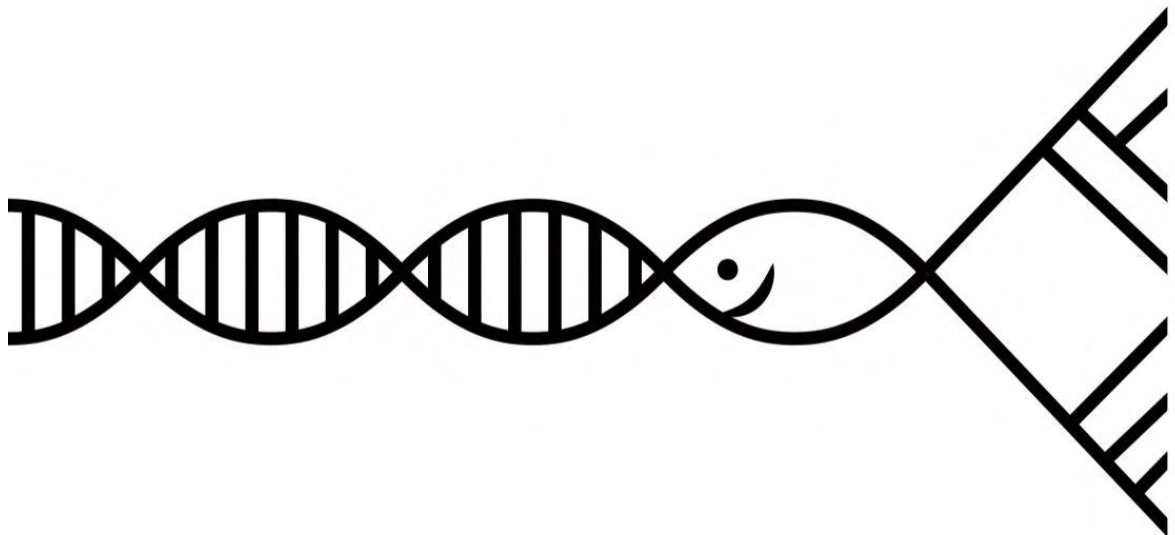




**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ & ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ**  
**ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

Επίπεδα πολυμορφισμού του γονιδίου NDUFS8A στο  
είδος *Dicentrarchus labrax*



---

**Βόντζου Νίκη**

**Λάρισα 2018**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ & ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Επίπεδα πολυμορφισμού του γονιδίου NDUFS8A στο  
είδος *Dicentrarchus labrax*

Polymorphism level of the nuclear OXPHOS gene  
NDUFS8A of species *Dicentrarchus labrax*

**Βόντζου Νίκη**

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

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Αικατερίνη Μούτου:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Ζήσης Μαμούρης:** Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Κωνσταντίνος Σταμάτης:** Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή μου την κ. Μούτου, τον κ. Μαμούρη και τον κ. Σταμάτη για τη συμβολή τους στην επίτευξη της διπλωματικής εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Τσιπουρλιάνο Ανδρέα για την πολύτιμη βοήθειά του, με τον οποία είχα την χαρά και τύχη να συνεργαστώ καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία, την θετική ενέργεια και το χιούμορ τους που αποτέλεσαν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της ευχάριστης παραμονής μου στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το λαβράκι είναι ένα από τα σημαντικότερα ψάρια της Ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας. Εκτός από το οικονομικό του ενδιαφέρον, το λαβράκι είναι, επίσης, γνωστό για την ικανότητα του να προσαρμόζεται σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το γονιδίωμα του Ευρωπαϊκού λαβρακιού μελετάται εντατικά τα τελευταία χρόνια και ορισμένες μελέτες έχουν προσπαθήσει να συλλέξουν πληροφορίες με σκοπό το γενετικό έλεγχο της αναπαραγωγής και ανάπτυξης του είδους με τη χρήση γονιδιωματικών τεχνολογιών. Ωστόσο, μέχρι στιγμής, είναι διαθέσιμο το γονιδίωμα ενός ατόμου του είδους, και επομένως, υπάρχει ανάγκη διερεύνησης της ποικιλομορφίας του γονιδιώματος σε επίπεδο πληθυσμών. Προς αυτήν την κατεύθυνση, στην παρούσα μελέτη ακολουθήθηκε ο εντοπισμός και η αξιολόγηση του επιπέδου πολυμορφισμού του πυρηνικού διπλασιασμένου γονιδίου οξειδωτικής φωσφορυλίωσης NDUF58A του συμπλόκου I στο λαβράκι. Όπως είναι ευρέως γνωστό, η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί την κύρια διεργασία παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο, συνεπώς παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση και πλαστικότητα του υπό μελέτη είδους.

Αρχικά, ενισχύθηκαν τέσσερις αλληλουχίες του γονιδίου, ειδικότερα η 5'UTR και τα πρώτα τρία εξόνια του γονιδίου. Τα προϊόντα ενίσχυσης επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο SSCP, και τα πρότυπα δείγματα που προέκυψαν στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης οδήγησε στον εντοπισμό δύο πολυμορφικών θέσεων, οι οποίες όμως δεν φάνηκαν να παρουσιάζουν κάποιο λειτουργικό ρόλο. Από τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο NDUF58A είναι ένα υψηλά συντηρημένο γονίδιο σε ένα ιδιαίτερα ποικιλόμορφο είδος, πράγμα που θέτει την ανάγκη περαιτέρω έρευνας τόσο διπλασιασμένων όσο και μη διπλασιασμένων πυρηνικών γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης του συμπλόκου I στο λαβράκι.

## ABSTRACT

The sea bass is an important species for the European aquaculture. Except for its financial role, it is also well-known for its adaptive skills in various environmental conditions. The sea bass genome has been thoroughly studied in the last few years and some studies have been associated with the genetic control of reproduction and growth of the species through the development of genomic technologies. However, so far there is a unique genome available in UCSC database, therefore there is significant need for estimating and evaluating the sea bass genome's diversity. This study was held to this direction in order for the genetic variation of the nuclear duplicated OXPHOS gene *NDUFS8A* in *Dicentrarchus labrax* to be estimated. It is common knowledge oxidative phosphorylation is the main process of energy production, thus it plays a key role in the survival and plasticity of the organism. The first step of the study was the amplification of the first four exons of *NDUFS8A* and subsequently the process of the PCR products by SSCP. The different band patterns were sent for Sanger sequencing and the processing of the resulting sequences revealed two polymorphisms. However, the polymorphisms were not detected in known functional regions and did not result in any change of the amino acid sequence. As a result *NDUFS8A* was characterized as highly conserved in bass fish. On account of these results, there is considerable need for further analysis of both duplicated and non-duplicated nuclear OXPHOS genes of bass fish's complex I in order for the exact role and evolution of these genes to be detected.

# Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 Οι Τελεόστεοι .....	10
1.1.1 Διπλασιασμός γονιδιωμάτων στους τελεόστεους .....	10
1.1.2 Γονιδιωματικές ανακατάξεις και η «μοίρα» των διπλασιασμένων γονιδίων .....	11
1.1.3 Η εξελικτική προέλευση των τελεόστεων .....	14
1.2 Το λαβράκι.....	16
1.2.1 Το γονιδίωμα του λαβρακιού.....	17
1.2.2 Το γονιδίωμα του λαβρακιού ως μοντέλο μελέτης εξελικτικών μηχανισμών .....	17
1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση .....	19
1.3.1 Συνεξέλιξη .....	20
1.3.2 Η εξέλιξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μετόζωα .....	21
1.3.3 Η εξέλιξη των γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα ψάρια.....	22
1.4 Σύμπλοκο I.....	23
1.4.1 Δομή του συμπλόκου I .....	24
1.4.2 Η αρθρωτή δομή του συμπλόκου I.....	26
1.4.3 Εξέλιξη του συμπλόκου I.....	26
1.5 Η υπομονάδα NDUFS8 του συμπλόκου I.....	28
1.5.1 Υποξία και NDUFS8.....	29
1.6 Σκοπός.....	31
2.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων .....	33
2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	33
2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.....	35
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-SSCP .....	36
2.5 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO <sub>3</sub> ) – Silver staining .....	37
2.6 Αλληλούχηση.....	38
2.7 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης.....	39
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
3.1 Οπτικοποίηση του απομονωμένου DNA των υπό μελέτη δειγμάτων λαβρακιού .....	41
3.2 Ενίσχυση γενετικών τόπων του γονιδίου NDUFS8A .....	41
3.3 Εύρεση διαφορετικών προτύπων μέσω SSCP.....	43
3.4 Αλληλούχηση.....	45
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	48

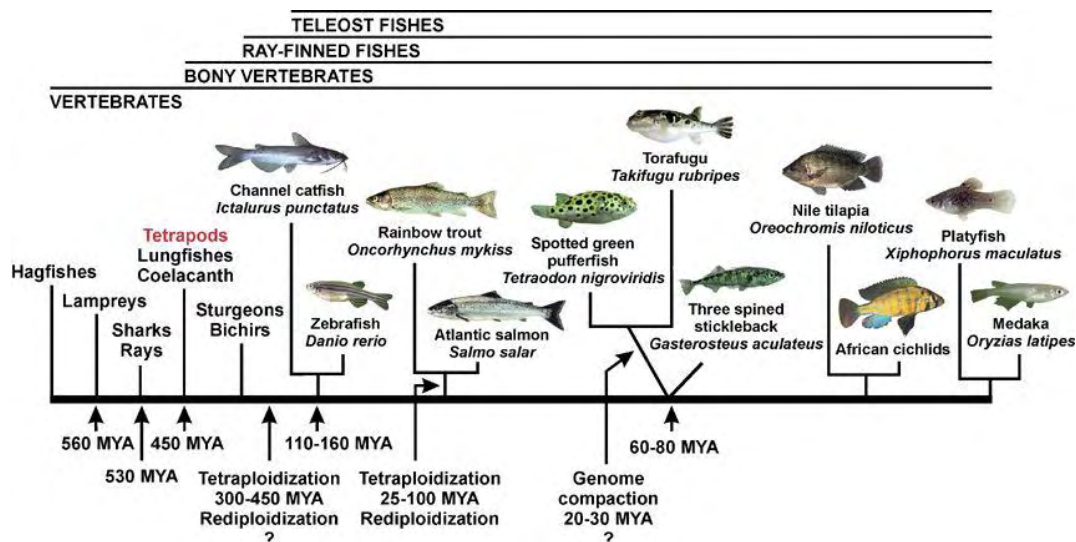
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... 53



# ***1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## 1.1 Οι Τελεόστεοι

Τα ψάρια αποτελούν μια εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα σπονδυλωτών υδρόβιων οργανισμών, οι οποίοι συνήθως αναπνέουν μέσω βράγχων, καθώς και φέρουν πτερύγια και λέπια. Περιλαμβάνουν τα άγναθα, τους χονδριχθύες και τους οστεϊχθύες (Nelson, 1994). Με περισσότερα από 23.500 είδη, οι ακτινοπτερύγιοι αποτελούν πάνω από το 95% των ειδών ψαριών, και κατά προσέγγιση το 50% των σπονδυλωτών. Πάνω από το 99.8% των ακτινοπτερύγιων ανήκουν στους τελεόστεους (Εικόνα 1) (Volf, 2005). Τα ψάρια δεν αποτελούν μια μονοφυλετική ομάδα, ξεχωριστή από τα τετράποδα. Αντίθετα, οι οστεϊχθύες θεωρούνται ότι σχετίζονται περισσότερο με τα τετράποδα παρά με τα άγναθα ή τους χονδριχθύες (Nelson, 1994)



Εικόνα 1 : Η γενεαλογία των ψαριών

Αυτό σημαίνει ότι ο άνθρωπος και άλλα θηλαστικά της ξηράς, πιθανότατα, να μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο-ψάρι περίπου 360-450 εκατομμύρια χρόνια πριν. Τα ψάρια παρουσιάζουν ένα αξιοσημείωτο επίπεδο βιοποικιλότητας, το οποίο φαίνεται να έχει αντίκτυπο στη μορφολογία, οικολογία, συμπεριφορά, καθώς και στο γονιδίωμα των ψαριών (Nelson, 1994). Αυτό τους καθιστά εξαιρετικά ελκυστικά για τη μελέτη πολλών εξελικτικών ζητημάτων. Η ποικιλότητα των ψαριών είναι σημαντική για τον άνθρωπο σε οικονομικό, οικολογικό και εμπορικό επίπεδο, ενώ η διατήρηση αυτής της ποικιλότητας είναι σημαντική πρόκληση για τις επόμενες γενιές. Περισσότερες πληροφορίες από διάφορα είδη ψαριών μέσω ερευνητικών προγραμμάτων αλληλούχησης έχουν ρίξει φως στην οργάνωση και εξέλιξη των γονιδιωμάτων ψαριών και πλέον επιτρέπουν την προσέγγιση των εξελικτικών μηχανισμών, στους οποίους και έγκειται η τεράστια αυτή ποικιλομορφία (Volf, 2005).

### 1.1.1 Διπλασιασμός γονιδιωμάτων στους τελεόστεους

Οι αναλύσεις του γονιδιακού περιεχομένου και μεγέθους των οικογενειών γονιδίων διαφορετικών ειδών ζώων υποδηλώνουν ότι δύο διπλασιασμοί γονιδιωμάτων έλαβαν χώρα

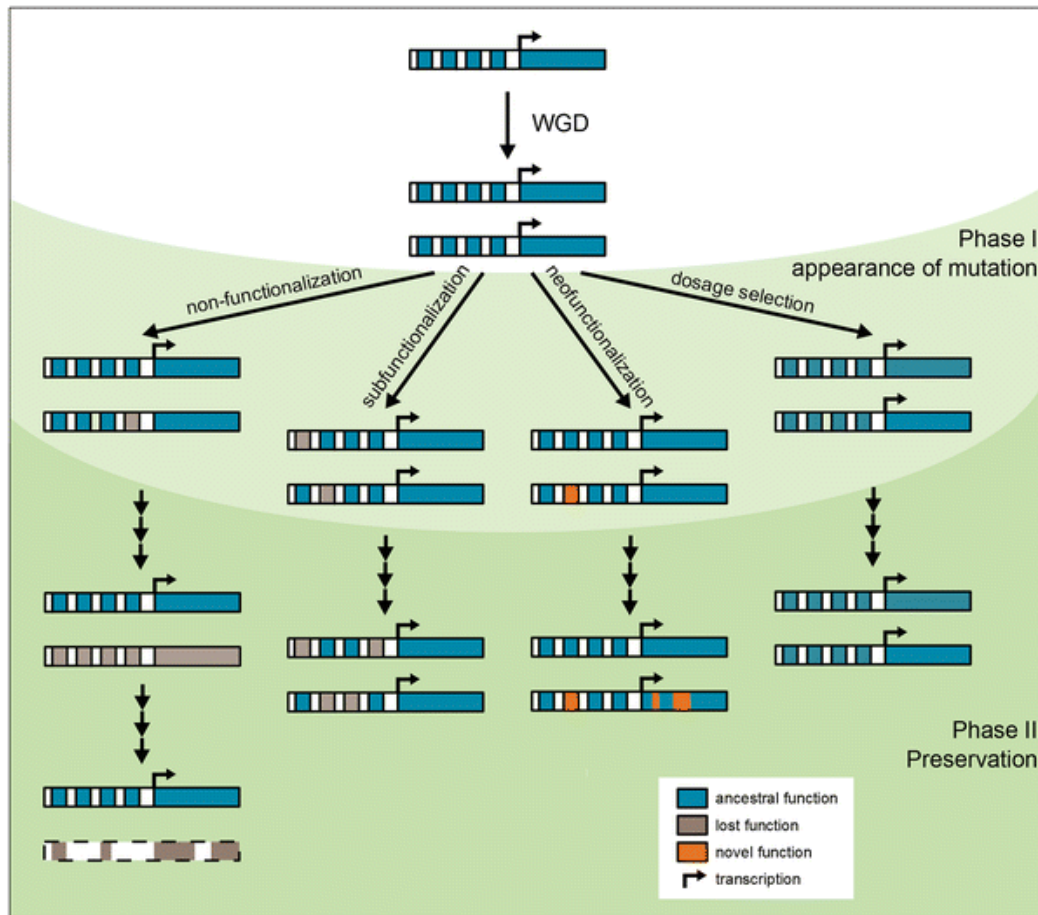
κατά την εξελικτική προέλευση των σπονδυλωτών (γνωστή ως υπόθεση 2R) (Meyer & Schartl, 1999). Νέες πληροφορίες μέσω προγραμμάτων αλληλούχησης διαφορετικών ειδών τελεόστεων αποκάλυψαν ορισμένα χαρακτηριστικά των γονιδιωμάτων που μπορεί να έχουν παίξει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη των ψαριών. Υπάρχουν δεδομένα ότι ένας γύρος διπλασιασμού έλαβε χώρα κατά την πρώιμη εξέλιξη των ακτινοπτερυγίων (υπόθεση 3R), και ότι εκατοντάδες ζεύγη διπλασιασμένων γονιδίων που δημιουργήθηκαν, επικράτησαν για εκατοντάδες χρόνια κατά την εξέλιξη. Η σύγκριση δεδομένων από αλληλουχίες γονιδιωμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί αλλά και από μελλοντικές αλληλουχίες, καθώς και συμπληρωματικές έρευνες σε άλλα είδη, θα επιτρέψουν την προσέγγιση των μοριακών και εξελικτικών μηχανισμών που διέπουν την ποικιλομορφία των γονιδιωμάτων στα ψάρια. Μία τέτοια προσέγγιση θα μπορούσε να συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση της γονιδιακής εξέλιξης και λειτουργίας στον άνθρωπο και σε άλλα σπονδυλωτά (Volf, 2005).

Οι πρώτες ενδείξεις για τον γύρο διπλασιασμού στα ψάρια προέκυψαν από το γεγονός ότι πολλά γονίδια τετραπόδων έχουν δύο ορθόλογα στους τελεόστεους (Wittbrodt et al. 1998). Ωστόσο, αρχικά ήταν ασαφές, εάν αυτά τα ορθόλογα είναι αποτέλεσμα ενός γύρου διπλασιασμού ολόκληρων γονιδιωμάτων ή μικρότερων διπλασιασμών σε επίπεδο χρωμοσωμάτων ή τμημάτων χρωμοσωμικών περιοχών. Διάφορα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι ο διπλασιασμός ολόκληρων γονιδιωμάτων, πράγματι, έλαβε χώρα στη ρίζα της φυλογένεσης των τελεόστεων: από νωρίς, οι σημαντικές από άποψη ανάπτυξης και καλά διατηρημένες οικογένειες γονιδίων Hox προκάλεσαν ενδιαφέρον (Glasauer & Neuhaus Stephan, 2014). Μετά την ταυτοποίηση πολυάριθμων γονιδίων Hox σε ήδη γνωστά τετράποδα (Misof and Wagner, 1996) και οι συστηματικές μελέτες των γονιδίων Hox, αποκάλυψαν εφτά οικογένειες γονιδίων Hox στο ψάρι-ζέβρα (Amores et al. 1998), σε αντίθεση με τις τέσσερις οικογένειες γονιδίων Hox που εντοπίστηκαν στα τετράποδα (Glasauer & Neuhaus, 2014).

### **1.1.2 Γονιδιωματικές ανακατατάξεις και η «μοίρα» των διπλασιασμένων γονιδίων**

Ο ρυθμός γονιδιωματικής αναδιάταξης αυξάνεται μετά από έναν γύρο διπλασιασμού γονιδιωμάτων (Comai, 2005). Υπάρχουν τουλάχιστον δύο λόγοι για τους οποίους μπορεί να συμβεί κάτι τέτοιο. Πρώτον, ο διπλασιασμός ολόκληρων γονιδιωμάτων δημιουργεί πολλές ομόλογες περιοχές, οι οποίες παρέχουν υπόστρωμα για ανασυνδυασμό και συνεπώς αυξάνουν τον ρυθμό αναδιάταξης. Για παράδειγμα, ο διπλασιασμός γονιδιωμάτων διπλασιάζει το μέγεθος των οικογενειών γονιδίων, αυξάνοντας την πιθανότητα για εκτοπικές ανταλλαγές (Sémon & Wolfe, 2007). Ομοίως, διπλασιάζει και άλλες ομόλογες αλληλουχίες, όπως επαναλαμβανόμενα στοιχεία, τα οποία είναι γνωστό ότι προάγουν ανακατατάξεις: για παράδειγμα, η ατελής ανταλλαγή αλληλουχιών που επιτελείται μέσω των μεταθετών στοιχείων Alu κατά τη μείωση, έχει συσχετιστεί με διάφορες ανθρώπινες ασθένειες (Deininger et al. 2003). Εναλλακτικά, η αύξηση των ρυθμών αναδιάταξης μπορεί να ευνοηθεί επιλεκτικά, εάν οδηγεί σε δομική απόκλιση των χρωμοσωμάτων και συνεπώς, διευκολύνει τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Τα αντίγραφα που δημιουργούνται από τον διπλασιασμό γονιδιωμάτων μπορεί να είναι επιβλαβή επειδή

μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα χρωμοσωμικής μη-αποκατάστασης (Comai, 2005). Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναμένεται ότι ο ρυθμός αναδιάταξης αυξάνεται άμεσα μετά από έναν γύρο διπλασιασμού και στη συνέχεια μειώνεται και πάλι καθώς εξελίσσεται η διπλοειδία (Sémon & Wolfe, 2007).



**Εικόνα 2 :** Η «μοίρα» των διπλασιασμένων γονιδίων μετά από έναν διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος.

Ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο πανομοιότυπων αντιγράφων κάθε γονιδίου. Τα αντίγραφα αυτά μπορούν να ακολουθήσουν διαφορετικές πορείες (Εικόνα 2):

- Απώλεια λειτουργίας: Επιβλαβείς μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο αντίγραφα μπορούν, τελικά, να οδηγήσουν σε απώλεια της έκφρασης (ψευδογονίδια). Μεταλλάξεις συνεχίζουν να συσσωρεύονται, μέχρις ότου τα δομικά χαρακτηριστικά του γονιδίου εκλείψουν πλήρως.
- Μερική απώλεια λειτουργίας: Συμπληρωματικές εκφυλιστικές μεταλλάξεις σε παράλογα γονίδια οδηγούν στη διατήρηση και των δύο αντιγράφων.
- Απόκτηση νέας λειτουργίας: Ένα από τα δύο γονίδια αποκτά μία νέα λειτουργία.
- Επιλογή δόσης: Ορισμένα γονίδια παραμένουν αμετάβλητα, όσον αφορά τα αντίγραφά τους μετά τον διπλασιασμό (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Μια παρατήρηση που έγινε τόσο στο είδος *P. tetraurela* όσο και στο είδος *X. laevis* ήταν ότι τα γονίδια που εξελίσσονται αργά πριν από τον διπλασιασμό του γονιδιώματος είναι πιθανότερο να διατηρηθούν (Gout et al. 2010). Σύμφωνα με αυτό το εύρημα, οι Sémon και

Wolfe υποστήριξαν ότι τα αργά εξελισσόμενα γονίδια μπορεί να τείνουν να διατηρηθούν, επειδή παρέχουν το κατάλληλο χρονικό περιθώριο, ώστε η απόκτηση μερικής ή νέας λειτουργίας να λάβει χώρα, πριν την εμφάνιση επιβλαβών μεταλλάξεων (Semon & Wolfe, 2008). Ακόμη μία παρατήρηση που τείνει προς την ίδια κατεύθυνση είναι ότι καλά συντηρημένα γονίδια στο *rufferfish*, με ομόλογα γονίδια σε ασπόνδυλα, χαρακτηρίζονται από πολλά παράλογα (Kassahn et al. 2009).

Επιπλέον, η διατήρηση ορισμένων διπλασιασμένων γονιδίων έγκειται στη λειτουργία τους (Πίνακας 1) (Brunet, et al. 2006). Το τεράστιο εύρος των λειτουργιών ανάπτυξης και σηματοδότησης ενισχύει την άποψη ότι ο διπλασιασμός γονιδιωμάτων πιθανόν να έπαιξε κάποιο ρόλο στην εγκαθίδρυση της τεράστιας ποικιλομορφίας κατά την ανάπτυξη των ψαριών (Vogel 1998).

**Πίνακας 1 :** Λειτουργική ταξινόμηση των διπλασιασμένων γονιδίων στο γένος *Tetraodon*

Ontology	GO Term	Observed Gene Number	Enrichment/ Depletion	P Value
Biological process	Cell communication	43	×1.79	$3.7 \times 10^{-06}$
	Organismal physiological process	24	×2.04	$1.2 \times 10^{-04}$
	Death	10	×2.86	$9.5 \times 10^{-04}$
	Locomotory behavior	6	×3.21	0.0054
	System development	9	×2.14	0.012
	Mesoderm development	3	×5.15	0.012
	Tissue development	5	×2.67	0.023
	Regulation of cellular process	29	×1.24	0.037
	Response to stimulus	19	×1.35	0.039
	Regulation of physiological process	28	×1.22	0.042
	Metabolism	54	÷ 1.31	$4.4 \times 10^{-05}$
Molecular function	Cellular physiological process	77	÷ 1.06	0.050
	Pattern binding	6	×3.16	0.0059
	Neurotransmitter binding	4	×3.74	0.013
	Structural constituent of eye lens	2	×8.42	0.014
	Ion binding	30	×1.33	0.017
	Carbohydrate binding	6	×2.53	0.018
	Channel or pore class transporter activity	4	×2.59	0.045
	Catalytic activity	41	÷ 1.28	0.0045
	Nucleic acid binding	13	÷ 1.54	0.018
	Oxidoreductase activity	4	÷ 2.23	0.027
	Ligase activity	1	÷ 4.87	0.029
	Hydrolase activity	13	÷ 1.45	0.031
	Nucleotide binding	13	÷ 1.43	0.034
	Cellular component	Connexon complex	3	×8.22
Extracellular matrix (sensu Metazoa)		9	×2.54	0.0038
Membrane		35	×1.28	0.017
Membrane-bound organelle		39	÷ 1.30	0.0029
Intracellular organelle		45	÷ 1.23	0.0051
	Intracellular	58	÷ 1.13	0.015

**Υποσημείωση:** Ορθόλογα γονίδια του *Tetraodon* στον άνθρωπο

Τα διπλασιασμένα γονίδια που διατηρούνται σε διπλή δόση, συχνά κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με περισσότερες από τις συνηθισμένες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και για πρωτεΐνες που λειτουργούν σε σύμπλοκα (Hakes et al. 2007). Αντιπροσωπευτικές κατηγορίες τέτοιων γονιδίων περιλαμβάνουν ριβοσωμικές πρωτεΐνες, πρωτεϊνικές κινάσες, και μεταγραφικούς παράγοντες (Glasauer & Neuhauss, 2014). Μελετώντας και διακρίνοντας τις λειτουργίες από διπλασιασμένα και μη διπλασιασμένα γονίδια σε πέντε είδη τελεόστεων, παρατηρήθηκε ότι ένας αριθμός λειτουργικών γονιδίων εμπλουτίστηκε σημαντικά από παράλογα γονίδια τα οποία προέκυψαν από τον διπλασιασμό

γονιδιωμάτων στα ψάρια (Kassahn et al. 2009). Τα γονίδια σχετίζονται με κανάλια ιόντων ή μεταφορείς ηλεκτρονίων. Η μεταφορά ιόντων είναι απαραίτητο να ρυθμίζεται αυστηρά σε κάθε κύτταρο (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Σύμφωνα με την υπόθεση της γονιδιακής ισορροπίας, όσον αφορά μακρομοριακά σύμπλοκα, η διατήρηση της σωστής γονιδιακής ισορροπίας είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του (EdgerJ & Pires, 2009). Η μειωμένη ή αυξημένη έκφραση των υπομονάδων ενός συμπλόκου μπορεί να επάγει την μη λειτουργική συναρμολόγηση του συμπλόκου (Veitia et al. 2008). Η απώλεια ή το κέρδος γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες ενός συμπλόκου απαντώνται είτε με αντίστροφη αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση των αντιγράφων του γονιδίου είτε με την αντίστοιχη αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση όλων των υπόλοιπων γονιδίων του συμπλόκου, ώστε να διατηρηθεί η σωστή ισορροπία (EdgerJ & Pires, 2009). Εάν ένα συστατικό του συμπλόκου υπερεκφράζεται, τότε η υπερβολική παραγωγή των υπόλοιπων συστατικών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της στοιχειομετρικής ισορροπίας. Στην διαδικασία αυτή μπορεί, επίσης, να εμπλέκεται και η εναλλαγή των ρυθμών αποσύνθεσης των mRNA (Veitia et al. 2008).

Η αμοιβαία απώλεια διαφορετικών παράλογων γονιδίων μεταξύ δύο στενά συνδεδεμένων ειδών μπορεί να οδηγήσει σε υβριδική ασυμβατότητα, και να μειώσει την βιωσιμότητα και γονιμότητα των υβριδίων (Scannell et al. 2006). Αυτές οι υβριδικές ασυμβατότητες δημιουργούν φραγμούς μεταξύ των ειδών και μία ισχυρή δύναμη εξάπλωσης, η οποία φαίνεται να ευθύνεται για την γρήγορη ειδογένεση σε ζύμες, τελεόστεους και αγγειόσπερμα ύστερα από διπλασιαμούς γονιδιωμάτων (Soltis & Soltis 2004). Η συσχέτιση της βιοποικιλότητας με τους διπλασιασμούς γονιδιωμάτων είναι ιδιαίτερα εμφανής κατά τη σύγκριση πολυπλοειδών οργανισμών με οργανισμούς από γειτονικά είδη που στερούνται διπλασιασμούς γονιδιωμάτων κατά την γενεαλογία τους. Για παράδειγμα, οι τελεόστεοι, επωφελούμενοι του 3R, αποτελούν τη μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη ομάδα σπονδυλωτών (~22,000 είδη), ενώ γειτονικά είδη βασικών ακτινοπτερυγίων χαρακτηρίζονται από ολιγάριθμα υφιστάμενα είδη (Van de Peer, 2004).

### **1.1.3 Η εξελικτική προέλευση των τελεόστεων**

Παρόλο που η πολυπλοειδία πολλές φορές οδηγεί σε ένα εξελικτικό τέλμα, φαίνεται ότι πολυπλοειδείς οργανισμοί μερικές φορές παρουσιάζουν εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι των αντίστοιχων διπλοειδών (Glasauer & Neuhauss, 2014). Ειδικότερα, ορισμένοι πολυπλοειδείς οργανισμοί θεωρούνται πιο ανθεκτικοί σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο κίνδυνος εξαφάνισής τους (Fawcett et al. 2009). Οι ταχείες γονιδιωματικές και επιγενετικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα ύστερα από έναν διπλασιασμό γονιδιωμάτων (Osborn et al. 2003), πιθανότατα να επιτρέπουν τη προσαρμογή των πολυπλοειδών ταχύτερα απ' ότι των διπλοειδών. Επιπρόσθετα, οι πολυπλοειδείς οργανισμοί θεωρούνται ότι έχουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε μεταλλάξεις, πράγμα που σημαίνει ότι τα πλεονάζοντα αντίγραφα των γονιδίων μπορούν να καλύψουν προσωρινά την επίδραση των επιβλαβών μεταλλάξεων στα παράλογα τους (Otto & Whitton, 2000). Οι διπλασιασμοί γονιδιωμάτων έχουν επίσης προταθεί ότι διευκολύνουν άμεσα την

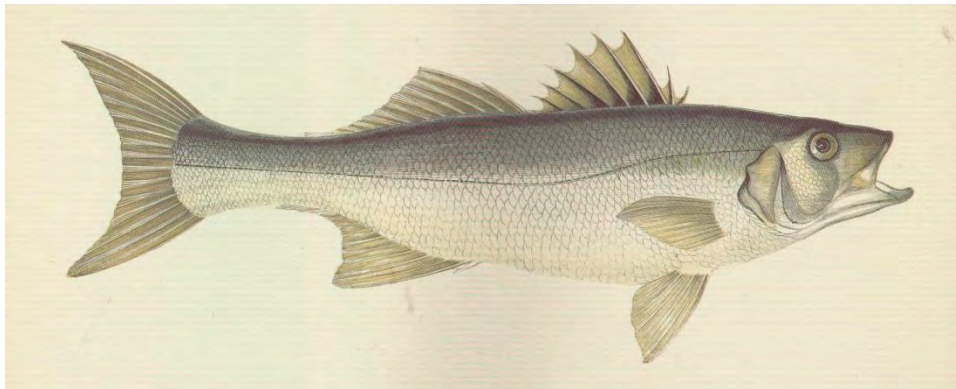
ειδογένεση, μέσω αμοιβαίας απώλειας γονιδίων, όπου διαφορετικά παράλογα χάνονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς, οδηγώντας τελικά σε γενετική απομόνωση και ειδογένεση αυτών των πληθυσμών (Scannell et al. 2006). Συνοπτικά, η αυξημένη φαινοτυπική μεταβλητότητα επιτρέπει στα πολυπλοειδή να επιβιώσουν σε περιβαλλοντικές συνθήκες που δεν ευνοούν τους διπλοειδείς προγόνους τους. Είναι επίσης γνωστό ότι η πολυπλοειδία διευκολύνει την αυτο-γονιμοποίηση και το σχηματισμό ασεξουαλικά αναπαραγόμενων ειδών (απομικτικά), τα οποία χαρακτηρίζονται από επιλεκτικό πλεονέκτημα, όταν οι σεξουαλικοί σύντροφοι είναι σπάνιοι (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Ωστόσο, υπάρχει ένα μεγάλο χρονικό πλαίσιο μεταξύ του 3R και της «έκρηξης» των τελεόστεων, η οποία σύμφωνα με απολιθώματα δεν εμφανίστηκε μέχρι τις Κρητιδικές και Τριτογενείς περιόδους, περίπου 150 εκατομμύρια χρόνια πριν. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να υποδείξει ότι ο διπλασιασμός γονιδιωμάτων δεν αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα για την ταχεία εξάπλωση των τελεόστεων. Επιπλέον, η δυνατότητα για φαινοτυπική ενίσχυση μέσω του διπλασιασμού γονιδιώματος ακυρώνεται εάν δεν υπάρχουν οικοθέσεις όπου οι καινούριοι φαινότυποι να πλεονεκτούν. Σε σταθερά οικοσυστήματα, οι νεοσχηματισμένοι πολυπλοειδείς οργανισμοί πιθανόν δεν είναι σε θέση να ανταγωνιστούν τους ιδιαίτερα προσαρμοσμένους κατοίκους των υπαρχόντων οικοθέσεων, συμπεριλαμβανομένων και των διπλοειδών προγόνων τους. Επομένως, η διαθεσιμότητα των οικοθέσεων ή των διαταραγμένων οικοσυστημάτων θα μπορούσε να αποτελέσει τον καθοριστικό παράγοντα για την επιβίωση και την μακροπρόθεσμη εξελικτική επιτυχία ενός διπλασιασμού γονιδιωμάτων. Οι μαζικές εξαφανίσεις αποτελούν τα πιο δραστηρικά γεγονότα, μέσω των οποίων παλιοί και νέοι βιότοποι γίνονται διαθέσιμοι για επικοισμό. Διπλασιασμοί γονιδιωμάτων κοντά σε αυτές τις εξαφανίσεις πιθανόν συνεισφέρουν στην εξάπλωση των σπονδυλωτών. Η αλληλούχηση περισσότερων γονιδιωμάτων και η ανάπτυξη εργαλείων τα οποία θα μπορούν να εντοπίσουν γεγονότα πολυπλοειδίας, πιθανόν να αποκαλύψουν τη συσχέτιση μεταξύ πολυπλοειδίας και εξελικτικών αλλαγών, η οποία μέχρι τώρα παραμένει άγνωστη. Η μελέτη γονιδίων τα οποία διατηρούνται μετά από έναν γύρο διπλασιασμού, και οι αλληλεπιδράσεις τους σε επίπεδο συστημάτων, μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με το γιατί τα πολυπλοειδή είδη συχνά μπορεί να εμφανίζουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα έναντι των αντίστοιχων διπλοειδών ειδών (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Συνοψίζοντας, υπάρχουν καλοί λόγοι να πιστεύεται ότι ο διπλασιασμός γονιδιωμάτων στα ψάρια είναι σημαντικός για την εγκαθίδρυση της πολυπλοκότητας των τελεόστεων. Ωστόσο το χρονικό περιθώριο ανάμεσα στον διπλασιασμό και την φάση ειδογένεσης, συνιστά ότι ο διπλασιασμός των γονιδιωμάτων δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας της βιοποικιλότητας των τελεόστεων. Οι οικολογικές αλλαγές, καθώς και οι προσαρμογή σε αυτές, είχαν, επίσης, μεγάλο αντίκτυπο. Ο γύρος διπλασιασμού πιθανότατα, ώθησε τους τελεόστεους σε διαφοροποίηση, όταν χρειάστηκε, ακόμη και μετά από δεκάδες εκατομμύρια χρόνια. Με άλλα λόγια, ο διπλασιασμός ολόκληρων γονιδιωμάτων των τελεόστεων έθεσε επιτυχώς το στάδιο της προσαρμογής σε οικολογικές μεταπτώσεις (Glasauer & Neuhauss, 2014).

## 1.2 Το λαβράκι

Το λαβράκι (Εικόνα 3) *Dicentrarchus labrax* είναι ψάρι της οικογένειας των Μορονίδων, που απαντάται στην Μεσόγειο και στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού. Το λαβράκι ανήκει στους γονοχωριστικούς τελεόστεους και απαντάται στον βορειοανατολικό Ατλαντικό, στη Μεσόγειο και Μαύρη θάλασσα (Εικόνα 4) (Pickett & Pawson 1994). Ζει σε ρηχά, παράκτια ύδατα, εκβολές ποταμών, λιμνοθάλασσες και λιμάνια, κινούμενο σε βαθύτερα νερά (έως και 100 μέτρα βάθος) καθώς μεγαλώνει. Αν και μπορεί να ζήσει σε νερά κάτω των 5 ° C, οι θερμοκρασίες που αναζητά είναι πάνω από τους 10 ° C και φτάνει ακόμη και τους 15 ° C κατά το πρώτο έτος της ζωής του (Kelley 1988). Ωτοκεί σε ανοικτά νερά αργά το χειμώνα - νωρίς την άνοιξη, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος. Τα αυγά τους εκκολάπτονται σε 4 με 9 ημέρες, και τα νεαρά ψάρια μετακινούνται παράκτια στον πρώτο μήνα τους, προς τα θερμότερα νερά, ειδικά στις εκβολές ποταμών (Pickett & Pawson 1994). Το φύλο παραμένει αδιαφοροποίητο για μεγάλη περίοδο: η διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα μεταξύ 128 και 250 ημερών μετά την γονιμοποίηση (Saillant et al. 2003). Η καταγραφή των αναλογιών φύλου στα λαβράκια άγριων πληθυσμών είναι σπάνια. Εμφανίζουν ισορροπημένη φυλετική αναλογία (Saillant et al. 2003), περίσσεια θηλυκών ή περίσσεια αρσενικών ατόμων (Arias 1980).



**Εικόνα 3 :** Το λαβράκι

Το ευρωπαϊκό λαβράκι (Εικόνα 3) είναι ένα σημαντικό είδος αλιείας και υδατοκαλλιέργειας στις ακτές της Μεσογείου και του Ατλαντικού της Ευρώπης και της Βόρειας Αφρικής (Εικόνα 4). Η βιομηχανική παραγωγή του έχει αυξηθεί σταθερά τις τελευταίες δύο δεκαετίες και το 2008 έφτασε τουλάχιστον 105.900 μετρικούς τόνους. Η ανάγκη τροφοδοσίας ενός αυξανόμενου πληθυσμού, παράλληλα με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για υγιεινά τρόφιμα και η κατάρρευση των άγριων αλιευτικών αποθεμάτων, προσδίδουν στην υδατοκαλλιέργεια πρωταρχική σημασία (Naylor & Burke, 2005). Μέχρι σήμερα, η εντατικοποίηση της καλλιέργειας ψαριών στόχευε σε μεγάλο βαθμό στην επιλογή ταχύτερων ρυθμών αύξησης και σε καλύτερους λόγους μετατροπής των ιχθυοτροφών.





Εικόνα 4: Χάρτης κατανομής του λαβρακιού

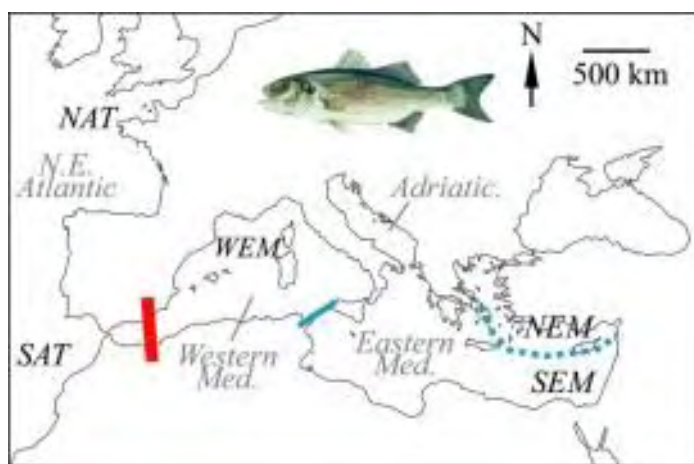
### 1.2.1 Το γονιδίωμα του λαβρακιού

Εκτός από το οικονομικό του ενδιαφέρον, το *D. labrax* είναι, επίσης, γνωστό για την ικανότητα του να προσαρμόζεται σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Kuhl et al. 2011). Το είδος αυτό εντοπίζεται σε λιμνοθάλασσες και περιβάλλοντα των εκβολών ποταμών, όπου οι μεταβολές των φυσικοχημικών παραγόντων όπως η αλατότητα, η θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο ή το φορτίο ρύπων μπορεί να είναι σημαντικές (Kelley, 1998). Τέτοιες περιβαλλοντικές παραλλαγές συνιστούν σοβαρά αβιοτικά εμπόδια που θα μπορούσαν να επηρεάσουν σημαντικά την σωστή βιολογική λειτουργία, όπως την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Για τους παραπάνω λόγους, το γονιδίωμα του ευρωπαϊκού λαβρακιού έχει μελετηθεί εντατικά τα τελευταία χρόνια (Whitaker et al. 2006). Αρκετές μελέτες έχουν επιχειρήσει να αποκτήσουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον γενετικό έλεγχο της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης αυτού του είδους, χρησιμοποιώντας διάφορες γονιδιωματικές τεχνολογίες (Martins et al. 2007). Ωστόσο, μέχρι στιγμής υπάρχει ένα μοναδικό γονιδίωμα αναφοράς για το λαβράκι. Η αλληλούχηση περισσότερων γονιδιωμάτων αναμένεται και παραμένει καθοριστική για την ανακάλυψη ποσοτικών χαρακτηριστικών που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την υδατοκαλλιέργεια και τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν για τη βελτίωση της παραγωγής λαβρακιού. Επιπλέον, η μελέτη γονιδιωμάτων περισσότερων ατόμων θα επιτρέψει την ανακάλυψη νέων βιολογικών δεικτών που θα μπορούσαν να παρέχουν πληροφορίες για το πως το λαβράκι έχει προσαρμοστεί σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Kuhl et al. 2011).

### 1.2.2 Το γονιδίωμα του λαβρακιού ως μοντέλο μελέτης εξελικτικών μηχανισμών

Το λαβράκι αποτελεί μοντέλο για εξελικτικές μελέτες σε θαλάσσια ψάρια φυσικών και καλλιεργούμενων πληθυσμών (Volckaert et al. 2008). Στην περιοχή κατανομής του, το είδος δομείται σε τρεις κύριους μεταπληθυσμούς: τον ατλαντικό, τον δυτικό και ανατολικό μεσογειακό, διαχωρισμένους από διακριτά όρια σύμφωνα με τη γονιδιακή ροή (Benharrat et al. 1983) (Εικόνα 5). Γενετική ομοιογένεια κυριαρχεί στους πληθυσμούς του Ατλαντικού

και της δυτικής Μεσογείου (Garcia de León et al. 1997), ενώ ο λιγότερο μελετημένος πληθυσμός της ανατολικής μεσογείου φαίνεται πιο πολυμορφικός (Bahri-Sfar et al. 2000). Ο ατλαντικός και μεσογειακός πληθυσμός του είδους αντιπροσωπεύουν δύο διακριτές γενεαλογίες, οι οποίες υβριδίζονται στην Αλβανική θάλασσα. Η περιγραφή των γενωμικών παραλλαγών που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο διαφορετικών γενεαλογιών έχει σημαντικά αποτελέσματα στην κατανόηση των εξελικτικών δυνάμεων που διαδραματίζονται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των θαλάσσιων ειδών. Επιπλέον, μια λεπτομερής εικόνα της γονιδιωματικής διακύμανσης εντός και μεταξύ των γενεαλογικών σειρών θα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τον προσανατολισμό της υδατοκαλλιέργειας και θα βοηθήσει στη διαχείριση της διατήρησης των πληθυσμών λαβρακιού (Tine et al. 2014).



**Εικόνα 5:** Επισκόπηση της γονιδιακής ροής στους πληθυσμούς του λαβρακιού. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει τον διαχωρισμό μεταξύ του Ατλαντικού και μεσογειακού πληθυσμού. Το μπλε βέλος δείχνει την γενετική διαφοροποίηση μεταξύ του ανατολικού και δυτικού Μεσογειακού πληθυσμού με βάση πυρηνικούς δείκτες. Τα διακοπτόμενο μπλε βέλος δείχνει την περαιτέρω διαφοροποίηση των ανατολικών μεσογειακών μεταπληθυσμών σε βόριο και νότιο (Guinand et al. 2017).

Επιπρόσθετα, το ευρωπαϊκό λαβράκι παρέχει ένα ενδιαφέρον μοντέλο για την κατανόηση των εξελικτικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ειδογένεση. Αναπαραγωγικά εμπόδια μειώνουν τη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών του ατλαντικού και μεσογειακού λαβρακιού. Η έρευνα των Tine et al. (2014) αποκάλυψε σημαντικές πτυχές της γενετικής αρχιτεκτονικής της διαφοροποίησης μεταξύ αυτών των δύο γενεαλογιών, όπως η δυσανάλογη χαρτογράφηση των γονιδιωματικών νησίδων της διαφοροποίησης εντός των περιοχών χαμηλού ανασυνδυασμού. Οι γενωμικές νησίδες στο λαβράκι δεν είναι απλώς μια παρεμπόδιση συνέπεια της μειωμένης ποικιλομορφίας σε περιοχές χαμηλού ανασυνδυασμού, αλλά και του προϊόντος της μειωμένης ροής των γονιδίων σε αυτές τις περιοχές. Επιπλέον, ορισμένες γενωμικές νησίδες υψηλής διαφοροποίησης παρατηρούνται και σε περιοχές με μεγάλη ποικιλομορφία. Επομένως, το γονιδιωματικό τοπίο της διαφοροποίησης των λαβρακιών πιθανότατα προκύπτει από την επιλεκτική μείωση της απόκλισης στις γονιδιωματικές περιοχές με υψηλά ποσοστά ανασυνδυασμού (Tine et al. 2014).

### 1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η κύρια κυτταρική λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι η παραγωγή ATP μέσω της οξείδωσης των μεταβολικών καυσίμων στον κύκλο του κιτρικού οξέος και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα NADH και FADH<sub>2</sub> λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων του συμπλόκου I (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q) και του συμπλόκου II (οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτόχρωμα c), τα οποία μεταφέρονται μέσω του συμπλόκου III στο σύμπλοκο IV, όπου το μοριακό οξυγόνο αποτελεί τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίων δημιουργεί μια πρωτονιακή διαβάθμιση κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και συνάμα με τη λειτουργία του συμπλόκου V πραγματοποιείται η σύνθεση του ATP από το ADP και το P<sub>i</sub>. Στα θηλαστικά, η διαδικασία είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη σε μεταγραφικό επίπεδο, με τον μιτοχονδριακό μεταφραστικό μηχανισμό να είναι υπεύθυνος για τη σύνθεση 13 καταλυτικών υδρόφοβων πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Ωστόσο, περισσότερες από 70 πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια και αφού εισέλθουν στο κυτοσόλιο, μεταφέρονται στην εξωτερική και εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από καλά συντηρημένους μοριακούς συνοδούς και πρωτεϊνικά συστατικά του συμπλόκου TOM/TIM (Ljubicic et al. 2010). Συνεπώς, η συνολική διεργασία έγκειται στην συζευγμένη λειτουργία του πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος, η οποία περιλαμβάνει εκατοντάδες γονίδια που ρυθμίζουν την έκφραση, λειτουργία, μεταφορά και συναρμολόγηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και ενζυμικών υπομονάδων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Smits et al. 2010).

Καθένα από τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελείται από πολλαπλές υπομονάδες και κάθε υπομονάδα μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο σημαντική για τη βασική καταλυτική δράση του συμπλόκου. Τα γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης χωρίζονται σε βασικά και μη βασικά, όπου τα βασικά γονίδια κωδικοποιούν υπομονάδες που διατηρούν δομική, λειτουργική ομολογία, καθώς και ομολογία αλληλουχίας με προκαρυωτικά συστήματα. Για παράδειγμα, σε αντίθεση με το σύμπλοκο I του σθθρώπου, το οποίο αποτελείται από 43 υπομονάδες, το βακτηριακό σύμπλοκο I αποτελείται από 14 υπομονάδες (Zhang et al. 2013). Αυτές οι 14 υπομονάδες έχουν ομόλογα στο ανθρώπινο σύμπλοκο I, και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως βασικές υπομονάδες. Αυτές περιλαμβάνουν επτά πυρηνικά γονίδια (*NDUFS1-3*, *NDUFS7-8*, and *NDUFV1-2*) και επτά μιτοχονδριακά (*MT-ND1-6*, *MT-ND4L*) (Janssen et al. 2006).

Στα ψάρια, υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο ενδείξεων για προσαρμοστικές αλλαγές στις ενζυμικές δραστηριότητες του OXPHOS με επίδραση στις μεταβολικές ικανότητες (Bremer & Moyes, 2011), στη διατροφή (Eya et al. 2011), στη θερμική κατάσταση (Lucassen et al. 2003) και στην έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους (Soares et al. 2007). Τα μοριακό επίπεδο των αλλαγών αυτών δεν είναι τόσο γνωστό, ωστόσο, αυτό αρχίζει να αλλάζει, καθώς μετά την ευρεία ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, όλο και περισσότερες πληροφορίες αποκαλύπτονται από τις μεταγραφικά μεσολαβούμενες επιδράσεις της υποξίας, των ρύπων και των περιβαλλοντικών συνθηκών στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ενός ευρέος φάσματος ψαριών, συμπεριλαμβανομένων των μοντέλων ειδών ιχθύων (Everett et al.

2012) και άγριων/εκτρεφόμενων ψαριών, όπως το ευρωπαϊκό χέλι (Pujolar et al. 2012), ο σολομός (Miller et. Al 2009) και η πέστροφα (Rescan et al. 2007). Τα πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν επίσης μια σχετικά υψηλή διατήρηση των ενζύμων OXPHOS στο γονιδίωμα των τελεόστεων (Zhang & Broughton, 2013). Ωστόσο, η μοριακή ταυτότητα και, το σημαντικότερο, η μεταγραφική πλαστικότητα του συστήματος στα ψάρια παραμένουν ως επί το πλείστον ανεξερεύνητες (Bermejo-Nogales et al. 2015).

### 1.3.1 Συνεξέλιξη

Το σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι μοναδικό μεταξύ των θεμελιωδών μεταβολικών οδών στα ζώα (εκτός από τη συντήρηση και τη γονιδιακή έκφραση των μιτοχονδρίων) στο ότι τα λειτουργικά συμπλέγματα OXPHOS αποτελούνται από υπομονάδες που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονιδιώματα. Οι διαφορετικοί τρόποι κληρονομής των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδιωμάτων αυξάνει την πολυπλοκότητα των λειτουργικών αλληλεπιδράσεων στις υπομονάδες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο ρόλος οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στη βασική διεργασία της αερόβιας παραγωγής ATP σημαίνει ότι οι μικρές διαταραχές του διαγονιδιακού συντονισμού οδηγούν σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων παθολογιών (Wallace 2010). Επιπλέον, η ελάχιστη απόκλιση των υπομονάδων του OXPHOS μπορεί να οδηγήσει σε αναπαραγωγική ασυμβατότητα μεταξύ στενά συνδεδεμένων πληθυσμών (Rand et al., 2004). Συνεπώς, η επιτυχής αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών OXPHOS που κωδικοποιούνται από τα δύο γονιδιώματα παίζει κεντρικό ρόλο στις θεμελιώδεις διεργασίες στο επίπεδο κυτταρικής, οργανικής και πληθυσμιακής οργάνωσης της βιολογικής οργάνωσης. Το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης παρέχει μία σπάνια ευκαιρία για τη μελέτη της συνεξέλιξης των υπομονάδων που πρέπει επιτυχώς να συνεργαστούν στην μεταφορά ηλεκτρονίων και στην παραγωγή ATP, αλλά υπόκεινται ενδεχομένως σε πολύ διαφορετικές εξελικτικές δυνάμεις που διέπουν τα μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονιδιώματα (Zhang & Broughton, 2013).

Ο γρήγορος ρυθμός μεταβολής του mtDNA επιβάλλει τη στενή συνεξέλιξη των στενά αλληλεπιδρώντων παραγόντων που κωδικοποιούνται από το mtDNA και των κωδικοποιούμενων από πυρηνικό DNA (nDNA) παραγόντων (Grossman et al., 2004). Κατά συνέπεια, αποδείχθηκε ότι η παρεμβολή στην συνέξελξη των δύο γονιδιωμάτων οδηγεί σε υβριδική διάσπαση και υποβάθμιση της φυσικής κατάστασης λόγω δυσλειτουργίας του OXPHOS (Burton et al., 2006). Συνεπώς, η ασυμβατότητα των δυο γονιδιωμάτων έπαιξε σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αναπαραγωγικών φραγμών και ακόμη και γεγονότων ειδογένεσης (Gershoni et al., 2009).

Δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα μερικών αντισταθμιστικών αλλαγών στα πυρηνικά γονίδια οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, καθώς αυτές οι αλλαγές «συμβαδίζουν» με τις αλλαγές στα μιτοχονδριακά γονίδια. Ούτε μπορούμε να απορρίψουμε τις αντισταθμιστικές αλλαγές στα μιτοχονδριακά γονίδια ως απάντηση σε αλλαγές στο πυρηνικό γονιδίωμα. Πράγματι, ο ταχύς ρυθμός εξέλιξης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος

θα μπορούσε να επιτρέψει σε αυτά τα γονίδια να ανταποκρίνονται πιο εύκολα στις αλλαγές των πυρηνικών συστατικών (Zhang & Broughton, 2013).

### 1.3.2 Η εξέλιξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μετάζωα

Τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα προέρχονται, σύμφωνα με τη θεωρία ενδοσυμβίωσης για την προέλευση των ευκαρυωτικών κυττάρων, από πρωτογενείς μορφές προκαρυωτικών οργανισμών (Martin & Muller, 1998). Όποια και αν είναι η προέλευση, το βακτηριακό γονιδίωμα, από το οποίο προήλθε το μιτοχονδριακό DNA κατά την εξέλιξη, σταδιακά έχασε γονίδια, τα οποία μεταφέρθηκαν στο πυρηνικό γονιδίωμα (Gabaldon & Huynen, 2005).

Αν και στα διάφορα ευκαρυωτικά φύλα το μιτοχονδριακό γονιδίωμα παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα στο μέγεθος και την οργάνωση των γονιδίων, σε όλα τα μετάζωα, δηλαδή σε ένα χρονικό διάστημα περίπου 800 MY, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κατέστη πρακτικά «παγωμένο», τουλάχιστον για μερικές κύριες ιδιότητες, όπως φαίνεται από το μικρό μέγεθος (περίπου 16 kb) και το σταθερό περιεχόμενο των γονιδίων του (Saccrone et al. 2006)

Την ίδια χρονική περίοδο με την εξέλιξη των μετάζωων, σε αντίθεση με την παγωμένη κατάσταση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, το πυρηνικό γονιδίωμα παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη πλαστικότητα. Το διαφορετικό επίπεδο πλαστικότητας που διακρίνει τα δύο κυτταρικά γονιδιώματα οφείλεται κυρίως στα πολλαπλά και συνεχή γεγονότα διπλασιασμού που επηρεάζουν αποκλειστικά το πυρηνικό (Gu X. Et al. 2002). Αυτά τα γεγονότα δημιουργούν γενετικό πλεονασμό, επηρεάζοντας έντονα την εξέλιξη του πυρηνικού γονιδιώματος στα μετάζωα (Babenko & Krylov, 2004). Ο πλεονασμός γενετικών πληροφοριών για τα δύο κυτταρικά γονιδιώματα είναι αποτέλεσμα εντελώς διαφορετικών μηχανισμών. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, «παγωμένο» στα κύρια χαρακτηριστικά του, δείχνει πλεονασμό στον αριθμό αντιγράφων DNA ανά μιτοχόνδριο και στον αριθμό των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο, αποκτώντας πιθανώς και ιστο-ειδικές ιδιαιτερότητες. Αντίθετα, το πυρηνικό γονιδίωμα, το οποίο είναι παρόν σε ένα μονό / διπλό αντίγραφο ανά κύτταρο με ταυτόσημα αντίγραφα μεταξύ των κυττάρων (με λίγες εξαιρέσεις), εκφράζει τον πλεονασμό του στο επίπεδο αλληλουχίας, κυρίως μέσω επαναλήψεων και μεταθετών στοιχείων (Saccrone et al. 2006).

Σε αυτό το πλαίσιο, ο χαρακτηρισμός και η ανάλυση πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που στοχεύουν στο μιτοχόνδριο μπορούν να αποτελέσουν κλειδί για την κατανόηση της εξελικτικής προέλευσης και μοίρας των δύο γονιδιωμάτων. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στα γονίδια που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, καθώς είναι μία από τις αρχαιότερες και πιο συντηρημένες μιτοχονδριακή λειτουργία, καθώς και το μόνο βιολογικό σύστημα όπου μιτοχονδριακά και πυρηνικά γονίδια αλληλεπιδρούν φυσικά (Saccrone et al. 2006). Το μέγεθος της οικογένειας γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (όπως και ο αριθμός των παράλογων γονιδίων ανά οικογένεια γονιδίων) είναι πολύ μεγαλύτερο στα σπονδυλωτά απ' ό,τι στα ασπόνδυλα, σύμφωνα με την αύξηση τόσο του μεγέθους του γονιδιώματος όσο και του συνολικού αριθμού γονιδίων (Grassi et al. 2005). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ο μέσος όρος παράλογων γονιδίων οξειδωτικής

φωσφορυλίωσης είναι στατιστικά χαμηλότερος σε σχέση με τον συνολικό μέσο αριθμό παραλόγων, υπολογιζόμενη επί του συνόλου της γονιδιακής περιεκτικότητας των πυρηνικών γονιδιωμάτων σε όλα τα είδη που αναλύθηκαν. Αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια οξειδωτικής φωσφορυλίωσης δεν είναι επιρρεπή στο σχηματισμό ή τη διατήρηση αντιγράφων σε σπονδυλωτά ή ασπόνδυλα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται για τις γενεαλογίες που έχουν υποβληθεί σε διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος (Saccrone et al. 2006). Μια πιθανή εξήγηση για τον χαμηλό αριθμό γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης θα μπορούσε να είναι η «υπόθεση ισορροπίας» (Veitia, 2002), όπου διπλασιασμένα γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων επιλέγονται αρνητικά, διότι η ανισορροπία στη συγκέντρωση των υπομονάδων επηρεάζει αρνητικά τη σωστή τους συναρμολόγηση. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση των διπλασιασμένων γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα έντομα είναι πολύ χαμηλή και διαχωρίζεται στους όρχεις πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτά τα γονίδια μπορούν να επιβιώσουν μόνο εάν η έκφρασή τους είναι χαμηλή και ιστοειδική (Tripoli et al. 2005).

### **1.3.3 Η εξέλιξη των γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα ψάρια**

Η εξέλιξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διαφοροποίηση των ζωντανών οργανισμών. Η λειτουργική αποτελεσματικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης πιθανότατα είναι ιδιαίτερα σημαντική για ενεργειακές διαδικασίες, όπως η μετακίνηση. Η ποικιλόμορφη συμπεριφορά των ψαριών κατά τη μετακίνηση είναι από τις πιο ακραίες μεταξύ των σπονδυλωτών (Zhang & Broughton, 2015).

Σε μοριακό επίπεδο, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται άμεσα στον μεταβολισμό πιθανόν να αυξάνονται σε είδη ψαριών με υψηλή κινητικότητα. Οι τόνοι, που έχουν υψηλότερες ταχύτητες πλεύσης από άλλα ενεργά ψάρια (Block et al. 1992), έχει αποδειχθεί ότι έχουν αυξημένη μυοσφαιρίνη (Dickson, 1995) και υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταβολικών ενζύμων στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες. Από τη στιγμή που ένα αποτελεσματικό σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης εξελιχθεί, πιθανότατα είναι δύσκολο να αλλάξει στα ψάρια με υψηλή κινητικότητα. Τα ψάρια αυτά αναμένεται να έχουν πολύ χαμηλότερη ανοχή σε μη συνώνυμες μεταλλάξεις, καθώς η παραμικρή μεταλλαγή θα μπορούσε να έχει αρνητικά αποτελέσματα για τη λειτουργία του ψαριού. Αντίστροφα, ψάρια με χαμηλή κινητικότητα αναμένεται να έχουν μια πιο ευρεία ανοχή σε μη συνώνυμες μεταλλάξεις, καθώς το σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα ψάρια αυτά βρίσκεται υπό πολύ χαμηλότερες απαιτήσεις απόδοσης (Zhang & Broughton, 2015).

Επίσης, είναι πιθανό ότι η φυσική κατάσταση των ψαριών με χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις να μπορεί να βελτιωθεί μέσω ενός τροποποιημένου λειτουργικού συστήματος οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ή ακόμη και μέσω μείωσης της αποτελεσματικότητας του συστήματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις αναμένεται θετική επιλογή των γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε αυτά τα είδη. Επειδή μπορεί να υπάρξουν αντισταθμίσεις μεταξύ του ρυθμού ή της αποτελεσματικότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και των επιβλαβών

επιδράσεων, η μείωση της αποτελεσματικότητας του συστήματος θα μπορούσε να αποτελεί προσαρμοστικό μηχανισμό, όταν οι απαιτήσεις σε ATP είναι χαμηλές για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για παράδειγμα, η διατήρηση μιας ισχυρής χημειοσωμωτικής διαβάθμισης σε οργανισμούς με χαμηλή απαίτηση σε ATP, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (Brand, 2005), προκαλώντας οξειδωτικό στρες (Schieber & Chandel, 2014). Επομένως, η μείωση της αναλογίας της  $H^+ / 2e$  λόγω τροποποιημένων πρωτεϊνικών δομών, θα μπορούσε να αποτελεί αποτέλεσμα προσαρμογής στα είδη με χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Η ρύθμιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και περιλαμβάνει μηχανισμούς ανεξάρτητους των δομικών πρωτεϊνών του συστήματος. Συνεπώς, είναι σαφές ότι θετική επιλογή επιδρά στις πρωτεΐνες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και τα αποτελέσματα της θετικής επιλογής συχνά σχετίζονται με την εξέλιξη των ψαριών λόγω διαφορετικών απαιτήσεων σε ενέργεια (Zhang & Broughton, 2015).

## 1.4 Σύμπλοκο I

Το σύμπλοκο I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η μεγαλύτερη και η λιγότερο κατανοητή υπομονάδα της αναπνευστικής αλυσίδας. Αποτελείται από 45 διαφορετικές υπομονάδες οι οποίες συγκροτούν μία δομή της τάξης του ενός MDa (Caroll et al. 2006). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί 7 υπομονάδες του συμπλόκου. Οι υπόλοιπες 38 κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, τα οποία εφόσον μεταφραστούν εισάγονται στο μιτοχόνδριο μέσω μηχανισμών μεταφοράς (Hoogenraad et al. 2002). Ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας από την οξείδωση του NADH μεταφέρονται σε ένα φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN) και εν συνεχεία σε μια σειρά σιδηροθειούχων συμπλόκων, ώστε ο τελικός αποδέκτης να είναι ένα μόριο ουβικινόνης, το οποίο όταν λάβει τα ηλεκτρόνια ανάγεται σε ουβικινόλη. Η μεταφορά κάθε ζεύγους ηλεκτρονίων συνοδεύεται από την άντληση 4 πρωτονίων από τη μήτρα του μιτοχονδρίου στον διαμεμβρανικό χώρο (Lazarou et al. 2009).

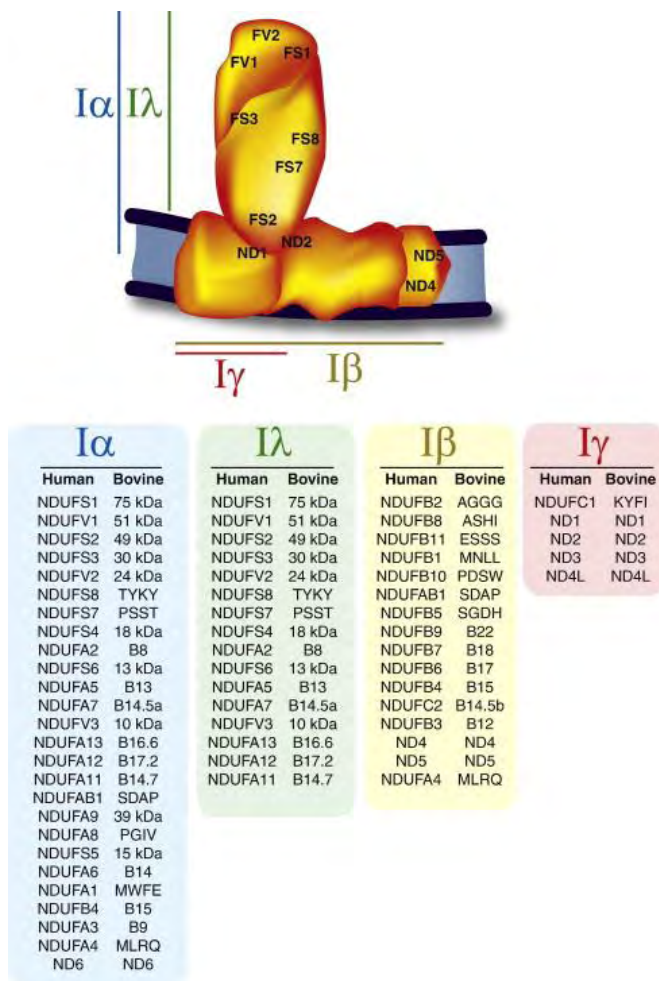
Το σύμπλοκο I αρχικά περιγράφηκε στα μιτοχόνδρια (Rich, 2003), ωστόσο έχει βρεθεί σε πολλά ευβακτηρια, όπου συνήθως ορίζεται ως αφυδρογονάση 1 του NADH ή NDH (Loeffen et al. 2000). Επίσης, το σύμπλοκο I συμμετέχει στην βακτηριακή φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων (Brown et al. 2002). Σε μερικούς προκαρυώτες, έχει βρεθεί μία αντλία νατρίου NADH: οξειδοορεδοκτάση κινόνης ή αλλιώς NQR (Kirby et al. 2004). Η εξέλιξή του, όμως, δεν σχετίζεται με αυτήν του συμπλόκου I. Τέλος τα μιτοχόνδρια των φυτών, ζυμών και πολλών βακτηρίων περιέχουν μέχρι και τέσσερις εναλλακτικές αφυδρογονάσες του NADH (Loeffen et al. 1998). Παρόλο που το σύμπλεγμα I απομονώθηκε, αρχικά, από τα μιτοχόνδρια της καρδιάς των βοοειδών σχεδόν πριν από 50 χρόνια (Rich, 2003), η μοριακή δομή και ο μηχανισμός του συνεχίζουν να μελετώνται. Έχει καταστεί εμφανές τα τελευταία χρόνια ότι το σύμπλοκο I εμπλέκεται σε πολυάριθμες παθολογικές καταστάσεις και εκφυλιστικές διεργασίες (Friedrich, 2001). Αυτό έχει οδηγήσει σε αυξανόμενες προσπάθειες για τη βελτίωση των γνώσεων για το σύμπλοκο I (Lazarou et al. 2009).

### 1.4.1 Δομή του συμπλόκου I

Ενώ κρυσταλλογραφίες έχουν πραγματοποιηθεί για τα υπόλοιπα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μόνο τρισδιάστατες δομές χαμηλής ανάλυσης είναι διαθέσιμες για το σύμπλοκο I (Grigorieff, 1998). Η γενικότερη ιδέα για το συνολικό σχήμα του συμπλόκου από βακτήρια και μιτοχόνδρια, είναι της μορφής του γράμματος L (Friedrich & Bottchen, 2004). Η δομή αυτή αποτελείται από ένα υδρόφιλο περιφερικό τμήμα και ένα υδρόφοβο, κάθετα σε αυτό. Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφία ακτινών Χ και οδήγησε στην ατομική δομή του υδρόφιλου περιφερικού άκρου του ενζύμου (Hinchliffe & Sazanov, 2005). Η δομή έφερε στο φως πληροφορίες σχετικά με το μονοπάτι ηλεκτρονιακής μεταφοράς του ενζύμου και επιπλέον τις σχετικές θέσεις των κύριων υπομονάδων (του πυρήνα), που εντοπίζονται στο βασικό άκρο. Επειδή οι υπομονάδες αυτές είναι εξελικτικά συντηρημένες, το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί να εφαρμοστεί στο μιτοχονδριακό σύμπλοκο I. Ωστόσο, δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό σύμπλοκο I περιέχει πολλές επιπλέον υπομονάδες άγνωστης λειτουργίας, το βακτηριακό μοντέλο δεν μπορεί να παρέχει μια πλήρη εικόνα (Lazarou et al. 2009).

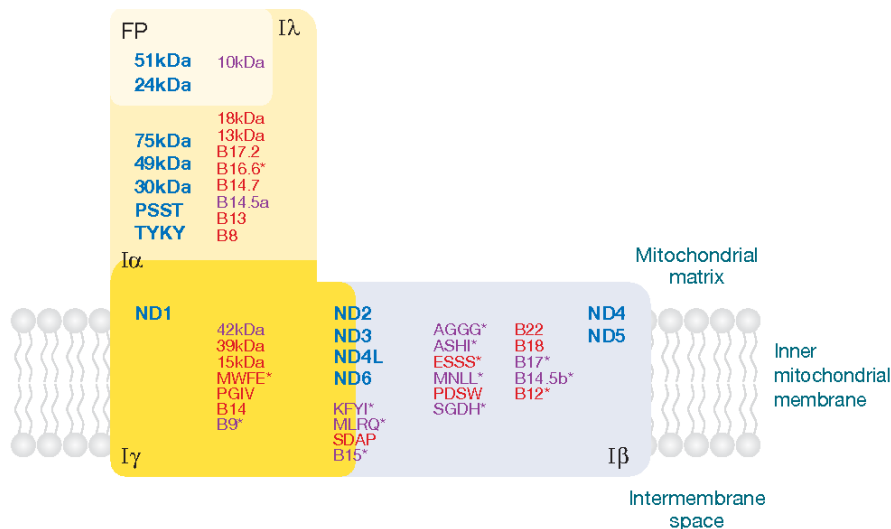
Οι υπομονάδες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια ορίζονται ως NADH αφυδρογονάσες της ουβικινόνης (NDU), και ακολουθεί η περιγραφή της εκάστοτε λειτουργίας (FS για σιδηροθειούχες πρωτεΐνες, FV για φλαβινοπρωτεΐνες κ.λ.π.). Οι βασικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ορίζονται ως αφυδρογονάσες NADH (ND) και ακολουθούνται από τον αριθμό της υπομονάδας. Οι βασικές υπομονάδες ("υπομονάδες του πυρήνα") NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 and NDUFV2 κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια και είναι υψηλά συντηρημένες στους ευκαρυώτες (Εικόνα 6). Αυτές οι υπομονάδες εμπλέκονται στην οξείδωση του NADH και στην επ' ακόλουθη μεταφορά των ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη. Οι υπόλοιπες επτά βασικές υπομονάδες κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Είναι όλες υδρόφοβες και εντοπίζονται στο μεμβρανικό άκρο του συμπλόκου (Lazarou et al. 2009).





Εικόνα 6: Οι υπομονάδες του συμπλόκου I

Από τις 45 υπομονάδες που συγκροτούν το σύμπλοκο I, οι 38 κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Από αυτές, επτά είναι υπομονάδες του πυρήνα, και οι υπόλοιπες είναι βοηθητικές υπομονάδες, οι οποίες δεν έχουν ομόλογα στο βακτηριακό γονιδίωμα (Walker, 1992). Πώς οι υπομονάδες του πυρήνα και οι βοηθητικές υπομονάδες συνεργάζονται για την συναρμολόγηση ενός λειτουργικού ενζύμου; Η σύνθεση της υπομονάδας και η γενική τοπολογία του συμπλόκου I έχει καθοριστεί μέσω της διάκρισης σε τέσσερα υποσύμπλοκα Iα, Iβ, Iλ και Iγ (Finel et al. 1992). Όπως φαίνεται στο σχήμα (Εικόνα 7), το υποσύμπλοκο Iα αποτελείται από υπομονάδες τόσο από τον περιφερειακό βραχίονα όσο και από ένα τμήμα του βραχίονα υδρόφοβης μεμβράνης, ενώ το υποσύμπλοκο Iβ αποτελείται από υπομονάδες που αποτελούν την πλειοψηφία του βραχίονα μεμβράνης. Οι υπομονάδες που δεν βρίσκονται σε κανένα από τα προηγούμενα υποσύμπλοκα βρίσκονται στο Iγ. Το υποσύμπλοκο Iλ αντιπροσωπεύει τον υδρόφιλο περιφερειακό βραχίονα και περιέχει τις 15 υπομονάδες που παρέχουν όλους τους συμπαραγόντες αναγωγής (Hirst et al. 2003). Η υπομονάδα NDUFA13 αντιπροσωπεύει τη μόνη μεμβρανική πρωτεΐνη του Iλ (Lazarou et al. 2009).



Εικόνα 7: Τα υποσύνπλοκα των υπομονάδων του συμπλόκου I

### 1.4.2 Η αρθρωτή δομή του συμπλόκου I

Το σύμπλοκο I αποτελείται από τρεις λειτουργικές μονάδες. Η μονάδα N συνδέει και οξειδώνει το NADH, οδηγώντας στην απελευθέρωση ηλεκτρονίων τα οποία μεταφέρονται από το φλαβινο μονονουκλεοτίδιο (FMN) στα σιδηροθειούχα σύμπλοκα. Η μονάδα Q λαμβάνει ηλεκτρόνια τα οποία έχουν μεταφερθεί στα σιδηροθειούχα σύμπλοκα της μονάδας N και τα μεταφέρει στην ουβικινόνη. Ενώ οι μονάδες N και Q βρίσκονται μέσα στη μιτοχονδριακή μήτρα, η μονάδα P είναι μεμβρανική και εμπλέκεται στην άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα (Lazarou et al. 2009).

### 1.4.3 Εξέλιξη του συμπλόκου I

Το μιτοχονδριακό σύμπλοκο I προέρχεται από το βακτηριακό ένζυμο των μιτοχονδρίων των α-πρωτεοβακτηρίων (Gray et al. 1999), όπως μπορεί σαφώς να παρατηρηθεί στις φυλογενετικές ανακατασκευές των βακτηριακών βασικών υπομονάδων που έγιναν σε προηγούμενες μελέτες (Gobaldon & Huynen, 2003). Μετά την εμφάνιση του μιτοχονδριακού συμπλόκου I, διάφορες υπομονάδες, κυρίως ευκαρυωτικής προέλευσης, προστέθηκαν στο ένζυμο. Αυτή η προσθήκη θα πρέπει να προηγήθηκε της διαφοροποίησης των μηκύτων, φυτών και μετάρζων, καθώς δεν υπάρχει κάποιο ενδιάμεσο παράδειγμα σε αυτά τα είδη. Εκτός από τις προαναφερθείσες 32 κοινές υπομονάδες, οι υπομονάδες που είναι κοινές τόσο στα φυτά όσο και στους μύκητες, εξαιρουμένων των μετάρζων, πρέπει να έχουν προστεθεί πριν από την απόκλιση των τριών βασιλείων (Gobaldon et al. 2005).

Η εξελικτική ανασυγκρότηση παρέχει έτσι μια ελάχιστη εκτίμηση 35 υπομονάδων, συμπεριλαμβανομένων 2 πρωτεϊνών συναρμολόγησης, για το σύμπλεγμα I που ήταν πιθανό να υπήρχε στον κοινό πρόγονο των τριών κύριων ευκαρυωτικών βασιλείων. Σε σύγκριση με τις δεκατέσσερις υπομονάδες του α-πρωτεοβακτηριακού συμπλόκου I, οι 35 υπομονάδες αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό κέρδος, όσον αφορά την πολυπλοκότητα

(Gobaldon et al. 2005). Αυτή η αύξηση της πολυπλοκότητας που ακολούθησε μετά το γεγονός ενδοσυμβίωσης, δεν είναι ασυνήθηστη για άλλα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Berry, 2003) και σχετίζεται με μια πιθανή εξέλιξη των βοηθητικών υπομονάδων στη βιογένεση και σταθεροποίηση των συμπλόκων (Caroll et al. 2004).

Οι περισσότερες βοηθητικές υπομονάδες είναι ευκαρυωτικής προέλευσης. Ωστόσο φυλογενετικές μελέτες για όλες τις υπομονάδες του συμπλόκου I αποκαλύπτουν μία α-πρωτεοβακτηριακή προέλευση για έξι βοηθητικές υπομονάδες, γεγονός που υποδηλώνει ότι, αφού υπήρχαν ήδη στο μιτοχόνδριο των πρωτεοβακτηρίων, αυτές οι πρωτεΐνες τελικά εγκαθιδρύθηκαν στον λειτουργικό μηχανισμό του συμπλόκου I. Ωστόσο, εξετάζοντας το γενωμικό περιεχόμενο των βοηθητικών υπομονάδων στα α-πρωτεοβακτήρια δεν αποκαλύπτει κάποια σύνδεση με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου I (Gobaldon et al. 2005).

Η γενικότερη εικόνα είναι αυτή ενός πολυπρωτεϊνικού ενζύμου, προγονικού των α-πρωτεοβακτηρίων, το οποίο τριπλασιάστηκε σε μέγεθος με την προσθήκη νέων υπομονάδων, τόσο α-πρωτεοβακτηριακής όσο και ευκαρυωτικής προέλευσης. Δεν υπάρχει κάποια ένδειξη ότι οι πρωτεΐνες που προσθέθηκαν στο σύμπλοκο I κατά την εξέλιξη των ευκαρυώτων λειτουργούν ή λειτούργησαν ως ξεχωριστά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Το σενάριο για την εξέλιξη του συμπλόκου I στους ευκαρυώτες, κατά το οποίο νέες πρωτεΐνες προστέθηκαν σε ένα ήδη υπάρχον σύμπλεγμα, συνεπώς, έρχεται σε αντίθεση με το σενάριο πολύ νωρίτερα και κατά την εξέλιξη του συμπλόκου I στους προκαρυώτες, όπου ξεχωριστά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα εμφανίστηκαν για να συνδυαστούν σε μία ενιαία μονάδα (Friedrich, 2001). Η μείζων αναβάθμιση του συμπλόκου I στην ευκαρυωτική εξέλιξη συνέβη πριν από την απόκλιση των τριών κύριων ευκαρυωτικών περιοχών, καταλήγοντας σε ένα πρωτόγονο ευκαρυωτικό σύμπλεγμα τουλάχιστον 35 υπομονάδων που συμπεριέλαβαν δύο πρωτεΐνες που συμμετείχαν στη συναρμολόγησή του. Στη συνέχεια αυτό διαφοροποιήθηκε κατά μήκος των διαφορετικών ευκαρυωτικών γενεαλογιών με συνεχή πρόσληψη νέων υπομονάδων και τελικά με μερικές απώλειες. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα είναι εάν η προσθήκη νέων υπομονάδων στην εξέλιξη μιμείται εκείνη στο μονοπάτι συναρμολόγησης του συμπλόκου I. Αυτή είναι μια ελκυστική υπόθεση, αλλά τα στοιχεία δεν είναι, μέχρι στιγμής, πειστικά. Από τη μία πλευρά στον άνθρωπο, ορισμένες βοηθητικές υπομονάδες φαίνεται ότι, όντως, προστέθηκαν σε ένα πρώιμο εξελικτικά συναρμολογημένο σύμπλεγμα που αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες προκαρυωτικού πυρήνα (Ugalde et al. 2004). Από την άλλη πλευρά, ορισμένες εξειδικευμένες βοηθητικές υπομονάδες προστέθηκαν σε ένα πρώιμο στάδιο κατά την συναρμολόγηση ενός μεμβρανικού υποσυμπλόκου (Ugalde et al. 2004). Μια οριστική απάντηση σε αυτό το ερώτημα αναμένεται μιας υψηλότερης ανάλυσης μελέτης για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου I. Με την αλληλούχηση περισσότερων γονιδιωμάτων και πειραματικά δεδομένα για το σύμπλοκο I σε διαφορετικά είδη, αναμένουμε να αποκτήσουμε βαθύτερη γνώση της εξέλιξης του ευκαρυωτικού συμπλέγματος I. Ο πειραματικός προσδιορισμός του συμπλέγματος I σε περισσότερα και ποικιλόμορφα είδη, όπως έντομα ή ψάρια, πιθανώς θα ανιχνεύσει νέες υπομονάδες ειδικής γενεαλογικής προέλευσης όπως υπάρχουν σε μύκητες, φύκη και θηλαστικά. Τέλος, η ανάλυση ιστο-ειδικών και παροδικώς συσχετιζόμενων συστατικών του συμπλόκου I, είναι απαραίτητη για να ληφθεί μια ευρύτερη άποψη της εξέλιξης του ευκαρυωτικού συμπλέγματος I που περιλαμβάνει πιθανές ιστοειδικές

προσαρμογές και την προέλευση περισσότερων παραγόντων συναρμολόγησης (Gobaldon et al. 2005).

## 1.5 Η υπομονάδα NDUFS8 του συμπλόκου I

Το γονίδιο NDUFS8 είναι ένα υψηλά συντηρημένο πυρηνικό γονίδιο που κωδικοποιεί για τη υπομονάδα ΤΥΚΥ/ΝυοΙ του συμπλόκου I με ομόλογες πρωτεΐνες σε διάφορα είδη, όπως στον άνθρωπο (Procaccio et al. 1997), *B. taurus* (Walker 1992), στο *N. crassa* (Duarte et al. 1996), *E. coli* (Weidner et al. 1993), και *Rhodobacter capsulatus* (Chevallet et al. 1997). Για παράδειγμα, η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης στον άνθρωπο και στο *B. taurus* είναι ίδια κατά 93% (Εικόνα 8). Στους τελεόστεους το γονίδιο NDUFS8 είναι διπλασιασμένο, με παράλογα γονίδια τα NDUFS8A και NDUFS8B. Ο εντοπισμός του προϊόντος του γονιδίου στο συμπλόκο I δεν είναι ιδιαίτερα σαφής. Η αμινοξική αλληλουχία περιέχει 2 μοτίβα συναίνεσης για τη σύνδεση 4Fe-4S συμπλόκων. Πρόσφατα, οι μελέτες ομόλογου ανασυνδυασμού που πραγματοποιήθηκαν με την υπομονάδα ΝΥΟΙ του *R. capsulatus* (ομόλογη με την ανθρώπινη NDUFS8) έδειξαν ότι το ΝΥΟΙ παίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση του συμπλόκου I, το οποίο τονίζει τη σημασία της υπομονάδας (Chevallet et al. 1997).

		P to L	
		↓	
<i>H. sapiens</i>	RGLGMTLSYLFREPATINYPFEKGPL		91
Bovine	RGLGMTLSYLFREPATINYPFEKGPL		93
<i>D. Melanogaster</i>	RGFAVTLAHIFKEPATINYPFEKGPL		98
<i>C. Elegans</i>	RGFGVMLGHVFMEPATINYPFEKGPL		93
<i>N. crassa</i>	RGMVAMEQFFRPPYTIYYPFKEGPI		44
<i>Y. lipolytica</i>	RGLYVVLEQFFRAPYTIYYPFKEGPV		103
<i>R. capsulatus</i>	KGFALGMKYFVAPKPTLNYPHEKGPL		110
<i>A. Thaliana</i>	RGLSLTLKYFFDPKVTINYPFEKGPL		100
<i>E. coli</i>	-GL-----HAFAKRETRMYPEEPVYL		76
		R to H	
		↓	
<i>H. sapiens</i>	ITIEAEPRADGSRRTTRYDIDMTKCI		151
Bovine	ITIEAEPRADGSRRTTRYDIDMTKCI		153
<i>D. Melanogaster</i>	ITIEAEERADGSRRTTRYDIDMTKCI		158
<i>C. Elegans</i>	ITIEAETRPDGSRRRTTRYDIDMTKCI		153
<i>N. crassa</i>	ITIEAEERADGSRRTTRYDIDMTKCI		160
<i>Y. lipolytica</i>	ITIDAEERIDGSRRTTKYDIDMTKCI		170
<i>R. capsulatus</i>	ITIDAEPRDDGSRRTTRYDIDMTKCI		104
<i>A. Thaliana</i>	ITIEAEEREDGSRRTTRYDIDMTKCI		163
<i>E. coli</i>	ISLQKAETKDGWRWYPEFFRINFSRCI		136

**Εικόνα 8 :** Συντήρηση του γονιδίου NDUFS8 μεταξύ διαφορετικών ειδών. Στοιχισμός των αμινοξικών αλληλουχιών από τον άνθρωπο μέχρι τα βακτήρια.

Είναι πιθανό ότι η μεμβρανική περιοχή καθώς και μια περιοχή σύνδεσης του πρωταρχικού υδρόφιλου τμήματος με τη μεμβρανική περιοχή του συμπλόκου παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην σύζευξη της μεταφοράς ηλεκτρονίων με την άντληση των πρωτονίων

από τη μήτρα. Η περιοχή σύνδεσης περιλαμβάνει τις υπομονάδες PSST(NQO6/NuoB/NDUFS7) και ΤΥΚΥ(NQO9/NuoI/NDUFS8), ενώ η μεμβρανική περιοχή συντίθεται από τουλάχιστον επτά υπομονάδες. Η σιδηροθειούχα πρωτεΐνη N2 που αποτελεί μέγιστης σημασίας, καθώς φέρει το τελικό σύμπλοκο 4Fe-4S με το οποίο συνδέεται η ουβικινόνη, εντοπίζεται στην παραπάνω περιοχή σύνδεσης και συγκεκριμένα στην υπομονάδα PSST. Η υπομονάδα ΤΥΚΥ αποτελεί τη γέφυρα για την ηλεκτρονιακή μεταφορά στο τελικό σιδηροθειούχο σύμπλοκο N2. Επομένως, η μεμβρανική περιοχή και η περιοχή σύνδεσης με το κύριο υδρόφιλο τμήμα του συμπλόκου έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη λειτουργία του συμπλόκου και η μελέτη των συστατικών που τις απαρτίζουν αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα για την κατανόηση του συζευκτικού μηχανισμού του συμπλόκου I (Yano et al. 2000).

### 1.5.1 Υποξία και NDUFS8

Τα μιτοχόνδρια παίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο κατά την καρκινογένεση, εν μέρει λόγω της μεσολάβησης τους στην απόπτωση (Green & Reed, 1998), αλλά και ως κύρια πηγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), τα οποία διαφεύγουν από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Murphy, 2009). Το σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης περιλαμβάνει 5 σύμπλοκα, και υπάρχουν δύο κύριες θέσεις παραγωγής υπεροξειδίου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη: η αφυδρογονάση του NADH στο σύμπλοκο I, και το διάστημα μεταξύ της ουβικινόνης και του συμπλόκου III (Murphy, 2009).

Η πρωτεάση Lon είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που συμμετέχει στη ρύθμιση του πρωτεϊνικού ποιοτικού ελέγχου και σε μονοπάτια απόκρισης στρες στα μιτοχόνδρια. Η ανθρώπινη Lon υπερέκφράζεται υπό συνθήκες οξειδωτικού και υποξικού στρες. Η υπερέκφραση της Lon προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αποπτωτική αντοχή στο στρες και τον μετασχηματισμό. Επιπλέον, η υπερέκφραση της Lon επάγει την παραγωγή μιτοχονδριακών ROS, γεγονός που αποτελεί αποτέλεσμα της διαμεσολαβούμενης από την Lon υπερέκφραση του NDUFS8, της μιτοχονδριακής, δηλαδή, σιδηροθειούχας πρωτεΐνης του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. Η Lon πιθανό να αλληλεπιδρά με το NDUFS8, όπως έχει αποδειχθεί από μία πρωτεομική ανάλυση που διεξάχθηκε. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Lon συνδέεται με το σύμπλοκο της προχιβιτίνης και στρατολογείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου εντοπίζεται και η NDUFS8. Συνεπώς, η Lon είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με τη NDUFS8 και να ρυθμίζει τη σταθερότητα και τα επίπεδα της δεύτερης. Η αλληλεπίδραση της Lon με τη NDUFS8 έχει επιβεβαιωθεί μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης. Επίσης, έχει βρεθεί, ότι τα επίπεδα της NDUFS8 αυξάνονται όχι μόνο μέσω υπερέκφρασης της Lon, αλλά και μέσω υψηλών συγκεντρώσεων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cheng et al. 2013).

Η μακροχρόνια επίδραση της υποξίας είναι η μείωση τόσο της παραγωγής όσο και της χρήσης του ATP και κατ' επέκταση η μείωση της εξάρτησης από την παραγωγή της μιτοχονδριακής οξειδωτικής ενέργειας (Everett et al. 2013). Σε γενικές γραμμές, η αντίδραση στην υποξία έχει δύο πτυχές: άμυνα και διάσωση: Το πρώιμο στάδιο της άμυνας επιτυγχάνεται με τη μείωση της χρήσης της ενέργειας και της εξάρτησης από τον

αερόβιο μεταβολισμό (Hochachka et al., 1996). Συγκεκριμένα, για την εξοικονόμηση ενέργειας για πρωτεϊνοσύνθεση, η αποικοδόμηση πρωτεϊνών, η γλυκονογένεση και η δραστικότητα της αντλίας Na μπορούν να μειωθούν κατά 90%. Για το τελεόστεο *F. grandis*, δεδομένα από μακροχρόνια έκθεση σε συνθήκες υποξίας (28 ημέρες) συμφωνούν με τα παραπάνω (Everett et al. 2013).

Στα θηλαστικά, η μέτρια έκθεση σε υποξία ενισχύει τη μιτοχονδριακή αναπνοή μέσω αλλαγών στη μεταγραφή (Essor, 2007). Στην τιλαπία, η έκθεση σε 8 ώρες υποξίας προκάλεσε μείωση της ολικής κατανάλωσης οξυγόνου στο σώμα, αντανακλώντας μια μείωση της απαίτησης σε ATP (Speers- Roesch κ.ά., 2010). Τέλος, στον καρδιακό ιστό του *G. mirabilis* υπήρξε μεγαλύτερη από διπλάσια αύξηση του κυτοχρώματος b και της οξειδάσης του κυτοχρώματος I (πρωτεΐνη στην οδό οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) και ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (Gracey et al., 2001). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανταπόκριση στη βραχυπρόθεσμη έκθεση στην υποξία μπορεί να είναι πιο πολύπλοκη από τη μείωση της απαίτησης σε ATP (Everett et al. 2013).

Για την καλύτερη κατανόηση της βραχυπρόθεσμης απόκρισης στην υποξία, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης mRNA στο ήπαρ και στην καρδιά των τελεόστεων *Fundulus grandis*, ύστερα από έκθεση σε μερική πίεση οξυγόνου. Παραδόξως, πολλά (σε σχέση με το αναμενόμενο) των γονιδίων με σημαντική αύξηση στα επίπεδα των mRNA τους, εμπλέκονται στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τόσο σε ηπατικά όσο και σε καρδιακά κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των επίπεδων mRNA ενζύμων της οδού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Εάν αυτές οι μεταβολές στο mRNA παράγουν μια παρόμοια μεταβολή και στην πρωτεΐνη, τότε αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η αρχική απόκριση στην υποξία συνεπάγεται αύξηση της οξειδωτικής οδού δυνητικά ως μηχανισμό για τη διατήρηση της παραγωγής ATP (Everett et al. 2013).

Σε ένα άλλο πείραμα που διεξάχθηκε, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης σε δύο πληθυσμούς ψαριών *Gasterosteus aculeatus*, οι οποίοι είχαν μολυνθεί με κεστώδη παράσιτα. Και στους δύο πληθυσμούς ενισχύθηκαν γονίδια, τα οποία σχετίζονται με ανοσολογικές λειτουργίες και με την απόκριση σε λοίμωξη. Για παράδειγμα μελετήθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS. Η εξελικτική απόκλιση μεταξύ των σπονδυλωτών έχει ως αποτέλεσμα την εξειδικευμένη ανά πληθυσμούς γονιδιακή έκφραση, ως απόκριση στη μόλυνση. Ένας τρόπος για τον εντοπισμό γονιδίων που ευνοούνται από τη φυσική επιλογή είναι η αναζήτηση της εξέλιξης της γονιδιακής έκφρασης σε απάντηση της μόλυνσης. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία αλληλούχησης και στη γενετική χαρτογράφηση έχουν καταστήσει αυτό τον στόχο εφικτό (Lohman et al, 2017).

Στο παραπάνω πείραμα παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου NDUFS8 στα ψάρια. Επομένως, το NDUFS8 μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη ρύθμιση της επαγωγής των ROS σε απόκριση της μόλυνσης, επειδή είναι η μόνη υπομονάδα του συμπλόκου I, όπου παρατηρήθηκε θετική ρύθμιση κατά τη μόλυνση (Lohman et al, 2017).

## 1.6 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο εντοπισμός των επιπέδων πολυμορφισμού στο πυρηνικό διπλασιασμένο γονίδιο οξειδωτικής φωσφορυλίωσης NDUFS8A στο λαβράκι, για το οποίο δεν έχουν πραγματοποιηθεί αναλύσεις σε επίπεδο πληθυσμών λαβρακιού στο παρελθόν. Επιπλέον, πρόκειται για ένα πολύ καλά συντηρημένο γονίδιο με υψηλή λειτουργικότητα μεταξύ των ειδών, το οποίο είναι απόρροια της λειτουργικής συνεργασίας δύο γονιδιωμάτων. Το *D. labrax* αποτελεί ένα είδος με ιδιαίτερη εμπορική σημασία, επομένως, η συλλογή και διερεύνηση πληροφοριών σε επίπεδο πληθυσμού μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο τόσο από άποψη επιστημονικού όσο και οικονομικού ενδιαφέροντος.

## ***2.ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ***



## 2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν συνολικά 60 δείγματα λαβρακιού από πληθυσμούς ιχθυοκαλλιέργειας. Η επιλογή πραγματοποιήθηκε με τέτοιον τρόπο, ώστε τα δείγματα που μελετήθηκαν να έχουν τον μέγιστο δυνατό βαθμό ποικιλομορφίας. Συγκεκριμένα, η επιλογή των δειγμάτων βασίστηκε σε ανάλυση 10 μικροδορυφόρων, που είχε ήδη πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη εργαστηριακή μελέτη, και επιλέχθηκαν δείγματα με το μεγαλύτερο ποσοστό ετεροζυγωτίας, όσον αφορά τους μικροδορυφόρους. Τα περισσότερα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν ετερόζυγα και για τους 10 μικροδορυφόρους, ενώ μερικά ήταν ετερόζυγα για 9 και λίγα για 8 μικροδορυφόρους.

## 2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

### Υλικά:

- DNA
- Εκκινητές (Forward, Reverse)
- Taq DNA πολυμεράση
- Buffer ενζύμου
- DNTPs
- Νερό
- MgCl<sub>2</sub>

### Μέθοδος:

Η PCR είναι ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός επιλεγμένων αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά αντίγραφα, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία. Σε κάθε κύκλο ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

1. **Το στάδιο της αποδιάταξης.** Στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του, σε υψηλή θερμοκρασία 94°C.
2. **Το στάδιο της υβριδοποίησης.** Στο στάδιο αυτό υβριδοποιούνται οι εκκινητές (primers) στις αποδιαταγμένες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_a$ ) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών ( $T_m$ ). Η  $T_m$  υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:  $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$
3. **Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Στο στάδιο αυτό δρα το ένζυμο Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινητές επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C.

Ανάλογα με το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος ρυθμίζεται και ο αριθμός των κύκλων, λαμβάνοντας υπόψιν ότι συνήθως μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει

συχνά λάθη. Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως 2<sup>v</sup> αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου v οι κύκλοι της PCR.

Ο σχεδιασμός εκκινητών πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος σχεδιασμού εκκινητών του NCBI. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση το μοναδικό γονιδίωμα αναφοράς για το λαβράκι που είναι καταχωρημένο στη βάση δεδομένων UCSC Genome Browser. Σκοπός ήταν η ενίσχυση ολόκληρης της κωδικής περιοχής των πρώτων τεσσάρων εξονίων του γονιδίου NDUFS8A. Ο πρώτος εκκινητής σχεδιάστηκε 50 ζεύγη βάσεων πριν το πρώτο εξόνιο, ώστε το πρώτο αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης (αμπλικόνιο) να περιλαμβάνει το πρώτο εξόνιο, συμπεριλαμβανομένης της 5' UTR, ενώ οι υπόλοιποι εκκινητές σχεδιάστηκαν σε ιντρόνια ανοδικά και καθοδικά των αντίστοιχων εξονίων του γονιδίου.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος PCR προϊόντος	T <sub>m</sub> εκκινητών	GC%
NDUFS8A1_F	ATGTAGTTACGTCAGTCA	172 bp	53,19	40
NDUFS8A1_R	GAACCTTGTAAGAAATAA		53,83	28
NDUFS8A2_F	G G G G C T A C T T T T G A C C T G	145 bp	57,19	50
NDUFS8A2_R	T G T G T A A G T G C A A C T G G T		58,04	50
NDUFS8A3_F	A G C A A T C C T A A T G A T A A T	126 bp	57,86	37,5
NDUFS8A3_R	T T T G T G T G C T G T A G T G C T A		58,2	40,9
NDUFS8A4_F	A C T A T C A G C A G C T C T C T C A	157 bp	56,46	50
NDUFS8A4_R	A C T G T A T G T G T G T A G C T G		54,54	45

Συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία για τελικό όγκο αντίδρασης 50 μL ήταν η εξής:

Υλικά	C <sub>αρχικό</sub>	C <sub>τελικό</sub>	Ποσότητες/PCR tube
Buffer	10x	1x	5 μL
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 μL
Εκκινητής Fw	50 pmol	1 pmol	1 μL
εκκινητής Rv	50 pmol	1 pmol	1 μL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	4 μL
DNA Πολυμεράση Kappa Taq	5 u/μL	1 u	0.2 μL
ddH <sub>2</sub> O	-	-	Μέχρι τον τελικό όγκο
		Τελικός όγκος	50 μL

- οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν προσθέτοντας 100 ng/μl DNA

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι ακόλουθες:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	40 m
Αποδιάταξη	95° C	40 s
Υβριδοποίηση	51-58° C	40 s
Επιμήκυνση	72° C	40 s
Τελική επιμήκυνση	72° C	10 m

- Η θερμοκρασία υβριδισμού για το 1<sup>ο</sup> ζεύγος εκκινητών ήταν 51-53°C.
- Η θερμοκρασία υβριδισμού για το 2<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> ζεύγος εκκινητών ήταν 58°C.

## 2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης

### Υλικά:

- Loading Buffer
- TAE 1X
- Αγαρόζη
- Χρωστική Serva
- Ladder

### Μέθοδος:

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό τμημάτων DNA. Βασίζεται στην αρχή της μετακίνησης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Αφού εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο το DNA αρχίζει να μετακινείται προς τον θετικό πόλο της συσκευής λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH. Βάσει, λοιπόν, των διαφορών στο μέγεθος του DNA πραγματοποιείται ο διαχωρισμός, με τα μικρότερα σε μέγεθος (ζεύγη βάσεων) δείγματα να μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό πόλο. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μέσω της εισαγωγής μιας φθορίζουσας χρωστικής, που παρεμβάλλεται εντός της διπλής έλικας του DNA και ανιχνεύεται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός. Επιπλέον, ο υπολογισμός του μεγέθους των δειγμάτων μας βασίζεται στη σύγκριση με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (ladder), ο οποίος αποτελεί ένα μίγμα τμημάτων με διακριτά μοριακά μεγέθη και μετακινείται παράλληλα με το DNA στο ηλεκτρικό πεδίο.

Συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

1. Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμιγνύεται με συγκεκριμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συνήθως 1x TAE. Η αγαρόζη διαλύεται με τη βοήθεια βρασμού ώσπου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.
2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα χρωστικής Serva σε τελική συγκέντρωση 0.1 µg/ml

3. Το διάλυμα εισάγεται σε ειδική μήτρα και τοποθετούνται χτένες για τη δημιουργία μικρών πηγαδιών, εντός του πηκτώματος.
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής Loading Buffer.
5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή στην οποία έχει προστεθεί διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης.
7. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

## 2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης-SSCP

### Υλικά:

- Ακρυλαμίδη
- Bis-ακρυλαμίδη
- Γλυκερόλη 50%
- 10x TBE Buffer
- TEMED
- APS 20% w/v
- ddH<sub>2</sub>O

### Μέθοδος:

Η μέθοδος SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) ή «πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονού κλώνου» αποτελεί την απλούστερη και πιο ευαίσθητη τεχνική σήμερα για την ανίχνευση μεταλλάξεων και γενετικών πολυμορφισμών. Συγκεκριμένα με την μέθοδο SSCP μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν οι πολυμορφισμοί σε επίπεδο νουκλεοτιδίου (SNPs: SingleNucleotidePolymorphisms), οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της γενετικής ποικιλομορφίας στα γονιδιώματα των θηλαστικών. Βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων με βάση μικρές διαφορές στην αλληλουχία (ακόμη και ένα ζεύγος βάσεων) οι οποίες δίνουν διαφορετική δευτεροταγή δομή και διαφορετική κινητικότητα σε πηκτική. Η βασική αρχή αυτής της δοκιμής είναι ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιατάσσεται παίρνει μια ειδική διαμόρφωση. Αυτή η διαμόρφωση είναι μοναδική και εξαρτάται από την αρχική ακολουθία νουκλεοτιδίων. Αποτελεί μία μέθοδο αρκετά ευαίσθητη για να ανιχνεύσει ακόμη και διαφορά στις μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλυσίδες που καταλαμβάνουν μια διαφορετική

διαμόρφωση και όταν υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση, η παραλλαγή των νουκλεοτιδίων καταλαμβάνει μια διαφορετική θέση. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται με πολυμερισμό ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή N,N' methylene bisacrylamide. Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από την ποσότητα της ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή στο μείγμα. Όσο πιο μεγάλοι είναι οι πόροι της πηκτής, τόσο πιο γρήγορα κινούνται τα μόρια. Ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων που θα ηλεκτροφορηθούν και την ποιότητα των αποτελεσμάτων που απαιτείται, χρησιμοποιούνται πηκτές πολυακρυλαμίδης με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε κάθε περίπτωση. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα πιο αργά. Επομένως, ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων που πήραμε από τις PCR επιλέξαμε και τη συγκέντρωση της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Τα προϊόντα ενίσχυσης που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτη πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 12%, καθώς το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης ήταν σχετικά μικρό, και για την κατασκευή της οποίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες συστατικών:

Συστατικά	Ποσότητες
Ακρυλαμίδα	6 g
Bis-ακρυλαμίδα	0.2 g
Γλυκερόλη 50%	6 ml
10x TBE Buffer	3,25 ml
TEMED	65 μl
APS 20% w/v	400 ml
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τελικό όγκο 65 ml

Αρχικά προστέθηκαν η ακρυλαμίδα, η Bis-ακρυλαμίδα, η γλυκερόλη και το TBE σε ποτήρι ζέσεως, προστέθηκε το ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 60ml, ακολούθως το TBE και η γλυκερόλη και το διάλυμα αναδεύτηκε μέχρι να διαλυθεί. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθήθηκε σε έναν ογκομετρικό σωλήνα μέχρι τα 65 ml και προστέθηκαν το TEMED και το APS. Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 10μL PCR προϊόντος και 10μL χρωστικής SSCP και ακολούθησε αποδιάταξη των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου πρώτα προσθέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα, 0,5x TBE, σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες και στα 180V.

## 2.5 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO<sub>3</sub>) – Silver staining

### Υλικά:

- οξικού οξύ
- νιτρικός άργυρος
- NaOH
- NaBH<sub>4</sub>
- Φορμαλδεΰδη

➤ ddH<sub>2</sub>O

### **Μέθοδος:**

Στην τεχνική της χρώσης νιτρικού αργύρου, ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με τη φορμαλδεΐδη παρουσία βάσης. Το DNA φαίνεται καφέ σε κίτρινο φόντο. Οι πηκτές μπορούν να διατηρηθούν για αρκετό καιρό. Έτσι μετά τη χρώση της πηκτής είναι δυνατή η παρατήρηση των προτύπων.

Η χρώση των πηκτωμάτων περιλαμβάνει πλύσεις με τρία διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

1<sup>ο</sup> διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 400 ml ddH<sub>2</sub>O και 1ml οξικού οξέως
- Ακολούθησε ανακίνηση και η πρώτη πλύση με προσθήκη 200 ml του διαλύματος στο πήκτωμα για 3 λεπτά
- Τοποθέτηση των πηκτωμάτων στον αναδευτήρα
- Απομάκρυνση του διαλύματος μετά από 3 λεπτά
- Προσθήκη ξανά 200 ml διαλύματος σε κάθε πήκτωμα για 3 λεπτά για να γίνει μια δεύτερη πλύση και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος

2<sup>ο</sup> διάλυμα:

- Σε ογκομετρικό κύλινδρο έγινε προσθήκη 0,2g νιτρικού αργύρου σε 200mL ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια, το διάλυμα προστέθηκε στο πήκτωμα για 20 λεπτά
- Ξέπλυμα των πηκτωμάτων 2 φορές με ddH<sub>2</sub>O

3<sup>ο</sup> διάλυμα:

- Προσθήκη σε ποτήρι ζέσεως 3 g NaOH, 0,01 g NaBH<sub>4</sub>, 1 ml φορμαλδεΐδης και συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο τελικός όγκος του διαλύματος να φθάσει 200ml
- Προσθήκη 200 ml διαλύματος στο πήκτωμα και τοποθέτηση του στον αναδευτήρα
- Παραμονή του πηκτωματος στο διάλυμα μέχρι την εμφάνιση των ζωνών
- Απομάκρυνση του διαλύματος και μια πλύση με ddH<sub>2</sub>O

Στο τέλος της διαδικασίας τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου συσκευάστηκαν σε διαφανείς μεμβράνες για να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων. Έγινε επιλογή των δειγμάτων που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ηλεκτροφόρησης και ακολούθησε η διαδικασία του καθαρισμού των PCR προϊόντων των επιλεγμένων δειγμάτων, ώστε να σταλούν για αλληλούχηση.

## **2.6 Αλληλούχηση**

### **Μέθοδος:**

- Μέθοδος τερματισμού νουκλεοτιδικής αλυσίδας με δι-δεοξυνουκλεοτίδια (Μέθοδος κατά Sanger)

Η αλληλούχηση πραγματοποιείται και για τις δύο αλυσίδες όμως με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μία. Το προς ανάλυση τμήμα του DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση αντιγράφων τα οποία έχουν το ίδιο σημείο έναρξης αλλά διακόπτονται σε διαφορετικά σημεία. Η αρχή της μεθόδου κατά Sanger βασίζεται στην εισαγωγή τροποποιημένων δεσοξυνουκλεοτιδίων που ονομάζονται διδεσοξυνουκλεοτίδια ddNTP. Το υδρογόνο αντί υδροξυλίου στη θέση 3' της δεσοξυριβόζης και η ενσωμάτωση τους στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εμποδίζει την περαιτέρω επιμήκυνση της καθώς δεν είναι εφικτός ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Σύμφωνα με την διαδικασία της μεθόδου κατά Sanger πραγματοποιούνται παράλληλα τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις αντιγραφής της αλληλουχίας που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την DNA πολυμεράση. Απαιτείται συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό του αρχικού τμήματος που χρησιμεύει ως εκκινητής (primers). Κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις περιέχει ένα διαφορετικό ddNTP αλλά όλα τα dNTP, ένα εκ των οποίων οφείλει να είναι ραδιοσημασμένο.

Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως συστήματα αυτόματης ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όπου εφαρμόζεται η μέθοδος κατά Sanger αλλά στην πρώτη φάση γίνεται εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου με PCR. Χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, μια για κάθε βάση, laser για την διέγερση των φθοριοχρωμάτων, ανιχνευτές για τη συλλογή των εκπομπών. Τα τελικά προϊόντα ηλεκτροφορούνται όλα μαζί για να μειώνονται τα προβλήματα που οφείλονται στη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα από σειρά σε σειρά του πηκτώματος. Τα συστήματα αυτά διαθέτουν ειδικά software, τα οποία δίνουν σε σύντομο χρονικό διάστημα το αποτέλεσμα.

## 2.7 Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης

### Υλικά:

- Πρόγραμμα Bioedit

### Μέθοδος:

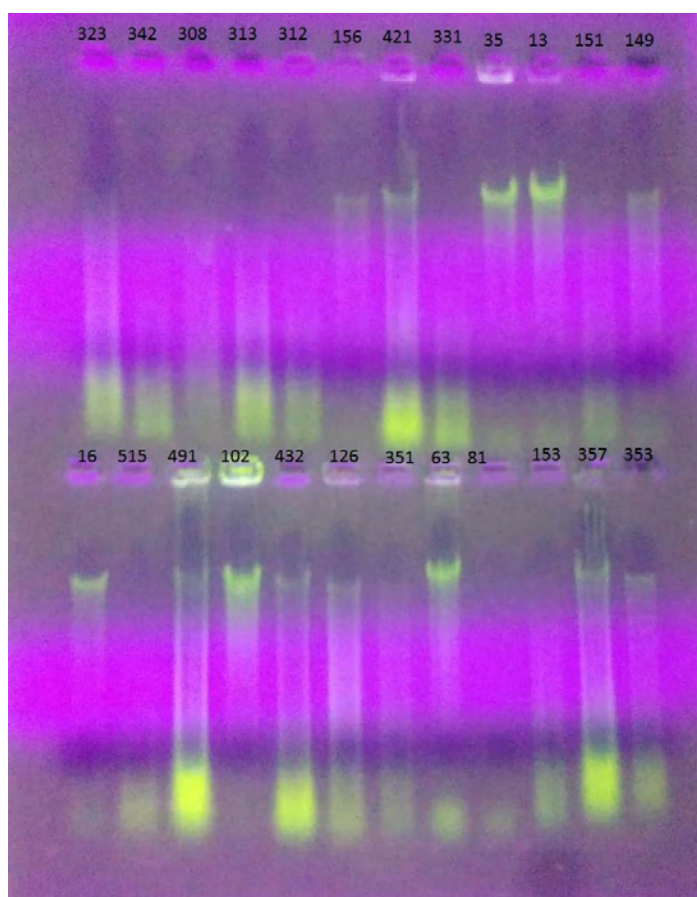
Το βιοπληροφορικό πρόγραμμα BioEdit χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης. Στο χρωματογράφημα εμφανίζονται 4 καμπύλες διαφορετικών χρωμάτων, που η κάθε μια αντιστοιχεί σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Αφού ολοκληρωθεί η επεξεργασία και στοίχιση των χρωματογραφημάτων ανακτούμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει σε μορφή FASTA.

## ***3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***



### 3.1 Οπτικοποίηση του απομονωμένου DNA των υπό μελέτη δειγμάτων λαβρακιού

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του απομονωμένου DNA των δειγμάτων που επιλέχθηκαν, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη DNA, καθώς και να διερευνηθεί ποιοτικά και ημιποσοτικά το απομονωμένο γενετικό υλικό των υπό μελέτη δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσίασαν μία διαβάθμιση στην ποσότητα και την ποιότητα του απομονωμένου DNA των δειγμάτων. Ορισμένα δείγματα χαρακτηρίστηκαν από κατακερματισμένο DNA, ενώ μερικά έφεραν υψηλότερη ή χαμηλότερη ποσότητα DNA (Εικόνα 9). Στα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης βασίστηκε η αρχική επιλογή και ρύθμιση των συνθηκών των αντιδράσεων ενίσχυσης μέσω PCR που ακολούθησαν.

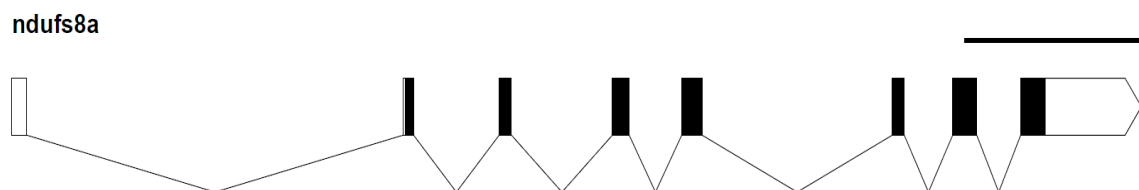


Εικόνα 9: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης DNA των υπό μελέτη δειγμάτων.

### 3.2 Ενίσχυση γενετικών τόπων του γονιδίου NDUFS8A

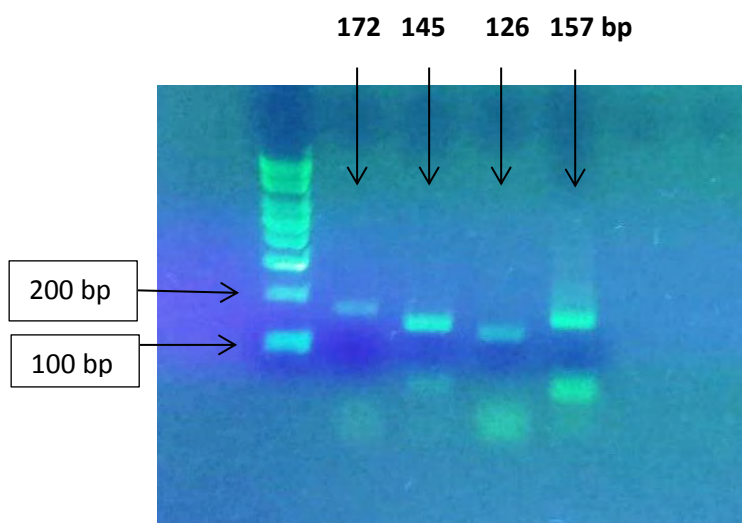
Στα πειράματα PCR που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση των πρώτων τεσσάρων εξονίων του γονιδίου NDUFS8A. Το πυρηνικό γονίδιο NDUFS8A, που εμπλέκεται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, αποτελείται συνολικά από οκτώ εξόνια, σύμφωνα με το

γονιδίωμα αναφοράς που υπάρχει στη βάση δεδομένων της UCSC Genome Browser (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Το NDUF58A φέρει 8 εξόνια. Το πρώτο, μέρος του δεύτερου και όγδοου εξονίου αντιστοιχούν στις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές.

Οι διαθέσιμες πληροφορίες για το γονιδίωμα του λαβρακιού χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την ενίσχυση των πρώτων τεσσάρων εξονίων του γονιδίου, μέσω του σχεδιασμού εκκινητών που περιγράφηκε παραπάνω, και στη συνέχεια της εύρεσης όλων των πολυμορφισμών της υπό μελέτη περιοχής του γονιδίου. Τα προϊόντα ενίσχυσης που προέκυψαν είχαν διαφορετικό μέγεθος κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11:** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των τεσσάρων προϊόντων ενίσχυσης κατά την PCR.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση των συνθηκών της κάθε αντίδρασης PCR, εναλλάσσοντας τις θερμοκρασίες υβριδισμού, τις συγκεντρώσεις DNA, εκκινητών και  $MgCl_2$ , ώστε να επιτευχθεί η ειδικότερη ενίσχυση των εξονίων. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν θερμοκρασίες υβριδισμού πολύ κοντά ή λίγο υψηλότερες από τα  $T_m$  των εκκινητών. Όπως αναφέρθηκε, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν στα ιντρόνια των γειτονικών τους εξονίων, με σκοπό την ενίσχυση και, κατ' επέκταση, τη διερεύνηση των πολυμορφισμών σε όλη την μελετώμενη κωδική περιοχή, καθώς και 5' UTR. Ωστόσο, ο

υβριδισμός των εκκινητών σε τμήματα ιντρονίων είναι πολλές φορές δυσμενής, λόγω του πιθανού υψηλού επιπέδου πολυμορφισμού των περιοχών αυτών. Εξαιτίας αυτού, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην βελτιστοποίηση των συνθηκών της κάθε αντίδρασης με τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Μετά από μία σειρά πειραμάτων ικανοποιητικά αποτελέσματα ανακτήθηκαν για τα πρώτα τέσσερα αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Το σύνολο των δειγμάτων που ενισχύθηκαν για κάθε εξόνιο

Εξόνιο	Δείγματα που ενισχύθηκαν	Κοινά δείγματα
1 <sup>ο</sup> εξόνιο	59	20
2 <sup>ο</sup> εξόνιο	52	
3 <sup>ο</sup> εξόνιο	31	
4 <sup>ο</sup> εξόνιο	33	

**Υποσημείωση:** Τα κοινά δείγματα που ενισχύθηκαν επιτυχώς και στα 4 amplicon ήταν 20.

### 3.3 Εύρεση διαφορετικών προτύπων μέσω SSCP

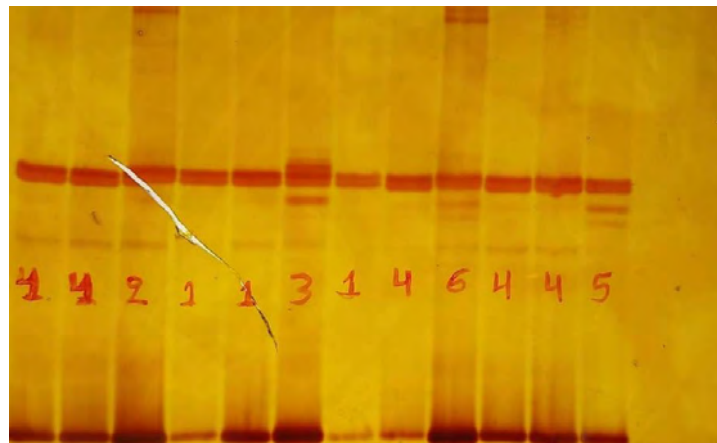
Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αποδιάταξη των ενισχυμένων προϊόντων, τα οποία, έπειτα, ηλεκτροφορήθηκαν σε gel πολυακρυλαμιδίου 12%, για περίπου 18 ώρες στα 180Volt. Η εφαρμογή της μεθόδου SSCP στα προϊόντα της PCR όλων των δειγμάτων αποκάλυψε επτά πρότυπα για το 1<sup>ο</sup> εξόνιο, τέσσερα για το 2<sup>ο</sup>, έξι για το 3<sup>ο</sup> και δύο για το 4<sup>ο</sup>. Για την ταυτοποίηση των διαφορετικών αλληλομόρφων ακολούθησε αλληλούχηση των δειγμάτων που αντιστοιχούσαν σε κάθε διαφορετικό πρότυπο.



**Εικόνα :** Ενδεικτικά αποτελέσματα της εφαρμογής SSCP σε προϊόντα ενίσχυσης του 1<sup>ου</sup> εξονίου



**Εικόνα :** Τα διαφορετικά πρότυπα των προϊόντων PCR του 2<sup>ου</sup> εξονίου



**Εικόνα :** Τα πρότυπα των προϊόντων PCR του 3<sup>ου</sup> εξονίου



**Εικόνα :** Τα πρότυπα των προϊόντων PCR του 4<sup>ου</sup> εξονίου

### 3.4 Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με τους δύο εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί για την ενίσχυση του προϊόντος PCR, επομένως προέκυψαν δύο αλληλουχίες βάσεων για κάθε ένα δείγμα: μία που αντιστοιχεί στον εκκινητή της μεταγραφόμενης αλυσίδας και μία που αντιστοιχεί στον εκκινητή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Τα αρχεία των ακολουθιών αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit® και στη συνέχεια οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν με τον αλγόριθμο ClustalX, για να βρεθούν οι περιοχές ομολογίας. Από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων του κάθε δείγματος εντοπίστηκαν δύο πολυμορφικές θέσεις. Η πρώτη εντοπίστηκε στην 5' αμετάφραστη περιοχή και η δεύτερη στο 2<sup>ο</sup> εξόνιο. Ύστερα από την στοιχίση του mRNA του γονιδίου αναφοράς (βάση δεδομένων UCSC Genome Browser) με τις τελικές αλληλουχίες, βρέθηκε ότι ο πρώτος πολυμορφισμός βρίσκεται στη θέση 57 και ο δεύτερος στη θέση 99 σύμφωνα με τις θέσεις τους στο mRNA αναφοράς. Η πρώτη πολυμορφική θέση (θέση 57) βρέθηκε ότι μπορεί να φέρει είτε νουκλεοτίδιο αδενίνης, είτε γουανίνης, ενώ η δεύτερη (θέση 99) νουκλεοτίδιο αδενίνης ή θυμίνης. Παρακάτω φαίνονται οι στοιχίσεις των πρότυπων αλληλουχιών κάθε εξονίου με το γονίδιο αναφοράς.

#### Πρότυπα 1<sup>ου</sup> εξονίου:

```

          10      20      30      40      50
5' UTR_dicLab1_genemodels_DLAgn_  TCTAACTTCC TGTAGACGCA GGGTCCGTTC TGCAAATCGT CCGCTGTTCT
s2f      .....S.....
s3f      .....
s4f      .....S.....
s5f      .....S.....
s6f      .....
s7f      .....S.....

          60      70      80
5' UTR_dicLab1_genemodels_DLAgn_  GGTTCAGAAG GCCAAATAGC GACAACTGCG
s2f      .....
s3f      .....
s4f      .....
s5f      .....
s6f      .....
s7f      .....

```

#### Πρότυπα 2<sup>ου</sup> εξονίου:

**Τμήμα της 5'UTR**

```

          10      20      30      40      50
EXON2_dicLab1_genemodels_DLAgn_  CTTCAAGGAC GTGATGGCTG CAACGTTGCG TTTACTTTAC TCCGTGTCAA
S2_A2      .....
S3_A2      .....A.....

EXON2_dicLab1_genemodels_DLAgn_  GGCCAG
S2_A2      -----
S3_A2      .....

```

Τα διαφορετικά πρότυπα αλληλόμορφα των εξονίων που εντοπίστηκαν μέσω της μεθόδου SSCP και δεν εμφάνισαν πολυμορφισμούς κατά τη επεξεργασία των χρωματογραφημάτων τους αποτελούν αποτέλεσμα πιθανών πολυμορφισμών των αντίστοιχων ιντρονικών τμημάτων που περιείχαν. Οι αλληλουχίες των τμημάτων των ιντρονίων που ενισχύθηκαν κατά την PCR αποκλείστηκαν κατά την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων, καθώς αποτέλεσαν την αρχή ή το τέλος της αλληλούχησης, όπου συχνά αναμένονται λάθη. Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατό να μελετηθεί όσο το δυνατόν περισσότερη επιθυμητή αλληλουχία του γονιδίου.

Όσον αφορά την πρώτη πολυμορφική θέση (θέση 57) εντοπίστηκαν ετερόζυγα δείγματα ως προς τη θέση αυτή, καθώς και ομόζυγα που φέρουν τα αλληλόμορφα με γουανίνη στη συγκεκριμένη θέση. Το σύνολο των δειγμάτων που ενισχύθηκαν για το 1<sup>ο</sup> εξόνιο ήταν 59. Το 71% των δειγμάτων ήταν ομόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει γουανίνη, ενώ το 24% των δειγμάτων ήταν ετερόζυγο για τη θέση 57 (Πίνακας 3). Η ανάκτηση της αλληλουχίας ενός προτύπου δεν κατέστη δυνατή. Ύστερα από την στοίχιση των πρότυπων αλληλουχιών του 1<sup>ου</sup> εξονίου με το γονίδιο αναφοράς, φάνηκε ότι το γονίδιο αναφοράς φέρει γουανίνη στη θέση 57. Η επεξεργασία της αλληλουχίας του RNA του γονιδίου μέσω του βιοπληροφορικού προγράμματος RegRNA2.0 (2018), έδειξε ότι ο πολυμορφισμός αυτός στην 5'UTR δεν εμπίπτει σε κάποια γνωστή ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου.

**Πίνακας 3:** Τα ποσοστά των δειγμάτων που εμφάνισαν τον πολυμορφισμό στη θέση 57

SNP στην 5' UTR	
G	S(G/A)
42 δείγματα (71%)	14 δείγματα (24%)

Όσον αφορά τη δεύτερη πολυμορφική θέση (θέση 99), εντοπίστηκαν ομόζυγα δείγματα που έφεραν το αλληλόμορφο τόσο με τη θυμίνη όσο και με την αδενίνη, ενώ δεν προέκυψαν ετερόζυγα δείγματα για τη θέση αυτή. Το σύνολο των δειγμάτων που ενισχύθηκε για το 2<sup>ο</sup> εξόνιο ήταν 53 και το 52% των δειγμάτων ήταν ομόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει θυμίνη, ενώ το 4% ήταν ομόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει αδενίνη στη θέση 99 (Πίνακας 4). Η ανάκτηση των αλληλουχιών δύο προτύπων του εξονίου δεν κατέστη δυνατή. Ύστερα από στοίχιση των πρότυπων αλληλουχιών του 2<sup>ου</sup> εξονίου με το γονίδιο αναφοράς, φάνηκε ότι το γονίδιο αναφοράς φέρει θυμίνη στη θέση 99. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός αυτός οδηγεί σε συνώνυμη μετάλλαξη, ύστερα από ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Bioedit.

**Πινάκας 4:** Τα ποσοστά των δειγμάτων που εμφάνισαν τον πολυμορφισμό στη θέση 99

SNP στη θέση 99	
T	A
27 δείγματα (52%)	2 δείγματα (4%)

Οι αλληλουχίες των προτύπων του 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> εξονίου δεν παρουσίασαν κάποια πολυμορφική θέση, πράγμα που σημαίνει ότι τα διαφορετικά αυτά πρότυπα που προέκυψαν κατά την SSCP έγκεινται σε διαφορές των αντίστοιχων ενισχυμένων ιντρονικών περιοχών που έφεραν.

## **4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



Τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη των θαλάσσιων ιχθυοκαλλιεργειών είναι η τσιπούρα και το λαβράκι, τα οποία αποτελούν περίπου το 55% και 40% της συνολικής παραγωγής ιχθύων. Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι ένα σημαντικό και υψηλής εμπορικής αξίας είδος στην Ευρώπη, του οποίου η καλλιέργεια είναι ευρέως διαδεδομένη και εδραιωμένη στην Μεσόγειο. Οι κύριες χώρες που εκτρέφουν λαβράκι είναι η Ελλάδα, η Ισπανία και η Τουρκία. Επομένως, η μελέτη τόσο σε επίπεδο γονιδιώματος όσο και σε επίπεδο πληθυσμών μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στη αύξηση της ποιότητας και της ποσότητας της παραγωγής των εκτρεφόμενων ψαριών. Για το λόγο αυτό, στις χώρες όπου το λαβράκι κατέχει υψηλή διατροφική αξία, όλο και περισσότερες μελέτες λαμβάνουν χώρα, ώστε να αποκαλυφθούν χρήσιμες πληροφορίες για το είδος.

Όσον αφορά το γονιδίωμα του λαβρακιού, υπάρχει ένα μοναδικό γονιδίωμα διαθέσιμο στη βάση δεδομένων UCSC Genome Browser. Το λαβράκι ανήκει στην οικογένεια των Μαρονίδων και πρόκειται για ένα τελεόστεο ψάρι. Οι τελεόστεοι περιλαμβάνουν μερικά από τα πιο ποικιλόμορφα είδη σπονδυλωτών, τα οποία, μάλιστα, χαρακτηρίζονται από έναν ειδικό για τα ψάρια διπλασιασμό γονιδιωμάτων, στον οποίον πιθανότατα και να οφείλεται ο υψηλός βαθμός βιοποικιλότητας τους. Συνεπώς, είναι σαφής η ανάγκη που δημιουργείται για την συλλογή και αξιολόγηση πληροφοριών που να αποκαλύπτουν την ποικιλομορφία αυτή στο λαβράκι. Η πραγματοποίηση πληθυσμιακών αναλύσεων μπορεί να οδηγήσει στην βελτιστοποίηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ψαριών, καθώς και στον αποτελεσματικό έλεγχο της ανάπτυξής τους.

Σχεδόν όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν την οξειδωτική φωσφορυλίωση για να παράγουν την απαιτούμενη ενέργεια για τη σωστή κυτταρική λειτουργία. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι το τέταρτο βήμα της κυτταρικής αναπνοής και παράγει την περισσότερη ενέργεια κατά την αναπνοή (Efremov & Sazanov, 2012). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η πρωτογενής αυτή βιολογική διεργασία παραγωγής ενέργειας, παράγει ATP, βασιζόμενοι σε προϊόντα τόσο των πυρηνικών όσο και των μιτοχονδριακών γονιδίων. Εφόσον το σύνολο των γονιδίων αυτών κωδικοποιεί προϊόντα, τα οποία οργανώνονται στα αναπνευστικά σύμπλοκα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, είναι απαραίτητο να υπόκειται σε συγκεκριμένους εξελικτικούς περιορισμούς/φραγμούς για την σωστή λειτουργία του συστήματος. Το λαβρακί αλλά και τα περισσότερα τελεόστεα ψάρια χαρακτηρίζονται από διπλασιασμένα γονίδια οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα οποία φαίνονται να είναι απόρροια του 3R. Σύμφωνα με την υπόθεση της γονιδιακής ισορροπίας, μετά από έναν διπλασιασμό γονιδιώματος, ορισμένα γονίδια χάνονται, ενώ άλλα διατηρούνται (Edger & Pires et al. 2009). Το σίγουρο είναι ότι η «μοίρα» των ρυθμιστικών διπλασιασμένων γονιδίων και μάλιστα των γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης δεν είναι τυχαία, αλλά υφίσταται ιδιαίτερη εξελικτική πίεση.

Το σύμπλοκο I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι το πρώτο και μεγαλύτερο από τα σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με μοριακή μάζα που αγγίζει το 1 MDa (Hirst, 2013). Αποτελεί το κύριο σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και συζευγνύει την μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στην ουβικινόνη, με την άντληση 4 πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης (Grandt et al. 2016). Το σύμπλοκο I αποτελείται από ένα υδρόφιλο περιφερικό άκρο στο οποίο λαμβάνει χώρα η μεταφορά  $e^-$  και μία υδρόφοβη μεμβρανική περιοχή όπου πραγματοποιείται η άντληση των  $H^+$ . Όλοι οι

συμπαράγοντες του συμπλόκου I (το φλαβινοουκλεοτίδιο και τα σιδηροθειούχα σύμπλοκα) βρίσκονται στο περιφερικό άκρο του συμπλόκου. Το σύμπλοκο I είναι ένα ένζυμο-κλειδί για την αναπνευστική αλυσίδα σε όλους τους οργανισμούς. Το πολυπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο με μία περίπλοκη εξελικτική πορεία προήλθε από την συνένωση προϋπάρχοντων μορίων αφυδρογονάσης και μεταφορέων (Grandt et al. 2016). Το σύμπλοκο I στους τελεοστέους και κατ' επέκταση στο λαβράκι που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό διπλασιασμένων γονιδίων, και η μελέτη ενός από αυτά σε επίπεδο πληθυσμού επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία.

Το γονίδιο NDUFS8 είναι ένα πυρηνικό γονίδιο του συμπλόκου I με δύο παράλογα γονίδια στο λαβράκι. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια σιδηρο-θειούχα υπομονάδα, την Nuoi/ΤΥΚΥ, η οποία εντοπίζεται στην αμφιπαθή περιοχή του συμπλόκου I. Η περιοχή σύνδεσης του υδρόφιλου με το μεμβρανικό τμήμα του συμπλόκου I παίζει σημαντικό ρόλο στη σύζευξη της μεταφοράς ηλεκτρονίων με την άντληση πρωτονίων από την μιτοχονδριακή μήτρα. Η περιοχή αυτή σύνδεσης περιλαμβάνει δύο υπομονάδες, την PSST(NQO6/NuoB) και ΤΥΚΥ(NQO9/Nuoi). Επομένως, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη των συστατικών μεταφοράς σε αυτήν την περιοχή είναι ιδιαίτερα σημαντική (Yano et al. 2000). Το γονίδιο NDUFS8 έχει χαρακτηριστεί ως υψηλά συντηρημένο σε διάφορους οργανισμούς, από έντομα όπως η δροσόφιλα (Joel Garcia et al. 2018), μέχρι και τον άνθρωπο (Loeffen et al. 1998). Επιπλέον, ανήκει στα πρωταρχικά γονίδια συναρμολόγησης της περιοχής που συνδέει το μεμβρανικό με το υδρόφιλο τμήμα του συμπλόκου I στα βακτήρια. Η συναρμολόγηση της περιοχής αυτής αποτελεί ένα από τα βασικά βήματα κατά τη βιογένεση του συμπλόκου I. Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν δύο πολυμορφικές θέσεις στο τμήμα του γονιδίου NDUFS8A που μελετήθηκε. Η πρώτη βρίσκεται στην 5' UTR και δεν εμπλέκεται σε κάποια γνωστή ρυθμιστική περιοχή. Η δεύτερη μετάλλαξη βρίσκεται σε κωδική περιοχή του γονιδίου, ωστόσο πρόκειται για συνώνυμη μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με μελέτες του γονιδίου σε άλλους οργανισμούς. Το γονίδιο NDUFS8, πιθανώς, υφίσταται μεγάλη εξελικτική πίεση, ώστε να διατηρηθεί, καθώς φαίνεται να είναι κρίσιμο για την επιβίωση του οργανισμού. Η συσσώρευση μη συνώνυμων μεταλλάξεων στο γονίδιο NDUFS8 ίσως έβαζε σε κίνδυνο την επιβίωση των οργανισμών.

## Μελλοντικές προσεγγίσεις

Τα παράλογα γονίδια αποτελούν κύριο υπόστρωμα για την προσαρμογή και την εξέλιξη του οργανισμού, πόσο μάλλον όταν αυτά τα γονίδια και τα προϊόντα αυτών αποτελούν μέρος ενός πολύπρωτεϊνικού συμπλόκου, θεμελιώδους σημασίας για την επιβίωση του οργανισμού. Η μελέτη, λοιπόν, τέτοιων γονιδίων σε ένα είδος το οποίο χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ποικιλομορφία αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας με στόχο την βελτιστοποίηση της παραγωγής του λαβρακιού.

Συγκεκριμένα, η στόχευση προς αυτήν την κατεύθυνση θα μπορούσε να ακολουθηθεί με τα παρακάτω βήματα:

- Καταρχήν, η ολοκλήρωση της ανάλυσης εντοπισμού πολυμορφισμών στο γονίδιο NDUF58A θα πρέπει να συνεχιστεί για τα υπόλοιπα εξόνια του γονιδίου, ώστε να διερευνηθεί το επίπεδο πολυμορφισμού σε όλη την κωδική περιοχή του γονιδίου, καθώς και των αμετάφραστων περιοχών του. Στο παράλογο γονίδιο NDUF58B δεν εντοπίστηκε καμία πολυμορφική θέση.
- Ο αριθμός των δειγμάτων που ενισχύθηκε για το γονίδιο NDUF58A στην παρούσα εργασία ήταν σχετικά περιορισμένος. Επομένως, η ενίσχυση και μελέτη περισσότερων δειγμάτων, θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό περισσότερων πιθανών πολυμορφισμών. Επιπρόσθετα, η αύξηση της γεωγραφικής κατανομής των δειγμάτων θα δώσει μια πιο σφαιρική εικόνα του επιπέδου πολυμορφισμού του γονιδίου. Η συλλογή δειγμάτων από διαφορετικές ιχθυοκαλλιέργειες αυξημένης κατανομής θα μπορούσε να ακολουθηθεί σε μία μελλοντική μελέτη.
- Η μελέτη των παράλογων γονιδίων συνεισφέρει στη μελέτη της λειτουργικής απόκλισης και ποικιλότητας ενός οργανισμού. Η λειτουργική αυτή ποικιλότητα έγκειται συχνά στην γονιδιακή έκφραση και τα χαρακτηριστικά των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Συνεπώς, παρακάτω θα προταθούν κάποια βήματα για την μελέτη του ζεύγους παράλογων NDUF58A και NDUF58B:
  1. Ο καθορισμός των ρυθμιστικών περιοχών των δύο παραλόγων θα επιτρέψει, πρώτον, την στοχευμένη μελέτη των περιοχών αυτών και, δεύτερον, την συγκριτική ανάλυση των περιοχών αυτών στα δύο αντίγραφα του γονιδίου.
  2. Ο προσδιορισμός της έκφρασης των δύο γονιδίων αποτελεί, επίσης, ιδιαίτερα σημαντικός και μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω εφαρμογής ποσοτικής PCR (qPCR). Η μελέτη της έκφρασης των δύο γονιδίων, μπορεί να αποκαλύψει διαφορές στην έκφραση των δύο παράλογων γονιδίων, καθώς και στις συνθήκες υπό τις οποίες εκφράζονται. Μακροπρόθεσμα, μπορεί να εφαρμοστεί RNAi σίγηση του κάθε γονιδίου και να εντοπιστεί η επίδραση της κάθε σίγησης στη λειτουργία.
  3. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των δύο γονιδίων με άλλα γονίδια θα μπορούσε, επίσης, να δώσει πληροφορίες για τον ακριβή ρόλο των δύο γονιδίων στον καθορισμό φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του οργανισμού. Αυτό θα μπορούσε να διερευνηθεί μέσω κατασκευής knock-out λαβρακίων για καθένα από τα δύο γονίδια, ώστε να μελετηθεί και να συγκριθεί η ανάπτυξη των οργανισμών αυτών.
- Η μελέτη περισσότερων διπλασιασμένων γονιδίων του συμπλόκου I, μπορεί να συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση του αποτυπώματος του 3R στο λαβράκι. Επιπλέον, η στόχευση προς διπλασιασμένα γονίδια του συμπλόκου I που έρχονται σε άμεση επαφή με μιτοχονδριακές υπομονάδες, καθώς και η μελέτη των μιτοχονδριακών αυτών υπομονάδων, είναι πιθανό να παρέχει νέες πληροφορίες για τη θεωρία της συνεξέλιξης μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.
- Η εξελικτική πορεία των γονιδίων του συμπλόκου I δεν είναι τυχαία. Τα γονίδια αυτά επιλέγονται αυστηρά να διατηρηθούν είτε σε ένα είτε σε δύο αντίγραφα.

Συνεπώς, η μελέτη, σε δεύτερο χρόνο, μη διπλασιασμένων γονιδίων με κύριο ρυθμιστικό ρόλο στην συναρμολόγηση και συνεργασία με μιτοχονδριακές υπομονάδες αποτελεί εξίσου σημαντική. Πιθανώς, το διπλασιασμένο πρότυπο για αυτά τα γονίδια να αποτελεί επιβλαβές για τη λειτουργία και επιβίωση του οργανισμού και για αυτό το λόγο να οδηγείται στην απώλεια του. Τέλος, η σύγκριση του επιπέδου πολυμορφισμού μεταξύ διπλασιασμένων και μη γονιδίων του συμπλόκου I θα μπορούσε να αποκαλύψει πληροφορίες σχετικά με το ρόλο και την εξέλιξη των γονιδίων αυτών.

## ***5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

- A. De Grassi, C. Caggese, D. D'Elia, C. Lanave, G. Pesole, C. Saccone Evolution of uclearly encoded mt genes in MetazoaGene, 354 (2005), pp. 181-188
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH (1998) Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. Science 282:1711–1714
- Anim. Genet., 37 (2006), p. 526
- Arias, A., 1980 Crecimiento, régmen alimentario y reproduccion de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cadiz. Investigación Pesquera 44: 59-83.
- Benharrat K, Pasteur N, Siau Y, Bouain A. Recherches Biologiques et Aquaculture. Vol. I. Journées d'études de Montpellier. Brest, France: CNEXO-BNDO; 1983. Polymorphisme biochimique de loups (*Dicentrarchus labrax*) originaires de quatre populations naturelles et d'un élevage; pp. 1–17
- Bermejo-Nogales A, Nederlof M, Benedito-Palos L, Ballester-Lozano GF, Folkedal O, Olsen RE, et al. Metabolic and transcriptional responses of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to environmental stress: New insights in fish mitochondrial phenotyping. Gen Comp Endocrinol. 2014; 205: 305–315. pmid:24792819
- billfishes for life in the pelagic environment. Environmental Biology of Fishes Biophys Acta. 2004 1659:212-20
- Blazquez, M., S. Zanuy, M. Carrillo and F. Piferrer, 1998. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool. 281: 207–216.
- Blazquez, M., S. Zanuy, M. Carrillo and F. Piferrer, 1998. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool. 281: 207–216
- Block BA, Booth D, Carey FG 1992. Direct measurement of swimming speeds and depth of blue marlin. Journal of Experimental Biology 166: 267-284
- Brand M. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. Biochem Soc Trans. 2005;33(5):897–904. doi: 10.1042/BST0330897
- Bremer K, Moyes CD. Origins of variation in muscle cytochrome c oxidase activity within and between fish species. J Exp Biol. 2011; 214: 1888–1895. pmid:21562176
- Brunet, F., Crollius, H., Paris, M., Aury, J., Gibert, P., & Jaillon, O. et al. (2006). Gene Loss and Evolutionary Rates Following Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes. Molecular Biology And Evolution, 23(9), 1808-1816.
- Bull, J. J., and R. C. Vogt, 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. Science 206: 1186–1188.
- Bull, J. J., R. C. Vogt and M. G. Bulmer, 1982. Heritability of sex ratio in turtles with environmental sex determination. Evolution 36:333–341

- cDNA sequence and chromosomal localization of the NDUFS8 human gene coding for the 23 kDa subunit of the mitochondrial complex I *Biochim Biophys Acta*, 1351 (1997), pp. 37-41
- climates: molecular mechanisms. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83 (5), 721-732.
- Comai L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid, *Nat Rev Genet* , vol. 6 (pg. 836-846)
- Construction and characterization of a BAC library for the European sea bass *Dicentrarchus labrax*
- Coyne JA, Orr HA (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 287–305
- D.F. Kelley (1998)The importance of estuaries for sea-bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Biol.*, 33, pp. 25-33
- D.M. Kirby, R. McFarland, A. Ohtake, C. Dunning, M.T. Ryan, C. Wilson, D. Ketteridge, D.M. Turnbull, D.R. Thorburn, R.W. Taylor Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS *J. Med. Genet.*, 41 (2004), pp. 784-789
- Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Jr Kazazian HH. (2003)Mobile elements and mammalian genome evolution, *Curr Opin Genet Dev*, vol. 13 (pg. 651-658)
- Developmental expression of DAX1 in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: lack of evidence for sexual dimorphism during sex differentiation
- Dickson KA 1995. Unique adaptations of the metabolic biochemistry of tunas and
- Edger, P., & Pires, J. (2009). Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Research*, 17(5), 699-717
- Efremov, R., & Sazanov, L. (2012). The coupling mechanism of respiratory complex I — A structural and evolutionary perspective. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(10), 1785-1795
- Everett MV, Antal CE, Crawford DL. The effect of short-term hypoxic exposure on metabolic gene expression. *J Exp Zool.* 2012; 317A: 9–23
- Everett, M., Antal, C., & Crawford, D. (2011). The effect of short-term hypoxic exposure on metabolic gene expression. *Journal Of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics And Physiology*, 317A(1), 9-23. doi:10.1002/jez.717
- Eya JC, Ashame MF, Pomeroy CF. Association of mitochondrial function with feed efficiency in rainbow trout: Diets and family effects. *Aquaculture.* 2011; 321: 71–84.
- G. Tripoli, D. D'Elia, P. Barsanti, C. Maggese Comparison of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) nuclear genes in the genomes of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila pseudoobscura* and *Anopheles gambiae**Genome Biol.*, 6 (2005), p. R11
- Gabaldón, T. and Huynen, M. A. "Shaping the mitochondrial proteome".*Biochim*
- Gabaldón, T. and Huynen, M. A. "Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism".*Science.* 2003 301:609

- Garcia de León FJ, Chikhi L, Bonhomme F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) *Mol. Ecol.* 1997;6:51–62
- Gershoni M, Templeton A, Mishmar D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation, *Bioessays*, 2009, vol. 31 (pg. 642-650)
- Glasauer, S., & Neuhauss, S. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics And Genomics*, 289(6), 1045-1060
- Gnanadt, E., Dörner, K., Strampraad, M., de Vries, S., & Friedrich, T. (2016). The multitude of iron–sulfur clusters in respiratory complex I. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), 1068-1072
- Gout J-F, Kahn D, Duret L (2010) The relationship among gene expression, the evolution of gene dosage, and the rate of protein evolution. *PLoS Genet* 6:e1000944
- H.A. Whitaker, B.J. McAndrew, J.B. Taggart
- Hakes L, Pinney JW, Lovell SC, Oliver SG, Robertson DL (2007) All duplicates are not equal: the difference between small-scale and genome duplication. *Genome Biol* 8:R209
- J.L. Loeffen, J.A. Smeitink, J.M. Trijbels, A.J. Janssen, R.H. Triepels, R.C. Sengers, L.P. van den Heuvel Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects *Hum. Mutat.*, 15 (2000), pp. 123-134
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology, *J Inherit Metab Dis.*, 2006, vol. 29 (pg. 499-515)
- Kassahn KS, Dang VT, Wilkins SJ, Perkins AC, Ragan MA (2009) Evolution of gene function and regulatory control after whole-genome duplication: comparative analyses in vertebrates. *Genome Res* 19:1404–1418
- Kelley, D. F., 1988 The importance of estuaries for sea-bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Biology* 33 (Suppl. A): 25-33.
- Kirpichnikov, V. S., 1981. *Genetic Bases of Fish Selection*. Springer-Verlag, Berlin
- Kuhl, H., Beck, A., Wozniak, G., Canario, A., Volckaert, F., & Reinhardt, R. (2010). The European sea bass *Dicentrarchus labrax* genome puzzle: comparative BAC-mapping and low coverage shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 11(1), 68.
- Kuhl, H., Tine, M., Beck, A., Timmermann, B., Kodira, C., & Reinhardt, R. (2011). Directed sequencing and annotation of three *Dicentrarchus labrax* L. chromosomes by applying Sanger- and pyrosequencing technologies on pooled DNA of comparatively mapped BAC clones. *Genomics*, 98(3), 202-212.
- Lazarou, M., Thorburn, D., Ryan, M., & McKenzie, M. (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), 78-88. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.04.015
- Leaver MJ, Villeneuve LA, Obach A, Jensen L, Bron JE, Tocher DR, Taggart JB: Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty



- acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*. 2008, 9 (299)
- Ljubicic V, Joseph A-M, Saleem A, Uguccioni G, Collu-Marchese M, Lai RYJ, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Effects of exercise and aging. *BBA Gen Subjects*. 2010; 1800: 223–234. pmid:19682549
  - Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., & Sengers, R. et al. (1998). The First Nuclear-Encoded Complex I Mutation in a Patient with Leigh Syndrome. *The American Journal Of Human Genetics*, 63(6), 1598-1608.
  - Lohman, B., Steinel, N., Weber, J., & Bolnick, D. (2017). The role of gene expression in the recent evolution of resistance in a model host parasite system
  - Lucassen M, Schmidt A, Eckerle LG, Portner HO. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and temperate zoarcid fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285: R1410–R1420. pmid:12907412
  - Lynch, M., and M. O'Hely, 2001. Captive breeding and the genetic fitness of natural populations. *Conserv. Genet.* 2: 363–378
  - M Chevallet, A Dupuis, J Lunardi, R van Belzen, SP Albracht, JP Issartel The Nuol subunit of the *Rhodobacter capsulatus* respiratory complex I (equivalent to the bovine TYKY subunit) is required for proper assembly of the membraneous and peripheral domains of the enzyme *Eur J Biochem*, 250 (1997), pp. 451-458
  - M Duarte, M Finel, A Videira Primary structure of a ferredoxin-like iron-sulfur ubunit of complex I from *Neurospora crassa* *Biochim Biophys Acta*, 1275 (1996), pp. 151-153
  - M. Finel, J.M. Skehel, S.P. Albracht, I.M. Fearnley, J.E. Walker Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme *Biochemistry*, 31 (1992), pp. 11425-11434
  - Meyer A, Schartl M (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 11: 699–704.
  - Miller KM, Schulze AD, Ginther N, Li S, Patterson DA, Farrell AP, et al. Salmon spawning migration: Metabolic shifts and environmental triggers. *Comp Biochem Physiol D Genomics Proteomics*. 2009; 4: 75–89. pmid:20403740
  - Misof BY, Wagner GP (1996) Evidence for four Hox clusters in the killifish *Fundulus heteroclitus* (teleostei). *Mol Phylogenet Evol* 5:309–322
  - Mylonas, C. C., L. Anezaki, P. Divanach, S. Zanuy, F. Piferrer et al., 2005. Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. *J. Fish Biol.* 67: 652–668

- N. Grigorieff Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J. Mol. Biol.*, 277 (1998), pp. 1033-1046  
*Nature*, 392 (6671) (1998), pp. 15-16
- Naylor RL, Burke M: Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Annu Rev Environ Resour.* 2005, 30: 185-210. 10.1146/annurev.energy.30.081804.121034.
- Nelson JS (1994). *Fishes of the World*, 3rd edn. John Wiley and Sons: New York
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet* 19:141–147
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34:401–437
- P. Hinchliffe, L.A. Sazanov Organization of iron–sulfur clusters in respiratory complex I *Science*, 309 (2005), pp. 771-774
- Pickett, G. D., and M. G. Pawson, 1994 *Seabass - Biology, exploitation and conservation.* Chapman & Hall, London, UK -325.
- Pujolar JM, Marino IAM, Milan M, Coppe A, Maes GE, Capoccioni F, et al. Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics.* 2012; 13: 507. pmid:23009661
- R.A. Veitia Exploring the etiology of haploinsufficiency *Bioessays*, 24 (2002), pp. 175-184
- R.S. Martins, L.A. Deloffre, C.C. Mylonas, D.M. Power, A.V. Canario
- Rand D, Haney R, Fry A. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation, *Trends Ecol Evol.* , 2004, vol. 19 (pg. 645-653)  
*Reprod. Biol. Endocrinol.*, 5 (2007), p. 19
- Rescan PY, Montfort J, Rallièrre C, Le Cam A, Esquerré D, Hugot K. Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth induced by a fasting-refeeding schedule. *BMC Genomics.* 2007; 8: 438. pmid:18045468
- Rice, W. R., 1986. On the instability of polygenic sex determination: the effect of sex-specific selection. *Evolution* 40: 633–639
- Saccone, C., Lanave, C., & De Grassi, A. (2006). Metazoan OXPHOS gene families: Evolutionary forces at the level of mitochondrial and nuclear genomes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9-10), 1171-1178
- Saillant, E., B. Chatain, B. Menu, C. Fauvel, M. O. Vidal et al. 2003a Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal Of Zoology* 260: 53-63.
- Saillant, E., B. Chatain, B. Menu, C. Fauvel, M. O. Vidal et al., 2003. a Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Zool.* 260: 53–63
- Scannell DR, Byrne KP, Gordon JL, Wong S, Wolfe KH (2006) Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts. *Nature* 440:341–345

- Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Seebacher, F., Brand, M. D., Else, P., Guderley, H., Hulbert, A. J., Moyes, C. D., & (2010). Plasticity of oxidative metabolism in variable
- Semon, M., & Wolfe, K. (2006). Rearrangement Rate following the Whole-Genome Duplication in Teleosts. *Molecular Biology And Evolution*, 24(3), 860-867
- Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 737385. pmid:20396601
- Soares SS, Gutiérrez-Merino C, Aureliano M. Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquat Toxicol.* 2007; 83: 1–9. pmid:17420061
- Soltis PS, Soltis DE (2004) The origin and diversification of angiosperms. *Am J Bot* 91:1614–1626
- T. Friedrich, D. Scheide The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases *FEBS Lett.*, 479 (2000), pp. 1-5
- T. Gabaldon, M.A. Huynen Lineage-specific gene loss following mitochondrial endosymbiosis and its potential for function prediction in eukaryotes *Bioinformatics*, 21 (2) (2005), pp. ii144-ii150
- Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P., Louro, B., Desmarais, E., & Martins, R. et al. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications*, 5(1)
- U Weidner, S Geier, A Ptock, T Friedrich, H Leif, H Weiss The gene locus of the proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*: organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of the mitochondrial complex I *J Mol Biol*, 233 (1993), pp. 109-122
- Ugalde, C., et al. "Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies". *Hum Mol Genet.* 2004 13:2461-72
- V Procaccio, D Depetris, P Soularue, MG Mattei, J Lunardi, JP Issartel
- V.N. Babenko, D.M. Krylov Comparative analysis of complete genomes reveals gene loss, acquisition and acceleration of evolutionary rates in Metazoa, suggests a prevalence of evolution via gene acquisition and indicates that the evolutionary rates in animals tend to be conserved *Nucleic Acids Res.*, 32 (2004), pp. 5029-5035
- Van de Peer Y (2004) Tetraodon genome confirms Takifugu findings: most fish are ancient polyploids. *Genome Biology* 5(12), art. no. 250
- Vandeputte M, Baroiller JF, Haffray P, Quillet E: Genetic improvement of fish: Achievements and challenges for tomorrow. *Cahiers Agricultures.* 2009, 18 (2): 262-269.

- Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., & Chatain, B. (2006). A Polygenic Hypothesis for Sex Determination in the European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics*, 176(2), 1049-1057.
- Veitia RA (2002) Exploring the etiology of haploinsufficiency. *BioEssays* 24:175–184
- Vogel G. 1998. Doubled genes may explain fish diversity. *Science* 281:1119–21.
- Volckaert FAM, Batargias C, Canario A, Chatziplis D, Chistiakhov D, Haley C. European sea bass. In: Kocher TD, Cole C, et al., editors. *Genome mapping and genomics in animals. Vol. 2: Genome mapping and genomics in fishes and aquatic animals*. Berlin: Springer-Verlag; 2008. pp. 117–133
- Volff JN, Schartl M (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* 111: 101–110.
- Volff JN. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94:280–94
- Volff, J. (2004). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94(3), 280-294
- W. Martin, M. Muller The hydrogen hypothesis for the first eukaryote
- Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging, *Environ Mol Mutagen.* , 2010, vol. 51 (pg. 440-450)
- Wittbrodt J, Meyer A, Schartl M (1998) More genes in fish? *BioEssays* 20:511–515
- X. Gu, Y. Wang, J. Gu Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplication in vertebrate evolution *Nat. Genet.*, 31 (2002), pp. 128-129
- Yano, T., Magnitsky, S., & Ohnishi, T. (2000). Characterization of the complex I-associated ubiquinone species: toward the understanding of their functional roles in the electron/proton transfer reaction. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1459(2-3), 299-304. doi:10.1016/s0005-2728(00)00164-x
- Zhang F, Broughton RE. Mitochondrial-nuclear interactions: compensatory evolution or variable functional constraint among vertebrate oxidative phosphorylation genes? *Genome Biol Evol.* 2013; 5: 1781–1791. pmid:23995460
- Zhang, F., & Broughton, R. (2013). Mitochondrial–Nuclear Interactions: Compensatory Evolution or Variable Functional Constraint among Vertebrate Oxidative Phosphorylation Genes?. *Genome Biology And Evolution*, 5(10), 1781-1791. doi:10.1093/gbe/evt129
- Zhang, F., & Broughton, R. (2013). Mitochondrial–Nuclear Interactions: Compensatory Evolution or Variable Functional Constraint among Vertebrate Oxidative Phosphorylation Genes?. *Genome Biology And Evolution*, 5(10), 1781-1791.
- Zhang, F., & Broughton, R. (2015). Heterogeneous natural selection on oxidative phosphorylation genes among fishes with extreme high and low aerobic performance. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1). doi:10.1186/s12862-015-0453-7