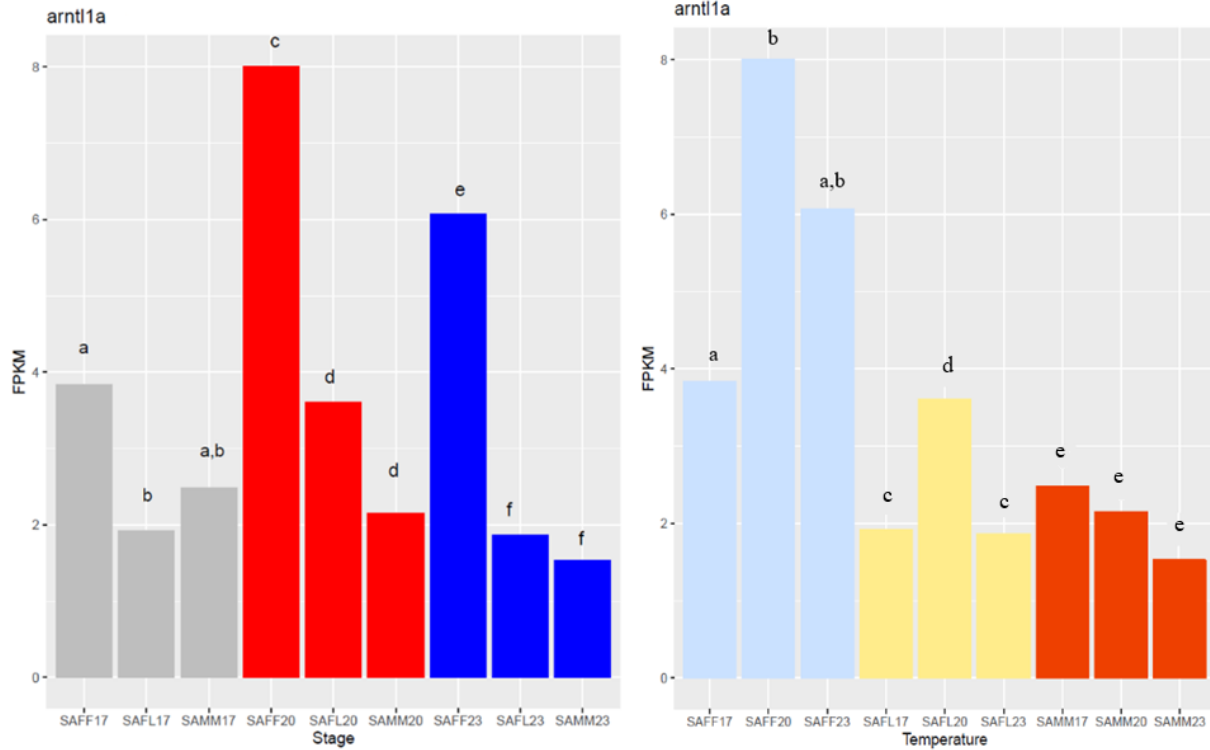
Εικόνα 14: επίπεδα έκφρασης του *clocka*

- *cry3a*: Εντοπίζονται διαφορές στις θερμοκρασίες των 20 και 23°C ανάμεσα στα στάδια FL και MM (αριστερά). Εντοπίζονται διαφορές στο στάδιο FF μεταξύ 17 – 20 και 17 – 23°C και στο στάδιο MM μεταξύ 17 – 23°C (δεξιά) (Εικόνα 15).



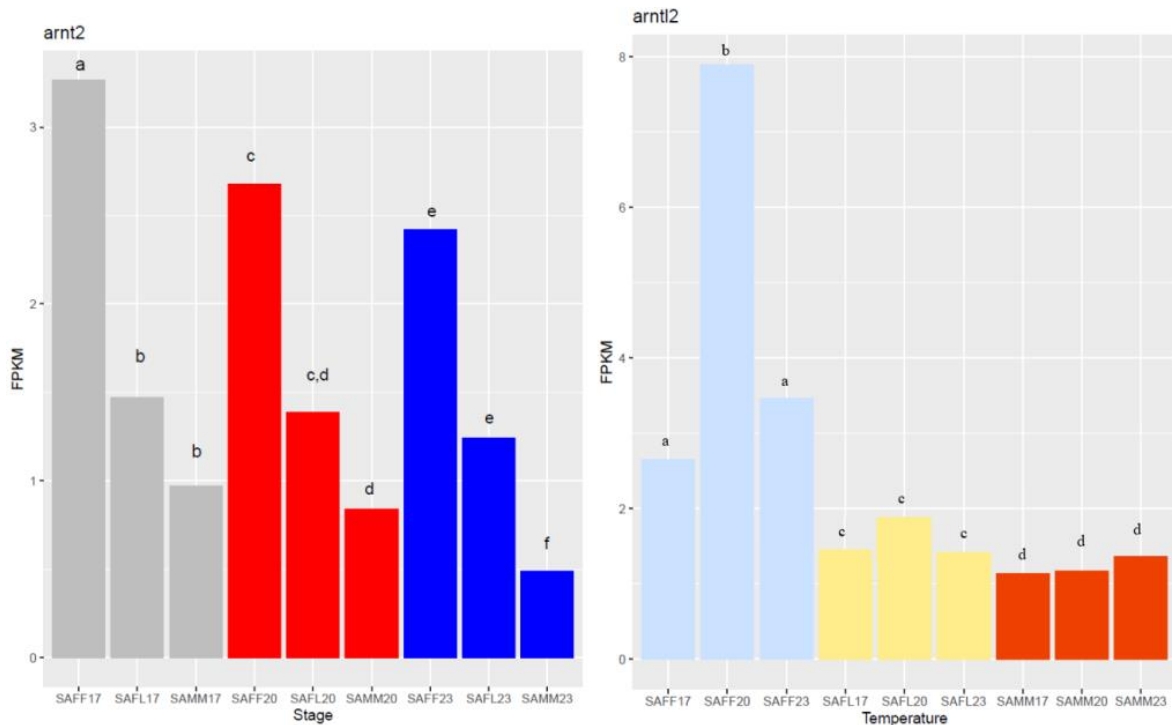
Εικόνα 15: επίπεδα έκφρασης του *cry3a*

- *arntl1a*: Εντοπίζονται διαφορές στη θερμοκρασία των 17°C ανάμεσα στα στάδια FF – FL, στα στάδια των 20 και 23°C ανάμεσα στα στάδια FF – FL και FF-MM (δεξιά). Διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 17 - 20°C στο FF και FL (αριστερά) (Εικόνα 16).



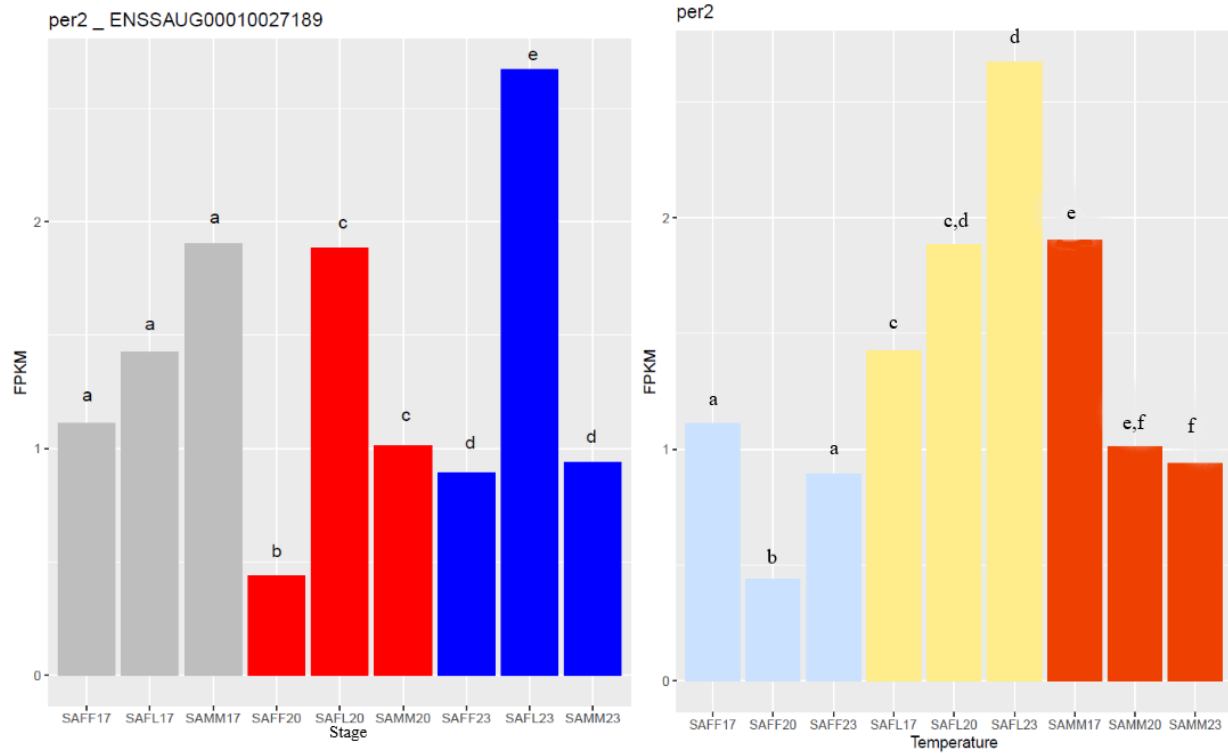
Εικόνα 16: επίπεδα έκφρασης arntl1a

- arntl2: Εντοπίζονται διαφορές στη θερμοκρασία των 17°C ανάμεσα στα FF – FL, στα στάδια των 20 και 23°C ανάμεσα στα FF – FL και FF – MM (αριστερά). Διαφορές εμφανίζονται μεταξύ 17 – 20°C στο στάδιο FF (δεξιά) (Εικόνα 17).



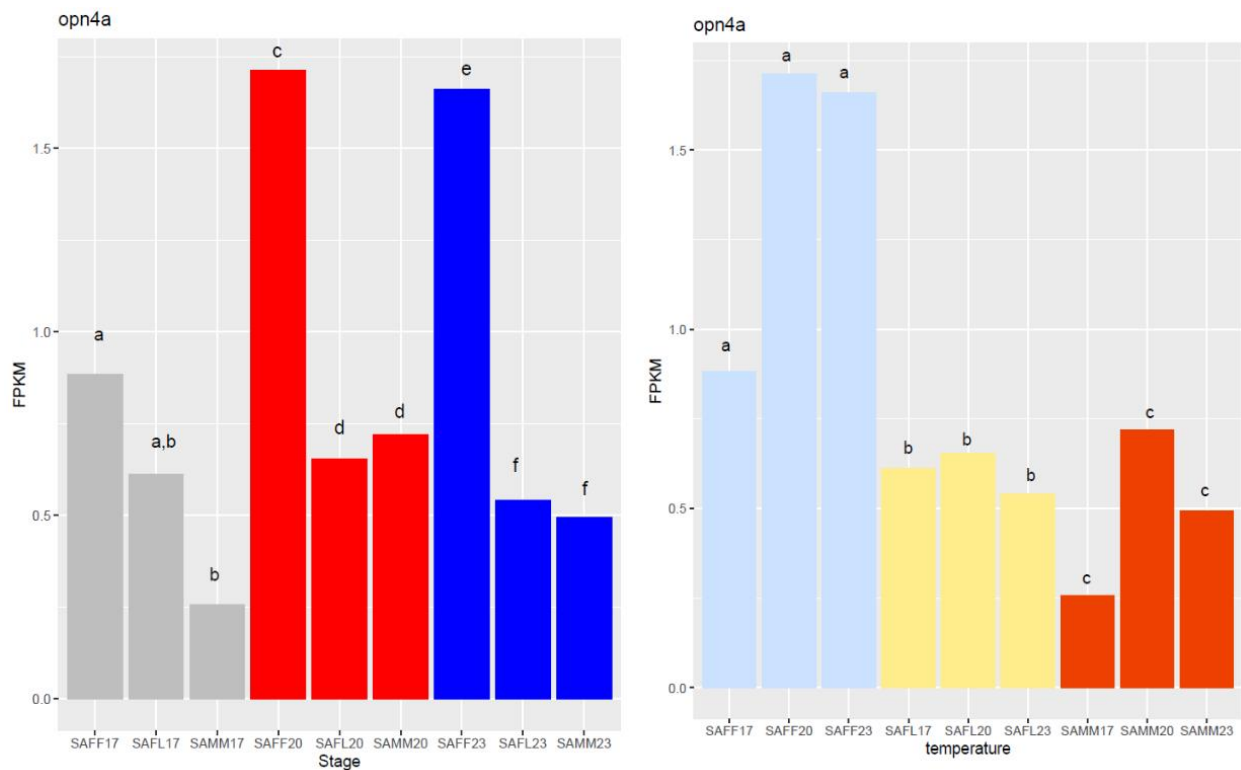
Εικόνα 17: επίπεδα έκφρασης *arnt12*

- *per2*: εντοπίζονται διαφορές στη θερμοκρασία των 20°C ανάμεσα στα FF – FL και FF – MM (αριστερά). Στο FF παρατηρούνται διαφορές μεταξύ 17 – 20°C καθώς και 20 – 23°C. Στα δύο επόμενα στάδια FL, MM διαφορές εντοπίζονται μεταξύ 17 – 23°C (δεξιά) (Εικόνα 18).



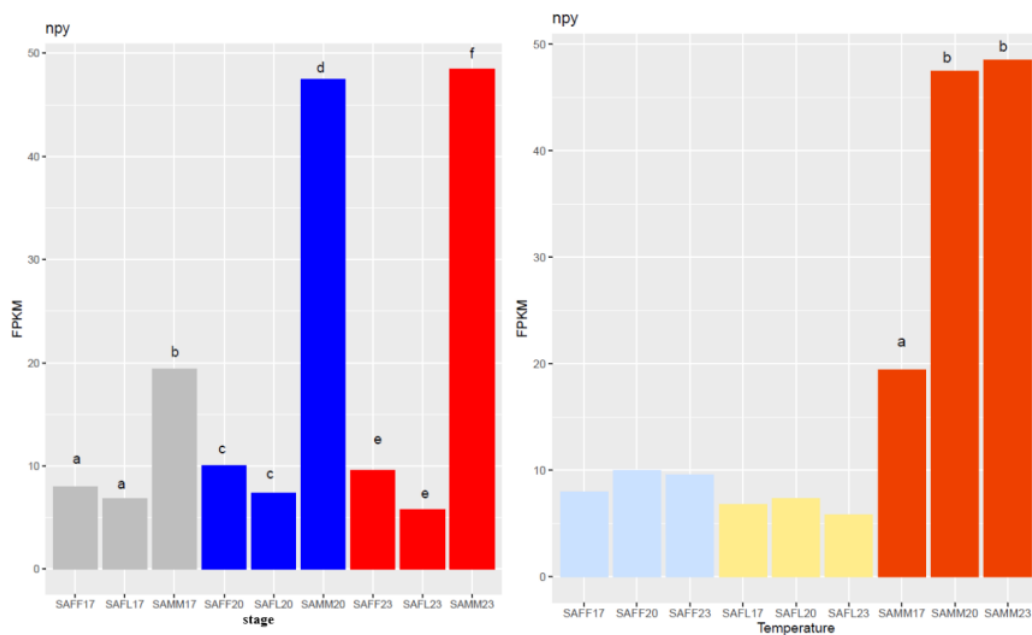
Εικόνα 18: επίπεδα έκφρασης *per2*

- *orn4a*: Διαφορές εντοπίζονται στη θερμοκρασία των 17°C μεταξύ FF – MM (αριστερά). Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιών (δεξιά) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: επίπεδα έκφρασης *opn4a*

- *npv*: Και στις τρεις θερμοκρασίες (17, 20, 23°C) διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FF – MM και FL – MM (αριστερά). Διαφορές εντοπίζονται μόνο στο τελευταίο στάδιο MM μεταξύ 17 – 20°C και 17 - 23°C (δεξιά) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: επίπεδα έκφρασης *npv*

Διαδικοί Πίνακες

Στην συνέχεια εμφανίζονται οι δυαδικοί πίνακες (Πίνακας 12, 13) που κατασκευάστηκαν. Με τον αριθμό 1 σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές και με τον αριθμό 0 οι συγκρίσεις που δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 12: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις μεταξύ των θερμοκρασιών

RNA SEQ	FF20vsFF17	FF23vsFF17	FF23vsFF20	MM20vsMM17	MM23vsMM17	MM20vsMM23	FL20vsFL17	FL23vsFL17	FL20vsFL23
cry3a	1	1	0	0	1	0	0	0	0
per2	1	0	1	0	1	0	0	1	0
arntl1a	1	0	0	0	0	0	1	0	1
arntl2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
clocka	0	0	0	0	0	0	0	0	0
opn4a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
npy	0	0	0	1	1	0	0	0	0

Πίνακας 13: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις μεταξύ των σταδίων

RNA SEQ	FF17vsFL17	FF17vsMM17	FL17vsMM17	FF20vsFL20	FF20vsMM20	FL20vsMM20	FF23vsFL23	FF23vsMM23	FL23vsMM23
clocka	0	0	0	0	1	0	0	0	0
cry3a	0	0	0	0	1	1	0	1	1
per2	0	0	0	1	1	0	1	0	0
arntl1a	1	0	0	1	1	0	1	1	0
arntl2	0	1	0	1	1	0	1	1	0
opn4a	0	1	0	1	1	0	1	1	0
npy	0	1	1	0	1	1	0	1	1

3.2 Επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNASeq μέσω Real Time PCR

Όπως αναφέρθηκε κατά την πειραματικό σχεδιασμό, τα στάδια δειγματοληψίας ήταν πέντε (EH, FF, FL, ER, MM). Το πρώτο βήμα της ανάλυσης αφορούσε τον έλεγχο κανονικότητας των δεδομένων, ώστε να επιλεγούν στην συνέχεια τα κατάλληλα στατιστικά tests.

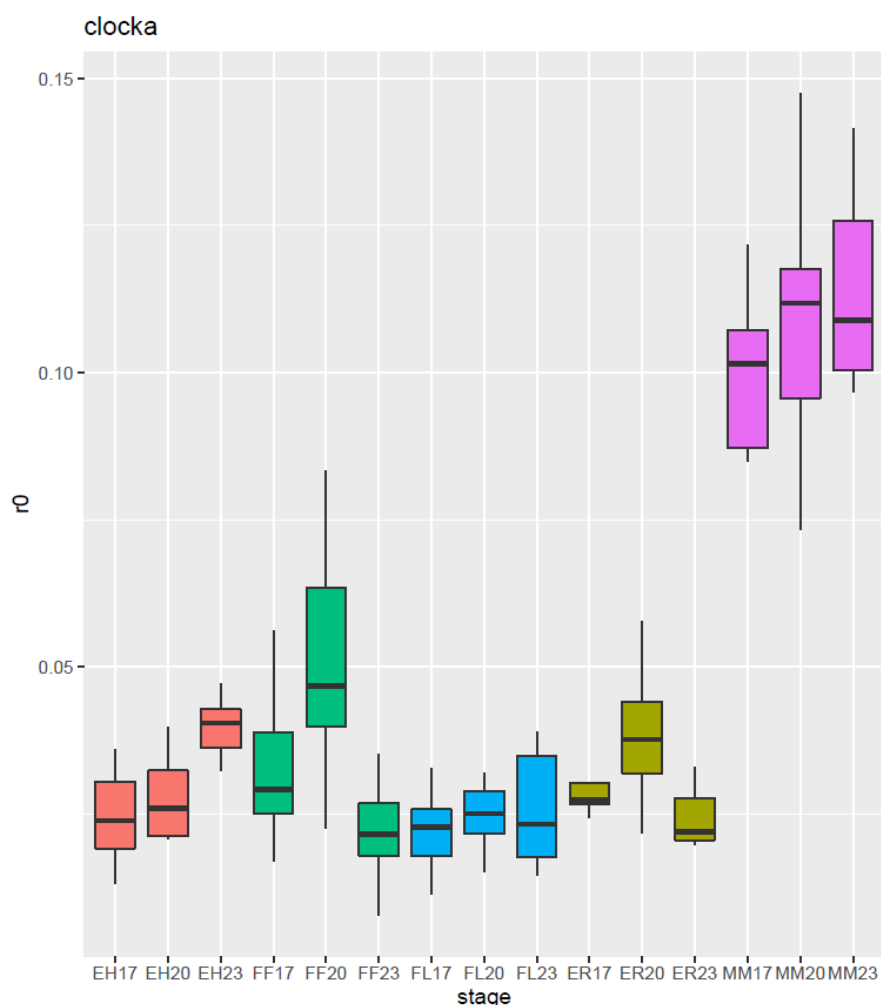
Συγκρίσεις μεταβολής της θερμοκρασίας

Οι τιμές p-value του Shapiro test που προσδιορίστηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 1 του παραρτήματος. Οι τιμές αποκλίνουν σημαντικά από την κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν μη παραμετρικά test ανάλογα της ANOVA, και πιο συγκεκριμένα το Kruskal-Wallis test, μιας και η σύγκρισή μας περιλάμβανε τρεις διαφορετικές ομάδες. Ακολούθησε το post-hoc Dunn test, για να προσδιοριστούν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά ζεύγη.

Οι τιμές p-value από το Kruskal-Wallis test στη σύγκριση όπου διατηρείται σταθερό το στάδιο παρατίθενται στον Πίνακα 2 του παραρτήματος. Επιπλέον, στον Πίνακα 3 του παραρτήματος εμφανίζονται τα p-values των κατά ζεύγη συγκρίσεων.

Θηκογράμματα

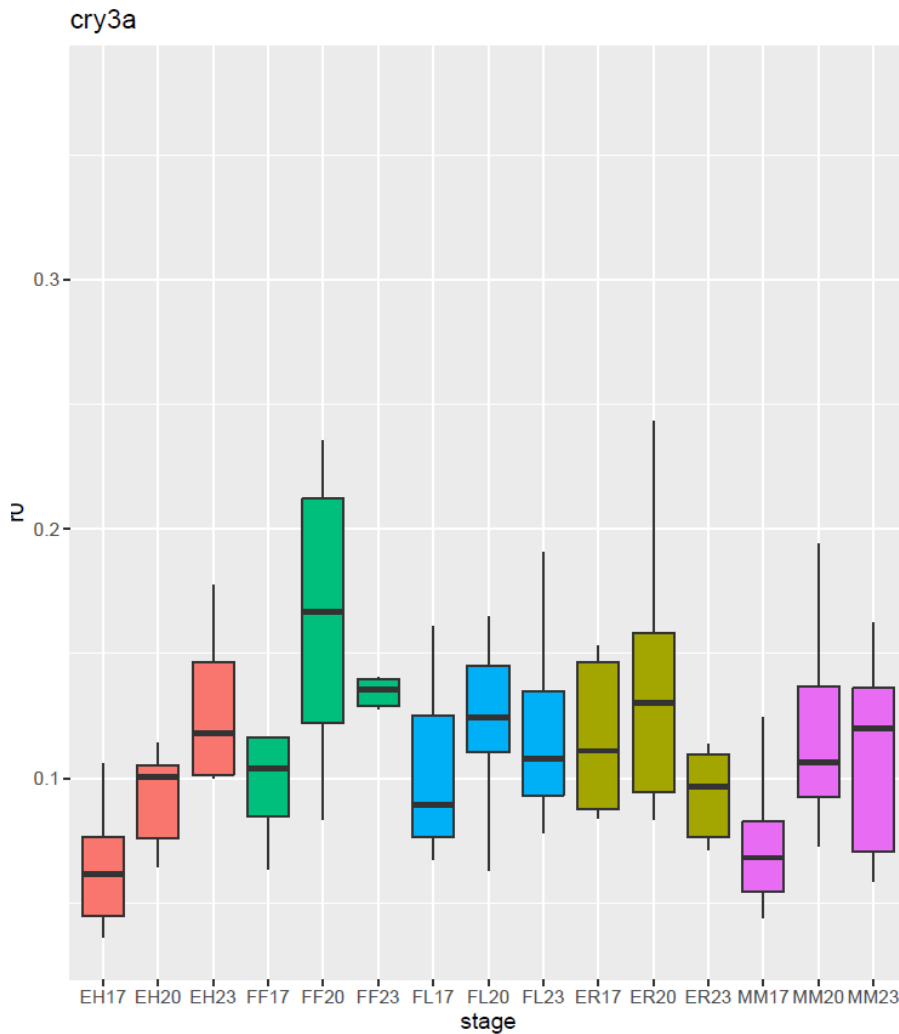
- *clocka*: Για το στάδιο της εκκόλαψης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στο FF παρατηρείται διαφορά μεταξύ 20 – 23°C. Στο FL δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Για το τελευταίο στάδιο της προνύμφης παρατηρείται αύξηση στην έκφραση στους 20°C και στη συνέχεια μείωση χωρίς οι διαφορές να είναι σημαντικές. Στο MM δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Έκφραση του γονιδίου clocka στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

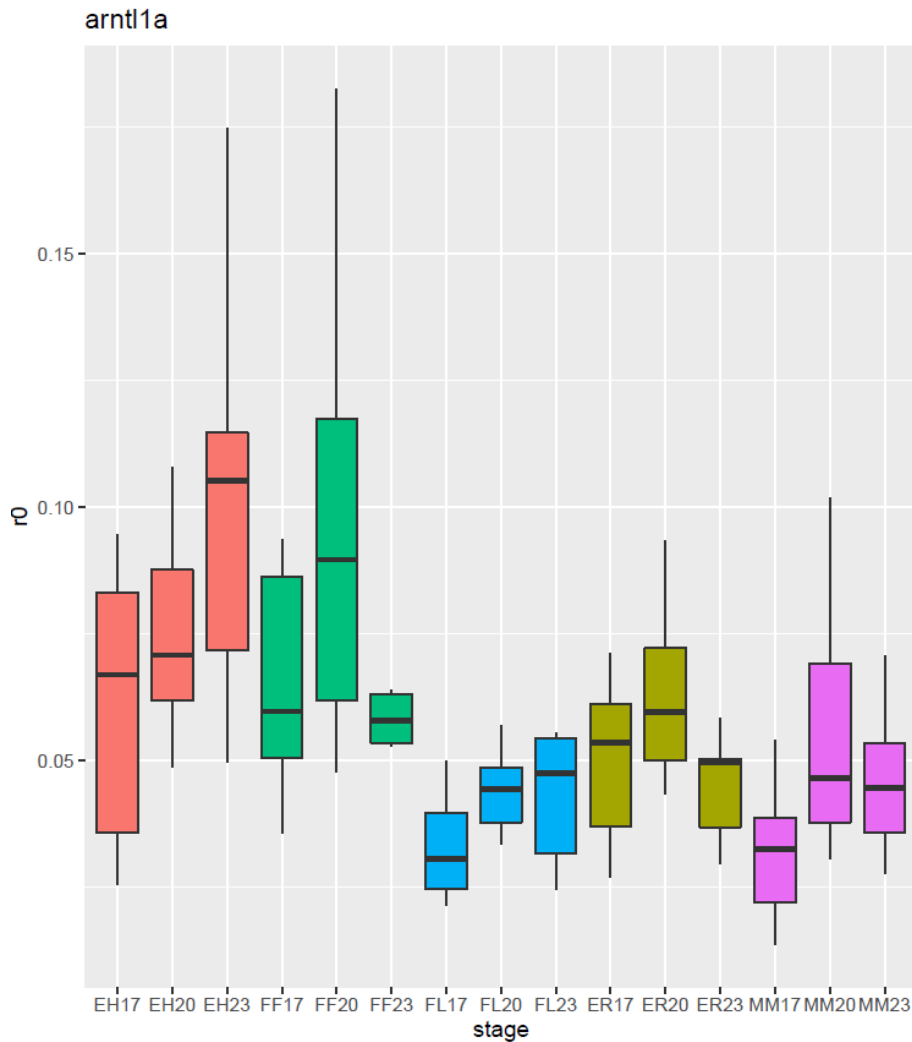
- *cry3a*: Για το στάδιο της εκκόλαψης παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία με σημαντικές διαφορές μεταξύ των 17 – 23°C. Στο FF παρατηρείται διαφορά μεταξύ 20 – 23°C. Στο FL δεν παρατηρούνται διαφορές στις συγκρίσεις των θερμοκρασιών. Για το τελευταίο στάδιο της προνύμφης παρατηρείται

αύξηση στην έκφραση στους 20°C και στη συνέχεια μείωση. Στο MM δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 22).



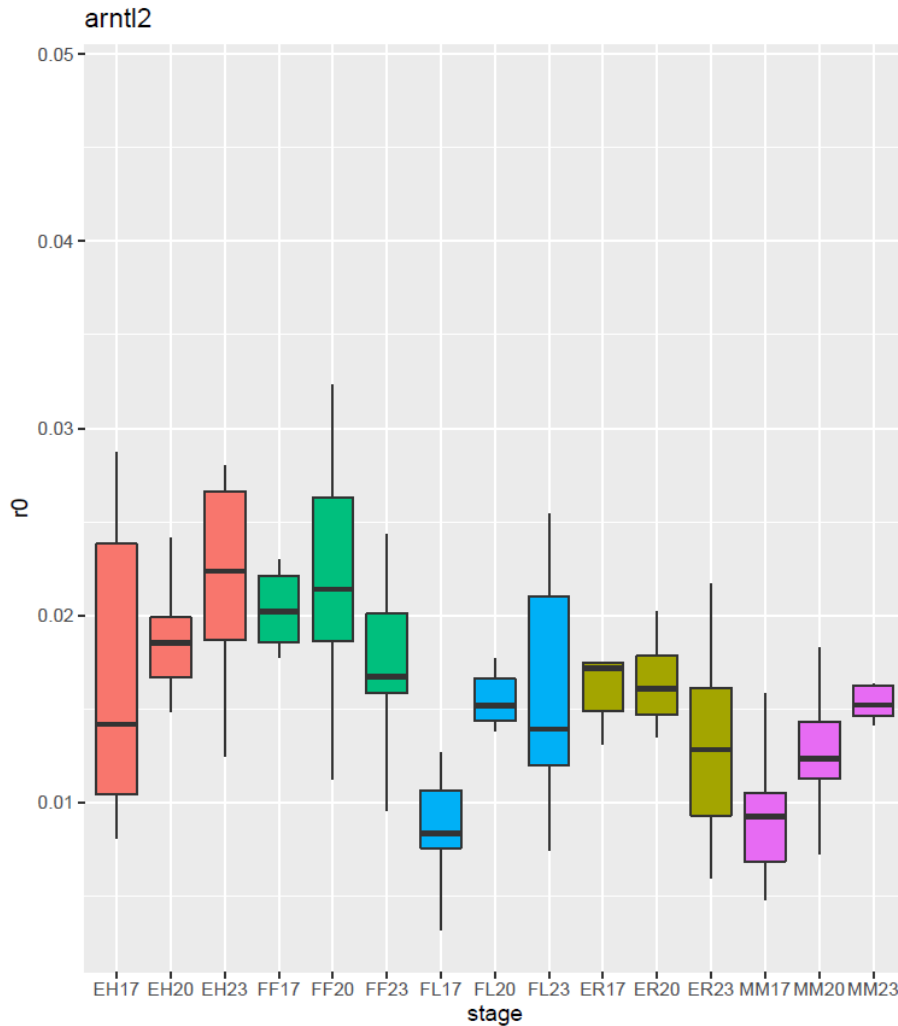
Εικόνα 22: Έκφραση του γονιδίου *cry3a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl1a*: Για το στάδιο της εκκόλαψης παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία με σημαντικές διαφορές μεταξύ των 17 - 23°C. Στα δύο επόμενα στάδια δεν παρατηρούνται διαφορές, ενώ για το τελευταίο στάδιο της προνύμφης παρατηρείται αύξηση στην έκφραση στους 20°C και στη συνέχεια μείωση. Στο MM δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 23).



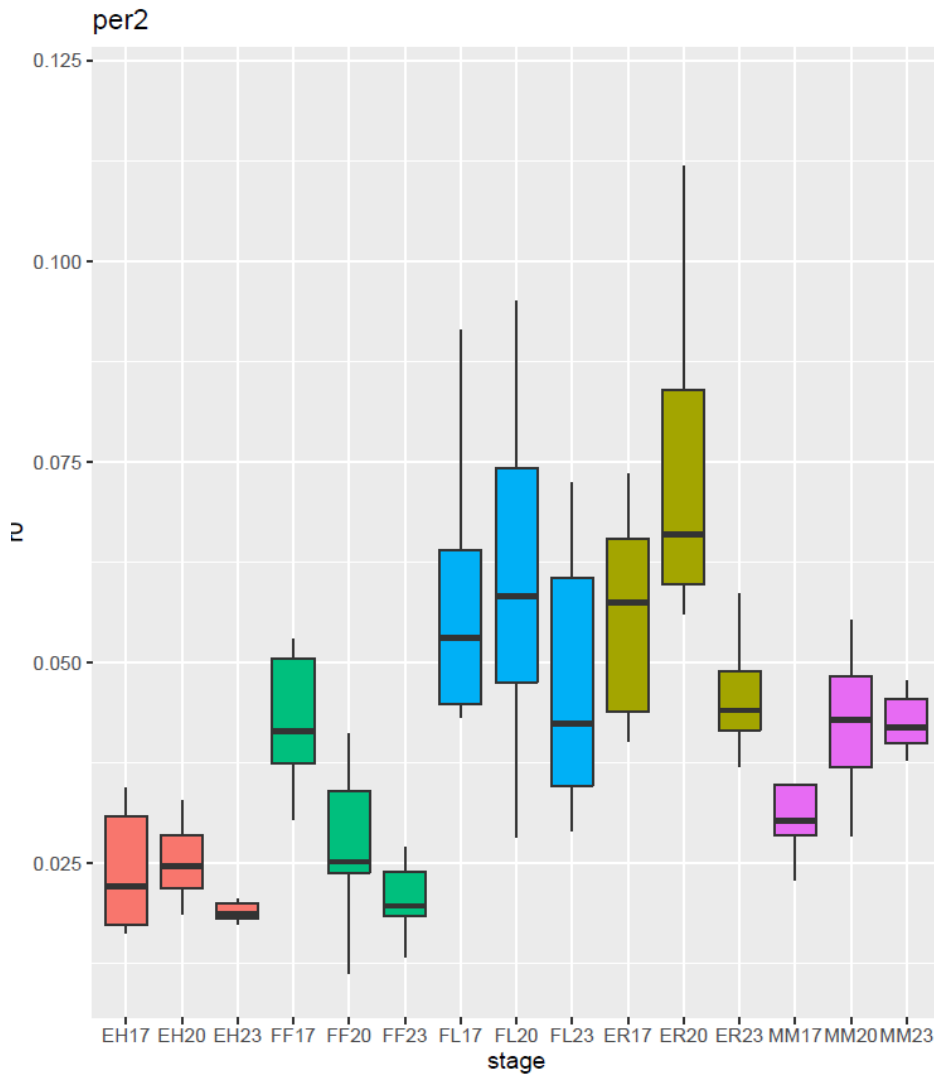
Εικόνα 23: Έκφραση του γονιδίου *arntl1a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl2*: Για το στάδιο της εκκόλαψης παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία χωρίς σημαντικές διαφορές, ενώ για το τελευταίο στάδιο της προνύμφης παρατηρείται μείωση της έκφρασης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία χωρίς σημαντικές διαφορές. Διαφορές παρατηρούνται στα στάδια FL και MM μεταξύ των 17 – 20 και 17 – 23οC (Εικόνα 24).



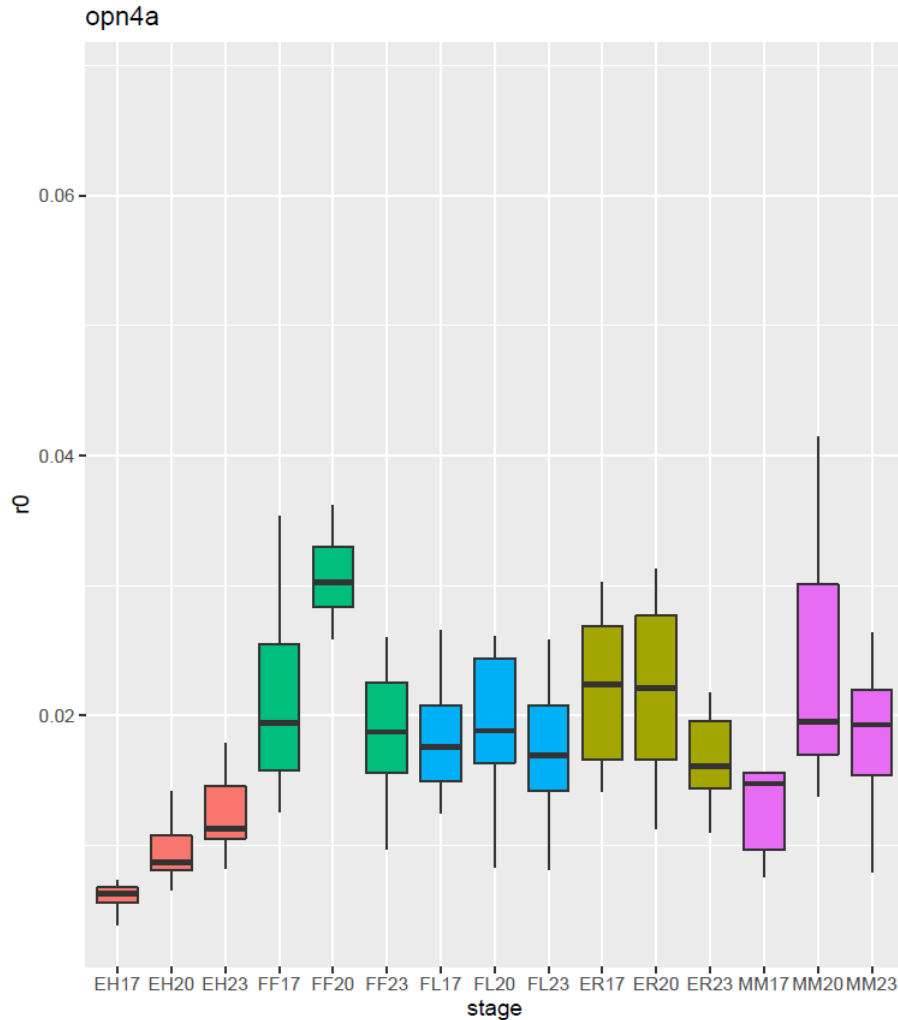
Εικόνα 24: Έκφραση του γονιδίου *arntl2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *per2*: Στο στάδιο της εκκόλαψης παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των 20 – 23°C. Στο FF παρατηρείται διαφορά μεταξύ 17 – 23°C, στο FL δεν παρατηρούνται διαφορές. Στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης παρατηρείται αύξηση στην έκφραση στους 20°C και στη συνέχεια μείωση χωρίς σημαντικές διαφορές. στο MM υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 17 – 23°C (Εικόνα 25).



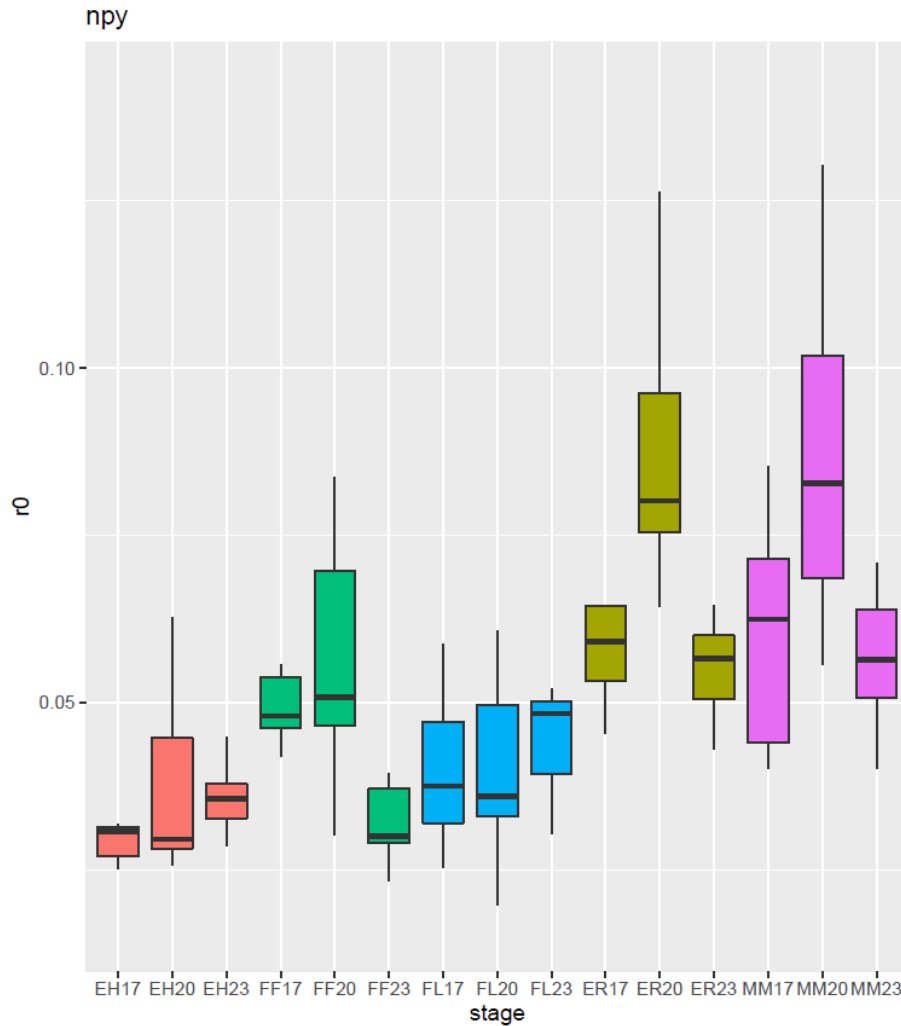
Εικόνα 25: Έκφραση του γονιδίου *per2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- orn4a*: Στο στάδιο της εκκόλαψης παρατηρείται σταδιακή αύξηση της έκφρασης όσος αυξάνεται η θερμοκρασία με σημαντικές διαφορές μεταξύ των 17 – 23°C. Στο FF στάδιο παρατηρείται διαφορά μεταξύ 20 – 23 οC, στο FL δεν παρατηρούνται διαφορές. Στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης μείωση της έκφρασης όταν η θερμοκρασία αυξάνεται στους 23°C χωρίς σημαντικές διαφορές. Στο MM υπάρχει διαφορά μεταξύ 17 – 20 οC (Εικόνα 26).



Εικόνα 4: Έκφραση του γονιδίου *orh4a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *nr1*: Στο στάδιο της εκκόλαψης παρατηρείται σταδιακή αύξηση της έκφρασης όσο αυξάνεται η θερμοκρασία χωρίς σημαντικές διαφορές. FF στάδιο μεταξύ 17 – 23 και 20 - 23°C. Στο FL δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ενώ στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης παρατηρείται αύξηση στην έκφραση στους 20°C και στη συνέχεια μείωση με σημαντικές διαφορές μεταξύ των 17 – 20°C. Στο MM δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Έκφραση του γονιδίου hpy στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

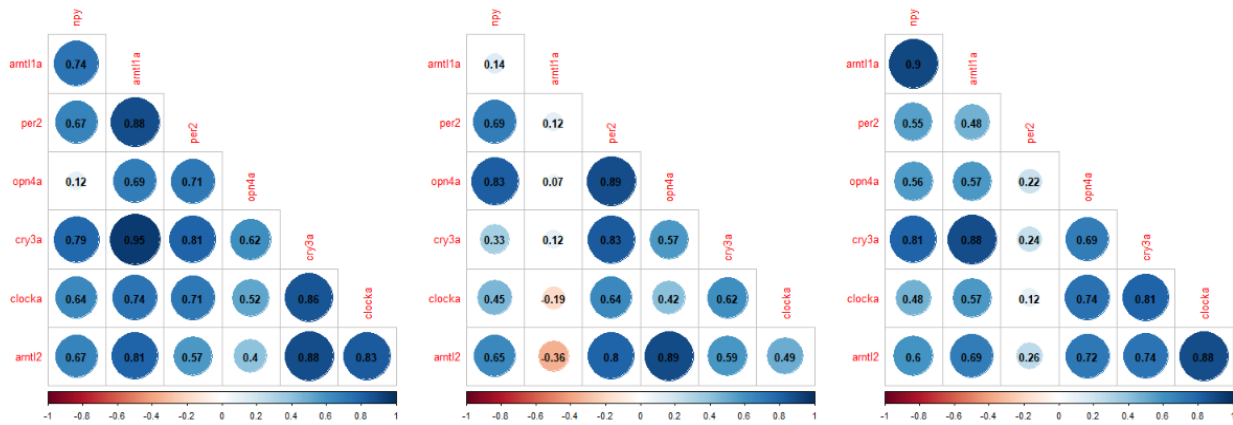
Διαγράμματα συσχέτισης

Επιπλέον, για τα γονίδια ενδιαφέροντος παρασκευάστηκαν και διαγράμματα συσχέτισης, ένας γρήγορος τρόπος παρατήρησης των συσχετίσεων μεταξύ των γονιδίων ανάλογα με τις μεταβολές στις θερμοκρασίες.

Stage: EH Temperature: 17o C

Stage: EH Temperature: 20o C

Stage: EH Temperature: 23o C



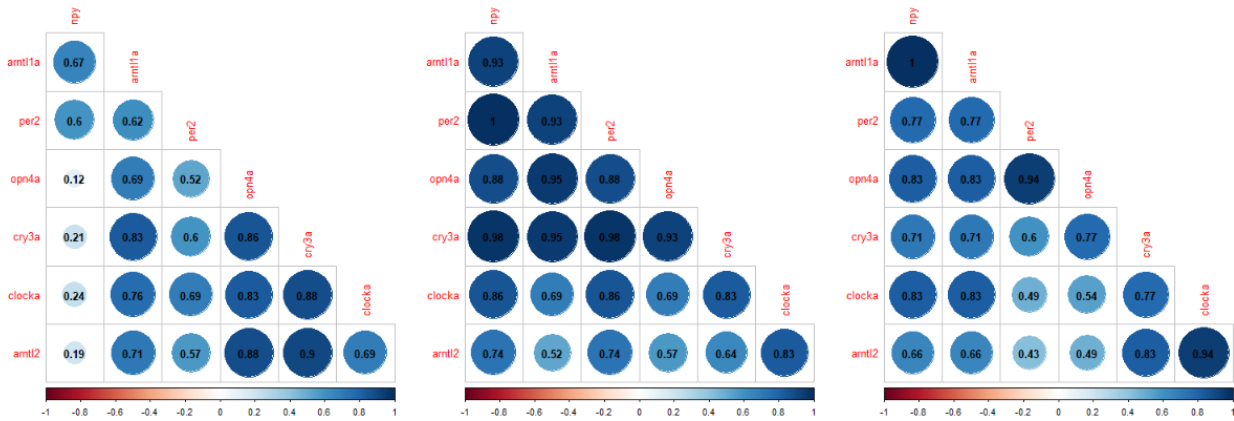
Εικόνα 28: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες του σταδίου της εκκόλαψης (EH). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στο στάδιο της εκκόλαψης (EH) παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις στους 17 και 23°C. Στην ενδιάμεση θερμοκρασία υπάρχουν και αρνητικές συσχετίσεις οι οποίες δεν είναι ισχυρές. Οι ισχυρότερες συσχετίσεις εμφανίζονται στους 17°C (Εικόνα 28).

Stage: FF Temperature: 17o C

Stage: FF Temperature: 20o C

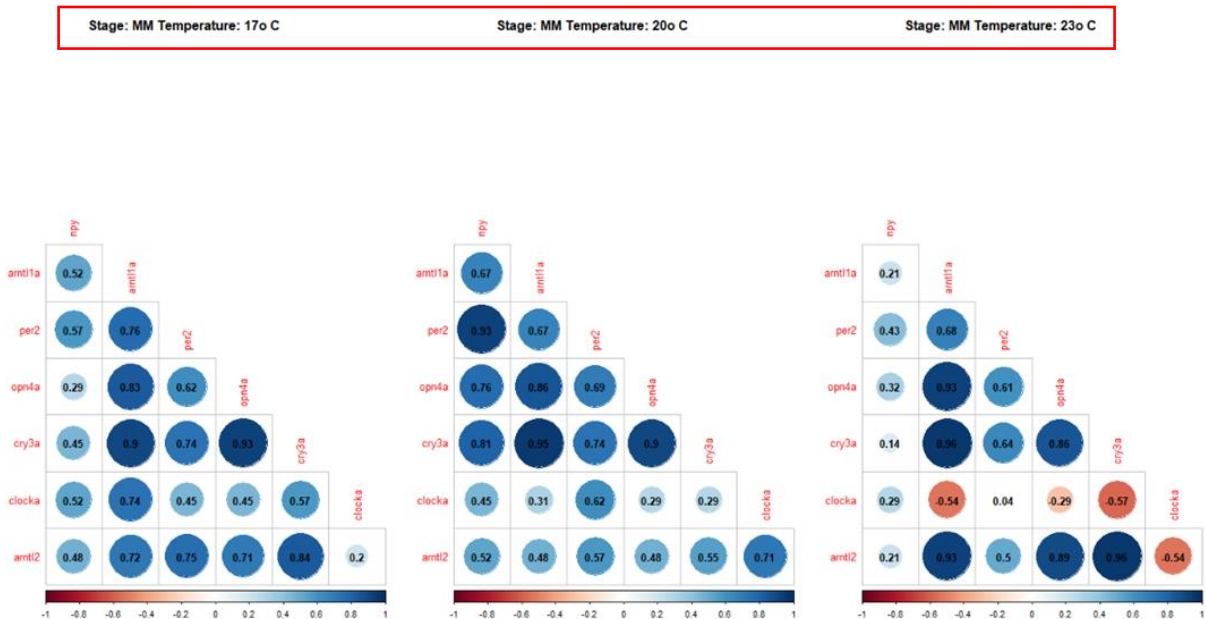
Stage: FF Temperature: 23o C



Εικόνα 29: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες του πρώτου ταΐσματος (FF). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος (FF) παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις σε όλες τις θερμοκρασίες. Αξίζει να αναφερθεί πως οι πιο ισχυρές συσχετίσεις εμφανίζονται στη θερμοκρασία των 20°C (Εικόνα 29).

Στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης (ER) στους 17 και 23°C υπάρχουν και θετικές και αρνητικές συσχετίσεις (δεν είναι ισχυρές). Στους 20°C εμφανίζονται μόνο θετικές συσχετίσεις (Εικόνα 31).



Εικόνα 32: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες του σταδίου της μεταμόρφωσης (MM). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

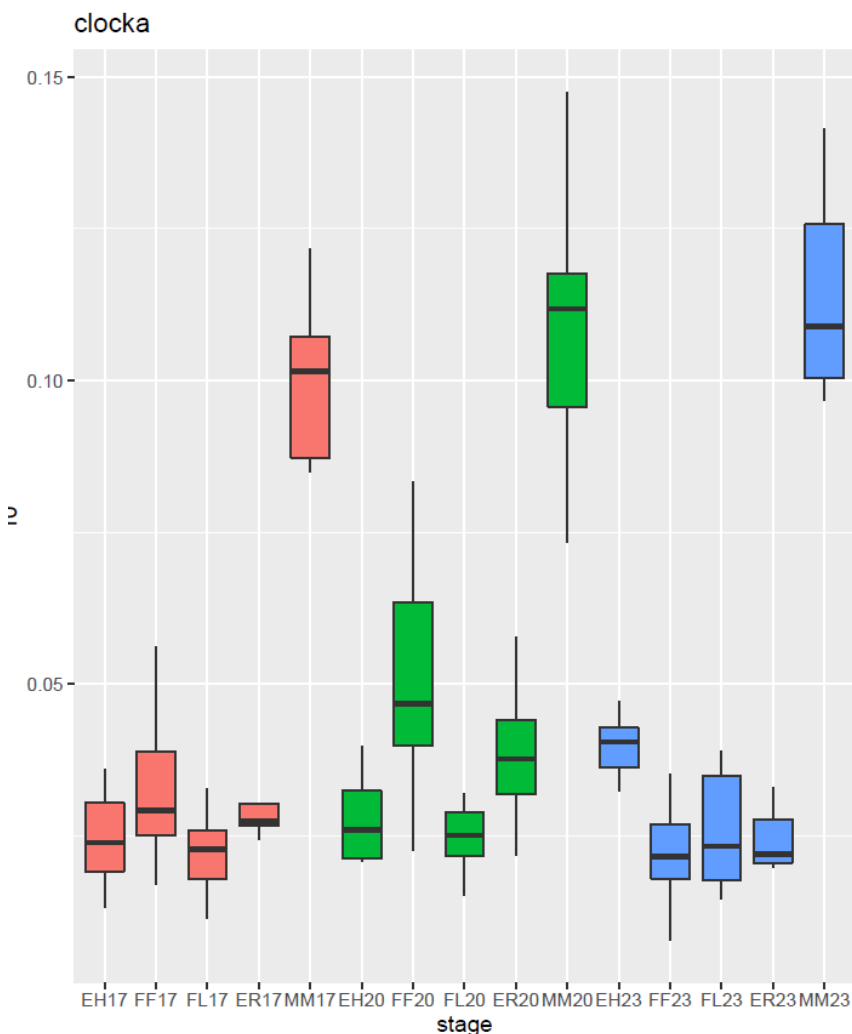
Στο στάδιο της μεταμόρφωσης στους 23°C παρατηρούνται και αρνητικές συσχετίσεις και στις δύο προηγούμενες θερμοκρασίες παρόμοια πρότυπα με ισχυρά θετικές συσχετίσεις (Εικόνα 32).

Συγκρίσεις μεταβολής των σταδίων

Οι τιμές p-value από το Kruskal-Wallis test στη σύγκριση όπου διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία παρατίθενται στον Πίνακα 4 του παραρτήματος. Επιπλέον στον Πίνακα 5 του παραρτήματος εμφανίζονται τα p-values των κατά ζεύγη συγκρίσεων.

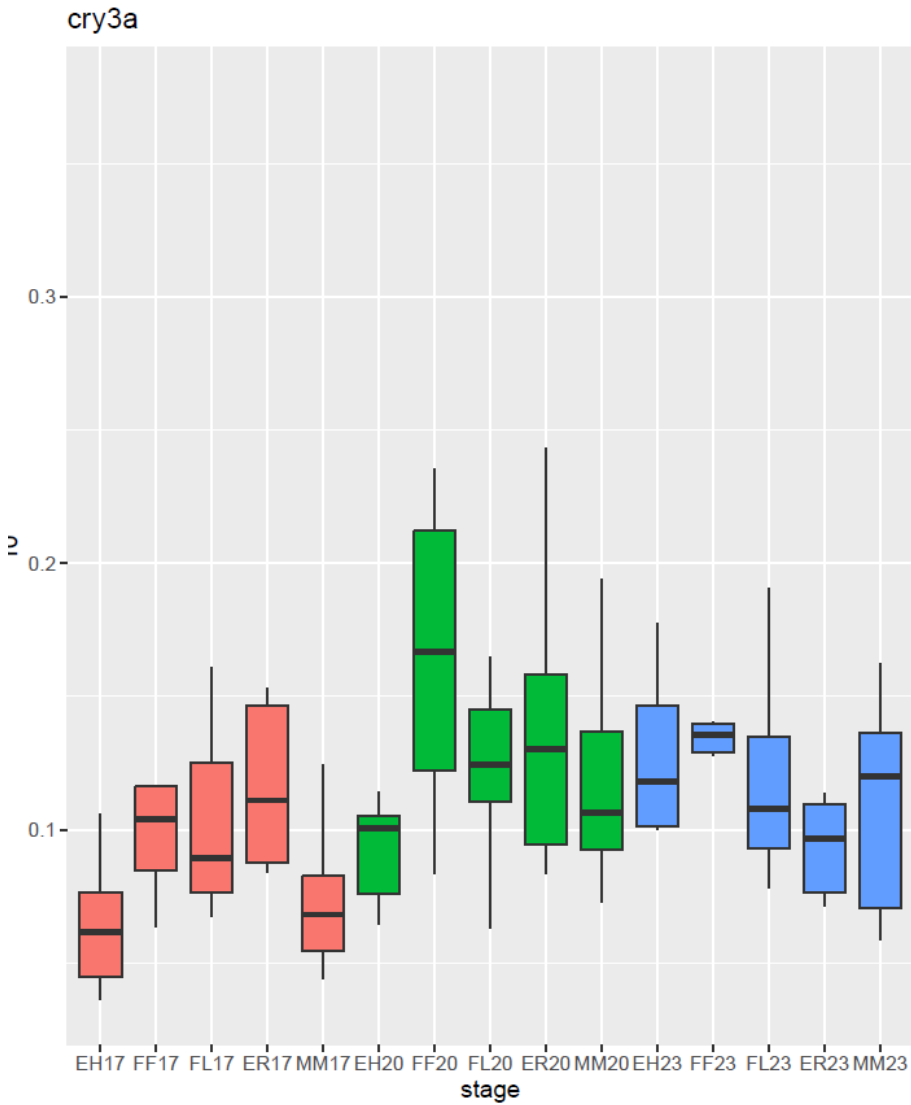
Θηκογράμματα

- *clocka*: Διαφορές παρατηρούνται στους 17 και 20°C ανάμεσα στα στάδια FF – MM. Στους 23 οC παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα στάδια FF -MM και FL – MM. Και στις τρεις θερμοκρασίες διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια EH– MM (Εικόνα 33).



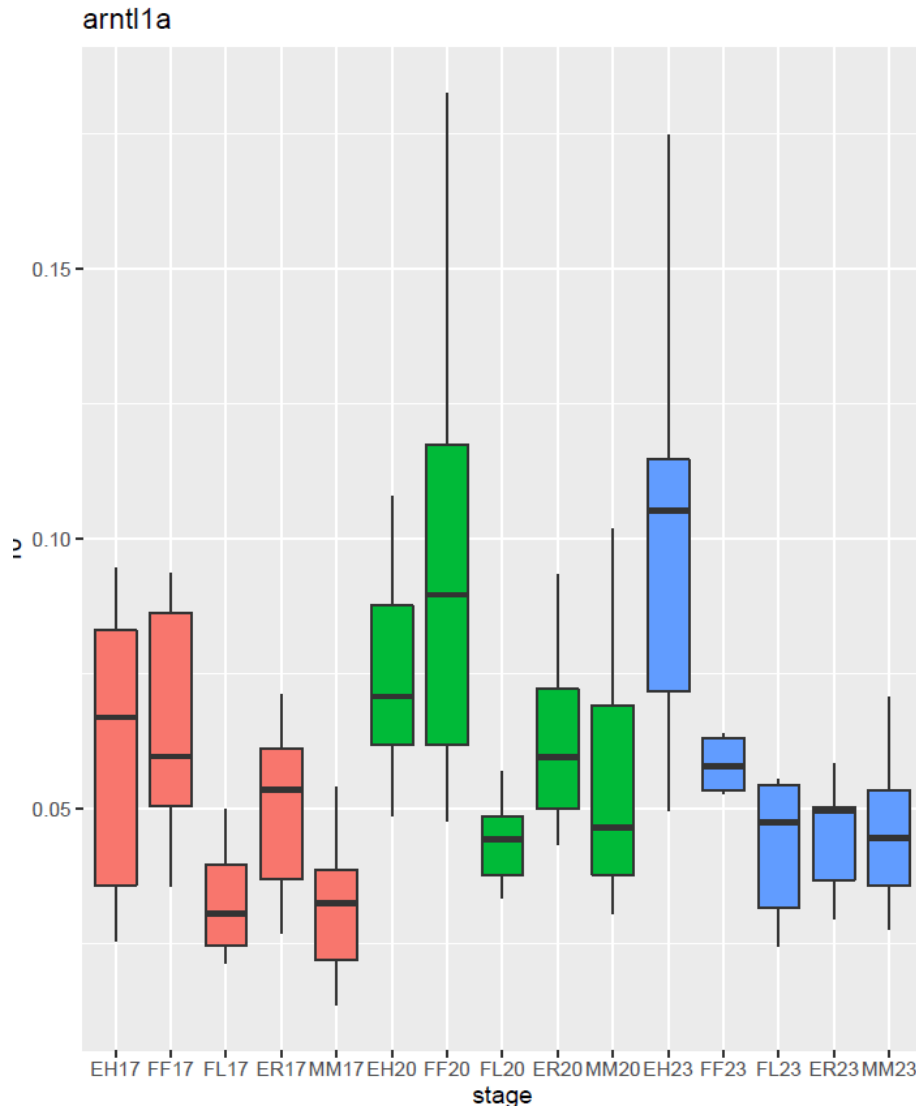
Εικόνα 33: Έκφραση του γονιδίου clocka στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *cry3a*: Στους 17 και 23οC διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στα EH – ER, ενώ στους 17 οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FF - MM (Εικόνα 34).



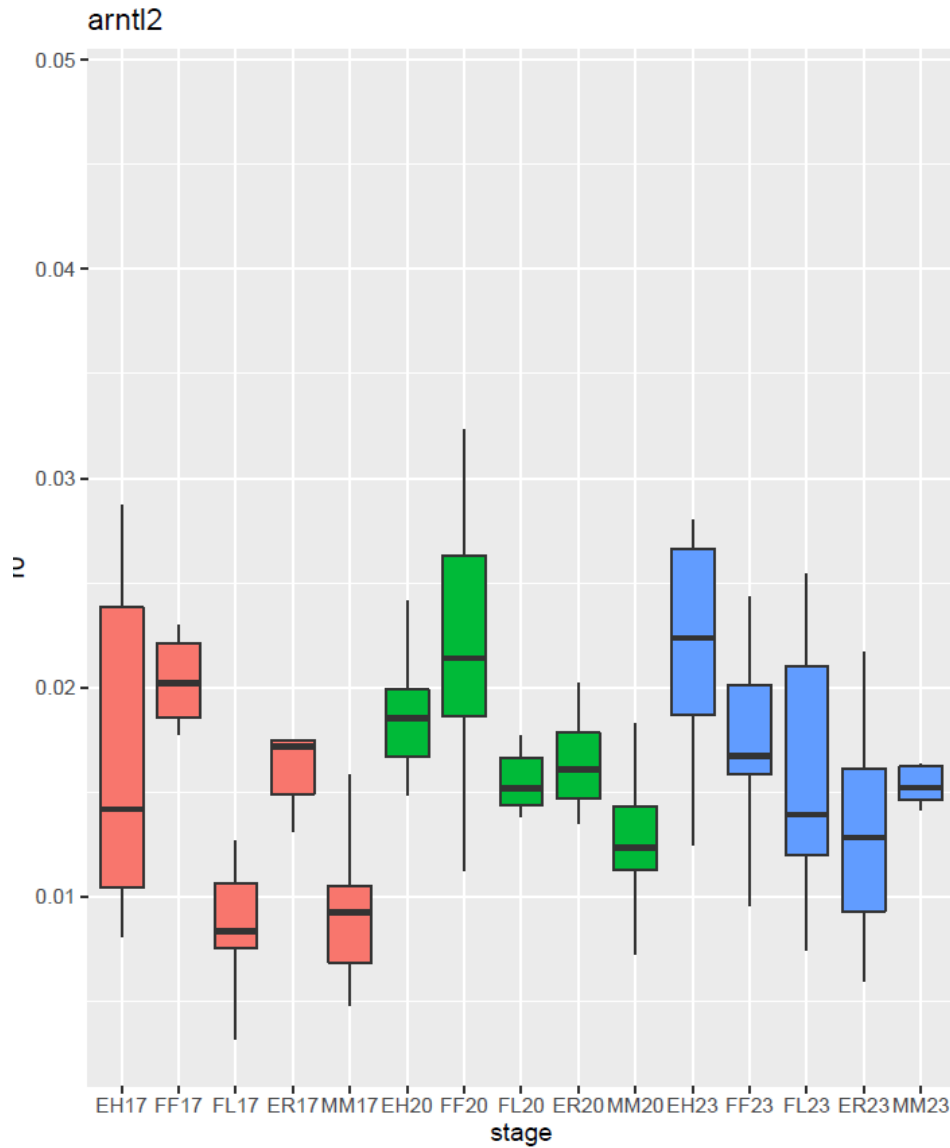
Εικόνα 34: Έκφραση του γονιδίου *cry3a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl1a*: Διαφορές παρατηρούνται στους 17 και 20οC ανάμεσα στα στάδια FL – FF και FF – MM. Στους 17οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα EH – MM στους 20οC ανάμεσα στα EH – FL και στους 23οC ανάμεσα στα ER - EH, EH – FL, EH – MM (Εικόνα 35).



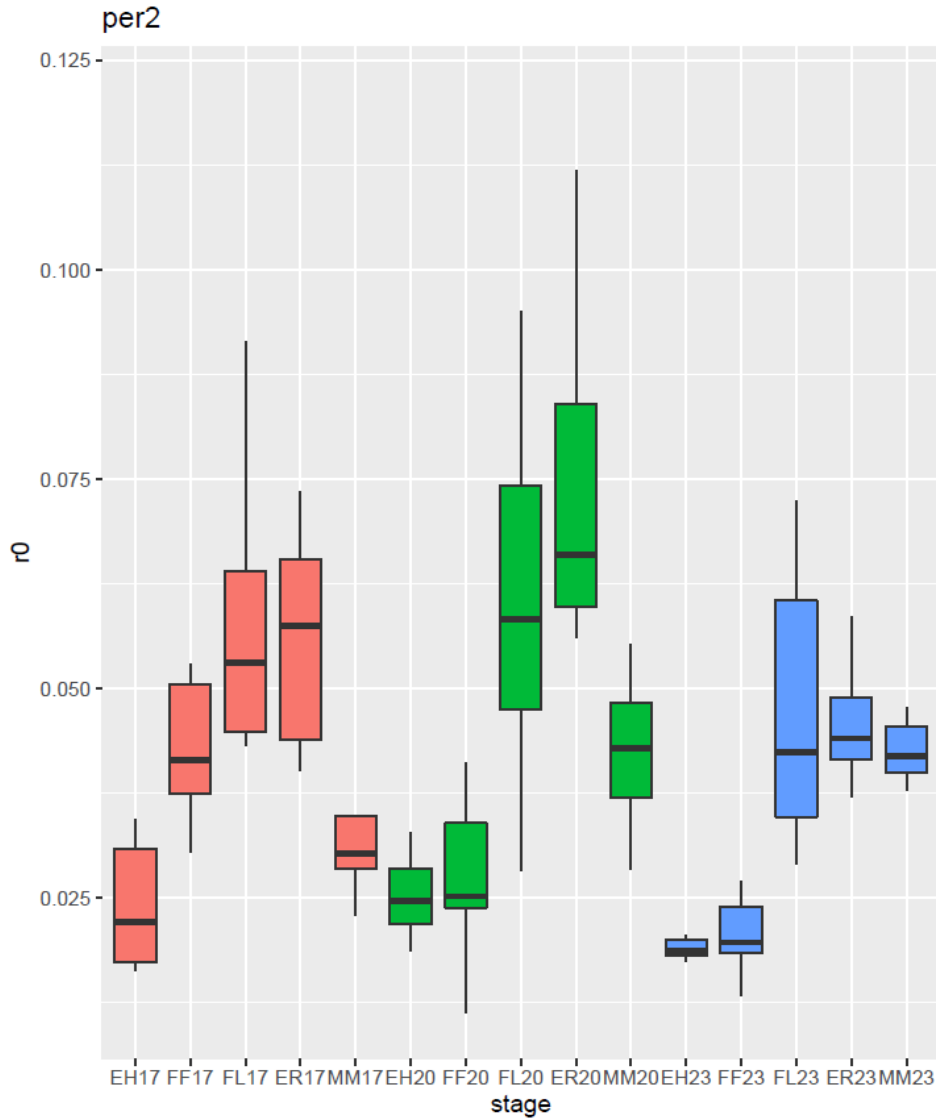
Εικόνα 35: Έκφραση του γονιδίου *arntl1a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl2*: Διαφορές παρατηρούνται στους 17οC ανάμεσα στα στάδια FF – FL και FF – MM. Στους 20οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – MM. Μόνο στο στάδιο των 23οC παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στα ER – EH (Εικόνα 36).



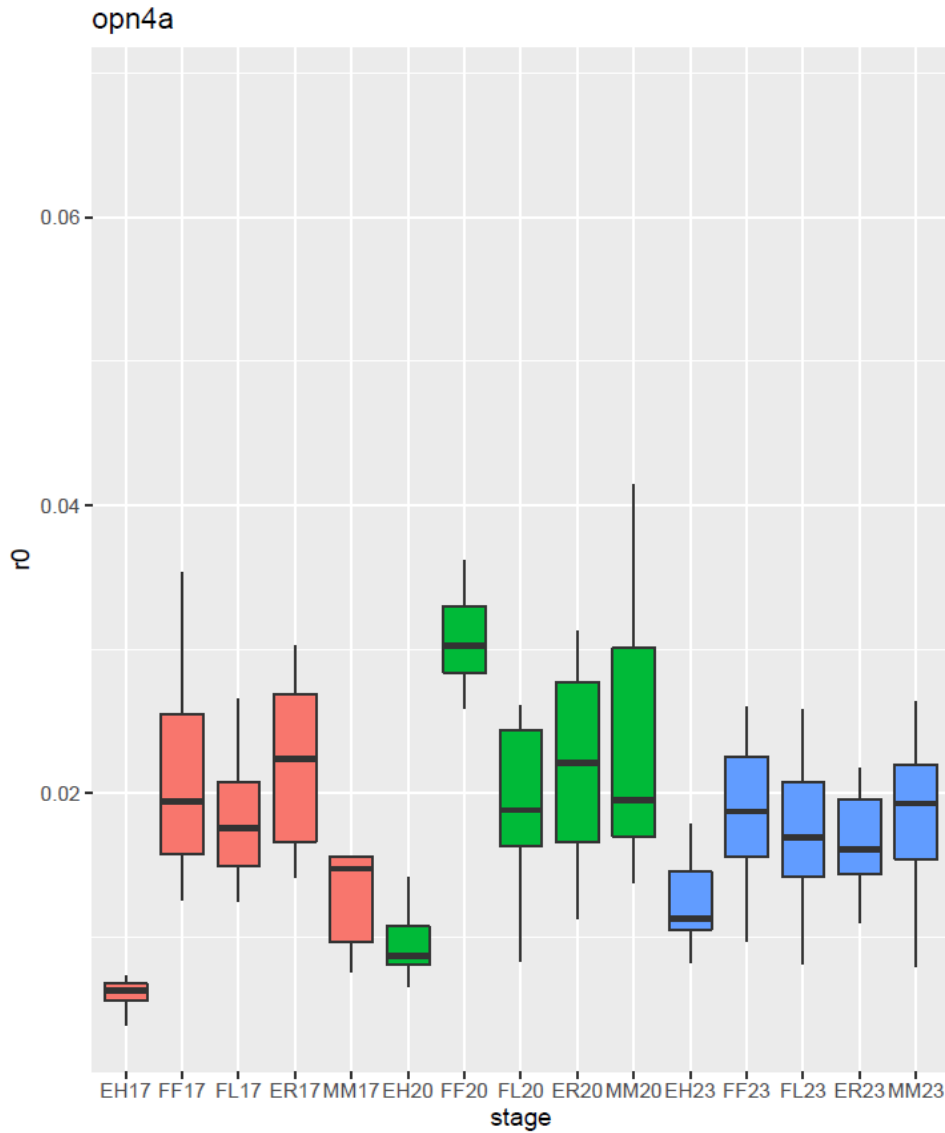
Εικόνα 36: Έκφραση του γονιδίου *arntl2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *per2*: Στους 17οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FL – MM, ER – EH, EH-FF, EH – FL, ER – MM. Στους 20οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – FL, ER – EH, EH – FL, ER – FF, ER – MM. Στους 23οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – FL και FF – MM, ER – EH, EH – FL, EH – MM, ER – FF (Εικόνα 37).



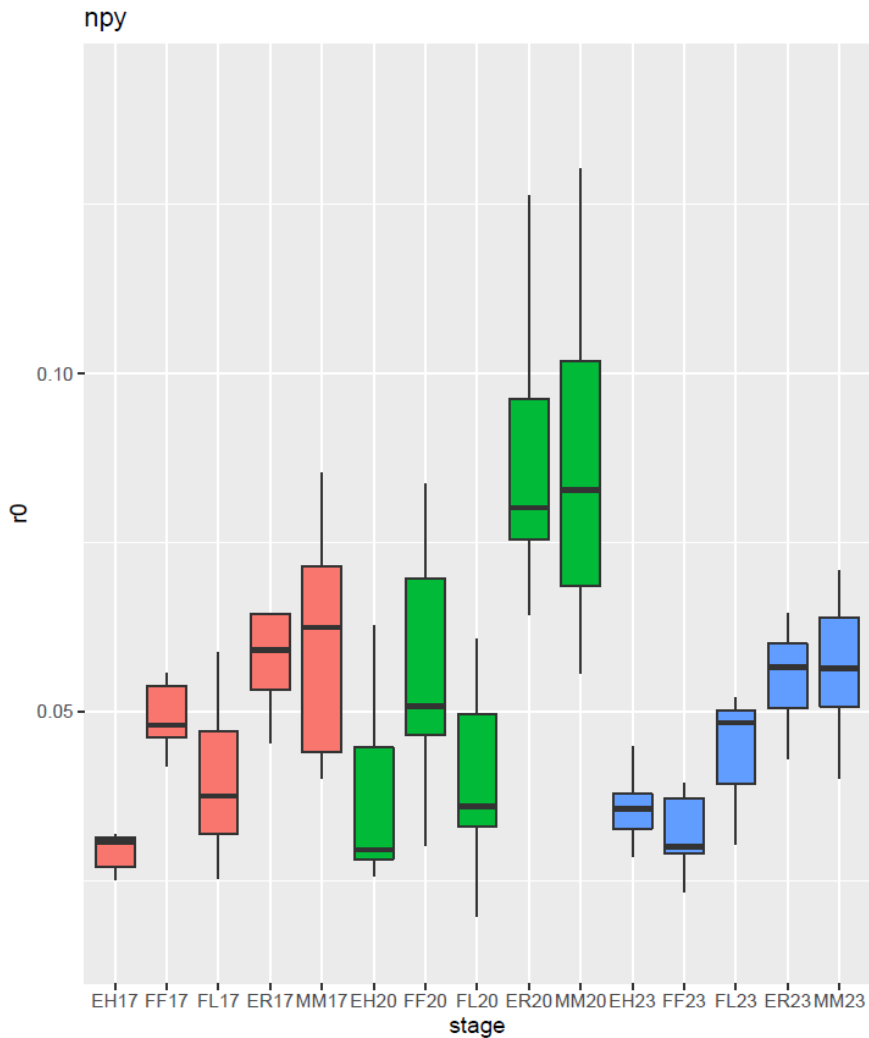
Εικόνα 37: Έκφραση του γονιδίου *per2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *orn4a*: Διαφορές παρατηρούνται στους 17οC ανάμεσα στα στάδια FF – MM και στους 20οC ανάμεσα στα FF – FL. Στους 17οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα ER – EH, EH – FF, EH – FL. Στους 20οC ανάμεσα στα EH – FF, EH – FL, EH – MM και στους 23οC ανάμεσα στα EH -FF, EH – MM (Εικόνα 38).



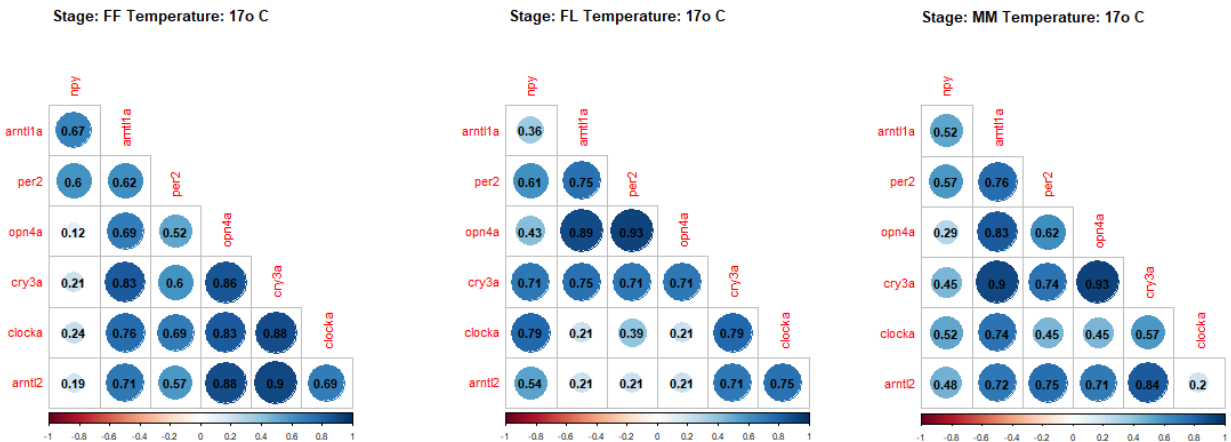
Εικόνα 38: Έκφραση του γονιδίου *orn4a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *nrp*: Στους 17οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FL – MM, ER – EH, EH – FF, EH – MM. Στους 20οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα ER – EH, EH – MM, ER – FL και στους 23οC ανάμεσα στα FF – MM, ER – EH, EH – MM, ER – FF (Εικόνα 39).

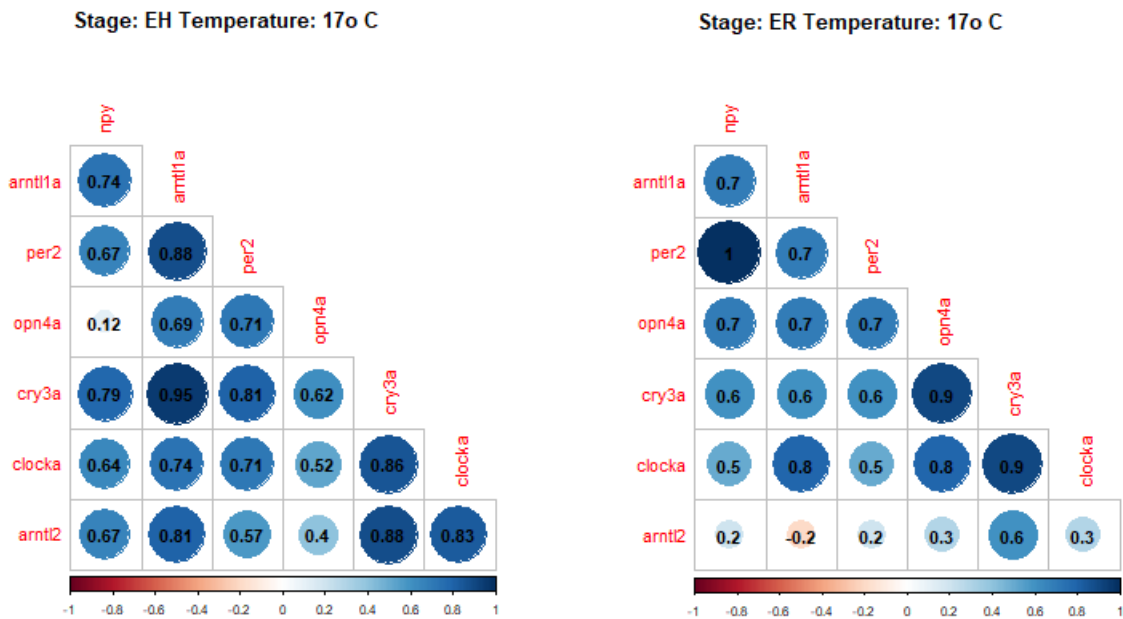


Εικόνα 39: Έκφραση του γονιδίου *nrp* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

Διαγράμματα συσχετίσεων

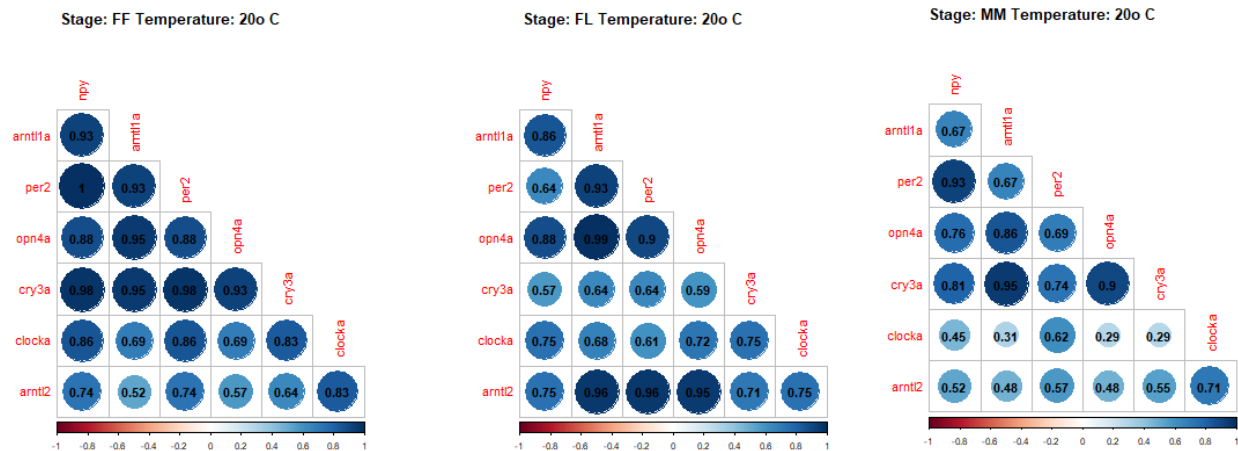


Εικόνα 40: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα τρία διαφορετικά στάδια (FF, FL, MM) στους 17oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

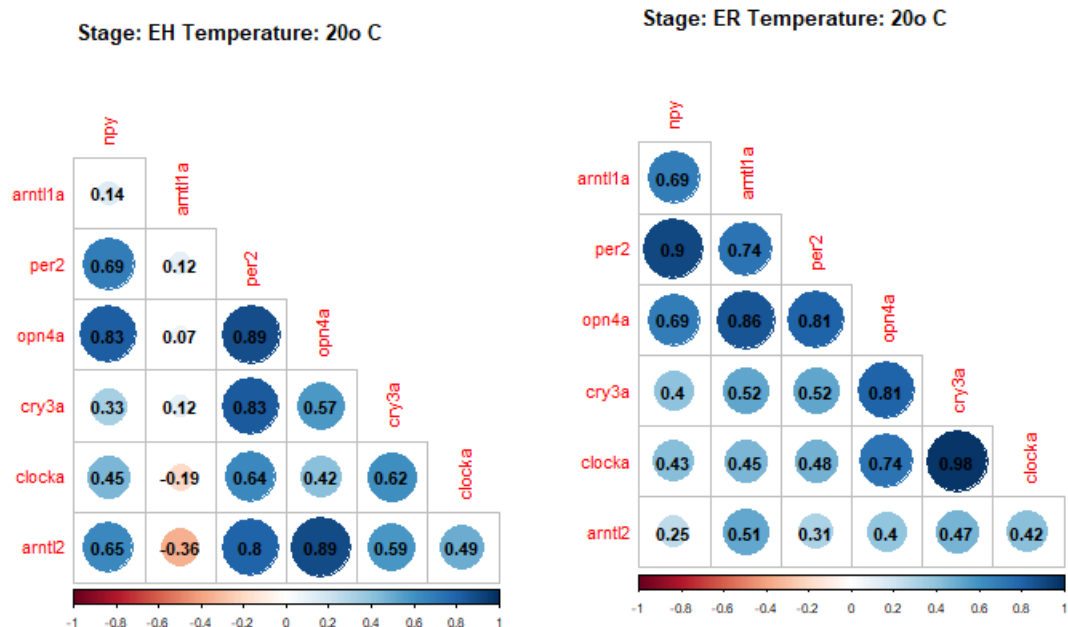


Εικόνα 41: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στους 17oC για τα δύο στάδια EH και ER. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στη θερμοκρασία των 17°C και στα πέντε αναπτυξιακά στάδια παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις (Εικόνες 40, 41).

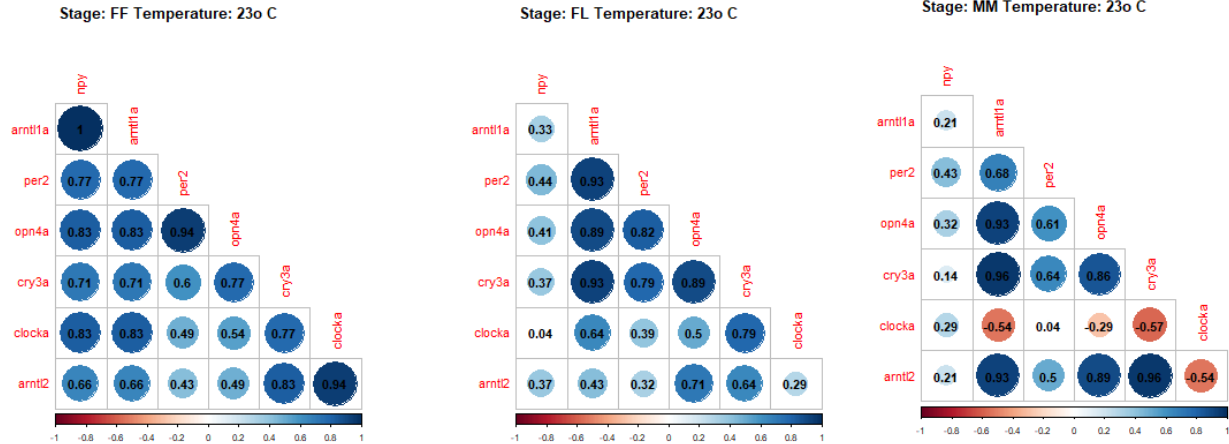


Εικόνα 42: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα τρία διαφορετικά στάδια (FF, FL, MM) στους 20oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης.

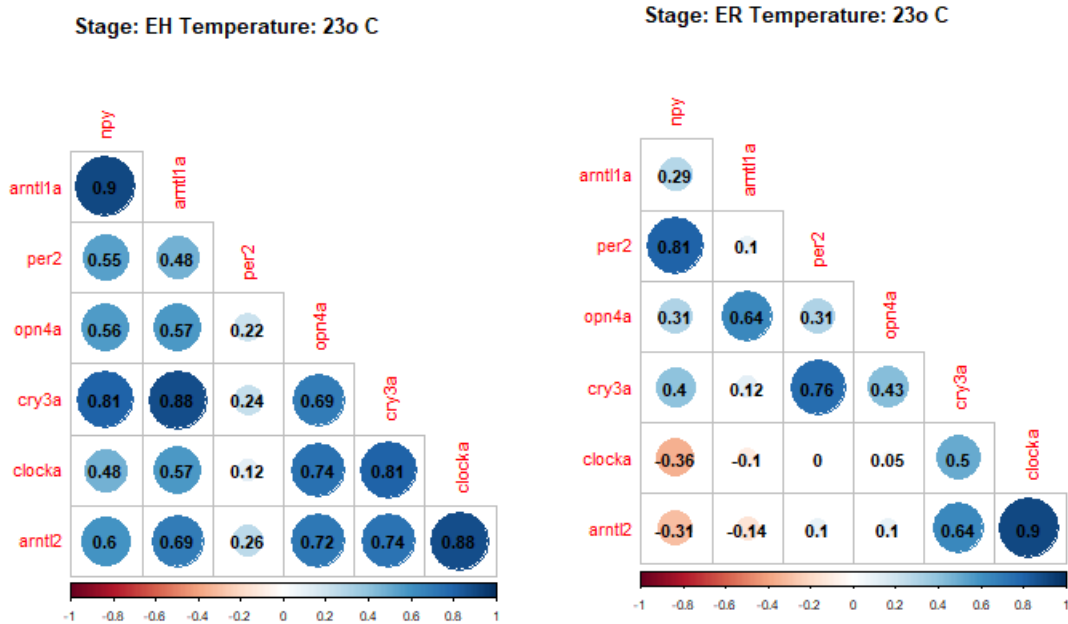


Εικόνα 43: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στους 20oC για τα δύο στάδια EH, ER. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στους 20oC στο EH παρατηρούνται κυρίως θετικές συσχετίσεις και κάποιες αρνητικές (όχι ισχυρές). Στα υπόλοιπα στάδια παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις, με το πρώτο στάδιο (FF) να εμφανίζει σχεδόν σε όλες τις συγκρίσεις ισχυρές συσχετίσεις (Εικόνες 42, 43).



Εικόνα 44: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα τρία διαφορετικά στάδια (FF, FL, MM) στους 23oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης.



Εικόνα 45: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στους 23oC για τα στάδια EH και ER. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στη θερμοκρασία των 23°C στα δύο πρώτα στάδια (FF, FL) παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις. Στο MM διαφαίνονται κάποιες αρκετά ισχυρές θετικές συσχετίσεις και κάποιες ελάχιστες αρνητικές συσχετίσεις (Εικόνα 44). Στο στάδιο των 23oC στο EH στάδιο παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις, ενώ στο στάδιο ER παρατηρούνται και αρνητικές (Εικόνα 45).

3.3 Σύνοψη

Αναφορικά με τη τσιπούρα, παρουσιάζονται οι συγκεντρωτικοί πίνακες (Πίνακας 14, 25) όπου σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές για το σύνολο των συγκρίσεων. Στο επάνω μέρος φαίνονται τα αποτελέσματα του RNA sequencing και στο κάτω μέρος τα αποτελέσματα από την PCR και για τις δύο συγκρίσεις. Επιπλέον υπάρχει ο χαρακτηρισμός «up» για τα γονίδια που υπερεκφράζονται και ο χαρακτηρισμός «down» για τα γονίδια που υποεκφράζονται. Εκεί που συμφωνούν τα αποτελέσματα σημειώνονται με γκρι χρώμα στα κελιά.

Μεταβολή της θερμοκρασίας

Πίνακας 14: συγκεντρωτικός Πίνακας για την επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNA sequencing στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

RNA SEQ	FF20vsFF17	FF23vsFF17	FF23vsFF20	MM20vsMM17	MM23vsMM17	MM20vsMM23	FL20vsFL17	FL23vsFL17	FL20vsFL23
cry3a	up	up			up				
per2	down		up		down			down	
arntl1a	up						up		up
arntl2	up		down						
clocka									
opn4a									
npy				up	up				
REAL TIME	FF20vsFF17	FF23vsFF17	FF23vsFF20	MM20vsMM17	MM23vsMM17	MM20vsMM23	FL20vsFL17	FL23vsFL17	FL20vsFL23
cry3a	up			up					
per2		down			up				
arntl1a				up					
arntl2	up				up		up		
clocka			down						
opn4a			down	up					
npy		down	down						

Μεταβολή των σταδίων

Πίνακας 15: συγκεντρωτικός Πίνακας για την επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNA sequencing στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλονται τα στάδια

RNA SEQ	FF17vsFL17	FF17vsMM17	FL17vsMM17	FF20vsFL20	FF20vsMM20	FL20vsMM20	FF23vsFL23	FF23vsMM23	FL23vsMM23
clocka					up				
cry3a					up	up		up	up
per2				down	down		down		
arntl1a	up			up	up		up	up	
arntl2		up		up	up		up	up	
opn4a		up		up	up		up	up	
npv		down	down		down	down		down	down
REAL TIME	FF17vsFL17	FF17vsMM17	FL17vsMM17	FF20vsFL20	FF20vsMM20	FL20vsMM20	FF23vsFL23	FF23vsMM23	FL23vsMM23
clocka		down	down		down	down		down	down
cry3a		up							
per2			up	down			down	down	
arntl1a	up	up		up	up				
arntl2	up	up			up				
opn4a		up		up					
npv			down			down		down	

3.4 RNA SEQUENCING – Λαβράκι

Για τα δείγματα του λαβρακιού ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με τα δείγματα της τσιπούρας. Απο τα δεδομένα απουσιάζουν οι συγκρίσεις FL17vsFL20, FL17vsFL14, FL14vsFL20.

Κατηγοριοποίηση γονιδίων

Τα γονίδια που ανήκουν στην κάθε κατηγορία των core γονιδίων είναι τα ακόλουθα:

	gene name	gene ID
clock και arntl-like ομάδες παράλογων γονιδίων	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005013892
	<i>arntl1a</i>	ENSDLAG00005026433
	<i>ARNTL</i>	ENSDLAG00005022380
	<i>arntl2</i>	ENSDLAG00005023504
	<i>ARNTL2</i>	ENSDLAG00005009059
	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005022872
	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005007305
	<i>arnt2</i>	ENSDLAG00005004634
	<i>clocka</i>	ENSDLAG00005012393

	gene name	gene ID
cry	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005023785
	<i>cry-dash</i>	ENSDLAG00005006961
	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005024015
	<i>cry2</i>	ENSDLAG00005019570
	<i>cry3a</i>	ENSDLAG00005001597
	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005023868
	<i>cry1b</i>	ENSDLAG00005022057

	gene name	gene ID
Period	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005020421
	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005015065

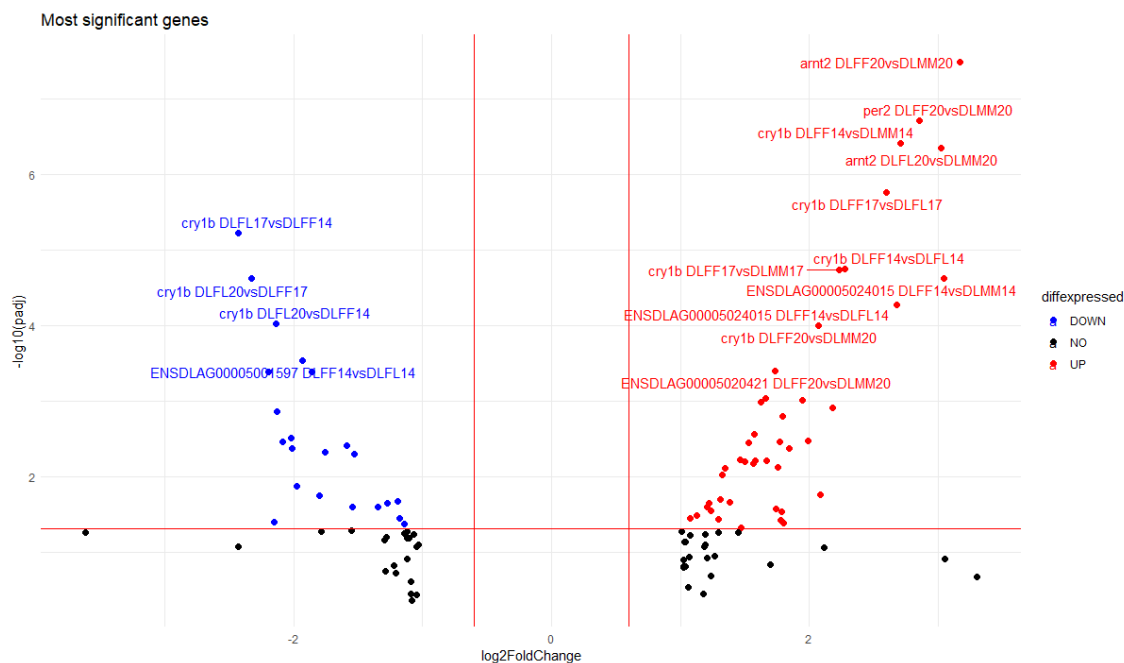
	<i>novel gene</i>	ENSDLAG00005020824
	<i>per2</i>	ENSDLAG00005000521

Γονίδια με στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους

Από αυτή την λίστα προσδιορίστηκαν τα γονίδια με στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως στη μεθοδολογία. Αυτά είναι τα ακόλουθα: *arni2*, *per2*, *cry1b*, *ENSDLAG00005020421*, *ENSDLAG00005024015*, *ENSDLAG00005001597*, *ARNTL2*

Διάγραμμα volcano

Για το σύνολο των συγκρίσεων κατασκευάστηκε το volcano με τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια, το οποίο φαίνεται στη Εικόνα που ακολουθεί. Εκτός από το όνομα του γονιδίου, επισημαίνεται και η σύγκριση στην οποία εντοπίζονται οι διαφορές (Εικόνα 46).



Εικόνα 46: διάγραμμα volcano για τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια στο λαβράκι

Επιπλέον για τα γονίδια ακολουθεί η Εικόνα 47 με την σύγκριση, *p*-adjusted, log fold change και το όνομα του γονιδίου.

comparison	log2FoldChange	padj	gene_name
DLFF20vsDLMM20	3.167602	3.247290e-08	arnt2
DLFF20vsDLMM20	2.854920	1.959165e-07	per2
DLFF14vsDLMM14	2.710715	3.870135e-07	cry1b
DLFL20vsDLMM20	3.023879	4.447725e-07	arnt2
DLFF17vsDLFL17	2.596413	1.752556e-06	cry1b
DLFL17vsDLFF14	-2.428192	5.966712e-06	cry1b
DLFF14vsDLFL14	2.277160	1.766280e-05	cry1b
DLFF17vsDLMM17	2.229404	1.836070e-05	cry1b
DLFF14vsDLMM14	3.042543	2.419182e-05	ENSDLAG00005024015
DLFL20vsDLFF17	-2.324274	2.421637e-05	cry1b
DLFF14vsDLFL14	2.675843	5.392556e-05	ENSDLAG00005024015
DLFL20vsDLFF14	-2.136699	9.461404e-05	cry1b
DLFF20vsDLMM20	2.069079	9.974186e-05	cry1b
DLFF14vsDLFL14	-1.931844	2.942887e-04	ENSDLAG00005001597
DLFF20vsDLMM20	1.733528	4.050014e-04	ENSDLAG00005020421

Εικόνα 47: log fold change, p-adjusted των συγκρίσεων

Οντολογίες

Τα GOs που προέκυψαν είναι τα ακόλουθα:

- entrainment of circadian clock by photoperiod (GO:0043153)
- circadian regulation of gene expression (GO:0032922)
- entrainment of circadian clock (GO:0009649)

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα τα γονίδια που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση είναι τα ακόλουθα:

- *clocka*
- *per2*
- *arntl2*

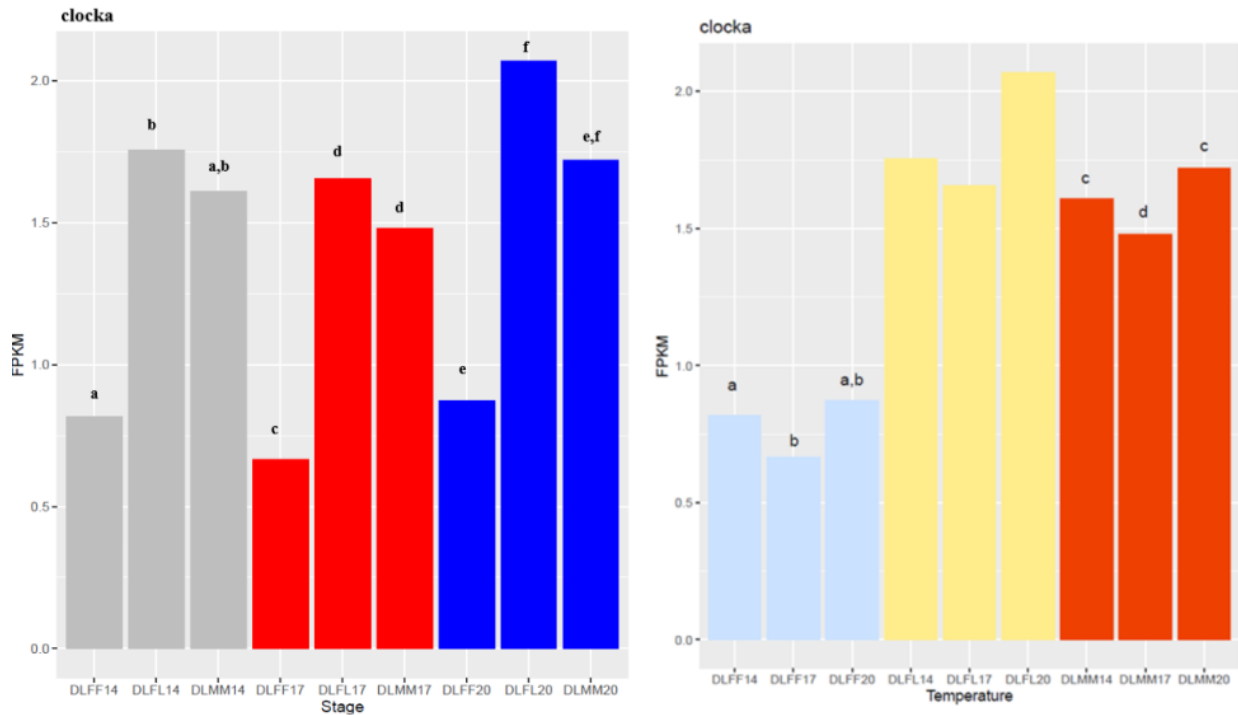
Ωστόσο, εκτός από τα συγκεκριμένα γονίδια, προκειμένου να μπορεί να γίνει μια σύγκριση μεταξύ της τσιπούρας και του λαβρακιού και είναι πιο ολοκληρωμένη η προσέγγιση για τον μηχανισμό του κερκαδικού ρυθμού επιλέχθηκαν και τα υπόλοιπα γονίδια ενδιαφέροντος.

- *arntl1a*
- *cry3a*
- *hpy*
- *orn4a*

Ιστογράμματα

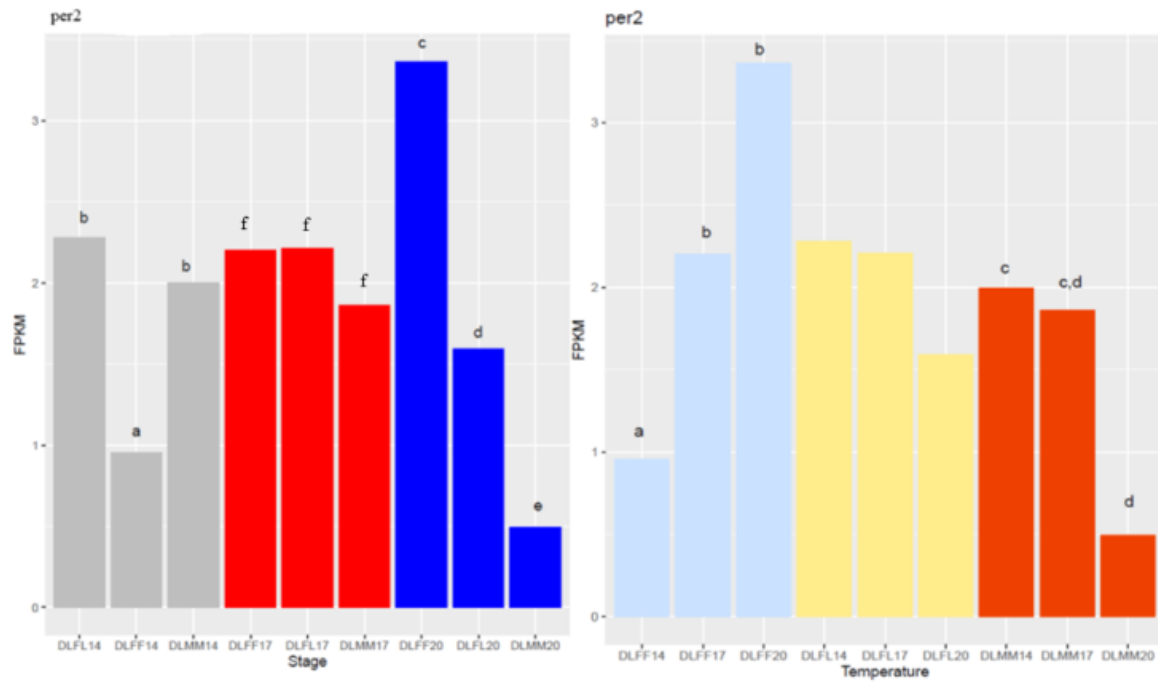
- *clocka*: Μεταξύ των θερμοκρασιών 14, 20°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FF – FL, ενώ στους 17°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FF – FL,

FF – MM (αριστερά). Στο πρώτο στάδιο (FF) διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 14 – 17°C και στο τελευταίο στάδιο (MM) μεταξύ 14 - 17 και 17 – 20°C (δεξιά) (Εικόνα 48).



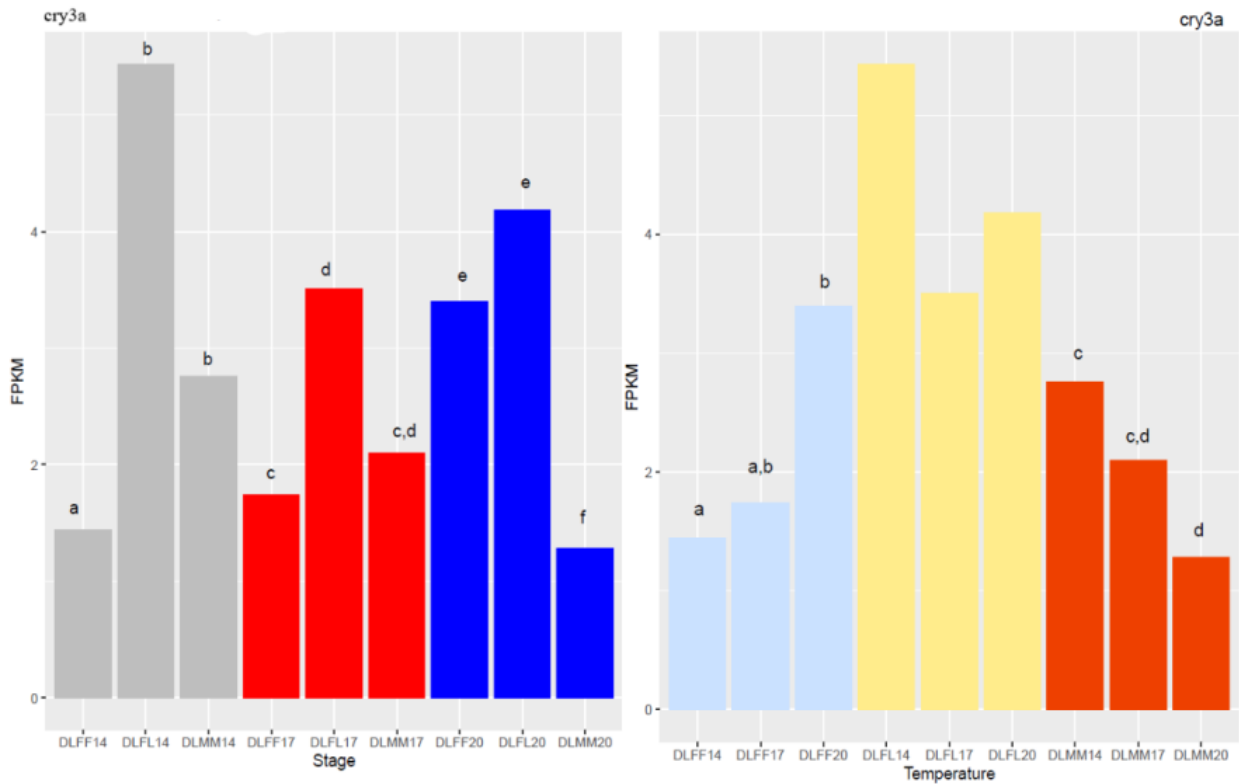
Εικόνα 48: έκφραση του γονιδίου clocka

- *per2*: Στους 14°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FL – FF και FF – MM και στους 20°C διαφορές εντοπίζονται και στις τρεις συγκρίσεις των σταδίων (αριστερά). Στο πρώτο στάδιο παρατηρούνται διαφορές μεταξύ 14 – 17 και 14 – 20°C και στο τελευταίο στάδιο μεταξύ 14 -20°C (δεξιά) (Εικόνα 49).



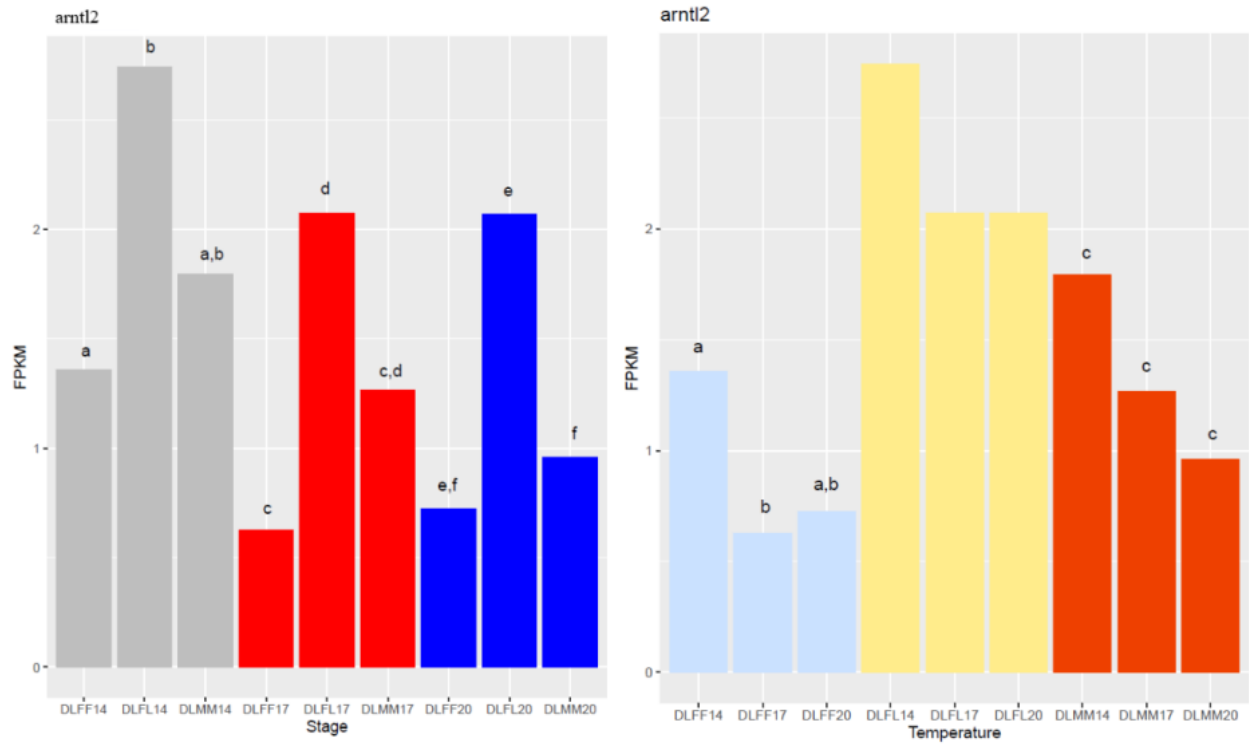
Εικόνα 49: έκφραση του γονιδίου per2

- *εργα*: Στους 14°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – FL, FF – MM, στο στους 17°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – FL και στους 20°C ανάμεσα στα FF – MM και FL – MM (αριστερά). Τόσο στο πρώτο όσο και στο τελευταίο στάδιο διάφορες παρατηρούνται μεταξύ 14 – 20°C (δεξιά) (Εικόνα 50).



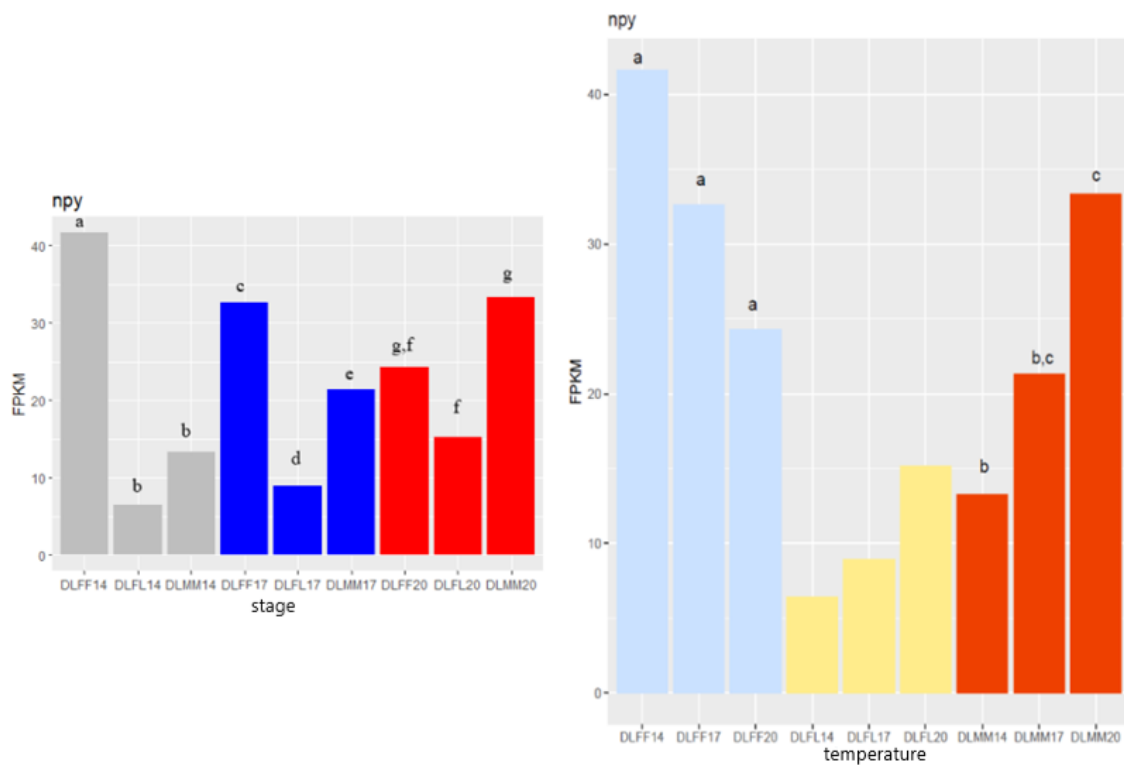
Εικόνα 50: έκφραση του γονιδίου cry3a

- *arnil2*: Στους 14, 17°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FF – FL και στους 20°C διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FL – MM (αριστερά). Διαφορές παρατηρούνται μόνο στο πρώτο στάδιο μεταξύ 14 – 17°C (δεξιά) (Εικόνα 51).



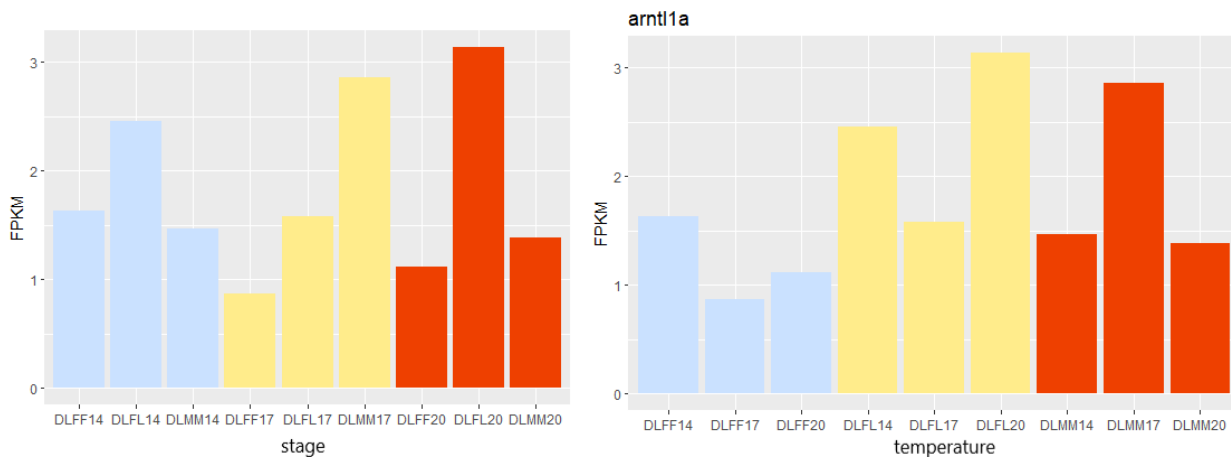
Εικόνα 52: έκφραση του γονιδίου *arntl2*

- *ηρυ*: Διαφορές παρατηρούνται μόνο στο τελευταίο στάδιο μεταξύ 14 – 20oC (Εικόνα 53).



Εικόνα 53: έκφραση του γονιδίου nry

- *arntl1a*: Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο σύνολο των συγκρίσεων (Εικόνα 54).



Εικόνα 54: έκφραση του γονιδίου arntl1a

Διαδικοί Πίνακες

Στην συνέχεια εμφανίζονται οι δυαδικοί Πίνακες (Πίνακας 16, 17) για τα γονίδια που μελετήθηκαν για όλες τις συγκρίσεις. Με τον αριθμό 1 σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές και με τον αριθμό 0 οι συγκρίσεις που δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 16: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις μεταξύ των θερμοκρασιών

gene_name	FF14vsFF20	FF14vsFF17	FF20vsFF17	MM14vsMM20	MM14vsMM17	MM20vsMM17
arntl2	0	1	0	0	0	0
per2	1	1	0	1		1
cry3a	1	0	0	1	0	0
clocka	0	1	0	0	1	1
npy	0	0	0	1	0	0

Πίνακας 17: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις μεταξύ των σταδίων

gene_name	FF14vsFL14	FF14vsMM14	FL14vsMM14	FF17vsFL17	FF17vsMM17	FL17vsMM17	FF20vsFL20	FF20vsMM20	FL20vsMM20
clocka	1	0		1	1	0	1	0	0
cry3a	1	0	1	1	0	0	0	1	1
per2	1	1	0	0	0	0	1	1	1
arntl2	1	0	0	1	0	0	0	0	1
npy	1	1	0	1	1	1	0	0	1

3.5 Επικύρωση των αποτελεσμάτων του RNASeq μέσω Real Time PCR

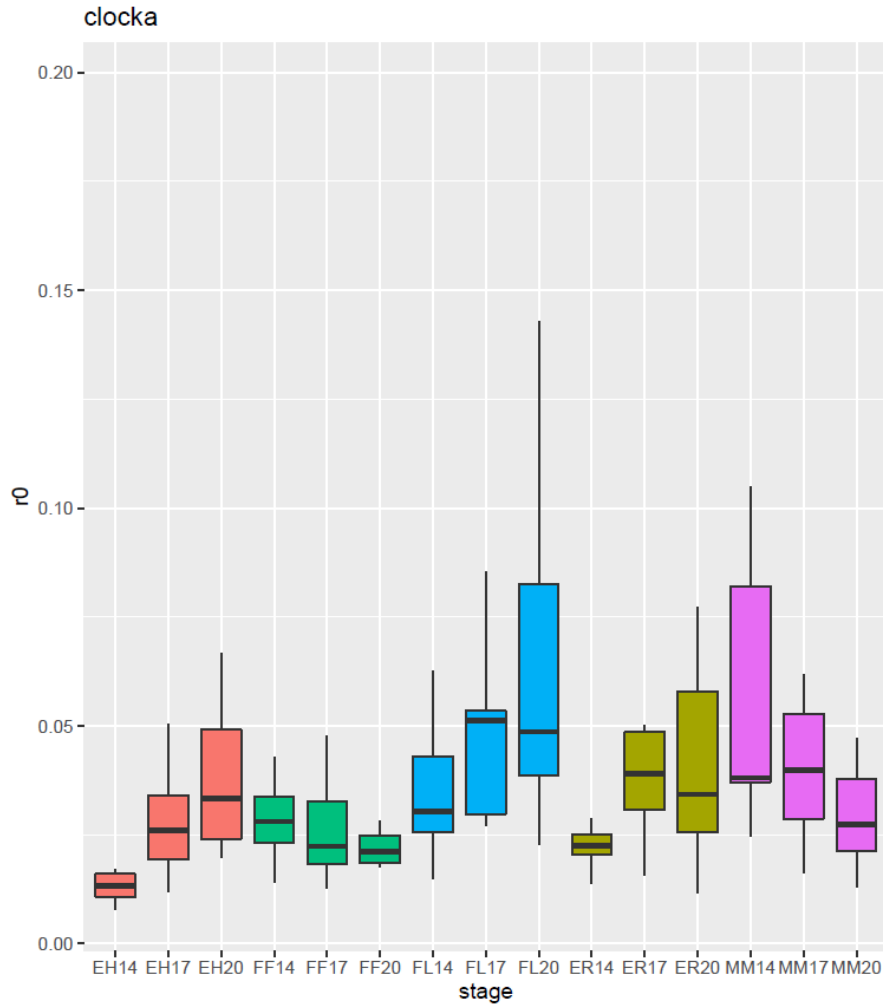
Όμοια με τα δείγματα της τσιπούρας, το πρώτο βήμα της ανάλυσης αφορούσε τον έλεγχο κανονικότητας των δεδομένων, ώστε να επιλεγούν στην συνέχεια τα κατάλληλα στατιστικά tests.

Συγκρίσεις μεταβολής της θερμοκρασίας

Οι τιμές p-value του Shapiro test που προσδιορίστηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 6 του παραρτήματος. Οι τιμές p-value από το Kruskal-Wallis test στη σύγκριση όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία υπάρχουν στον Πίνακα 7 του παραρτήματος και επιπλέον εμφανίζονται και τα p – values των κατά ζεύγη συγκρίσεων στον Πίνακα 8 του παραρτήματος.

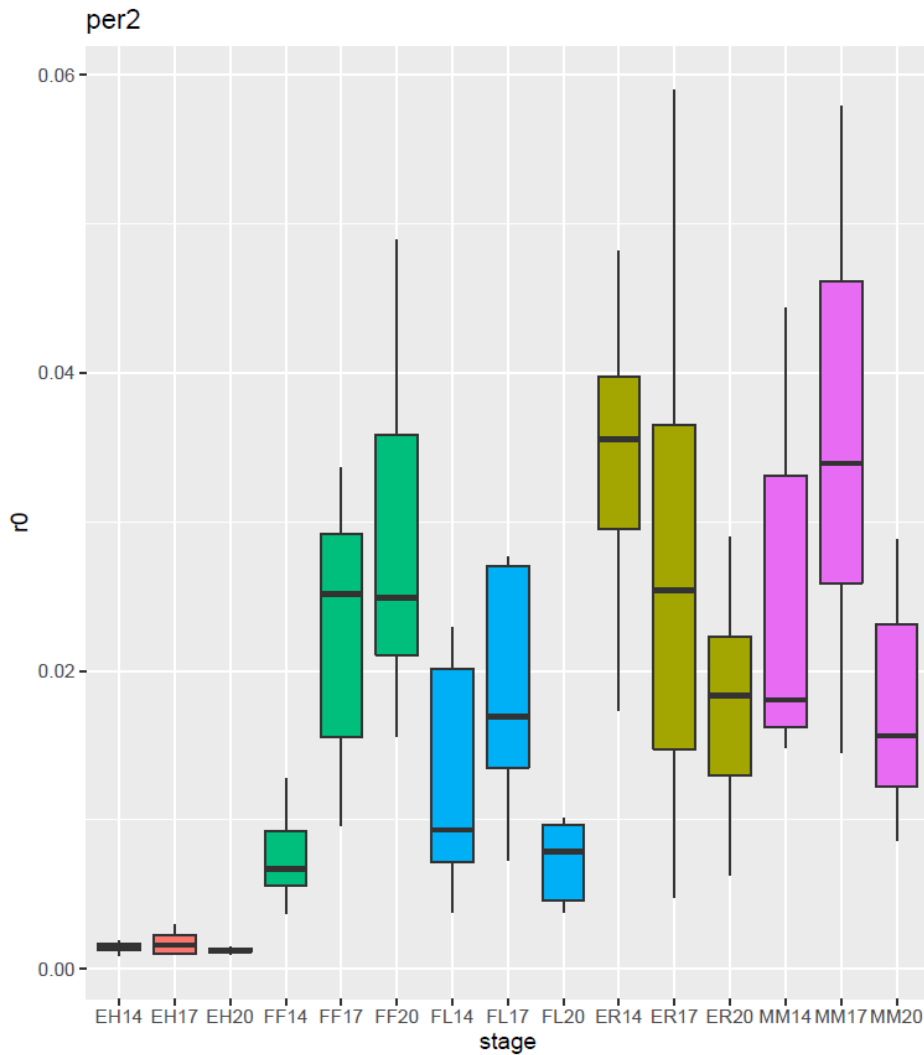
Θηκογράμματα

- *clocka*: Τόσο στο στάδιο της εκκόλαψης (EH) όσο στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 14 – 17 και 14 – 20°C. Στο τελευταίο στάδιο (MM) διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 14 – 20 και 17 – 20°C. Στα υπόλοιπα στάδια δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 55).



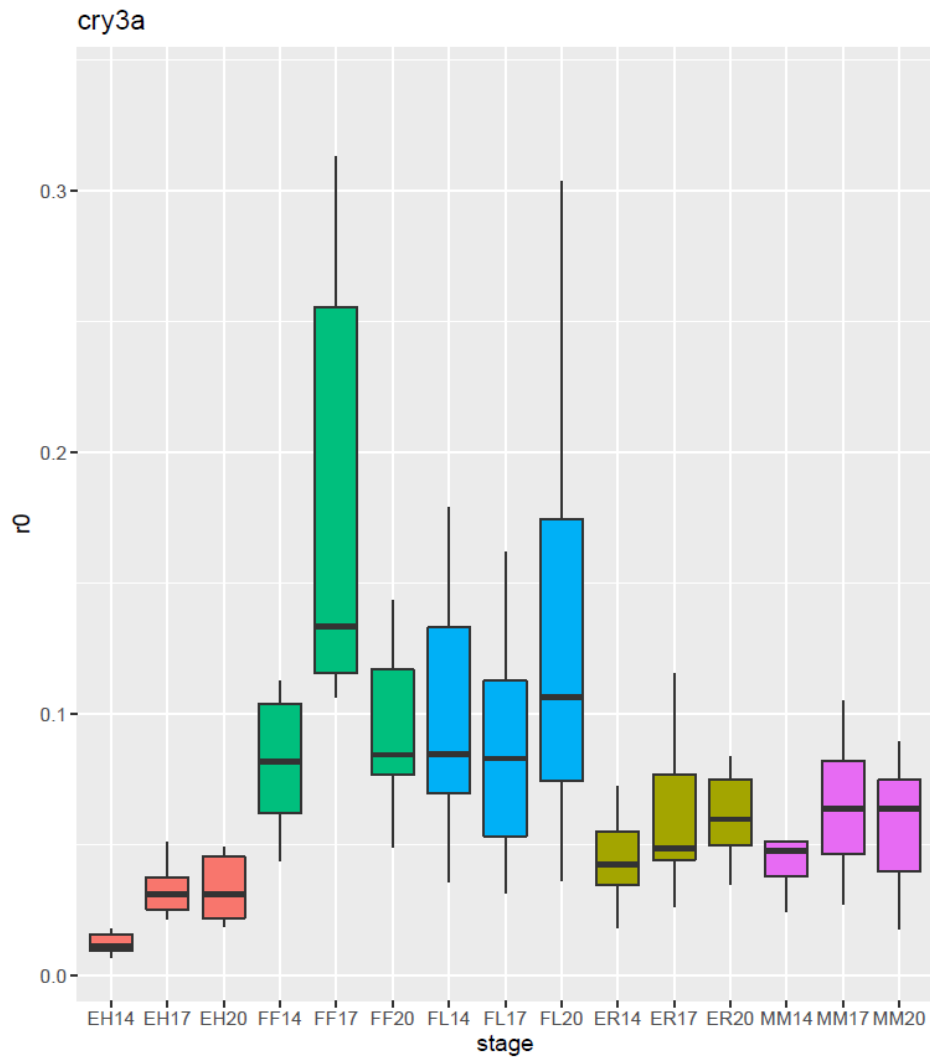
Εικόνα 55: Έκφραση του γονιδίου *clocka* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *per2*: Στο ΕΗ δεν παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στις θερμοκρασίες. Στο πρώτο στάδιο διαφορές παρατηρούνται μεταξύ 14 – 17 και 14 - 20οC. Στο δεύτερο στάδιο (FL) παρατηρούνται μεταξύ 17 – 20οC. Στο ΕR παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των 14 – 20οC και στο τελευταίο στάδιο (MM) μεταξύ 17 – 20οC (Εικόνα 56).



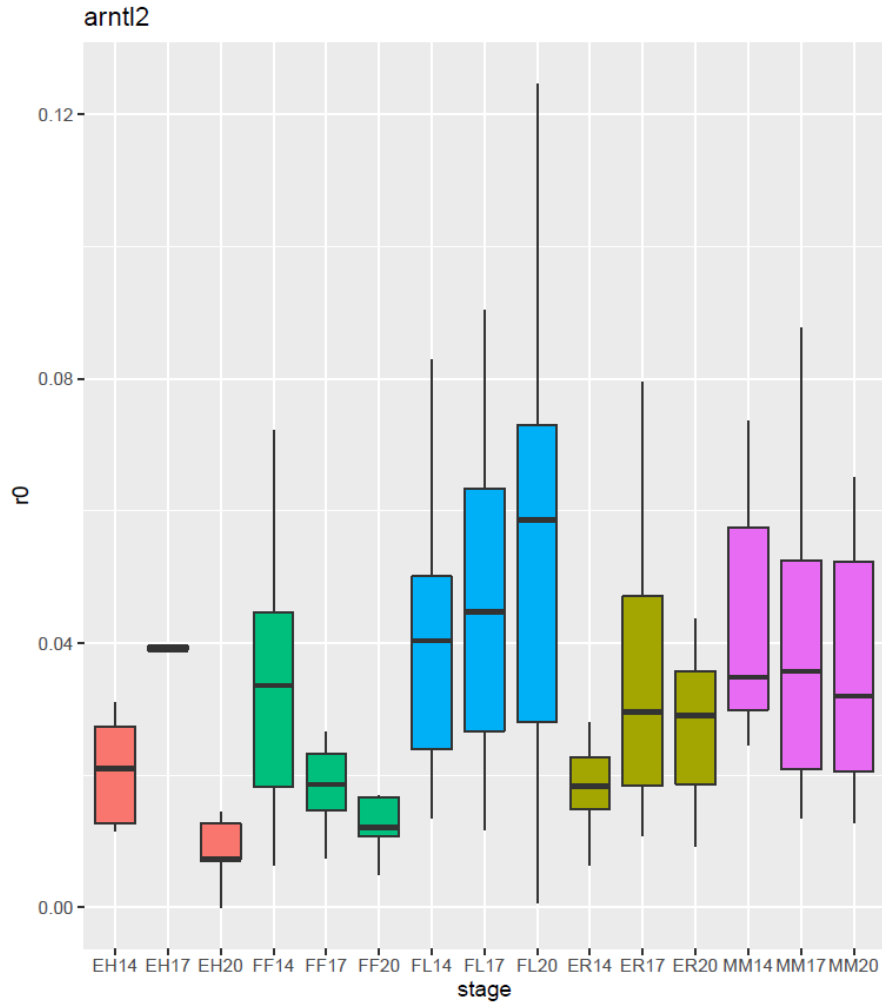
Εικόνα 56: Έκφραση του γονιδίου *per2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *cry3a*: Διαφορές παρατηρούνται στο ΕΗ μεταξύ των 14 – 17 και 14 – 20οC. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης εμφανίζεται στο πρώτο στάδιο (FF) μεταξύ 14 - 17οC. Στα υπόλοιπα στάδια δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 57).



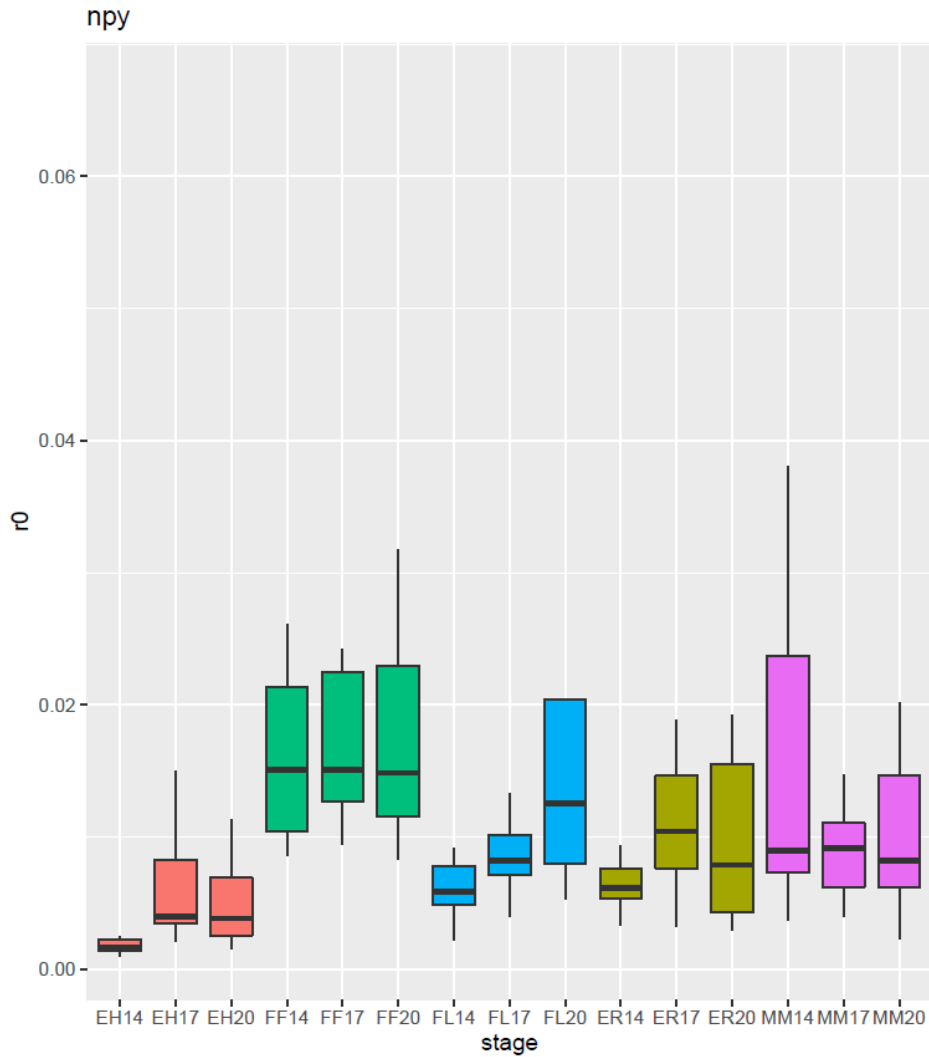
Εικόνα 57: Έκφραση του γονιδίου *cry3a* τα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl2*: Διαφορές παρατηρούνται στο στάδιο ΕΗ μεταξύ των 14 – 17 και 17 – 20οC. Επιπλέον στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος (FF) μεταξύ 14 -20οC (Εικόνα 58).



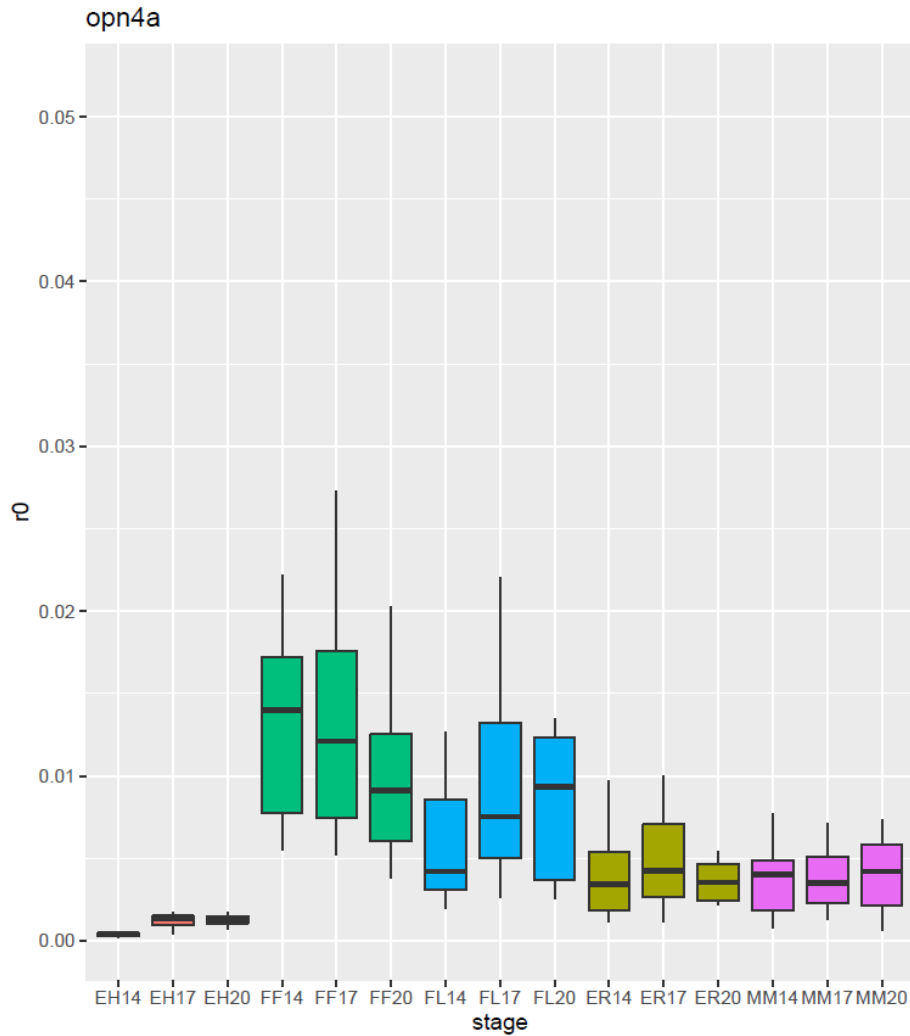
Εικόνα 58: Έκφραση του γονιδίου *arntl2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *nrγ*: Στο στάδιο ΕΗ παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των 14 – 17 και 14 – 20οC. Στο στάδιο ΕR διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των 14 – 17οC. Στα υπόλοιπα στάδια δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 59).



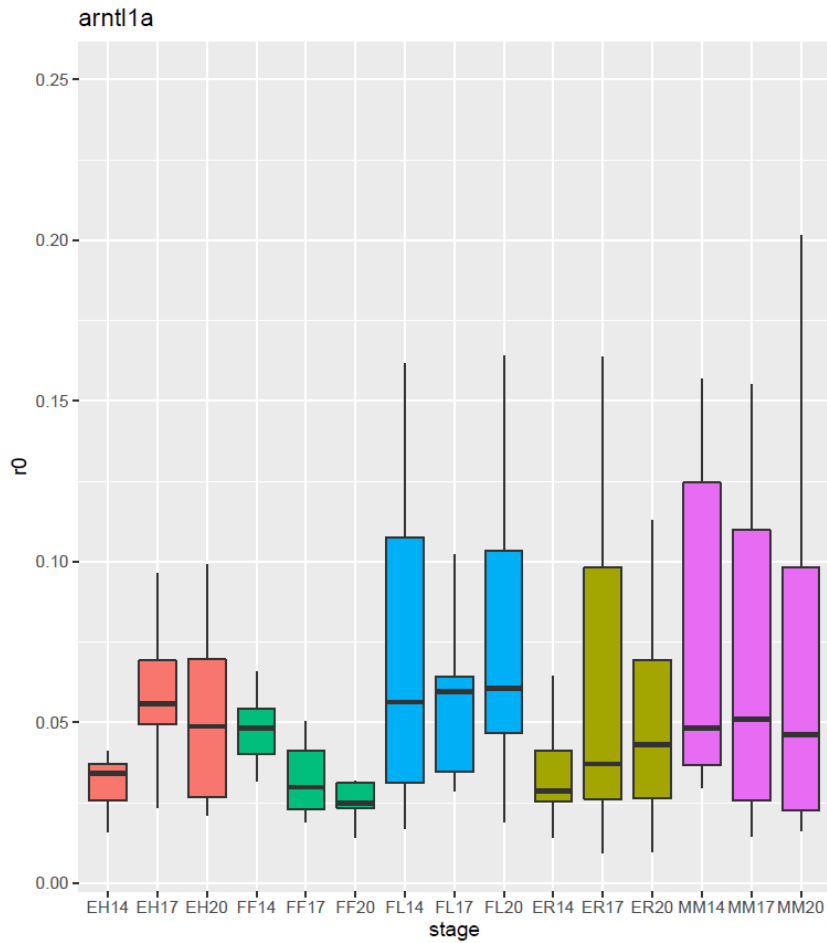
Εικόνα 59: Έκφραση του γονιδίου *nrγ* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *orn4a*: Στο στάδιο ΕΗ παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των 14 -17 και 14 – 20°C. Στα υπόλοιπα στάδια δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 60).



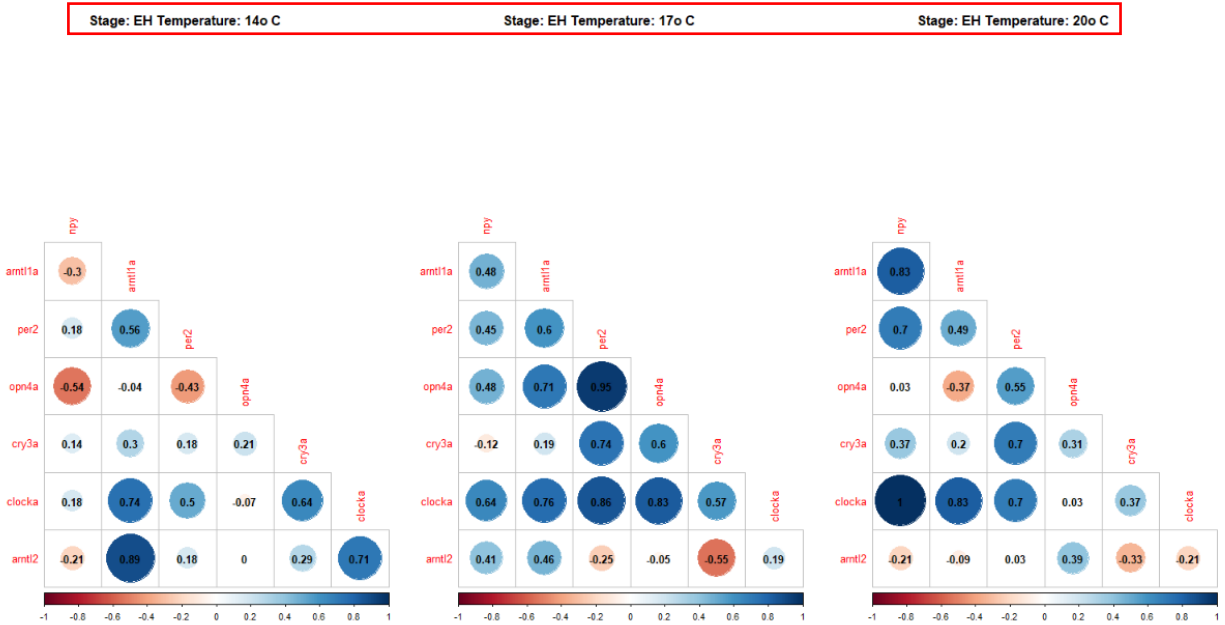
Εικόνα 60: Έκφραση του γονιδίου *orn4a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl1a*: Στο στάδιο ΕΗ διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των 14 – 17οC. Διαφορές παρατηρούνται στο πρώτο στάδιο μεταξύ 14 – 20οC. Στα υπόλοιπα στάδια δεν παρατηρούνται διαφορές (Εικόνα 61).



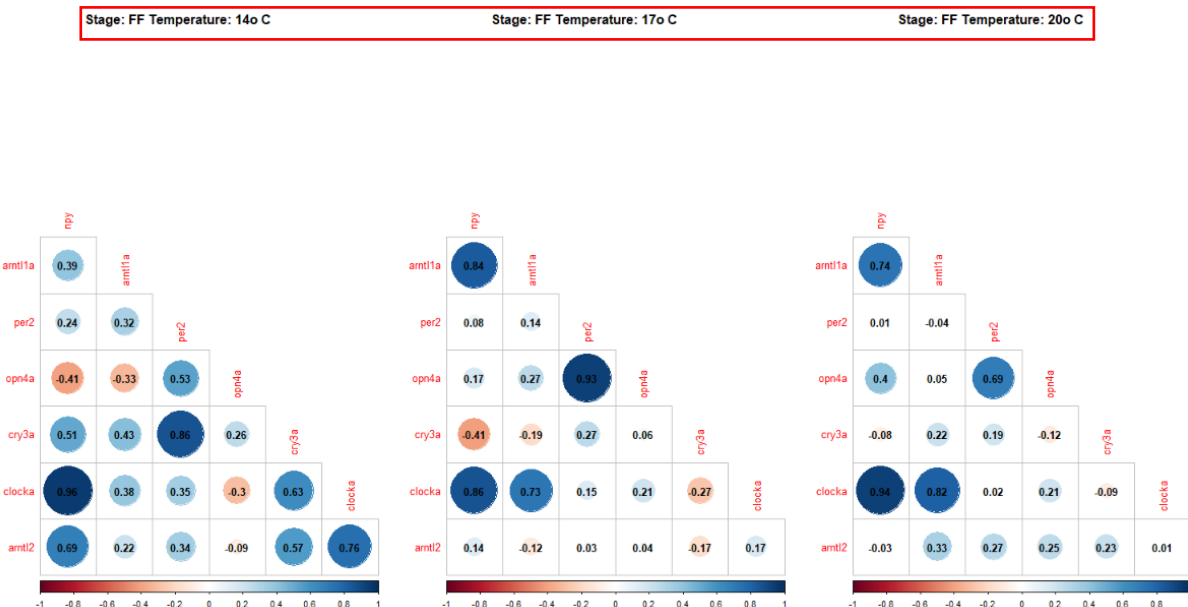
Εικόνα 61: Έκφραση του γονιδίου *arntl1a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

Διαγράμματα συσχέτισης



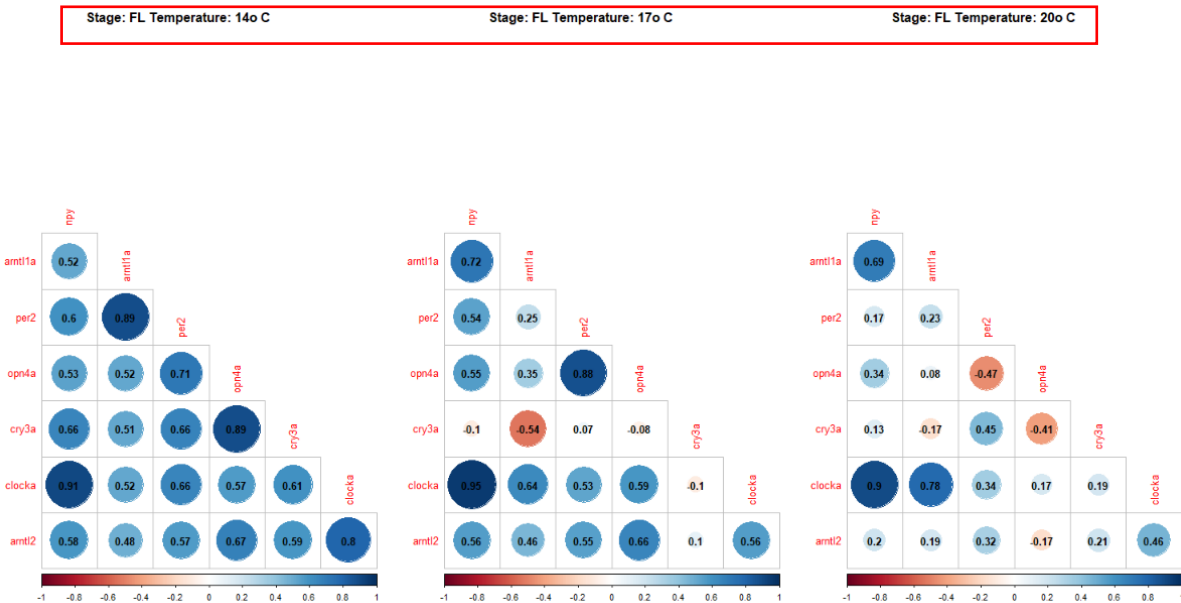
Εικόνα 62: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες της εκκόλαψης (EH). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στο στάδιο της εκκόλαψης και στις τρεις θερμοκρασίες παρατηρούνται και θετικές και αρνητικές συσχετίσεις. Ωστόσο, στους 17oC παρατηρούνται κυρίως ισχυρές θετικές συσχετίσεις (Εικόνα 62).



Εικόνα 63: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες του πρώτου ταΐσματος (FF). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

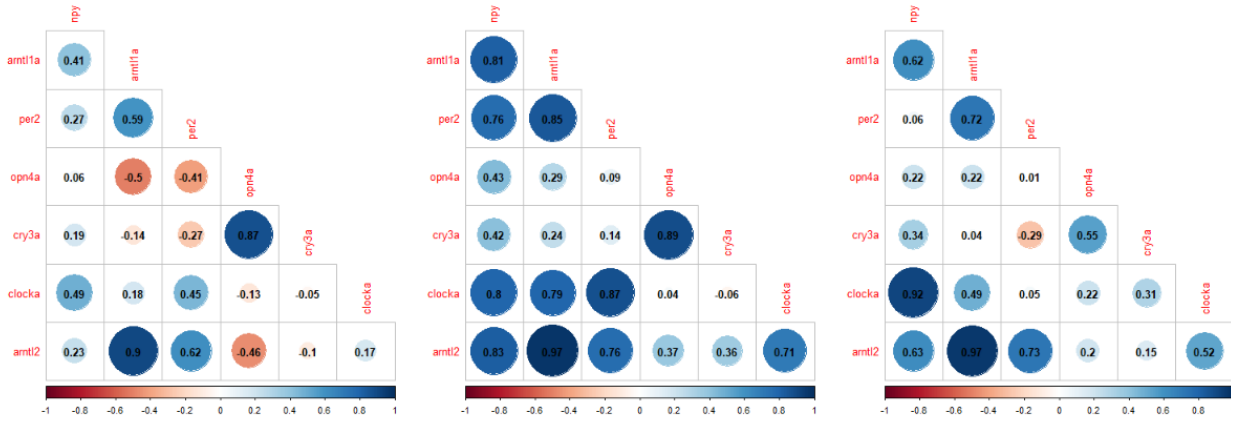
Στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος (FF) στους 14 και 17οC παρατηρούνται θετικές και αρνητικές συσχετίσεις, ωστόσο στους 20οC παρατηρούνται κάποιες ισχυρές θετικές συσχετίσεις και κάποιες κοντά στο μηδέν (Εικόνα 63).



Εικόνα 64: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες της κάμψης (FL). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στο στάδιο της κάμψης (FL) στους 14οC παρατηρούνται μόνο ισχυρές θετικές συσχετίσεις. Στους 17οC παρατηρούνται κυρίως θετικές συσχετίσεις καθώς και κάποιες κοντά στο μηδέν. Στους 20οC παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις (ελάχιστες είναι ισχυρές) και αρνητικές (Εικόνα 64).

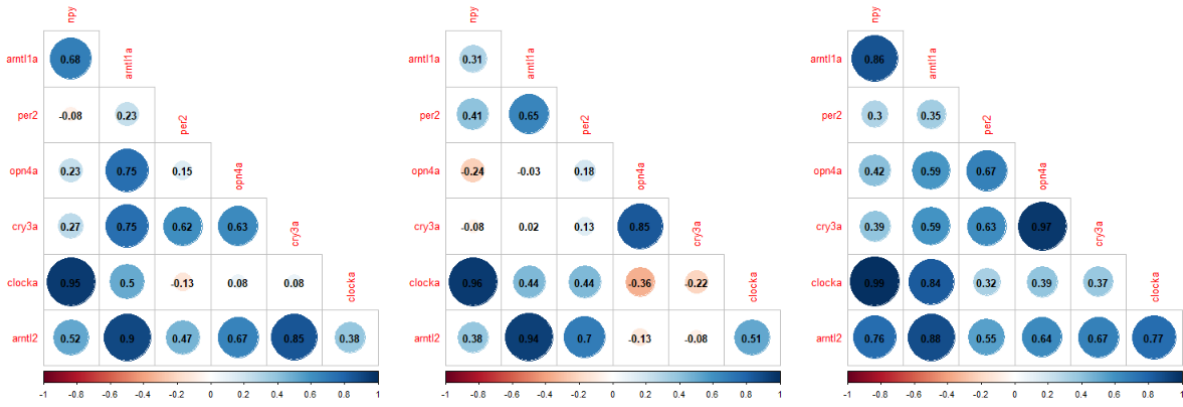
Stage: ER Temperature: 14o C Stage: ER Temperature: 17o C Stage: ER Temperature: 20o C



Εικόνα 65: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες του τελευταίου σταδίου της προνύμφης (ER). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης στους 14oC παρατηρείται μικρός αριθμός από ισχυρές θετικές συσχετίσεις και αρκετές αρνητικές. Στους 17oC παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις. Τέλος, στους 20oC παρατηρούνται θετικές αλλά όχι ισχυρές συσχετίσεις (Εικόνα 65).

Stage: MM Temperature: 14o C Stage: MM Temperature: 17o C Stage: MM Temperature: 20o C



Εικόνα 66: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες του τελευταίου της μεταμόρφωσης (MM). Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

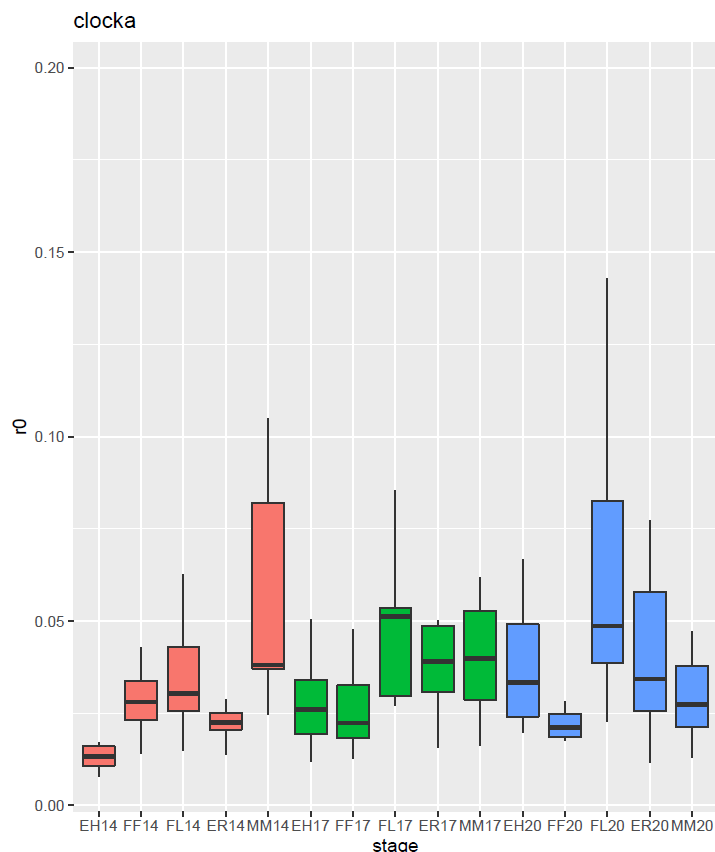
Στο στάδιο της μεταμόρφωσης (MM) στους 14oC παρατηρούνται κυρίως θετικές συσχέτισεις, μικρός αριθμός αυτών είναι ισχυρές. Στους 17oC παρατηρούνται κάποιες ισχυρά θετικές αλλά και αρνητικές συσχέτισεις (όχι ισχυρές). Τέλος, στους 20oC παρατηρούνται μόνο θετικές συσχέτισεις όπου οι περισσότερες είναι ισχυρές (Εικόνα 66).

Συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο

Αντίστοιχα, οι τιμές p-value από το Kruskal-Wallis test στη σύγκριση όπου μεταβάλλεται το στάδιο φαίνονται στον Πίνακα 9 του παραρτήματος. Επιπλέον, παρουσιάζονται τα p – values των κατά ζεύγη συγκρίσεων στον Πίνακα 10 του παραρτήματος.

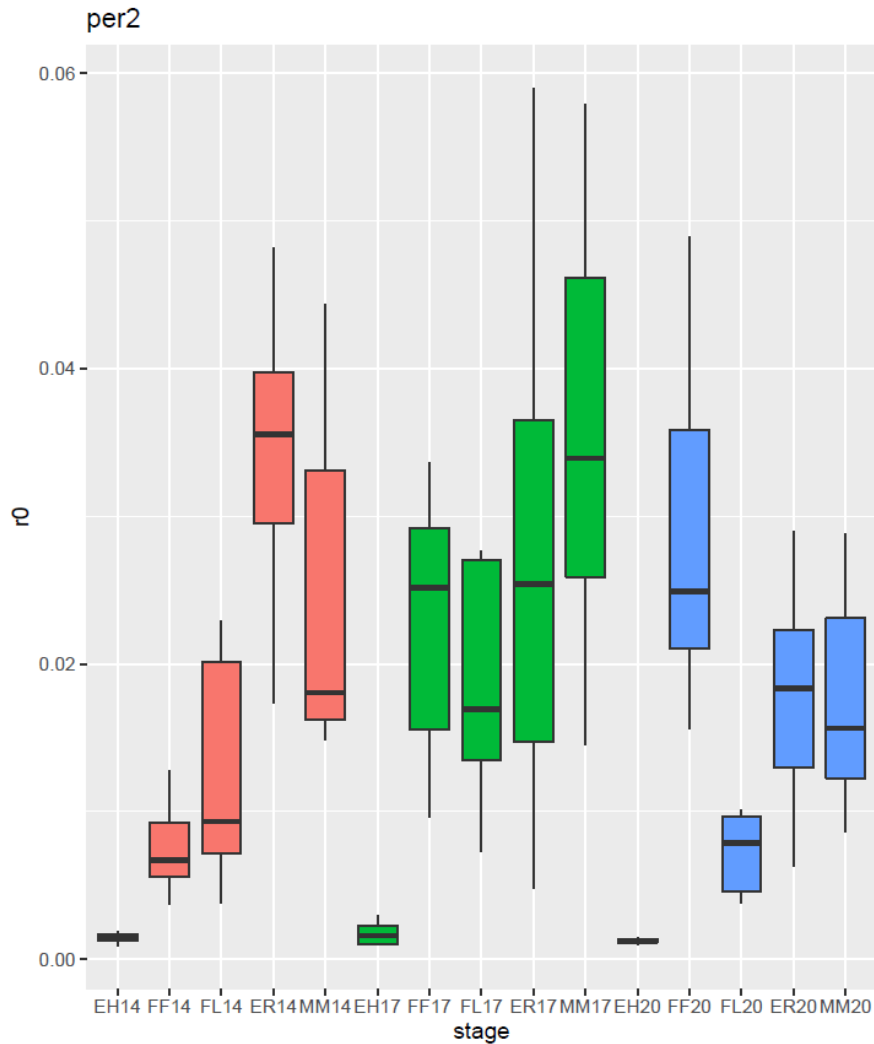
Θηκογράμματα

- *clocka*: Στους 14oC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – MM και στις δύο επόμενες θερμοκρασίες διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα στάδια FF – FL (Εικόνα 67).



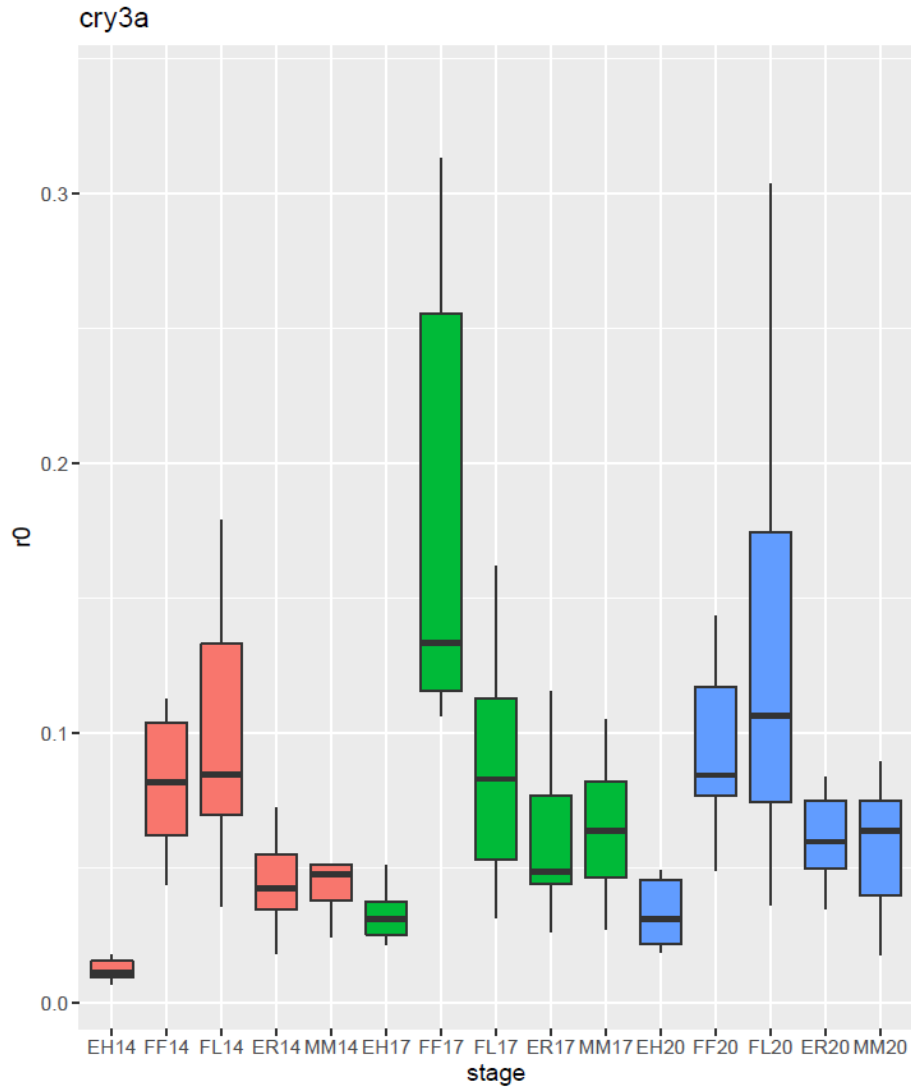
Εικόνα 67: Έκφραση του γονιδίου *clocka* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *per2*: Διαφορές παρατηρούνται στους 14°C ανάμεσα στα στάδια FF – MM και FL – MM. Στους 17°C ανάμεσα στα στάδια FL – MM και στους 20°C ανάμεσα στα FF – FL. Και στις τρεις θερμοκρασίες παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα EH – ER (Εικόνα 68).



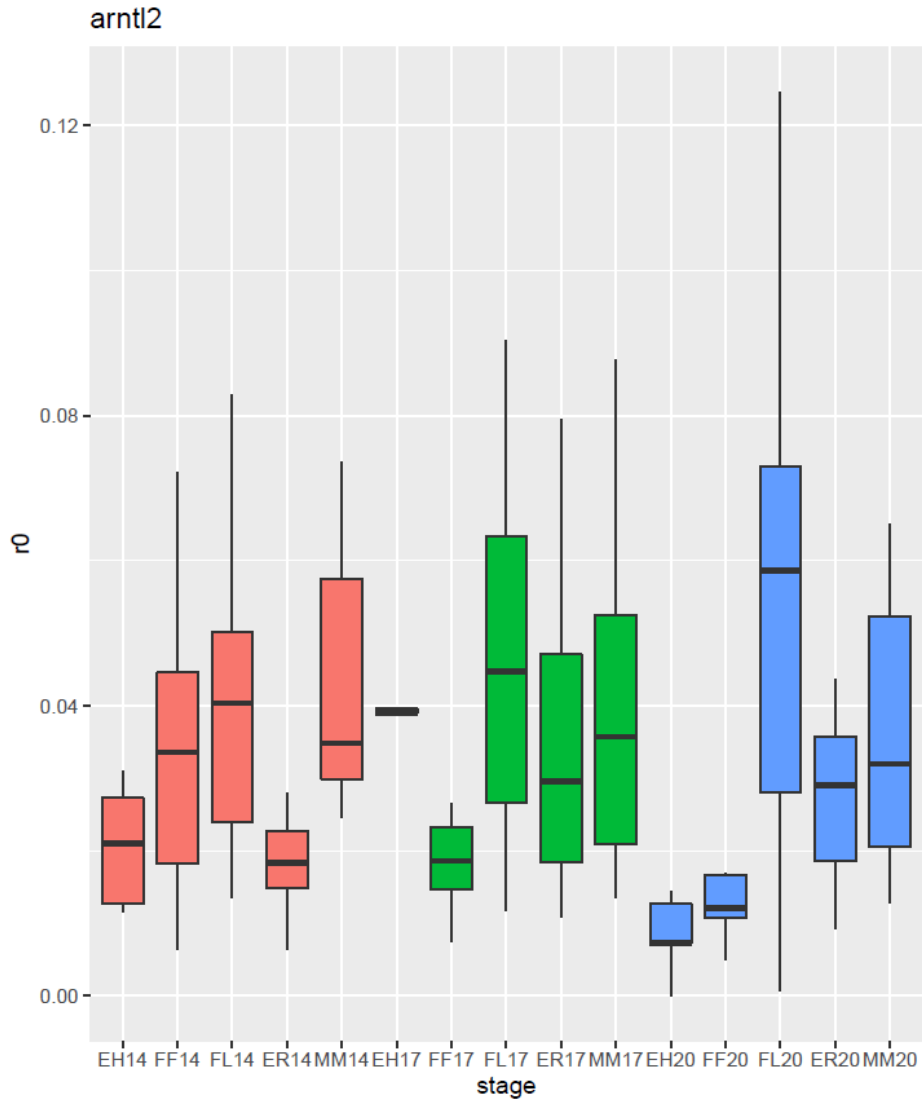
Εικόνα 68: Έκφραση του γονιδίου *per2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *cry3a*: Διαφορές παρατηρούνται στους 14 και 20°C ανάμεσα στα FF – MM και FL – MM. Στους 17°C ανάμεσα στα στάδια FF – MM και FF – FL. Στους 14°C παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στα ER – EH (Εικόνα 69).



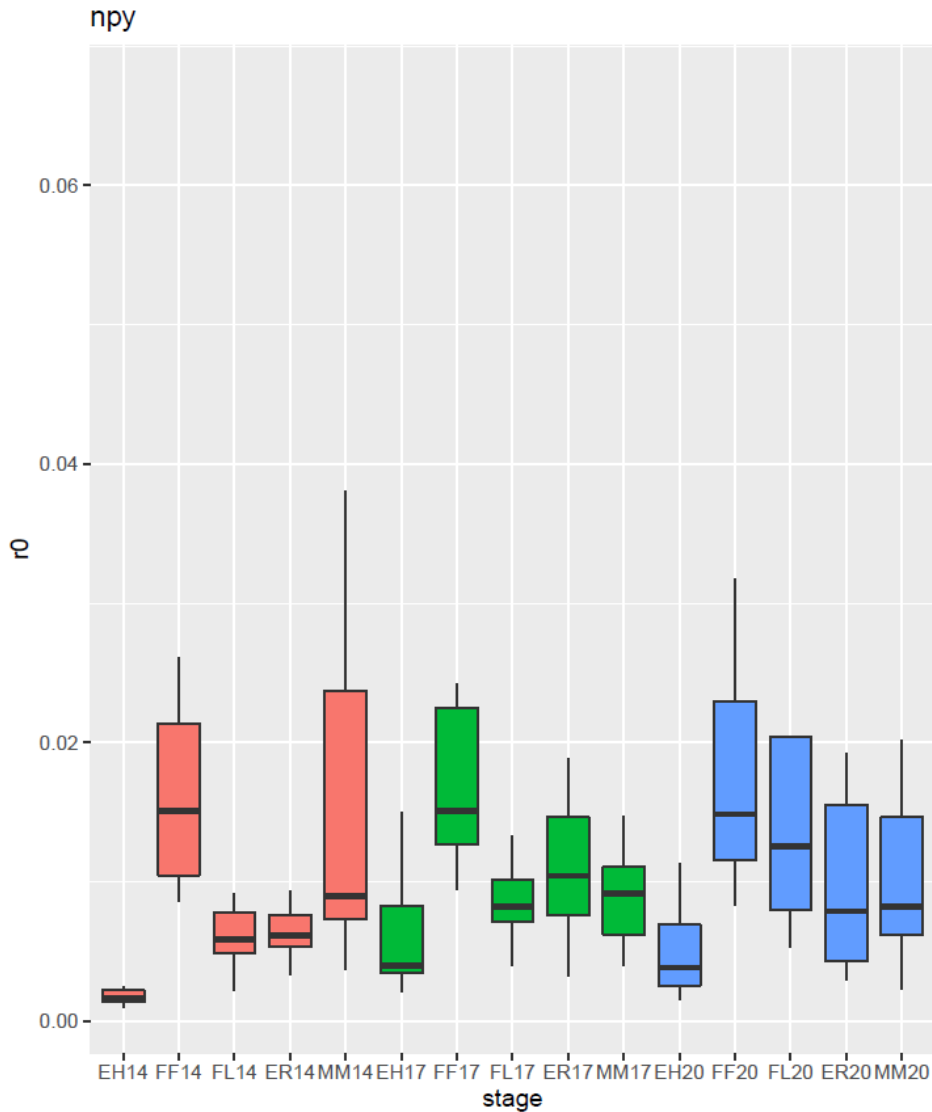
Εικόνα 69: Έκφραση του γονιδίου *cry3a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl2*: Διαφορές παρατηρούνται στους 17 και 20οC ανάμεσα στα στάδια FF – FL και FF – MM (Εικόνα 70).



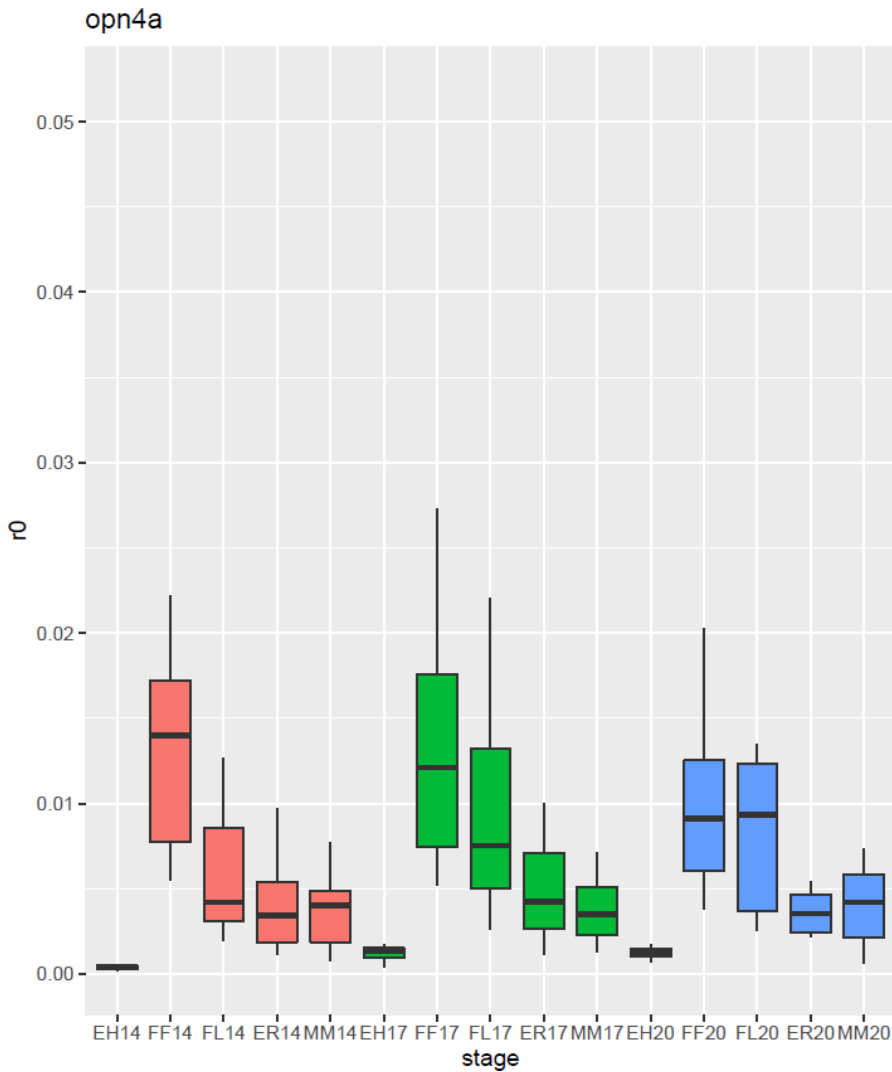
Εικόνα 70: Έκφραση του γονιδίου *arntl2* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *nrp*: Διαφορές παρατηρούνται στους 14οC ανάμεσα στα στάδια FF – FL, στους 17οC ανάμεσα στα FF – FL και FF – MM. Τέλος, στους 20οC διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – MM. Στις θερμοκρασίες 14 και 17οC παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα EH – ER (Εικόνα 71).



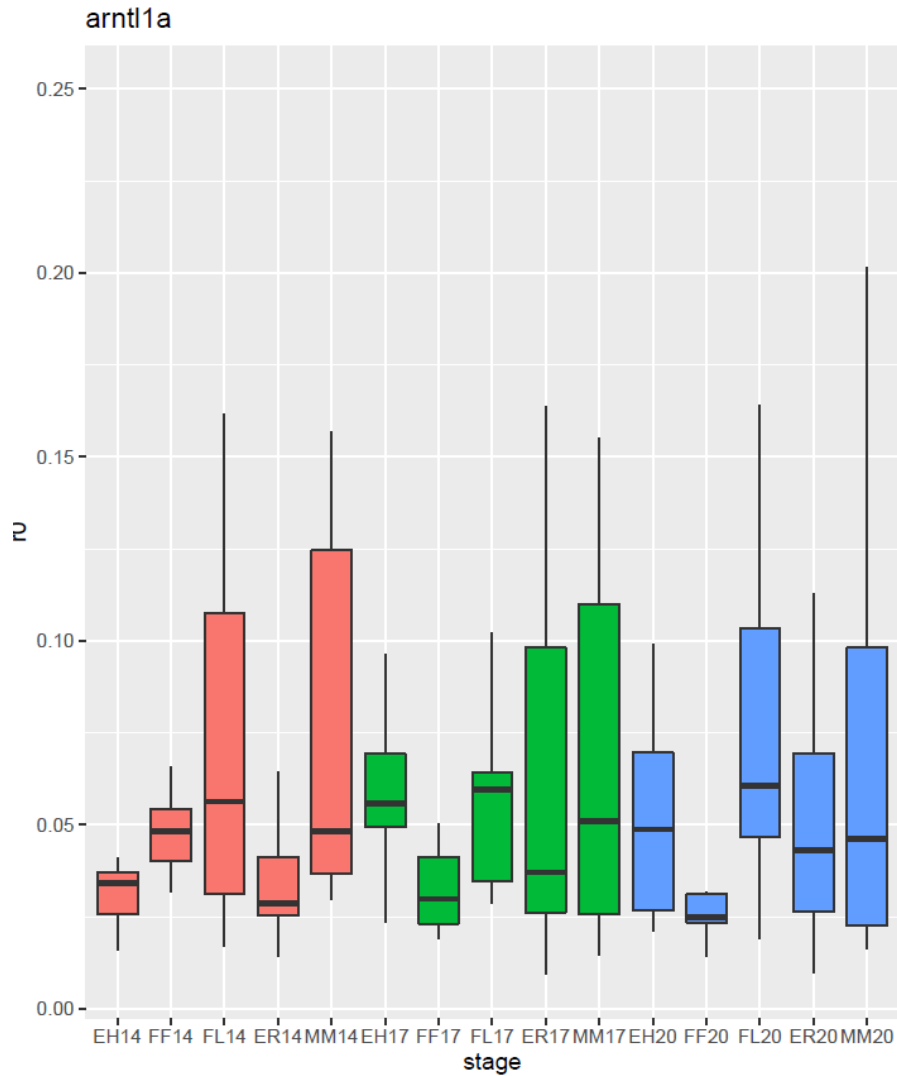
Εικόνα 71: Έκφραση του γονιδίου *nrp* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *orn4a*: Διαφορές παρατηρούνται στους 14oC ανάμεσα στα στάδια FF – FL, FF – MM. Στις δύο επόμενες θερμοκρασίες διαφορές παρατηρούνται ανάμεσα στα FF – MM και FL – MM. Και στις τρεις θερμοκρασίες παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στα EH – ER (Εικόνα 72).



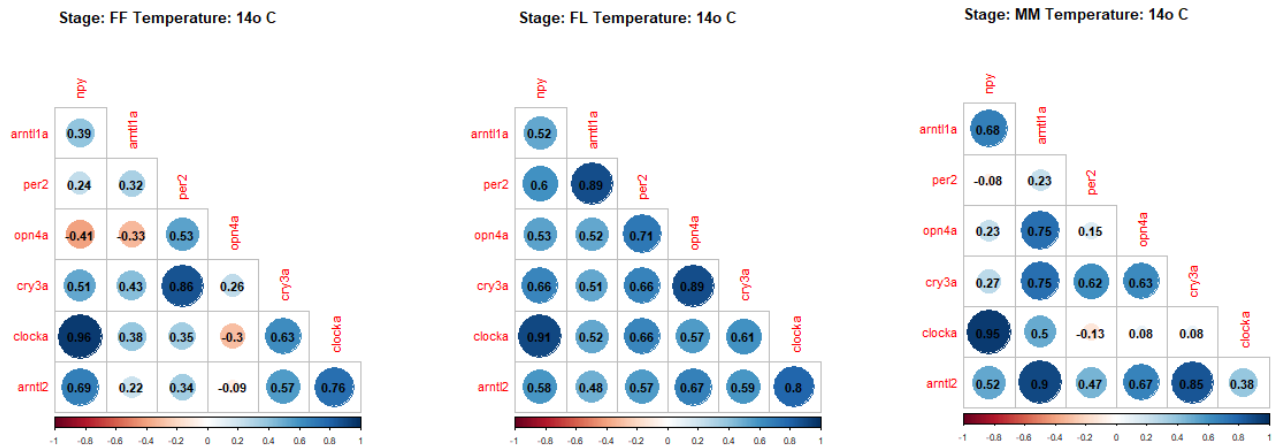
Εικόνα 72: Έκφραση του γονιδίου *orn4a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

- *arntl1a*: Διαφορές παρατηρούνται μόνο στους 20oC ανάμεσα στα στάδια FF – FL (Εικόνα 73).



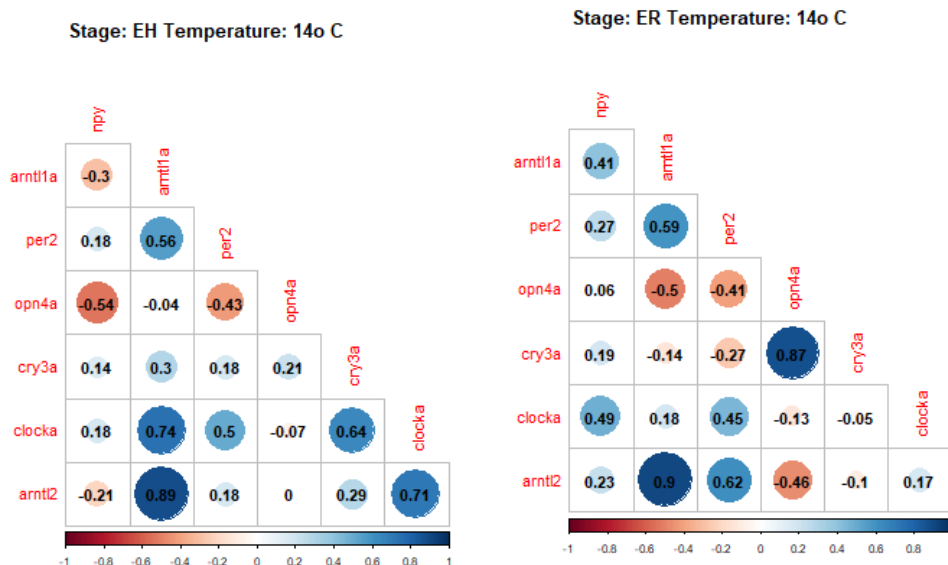
Εικόνα 73: Έκφραση του γονιδίου *arntl1a* στα διαφορετικά στάδια και θερμοκρασίες

Διαγράμματα συσχέτισης



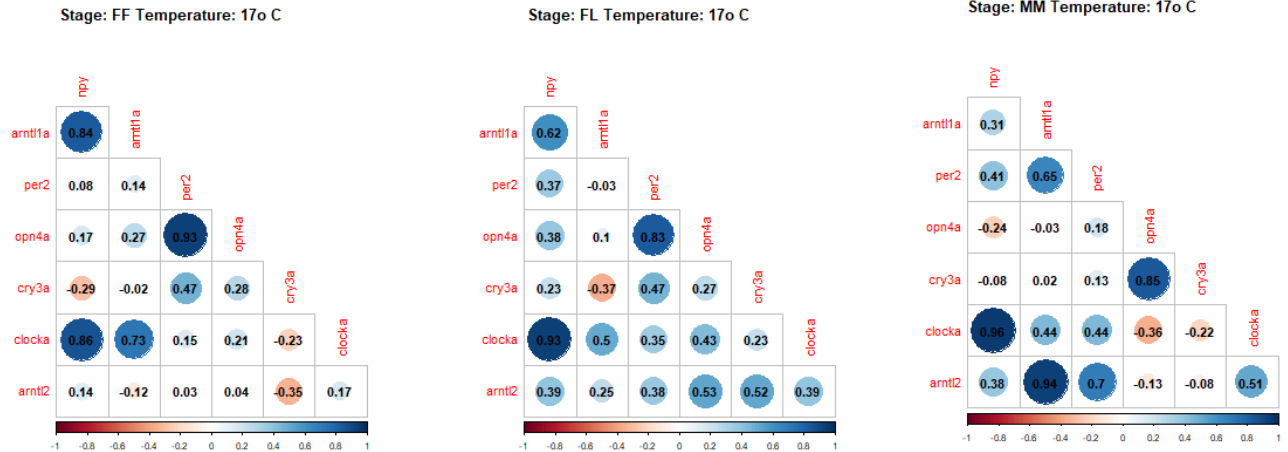
Εικόνα 74: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα τρία στάδια (FF, FL, MM) για τους 14oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στους 14oC στα στάδια FF και MM παρατηρούνται θετικές και αρνητικές συσχετίσεις. Στο FL στάδιο παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις και όλες σχεδόν ισχυρές (Εικόνα 74).



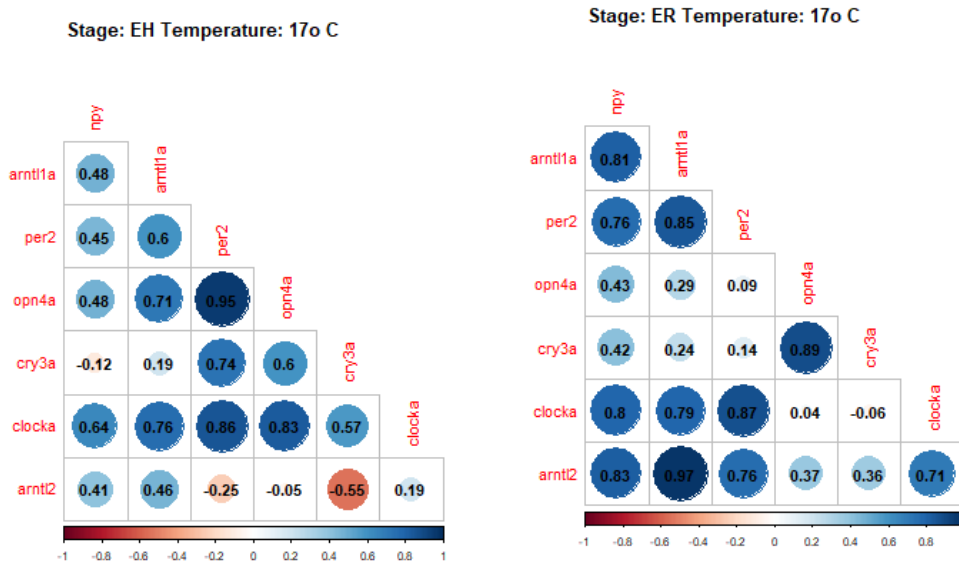
Εικόνα 75: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης για τα στάδια EH και ER στους 14oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Επιπλέον, στους 14oC παρατηρούνται τόσο θετικές όσο και αρνητικές συσχετίσεις μέτριας κλίμακας και για τα δύο στάδια EH, ER (Εικόνα 75).



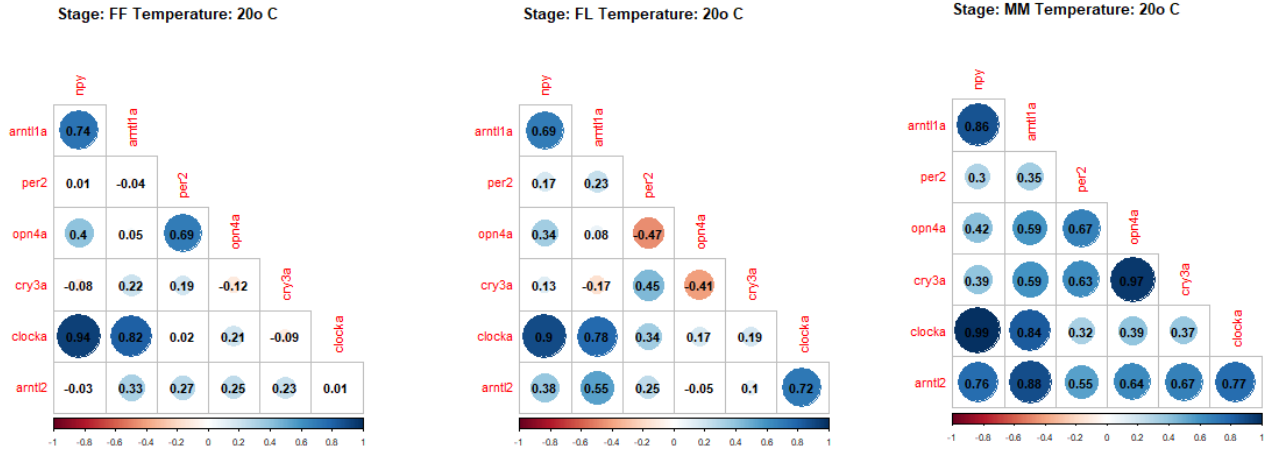
Εικόνα 76: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα τρία στάδια (FF, FL, MM) για τους 17oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στους 17°C και στα τρία αναπτυξιακά στάδια παρατηρούνται τόσο θετικές όσο και αρνητικές συσχετίσεις με το στάδιο FL να εμφανίζει τις λιγότερες αριθμητικά αρνητικές (Εικόνα 76).



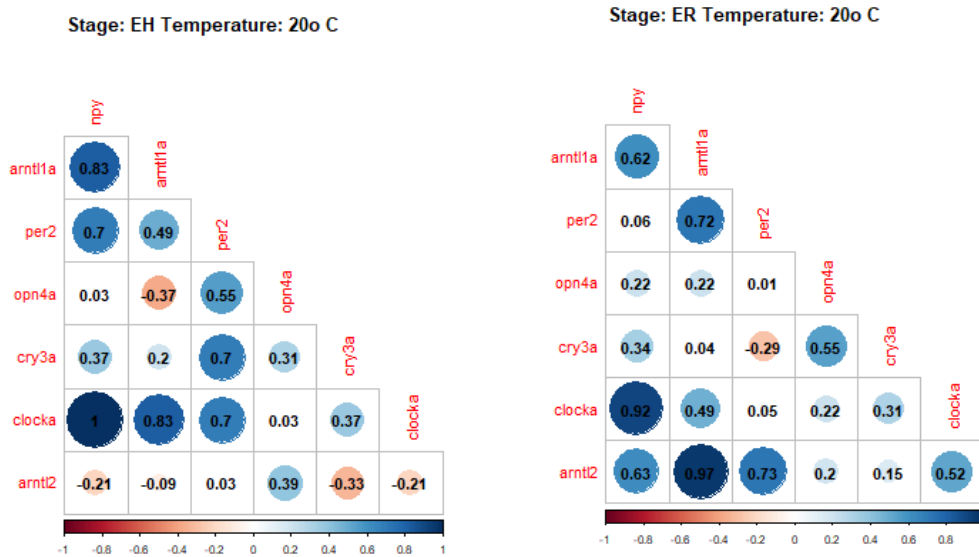
Εικόνα 77: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης για τα στάδια EH και ER στους 17oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στους 17oC στο EH παρατηρούνται κυρίως ισχυρά θετικές συσχετίσεις και κάποιες αρνητικές χαμηλής συσχέτισης. Στο στάδιο ER παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις (Εικόνα 77).



Εικόνα 78: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα τρία στάδια (FF, FL, MM) για τους 20oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στους 20°C στα δύο πρώτα αναπτυξιακά στάδια παρατηρούνται και θετικές και αρνητικές συσχετίσεις οι οποίες στην πλειοψηφία τους δεν είναι ισχυρές. Στο MM στάδιο παρατηρούνται μόνο θετικές συσχετίσεις όπου οι περισσότερες είναι ισχυρές (Εικόνα 78).



Εικόνα 79: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης για τα στάδια EH και ER στους 14oC. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Στους 20oC και στο EH και στο ER παρατηρούνται τόσο θετικές όσο και αρνητικές συσχετίσεις οι οποίες δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρές (Εικόνα 79).

3.6 Σύνοψη

Όπως στην τσιπούρα έτσι και στο λαβράκι παρατίθενται δύο συγκεντρωτικοί πίνακες όπου φαίνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές και για τις δύο προσεγγίσεις και στις συγκρίσεις όπου το αποτέλεσμα είναι το ίδιο σημειώνονται με γκρι χρώμα (Πίνακες 18, 19).

Συγκρίσεις μεταβολής της θερμοκρασίας

Πίνακας 18: συγκεντρωτικός πίνακας για επικύρωση αποτελεσμάτων RNAseq στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

RNA SEQ	FF14vsFF20	FF14vsFF17	FF20vsFF17	MM14vsMM20	MM14vsMM17	MM20vsMM17
arntl2		up				
per2	down	down		up		down
cry3a	down			up		
clocka		up			up	up
npy				down		
REAL TIME	FF14vsFF20	FF14vsFF17	FF20vsFF17	MM14vsMM20	MM14vsMM17	MM20vsMM17
arntl2	up					
per2	down	down				down
cry3a		down	down			
clocka				up		down
npy						

Συγκρίσεις μεταβολής σταδίων

Πίνακας 19: συγκεντρωτικός πίνακας για επικύρωση αποτελεσμάτων RNAseq στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο

RNA SEQ	FF14vsFL14	FF14vsMM14	FL14vsMM14	FF17vsFL17	FF17vsMM17	FL17vsMM17	FF20vsFL20	FF20vsMM20	FL20vsMM20
clocka	down			down	down		down		
cry3a	down		up	down				up	up
per2	down	down					up	up	up
arntl2	down			down					up
npy	up	up		up	up	up			down
REAL TIME	FF14vsFL14	FF14vsMM14	FL14vsMM14	FF17vsFL17	FF17vsMM17	FL17vsMM17	FF20vsFL20	FF20vsMM20	FL20vsMM20
clocka		down		down			down		up
cry3a		up	up	up	up			up	up
per2		down	down						down
arntl2				down	down		down	up	
npy	up			up	up			up	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κερκάδιο σύστημα έχει εξελιχθεί ως προσαρμογή στις τακτικές και προβλέψιμες αλλαγές στο περιβάλλον που είναι συνέπεια της περιστροφής της Γης γύρω από τον άξονά της. Αυτές οι περιβαλλοντικές αλλαγές συνίστανται στην τακτική εναλλαγή ημέρας και νύχτας και στην σχέση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος και της διαθεσιμότητας ή της προσβασιμότητας των τροφίμων με τις εναλλαγές αυτές. Οι ενδογενώς ρυθμισμένοι κερκάδιοι ρυθμοί επιτρέπουν μια βέλτιστη χρονική οργάνωση της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας σε σχέση με το κυκλικό περιβάλλον. Τα κερκαδικά ρολόγια επιτρέπουν στους ζωικούς οργανισμούς να ζουν σε συγχρονισμό με το κυκλικό τους περιβάλλον, να προβλέπουν και να προετοιμάζονται για αλλαγές που συμβαίνουν καθημερινά με συγκεκριμένα πρότυπα (Ota et al., 2021). Ωστόσο, τα νέα δεδομένα της κλιματικής αλλαγής, φέρνουν τους οργανισμούς αντιμέτωπους με μια σειρά μεταβολών του περιβάλλοντός τους, των οποίων οι επιδράσεις είναι δυναμικές και επηρεάζουν την λειτουργία των οργανισμών (Araújo et al., 2018)

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μιας σειράς γονιδίων που συμμετέχουν στο κερκαδικό ρυθμό, στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας και του λαβρακιού, από το στάδιο της εκκόλαψης μέχρι την μεταμόρφωση της προνύμφης, σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας για σύντομο χρονικό διάστημα στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια στην οντογένεση των ψαριών. Μέσω της ανάλυσης αυτής, προσδιορίστηκε ο βαθμός πλαστικότητας των μηχανών χρονισμού και η δυνατότητα τους να υποστηρίξουν την ομοιόσταση και τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού.

Πρώτο βήμα σε αυτή την μελέτη ήταν η χρήση της αλληλούχησης RNA για την αξιολόγηση της μεταγραφωμικής κατάστασης των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων και για την ανίχνευση γονιδίων με σημαντικές αλλαγές στην έκφρασή τους υπό συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Από το σύνολο των γονιδίων, επιλέχθηκαν αυτά που συμμετέχουν στο βασικό μονοπάτι του κερκαδικού ρυθμού και αυτά που φαίνεται να μεταβάλλονται από τους βασικούς χρονοδότες, δηλαδή την θερμοκρασία και την φωτοπερίοδο. Τα γονίδια που εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση στα δείγματα φάνηκε να συμμετέχουν στα ίδια μονοπάτια και να ανήκουν στις ίδιες κατηγορίες, καθώς τα περισσότερα από αυτά κωδικοποιούν για γονίδια μεταγραφικών παραγόντων που αποτελούν βασικό συστατικό του κερκαδικού ρολογιού. Οι

μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω αναγνώρισης συγκεκριμένων μοτίβων στην αλληλουχία του DNA, επάγοντας την γονιδιακή έκφραση.

Επιπλέον, τα γονίδια που επιλέχθηκαν συμμετέχουν σε γονιδιακές οντολογίες που σχετίζονται με την ρύθμιση, τη μοριακή βάση του ρολογιού, την έναρξη της ταλάντωσης καθώς και στην απόκριση σε θερμοκρασιακά ερεθίσματα. Μεταξύ των γονιδίων με σημαντικές αλλαγές, εστίασαμε σε πέντε συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με το βασικό μονοπάτι του κερκαδικού ρυθμού: *clocka*, *arntl1a*, *arntl2*, *per2*, *cry3a* καθώς και σε δύο ακόμη γονίδια με σημαντικές αλλαγές, το *orn4a*, που αποτελεί σήμα έναρξης της ταλάντωσης και το *hry* που αποτελεί σήμα εξόδου του κερκαδικού ρυθμού.

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *clocka* (CLOCK) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των κερκαδικών ρυθμών. Η πρωτεΐνη είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας της βασικής οικογένειας έλικας-βρόχου-έλικας και έχει δραστηριότητα σύνδεσης ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης DNA. Η πρωτεΐνη σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα γονίδια της οικογένειας ARNTL (BMAL). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τα παράλογα γονίδια *arntl1a* και *arntl2* είναι μεταγραφικός παράγοντας της βασικής οικογένειας έλικας-βρόχου-έλικας. Το ετεροδιμερές ARNTL / CLOCK, κατά την διάρκεια της ημέρας, επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κερκαδικό ρυθμό, όπως τα γονίδια *per2* και *cry3a*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες που σχηματίζουν με την σειρά τους ένα ετεροδιμερές το οποίο στο τέλος της ημέρας αλληλεπιδρά με στοιχεία του DNA και αναστέλλουν την έκφραση των *clock* και *arntl*, σταματώντας έτσι την ταλάντωση. Στο τέλος της νύχτας, οι πρωτεΐνες *PER* και *CRY* αποικοδομούνται και ξεκινά ένας νέος κύκλος ταλάντωσης. Όλη αυτή η διαδικασία διαρκεί 24 ώρες και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό της ρυθμικότητας. Αυτός ο βασικός πυρήνας αλληλεπιδρά με μια σειρά από ενδογενή και εξωγενή σήματα προκειμένου να αποκρίνεται στις μεταβολές και προσδίδει πλαστικότητα στον μηχανισμό (Prokkola et al., 2018).

Από τα δεδομένα του RNAseq προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- στις συγκρίσεις μεταξύ των θερμοκρασιών για την τσιπούρα, φαίνεται πως η μετάβαση από τους 17 στους 20°C για το στάδιο του πρώτου ταΐσματος (FF) συγκεντρώνει τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Εικόνες 15-18, Πίνακας 12), το οποίο αναδεικνύει την σημαντική επίδραση αυτής της μεταβολής

στην γονιδιακή έκφραση στο συγκεκριμένο στάδιο. Επιπλέον, παρόμοια επίδραση φαίνεται να εμφανίζει η μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 17 στους 23° C στο στάδιο της μεταμόρφωσης (MM) (Εικόνες 15, 18, 20, Πίνακας 13). Η θερμοκρασία είναι ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει την ομοιόσταση του οργανισμού και θερμοκρασιακές μεταβολές είναι ικανές να προκαλέσουν στρες απορρυθμίζοντας την ομοιόσταση. Η περίοδος του ρολογιού, ο χρόνος μιας ταλάντωσης, δεν φαίνεται να επηρεάζεται τόσο από την θερμοκρασία. Η φάση της ταλάντωσης, φαίνεται να επηρεάζεται από τους θερμικούς παλμούς. Προκειμένου να μπορέσει ο οργανισμός να συγχρονιστεί εκ νέου και να είναι σε ισορροπία με το περιβάλλον του, φαίνεται να συμβαίνουν κάποιες αλλαγές στον μοριακό μηχανισμό. Αυτό εξηγεί πιθανότατα την αύξηση στα επίπεδα έκφρασης των *arntl1a* και *arntl2* που παρατηρούνται στη σύγκριση 17 με 20°C (Εικόνα 16,17) ως απόκριση του κερκαδικού ρυθμού στις μεταβολές που έχουν προκληθεί από την αύξηση της θερμοκρασίας. (Hirota et al., 2016)

- Στις συγκρίσεις μεταξύ των σταδίων, φαίνεται πως η σύγκριση ανάμεσα στο FF με το MM, τα οποία είναι και τα πιο απομακρυσμένα στάδια στην ανάπτυξη, τόσο στους 20 (Εικόνες 14-20, Πίνακας 13) όσο και στους 23°C (Εικόνες 15-20, Πίνακας 13), επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης για όλα τα γονίδια. Το φαινόμενο αυτό συνάδει με τις αναμενόμενες αλλαγές ανάμεσα στα δυο στάδια, καθώς από άποψη φυσιολογίας και λειτουργικότητας τα δύο στάδια διαφέρουν αρκετά, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται αυξημένη έκφραση στο στάδιο της μεταμόρφωσης του νευροπεπτιδίου γ σε σχέση με το στάδιο του πρώτου ταΐσματος (Εικόνα 20). Στο στάδιο της μεταμόρφωσης το ιχθύδιο είναι μεγαλύτερο και έχει αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις, επομένως αυξάνεται και η έκφραση του *hpy* ως αποτέλεσμα του κύκλου σίτισης. Επιπλέον για τα γονίδια *clocka*, *arntl1a*, *arntl2*, *cry3a* (Εικόνα 14,15,16,17) παρατηρείται μείωση των επιπέδων έκφρασης στο στάδιο της μεταμόρφωσης. Τα γονίδια αυτά, συμμετέχουν σε μια σειρά από βασικούς μηχανισμούς, όπως η επαγωγή και ρύθμιση του κερκαδικού ρυθμού, και η υπερέκφραση τους στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια πιθανός να σχετίζεται στην προσαρμογή των ιχθύων στα εξωτερικά ερεθίσματα και στις απότομες μεταβολές με τις οποίες έρχονται αντιμέτωπα.

Από της άλλη μεριά, για το λαβράκι φαίνεται να μην υπάρχει κάποια συγκεκριμένη μεταβολή στην θερμοκρασία που να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την έκφραση των γονιδίων.

- Η μοναδική σύγκριση που συγκεντρώνει έναν εύλογο αριθμό στατιστικά σημαντικών διαφορών είναι η σύγκριση 14 με 20°C στο στάδιο της μεταμόρφωσης και του πρώτου ταΐσματος όπου παρατηρείται μείωση της έκφρασης των γονιδίων *per2*, *cry3a*, *arntl2* (Εικόνες 63-66, Πίνακας 16). Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση έναν μηχανισμό προσαρμογής, όπου παρατηρείται αύξηση της θερμοσταθερότητας μέσω αλλαγών μιας περιοχής της πρωτεΐνης (για παράδειγμα αύξηση αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων) ώστε να λειτουργεί σωστά σε υψηλές θερμοκρασίες. Με βάση αυτό σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται χαμηλή έκφραση αυτών των πρωτεϊνών ώστε να αντισταθμίζεται το κόστος υπερέκφρασης άλλων πρωτεϊνών. (Moreno et al., 2021)
- Τέλος στις συγκρίσεις μεταξύ των σταδίων πιο ευαίσθητο στις μεταβολές φαίνεται να είναι το FF σε σχέση με το FL και στις τρεις θερμοκρασίες όπου εδώ παρατηρείται αύξηση των *clocka*, *per2*, *arntl2*, *cry3a* όσο προχωρά η ανάπτυξη (Εικόνες 62,63,64, Πίνακας 17). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα στάδια αυτά είναι αρκετά ευαίσθητα και είναι απαραίτητη η προσαρμογή στις αλλαγές που επάγονται από ενδογενή ερεθίσματα όσο και από εξωγενή. Η αύξηση αυτή πιθανόν να οφείλεται στην στενή σύνδεση του κερκάδιου ρυθμού με τον κυτταρικό κύκλο. Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε συγκεκριμένες φάσεις (M, G1, S και G2) η μετάβαση των οποίων ελέγχεται αυστηρά από τον κυτταρικό κύκλο. Ο συνδετικός κρίκος αυτών των δύο μηχανισμών είναι μια κινάση – *wee1* η οποία ρυθμίζεται από το διμερές CLOCK / ARNTL το οποίο επάγει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την κινάση. Στη συνέχεια η κινάση *wee1* αναστέλλει μια δεύτερη κινάση η οποία με την σειρά της καταστέλλει την μετάβαση G2 / M προκειμένου να επιτευχθεί μετάβαση των φάσεων σε συγκεκριμένες ώρες του κύκλου ημέρας νύχτας. Κατά το στάδιο της κάμψης συμβαίνουν κυτταρικές διαιρέσεις με αυξημένο ρυθμό οπότε η σωστή λειτουργία του κερκαδικού ρολογιού είναι απαραίτητη για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *per2* που παρατηρείται, πιθανόν σχετίζεται με την αναστολή έκφρασης του διμερούς CLOCK / ARNTL, επάγοντας έτσι την προώθηση του κυτταρικού κύκλου όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες. (Kulczykowska et al., 2010)

Προκειμένου να γίνει επικύρωση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση του RNAseq, έγινε ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της PCR πραγματικού χρόνου σε περισσότερα δείγματα ανά αναπτυξιακό στάδιο και ανά θερμοκρασία για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Μετά από σύγκριση των δύο αναλύσεων κατασκευάστηκαν οι συγκεντρωτικοί Πίνακες (Πίνακες 14, 15, 18, 19) στους οποίους εστιάζουμε στις συγκρίσεις που έχουν σημαντικές διαφορές.

- Αναφορικά με την τσιπούρα, στις συγκρίσεις μεταβολής της θερμοκρασίας τόσο στο RNAseq όσο και στην qPCR δεν εμφανίζονται αρκετές διαφορές στις συγκρίσεις. Παρόλα αυτά, υπάρχουν συγκεκριμένα γονίδια όπως το *cry3a* και *arntl2* των οποίων οι συγκρίσεις συμφωνούν μεταξύ των δυο μεθόδων (Πίνακας 14), επομένως θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως αξιόπιστοι δείκτες για τις μελέτες της επίδρασης της θερμοκρασίας στα οντογενετικά προφίλ των ιχθύων. Το γονίδιο *cry3a* φαίνεται να εμφανίζει μια στατιστικά σημαντική αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας (Εικόνα 22), το οποίο θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα κρυπτοχρώματα είναι φωτοϋποδοχείς για το μπλε φως και επομένως η έκφραση του επάγεται και από το φως. Η αύξηση της θερμοκρασίας σηματοδοτεί πιθανότατα εναλλαγή περιόδου από ψυχρή σε θερμή, άρα και αύξηση του φωτός επομένως επάγεται η έκφραση του γονιδίου. Από την άλλη μεριά, το *arntl2* (Εικόνα 24), εμφανίζει μια σημαντική αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας η οποία θα μπορούσε να εξηγηθεί από την επίδραση του θερμικού στρες στον μηχανισμό του ρολογιού και με βάση αυτό που αναφέρθηκε προηγουμένως σχετικά με την μετατόπιση φάσης (Hirota et al., 2016).
- Αντίθετα, στις συγκρίσεις μεταβολής των σταδίων και στις δύο αναλύσεις παρατηρούνται αρκετές διαφορές, το οποίο υποδηλώνει πως η ανάπτυξη και η μετάβαση των σταδίων είναι μια αρκετά δυναμική διαδικασία, η οποία επιδρά σε μεγάλο βαθμό στην έκφραση σημαντικών γονιδίων, όπως αυτά που ρυθμίζουν τον κερκαδικό ρυθμό. Ανακεφαλαιώνοντας, παρατηρούμε πως η επίδραση της μεταβολής των σταδίων επηρεάζει εντονότερα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος, ενώ η μεταβολή της θερμοκρασίας ακόμα και έως 6° C, δεν φαίνεται να έχει τόσο σημαντική επίδραση.

Επιπλέον, σχεδόν στο σύνολο τους οι συγκρίσεις συμφωνούν ανάμεσα στις δύο αναλύσεις για τα *arntl2*, *nry*, *arntl1a*, *per2* (Πίνακας 15) επομένως και αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως αξιόπιστοι δείκτες για αυτές τις συγκρίσεις.

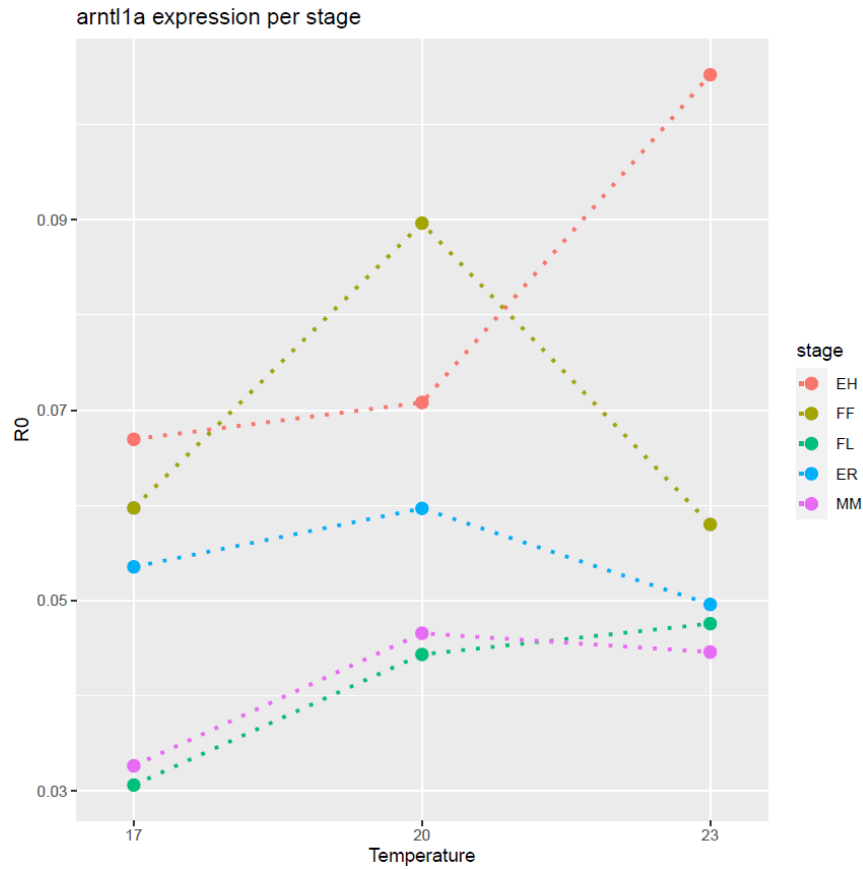
Η ανάλυση του μεταγραφώματος με τεχνικές αλληλούχησης είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη των μεταβολών των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, ωστόσο στην συγκεκριμένη εργασία ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιορισμένος (ένα δείγμα ανά συνδυασμό σταδίου και θερμοκρασίας) και ταυτόχρονα η ομαδοποίηση (pooling) αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για ακριβή ποσοτικοποίηση και για καλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Επομένως, η qPCR χρησιμοποιήθηκε συνεργιστικά με το RNAseq για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης, και για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Οι διαφορές που εμφανίζονται στα αποτελέσματα των δυο μεθόδων πιθανόν να οφείλονται στους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί πως η χρήση ολόκληρων των ιχθύων (λόγω μεγέθους ήταν αδύνατος ο διαχωρισμός ιστών σε όλα τα στάδια) πιθανόν να περιορίζει την εμφάνιση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην γονιδιακή έκφραση, οι οποίες πιθανόν θα εντοπίζονταν σε κατά ζεύγη συγκρίσεις ιστών μεταξύ θερμοκρασιών. Η επίδραση της θερμοκρασίας δεν αναμένεται να είναι καθολική στο σύνολο του οργανισμού, με συγκεκριμένους ιστούς (πχ εγκέφαλος, ήπαρ, αναπαραγωγικό σύστημα) να θεωρούνται οι πιο ευαίσθητοι στις θερμοκρασιακές αλλαγές.

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR, ακολουθήσαμε δυο διαφορετικές προσεγγίσεις: στην πρώτη προσέγγιση, διατηρήθηκε σταθερό το στάδιο και μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας ενώ στην δεύτερη προσέγγιση έγινε το αντίστροφο.

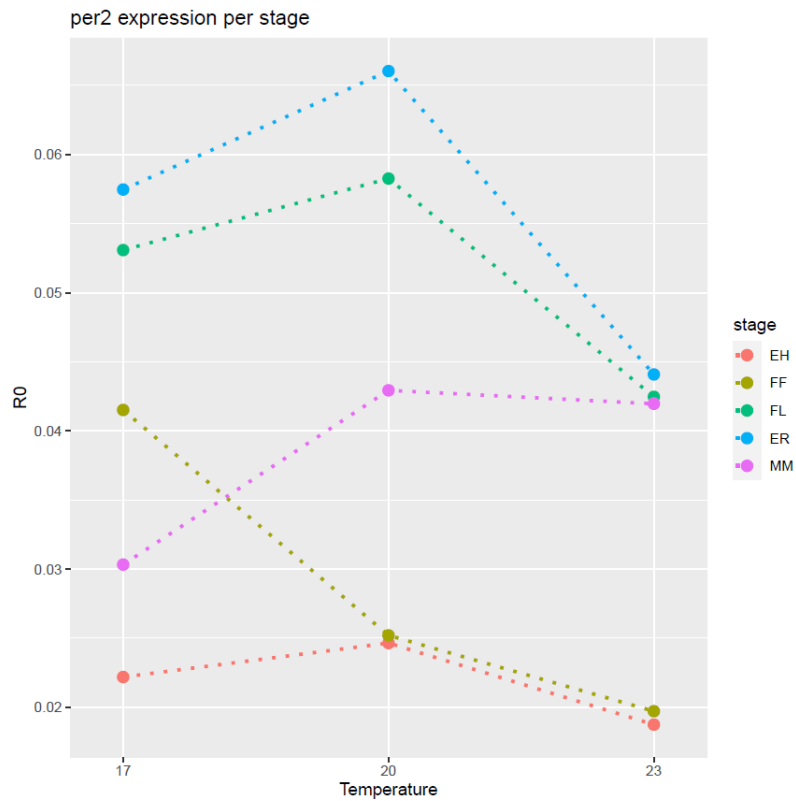
Μελέτες επίδρασης της θερμοκρασίας

Οι πιο σημαντικές παρατηρήσεις που προκύπτουν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων για την τσιπούρα, αφορούν την τάση για υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην θερμοκρασία των 20oC και μια μείωση στην θερμοκρασία των 23oC στο σύνολο των γονιδίων το οποίο δείχνει πως η αύξηση της θερμοκρασίας δεν είναι ευνοϊκή για την ρύθμιση του κερκαδικού ρυθμού για τα συγκεκριμένα γονίδια. Επιπλέον, τα πρότυπο έκφρασης των *arntl1* (Εικόνα 80), *per2* (Εικόνα 81) και *orn4a* (Εικόνα 82) εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες ανεξάρτητα από την μεταβολή στη θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τον

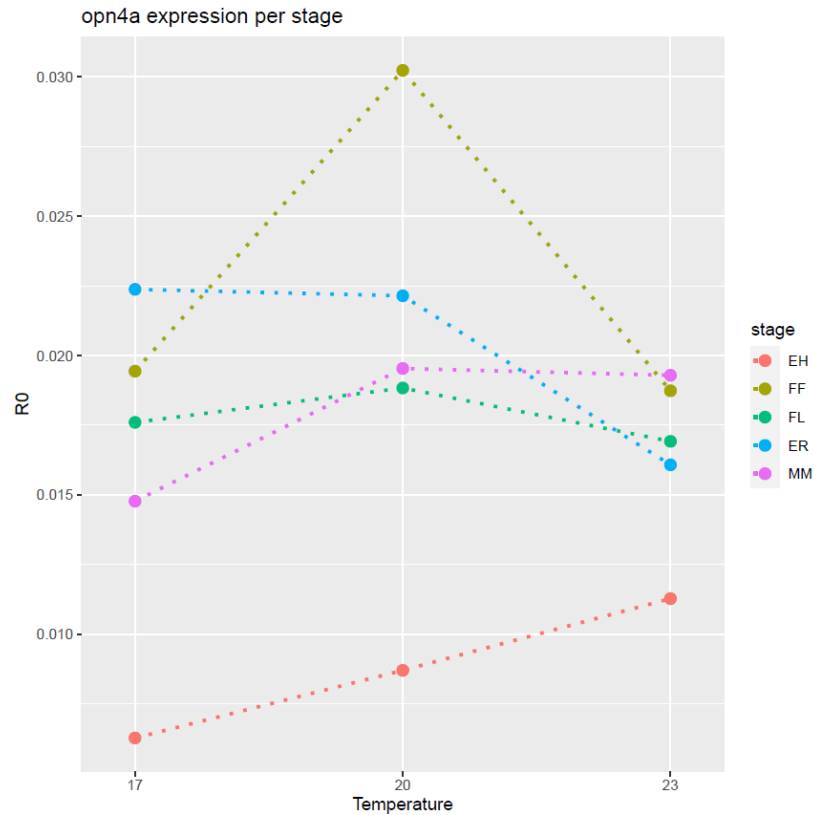
θεμελιώδη ρόλο των τριών γονιδίων για την λειτουργία του κυττάρου, το οποίο οδηγεί στην πολύ αυστηρή ρύθμισή τους ανεξάρτητα από τις εξωτερικές μεταβολές θερμοκρασίας.



Εικόνα 80: πρότυπο έκφρασης του *arntl1a* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

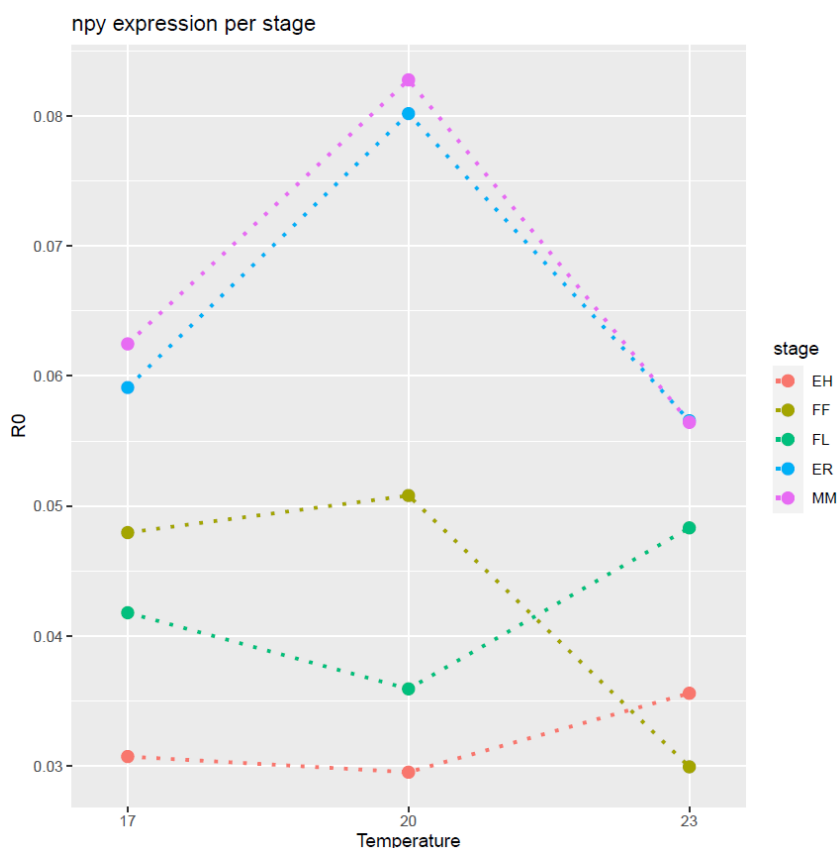


Εικόνα 81: πρότυπο έκφρασης του *per2* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία



Εικόνα 82: πρότυπο έκφρασης του *orn4a* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

Αναφορικά με το *hry* (Εικόνα 83) παρατηρείται αύξηση της έκφρασης στα στάδια του πρώτου ταΐσματος και κατά το τέλος της νυμφικής εκτροφής στους 20°C και αντίθετα μείωση στους 23°C. Αυτό υποδηλώνει ότι στα πρωταρχικά στάδια η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μια κατάσταση οξείας θερμικής πίεσης. Όταν ο οργανισμός βρεθεί σε αυτή την κατάσταση, όπου το σώμα χρειάζεται γρήγορη ενέργεια για να τροφοδοτήσει την αισθητηριακή αντίληψη, τη γνωστική επεξεργασία και την μυϊκή δραστηριότητα, η πρόσληψη πρόσθετης ενέργειας με την μορφή της τροφής θα αποσπούσε μάλλον την προσοχή από αυτές τις λειτουργίες και ως εκ τούτου μειώνεται η όρεξη για τροφή. Επιπλέον, οι επιπτώσεις της θερμικής καταπόνησης στην λειτουργία του οργανισμού πιθανόν να επιδεινώνονταν μέσω της πρόσληψης τροφής, λόγω της ανάπτυξης μεταβολικής θερμότητας, το οποίο θα οδηγούσε σε περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος. Για το λόγο αυτό, πιθανόν η πρόσληψη της τροφής να ρυθμίζεται αρνητικά πάνω από ένα συγκεκριμένο θερμοκρασιακό κατώφλι (Oster H., 2020)



Εικόνα 83: πρότυπο έκφρασης του *hry* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

Αξίζει να σημειωθεί πως το στάδιο της εκκόλαψης και το τελευταίο στάδιο της νυμφικής εκτροφής εμφανίζουν τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σύγκριση 17 –

23oC για το πρώτο και στη σύγκριση 20 – 23oC για το δεύτερο, το οποίο υποδηλώνει πως η μεταβολή της θερμοκρασίας καθιστά αυτά τα στάδια αρκετά ευάλωτα. Στον αντίποδα, στο στάδιο κάμψης σε όλες τις συγκρίσεις δεν εμφανίζονται σημαντικές διαφορές, επομένως φαίνεται το συγκεκριμένο στάδιο να μην επηρεάζεται από το συγκεκριμένο ερέθισμα.

Συμπληρωματικά, τονίζεται πως οι συγκρίσεις γονιδιακών εκφράσεων μεταξύ 17 – 20° C εμφανίζουν τις λιγότερες διαφορές, και αυτό πιθανόν να οφείλεται πως οι θερμοκρασίες ανήκουν μέσα στο φάσμα της θερμοουδέτερης ζώνης των ιχθύων και δεν εκδηλώνουν επιπτώσεις θερμικής καταπόνησης. Θα μπορούσαμε να πούμε πως η αλλαγές στη θερμοκρασία δεν επηρεάζουν στο σύνολο την διαδικασία της ανάπτυξης αλλά κάποια συγκεκριμένα στάδια.

Επιπλέον, από τα διαγράμματα συσχετίσεων προκύπτει πως υπάρχουν ζεύγη γονιδίων που σε κάθε θερμοκρασία εμφανίζουν ισχυρή και θετική συσχέτιση. Τέτοια ζεύγη αποτελούν τα:

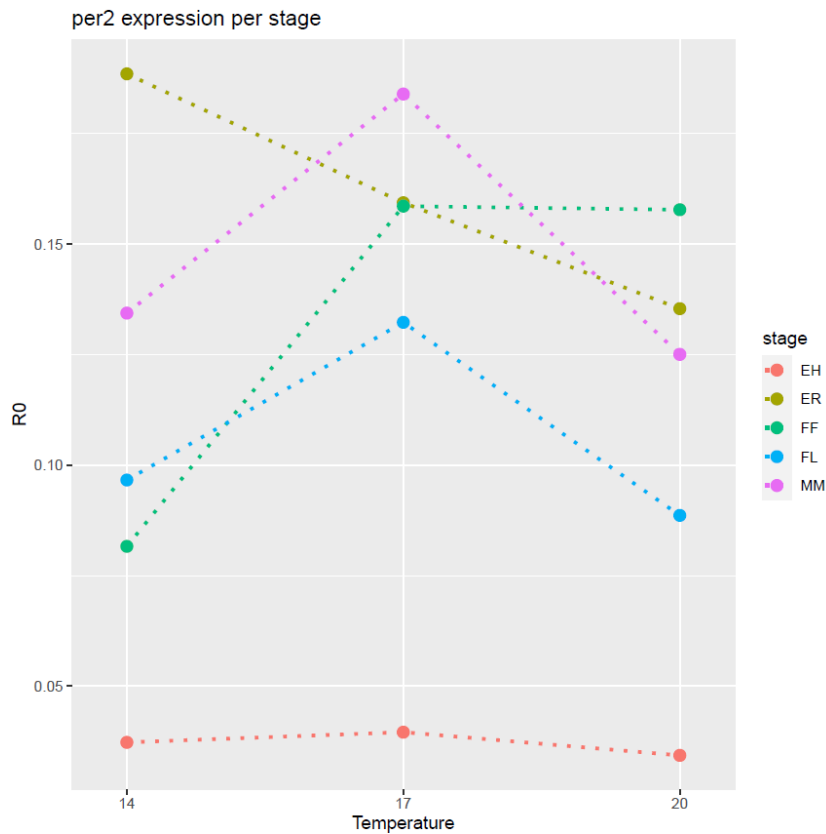
- *cry3a / arntl1a* σε όλες τις θερμοκρασίες και όλα τα στάδια,
- *per2 / arntl1a* για όλες τις θερμοκρασίες στο στάδιο κάμψης,
- *arntl1a / nry* για όλες τις θερμοκρασίες στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος,
- *per2 / nry* για όλες τις θερμοκρασίες στα στάδια της εκκόλαψης και του πρώτου ταΐσματος και τέλος
- *orn4a / arntl1a* για όλες τις θερμοκρασίες στα στάδια του πρώτου ταΐσματος και της μεταμόρφωσης (Εικόνες 28-32).

Όλες αυτές είναι ισχυρές και θετικές συσχετίσεις που υποδηλώνουν ότι τα γονίδια αυτά συν-ρυθμίζονται από κοινούς μηχανισμούς και επιβεβαιώνει ότι η έκφραση τους επάγεται κυρίως από ένα κοινό μονοπάτι, αυτό του κερκαδικού ρυθμού.

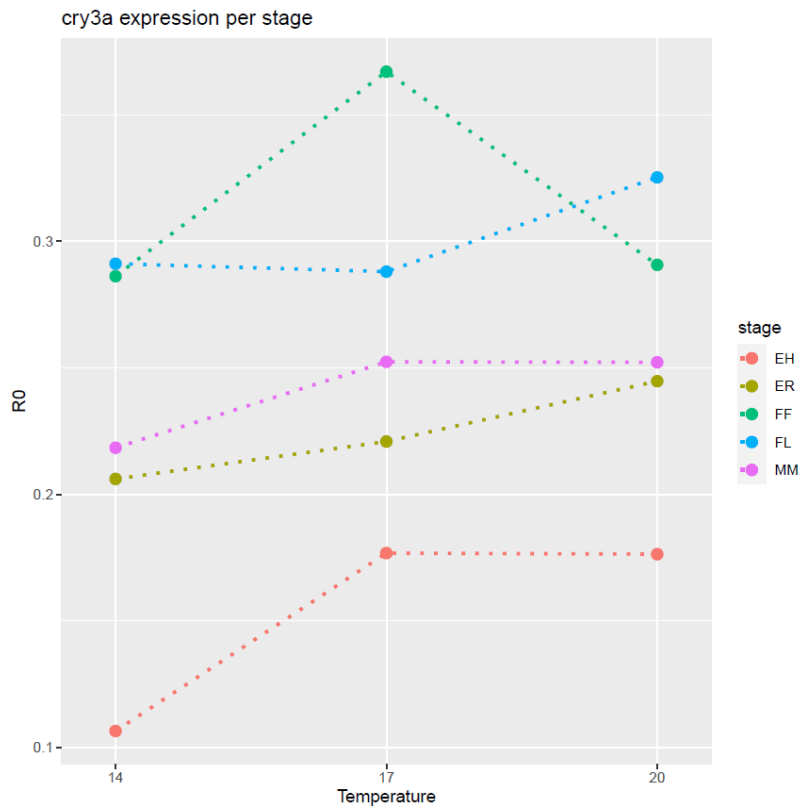
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό ο αβιοτικός παράγοντας που μεταβάλλεται είναι η θερμοκρασία, ωστόσο η φωτοπερίοδος παραμένει σταθερή με 18 ώρες φως και 6 ώρες σκοτάδι καθόλη την διάρκεια του πειράματος όπως και η ένταση του φωτός. Και οι δύο αυτοί παράγοντες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ταλάντωση του ρολογιού και την ρύθμιση της φάσης της ταλάντωσης. Η φωτοπερίοδος σε συνδυασμό με τους θερμικούς παλμούς μετατοπίζουν την φάση της ταλάντωσης των ρολογιών (Feng et al., 2016). Η φάση είναι αυτή που συγχρονίζει την ταλάντωση σύμφωνα με τις αλλαγές στο περιβάλλον, επομένως εάν ένας από τους δύο βασικούς ρυθμιστές της δεν μεταβάλλεται τότε είτε δεν λαμβάνεται το σήμα για μετατόπιση φάσης είτε λαμβάνεται μειωμένο σήμα και άρα μετατοπίζεται ελάχιστα ώστε να μην προκαλεί αλλαγές στη ρυθμικότητα του ρολογιού.

Πιθανότατα είναι και αυτός ένας από τους βασικούς λόγους για τους οποίους δεν παρατηρείται πλήθος σημαντικών διαφορών στις συγκρίσεις που σχετίζονται με την μεταβολή της θερμοκρασίας (Hirota et al., 2016).

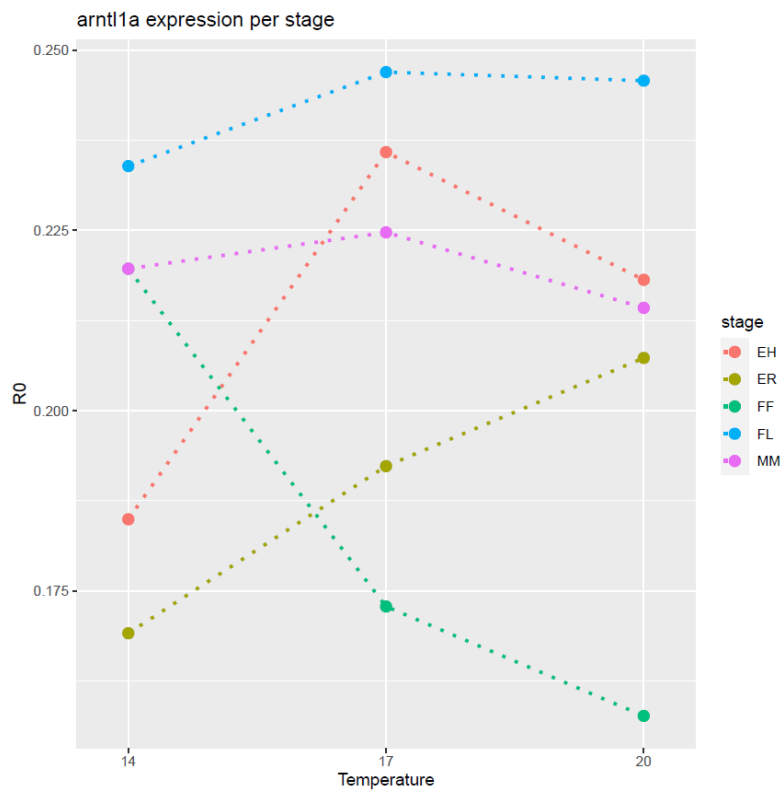
Αντίστοιχα στο λαβράκι εντοπίζονται κάποια αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Αρχικά, στη σύγκριση 17 με 20°C παρατηρούνται οι λιγότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές σε αντίθεση με την σύγκριση 14 με 20°C όπου παρατηρούνται οι περισσότερες σημαντικές διαφορές υποδηλώνοντας πως η σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας δεν επιφέρει τόσες μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων σε σύγκριση με την απότομη μεταβολή. Τα γονίδια *per2* (Εικόνα 84) / *cry3a* (Εικόνα 85) καθώς και τα *arntl1a* (Εικόνα 86) / *arntl2* (Εικόνα 87) / *clocka* (Εικόνα 88) έχουν παρόμοια μοτίβα, το οποίο εξηγείται βάση του μοριακού μηχανισμού.



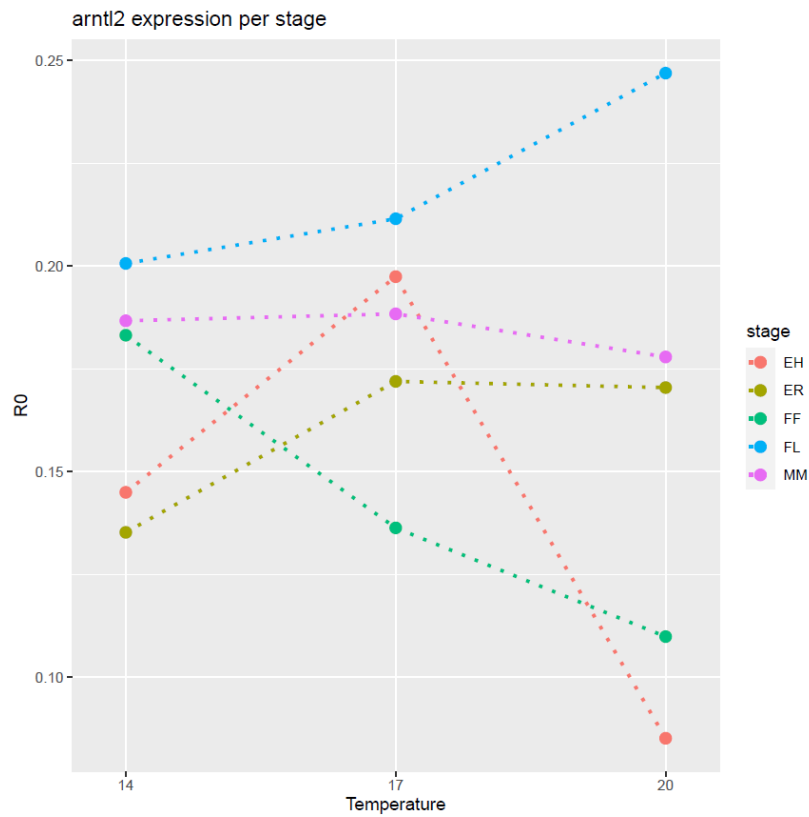
Εικόνα 84: πρότυπο έκφρασης του *per2* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία



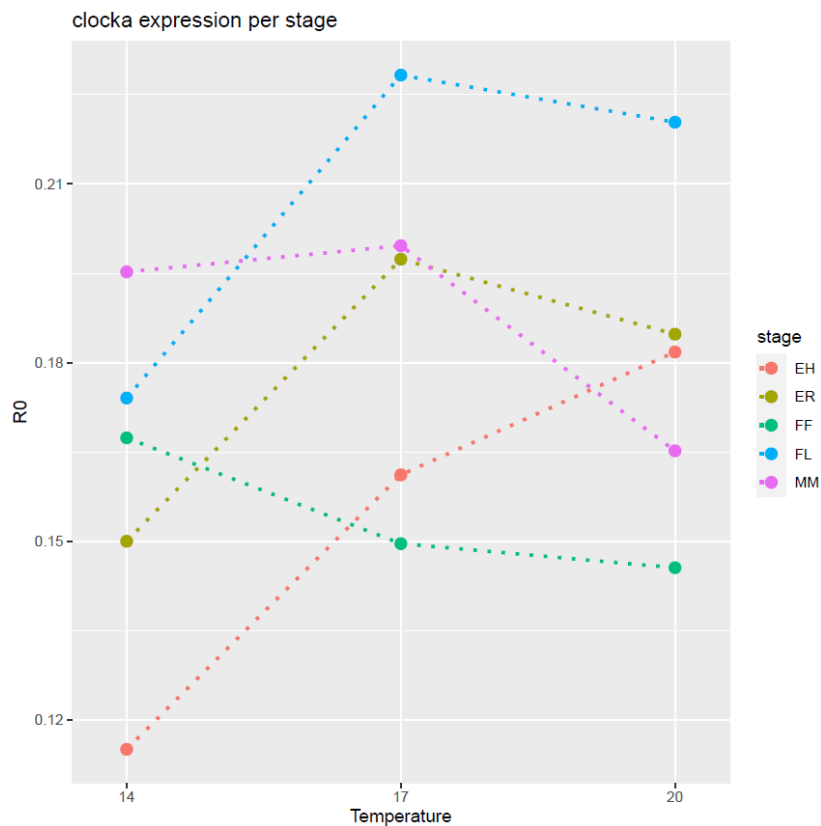
Εικόνα 85: πρότυπο έκφρασης του cry3a με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία



Εικόνα 86: πρότυπο έκφρασης του arnt1a με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

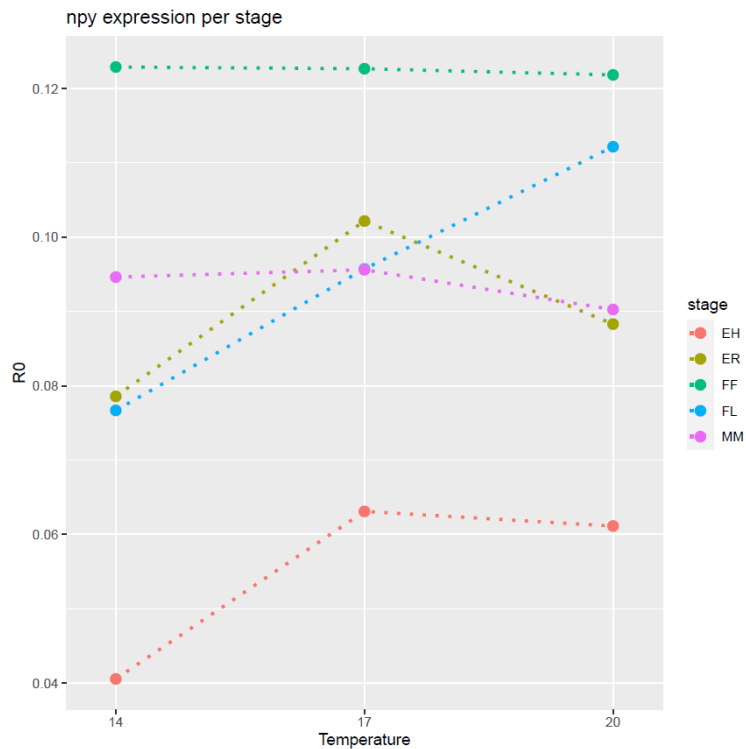


Εικόνα 87: πρότυπο έκφρασης του *arntl2* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

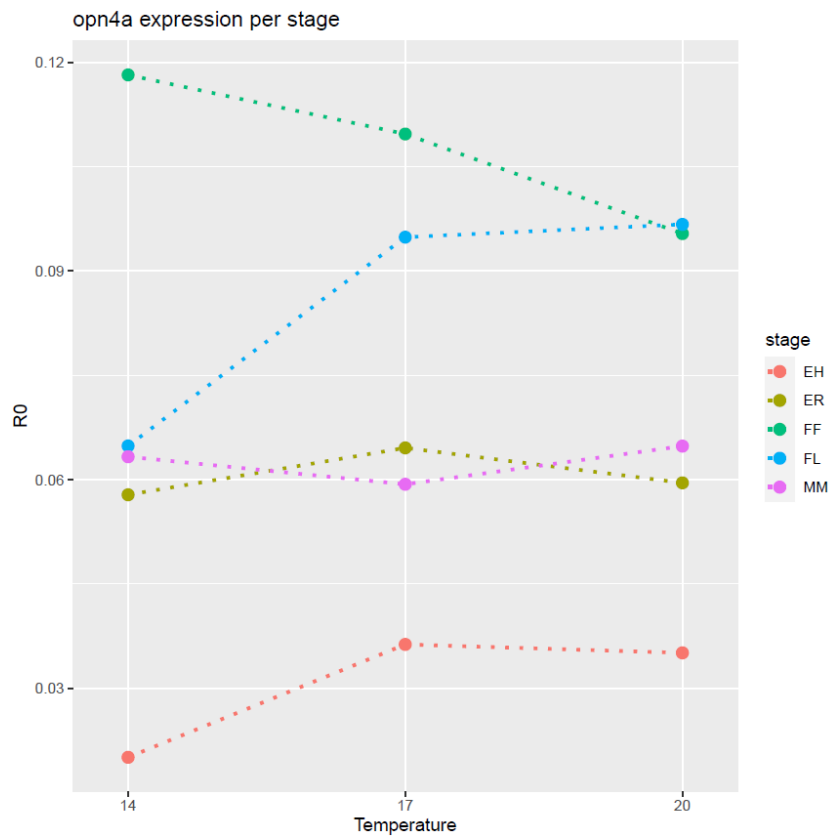


Εικόνα 88: πρότυπο έκφρασης του *clocka* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

Επιπλέον, μια σημαντική παρατήρηση είναι πως τα *hry* (Εικόνα 89), *orn4a* (Εικόνα 90) φαίνεται να μην επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης τους με τις μεταβολές στη θερμοκρασία κάτι που υποδηλώνει πως είναι γονίδια των οποίων η λειτουργία είναι αρκετά σημαντική και δεν επηρεάζεται από ερεθίσματα που δέχεται ο οργανισμός εμφανίζοντας έτσι μια πλαστικότητα.



Εικόνα 89: πρότυπο έκφρασης του npy με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία



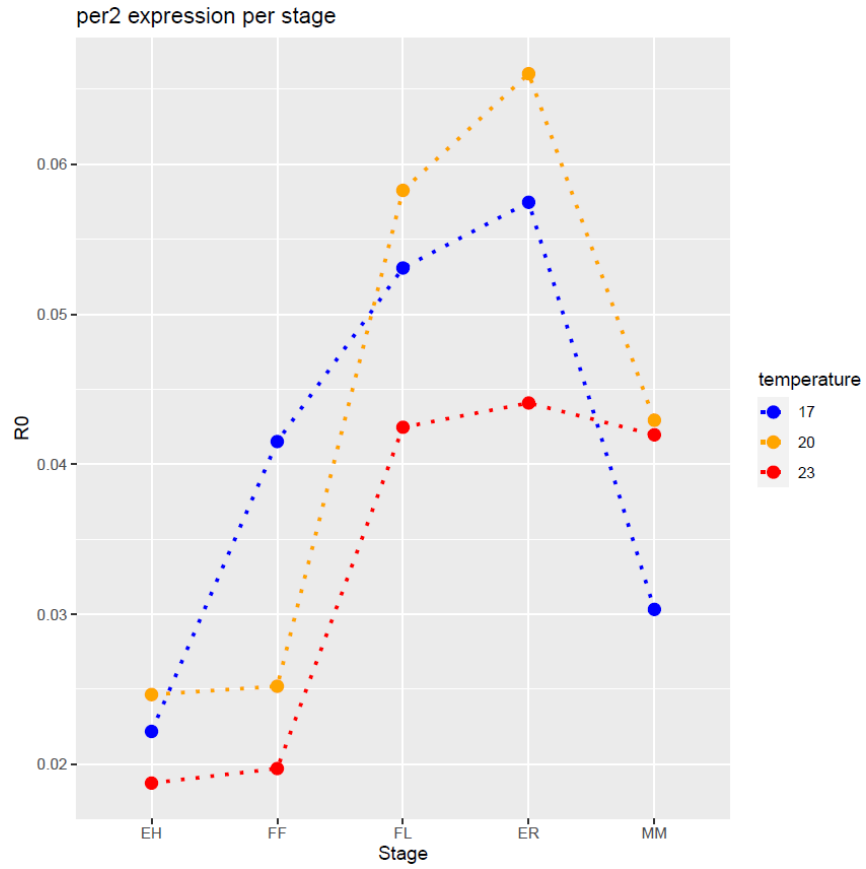
Εικόνα 90: πρότυπο έκφρασης του orn4a με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται η θερμοκρασία

Το ίδιο δεν ισχύει όμως για το *clocka* το προφίλ έκφρασης του οποίου φαίνεται να μεταβάλλεται με την μεταβολή της θερμοκρασίας από τους 14oC σε σχέση με το προφίλ έκφρασης στους 17 και 20oC. Το γονίδιο αυτό για το λαβράκι φαίνεται να είναι αρκετά ευαίσθητο και να εμφανίζει πλαστικότητα ανάλογη με τα γονίδια που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Το *clocka* όπως γνωρίζουμε από τον βασικό μηχανισμό ρύθμισης του ρολογιού διμερίζεται με τα *arntl* γονίδια και αυτή η δυσπροσαρμογή του πρώτου σε σχέση με το δεύτερο ίσως επιφέρει προβλήματα στη ρύθμιση του μηχανισμού. Επιπλέον, αναφορικά με τις συσχετίσεις των γονιδιακών εκφράσεων, εντοπίζονται ζεύγη γονιδίων που πιθανότατα συν ρυθμίζονται όπως και στην τσιπούρα. Αυτά είναι το *clocka* / *hry* και στις τρεις θερμοκρασίες σε όλα τα στάδια και το *arntl1a* / *arntl2* σε όλες τις θερμοκρασίες για τα στάδια ER και MM (Εικόνες 62-66).

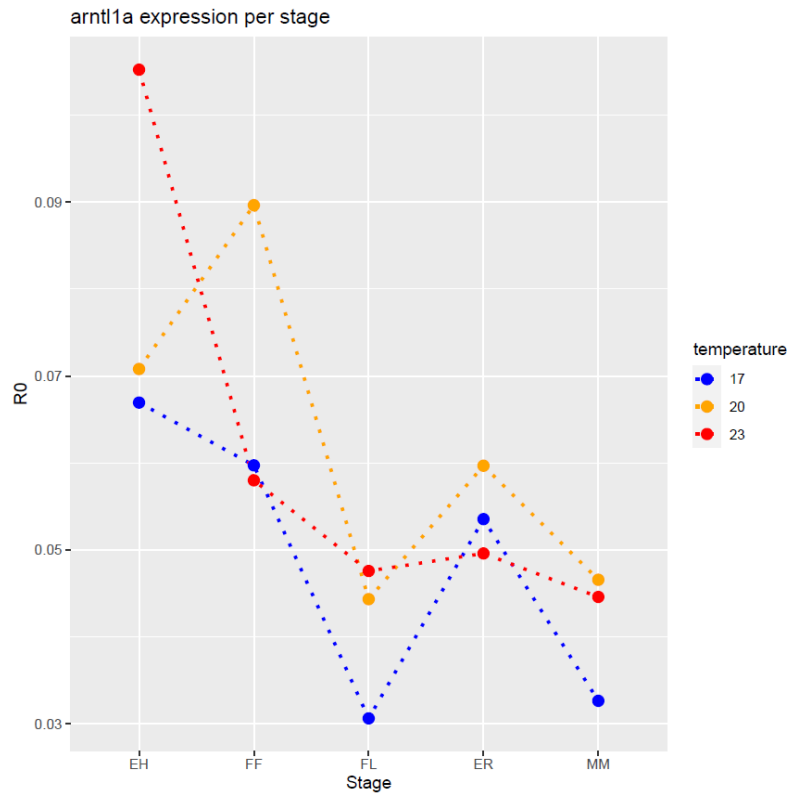
Εξίσου και στο λαβράκι δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης με τις μεταβολές των θερμοκρασιών, όπως και στην τσιπούρα και ο λόγος πιθανότατα είναι πως η φωτοπερίοδος παρέμεινε σταθερή στην πειραματική διαδικασία. Επιπλέον, ίσως ο οργανισμός μπόρεσε να προσαρμοστεί και να δημιουργήσει μια αρχική κατάσταση εσωτερικής αναδιοργάνωσης στο παροδικό στρες, ωστόσο αυτή η αρχική κατάσταση μπορεί να εξελιχθεί σε κατάσταση εσωτερικού αποσυγχρονισμού με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιούνται πλέον συντονισμένες ταλαντώσεις.

Συγκρίσεις μεταβολής των σταδίων

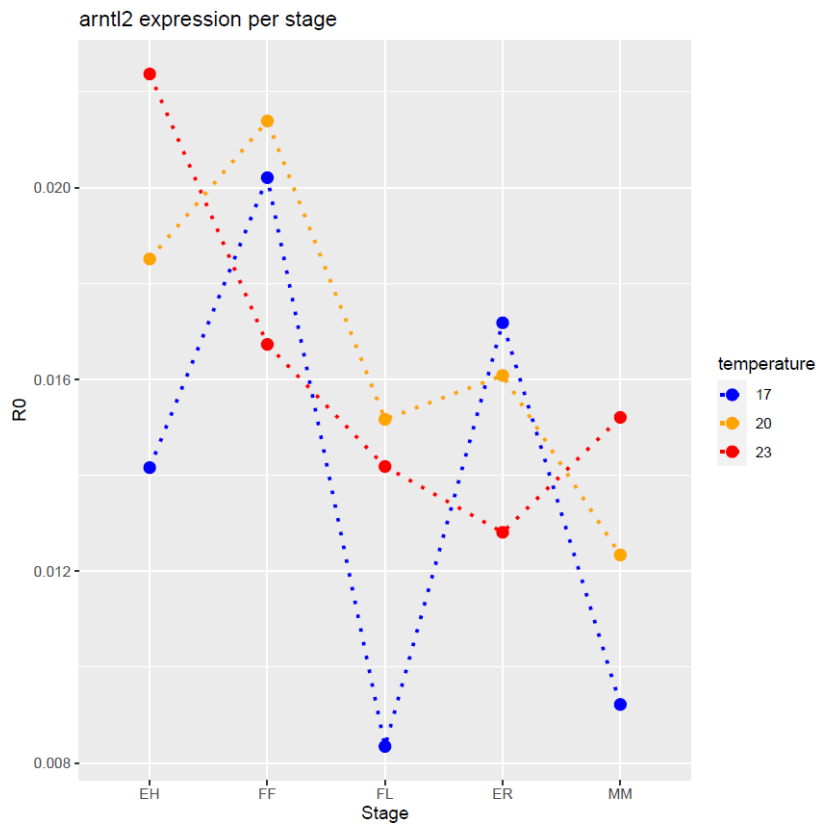
Στην τσιπούρα, μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με τις αλλαγές στο οντογενετικό προφίλ του οργανισμού, υπό σταθερή θερμοκρασία. Αρχικά όταν το *per2* (Εικόνα 91) υπερεκφράζεται, τα *arntl1a* και *arntl2* (Εικόνα 92, 93 αντίστοιχα) υποεκφράζονται το οποίο είναι σύμφωνο με τον βασικό μηχανισμό ρύθμισης του ρυθμού.



Εικόνα 91: πρότυπο έκφρασης του *per2* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο



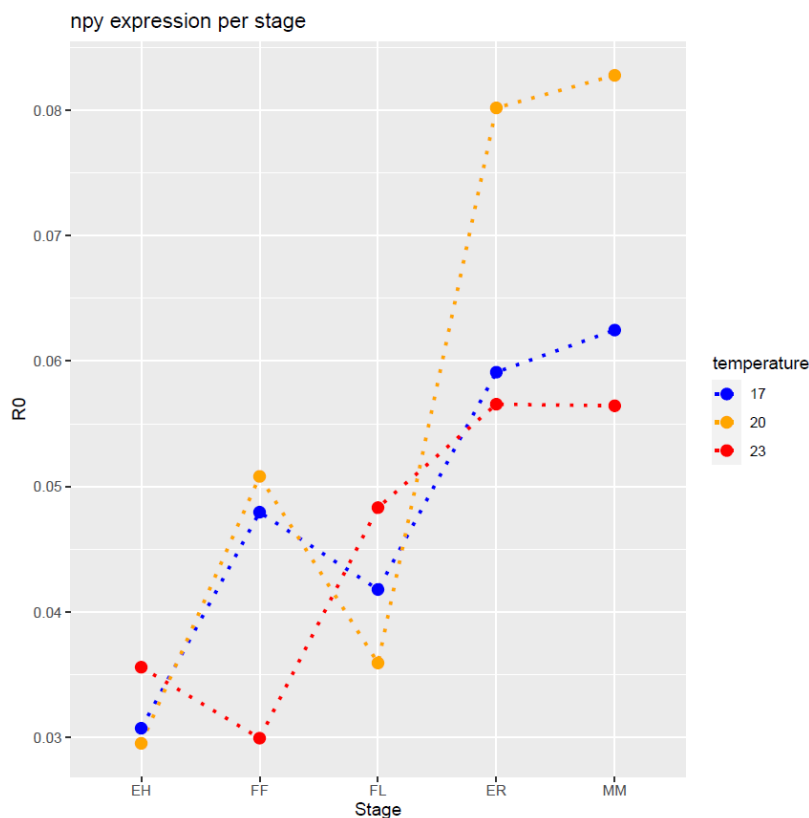
Εικόνα 92: πρότυπο έκφρασης του arntl1a με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο



Εικόνα 93: πρότυπο έκφρασης του arntl2 με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο

Επιπλέον για το *hry* (Εικόνα 94) φαίνεται πως κατά το στάδιο της εκκόλαψης τα επίπεδα έκφρασης είναι αρκετά χαμηλά καθώς το ιχθύδιο τρέφεται ακόμη με την λέκιθο και επομένως δεν χρειάζεται να αναζητήσει τροφή. Στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος η έκφραση αυξάνεται στις δύο πιο χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που είναι αναμενόμενο καθώς το ψάρι αρχίζει να αναζητά εξωτερική πηγή θρέψης, καταναλώνει ενέργεια και ταυτόχρονα υπάρχει έλλειψη πτερυγίων και ουράς. Το ψάρι σε αυτό το στάδιο κάνει κάποιες άτακτες κινήσεις για να αναζητήσει τροφή χωρίς να καταφέρνει πάντα να τραφεί, για αυτό το λόγο και κατά το στάδιο αυτό παρατηρείται πολλές φορές μεγάλη μείωση στον πληθυσμό (Kendall et al., 1993).

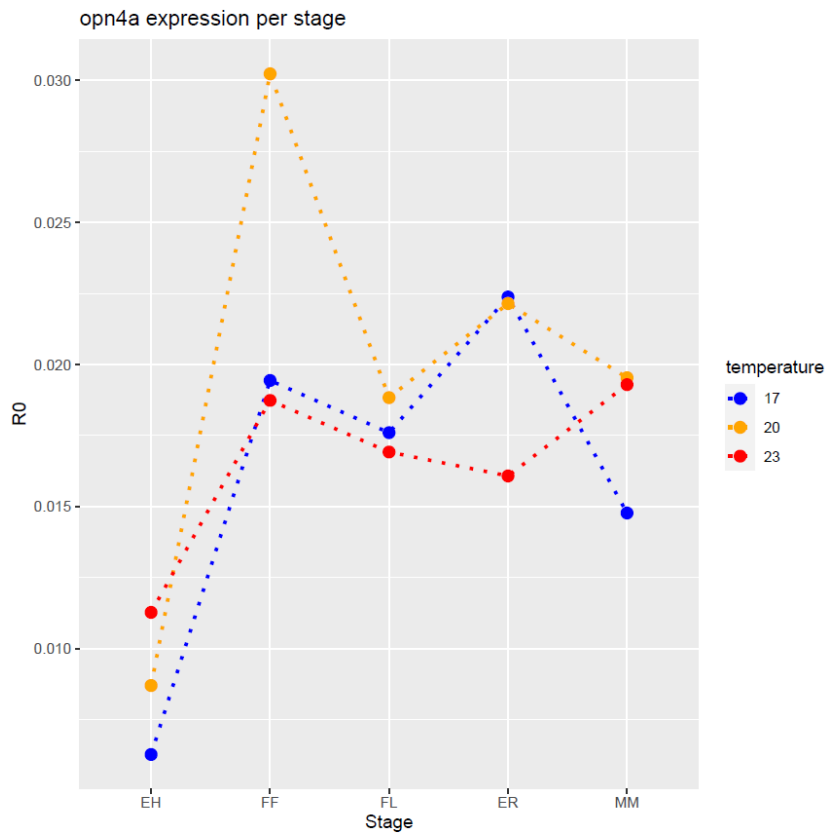
Σε αντίθεση, στους 23οC, η έκφραση του *hry* μειώνεται και φτάνει σε χαμηλότερο επίπεδο και από τα επίπεδα έκφρασης κατά την εκκόλαψη. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό αναφέρθηκε προηγουμένως, και έχει να κάνει με την θερμική καταπόνηση. Στα υπόλοιπα στάδια η έκφραση φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία εκτός από το στάδιο της μεταμόρφωσης όπου και εκεί η έκφραση μειώνεται στους 23οC.



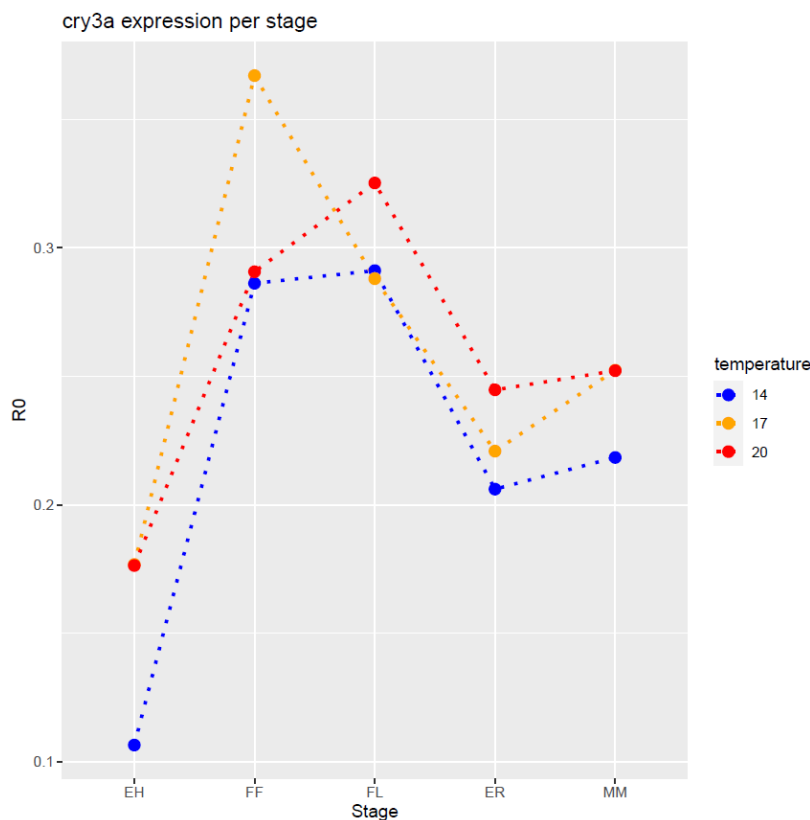
Εικόνα 94: πρότυπο έκφρασης του *hry* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο

Επιπλέον, σχεδόν για το σύνολο των γονιδίων φαίνεται ότι το στάδιο της εκκόλαψης συγκεντρώνει την χαμηλότερη έκφραση με εξαίρεση τα γονίδια *arntl1a* και *arntl2* τα όποια

έχουν αρκετά αυξημένη έκφραση, καθώς η έκφραση αυτών εκκινεί το κερκαδικό ρολόι. Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση σχετίζεται με το μοτίβο έκφρασης του *orn4a* (Εικόνα 95) και του *cry3a* (Εικόνα 96) είναι πως φαίνεται να μην επηρεάζεται με την μετάβαση των σταδίων το οποίο σημαίνει πως η έκφραση του είναι αρκετά συντηρημένη.



Εικόνα 95: πρότυπο έκφρασης του *orn4a* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο



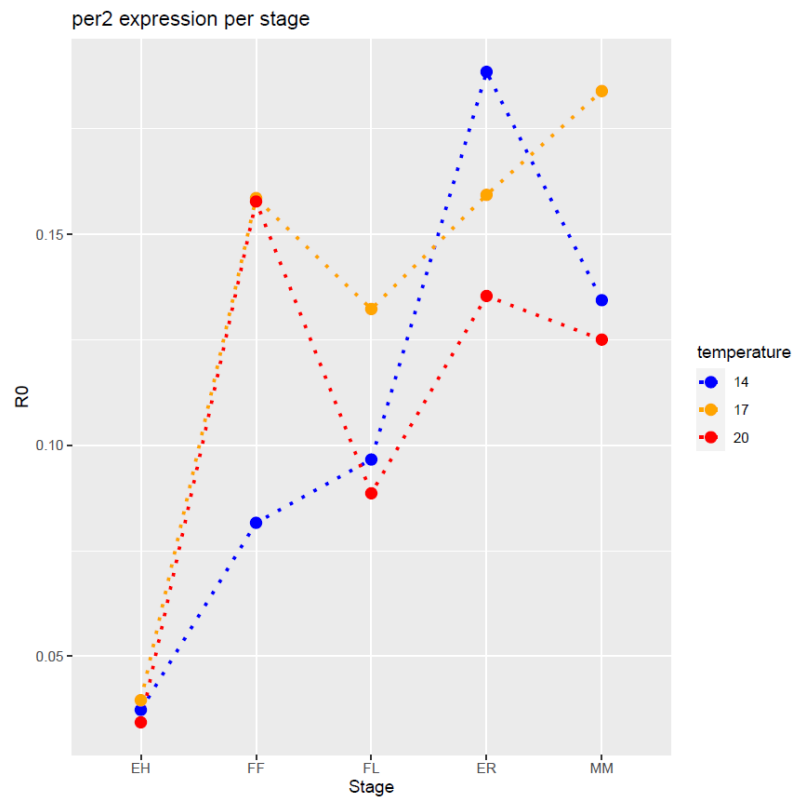
Εικόνα 96: πρότυπο έκφρασης του *cry3a* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο

Επιπλέον, φαίνεται πως η μετάβαση από το FL στο ER είναι η πιο ομαλή καθώς δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για την πλειοψηφία των γονιδίων, σε αντίθεση με την μετάβαση από το ER στο MM όπου παρατηρούνται οι σημαντικότερες διαφορές, ίσως γιατί από το στάδιο της προνύμφης μεταβαίνει στο στάδιο του ενήλικου οργανισμού και πλέον δίνεται έμφαση στην αύξηση και όχι στην ανάπτυξη (Geladakis et al., 2022).

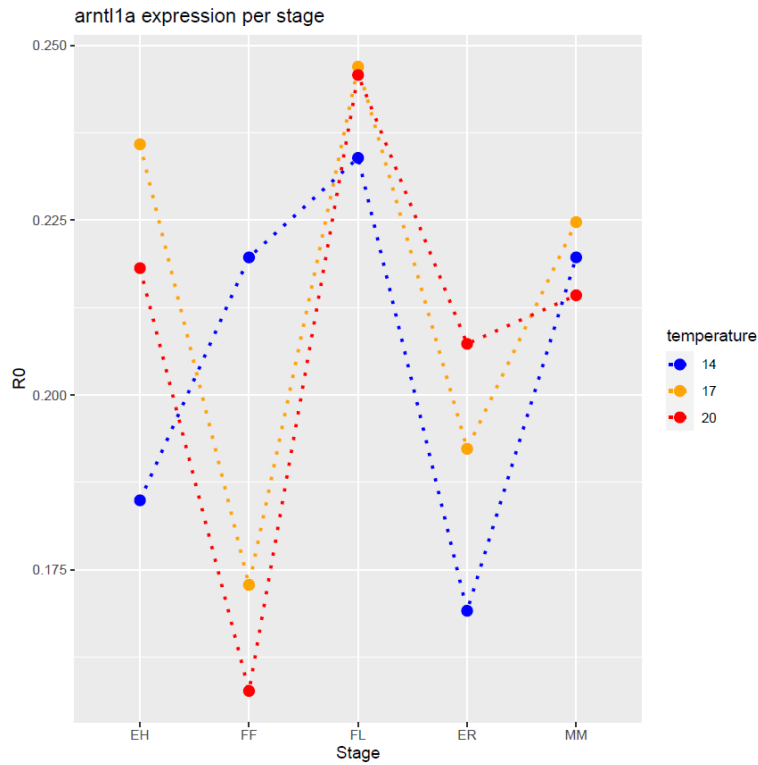
Ακόμη από τα διαγράμματα συσχετίσεων προκύπτουν και για αυτή τη σύγκριση κάποια ζεύγη με ισχυρές συσχετίσεις. Κάποια από αυτά είναι το *orn4a* / *cry3a* στους 17 και 23°C, *arn12* / *cry3a* στους 17°C καθώς και *per2* / *hry* στους 20 °C. Από αυτά τα ζεύγη φαίνεται πως το *cry3a* συμμετέχει και αλληλεπιδρά με αρκετά γονίδια και ρυθμίζονται από κοινού (Εικόνες 40-45).

Στο λαβράκι, αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων όσο γίνεται η μετάβαση των σταδίων στο σύνολο των γονιδίων φαίνεται να ακολουθούν ένα συγκεκριμένο μοτίβο στο οποίο κατά το πρώτο στάδιο της εκκόλαψης έχουν χαμηλή έκφραση στα δύο επόμενα στάδια η έκφραση αυξάνει στη συνέχεια μειώνεται στο τέλος της νυμφικής εκτροφής και στο στάδιο της μεταμόρφωσης αυξάνει και για τις τρεις θερμοκρασίες. Το πρότυπο αυτό μπορεί να εξηγηθεί με

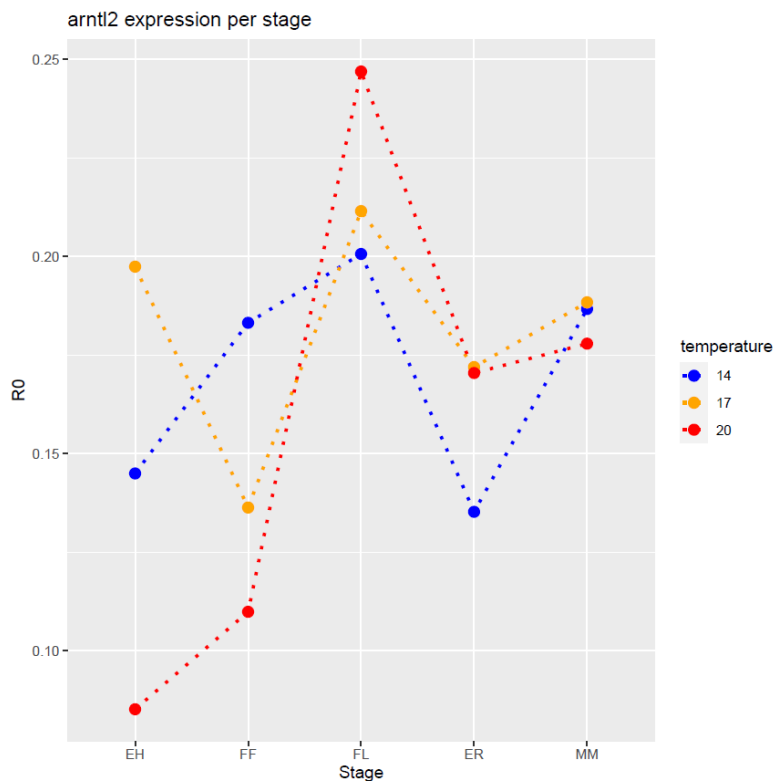
βάση την συσχέτιση του κερκαδικού ρυθμού με τον κυτταρικό κύκλο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Το *per2* (Εικόνα 97), όπως και στην τσιπούρα, φαίνεται να αποκλίνει από αυτό το πρότυπο κυρίως στα δύο τελευταία αναπτυξιακά στάδια όπου παρατηρείται αύξηση κατά το τελευταίο στάδιο της προνύμφης και μείωση στο στάδιο της μεταμόρφωσης, διαμορφώνοντας έτσι αντίθετο πρότυπο από τα *arntl1a* / *arntl2* (Εικόνα 98, 99 αντίστοιχα).



Εικόνα 97: πρότυπο έκφρασης του *per2* με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο



Εικόνα 98: πρότυπο έκφρασης του arntl1a με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο



Εικόνα 99: πρότυπο έκφρασης του arntl2 με βάση διάμεσο, στις συγκρίσεις όπου μεταβάλλεται το στάδιο

Επιπλέον, για το σύνολο των γονιδίων φαίνεται το στάδιο ΕΗ να συγκεντρώνει τις περισσότερες διαφορές καθώς είναι ένα κομβικό σημείο για την ρύθμιση και έναρξη της ρυθμικότητας. Ωστόσο, το στάδιο της κάμψης, όπως και στην τσιπούρα φαίνεται να είναι το πιο σταθερό και η έκφραση των γονιδίων να μην επηρεάζεται από τις μεταβολές το οποίο ενισχύεται και από το γεγονός ότι η μετάβαση από την προνύμφη στην ενήλικη μορφή είναι και η πιο ομαλή με βάση τις μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης. Αναφορικά με τις συσχετίσεις των γονιδίων και εδώ υπάρχουν κάποια ζεύγη όπως είναι το *arntl1a / arntl2* για το ΕΗ στάδιο για το σύνολο των θερμοκρασιών και το *clocka / nry* για τα στάδια FF, FL και MM. Τα γονίδια αυτά με βάση τον μοριακό μηχανισμό αλλά και τις ισχυρές συσχετίσεις που αναδείχθηκαν πιθανότατα ρυθμίζονται από κοινούς μηχανισμούς (Εικόνες 74-79).

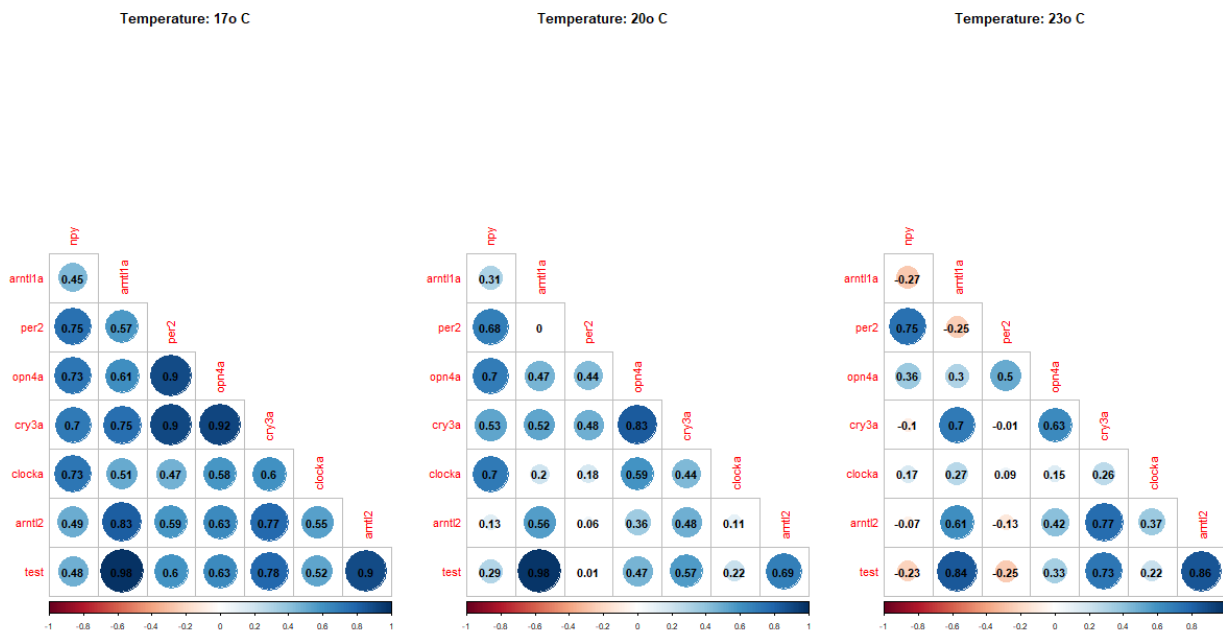
Για το σύνολο των ζευγαριών που προκύπτουν από τα διαγράμματα συσχέτισης τα κυρίαρχα μονοπάτια που εμπλέκονται στην από κοινού ρύθμιση των γονιδίων είναι δύο. Το mTOR και το MAPK μονοπάτι.

Σχετικά με το πρώτο, η μετάφραση του mRNA υπόκειται σε πολύπλοκους μηχανισμούς ρύθμισης. Μεταξύ αυτών, η χρονική ρύθμιση της μετάφρασης mRNA λαμβάνει χώρα σε καθημερινή βάση σε διάφορους ιστούς, όπως συντονίζεται από το κερκάδιο ρολόι και τις οδούς σηματοδότησης εξόδου του, όπως η σηματοδότηση mTOR. Με τη σειρά του, η ρυθμική σηματοδότηση mTOR ρυθμίζει σημαντικές λειτουργίες του ρολογιού, συμπεριλαμβανομένου του χρονισμού του, της απόκρισης σε σήματα συντονισμού, καθώς και το δίκτυο αλληλεπίδρασης μεταξύ των κερκάδιων ταλαντωτών. Η απορρύθμιση του μεταφραστικού ελέγχου συνδέεται με τη δυσλειτουργία του κερκάδιου ρολογιού (Cao R., 2018).

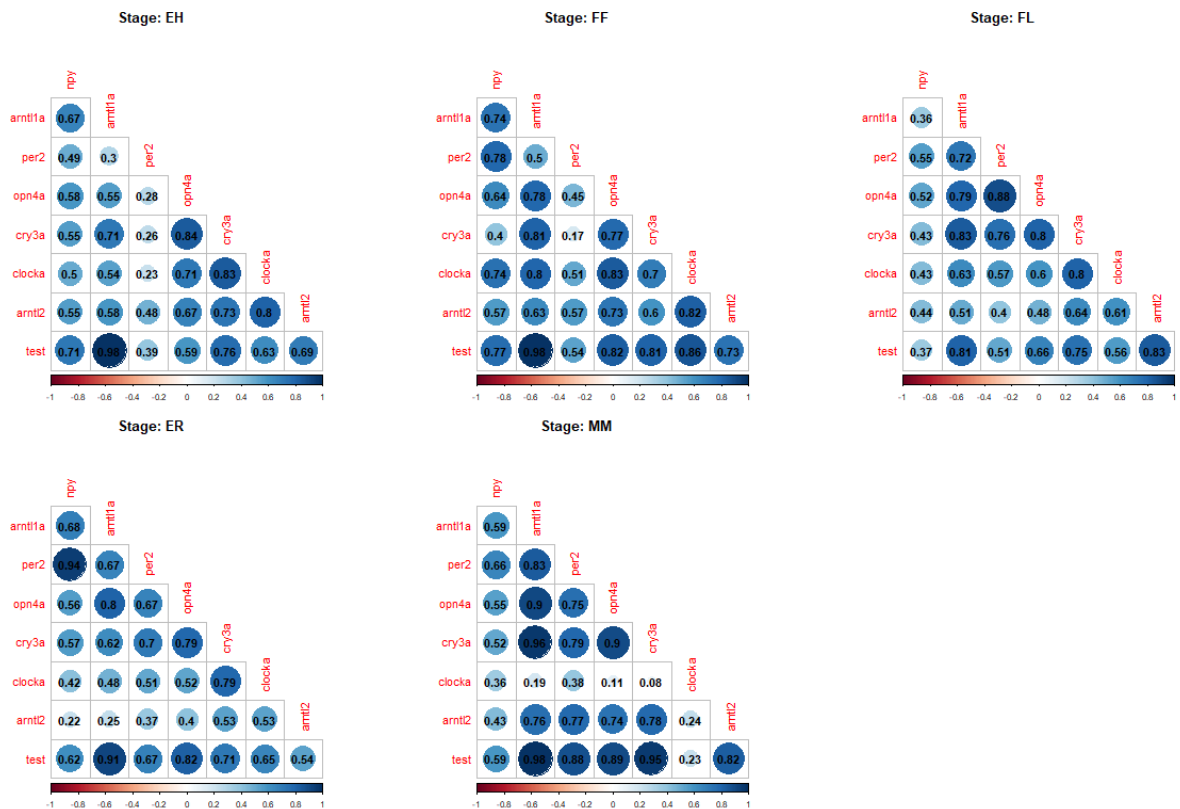
Σχετικά με το δεύτερο, αποτελεί την επικρατέστερη οδό που συνδέει την φωτοαντίληψη με την συμπαράσυρση του κερκαδικού ρολογιού. Σήματα που λαμβάνονται μέσω της αμφιβληστροειδο-υποθαλαμικής οδό, κυρίως μέσω των *orn4* και *cry3*, πυροδοτούν την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα υποδοχέα και έτσι ενεργοποιούν την οδό MAPK. Με τη σειρά του, η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού ενεργοποιητή, CREB (πρωτεΐνη δέσμευσης στοιχείων που ανταποκρίνεται σε cAMP), καθώς και γεγονότα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης έχουν προταθεί για να αντιπροσωπεύουν βασικά βήματα στην προκαλούμενη από το φως ενεργοποίηση των γονιδίων *per1* και 2, *arntl1* και 2 (Cermakian et al., 2002).

Στις εικόνες 100 - 103 φαίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων για το σύνολο των σταδίων ανά θερμοκρασία (δεν λαμβάνεται υπόψιν το κάθε στάδιο χωριστά) και οι συσχετίσεις των γονιδίων για το σύνολο των θερμοκρασιών ανά αναπτυξιακό στάδιο (δεν λαμβάνεται υπόψιν η κάθε θερμοκρασία χωριστά). Με βάση και αυτές τις συσχετίσεις παρατηρείται ένας κοινός μηχανισμός ρύθμισης των γονιδίων αυτών.

Τσιπούρα

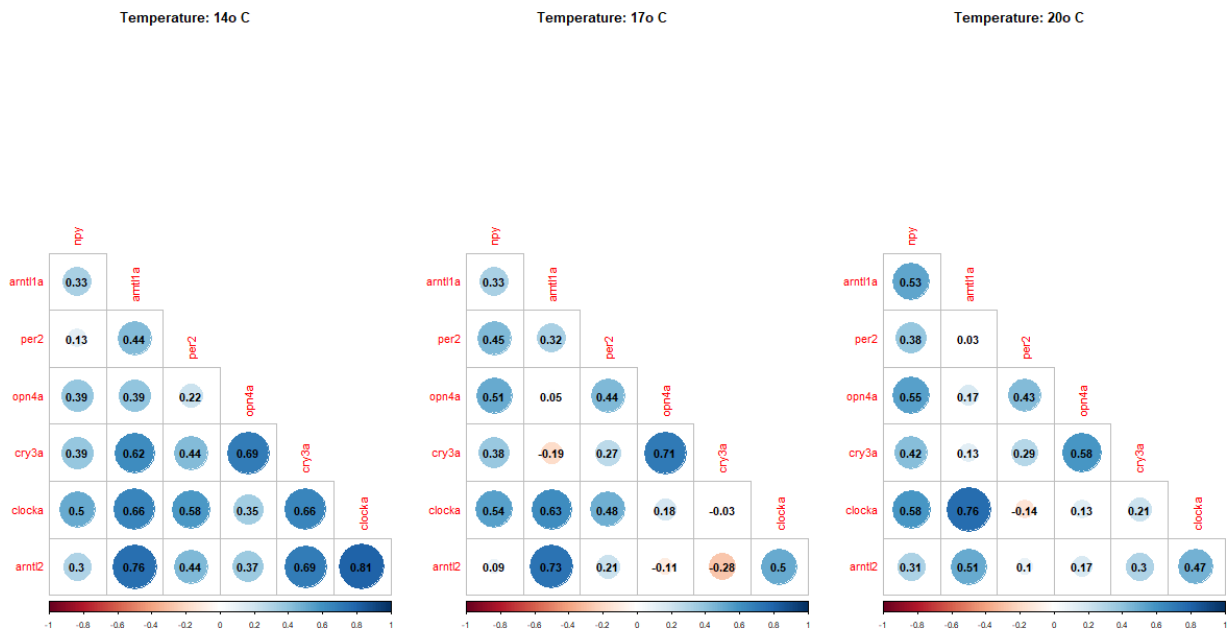


Εικόνα 100: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις θερμοκρασίες για το σύνολο των αναπτυξιακών σταδίων. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

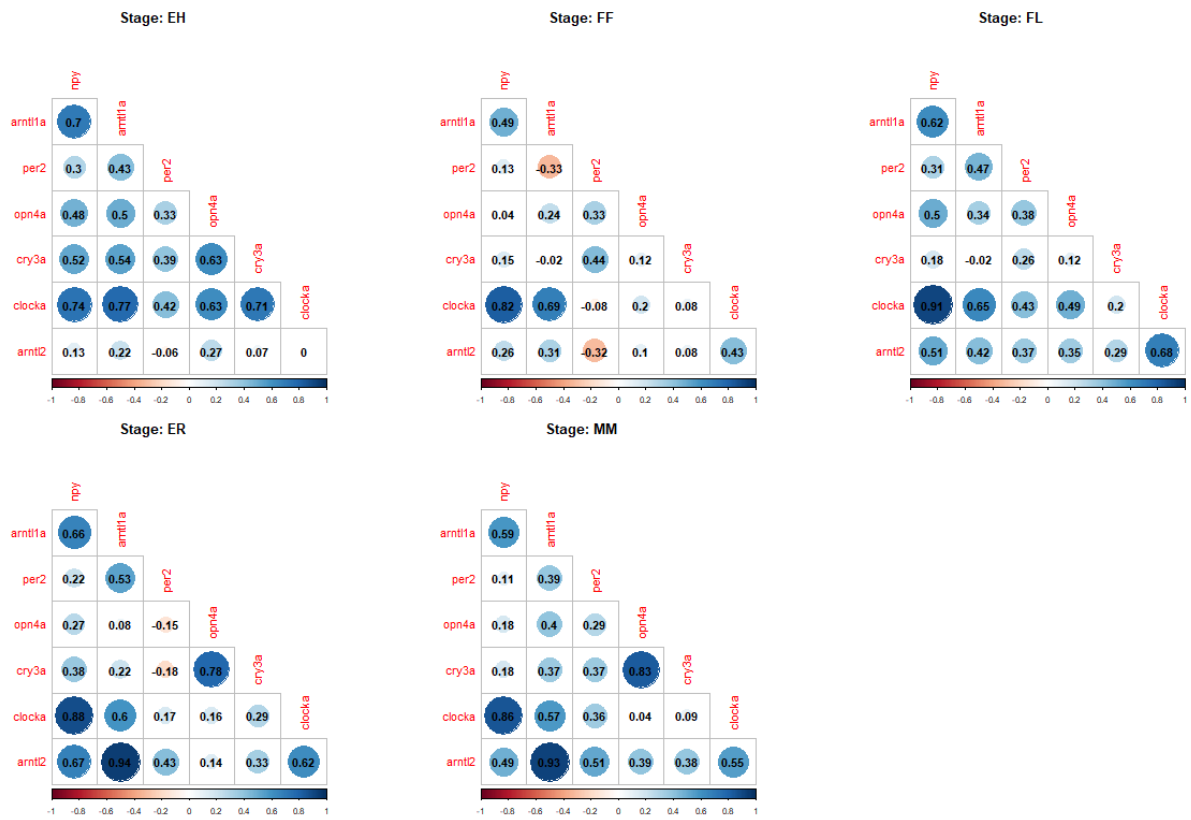


Εικόνα 101: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα πέντε αναπτυξιακά στάδια για το σύνολο των θερμοκρασιών. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

Λαβράκι



Εικόνα 102: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στις τρεις θερμοκρασίες για το σύνολο των αναπτυξιακών σταδίων. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης



Εικόνα 103: Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στα πέντε αναπτυξιακά στάδια για το σύνολο των θερμοκρασιών. Η ένταση του χρώματος υποδηλώνει το μέγεθος της συσχέτισης

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η κλιματική αλλαγή φαίνεται να επηρεάζει την σχέση μεταξύ της διάρκειας της ημέρας και της θερμοκρασίας προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας σε ένα δεδομένο γεωγραφικό πλάτος. Τα κίρκαδικά ρολόγια αποτελούν δομές υψηλής σημασίας για την διατήρηση της ομοιόστασης και φυσιολογικής λειτουργίας των οργανισμών (Hoegh-Guldberg, et al., 2018). Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στον πυρήνα του μοριακού μηχανισμού καθώς και ως σήματα εισόδου και εξόδου είναι χρήσιμος ώστε να προβλεφθούν οι πιθανές μεταβολές στη ρύθμιση του κίρκαδικού ρολογιού. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται η έκφραση των γονιδίων να επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την μετάβαση των σταδίων σε σύγκριση με τις μεταβολές των θερμοκρασιών. Επιπλέον, η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που έχουν καταλυτικό ρόλο στην έναρξη της ταλάντωσης, όπως το *clocka*, φαίνεται να παραμένει σταθερή. Ωστόσο, άλλα γονίδια όπως το *arntl1a* και *per2*, φαίνεται να επηρεάζονται από την θερμική καταπόνηση και η έκφραση τους μειώνεται. Αυτό που παρατηρείται επίσης, είναι πως ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο και τις απαιτήσεις που υπάρχουν σε αυτό ρυθμίζεται ανάλογα και η έκφραση των γονιδίων χωρίς να υπάρχει ένα συγκεκριμένο πρότυπο, επομένως μπορούμε να πούμε ότι η ρύθμιση είναι ειδική για κάθε αναπτυξιακό στάδιο.

Περαιτέρω πειραματικοί σχεδιασμοί που θα αφορούν τον προσδιορισμό γονιδίων που έχουν καταλυτικό αλλά και ρυθμιστικό ρόλο θα είναι χρήσιμες πληροφορίες για μια πιο σφαιρική γνώση της ρύθμισης του ρολογιού. Μια αρκετά χρήσιμη πληροφορία θα ήταν η λήψη δειγμάτων σε συγκεκριμένες ώρες του κύκλου ημέρας σκοταδιού με στόχο τον προσδιορισμό της ρυθμικότητας των γονιδίων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aral, F., Şahinöz, E., & Doğu, Z. (n.d.). 5 Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish. www.intechopen.com
2. Araújo, J. E., Madeira, D., Vitorino, R., Repolho, T., Rosa, R., & Diniz, M. (2018). Negative synergistic impacts of ocean warming and acidification on the survival and proteome of the commercial sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of Sea Research*, 139, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2018.06.011>
3. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 5, Issue 2, pp. 209–219). <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
4. Beaulé, C., Robinson, B., Lamont, E. W., & Amir, S. (2003). Melanopsin in the Circadian Timing System.
5. Biology, M., Animale, B., Li, M., Marine, B., & Date, F. (1991). *Marine Biology*. 371, 361–371.
6. Brander, K. M. (2007). Global fish production and climate change. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0702059104
7. Cao, R. (2018). mTOR signaling, translational control, and the circadian clock. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00367>
8. Cermakian, N., Pando, M. P., Thompson, C. L., Pinchak, A. B., Selby, C. P., Gutierrez, L., ... Sassone-Corsi, P. (2002). Light Induction of a Vertebrate Clock Gene Involves Signaling through Blue-Light Receptors and MAP Kinases. *Current Biology*, 12(10), 844–848. doi:10.1016/s0960-9822(02)00835-7
9. Chekhonin, E., Popov, E., Popov, Y., Gabova, A., Romushkevich, R., Spasennykh, M., & Zagranovskaya, D. (2018). High-Resolution Evaluation of Elastic Properties and Anisotropy of Unconventional Reservoir Rocks via Thermal Core Logging. *Rock Mechanics and Rock Engineering*, 51(9), 2747–2759. <https://doi.org/10.1007/s00603-018-1496-z>

10. China, V., & Holzman, R. (2014). Hydrodynamic starvation in first-feeding larval fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8083–8088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323205111>
11. Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
12. Daw, T., Adger, W., Brown, K., & Badjeck, M. (2009). Climate change and capture fisheries: potential impacts, adaptation and mitigation. In *Climate change implications for fisheries and aquaculture*.
13. Foulkes, N. S., Whitmore, D., Vallone, D., & Bertolucci, C. (2016). Studying the Evolution of the Vertebrate Circadian Clock: The Power of Fish as Comparative Models. In *Advances in Genetics* (Vol. 95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.05.002>
14. Frøland Steindal, I. A., & Whitmore, D. (2019). Circadian clocks in fish-what have we learned so far? In *Biology* (Vol. 8, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology8010017>
15. Geladakis, G., Kourkouta, C., Somarakis, S., & Koumoundouros, G. (2022). Developmental Temperature Shapes the Otolith Morphology of Metamorphosing and Juvenile Gilthead Seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Fishes*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/fishes7020082>
16. Hoegh-Guldberg O., Jacob D., Taylor M., Bindi M., Brown S., Camilloni I., Diedhiou A., Djalante R. et al. (Achlati M. listed as contributing author). (2018). Chapter 3: Impacts of 1.5°C global warming on natural and human systems. In: *Global Warming of 1.5 °C. An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5 °C above preindustrial levels and related global greenhouse gas emission pathways [...]. Special Report, Intergovernmental Panel on Climate Change, ISBN 978-92-9169-151-7, 175–311.*
17. Hirota T Fukada Y. 2016. Heat shock factors modulate circadian rhythms . In: Nakai A , editor. Heat shock factor . Japan : Springer . p. 197 – 209 .
18. Idda, M. L., Bertolucci, C., Vallone, D., Gothilf, Y., Sánchez-Vázquez, F. J., &

- Foulkes, N. S. (2012). Circadian clocks: Lessons from fish. *Progress in Brain Research*, 199, 41–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00003-4>
19. Islam, M. J., Kunzmann, A., & Slater, M. J. (2022). Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. In *Journal of the World Aquaculture Society* (Vol. 53, Issue 2, pp. 314–366). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jwas.12853>
20. Kasahara, M. (2007). The 2R hypothesis: an update. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 547–552). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.009>
21. Kendall, a. W., Ahlstrom, E. H., & Moser, H. G. (1981). Early Life Hisfory Stages of Fishes and Their Characters. *Ontogeny and Systematics of Fishes*, 1–12.
22. Kojetin, D. J., & Burris, T. P. (2014). REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 13, Issue 3, pp. 197–216). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4100>
23. Kourkouta, C., Printzi, A., Geladakis, G., Mitrizakis, N., Papandroulakis, N., & Koumoundouros, G. (2021). Long lasting effects of early temperature exposure on the swimming performance and skeleton development of metamorphosing Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88306-4>
24. Kulczykowska Ewa., Popek Wlodzimierz., Kapoor B.G., (2010). *Biological clock in fish*. Science Publishers
25. Lamb, T. D. (2020). Evolution of the genes mediating phototransduction in rod and cone photoreceptors. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100823>
26. Maulu, S., Hasimuna, O. J., Haambiya, L. H., Monde, C., Musuka, C. G., Makorwa, T. H., Munganga, B. P., Phiri, K. J., & Nsekanabo, J. D. M. (2021). Climate Change Effects on Aquaculture Production: Sustainability Implications, Mitigation, and Adaptations. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 5). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.609097>
27. Moreno, J. M., Jesus, T. F., Coelho, M. M., & Sousa, V. C. (2021). Adaptation and convergence in circadian-related genes in Iberian freshwater fish. *BMC Ecology and*

- Evolution, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01767-z>
28. Musilova, Z., Salzburger, W., & Cortesi, F. (2021). The Visual Opsin Gene Repertoires of Teleost Fishes: Evolution, Ecology, and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2021, 37, 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219>
29. Oster, H. (2020). The interplay between stress, circadian clocks, and energy metabolism. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 247, Issue 1, pp. R13–R25). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0124>
30. Ota, S. M., Kong, X., Hut, R., Suchecki, D., & Meerlo, P. (2021). The impact of stress and stress hormones on endogenous clocks and circadian rhythms. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 63). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100931>
31. 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(6), 487–504. <https://doi.org/10.1007/s004290050199>
32. Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., Thébaud, L., & Mugnier, C. (1993). Marine Fish Larvae Feeding: Formulated Diets or Live Prey? *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 211–224. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00010.x>
33. Prokkola, J. M., & Nikinmaa, M. (2018). Circadian rhythms and environmental disturbances - Underexplored interactions. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 221, Issue 16). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.179267>
34. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
35. Stuart-Smith, R. D., Bates, A. E., Lefcheck, J. S., Duffy, J. E., Baker, S. C., Thomson, R. J., Stuart-Smith, J. F., Hill, N. A., Kininmonth, S. J., Airoidi, L., Becerro, M. A., Campbell, S. J., Dawson, T. P., Navarrete, S. A., Soler, G. A., Strain, E. M. A., Willis, T. J., & Edgar, G. J. (2013). Integrating abundance and functional traits reveals new global hotspots of fish diversity. *Nature*, 501(7468), 539–542. <https://doi.org/10.1038/nature12529>
36. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., &

- Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
37. Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., & Foulkes, N. S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Letters*, 585(10), 1485–1494. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.007>
38. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). *BMC Bioinformatics*, 13(134).
39. Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodriguez, L., Blazquez, M., Ramos, J., Piferrer, F., & Zanuy, S. (2001). Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. In *Aquaculture* (Vol. 202, pp. 187–203). www.elsevier.com/locate/aqua-online
40. Zhdanova, I. V., & Reeb, S. G. (2005). Circadian Rhythms in Fish. In *Fish Physiology* (Vol. 24, Issue C, pp. 197–238). [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(05\)24006-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(05)24006-2)

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τσιπούρα

Πίνακας 1: τιμές p-value του Shapiro test

gene	p-value
<i>npy</i>	2.20E-16
<i>arntl1a</i>	2.81E-09
<i>per2</i>	6.47E-15
<i>opn4a</i>	2.20E-16
<i>cry3a</i>	4.99E-13
<i>clocka</i>	8.55E-13
<i>arntl2</i>	5.37E-14

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ανάλυσης Kruskal-Wallis για τις τρεις θερμοκρασίες

genes	p - value (FF)	p - value (FL)	p - value (MM)	p - value (EH)	p - value (ELR)
<i>npy</i>	0.003726	0.8715	0.08977	0.3143	0.004787
<i>arntl1a</i>	0.1477	0.2719	0.04731	0.08458	0.1099
<i>per2</i>	0.004633	0.4743	0.07096	0.1133	0.00707
<i>opn4a</i>	0.04008	0.6381	0.08887	0.003035	0.1926
<i>cry3a</i>	0.0359	0.4470	0.0449	0.0022	0.1245
<i>clocka</i>	0.0101	0.6624	0.4366	0.0182	0.0162
<i>arntl2</i>	0.2916	0.0536	0.0229	0.3294	0.1848

Πίνακας 3: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με αστερίσκο (*). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

EH	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
17 - 20	0.2081	0.2183	0.1365	0.0155	0.0281	0.3886	0.2622
17 - 23	0.0642	0.0142	0.1611	0.0004	0.0002	0.0049	0.0687
20 - 23	0.2398	0.0787	0.0185	0.1146	0.0558	0.0108	0.1980

FF	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
17 - 20	0.3360	0.0666	0.0271	0.0296	0.005527*	0.0352	0.2949
17 - 23	0.0030	0.3388	0.00059*	0.2644	0.0584	0.0936	0.1452

20 - 23	0.000854*	0.0355	0.0720	0.008745*	0.2165	0.001376*	0.0598
----------------	-----------	--------	--------	-----------	--------	-----------	--------

FL	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
17 - 20	0.3489	0.1224	0.3980	0.3178	0.1058	0.1829	0.012552*
17 - 23	0.5000	0.0605	0.1829	0.3178	0.2066	0.3026	0.021463*
20 - 23	0.3489	0.3491	0.1224	0.1716	0.3333	0.3491	0.4147

ER	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
17 - 20	0.0195*	0.1429	0.0634	0.4494	0.2787	0.1511	0.3779
17 - 23	0.2333	0.2205	0.1094	0.0661	0.1189	0.0698	0.0527
20 - 23	0.0007*	0.0181*	0.0008*	0.0581	0.0220*	0.0021*	0.0679

MM	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
17 - 20	0.0254*	0.0083*	0.0384	0.0148*	0.0092*	0.1882	0.0354
17 - 23	0.4736	0.0461	0.0161*	0.0896	0.0328	0.1063	0.0036*
20 - 23	0.0343	0.2641	0.3327	0.2242	0.3309	0.3476	0.1733

Πίνακας 4: αποτελέσματα ανάλυσης Kruskal-Wallis για τα στάδια

genes	p - value (17°C)	p - value (20°C)	p - value (23°C)
<i>npy</i>	2.43E-05	0.0002	0.0005
<i>arntl1a</i>	2.81E-05	0.0082	0.0054
<i>per2</i>	2.10E-06	7.68E-05	4.75E-05
<i>opn4a</i>	3.47E-06	0.0007	0.1679
<i>cry3a</i>	4.28E-05	0.0539	0.1825
<i>clocka</i>	3.16E-06	3.97E-05	6.98E-05
<i>arntl2</i>	2.19E-05	0.0110	0.1730

Πίνακας 5: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με κόκκινο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

17°C	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
EH - ER	0.0003	0.2885	0.0002	0.0002	0.0030	0.1767	0.3743
EH - FF	0.0032	0.3260	0.0042	0.0000	0.0052	0.1428	0.1965
ER - FF	0.1396	0.1703	0.1137	0.4487	0.3102	0.4967	0.3341

EH - FL	0.0231	0.0097	0.0000	0.0007	0.0138	0.3059	0.0245
ER - FL	0.0525	0.0638	0.4723	0.2674	0.2350	0.0881	0.0201
FF - FL	0.2605	0.0028	0.0795	0.2877	0.3929	0.0619	0.0026
EH - MM	0.0002	0.0078	0.1131	0.0173	0.2609	0.0001	0.0145
ER - MM	0.3617	0.0588	0.0070	0.0455	0.0146	0.0091	0.0127
FF - MM	0.2031	0.0020	0.0773	0.0376	0.0273	0.0037	0.0012
FL - MM	0.0743	0.5000	0.0027	0.1232	0.0565	0.0000	0.4440

20°C	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
EH - ER	8.12E-05	0.2150	1.88E-05	0.0021	0.0268	0.0870	0.1619
EH - FF	0.0255	0.2769	0.3305	1.05E-05	0.0018	0.0107	0.2280
ER - FF	0.0344	0.0836	0.0001	0.0802	0.1619	0.1729	0.0416
EH - FL	0.2238	0.0036	0.0012	0.0197	0.0329	0.4232	0.0829
ER - FL	0.0020	0.0273	0.1718	0.2441	0.4903	0.0659	0.3326
FF - FL	0.1301	0.0006	0.0045	0.0202	0.1642	0.0078	0.0176
EH - MM	0.0002	0.0397	0.0379	0.0019	0.1182	1.28E-05	0.0051
ER - MM	0.4047	0.1673	0.0095	0.4825	0.2280	0.0021	0.0572
FF - MM	0.0572	0.0095	0.0905	0.0870	0.0416	0.0282	0.0005
FL - MM	0.0040	0.1612	0.0935	0.2310	0.2432	1.02E-05	0.1373

23°C	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
EH - ER	0.0011	0.0009	0.0001	0.0644	0.0244	0.0145	0.0068
EH - FF	0.3196	0.0603	3.99E-01	1.84E-02	0.3626	0.0078	0.2061
ER - FF	0.0005	0.0925	0.0008	2.48E-01	0.0148	0.3463	0.0715
EH - FL	0.0564	0.0014	0.0004	0.0428	0.3280	0.0189	0.1043
ER - FL	0.0849	0.4935	0.4005	0.4004	0.0725	0.4869	0.1300
FF - FL	0.0268	0.1018	0.0022	0.3349	0.2250	0.3393	0.3543
EH - MM	0.0013	0.0012	0.0004	0.0152	0.1597	0.0449	0.0786
ER - MM	0.4830	0.4856	4.00E-01	0.2427	0.1822	7.08E-05	0.1662
FF - MM	0.0006	0.0934	0.0022	0.4951	0.1025	4.36E-05	0.3016
FL - MM	0.0853	0.4798	0.5000	0.3331	0.2971	0.0001	0.4395

Λαβράκι

Πίνακας 6: p-values των γονιδίων που προέκυψαν από το Shapiro test

γονίδιο	p-value
<i>npy</i>	1.61E-07
<i>arntl1a</i>	7.97E-06
<i>per2</i>	1.53E-02
<i>opn4a</i>	7.88E-04

<i>cry3a</i>	9.63E-05
<i>clocka</i>	3.68E-06
<i>arntl2</i>	5.07E-14

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ανάλυσης Kruskal-Wallis για τις τρεις θερμοκρασίες

genes	p-value (FF)	p-value (FL)	p-value (MM)	p-value (EH)	p-value (ELR)
<i>npy</i>	0.8723	0.0314	0.7881	0.0122	0.0631
<i>arntl1a</i>	0.0033	0.9109	0.6251	0.0731	0.4584
<i>per2</i>	3.47E-05	0.0226	0.0029	0.8234	0.0068
<i>opn4a</i>	0.3062	0.1383	0.9936	0.0145	0.4971
<i>cry3a</i>	0.0032	0.3630	0.4134	0.0073	0.1447
<i>clocka</i>	0.2587	0.1505	0.0287	0.0068	0.0183
<i>arntl2</i>	0.0207	0.3412	0.5923	0.0048	0.1203

Πίνακας 8: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με αστερίσκο (*). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

EH	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
14 - 17	0.0020*	0.0117*	0.4911	0.0047*	0.0019*	0.0136*	0.0064*
14 - 20	0.0180*	0.0815	0.2904	0.0074*	0.0060*	0.0011*	0.2726
17 - 20	0.2794	0.2313	0.2920	0.4900	0.4309	0.1510	0.0013*

FF	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
14 - 17	0.3023	0.0099	8.33E-05*	0.4289	0.0009*	0.1323	0.0365
14 - 20	0.4242	0.0005	2.65E-05*	0.0777	0.3662	0.0549	0.0031*
17 - 20	0.3763	0.1589	0.3596	0.1065	0.0035*	0.3056	0.1628

FL	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
14 - 17	0.0352	0.3350	0.0306	0.0285	0.2788	0.0503	0.1711
14 - 20	0.0055*	0.3949	0.1890	0.0786	0.1946	0.0444	0.0756
17 - 20	0.2697	0.4317	0.0033*	0.2894	0.0797	0.4922	0.3379

ER	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
14 - 17	0.0095*	0.1264	0.0478	0.1186	0.1039	0.0052*	0.0251
14 - 20	0.0938	0.1568	0.0007*	0.2871	0.0263	0.0100*	0.0629
17 - 20	0.1522	0.4460	0.0678	0.2676	0.2488	0.4080	0.3349

MM	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
----	------------	----------------	-------------	--------------	--------------	---------------	---------------

14 - 17	0.2616	0.2429	0.0490	0.4948	0.0941	0.2553	0.2899
14 - 20	0.2810	0.1708	0.0653	0.4663	0.1826	0.0062*	0.1532
17 - 20	0.4748	0.3919	0.0003*	0.4580	0.3288	0.0236*	0.3062

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανάλυσης Kruskal-Wallis για τα στάδια

gene	p - value (14 °C)	p-value (17 °C)	p-value (20 °C)
<i>npv</i>	4.62E-06	0.0049	0.0103
<i>arntl1a</i>	9.33E-05	0.2651	0.1501
<i>per2</i>	2.54E-09	8.29E-05	2.66E-06
<i>opn4a</i>	8.59E-06	3.16E-06	4.97E-05
<i>cry3a</i>	7.95E-08	8.01E-06	0.0010
<i>clocka</i>	4.79E-07	0.0182	0.0053
<i>arntl2</i>	8.90E-06	0.0031	0.0017

Πίνακας 10: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με κόκκινο χρώμα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

14 °C	<i>npv</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
EH - ER	0.0062	0.4189	2.12E-08	0.0055	0.0115	0.0379	0.4789
EH - FF	1.25E-07	0.0295	0.0290	2.14E-08	3.15E-06	0.0019	0.0441
ER - FF	0.0010	0.0074	0.0000	0.0003	0.0045	0.0957	0.0203
EH - FL	0.0062	0.0536	0.0027	3.40E-04	1.45E-06	0.0005	0.0119
ER - FL	0.5000	0.0172	0.0009	0.1594	0.0025	0.0366	0.0035
FF - FL	0.0010	0.3732	0.1498	0.0077	0.4252	0.3139	0.2590
EH - MM	6.96E-05	0.0147	1.15E-05	0.0099	0.0087	3.61E-06	0.0065
ER - MM	0.0486	0.0034	0.1418	0.4685	0.3951	0.0007	0.0019
FF - MM	0.1132	0.3252	0.0026	0.0006	0.0157	0.0226	0.1592
FL - MM	0.0486	0.2259	0.0334	0.1582	0.0100	0.0600	0.3449

17 °C	<i>npv</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
EH - ER	0.0233	0.2731	0.0002	0.0071	0.0409	0.0491	0.1216
EH - FF	0.0001	0.0559	0.0002	4.44E-07	2.52E-07	0.4653	0.0010
ER - FF	0.0291	0.1350	0.4690	0.0030	0.0001	0.0399	0.0156
EH - FL	0.0360	0.3438	0.0019	2.35E-05	0.0049	0.0042	0.4269
ER - FL	0.4488	0.1382	0.2608	0.0292	0.1582	0.1234	0.0738
FF - FL	0.0265	0.0162	0.2855	0.2327	0.0062	0.0023	0.0002
EH - MM	0.0958	0.3639	9.77E-07	0.0304	0.0351	0.0321	0.2485
ER - MM	0.2220	0.3877	0.0995	0.2583	0.4690	0.4127	0.2928
FF - MM	0.0039	0.0825	0.0865	0.0003	0.0002	0.0243	0.0035
FL - MM	0.2738	0.2071	0.0311	0.0060	0.1767	0.1717	0.1767

20 °C	<i>npy</i>	<i>arntl1a</i>	<i>per2</i>	<i>opn4a</i>	<i>cry3a</i>	<i>clocka</i>	<i>arntl2</i>
EH - ER	0.0472	0.4528	0.0002	0.0163	0.0539	0.4357	0.0274
EH - FF	0.0004	0.0924	3.55E-07	6.53E-06	0.0009	0.0406	0.4083
ER - FF	0.0181	0.0397	0.0412	0.0031	0.0300	0.0103	0.0217
EH - FL	0.0036	0.2186	0.0402	0.0001	0.0003	0.1014	0.0009
ER - FL	0.1070	0.2100	0.0123	0.0190	0.0127	0.0867	0.0694
FF - FL	0.1894	0.0055	4.17E-05	0.2385	0.3809	0.0001	0.0003
EH - MM	0.0325	0.4828	0.0002	0.0186	0.1155	0.2218	0.0150
ER - MM	0.4163	0.4214	0.4579	0.4737	0.3077	0.1278	0.3806
FF - MM	0.0295	0.0593	0.0329	0.0025	0.0088	0.1146	0.0103
FL - MM	0.1513	0.1576	0.0161	0.0161	0.0031	0.0062	0.1197