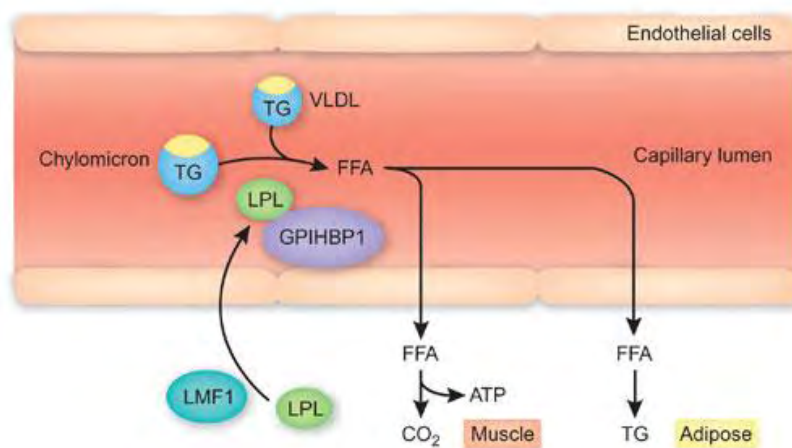


Φυλογένεση και έκφραση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης  
(*lpl-like*) στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας  
(*Sparus aurata*)



Πτυχιακή εργασία της Αλεξάνδρας Γιώβου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κατερίνα Μούτου

Λάρισα 2017

## **SUMMARY**

Lipoprotein lipase (LPL) catalyses the hydrolysis of the triacylglycerol component of circulating chylomicrons and very low density lipoproteins, thereby providing non-esterified fatty acids and 2-monoacylglycerol for tissue utilisation. Research carried out over the past two decades have not only established a central role for LPL in the overall lipid metabolism and transport but have also identified additional, non-catalytic functions of the enzyme. Advances have also been made involving the changes in LPL expression seen in response to nutritional and other physiological changes. The research involving the genomic and molecular regulation of this important enzyme in teleosts revealed another similar molecule with analogous catalytic function which was named *lpl-like*. Although, the gene responsible for its encoding, the molecular characteristics and the tissue distribution, especially in skeletal muscles, have been defined, the physiological function of this isoform, is largely unknown. Moreover during the evolution, the vertebrates underwent two rounds of whole-genome duplication (R1, R2), followed by a third one (TS-WGD) specific in the teleost lineage. In the present study we examined the phylogenesis and expression of this enzyme in the early developmental stages of the gilthead seabream (*Sparus aurata*).

The study was conducted in larvae of gilthead seabream during the developmental stages from 15, 25, 35, and 48 dph and also in 58dph when the larvae was sorted according to their sizes, using Q-PCR for measuring the expression levels of *lpl-like*. Also we studied the phylogenesis of *lpl* and *lpl-like* between various species including not only teleosts but also non-teleosts and tetrapods. A synteny for these two genes was constructed.

Our results showed that *lpl-like* is expressed in the early stages of larval development with the maximum peak occurring at 25 dph, an age which coincides with the beginning of exogenous feeding and active swimming. By metamorphosis (58 dph) the levels of *lpl-like* expression were significantly higher in larger individuals compared with the smaller. Our *in silico* searches and phylogenetic analysis showed that the *lpl-like* gene is closely related to the *lpl* gene more than it is to the other members of the lipase family genes. Also, it was found that according to the synteny the *lpl-like* gene is a product of tandem duplication of the *lpl* gene. Furthermore we identified for the first time one more *lpl* gene in *Danio rerio*, *Astyanax mexicanus* and *Gadus morhua*, probably from an independent interspecific duplication in these teleost species. Further studies are needed in order to define precisely the biological and functional role of *lpl-like* as well as the phylogeny of this gene and the second gene of *lpl* must be annotated experimentally.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων που προέρχονται από τα χυλομικρά και την VLDL, παρέχοντας έτσι μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα και 2-μονοακυλογλυκερόλη στους ιστούς. Προηγούμενες έρευνες τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταστήσει ξεκάθαρο το κεντρικό ρόλο της LPL στο μεταβολισμό και τη μεταφορά των λιπιδίων και αναγνώρισαν επιπλέον μη καταλυτικές λειτουργίες του ενζύμου. Επίσης, έχουν γίνει πρόοδοι που σχετίζονται με τις διαφορές της έκφρασης της LPL σε απόκριση σε διαφορετικές διατροφικές και φυσιολογικές καταστάσεις. Η εκτεταμένη έρευνα που αφορά τη γονιδιακή και τη μοριακή ρύθμιση της LPL αποκάλυψε την ύπαρξη ενός παρόμοιου μορίου με ανάλογη λειτουργία και η οποία χαρακτηρίστηκε ως *lpl-like*. Αν και το γονίδιο, τα μοριακά χαρακτηριστικά και η ιστική κατανομή, κυρίως στους σκελετικούς μύες, έχουν προσδιορισθεί, η φυσιολογική σημασία της λειτουργίας αυτού του μορίου παραμένει άγνωστη. Επιπλέον, κατά την διάρκεια της εξέλιξης, τα σπονδυλωτά υπέστησαν δυο κύκλους διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (R1,R2,) και ακολούθησε ένας τρίτος κύκλος (TS-WGD) που συνέβη αποκλειστικά στη γενεαλογία των τελεόστεων. Στη παρούσα μελέτη εξετάσαμε τη φυλογένεση και την έκφραση της *lpl-like* κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας.

Η μελέτη διεξήχθη σε προνύμφες της τσιπούρας κατά τις 25, 35, και 48 dph και επίσης κατά την 58 dph όταν έγινε διαλογή των προνυμφών ανάλογα με το μέγεθος τους. Η έκφραση του γονιδίου της *lpl-like* μετρήθηκε με Q-PCR. Επίσης, μελετήθηκε η φυλογένεση της *lpl-like* και της LPL μεταξύ διαφόρων ειδών συμπεριλαμβανομένων τελεόστεων, μη-τελεόστεων και τετράποδων. Κατασκευάστηκε και η συνταϊνικότητα των δυο γονιδίων.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η *lpl-like* εκφράζεται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών της τσιπούρας με τη μέγιστη έκφραση να εμφανίζεται την 25 dph, μια ηλικία που συμπίπτει με την έναρξη της εξωγενούς σίτισης και της έντονης κινητικότητας. Κατά τη μεταμόρφωση (58 dph), τα μεγαλύτερα σε μέγεθος άτομα είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της *lpl-like* από ότι τα μικρότερα. Όσον αφορά την φυλογένεση οι *in silico* έρευνες μας έδειξαν ότι η *lpl-like* ομαδοποιείται πλησιέστερα με την *lpl* από τι με τις υπόλοιπες λιπάσες. Επίσης σύμφωνα με τη συνταϊνικότητα η *lpl-like* φαίνεται να είναι προϊόν διπλασιασμού εν σειρά (*tandem duplication*). Επιπλέον αναγνωρίσαμε για πρώτη φορά ένα δεύτερο γονίδιο LPL στο *Danio rerio*, *Astyanax mexicanus* και *Gadus morhua*, γεγονός που συνέβη πιθανώς λόγω ανεξάρτητων διπλασιασμών μέσα στο εκάστοτε είδος. Τέλος πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί τόσο ο ακριβής βιολογικός και λειτουργικός ρόλος της *lpl-like* όσο και η φυλογένεση της, καθώς και να τεκμηριωθεί πειραματικά το δεύτερο γονίδιο που αντιστοιχεί στην LPL.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Η τσιπούρα
- 1.2 Κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας
- 1.3 Αναπαραγωγή και γονιμοποίηση
- 1.4 Στάδια ανάπτυξης στις προνύμφες των σπαροειδών (*Sparidae*)
- 1.5 Ιστοί μεσοδερμικής προέλευσης
- 1.6 Λιπογένεση στα ψάρια με μοντέλο το zebrafish
- 1.7 Ψάρια και απαραίτητα λιπαρά οξέα
- 2.1 Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)
- 2.2 Λειτουργίες της LPL
- 2.3 Ρύθμιση της HDL από την LPL
- 2.4 Καινούργιοι ρόλοι της LPL
- 2.5 Σύνθεση, επεξεργασία και απελευθέρωση της LPL από παρεγχυματικά κύτταρα και μετατόπιση στο ενδοθήλιο
- 2.6 Δομική ανάλυση της LPL
- 2.7 Κατανομή έκφρασης της LPL στους ιστούς
- 2.8 Έκφραση της LPL σε εποχιακές και διατροφικές καταστάσεις
- 2.9 Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην ρύθμιση της LPL
  - 2.9.1 Μεταγραφικός έλεγχος
  - 2.9.2 Μετά-μεταγραφικός έλεγχος
- 2.10 Οι τριακυλογλυκερόλες υδρολύονται από λιπάσες που ρυθμίζονται από το Camp
- 3.1 Προέλευση των γονιδίων των λιπασών
- 3.2 Φυλογενετικές σχέσεις των λιπασών
- 3.3 Η *lpl-like* αποτελεί παράλογο γονίδιο της *lpl*
- 3.4 Προφίλ έκφρασης της LPL-like
- 3.5 Διπλασιασμός γονιδιώματος στους τελεόστεους
- 3.6 WGDs και η εξέλιξη των τελεόστεων

### 4. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

### 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 5.1 Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας
- 5.2 Απομόνωση RNA
- 5.3 Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με Q-PCR
- 5.4 Συλλογή δεδομένων για φυλογενετική ανάλυση
- 5.5 Φυλογενετική ανάλυση και συνταϊνικότητα
- 5.6 Στατιστική Ανάλυση

### 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 6.1 Φυλογένεση και απόκλιση της LPL και της LPL-like
- 6.2 Συνταϊνικότητα των γονιδίων *lpl* και *lpl-like*
- 6.3 Έκφραση της LPL-like στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας

### 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- 7.1 Εξέλιξη των γονιδίων της *lpl* και *lpl-like*
- 7.2 Έκφραση της LPL-like στην τσιπούρα

### 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Εισαγωγή

### 1.1 Η τσιπούρα

Η τσιπούρα ανήκει στην τάξη των περκόμορφων και στην οικογένεια των σπαροειδών, που ανήκουν στους τελεόστεους ιχθύες. Τα περκόμορφα αποτελούνται από 20 υποτάξεις, 160 οικογένειες και πάνω από 10,000 είδη. Περίπου 52 οικογένειες έχουν μόνο ένα γένος, 23 έχουν μόνο ένα είδος και 21 έχουν 100 ή περισσότερα είδη. Τα περκόμορφα ανευρίσκονται κυρίως σε θαλάσσιες ακτές, αν και κάποια είδη φυσιολογικά ζουν μόνο σε γλυκό νερό. (1). Η τσιπούρα βρίσκεται κατά κύριο λόγο σε όλη τη Μεσόγειο και ανατολικά του Ατλαντικού, παρόλα αυτά η εμφάνιση της είναι λιγότερο συχνή στην νοτιοανατολική Μεσόγειο και πολύ σπάνια στην Μαύρη θάλασσα. Τα ενήλικα ψάρια μπορούν να βρεθούν και σε βάθος 150m. Το είδος είναι ευρύαλο και συχνά μπορεί και εισέρχεται σε υφάλμυρα νερά. Είναι κυρίως σαρκοφάγο και τρέφεται με οστρακοειδή και ψάρια, αν και δυνητικά μπορεί να γίνει φυτοφάγο και μπορεί να φτάσει σε μήκος τα 70cm και σε βάρος τα 50 Kg.

*Πίνακας 1. Ταξινόμική κατάταξη της τσιπούρας*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Ζώα
ΦΥΛΟ	Χορδωτά
ΥΠΟΦΥΛΟ	Σπονδυλωτά
ΥΠΕΡΟΜΟΤΑΞΙΑ	Γναθοστόματα
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Ακτινοπτερύγιοι
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ	Τελεόστεοι
ΤΑΞΗ	Περκόμορφα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Σπαροειδή
ΓΕΝΟΣ	Sparus
ΕΙΔΟΣ	Sparus aurata

### 1.2 Κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας

Η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από ένα σώμα σχήματος πεπλατυσμένου ωσειδούς και κεφαλή καμπυλωτή με μικρούς οφθαλμούς (Εικόνα 1). Ως επί το πλείστον το χρώμα του σώματος είναι αργυρό με μια μεγάλη μαύρη κηλίδα στην αρχή της πλευρικής γραμμής να η

οποία εκτείνεται προς το άνω άκρο του βλεφάρου και οριοθετείται με μια ερυθρή περιοχή. Επιπλέον υπάρχει μια μετωπιαία χρυσή γραμμή που οριοθετείται από δυο πιο σκούρες περιοχές (όχι καλά καθορισμένες στα νεαρά άτομα). Η εντομή και η άκρες του πτερυγίου είναι μαύρες (2)



*Εικόνα 1. Η τσιπούρα (Sparus aurata)*

### **1.3 Αναπαραγωγή και Γονιμοποίηση**

Όσον αφορά την αναπαραγωγική της βιολογία, η τσιπούρα είναι ένα πρώτανδρο ερμαφρόδιτο ψάρι. Η πλειοψηφία των ατόμων είναι λειτουργικά αρσενικά τα δυο πρώτα χρόνια (20-30 cm) και ύστερα μετατρέπονται σε θηλυκά (33-40cm). Ένα μόνο θηλυκό άτομο μπορεί να παράγει 1 εκατομμύριο αυγά σε μια αναπαραγωγική περίοδο και η φυσιολογική αναλογία γονιμοποίησης είναι 90-95%. Η αναπαραγωγική περίοδος τυπικά συμβαίνει από τον Δεκέμβριο μέχρι τον Απρίλιο, όταν η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται στους 13-17 °C (3).

Η αναπαραγωγή των ψαριών είναι μια συντονισμένη διαδικασία που γίνεται σε ανοιχτά νερά για κάποια είδη, ενώ για κάποια άλλα σε περιορισμένα και επιλεγμένα μέρη. Η απελευθέρωση των ώριμων ωαρίων και του σπέρματος στο νερό, που ακολουθείται από την γονιμοποίηση, είναι συνήθως εξωτερική, αν και σε μερικά είδη μπορεί να γίνει και εσωτερικά (4). Η είσοδος του σπερματοζωαρίου μέσω της μικροπύλης του χορίου έχει ως αποτέλεσμα σειρά σημαντικών δομικών αναδιατάξεων πριν τον σχηματισμό του ζυγωτού. Η μικροπύλη κλείνει, και λιπιδικά μόρια ή κυστίδια του φλοιού από τη λέκιθο ενισχύουν την πλασματική μεμβράνη και μειώνουν την κατά πολύ την διαπερατότητα. Αυτά τα μόρια είναι πολύ μεγάλα για να διαφύγουν μέσα από τους πόρους του χορίου, δηλαδή της σκληρής ελαστικής εξωτερικής στιβάδας του ωαρίου, με αποτέλεσμα η οσμωτική βαθμίδωση να “τραβάει” μέσα νερό σχηματίζοντας περιλεκιθικό υγρό. Αυτά τα γεγονότα συμβαίνουν λίγα λεπτά μετά την γονιμοποίηση και μερικές ώρες μετά το σπερματοζωάριο ενεργοποιεί τις τελικές μειωτικές διαιρέσεις, και τέλος οι δυο πυρήνες συντήκονται.

Όταν αρχίζει η ανάπτυξη της καρδιάς, των βραγχίων και άλλων σημαντικών οργάνων, το έμβρυο εκκρίνει πρωτεολυτικά ένζυμα για να δημιουργήσει μια οπή στο χόριο, επιτρέποντας έτσι στην προνύμφη με το λεκιθικό σάκο να διαφύγει. Αυτό αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο για τη ζωή της προνύμφης καθώς πλέον πρέπει να ανταπεξέλθει στο εξωτερικό περιβάλλον. Τα θρεπτικά αποθέματα του λεκιθικού σάκου είναι αρκετά μέχρι το σχηματισμό λειτουργικής γνάθου και η εξάντληση της λεκίθου ακολουθείται από την πρώτη λήψη τροφής. Στους τελεόστεους, η λέκιθος απορροφάται και πέπτει στο συγκύτιο (ή περιβλάστη) και τα παραγόμενα θρεπτικά στοιχεία απελευθερώνονται στο έμβρυο (5).

#### **1.4 Στάδια ανάπτυξης στις προνύμφες των Σπαροειδών (*Sparidae*)**

Η ανάπτυξη των προνύμφων μπορεί να καθορίζεται από τις φάσεις της ανάπτυξης του ψαριού από το στάδιο της εκκόλαψης μέχρι το στάδιο της ενηλικίωσης. Η ανάπτυξη προνύμφης χωρίζεται σε τρία βασικά στάδια και σε δυο μεταβατικά.

Πρώτο είναι το στάδιο αυγού, το οποίο περιλαμβάνει όλη την διαδικασία από την γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη, δεύτερο είναι το στάδιο προνύμφης, που αφορά όλη την περίοδο μεταξύ της εκκόλαψης και της αρχής της φολίδωσης. Σε αυτό το στάδιο η προνύμφη υφίσταται μετατροπές στο σχήμα του σώματος της όσο και της κίνησης της. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο υπάρχουν και υποκατηγορίες:

α) προνύμφη λεκιθικού σάκου: αφορά το στάδιο που ξεκινά με την εκκόλαψη και τελειώνει με την εξάντληση του λεκιθικού σάκου

β) προνύμφη προ-κάμψης: από την εξάντληση του λεκιθικού σάκου μέχρι την ανοδική κάμψη της νωτοχορδής

γ) προνύμφη κάμψης: ύστερα από την ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής μέχρι τα πλευρικά οστά να φτάσουν σε κατακόρυφη θέση

δ) προνύμφη μετά-κάμψης: η προνύμφη σχηματίζει το ουραίο πτερύγιο, καθώς και πλήρη εξωτερικά μεριστικά χαρακτηριστικά (ακτινωτό πτερύγιο).

Στάδιο ενηλικίωσης ιχθυδίου: περιλαμβάνει την ολοκλήρωση του ακτινωτού πτερυγίου και την έναρξη της φολίδωσης μέχρι την επίτευξη αναπαραγωγικής ωριμότητας (6).

Οι προνύμφες της τσιπούρας όταν εκκολάπτονται έχουν μήκος 3mm, οι οφθαλμοί γίνονται λειτουργικοί στο τέλος του σταδίου και αποκτούν κινητικότητα. Σε αυτό το στάδιο αρχίζει να διαφοροποιείται το πεπτικό σύστημα. Υπάρχουν δυο γεγονότα που καθορίζουν τη δεύτερη φάση της ανάπτυξης των προνυμφών: πρώτον η διατροφή και δεύτερον το διόγκωση της νηστικής κύστης. Η μη διόγκωση της νηστικής κύστης μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην επίπλευση (buoyancy) και τελικά θάνατο. Στην τσιπούρα η νηστική κύστη

διαφοροποιείται την 2<sup>η</sup> -3<sup>η</sup> dph και είναι τοποθετημένη ραχιαία μεταξύ του πεπτικού συστήματος και του σπλήνα. Η πρώτη διόγκωση της κύστης τελειώνει γύρω στην 15<sup>η</sup> dph, και η διαδικασία ολοκληρώνεται περίπου στη 40-50<sup>η</sup> dph (7).

Στα αρχικά προνυμφικά στάδια υπάρχει μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο και η ανταλλαγή αερίων γίνεται μέσω της επιφάνειας σώματος, αλλά καθώς η προνύμφη αναπτύσσεται, τα βράγχια αναλαμβάνουν αυτόν τον ρόλο. Επιπλέον η ωσμωρύθμιση γίνεται από κύτταρα που εντοπίζονται εκεί και είναι πλούσια σε μιτοχόνδρια. Επίσης ο μεσόνεφρος και τα αναπτυσσόμενα άκρα αναλαμβάνουν πλέον την ισορροπία του νερού. Σύντομα η προνύμφη ολοκληρώνει την ανάπτυξη της με τα βασικά συστήματα της να έχουν σχηματιστεί και μεταμορφώνεται τυπικά σε μια μικρογραφία του ιχθυδίου. Το ιχθύδιο συνεχίζει να αναζητά τροφή και να αναπτύσσει συμπεριφορές όπως π.χ. την αναγνώριση του ίδιου είδους ή την αποφυγή αρπακτικών μέχρι να φτάσει την ενηλικίωση του και την αναπαραγωγική του ωριμότητα (4).

Οι προνύμφες των σπαροειδών εκκολάπτονται από μικρά αυγά διαμέτρου περίπου 0.8–1.2 mm. Το αυγό έχει μόνο ένα ελαιώδες σταγονίδιο διαμέτρου 0.1–0.26 mm. Οι νεοεκκολαπτόμενες προνύμφες έχουν μήκος περίπου 2 mm, με μη χρωματισμένους οφθαλμούς, μη λειτουργικό στόμα και σχεδόν καθόλου χρωματισμένο δέρμα.

Κατά την εκκόλαψη τα βασικά χαρακτηριστικά της προνύμφης 0-1ημερών (περίπου 3 mm, 21 σωμίτες), είναι μια προεξέχουσα κεφαλή και ένας μεγάλος λεκιθικός σάκος από τον οποίο η προνύμφη εξαρτάται πλήρως για την λήψη των θρεπτικών στοιχείων. Όσον αφορά την κίνηση, σε αυτό το στάδιο η προνύμφη δεν είναι σε θέση να πραγματοποιεί συνεχή πλευση (8).

Ο μεγάλος λεκιθικός σάκος μαζί με το ελαιώδες σταγονίδιο προσδίδει κιτρινωπή απόχρωση στη προνύμφη. Η λέκιθος δεν είναι διασκορπισμένη. Στα περισσότερα είδη, το ελαιώδες σταγονίδιο εμφανίζεται στο οπίσθιο τμήμα του λεκιθικού σάκου. Οι προνύμφες της τσιπούρας αρχίζουν να τρέφονται την 4<sup>η</sup> dph (7)

Οι προνύμφες των 6-9 ημερών (3.5-3.7 mm, 23-24 σωμίτες) έχουν πιο ανεπτυγμένη κεφαλική περιοχή από την εκκολαπτόμενη προνύμφη. Το στόμα είναι πλέον ανοιχτό, ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί σε μεγάλο βαθμό, ενώ έχει αρχίσει η ανάπτυξη του εντεροπαγκρεατικού συστήματος και τα όρια των σπονδύλων γύρω από την νωτοχορδή είναι εμφανώς αναγνωρίσιμα. Σε αυτό το στάδιο τα λέπια και τα πτερύγια του θώρακα έχουν αρχίσει να σχηματίζονται και η προνύμφη είναι ικανή να εκτελεί σπασμωδικές κινήσεις (8).

Στο στάδιο των 15-18 ημερών (πάνω από 4mm, 24 σωμίτες), η απορρόφηση του περιεχομένου του λεκιθικού σάκου έχει ολοκληρωθεί και η ανάπτυξη ενός λειτουργικού εντέρου και των συσχετιζόμενων αδένων του βρίσκεται σε εξέλιξη. Επιπλέον, το περίγραμμα



των θωρακικών πτερυγίων προεξέχει και υπάρχει ικανή ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης. Αυτή η πιο ανεπτυγμένη προνύμφη έχει την δυνατότητα για μια πιο σταθερή κίνηση που ομοιάζει με αυτή του χελιού και βοηθάει στην πρόσληψη τροφής (9).

Στο στάδιο της προ-μεταμόρφωσης, δηλαδή στις 30-45 ημέρες (5.5-8 mm, 25 σωμαίτες) η ανάπτυξη των ιστών είναι πιο καθορισμένη και η προνύμφη εμφανίζει όλα τα χαρακτηριστικά ανατομικά γνωρίσματα τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά. Το νευρο-μυϊκό-σκελετικό σύστημα είναι καλά ανεπτυγμένο και η προνύμφη εμφανίζεται πολύ ενεργή όσον αφορά την κίνηση της για την ανεύρεση τροφής. Το έντερο είναι πλήρως λειτουργικό και το αρχικό περίγραμμα των κοιλιακών πτερυγίων είναι πλέον εμφανές.








Στις 60-90 ημέρες το ιχθύδιο (14-20mm) δεν χαρακτηρίζεται πλέον από τα τυπικά χαρακτηριστικά προνύμφης και τα λέπια καθώς και τα ακτινωτά πτερύγια είναι πλέον καλά οργανωμένα. Λόγω της αύξησης του μεγέθους του σώματος η ενέργεια που απαιτείται για την κίνηση είναι πολύ αυξημένη.

Τέλος, στις 150 ημέρες (28mm) το ιχθύδιο εμφανίζει γενικά ανατομικά και κινητικά χαρακτηριστικά με το στάδιο των 60-90 ημερών, καθώς και παρόμοια χαρακτηριστικά με το ενήλικο ψάρι.

Η ανάπτυξη της προνύμφης στο γένος των σπαροειδών επηρεάζεται από πολλούς εξωγενείς παράγοντες, με την θερμοκρασία και την θρέψη να αποτελούν τους πιο σημαντικούς. Επιπλέον αβιοτικούς παράγοντες αποτελούν η παροχή οξυγόνου, η αλατότητα και το φως. Οι απαιτήσεις για την βέλτιστη ανάπτυξη είναι ειδικές για κάθε είδος και αλλάζουν κατά τη διάρκεια της οντογένεσης της προνύμφης (2).

Η ανάπτυξη της προνύμφης των σπαροειδών επηρεάζεται από την διάρκεια της μετάβασης από την ενδογενή στην εξωγενή θρέψη. Η ανάπτυξη και η αύξηση επηρεάζονται ιδιαίτερα κατά την διάρκεια της εξωγενούς φάσης, όταν η προνύμφη παρουσιάζει υψηλή πλαστικότητα και αλλομετρική ανάπτυξη. Το μοτίβο της ανάπτυξης ξεκινάει αρχικά από ένα επίμηκες σώμα που χρονικά συμπυκνώνεται και συνήθως χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο κρανίο και γνάθους.

Οι προνύμφες των σπάρων τείνουν να αναπτύσσονται γρήγορα, κατά κύριο λόγο για να αποφύγουν να αποτελέσουν θηράματα. Ο ρυθμός της ανάπτυξης συνήθως μειώνεται και αλλάζει κατά την μεταμόρφωση, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένη μεταβολική ενεργότητα. Η χρονική εμφάνιση των διαφόρων μορφολογικών χαρακτηριστικών δίνεται στον Εικόνα 2 (2,7).

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

**Εικόνα 2.** Σχηματική αναπαράσταση των κύριων αναπτυξιακών γεγονότων στην τσιπούρα (8)

### 1.5 Ιστοί μεσοδερμικής προέλευσης

Σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων των ανώτερων σπονδυλωτών, το μεσόδερμα αποτελεί μια από τις τρεις βλαστικές στοιβάδες. Τις υπόλοιπες δυο τις αποτελούν το εξώδερμα και το ενδόδερμα, με το μεσόδερμα να βρίσκεται ανάμεσα τους. Το μεσόδερμα σχηματίζεται μέσω της διαδικασίας της γαστριδίωσης και διαχωρίζεται κατά μήκος του κεντρικού περιφερικού άξονα σε τέσσερις ζώνες: την νωτοχορδή, το παραξονικό μεσόδερμα, από το οποίο αναπτύσσονται οι σωμίτες και από αυτούς το μυοτόμιο, σκληροτόμιο και το δερμοτόμιο, το ενδιάμεσο μεσόδερμα, από το οποίο αναπτύσσονται οι γονάδες, οι νεφροί και

τα επινεφρίδια, και το πλευρικό πέταλο, από το οποίο αναπτύσσονται το τοίχωμα του σώματος, οι καταβολές των άκρων, τα αιμοφόρα αγγεία και η καρδιά. Το πλευρικό πέταλο υποδιαιρείται στο εξωτερικό σωματικό μεσόδερμα από όπου και θα αναπτυχθούν οι καταβολές των άκρων και από το εσωτερικό σπλαχνικό μεσόδερμα από που προκύπτει το μεσεντέριο και η καρδιά. Μερικά από τα πιο βασικά παράγωγα του μεσοδέρματος αποτελούν: οι λείοι, σκελετικοί και καρδιακοί μύες, το ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια, καθώς και ο συνδετικός ιστός.

Μεγάλο τμήμα του συνδετικού ιστού προέρχεται από το μεσόδερμα του εμβρύου, παρόλο που ένα μέρος του σχηματίζεται και από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Ο ώριμος συνδετικός ιστός αποτελείται από ινοβλάστες ενσωματωμένους στο εξωκυττάριο στρώμα (10).

### ***1.6 Λιπογένεση στα ψαρια με μοντελο το zebra-fish***

Ο λιπώδης ιστός, αποτελεί τύπο του συνδετικού ιστού και αναπτύσσεται και αυτός από το εμβρυικό μεσόδερμα (10). Τα σπονδυλωτά είναι ικανά να αποθηκεύουν ουδέτερα λίπη (τριακυλογλυκερόλες) σε διάφορους ιστούς, με τον λιπώδη ιστό να αποτελεί τη βασική αποθήκη. Τα κύρια κύτταρα του λιπώδους ιστού είναι τα λιποκύτταρα, που είναι ειδικά για την αποθήκευση λίπους σε κυτταροπλασματικά σταγονίδια, καθώς και για την ενδοκρινική ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας. Τα θηλαστικά αναπτύσσουν δυο τύπους λιπώδους ιστού: τον λευκό λιπώδη ιστό (WAT) και τον φαιό λιπώδη ιστό (BAT). Ο WAT βρίσκεται σε αφθονία και λειτουργεί κυρίως ως θέση αποθήκευσης και κινητοποίησης της ενέργειας, ενώ ο BAT έχει ως βασικό ρόλο τη θερμογένεση. Ο WAT και ο BAT σχηματίζονται σε ξεχωριστές ανατομικές θέσεις κατά την διάρκεια ανάπτυξης των θηλαστικών, και εκδηλώνουν διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης και ενδοκρινικής ευαισθησίας. Τα λιποκύτταρα του WAT (λευκά λιποκύτταρα) και του BAT (φαιά λιποκύτταρα) περιέχουν κυτταροπλασματικά σταγονίδια ουδέτερων λιπών. Παρόλα αυτά τα ώριμα λευκά λιποκύτταρα περιέχουν ένα μεγάλο ενιαίο σταγονίδιο, ενώ τα φαιά λιποκύτταρα περιέχουν πολλά μικρότερα σταγονίδια λιπιδίων.

Στα θηλαστικά η βιολογία των λιποκυττάρων επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως π.χ. η παροχή θρεπτικών στοιχείων. Τα ώριμα λιποκύτταρα συσσωρεύουν και κινητοποιούν ουδέτερα λιπίδια. Αυτή η λειτουργία της θρεπτικής διαθεσιμότητας κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής περιόδου μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Παραδείγματος χάριν, έλλειψη θρεπτικών συστατικών κατά τη μεταγεννητική περίοδο μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μάζα λίπους και αριθμού των λιποκυττάρων, ενώ η υπερβολική θρέψη μπορεί να προκαλέσει αύξηση του αριθμού τόσο των λιποκυττάρων όσο και των πρόδρομων μορφών τους. Ο αριθμός των λιποκυττάρων καθορίζεται κατά την παιδική ηλικία

και παραμένει σταθερός στην ενηλικίωση, υποδηλώνοντας έτσι ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την λιπογένεση κατά την ανάπτυξη έχουν δια βίου επίπτωση στην εναπόθεση λίπους. Παρόλα αυτά οι μοριακοί και οι κυτταρικοί μηχανισμοί για αυτή τη θρεπτική ρύθμιση της λιπογένεσης παραμένουν μη πλήρως κατανοητοί (11).

Μελέτες στο zebrafish έχουν δείξει ότι οι μηχανισμοί του μεταβολισμού των λιπιδίων στα ψάρια και στα θηλαστικά είναι συντηρημένοι (12). Όπως τα θηλαστικά ομόλογα, τα λιποκύτταρα των ενήλικων ψαριών αποθηκεύουν ουδέτερα λίπη στην μορφή της τριακυλογλυκερόλης και αυτά τα αποθέματα κινητοποιούνται σε περιόδους έλλειψης θρεπτικών στοιχείων και οι μηχανισμοί αποθήκευσης και κινητοποίησης φαίνεται να είναι παραπλήσιοι με αυτούς των θηλαστικών (13). Καλλιέργειες λιποκυττάρων από ψάρια, εκφράζουν γονίδια που είναι ομόλογα με τους λιποκυτταρικούς δείκτες των θηλαστικών όπως οι *PPAR $\gamma$* , *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$* , *λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)*, και η λεπτίνη ενώ ανταποκρίνονται σε παρόμοια ενδοκρινικά σήματα όπως είναι η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη (14).

Τα zebrafish διαθέτουν κατά τη γέννηση μεγάλη λεκιθική μάζα που λειτουργεί σαν κέντρο θρέψης πριν ξεκινήσει η εξωγενής θρέψη γύρω στην 5 dpf. Η λεκιθική αυτή μάζα είναι ουσιαστικά μια μεγάλη αποθήκη ουδέτερων λιπιδίων για τα έμβρυα του zebrafish (15). Κατά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης της προνύμφης σε ενήλικο zebrafish την 28 dpf, η σπλαγγική κοιλότητα συνεχίζει να περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα ουδέτερων λιπιδίων, με μικρότερες ποσότητες να βρίσκονται στη θωρακική πλάκα του πτερυγίου, στη γνάθο, στη σπονδυλική στήλη, τον υποδόριο ιστό και στο περικάρδιο. Τα λιποκύτταρα του zebrafish βρέθηκαν επίσης κοντά στην τριχοειδή αγγεία, παρέχοντας έτσι άμεση πρόσβαση στα λιπαρά οξέα που προέρχονται από λιποπρωτεΐνες και από άλλους παράγοντες του πλάσματος.

Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι η κυτταρική ανατομία των σπλαγγικών λιποκυττάρων του zebrafish βρίσκεται σε αντιστοιχία με τα λιποκύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού των θηλαστικών. Οι τελεόστεοι δεν έχουν φαιό λιπώδη ιστό, ο οποίος εξελίχθηκε με βάση την διαφορετική ομοιότητα της θερμότητας στα θηλαστικά.

Η εμφάνιση των θέσεων του λιπώδους ιστού κατά την ανάπτυξη του zebrafish συμβαίνει με την κατάλληλη σειρά, με το πρώτο και μεγαλύτερο απόθεμα να σχηματίζεται στα σπλάχνα γύρω στην 8 dpf. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της λιπογένεσης του zebrafish και άλλων τελεόστεων είναι ο αρχικός σχηματισμός λιποκυττάρων στο πάγκρεας. Ο λόγος του σχηματισμού αυτού δεν είναι ακόμα κατανοητός αλλά εικάζεται ότι ένα τοπικό σήμα μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων π.χ. η ινσουλίνη είναι παράγοντας που σε

μεγάλες συγκεντρώσεις γύρω από το πάγκρεας κατά τα αρχικά στάδια της προνύμφης μπορεί πιθανώς να προάγει την λιπογένεση από κοντινά προγονικά λιποκύτταρα (16).

Αν και η ανάπτυξη των θέσεων των λιποαποθηκών εμφανίζεται με διατεταγμένο τρόπο, η κινητοποίηση τους ως απόκριση στη νηστεία είναι ομοιόμορφη σε όλες τις θέσεις. Αυτό δείχνει ότι οι μηχανισμοί που διέπουν τη χρονική σειρά του σχηματισμού της λιπώδους αποθήκης δεν επηρεάζουν τη σειρά με την οποία οι αποθήκες αυτές θα εξαντληθούν κατά τη διάρκεια της περιόδου νηστείας. Αντίστοιχα, η εναπόθεση λίπους σε κατάσταση επανασίτισης συμβαίνει με έναν ομοιόμορφο τρόπο για όλες τις αποθήκες. Η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων είναι σημαντικός παράγοντας συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Τα λιποκύτταρα προέρχονται από προ-λιποκύτταρα και αυξάνονται σε μέγεθος από την συσσώρευση λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα σε συνδυασμό με την τελική τους διαφοροποίηση. Στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησής τους, πολλά χαρακτηριστικά γονίδια ενεργοποιούνται σταδιακά και έχουν καθορισμένους ρόλους στην προώθηση της διαφοροποίησης. Η *lpl* χαρακτηρίζεται ως ένα τέτοιο γονίδιο και χρησιμεύει ως πρώιμος δείκτης της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων (17).

### **1.7 Ψάρια και απαραίτητα λιπαρά οξέα**

Τα λιπίδια αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας στην διατροφή των ψαριών, πέραν του ότι αποτελούν την πηγή για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFA), που είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και πρόδρομα μόρια των εικοσανοειδών (18). Τα ψάρια, πιθανώς όπως όλα τα σπονδυλωτά, είναι ανίκανα να συνθέσουν n-3 και n-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία όμως είναι απαραίτητα στην διατροφή (19).

Τα (PUFAs) της διατροφής είναι σημαντικά για την σωστή θρέψη, την φυσιολογία και την αναπαραγωγή των σπονδυλωτών και έχουν κρίσιμο ρόλο στην αρχική ανάπτυξη, λόγω εμφάνισης εντυπωσιακών μορφολογικών και φυσιολογικών αλλαγών (20). Τα λίαν ακόρεστα λιπαρά (HUFAs) έχουν χαρακτηριστεί ως απαραίτητα συστατικά στην διατροφή των προνυμφών των ψαριών (21), έχοντας ρόλο ενεργειακό και δομικό ανάλογα με τις τάξεις των λιπιδίων που ενσωματώνονται. Καθώς τα συστατικά των φωσφολιπιδίων (PL) ενσωματώνονται στις κυτταρικές μεμβράνες, το δεκαεξανοϊκό (22:6n-3) και το αραχιδονικό (20:4n-6) οξύ είναι ιδιαίτερα απαραίτητα για την σωστή νευρική ανάπτυξη και λειτουργία (22).

Τα ψάρια του γλυκού νερού είναι ικανά να συνθέσουν HUFAs, όπως π.χ. το εικοσαπενταενικό οξύ (EPA, 20:4 (n-3)) και το δοκοσαεξαενοϊκό (DHA, 22:6n-3) με επιμήκυνση και αποκορεσμό του λινολειακού (18:3n-3) οξέος. Παρόλα αυτά, τα θαλάσσια ψάρια δεν διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα ή η ενζυμική ενεργότητα δεν είναι αρκετά υψηλή

ώστε να συνθέσουν HUFAs. Το DHA και το EPA αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των μεμβρανών, ενώ το EPA είναι επίσης και πρόδρομη ένωση κύριων συστατικών όπως π.χ. τα εικοσανοειδή (23). Μια επιπλέον πρόδρομη ένωση των εικοσανοειδών αποτελεί και το αραχιδονικό οξύ (20:4n-6, ARA) που επίσης ανήκει στην κατηγορία των EFA (24). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι όχι μόνο τα απόλυτα επίπεδα αυτών των τριών EFA, αλλά και οι μεταξύ τους αναλογίες παίζουν σημαντικό ρόλο για την βέλτιστη απόδοση και ποιότητα των προνυμφών των θαλάσσιων ψαριών. Το DHA, το EPA και σε μικρότερο βαθμό το ARA παίζουν μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη της προνύμφης της τσιπούρας (25). Στα σπαροειδή, η ανεπάρκεια του λινολενικού οξέος για την ανάπτυξη των ψαριών μελετήθηκε και εντέλει αποδόθηκε στην μη επαρκή μετατροπή του λινολενικού οξέος σε HUFA (26).

Η ποσότητα της τροφής προκαλεί σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα λιπιδίων των μυών στην τσιπούρα. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί και στα σαλμονοειδή μαζί με την παράλληλη αλλαγή της σύστασης των λιπαρών οξέων των συνολικών λιπιδίων των μυών. Οι περισσότερες αλλαγές στη σύσταση των λιπαρών οξέων έχουν αποδοθεί κυρίως στη σχετική αναλογία των φωσφολιπιδίων και των τριγλυκεριδίων. Παρόλα αυτά, η σύσταση των λιπαρών οξέων αυτών των δυο λιπιδικών κλασμάτων ρυθμίζεται διαφορετικά από διατροφικούς ή/και περιβαλλοντικούς παράγοντες λόγω των διαφορετικών ρόλων τους στον κυτταρικό μεταβολισμό και στον μεταβολισμό των λιπιδίων. Όντως η σύσταση των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων συνήθως είναι παρόμοια με αυτή των λιπιδίων της διατροφής, ενώ η σύσταση των φωσφολιπιδίων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η οσμωμοριακότητα, η οποία μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στις αλλαγές των επιπέδων διατροφής (27).

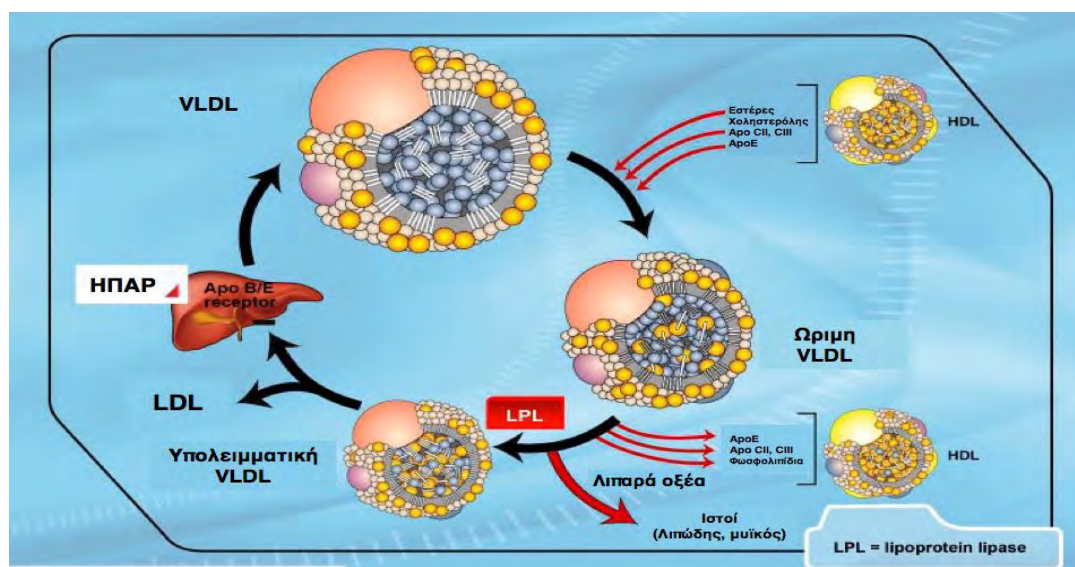
Οι PPARs συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με την οντογένεση, όπως ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση του σκελετού, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η αύξηση και η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, η μεταφορά τους, η οξείδωση των λιπιδίων και της γλυκόζης, η λιπογένεση, η ομοιοστάση των λιπιδίων, η βιογένεση των υπεροξειδωσωματίων και οι λειτουργίες τους (2).

Τα PUFA, τα οξειδωμένα PUFA και τα εικοσανοειδή αποτελούν συνδέτες για όλες τις ισομορφές των PPAR στα θηλαστικά και στα αμφίβια (28), συνεπάγοντας ότι λειτουργούν ως κύριοι μεταγραφικοί αισθητήρες για τα λιπαρά οξέα (29). Είναι ενδιαφέρον ότι οι τρεις υπότυποι των PPAR παρουσιάζουν διαφορετική αλλά και αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση και λειτουργίες (30). Στα θηλαστικά, οι PPARα και οι PPARβ ενεργοποιούν τον καταβολισμό των λιπιδίων, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων στόχων που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται στην β-οξείδωση των λιπαρών οξέων στα υπεροξειδωσώματα και στα

μιτοχόνδρια , ενώ οι PPAR $\gamma$  ελέγχουν την συσσώρευση των λιπιδίων και ρυθμίζουν την λιπογένεση και την οστεογένεση . Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές, οι PPAR $\alpha$ , $\beta$  και  $\gamma$  ενώ στους τελεόστεους υπάρχει επιπλέον ένας PPAR $\alpha$  λόγω του διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος που συνέβη ειδικά στους τελεόστεους (31).

## 2.1 Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)

Τα τριγλυκερίδια μεταφέρονται στην κυκλοφορία με τη μορφή μεγάλων πολυμοριακών λιποπρωτεϊνών. Τα τριγλυκερίδια που προέρχονται από τη διατροφή και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες “πακετάρονται” σε χυλομικρά από το έντερο, ενώ τα ενδογενώς παραγόμενα τριγλυκερίδια απελευθερώνονται από το ήπαρ με την μορφή VLDL σωματιδίων. Οι δυο τύποι λιποπρωτεϊνών μπαίνουν στην κυκλοφορία με σκοπό να προμηθεύσουν τριγλυκερίδια στους ιστούς. Επιπλέον κατά τη μεταφορά των λιπιδίων για να αποφευχθεί η διασπορά τους από ανταλλαγή ή η διάχυση, οι λιποπρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να καθοδηγούν τα λιπίδια σε συγκεκριμένους ιστούς. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει με μηχανισμούς κατά τους οποίους μεμονωμένες απολιποπρωτεΐνες δρουν είτε ως προσδέτες σε επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς είτε ως συμπαραγόντες για επιφανειακές κυτταρικές λιπάσες, όπως η λιποπρωτεϊνική λιπάση. Συνεπώς, τα πρωτεϊνικά συστατικά των λιποπρωτεϊνών καθορίζουν το πώς τα λιπίδια σε λιποπρωτεϊνικά μόρια μεταβολίζονται (32).



Εικόνα 3. Αλληλεπίδραση της LPL με τις λιποπρωτεΐνες.

Το γονίδιο της *lpl* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη λιποπρωτεϊνική λιπάση. Αυτή η πρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια των τριχοειδών, στους μύες και στον λιπώδη ιστό. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Όταν η λιποπρωτεϊνική λιπάση αποικοδομεί τα τρυγκλυκερίδια, τα λιπίδια που απελευθερώνονται χρησιμοποιούνται

από το σώμα για παραγωγή ενέργειας ή αποθηκεύονται στον λιπώδη ιστό για μετέπειτα χρήση. Το 1966 βρέθηκε επίσης ότι η απολιποπρωτεΐνη C-II(apoC-II), που αποτελεί συστατικό των VLDL και HDL, παίζει βασικό ρόλο στην λειτουργία της LPL ως συμπαράγοντας/ενεργοποιητής του ενζύμου (33) (Εικόνα 3).

Η LPL αποτελεί ένα γλυκοπρωτεϊνικό ένζυμο που παράγεται σε διάφορους ιστούς στα θηλαστικά, όπως ο λιπώδης ιστός, οι σκελετικοί μύες, η καρδιά, τα μακροφάγα, οι θηλαστικοί αδένες, αλλά όχι στο ενήλικο ήπαρ (34). Στα ψάρια, η LPL έχει ταυτοποιηθεί σε μοριακό επίπεδο σε διάφορα είδη, όπως στο *Danio rerio* (35), την ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, 36) και το φαγγρί (*Pagrus major*, 37), καθώς και τσιπούρα. Σε αυτά τα είδη έχουν αναγνωρισθεί μερικές ή ολόκληρες αλληλουχίες του γονιδίου της LPL.

Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, η ενεργότητα και η έκφραση της LPL έχει επίσης ανευρεθεί και στο ήπαρ των ενήλικων ψαριών (38).

Στα θηλαστικά, η LPL ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τις διατροφικές συνθήκες όσο και με έναν ιστο-εξειδικευμένο τρόπο. Ο βασικός της ρυθμιστής είναι η ινσουλίνη, καθώς προάγει άμεσα την ενεργότητα της LPL στον λιπώδη ιστό, και την μειώνει στους σκελετικούς μύες του ανθρώπου και του ποντικού (39). Η ινσουλίνη αποτελεί αναβολική ορμόνη και στα ψάρια. Οι Black and Skinner (40) και Albalat (41), παρατήρησαν μείωση της ενεργότητας LPL του λιπώδους ιστού λόγω νηστείας στην πέστροφα ενώ δεν είδαν καμία αλλαγή στους γραμμωτούς μύες. Παρόμοια, ο Liang και οι συνεργάτες (42) βρήκαν χαμηλά επίπεδα mRNA της LPL στον λιπώδη ιστό νηστικού φαγγριού (*Pagrus major*). Πιο πρόσφατη μελέτη στην τσιπούρα, έδειξε διαφοροποιήσεις στην έκφραση της LPL του λιπώδους ιστού, όταν άλλαζε η σύσταση των πρωτεϊνών στην τροφή (38).

## **2.2 Λειτουργίες της LPL**

Τα χυλομικρά σχηματίζονται στο εντερικό επιθήλιο, όπου τα κύτταρα δεν εκφράζουν υψηλές ποσότητες από τις απολιποπρωτεΐνες της οικογένειας apoC-I-E-C-II. Τα χυλομικρά της λέμφου, που είναι νεοσχηματιζόμενα μόρια, είναι σχετικά φτωχά σε αυτές τις απολιποπρωτεΐνες. Συνεπώς, ένα μεγάλο μέρος της συσχέτισης των apoCs και apoE με τα χυλομικρά συμβαίνει αφού αυτά αφήσουν την λέμφο και μπουν στην κυκλοφορία. Καθώς τα επίπεδα των apoCs και apoE των χυλομικρών αυξάνονται, τα επίπεδα των apoA-I και A-IV μειώνονται.

Η λιπόλυση από την LPL ξεκινά όταν οι λιποπρωτεΐνες αλληλοεπιδράσουν με την LPL των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η LPL υδρολύει τα τριγλυκερίδια που κυκλοφορούν με τη μορφή χυλομικρών και VLDL σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και 2-μονοακυλογλυκερόλες.

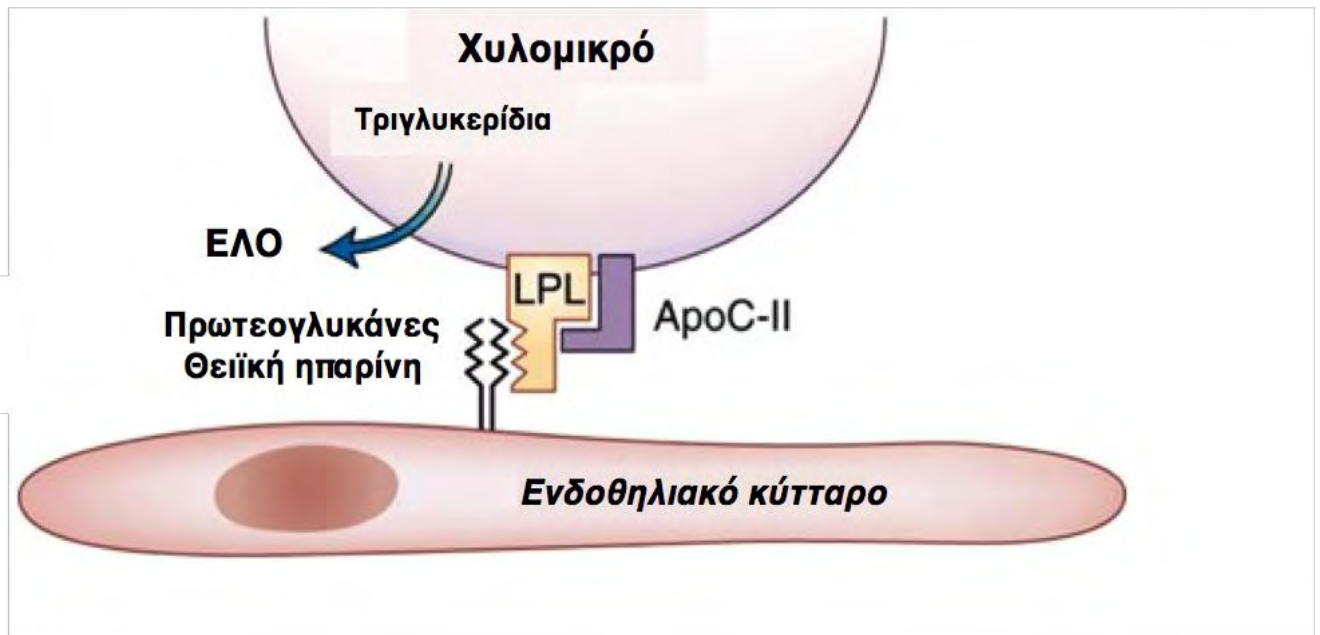


Τα FFA που προκύπτουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από διαφορετικούς ιστούς, όπως ο λιπώδης (οπού μπορούν να επαν-εστεροποιηθούν και να αποθηκευτούν) ή από άλλους περιφερικούς ιστούς, όπως οι μύες και η καρδιά (που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας) (43).

Οι πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες είναι μεγάλες για να περάσουν το τριχοειδές ενδοθήλιο στους περισσότερους ιστούς. Για να έχει πρόσβαση η LPL στα τριγλυκερίδια αυτά, το ενεργό της κέντρο βρίσκεται στην επιφάνεια του αυλού των τριχοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων στο οποίο το ένζυμο προσκολλάται μέσω υψηλά φορτισμένων, μεμβρανικών αλυσίδων θειικής ηπαράνης-πρωτεογλυκάνης (HSPG). Αυτή την αλληλεπίδραση μπορεί να την ανταγωνιστεί η ηπαρίνη. Η φυσιολογική ενεργή μορφή εμφανίζεται ως ομοδιμερές και απαιτεί apoC-II ως εξιδεικευμένο ενεργοποιητή/συμπράγοντα (Εικόνα 4). Οι πρωτεογλυκάνες μοιάζουν περισσότερο με πολυσακχαρίτες παρά για πρωτεΐνες, καθώς το 95% της μάζας τους αποτελείται από υδατάνθρακες. Οι πρωτεογλυκάνες λειτουργούν ως λιπαντικά και δομικά συστατικά στον συνδετικό ιστό, μεσολαβούν στην συγκόλληση των κυττάρων στην εξωκυτταρική ουσία και προσδένουν παράγοντες που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η δράση της LPL δίνει μη-εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (NEFA) και 2-μονοακυλογλυκερόλη για χρήση από τους ιστούς με ποικίλους τρόπους. Ως παράδειγμα, τα NEFA που προέρχονται από την αντίδραση επανα-εστεροποιούνται ως τριγλυκερίδια στον λευκό λιπώδη ιστό για την αποθήκευση ενέργειας (44).

Μετά την υδρόλυση τα μικρότερα υπολείματα χυλομικρών μεταφέρονται στο ήπαρ όπου ένας ειδικός υποδοχέας αναγνωρίζει την απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) τους, που τα επιτρέπει να εισέλθουν στα ηπατοκύτταρα. Όλα τα χυλομικρά συνήθως εξαφανίζονται από την κυκλοφορία μέσα σε 12-24 ώρες μετά από ένα γεύμα με λιπαρά. Όσον αφορά τη VLDL, τα λιποπρωτεϊνικά μόρια μικραίνουν μετά την υδρόλυση από την LPL αλλά είναι ακόμα πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης και ονομάζονται λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL). Με περαιτέρω υδρόλυση από την LPL και την αφαίρεση περισσότερων τριγλυκεριδίων και της apoE δημιουργείται η LDL. Η LDL είναι ο κύριος μεταφορέας χοληστερόλης στο αίμα για τους περιφερικούς ιστούς, καθώς και ρυθμίζει τη de novo σύνθεση της στους ιστούς αυτούς (45). Έχει βρεθεί ότι η αρχική σύνδεση των χυλομικρών και της VLDL στην LPL που βρίσκεται στην αυλική επιφάνεια μεσολαβείται από μια ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ της apoC-II και του ενζύμου. Αυτή η σύνδεση συνίσταται στην αλληλεπίδραση των αρνητικών καταλοίπων στο καρβοξυτελικό-άκρο της apoC-II με τα θετικά κατάλοιπα της LPL (46).



Εικόνα 4. Σταθεροποίηση, Πρόσδεση και Ενεργοποίηση της LPL

Ένα χαρακτηριστικό της υδρόλυσης των χυλομικρών και της VLDL από την LPL είναι ότι η αρχική ομογενής σε μέγεθος κατανομή των σωματιδίων αυτών γίνεται διάχυτη όσο περνάει ο χρόνος ώστε να βρίσκονται στην κυκλοφορία σωματίδια του αρχικού μεγέθους καθώς και των υπολειμμάτων μετά την υδρόλυση. Συνεπώς η λιπόλυση προϋποθέτει μια σειρά γεγονότων σύνδεσης/αποσύνδεσης. έχει βρεθεί ότι σε κάθε περιοχή σύνδεσης περίπου 40 LPL μόρια μπορούν να δρουν ταυτόχρονα σε μια λιποπρωτεΐνη ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός υδρόλυσης. Επιπλέον, η LPL μπορεί να αποδεσμευτεί από το ενδοθήλιο και να αποχωρήσει προσκολλημένη με τα υπολείμματα των σωματιδίων (47). Νέα παραγόμενα μόρια αντικαθιστούν τα ένζυμα που έχουν φύγει. Αυτή η μετατόπιση της λειτουργικής LPL εμποδίζει την υπερβολική απόδοση των λιπαρών οξέων στα παρεγχυματικά κύτταρα κάτω από συνθήκες εκτεταμένης λιπόλυσης (48).

### 2.3 Ρύθμιση της HDL από την LPL

Η δράση της LPL ρυθμίζει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης με τουλάχιστον τρεις τρόπους. Αρχικά, κατά τη διάρκεια της μεσολαβούμενης από την LPL υδρόλυσης των υψηλών σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, τα επιφανειακά λιπίδια και οι απολιποπρωτεΐνες μεταφέρονται στην HDL. Δεύτερον, η ποσότητα της HDL που ανταλλάσσει τα τριγλυκερίδια διαμορφώνεται από τα επίπεδα της VLDL στην κυκλοφορία του αίματος. Συνεπώς, μειώνοντας τα τριγλυκερίδια του πλάσματος, η LPL περιορίζει την από την CETP (cholesteryl ester transfer protein)-μεσολαβούμενη μείωση της HDL χοληστερόλης. Τρίτον, αλλάζοντας

την κεντρική σύνθεση των λιπιδίων της HDL, ο καταβολικός ρυθμός της apoA-I της HDL αλλάζει και αυτός. Εάν η HDL εμπλουτιστεί με τριγλυκερίδια, αυτά θα μπορούν να αφαιρεθούν πιο γρήγορα με αποτέλεσμα να παράγουν μικρότερα λιπίδια ‘φτωχότερα’ σε apoA-I. Η HDL που περιέχει αρκετά τριγλυκερίδια αποτελεί καλύτερο υπόστρωμα για την ηπατική λιπάση. Οι λιποπρωτεΐνες που είναι φτωχές σε apoA-I καθαρίζονται από την κυκλοφορία ταχύτερα. Ένας μηχανισμός σαν αυτόν μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο καταβολικό ρυθμό και να αυξήσει τα επίπεδα της HDL σε άτομα που πάσχουν από υπερτριγλυκεριδαιμία και στην αύξηση του καταβολικού ρυθμού της apoA-I που έχει διαπιστωθεί κατά τη διάρκεια αναστολής της LPL. Σε μερικούς, αλλά όχι σε όλους τους ανθρώπους, η ενεργότητα της LPL έχει συσχετιστεί θετικά με τα επίπεδα της HDL. Παρομοίως, η HDL είναι συχνά αντιστρόφως ανάλογη με την λιπαιμία μετά από γεύμα, που αποτελεί μια *in vivo* μέτρηση της δράσης της LPL. Συνεπώς, μέσω αυτής της έμμεσης δράσης, τα επίπεδα της HDL θεωρούνται ως ένας δείκτης της δράσης της LPL *in vivo*. (49), (50).

#### **2.4 Καινούργιοι ρόλοι της LPL**

Πέραν της γνωστής λειτουργίας της LPL να υδρολύει τα τριγλυκερίδια από τα χυλομικρά και την VLDL, έχουν βρεθεί και νέοι ρόλοι της LPL. Αρχικά, η LPL μπορεί να δράσει μη-καταλυτικά ως ‘γέφυρα’, πράγμα που επιτρέπει την ταυτόχρονη σύνδεση της στις λιποπρωτεΐνες και σε ειδικές κυτταρικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως στην HSPG, στον υποδοχέα της LDL, στον υποδοχέα της VLDL, στον υποδοχέα 2 της apoE κ.α. (51). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν στην αυξημένη συσσώρευση και κυτταρική πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών. Μια διαφορετική εκδοχή αφορά κύτταρα αντί λιποπρωτεΐνες (52), π.χ. έχει βρεθεί ότι η LPL δρα ως πρωτεΐνη προσκόλλησης για την HSPG των μονοκυττάρων και στα αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα (53). Επιπλέον μπορεί να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυϊκών ινών. Για την διεργασία αυτή απαιτούνται η ενζυματική δραστηριότητα της LPL, η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), και η σύνδεση της LPL στην HSPG μυϊκά κύτταρα των αγγείων (54). Τέλος, η LPL προκαλεί άμεσα την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον παράγοντα-α νέκρωσης όγκου (TNFα) (55), συνεργάζεται με την ιντερφερόνη-γ για την διέγερση της έκφρασης της συνθετάσης νιτρικού οξειδίου των μακροφάγων (56), ενεργοποιεί ενδοθηλιακά την NAD(P)H οξειδάση (57), και μειώνει την έκκριση ApoE (58).

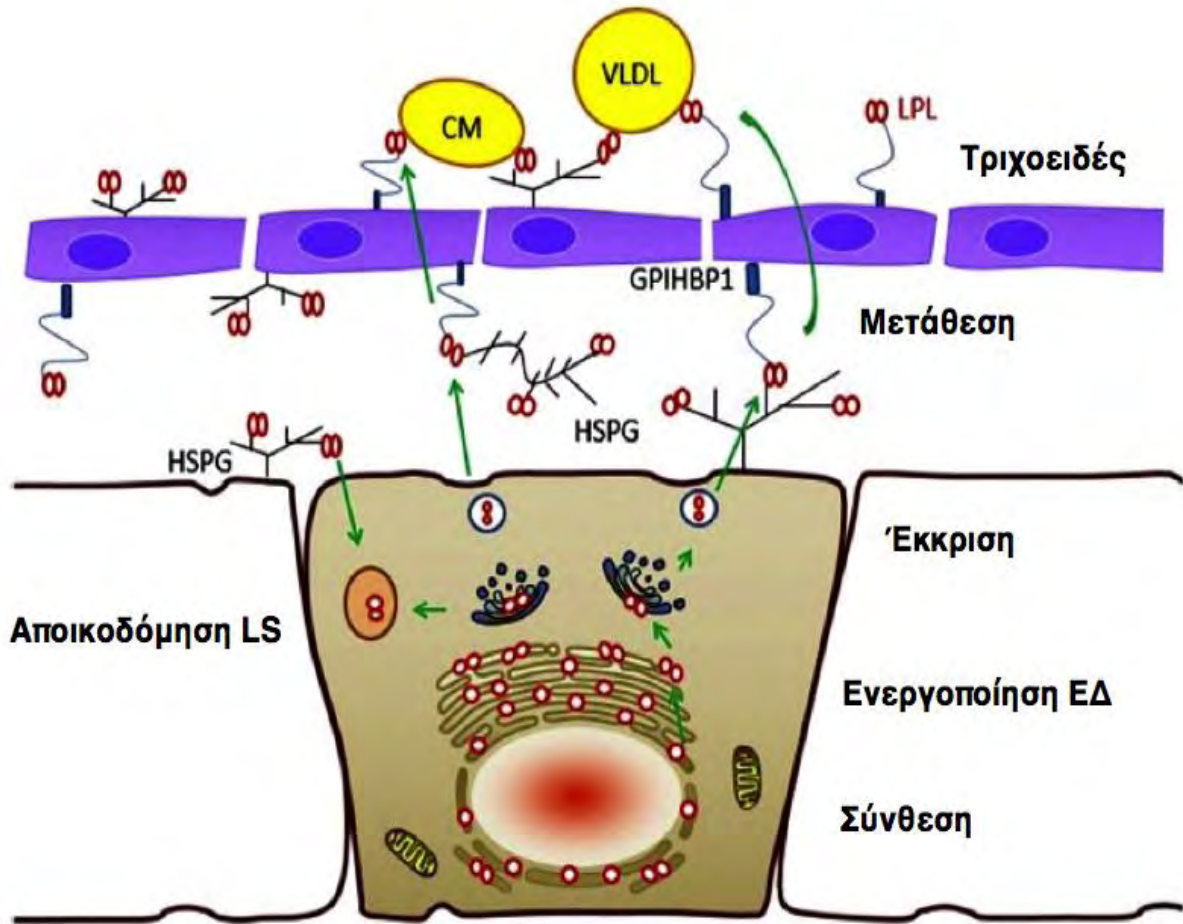
## **2.5 Σύνθεση, επεξεργασία και απελευθέρωση της LPL από παρεγχυματικά κύτταρα και μετατόπιση στο ενδοθήλιο**

Από τη στιγμή που η LPL θα συντεθεί, εκκρίνεται και μεταφέρεται στην αυλική κοιλότητα ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών όπου και επιτελεί την λειτουργία της (43).

Αν και η φυσιολογική θέση δράσης της LPL είναι στην αυλική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων, όπου μπορεί να αλληλοεπιδρά με τις κυκλοφορούντες λιποπρωτεΐνες, στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα δεν υπάρχει σύνθεση της LPL. Αντίθετα, η LPL βρέθηκε σε όλους τους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους που υπάρχουν σε αυτούς τους ιστούς. Αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τη θεωρία ότι η λειτουργική LPL στην αυλική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων πρώτα συντίθεται από τα παρεγχυματικά κύτταρα και έπειτα μεταφέρεται στην θέση της δράσης της (48).

Το αρχικό βήμα είναι η μεταγραφή του γονιδίου της LPL στον πυρήνα των παρεγχυματικών κυττάρων από τους ιστούς που εκφράζουν το ένζυμο. Στη συνέχεια, το mRNA της LPL μεταφράζεται σε ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) πριν υποστεί μετα-μεταφραστική επεξεργασία. Στο πρώτο στάδιο γίνεται γλυκοζυλίωση, που αποτελεί μια διαδικασία που ξεκινάει καθώς το πρόδρομο μόριο συντίθεται και αρχίζει με την προσθήκη N-ολιγοσακχαρίτη στο ΕΔ. Η διαδικασία ολοκληρώνεται καθώς η πρωτεΐνη μεταφέρεται από το ΕΔ στο σύστημα Golgi. Η διαμόρφωση γίνεται στο trans-Golgi από το οποίο, η πρωτεΐνη μεταφέρεται στα εκκριτικά κυστίδια και μετά είτε στα λυσοσώματα για ενδοκυτταρική αποικοδόμηση είτε στην επιφάνεια των παρεγχυματικών κυττάρων όπου η LPL μπορεί να συνδεθεί στην HSPG (Εικόνα 5).

Τέλος, η LPL μεταφέρεται στις λειτουργικές θέσεις δέσμευσης της HSPG στο τριχοειδικό ενδοθήλιο όπου και επιτελείται η υδρόλυση των υψηλών σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνων (48). Ο ακριβής μηχανισμός για την διακυττάρωση της LPL μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, αλλά χρειάζεται τους υποδοχείς της HSPG καθώς και της VLDL (59).



**Εικόνα 5.** Σύνθεση, έκκριση και μετατόπιση της LPL. Μετά την σύνθεση στο ΕΔ, η LPL εξάγεται στη συσκευή Golgi για έκκριση ή λυσοσωματική αποικοδόμηση. Μετά την έκκριση, η LPL δεσμεύεται με την HSPG της κυτταρικής επιφάνειας και στην βασική επιφάνεια των τριχοειδών. Στη συνέχεια κινείται διακυτταρικά προς τον αυλό όπου επιτελεί την δράση της

Η ώριμη LPL αποτελείται περίπου από 12% υδατάνθρακες, με την πρωτεΐνη του ινδικού χοιριδίου και της όρνιθας να έχουν τρεις ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες, ενώ σε άλλα είδη να έχουν μόνο δυο. Η χρήση ειδικών αναστολέων για την γλυκοζυλίωση και την μετέπειτα επεξεργασία έδειξε ότι, η αποκοπή των μορίων γλυκόζης από τους N-ολιγοσακχαρίτες μέσω της δράσης της γλυκοσιδάσης στο ΕΔ, είναι το κρίσιμο στάδιο ώστε να αποκτήσει η πρωτεΐνη την καταλυτική της ενεργότητα και όχι η περαιτέρω επεξεργασία της στο σύστημα Golgi. Λόγω του ότι η καταλυτικά ενεργή LPL είναι ένα ομοδιμερές που συντίθεται στο ΕΔ, διαμορφώθηκε η υπόθεση ότι αποκοπή προκαλεί τον διμερισμό και την ενεργοποίηση της LPL (60).

## 2.6 Δομική ανάλυση της LPL

Η LPL, η ηπατική λιπάση και η παγκρεατική λιπάση είναι μέλη μιας μεγαλύτερης ενζυμικής οικογένειας, της  $\alpha/\beta$ - υδρολάσης. Οι  $\alpha/\beta$ -υδρολάσες έχουν δομική ομολογία, αλλά όχι απαραίτητα και ομολογία αλληλουχιών. Χαρακτηρίζονται από ένα καταλυτικό κέντρο που σχηματίζεται από  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα και  $\alpha$ -έλικες. Η LPL γλυκοζυλιώνεται, υπάρχει σαν διμερές και συμμετέχει σε πληθώρα αλληλεπιδράσεων με διαφορετικά μόρια, όπως τον συμπαράγοντα apoCII, τις HSPGs με υποστρώματα στο ενεργό του κέντρο και με συγκεκριμένους λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς (48).

Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών έχουν δείξει ότι η LPL είναι οργανωμένη σε δυο ξεχωριστές δομές, μιας μεγάλης αμινο-τελικής περιοχής (κατάλοιπα 1-312) και μιας μικρότερης καρβοξυτελικής περιοχής (κατάλοιπα 313-448), συνδεδεμένες από ένα ευέλικτο πεπτίδιο. Το καρβοξυτελικό άκρο απαιτείται για την σύνδεση της LPL στο υπόστρωμα της λιποπρωτεΐνης, ενώ το αμινοτελικό άκρο είναι υπεύθυνο για την καταλυτική ενεργότητα. Αυτό περιέχει την πιο συντηρημένη περιοχή καταλοίπων του ενεργού κέντρου (Ser-132, Asp-156 και His-241), μια οπή οξυανιόντος (Trp-55, Leu-133), ένα πολυπεπτιδικό «κάλυμμα» (κατάλοιπα 216–239), και έναν  $\beta 5$  βρόγχο (κατάλοιπα 54–64) (37,49). Ένα υποθετικό μοντέλο βάσει των παραπάνω είναι ότι η καταλυτική τριάδα υπάρχει σε περιοχή που αποτελείται από υδρόφοβες αλυσίδες τριών βρόγχων, καθιστώντας την είσοδο του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μη προσβάσιμη λόγω του πολυπεπτιδικού καλύμματος. Η σύνδεση του λιποπρωτεϊνικού υποστρώματος στην LPL οδηγεί σε συγκεκριμένη αλλαγή που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του «καλύμματος». Επιπλέον, ο  $\beta 5$  βρόγχος, ο οποίος έρχεται σε επαφή με το κάλυμμα μαζεύεται προς τα πίσω καθιστώντας το ενεργό κέντρο ακόμα πιο προσβάσιμο και φέρνει την oxygenation hole σε μια καταλυτικά πιο ικανή θέση. Το συνολικό αποτέλεσμα όλων αυτών των αλλαγών είναι μια αύξηση της υδροφοβικότητας της περιοχής γύρω από την καταλυτική τριάδα, η οποία με τη σειρά της προσελκύει τις πλευρικές αλυσίδες των λιπαρών οξέων του υποστρώματος και δίνει πρόσβαση της γλυκερόλης οπή οξυανιόντος για να γίνει η υδρόλυση. Ένας παραπλήσιος διαεπιφανειακός μηχανισμός κατά τον οποίο, το «κρυμμένο» ενεργό κέντρο φανερώνεται μέσα από το άνοιγμα του «καλύμματος», αφού το ένζυμο συνδεθεί το λιπιδικό υπόστρωμα, έχει παρατηρηθεί τόσο και στην παγκρεατική όσο και σε άλλου τύπου λιπάσες (61).

Η αλληλουχία της LPL περιέχει τρεις συγκλίνουσες (consensus) περιοχές για την N-γλυκοζυλίωση (Asn-X-Ser/Thr, όπου X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ) που βρίσκονται στα Asn-43, Asn-257 και Asn-359 στον άνθρωπο, το ποντίκι και το ινδικό χοιρίδιο αντίστοιχα.

Το Asn-257 αποτελεί μέρος του Asn-Pro-Ser που σπανίως γλυκοσυλιώνεται στους ευκαρυώτες. Από τα Asn-43 και Asn-359, έχει βρεθεί μέσω μεταλλαξιγένεσης ότι το πρώτο κατάλοιπο είναι απολύτως απαραίτητο για την ενεργότητα και έκκριση της LPL (52).

Όπως προαναφέρθηκε, η LPL απαιτεί την apoCII για την μέγιστη ενεργοποίηση της τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, και χωρίς αυτήν η LPL παρουσιάζει μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα (48). Η ενεργοποίηση της LPL από τον συμπαράγοντα της αναστέλλεται από αυξημένες ιοντικές δυνάμεις, υποδηλώνοντας έτσι μια λειτουργική φορτιο-προς-φορτίο αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών (62). Μελέτες έχουν δείξει ότι η θέση σύνδεσης για την apoCII βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο στην Lys147/Lys148 (49).

Ένα κοινό χαρακτηριστικό στην αλληλουχία της LPL των θηλαστικών και της όρνιθας είναι η παρουσία δέκα συντηρημένων καταλοίπων Cys που σχηματίζουν πέντε δισουλφιδικές γέφυρες, τέσσερις στην αμινοτελική περιοχή και μια στην καρβοξυτελική.

Η LPL του λαβρακίου, καθώς και των υπόλοιπων τελεόστεων, έχουν οχτώ κατάλοιπα Cys στην αμινοτελική τους περιοχή συντηρημένα, ενώ στην καρβοξυτελική περιοχή τα κατάλοιπα Cys έχουν αντικατασταθεί από κατάλοιπα Ser. Οι δισουλφιδικές γέφυρες στο αμινοτελικό άκρο της ανθρώπινης LPL είναι απαραίτητες για την λειτουργικότητα του ενζύμου ενώ μεταλλάξεις αντικατάστασης από Cys σε Ser στο καρβοξυτελικό άκρο μπορούν και εκφράζουν την LPL με ποσοστό ενεργότητας 76-85% με αυτήν του άγριου τύπου (63). Συνεπώς είναι πιθανό, ότι η απουσία της δισουλφιδικής γέφυρας στο καρβοξυτελικό άκρο στην LPL των τελεόστεων να μην επηρεάζει την ενεργότητα της.

Τέλος, τα μόρια των LPL των ψαριών έχουν 17 επιπλέον αμινοξέα στο καρβοξυτελικό τους άκρο συγκριτικά με την LPL των θηλαστικών και οι κότες 15 αμινοξέα παραπάνω (64).

Όλες οι αλληλουχίες της LPL δείχνουν μια αυστηρή συντήρηση του ενεργού κέντρου που περιέχει την καταλυτική τριάδα Ser-Asp-His, στο σημείο δηλαδή που γίνεται η υδρόλυση των TG (65). Επιπλέον, το πολυπεπτιδικό «κάλυμμα» που συμμετέχει στην εξειδίκευση του υποστρώματος εμφανίζει και αυτό υψηλό βαθμό συντήρησης καθώς υψηλά συντηρημένα είναι και τα κατάλοιπα κυστεΐνης που βοηθούν στον σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών στο N-άκρο (Cys-27 and Cys-40, Cys-216 and Cys 239, Cys-264 and Cys-283, Cys-275 and Cys-278; Αναφέρονται στην ανθρώπινη αλληλουχία της LPL). Παρόλα αυτά στο C-άκρο υπάρχουν δυο επιπλέον κυστεΐνες (Cys-418 and Cys-438) στο φαγγρί (47) και σε ανώτερα σπονδυλωτά (66), αλλά όχι στην ιριδίζουσα πέστροφα, στο zebra fish και στην τσιπούρα (38) (Εικόνα 5).

Η LPL μπορεί επίσης και αλληλεπιδρά με διάφορους κυτταρικούς υποδοχείς (67). Μελέτες απώλειας λειτουργίας έδειξαν ότι η σύνδεση της LPL σε τέτοιους υποδοχείς είναι ανεξάρτητη από την καταλυτική της λειτουργία και απαιτεί τα αμινοξέα 380-384 και 404-414

στο καρβοξυτελικό άκρο (68). Επιπλέον μελέτες, υποδηλώνουν ότι ένας σωστός αναδιπλωμένος βρόγχος είναι σημαντικός για την λειτουργία ‘‘γεφύρωσης’’ της LPL (69).

Η αλληλουχία της LPL στο seabass περιέχει μέχρι και τέσσερις πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης. Στα πτηνά και στα άλλα είδη ψαριών, έχουν βρεθεί επίσης περισσότερες από δυο θέσεις γλυκοζυλίωσης: τρεις στην όρνιθα, (64), στο zebra fish (GenBank accession no. NP\_571202), στην ιριδίζουσα πέστροφα (70), και στο φαγγρί (71), και τέσσερις στην τσιπούρα (Εικόνα 6). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, παρότι η LPL στα ψάρια περιέχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο Asn70 (στο λαβράκι Asn92), η συγκλίνουσα (consensus) αλληλουχία Asn–Xaa–Ser/Thr λείπει υποδεικνύοντας ότι αυτή η θέση N-γλυκοζυλίωσης είναι σημαντική στην LPL των θηλαστικών και της όρνιθας αλλά όχι στων ψαριών.

Παρόλα αυτά, υπάρχουν δυο πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης της που είναι σχεδόν πλήρως συντηρημένες μεταξύ των τελεοστεων και δεν παρουσιάζονται στα θηλαστικά π.χ Asn38 και Asn495 στην LPL του sea bass, αν και η λειτουργική τους σημασία σε σχέση με τη σταθερότητα και την ενεργότητα του μορίου πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω (38).





σκελετικοί μύες, οι θηλάζοντες μαστιτικοί αδένες και σε χαμηλότερα επίπεδα τα μακροφάγα, τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων και των ωοθηκών, συγκεκριμένα νευρικά κύτταρα, η θωρακική αορτή, ο σπλήνας, οι όρχεις, οι πνεύμονες και οι νεφροί (51,52,72,73). Η LPL επιπλέον συντίθεται από τα ηπατοκύτταρα κατά το εμβρυικό στάδιο, αλλά η παραγωγή καταστέλλεται σύντομα μετά την γέννηση (74). Συνεπώς η LPL θεωρείται ως ένα εξωηπατικό ένζυμο. Παρόλα αυτά, η ενεργότητα της LPL στο ήπαρ των ενήλικων ψαριών διατηρείται ακόμα (36) και έχει επιβεβαιωθεί από την παρουσία επαρκούς ποσότητας μεταγραφημάτων της LPL στο ήπαρ της ιριδιζουσας πέστροφας (36) και του φαγκριού (42). Στην ιριδιζουσα πέστροφα, η ενεργότητα της LPL είναι αυξημένη στις ωοθήκες αλλά μειώνεται στον λιπώδη ιστό της θηλυκής πέστροφας κατά τους μήνες που προηγούνται της αναπαραγωγής. Επίσης, το γονίδιο της LPL εκφράζεται στις ωοθήκες κατά την διάρκεια της ωογένεσης, αλλά όχι στα έμβρυα (70).

Η έκφραση της LPL στους ιστούς υπόκειται σε ρύθμιση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, με εμφανή αύξηση της στον λιπώδη ιστό. Η κυτταρική θέση της LPL σε κάποιο συγκεκριμένο όργανο μπορεί επίσης να ρυθμίζεται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Παραδείγματος χάριν, το μεγαλύτερο ποσοστό δραστηριότητας της LPL στην νεογνική καρδιά βρίσκεται στα μεσεγγυματικά κύτταρα, ενώ τα καρδιακά μυοκύτταρα αντιπροσωπεύουν την κυριότερη πηγή της LPL στην ενήλικη καρδιά (75).

Επιπροσθέτως, υπάρχει και ιστοειδική ρύθμιση της LPL η οποία προκαλείται από εποχιακές αλλαγές και από την σύσταση της διατροφής. Στην τσιπούρα έχει διαπιστωθεί διαβάθμιση της έκφρασης της LPL στους ιστούς με την μεγαλύτερη προς την μικρότερη να βρίσκεται αντίστοιχα στον λιπώδη ιστό, στο ήπαρ, και στο λευκό μυϊκό ιστό (λευκές μυϊκές ίνες) (38) το οποίο συνάδει και με άλλες μελέτες στην ιριδιζουσα πέστροφα (36).

## **2.8 Έκφραση της LPL σε εποχιακές και διατροφικές καταστάσεις**

Έχει διαπιστωθεί επίσης η ιστοειδική ρύθμιση της LPL προκαλούμενη από εποχιακές αλλαγές και διατροφικούς παράγοντες. Κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα ο ηπατοσωματικός δείκτης HIS (αναλογία βάρους ήπατος προς συνολικό βάρος σώματος) και τα κυκλοφορούντα τριγλυκερίδια βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, ενώ μειώνονται αισθητά την άνοιξη και το καλοκαίρι. Αντίθετα, το συνολικό λίπος του σώματος αυξάνεται κατά τις θερμές περιόδους και κυρίως την άνοιξη (38). Ανεξάρτητα από αυτό, το εποχιακό προφίλ της LPL ήταν παρόμοιο στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό, με την χαμηλότερη έκφραση της κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και εμφανή αύξηση την άνοιξη. Αυξημένη είναι η έκφραση της LPL στον μεσεντερικό λιπώδη ιστό κατά το τέλος της εαρινής περιόδου, γεγονός που υποδηλώνει

ότι μπορεί να εμπλέκεται σε μηχανισμούς που παίρνουν μέρος στην ενίσχυση της εναπόθεσης λιπιδίων κατά αυτήν την εποχή. Η έκφραση της LPL στους σκελετικούς μύες είναι χαμηλή τον χειμώνα και αυξάνεται προοδευτικά σε σημαντικά επίπεδα κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού.

Η μεγαλύτερη έκφραση της LPL στους μύες παρατηρείται τον Ιούλιο και αυτό διότι μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της διαθεσιμότητας της ενέργειας που χρειάζεται για την ενίσχυση της ανάπτυξης κατά την διάρκεια του καλοκαιριού (76).

Το ήπαρ της τσιπούρας έχει την δυνατότητα να αποθηκεύει επαρκή ποσά τριγλυκεριδίων και έχει παρατηρηθεί σοβαρή ηπατομεγαλία κατά την διάρκεια της φθινοπωρινής περιόδου (82). Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ηπατική έκφραση της LPL ρυθμίζεται θετικά στο τέλος της άνοιξης, που υποδηλώνει ότι η έκφραση της LPL στο ήπαρ δεν σχετίζεται αιτιολογικά με την αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου στο ήπαρ κατά την φθινοπωρινή περίοδο (77). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα ηπατικά τριγλυκερίδια δρουν σαν μια δυναμική αποθήκη λιπιδίων που προέρχεται από διαφορετικές πηγές (χυλομικρά, de novo σύνθεση λιπαρών οξέων και NEFA που απελευθερώνονται από ιστούς), και αυτό καθιστά εφικτό τον κεντρικό ρόλο του ήπατος στην προσαρμογή της μεταβολικής ροής των λιπιδίων ως απάντηση στις μεταβολικές ανάγκες του σώματος. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ενισχυμένη έκφραση της LPL κατά τη διάρκεια των θερμών περιόδων (αρχικά στους ιστούς αποθήκευσης λίπιδίων και μετά στους σκελετικούς μύς) φαίνεται να διαδραματίζει ένα βασικό ρόλο στην σημαντικά μειωμένη κυκλοφορία των τριγλυκεριδίων κατά τη διάρκεια των εποχών άνοιξης-καλοκαιριού (38).

## **2.9 Μηχανισμοί που συμμετέχουν στην ρύθμιση της LPL**

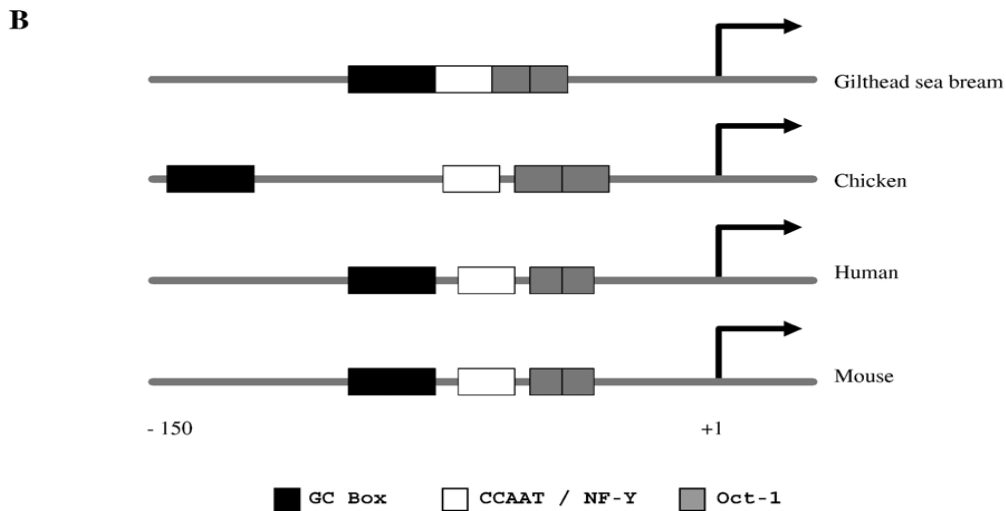
Μεταγραφικοί καθώς και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί ελέγχου έχουν περιγραφεί για την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της LPL. Η LPL επίσης μπορεί να ρυθμιστεί και με ιστο/κυτταρο-ειδικό τρόπο. Δυστυχώς, οι μηχανισμοί που ευθύνονται για αυτόν τον διαφορετικό τρόπο ρύθμισης δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς.

### **2.9.1 Μεταγραφικός έλεγχος**

Αυτός ο έλεγχος επιτυγχάνεται μέσα από την δράση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, που αλληλοεπιδρούν με τις cis-δραστικές αλληλουχίες που υπάρχουν στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου.

Ο υποκινητής του LPL γονιδίου της τσιπούρας έχει ένα μεγάλη θέση έναρξης της μεταγραφής, 154 νουκλεοτίδια ανοδικά του κωδικονίου έναρξης ATG. Υπάρχουν αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες, ανάμεσα τους οι οποίοι είναι οι AP-1 (activator protein 1, -279 nt),

HIF-1 (hypoxia inducible factor, -417 nt), TGIF (TG-interacting factor; -985, -829, -221 nt) και ο HSF-2 (heat shock factor 2; -1196 nt) με δυνατότητα πρόσβασης στον υποκινητή. Δεν υπάρχει πλαίσιο ATATA σαν ρυθμιστική αλληλουχία του υποκινητή, αλλά υπάρχει η αντίστοιχη αλληλουχία έναρξης που περικλείει την περιοχή μεταγραφής (Inr; YYA+1NWYY) καθώς το καθοδικό στοιχείο DPE (DPE; RGWYV) που λειτουργούν σαν την κεντρική μονάδα του υποκινητή σε αυτό το γονίδιο. Επιπλέον ρυθμιστικά στοιχεία που είναι παρόμοια με αυτά της όρνιθας, του ποντικού και του ανθρώπινου γονιδίου της LPL είναι ένα πλαίσιο GC (-94 nt), ένα πλαίσιο CCAAT (-72 nt) καθώς και επαναλήψεις του (OCT1; -60; -55 nt) (79, Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** (Α) 5' αμετάφραση περιοχή του γονιδίου *LPL* της τσιπούρας. Τα πλαίσια *Gc*, *CCAAT* και *Oct-1* (δύο επαναλήψεις) είναι υπογραμμισμένα. Επισημαίνονται επίσης και τα στοιχεία *Inr* και *DPE*. (Β) Αναπαράσταση των συντηρημένων στοιχείων του υποκινητή στο γονίδιο της *LPL* στη τσιπούρα, την όρνιθα, τον άνθρωπο και τον ποντικό. Η μεταγραφή ξεκινά εκεί που υποδηλώνουν τα βέλη (79).

## 2.9.2 Μετά-μεταγραφικός έλεγχος

Αυτό το είδος ελέγχου είναι το πιο διαδεδομένο και περιλαμβάνει την ρύθμιση της *LPL* ως απόκριση σε αλλαγές στη διατροφή, στην ινσουλίνη, την αδρεναλίνη και τις θυρεοειδικές ορμόνες (80). Η μετα-μεταγραφική ρύθμιση μπορεί ενδεχομένως να επιτελείται σε αρκετά

βήματα, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας του mRNA, της μετάφρασης, της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης, της επεξεργασίας, της μετατόπισης της στην θέση δράσης της, καθώς και στην ανταγωνιστική αναστολή της από διάφορα μόρια.

Για αρκετά από αυτά τα βήματα έχει περιγράψει η συμμετοχή των παραγόντων αυτών. Αρχικά, η ινσουλίνη αυξάνει τα επίπεδα του mRNA της LPL στα λιποκύτταρα χωρίς να επηρεάζει το ρυθμό της μεταγραφής του γονιδίου, ρυθμίζοντας τη σταθερότητα του mRNA (81). Δεύτερον, η μεταγραφική ρύθμιση έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης της LPL σε απόκριση στις κατεχολαμίνες και στις θυρεοειδικές ορμόνες. Έτσι, λιποκύτταρα σε καλλιέργεια έδειξαν μειωμένη σύνθεση της LPL ως αποτέλεσμα έκθεσης σε κατεχολαμίνες, που μεσολαβείται από την παρουσία μιας πρωτεΐνης που προσδένεται στο RNA και αλληλοεπιδρά με κοντινή 3' αμετάφραστη περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1599 και 1638 (82). Ποντίκια με υποθυρεοειδισμό έδειξαν μια αύξηση στην μεταγραφή της LPL, λόγω της απουσίας της πρωτεΐνης που προσδένει στην ίδια περιοχή. Σε διαβητικά μοντέλα με ανεπάρκεια ινσουλίνης, η μειωμένη LPL στον λιπώδη ιστό, οφείλεται επίσης στην μεταφραστική αναστολή από έναν κυτταροπλασματικό παράγοντα που αλληλοεπιδρά με την 3' αμετάφραστη περιοχή, αλλά εδώ η περιοχή αυτή βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1834 και 1980 (83).

Τέλος, τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (NEFA), σε υψηλές συγκεντρώσεις, έχει βρεθεί ότι ανταγωνίζονται με την HSPG/LPL αλληλεπίδραση και συνεπώς οδηγούν στην εκτόπιση της LPL στο αγγείο. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια αρνητική ανατροφοδότηση για την ρύθμιση της LPL εμποδίζοντας έτσι την υπερπροσφορά των NEFA στους ιστούς σε περιόδους εντατικής λιπόλυσης (84).

### ***2.10 Οι τριακυλογλυκερόλες υδρολύονται από λιπάσες που ρυθμίζονται από το cAMP***

Το εναρκτήριο γεγονός στη χρησιμοποίηση λίπους ως πηγής ενέργειας είναι η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών από λιπάσες, δηλαδή η λιπόλυση. Οι λιπάσες του λιπώδους ιστού ενεργοποιούνται από την επίδραση επινεφρίνης, νορεπινεφρίνης, γλυκαγόνης και ACTH στα κύτταρα του ιστού. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού οι ορμόνες αυτές διεγείρουν τους υποδοχείς 7TM οι οποίοι ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση (AC). Η αυξημένη συγκέντρωση του cAMP στη συνέχεια διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία ενεργοποιεί τις λιπάσες φωσφορυλιώνοντας τις. Άρα η επινεφρίνη, η νορεπινεφρίνη, η γλυκαγόνη και η φλοιοτρόπος ορμόνη επάγουν τη λιπόλυση. Αντίθετα η ινσουλίνη αναστέλλει την λιπόλυση. Τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται δεν είναι διαλυτά στο πλάσμα του αίματος και έτσι κατά την απελευθέρωση, η λευκωματίνη του ορού δεσμεύει τα λιπαρά οξέα

χρησιμοποιώντας ως φορέας. Με τους τρόπους αυτούς, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα διατίθενται ως καύσιμο στους άλλους ιστούς.

Οι μηχανισμοί της διακυτταρικής επικοινωνίας που εμπλέκονται στην ρύθμιση της έκφρασης της LPL, δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και οι κυτοκίνες επηρεάζουν την έκφραση της LPL στα μακροφάγα, χρησιμοποιώντας είτε κινάσες τυροσίνης (συγκεκριμένα ένζυμα δεν έχουν αναγνωρισθεί ακόμα) είτε κινάσες τυροσίνης σε συνδυασμό με PIK3R1. Προσφάτως, αναγνωρίστηκε ένας ρόλος της καζεϊνικής κινάσης 2 στην καταστολή της μεταγραφής της LPL που προκαλείται από την ιντερφερόνη- $\gamma$  (85).

Είναι εμφανές ότι αρκετοί παράγοντες των μακροφάγων που αυξάνουν την LPL (γλυκόζη, PDGF, εστέρες φορβόλης και ρίζες οξυγόνου) δρουν κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C. (86). Είναι ενδιαφέρον, ότι αυτός ο σηματοδοτικός καταρράκτης εμπλέκεται στην ιδιοσυστατική έκφραση της LPL στα λιποκύτταρα διότι έχει βρεθεί ότι η φαρμακολογική αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης C αναστέλλει την σύνθεση της LPL μέσω καταστολής της μετάφρασης (87). Η καταστολή των επιπέδων του LPL mRNA από τις προσταγλανδίνες έχει βρεθεί να συσχετίζεται με τα αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα του cAMP (88).

Γενικά, φαίνεται ότι η αύξηση του cAMP οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της LPL σε όλους τους ιστούς που έχουν μελετηθεί στον άνθρωπο και στους αρουραίους, με την εξαίρεση αυτά των ανθρώπινων πρόδρομων μονοκυττάρων που μετατρέπονται σε μακροφάγα. Αντίθετα, όλες οι μελέτες που χρησιμοποίησαν ιστούς από ποντίκια έδειξαν μείωση στην έκφραση της LPL, υποδεικνύοντας έτσι μια πιθανή ειδο-ειδική δράση του cAMP όσον αφορά την ρύθμιση της LPL (89).

### ***3.1 Προέλευση των γονιδίων των λιπασών***

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι λιπάσες είναι υδατοδιαλυτά ένζυμα που υδρολύουν εστερικούς δεσμούς αδιάλυτων υποστρωμάτων, όπως πχ. τα τριγλυκερίδια και τους εστέρες χοληστερόλης. Το 1986, αλληλουχήθηκαν διάφορα πρωτεολυμένα πεπτίδια προερχόμενα από την LPL, και βρέθηκε ότι είχαν παρόμοια αμινοξική ομολογία με αυτήν της παγρεατικής λιπάσης (PL). Αυτό οδήγησε τους ερευνητές να θεωρήσουν ότι αυτές οι λιπάσες σχηματίζουν μια πολυγενετική οικογένεια που σχετίζεται με την μεταφορά και την απορρόφηση των λιπιδίων και ότι ίσως αυτά τα ένζυμα προήλθαν από ένα κοινό προγονικό γονίδιο και διαχωρίστηκαν σε ξεχωριστά εξελικτικά μονοπάτια. Μέσα από την "έκρηξη" των τεχνικών αλληλούχισης και γονιδιακής οργάνωσης, η υπόθεση αυτή δικαιώθηκε, και κατέδειξε ότι η ηπατική λιπάση και η LPL ανήκουν σε οικογένεια γονιδίων που περιλαμβάνουν επίσης και την

παγκρεατική λιπάση. Πρόσφατες μελέτες εντάσσουν ακόμα δυο λιπολυτικά ένζυμα στην συγκεκριμένη οικογένεια την ενδοθηλιακή (EL) και την φωσφατιδυλοσερ-φωσφολιπάση A1 λιπάση (50).

### **3.2 Φυλογενετικές σχέσεις λιπασών**

Η ανάλυση των αλληλουχιών της οικογένειας λιπασών έδειξε φυλογενετικές συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων αυτών. Παραδείγματος χάριν, βασιζόμενοι στη κοινή οργάνωση των ορίων ιντρονίων-εξονίων και επιπλέον μιας υψηλής ομολογίας των αλληλουχιών προτάθηκε ότι η LPL, η ηπατική και η παγκρεατική λιπάση προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο. Βρέθηκε επίσης ότι η LPL και η ηπατική λιπάση (HL) να είναι περισσότερο συγγενικές μεταξύ τους από ότι με την παγκρεατική λιπάση (PL). Η εκτεταμένη ανάλυση όλων των λιπασών υπέδειξε ότι η ενδοθηλιακή λιπάση (EL) είναι ακόμα περισσότερο συγγενική με την LPL από ότι με την ηπατική και ότι η φωσφατιδυλοσερ-φωσφολιπάση A1 λιπάση διαχωρίστηκε πιο γρήγορα από την παγκρεατική λιπάση από ότι η LPL. Τα γονίδια της LPL περιέχουν συνήθως 10 εξόνια που κωδικοποιούν για αλληλουχίες, τα οποία ίσως υφίστανται αναδιάταξη δίνοντας διάφορες ισοπρωτεΐνες σε κάθε περίπτωση (90).

Εκτός από την άμεση συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών, η γνώση της κρυσταλλικής δομής της παγκρεατικής λιπάσης και ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός βάσεων δεδομένων, οδήγησε την αναγνώριση μιας υπεροικογένειας που περιλαμβάνει εστεράσες και θειο-εστεράσες. Όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής μοιράζονται μια χαρακτηριστική δομική εικόνα που περικλείει τις ενεργές θέσεις των καταλοίπων, που ονομάζονται πτυχές α/β υδρολασών. Αυτές οι πτυχές είναι υπεύθυνες για την συντήρηση της αντιπαράθεσης των διατηρημένων υπολλειμάτων στο πενταπεπτίδιο της ενεργού θέσης και εξελίχθηκαν διαφορετικά λόγω των δυνάμεων που διαμόρφωσαν το ανάλογο πενταπεπτίδιο των πρωτεασών σερίνης. Έτσι, ασχέτως της συντηρημένης κοινής αλληλουχίας, αυτά τα δυο μοτίβα είναι πιθανό να είναι αποτέλεσμα σύγκλισης της εξέλιξης παρά διαχωρισμού της. (50)

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και μελετηθεί κλώνοι cDNA για την LPL από διάφορα είδη συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου, του ινδικού χοιριδίου, του ποντικού, των ψαριών κ.α. Η ομολογία των αλληλουχιών της πρόδρομης πρωτεΐνης σε όλα τα θηλαστικά σχεδόν ξεπερνά το 90%. Η σύγκριση ομολογίας μεταξύ πτηνών και θηλαστικών κυμαίνεται περίπου στο 70%. Στο επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, η ομολογία μεταξύ των θηλαστικών κυμαίνεται στο 77-82% και στο 61% μεταξύ θηλαστικών και πτηνών (Εικόνα 8).



HUMAN	.....ADQRDFDIDIESKFLRTPEDTARDTCHLIPGVAVSVATCSFNHSSKTFVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	72
MOUSE	.....ADAGRDFSDIESKFLRTPEDTARDTCHLIPGLADSVNCSFNHSSKTFVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	72
PIG	.....LIVSRGSLATADRI SGRDFDIDIESKFLRTPEDTVDITCHLIPGVTSVAVCSFNHSSKTFVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	85
CHICKEN	.....SDPEAEMDFEIESKFLRTPAEFDHICVIVPGQMASIACQNPMTSATTFVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	74
ZEBRA	..LETTIDPTAESITLSDIIG-----NATEWMDFDIDIESKFSRLLEEPEDDLCYIVPGQPSIKKCNFTEIKTFFVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	93
TROUT	.....STPEQTLPGNS-----NSTEWLDDYIDIVSISKFLRTPAEIPDDICVIVPGQPSIIPKCBPFGKATFVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	85
PAGRUS	.....LEEELSDSIPGN---FLDPLKDLIEHKDDAMQTVAKFSLRKPSHPDDICVIVPGKPTSLAACPAGSSKTFVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	92
SPARUS	SDPEPNTTTTSSSSSSSVFVNTTITATLFTTAEMI DDIIDIVSISKFLRTPADI PDDICVIVPGKPDITKICBPNNEICSPVVIHGWTVTGMYBSWPKLVPAI	105

HUMAN	YRREEDSNVIVVDMLSRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	177
MOUSE	YRREEDSNVIVVDMLYRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	177
PIG	YRREEDSNVIVVDMLSRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	190
CHICKEN	YRREEDSNVIVVDMLYRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	179
ZEBRA	YRREEDSNVIVVDMLSRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	198
TROUT	YRREEDSNVIVVDMLYRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	190
PAGRUS	YRREEDSNVIVVDMLYRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	197
SPARUS	YRREEDSNVIVVDMLYRAQOHYFISAGYTKLVGCDVAKFINNMBEEFYPLDNVHLLGYSIGAFAGIAGSLTNKKNRITGLDPAGNFEYAFPSRLSPDDAD	210

S D

HUMAN	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	278
MOUSE	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	278
PIG	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	291
CHICKEN	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	280
ZEBRA	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	299
TROUT	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	292
PAGRUS	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	298
SPARUS	FVDVLHTRGSEFRSISIGIQKPVGEVDIYPNGGTFPOPCNIGEARIVTAEERGLG---DVDQLVKCSHERSIHLFIDSLLA--EENFSAYRCNSKRAFNKGLCLSC	314

LTD H

HUMAN	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	382
MOUSE	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	382
PIG	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	395
CHICKEN	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	384
ZEBRA	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	403
TROUT	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	396
PAGRUS	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	403
SPARUS	RKNRCNVLGVEINKVRAKFSKMYLKTRESOMPKYKVFHYQVNIHFGTENGKQHNCAFBSILYGAVFBERNIPFLEVEVFNKTYSPFLNYTVDIGILLMLKIKW	418

N-TERMINUS | C-TERMINUS NXT

HUMAN	KQDSYFWSM-----WVSSP---GPAIDKIRVRAGETQKVIIFCSREK-VSHIQKCKAPAVFVKCHDKSLNRGG-----	448
MOUSE	MQDSYFWSM-----WVSSP---GPAIDKIRVRAGETQKVIIFCSREK-VSHIQKCKKDSAVFVKCHDKSLNRGG-----	447
PIG	VQDSYFWSM-----WVSSP---GPAIDKIRVRAGETQKVIIFCSREK-KSHIQKCKSSVAVFVKCHDKSLNRGG-----	461
CHICKEN	ENDAYFWSM-----WVTPF---GPTIDKIRVRAGETQKVIIFCSREK-DG-SSFLCKCEEAAPVVKCLEQVGRVGGAKKASKENSAHESA--	465
ZEBRA	EPDILISMP-----WVNSD---TPEIRKIRVRAGETQKVIIFCSREK-ESEFYSLSGGEAAVAVKQKRAQSSRNQRILHKMKMHGSSPKQNN	486
TROUT	ENDAYFWSM-----IWNK---MSEIRKIRVRAGETQKVIIFCSREK-DG-SSFLCKCEEAAPVVKCLEQVGRVGGAKKASKENSAHESA--	480
PAGRUS	EETNGFWSM-----WVSSP---GPAIDKIRVRAGETQKVIIFCSREK-ESEFYSLSGGEAAVAVKQKRAQSSRNQRILHKMKMHGSSPKQNN	488
SPARUS	EPDILISMP-----WVNSD---TPEIRKIRVRAGETQKVIIFCSREK-ESEFYSLSGGEAAVAVKQKRAQSSRNQRILHKMKMHGSSPKQNN	502

**Εικόνα 8.** Σύγκριση αμινοξικών αλληλουχιών της LPL του ανθρώπου, όρνιθας, zebra fish και τσιπούρας. Τα πανομοιότυπα αμινοξέα είναι υπογραμμισμένα με μαύρο και τα ομόλογα αμινοξέα με γκρι. Οι κυστείνες, οι συντηρημένες περιοχές N-γλυκοζυλίωσης (NXT), οι αμινοτελικές (N-terminus) και καρβοξυτελικές (C-terminus) περιοχές υποδηλώνονται. Το πολυπεπτιδικό "κάλυμμα" σημειώνεται με αγκύλη και η καταλυτική τριάδα δηλώνεται με τα υπογραμμισμένα κατάλοιπα (38).

Εκτός από τις αλληλουχίες cDNA, έχουν απομονωθεί και κάποιοι γενωμικοί κλώνοι για την LPL, για κάποια από αυτά τα είδη π.χ. ανθρώπου, ψαριών. Όταν πραγματοποιήθηκε η γενωμική ανάλυση, βρέθηκε ότι το γονίδιο της LPL αποτελείται από δέκα εξόνια και εννιά ιντρόνια, με το μέγεθος κάθε εξονίου να είναι λίαν συντηρημένο. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί για την 5' αμετάφραστη περιοχή, ενώ το εξόνιο 10 που είναι φανερά μεγαλύτερο από τα άλλα κωδικοποιεί για ολόκληρη την 3' αμετάφραστη περιοχή (37,66).

### **3.3 Η *lpl-like* αποτελεί παράλογο γονίδιο της *lpl***

Σε φυλογενετική ανάλυση για το γονίδιο της LPL της τσιπούρας βρέθηκε ότι η ώριμη πρωτεΐνη της LPL έχει μεγάλη ομοιότητα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες της LPL ιριδίζουσα πέστροφα και στο zebra fish με ομολογία 78-79%. Παρόλα αυτά, το ποσοστό της ταύτισης των αλληλουχιών μειώθηκε στο 47.8% όταν συνέκριναν την LPL της τσιπούρας με αυτήν, την οποία νόμιζαν LPL για το φαγκρί (42). Επιπλέον, ο Oku και οι συνεργάτες του (71) αναγνώρισαν αυτή την δεύτερη LPL ως LPL2 στο φαγκρί, η οποία μετά από φυλογενετική ανάλυση βρέθηκε να ομαδοποιείται πιο κοντά με την LPL απ' ό,τι με τα υπόλοιπα γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια των λιπασών. Στη τσιπούρα αναγνωρίστηκε επίσης μια λιποπρωτεϊνική λιπάση που αναφέρεται ως LPL-like η οποία έχει τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την αυτήν που τεκμηριώθηκε ως LPL2 (27). Συνεπώς, υπάρχει ένα δεύτερο γονίδιο, το *lpl-like* που φέρεται να αποτελεί μια ισομορφή της LPL (Εικόνα 9).

### **3.4 Προφίλ έκφρασης της LPL-like**

Στο φαγκρί η LPL και η LPL-like εκφράζονται στον λιπώδη ιστό, στα βράγχια, στην καρδιά, στο ηπατοπάγκρεας, στις γονάδες, καθώς και στους μύες. Παρόλα αυτά η έκφραση της LPL είναι χαμηλή στους μύες. Αντίθετα η LPL-like αποτελεί την κύρια ισομορφή στους σκελετικούς μύες στη τσιπούρα και η έκφραση της ρυθμίζεται θετικά από τη μείωση της τροφής (27).

LPL1	-----MG	KENISFLTIV	IILGKIFATF	SSDPEPTTTS	SSSSSTVFV	NTTITATPLP	TTTEWITDYT	62
LPL2	-----M	KAWRVVFLYF	LVLNAVQVH	TSLEEEELSDS	IFGNFLDPLK	DLIEHKDDAN		51
HL	-----	-----	-----MSVVKI	LCYLLLTYL	HL	NEAKTKGSR	AADEEQRGVL	36
PL	MRLRSVLSW	AALMTCLPWG	GTAQRPASVL	PWHLEEIGTR	FLLFTQKNRY	YQEIKTDQNI	QASNYSGMRK	70
*								
LPL1	DI--VSKFSL	RTADIPDDDM	CYIVAGSPDT	IEDCEFPET	QTFIVIHGWT	VTGMFESWVP	KLVSALYERE	130
LPL2	QT--VAKFSL	RKPSHPDDL	CYIVPGKPS	LAACFNSSS	KTFLVIHGWT	LSGMFESWVA	KLVSALYERE	119
HL	KP--HVSSSV	FGLFVEEEN	CALDPLQLHT	LTSCGFNSSN	PLIIITHGWS	VDGMMESWVH	RLATTLKTHL	104
PL	TRFIIPGYLE	KGDEDWPQDM	C-KVMLK-WE	NVNC-----	-----	-----	-----	102
* * * * *								
LPL1	PSANVIVVDW	LTRANQHYPT	SAAYTKLVGR	DVAKFVTWIQ	KELHLPWDR	HLLGYSLGAH	VAGIAGDLTE	200
LPL2	QTANVIVVDW	LTSANQHYVY	AAQNTKAVGQ	EIARFIDWIE	ETTNMPLNI	HLIGYSLGAH	VAGFAGSHAT	189
HL	IDVNVVITDW	LLLAHQHYPT	AAQSTRVVGK	DIHLLQSLQ	VHYRFQLRKA	HLIGYSLGAH	ISGFAGSYLE	174
PL	-----IAVEW	KKGVKQYQA	AANNARVVA	QVASMIFLM	GNYKQKADKF	HIIGHSLGAH	AAGDTGSRIP	167
**** ** *								
LPL1	H--KISRITG	LDPAGPTFEN	ADNQNTLSPD	DAQFVDVLHT	NTRGS-PDRS	IGIQRPVGH	DIYPNGGTFQ	267
LPL2	N--KVGRITG	LDPAGPDFEG	MHAHRRSPD	DAHFDVLHT	FTRGS-LGLS	IGIQRPVGH	DIYPNGGSFQ	256
HL	GSEKIGRITG	LDPAGPLFEG	MSPTDRSPD	DAEFVDAIHT	FHER-MGLS	VGIKQAVAHY	DFYPNGGDFQ	243
PL	G--LARITG	LDPVEPYFQD	TDASVRLDTN	DAIFVDVIHT	DGLPFDKLG	LGMSHSVGH	DFYPNGGELM	234
***								
LPL1	PGCDIQSTLL	GIALEGIKGL	QNMDQLVKCS	HERSIHLFID	SLLNTEQQSM	AYRCNSKEAF	NKGLCLSCRK	337
LPL2	PGCNLRGAL	KIANFGIFA-	ITDAVKCE	HERSIHLFID	SLLNEQEA	AYRCGSSDMF	NRGMCLSCRK	323
HL	PGCDLQNIYE	HIAQYGLLG-	FEQTVKCA	HERSVHLFID	SLLNEDKQSM	AYRCSDNSAF	VKGVCLDCRK	310
PL	PGCSTNRGPP	TDLDAIWEG-	TKKFDACN	HVRAYQYYS	S-MVKPQGFV	GFPCSDKGSF	AAGKCFCAH	300
* *								
LPL1	NRCNKLGYNI	NKVRRTSTK	MYLKTREMP	YKVFHYQVKV	HFFSKDPLSF	TDQPMKISLY	GTHGEKEDIP	407
LPL2	GRCNTVGYDI	SKVRKARNVQ	MYTKTRASMP	FRVYHYQLKI	HFSSKVNRS	MEPSLTVSLY	GTNGEAEENLE	393
HL	NRCNTLGYNI	RKVRSGASKR	LYLKTRSRMP	YKLHHYQFRI	QFV--NQMES	IEPSLTISLS	GTKEESGDLS	378
PL	DNCPLMGHDA	DRFTVTDDVL	KMKYFLNTGR	SEPFGRYSYR	VTVTLDGPSW	PNP--GFLY	VALAGDND--	365
* * * * *								
LPL1	HVL-PVMKGN	TTLFLITTD	VDIGDLMIVK	LRWEKDTIIS	WS-----	-DWWGSSKFH	IRKLRIK---	464
LPL2	LKLKEKIATN	KTHSFLLVTE	KDIGDMLMLK	FKWE-ETNG-	WSTSNMLKMY	SSWWSGSDG	ANMEVHKIRI	461
HL	ITVPETIWN	KTFTFLITLD	KDLGDLMLLK	LHWE--GSAM	WKNVWNRVQT	IIPWGSRRMK	PLLSVGKISV	446
PL	-----NT	EYQLHVGT	MPGRTYELLI	DAEVNVS--	---VTEVKFR	WNNHILNPLN	PKYGASKVAL	422
*								
LPL1	-SGETQSKVI	FSAKEGEFVY	LVRGGEDGVF	VKSKEDNLSR	KEKLMHKLK	QGSLFGQSDA		523
LPL2	RAGETQQKMV	FCVKDPESQK	L--TQEVTF	VKCKDAWRN	SKQTPKRVTL	EKH		511
HL	KAGETQERTS	FCAMTNEDQQ	VEVSQDKV-Y	VRCKEETQKQ	RRRKHNLVLR	EP		497
PL	QRGKDKMIIF	FC--GTQ	KVEENEIQSV	LPCQV				452

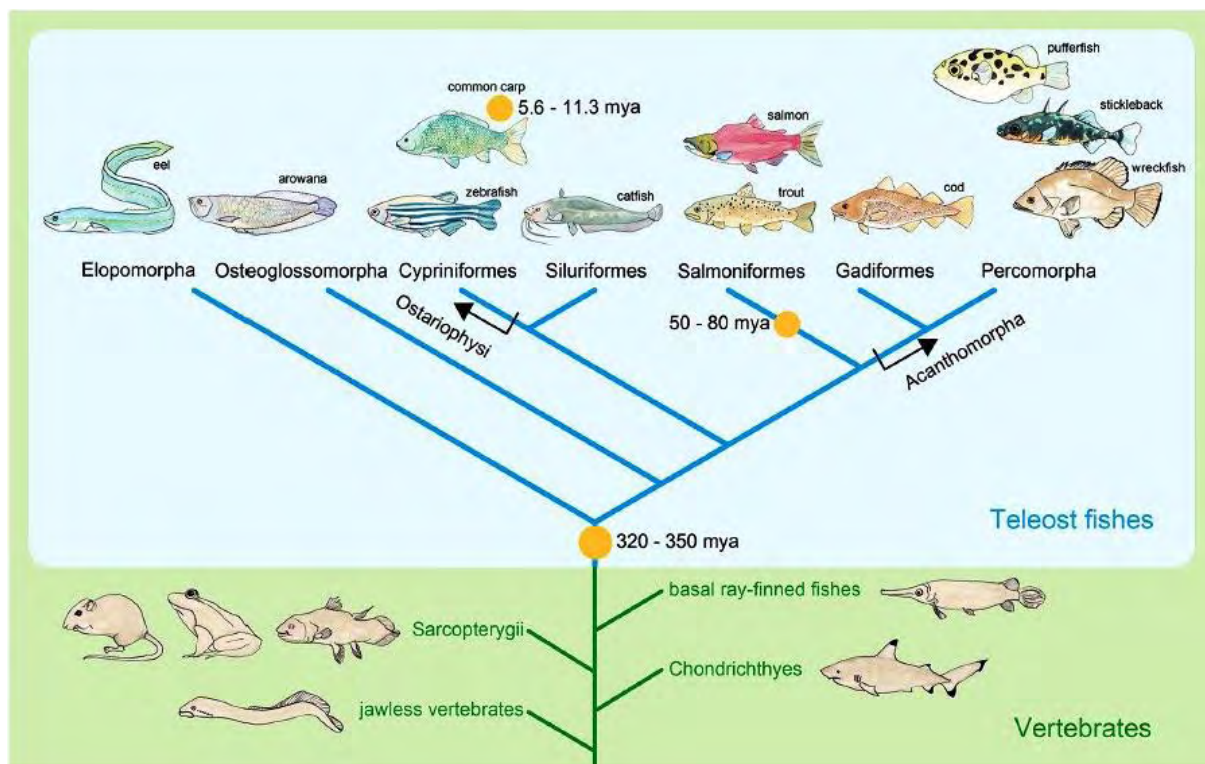
**Εικόνα 9.** Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών της LPL (LPL1) και LPL-like (LPL2) στο *Pagrus major*. Τα κενά εντάχθηκαν ώστε να μεγιστοποιηθεί η ταύτιση των αλληλουχιών. Οι καταλυτικές τριάδες βρίσκονται στα τετράγωνα και η περιοχή σύνδεσης λιπιδίων είναι υπογραμμισμένη. Οι αστερίσκοι (\*) υποδηλώνουν τα συντηρημένα κατάλοιπα αμινοξέων. HL=Ηπατική λιπάση, PL=παγκρεατική λιπάση

### 3.5 Διπλασιασμός γονιδιώματος στους τελεόστεους

Είναι πλέον γνωστό ότι πριν την εξελικτική απόκλιση των σπονδυλωτών προηγήθηκαν δυο κύκλοι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος-WGD (R1,R2), και ότι αυτό το γεγονός συνετέλεσε στην διαφοροποίηση και στην εξελικτική καινοτομία μεταξύ των

σπονδυλωτών (91). Ο πρώτος και δεύτερος κύκλος του διπλασιασμού του γονιδιώματος στην εξέλιξη των χορδωτών (R1, R2) συνέβη σχετικά με γρήγορη αλλαγή στη βάση της εξέλιξης των σπονδυλωτών, πριν ή περίπου κατά την διάρκεια της απόκλισης των αγκάθων από τα γναθοστόματα σπονδυλωτά περίπου 500 εκατομμύρια χρόνια πριν (Mya). Ένας τρίτος διπλασιασμός του γονιδιώματος (R3), συνέβη στην βάση της διακλάδωσης των τελεόστεων (teleost-specific, TS-WGD) μετά τον διαχωρισμό τους από τους μη τελεόστεους ακτινοπερύγιους ιχθύες περίπου 350 Mya (92,93).

Οι τελεόστεοι ιχθύες περιλαμβάνουν τα περισσότερα οστεώδη ψάρια και είναι μακράν η πιο ποικιλόμορφη ομάδα σπονδυλωτών. Ο ειδικός διπλασιασμός του γονιδιώματος των τελεόστεων φαίνεται να έχει προδώσει καινούργιες ιδιότητες στην ποικιλότητα της μορφολογίας, της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς των τελεόστεων ιχθύων, πιθανώς διευκολύνοντας την διαφοροποίηση και την προσαρμογή αυτών των ειδών σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Επιπλέον συνέβη ένας ακόμα διπλασιασμός του γονιδιώματος (R4) περίπου 50 mya στην βάση της διακλάδωσης των σαλμονοειδών (94) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10.** Φυλογένεση των τελεόστεων. Η γενεολογία των τελεόστεων διαχωρίστηκε τους βασικούς ακτινοπερύγιους και άρχισε να αποκλίνει μετά από τον TS-WGD πριν από 320-350 mya (μεγάλος πορτοκαλί κύκλος). Οι μικρότεροι κύκλοι δείχνουν επιπλέον WGD που συνέβησαν σε τελεόστεους.

Ο διπλασιασμός ολόκληρων των γονιδιωμάτων αρχικά οδηγεί σε πολυπλοειδία και μπορεί να επιτευχθεί μέσω του μη διαχωρισμού στην μείωση ή στον διπλασιασμό του

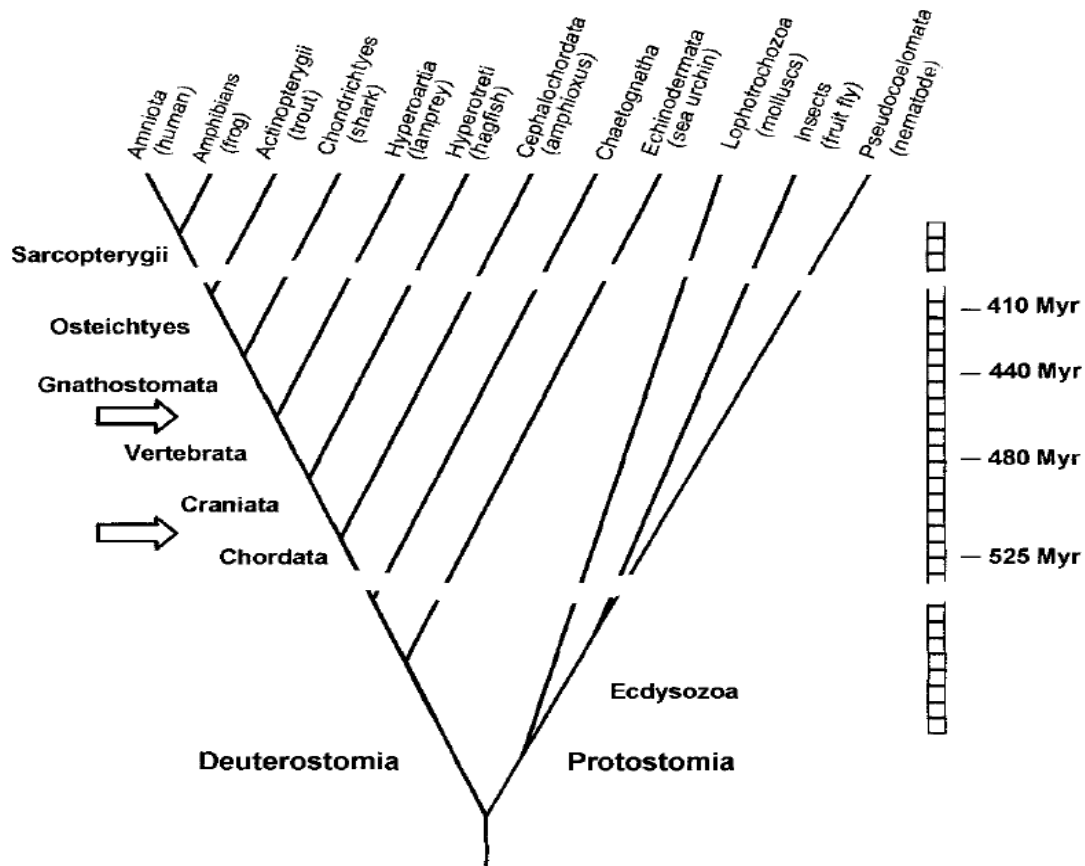
γονιδιώματος στα σωματικά κύτταρα, είτε στην γονική βλαστική σειρά είτε στο πρώιμο εμβρυικό στάδιο. Όσο προχωρά η εξέλιξη όμως, η πολυπλοειδία δεν εξακολουθεί να υφίσταται. Τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα συσσωρεύουν μεταλλάξεις μέχρι να γίνουν τόσο διαφορετικά ώστε να μην μπορούν να ζευγαρώσουν ως τετρασθενή κατά τη διάρκεια της μείωσης. Τελικά, όταν αποκαθίσταται η δισωμική κληρονομικότητα όλων των χρωμοσωμάτων δημιουργείται ένας διπλοειδής οργανισμός. Αν και οι επανα-διπλοειδικοί οργανισμοί δεν είναι πλέον πολυπλοειδείς, συνεχίζουν και μεταφέρουν χαρακτηριστικά σημεία από το αρχέγονο γεγονός του διπλασιασμού, όπως γονίδια που έχουν διατηρηθεί ως αντίγραφα.

Αμέσως μετά τον διπλασιασμό, τα παράλογα γονίδια είναι πανομοιότυπα και λειτουργικά πλεονάζοντα. Αυτά τα γονίδια είναι καλοί υποψήφιοι ώστε να αποτελέσουν την πρώτη γενετική ύλη για την εξελικτική καινοτομία (95). Με αυτόν τον τρόπο τα γονίδια διαφεύγουν της εξελικτικής πίεσης. Έχει προταθεί ότι ο WGD είναι ιδιαίτερα απαραίτητος στην δημιουργία νέων γονιδίων, από τη στιγμή που κατά την διάρκεια του WGD όλο το γενετικό απόθεμα ενός οργανισμού διπλασιάζεται.

### ***3.6 WGDs και η εξέλιξη των τελεόστεων***

Λίγο μετά τον TS-WGD, η γενεαλογία των τελεόστεων διαχωρίστηκε σε τρεις μεγάλους κλάδους: στα Elopomorpha (χέλια), στα Osteoglossomorpha (arowana) και στα Clupeocephala. Τα Clupeocephala περιλαμβάνουν τις διακλαδώσεις, Ostariophysi (zebra fish) και των Acanthomorpha (βακαλάος, τσιπούρα). Αυτές οι τρεις ομάδες διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά την διατήρηση των προγονικών ορθόλογων γονιδίων που έχουν προέλθει από τους δυο αρχικούς R1 και R2. Παραδείγματος χάριν, ενώ πολλές ομάδες των Hox γονιδίων λείπουν από τα Clupeocephala, στα Elopomorpha υπάρχουν σχεδόν όλα ανέπαφα (96). Παράλληλα, όσον αφορά την διατήρηση ή την απώλεια των παράλογων γονιδίων στο TS-WGD, υπάρχει αρκετή ποικιλότητα ακόμα και μέσα στο zebra fish και στα Percomorpha (τσιπούρα, stickleback, pufferfishes κ.α), αν και συνολικά η πλειοψηφία της διατήρησης των παράλογων γονιδίων είναι παραπλήσια μεταξύ των γονιδιωμάτων των Clupeocephalan (97).

Βρέθηκε επίσης ότι τα διπλασιασμένα ορθόλογα γονίδια του ανθρώπου μπορούν να βρεθούν και σε άλλες ομάδες σπονδυλωτών. Αντιθέτως, στα ασπόνδυλα (εχινόδερμα, έντομα, νηματώδεις) βρέθηκε, μέσα σε κάθε οικογένεια, μόνο ένα γονίδιο με υψηλή ομοιότητα με κάθε διπλασιασμένο γονίδιο στα θηλαστικά. Αυτό υποδηλώνει ότι οι WGD συνέβησαν μετά το διαχωρισμό των χορδωτών/εχινόδερμων και πριν την απόκλιση των σπονδυλωτών με οστέινο σκελετό (98) (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11:** Φυλογενετικό δέντρο της γενεολογίας των Μεταζώων σύμφωνα με το tree of life, εκτός από τη διακλάδωση των Protostomia που έγινε σύμφωνα με τον Aguinaldo et al. (1997). Τα φύλα υποδεικνύονται στο πάνω μέρος του σχήματος. Το σχετικό χρονοδιάγραμμα φαίνεται στα δεξιά. Τα βέλη υποδηλώνουν τους κύκλους του διπλασιασμού των γονιδίων που συνέβησαν στη γενεολογία των χορδωτών (98).

Έδωσαν λοιπόν μια πιθανή εξήγηση ότι ο Amphioxus που έχει ένα μόνο σύμπλεγμα γονιδίων HOX και ένα μόνο γονίδιο που αντιστοιχεί στα γονίδια της ινσουλίνης και των insulin-like growth factors, ότι αυτά τα γονίδια προήλθαν στην γενεολογία των κраниωτών μετά το διαχωρισμό του Amphioxus και των κраниωτών. Τουλάχιστον ο ένας από τους δυο κύκλους WGD συνέβη νωρίς στη γενεολογία των κраниωτών, από τη στιγμή που και το κраниωτό μη-σπονδυλωτό μυξίνος (hagfish) και το άγναθο σπονδυλωτό πετρόμυζον (lamprey) έχουν ένα γονίδιο ινσουλίνης και τουλάχιστον ένα γονίδιο IGF. Οι υπομονάδες του πρωτεοσωμικού συμπλέγματος LMP7 και X προήλθαν από έναν διπλασιασμό που συνέβη στη γενεολογία των γναθόστομων σπονδυλωτών. Αυτά τα δυο γονίδια υπάρχουν σε όλα τα γναθόστομα σπονδυλωτά που έχουν μελετηθεί ως τώρα, ενώ μόνο ένα γονίδιο, το *LMP/X*, βρέθηκε στους μυξίνους και στο πετρομύζον. Αυτό υποδηλώνει την παρουσία του δεύτερου κύκλου WGD στη γενεολογία των γναθόστομων σπονδυλωτών (98).

#### 4. Σκοπός Εργασίας

Η τσιπούρα αποτελεί ένα βασικό είδος εκτρεφόμενων ψαριών που υπάρχει στην περιοχή της Μεσογείου και για αυτό το λόγο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Υπάρχει λοιπόν αυξημένη ζήτηση μεθόδων που να ελέγχουν την ποιότητα και την ανάπτυξη αυτού του είδους σε όλα τα στάδια της παραγωγής. Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό αρχικά την ανεύρεση της εξελικτικής πορείας των γονιδίων *lpl* και *lpl-like* στους τελεόστεους και δεύτερον την μελέτη της έκφρασης της *lpl-like* σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών της τσιπούρας με σκοπό την αποκάλυψη του πιθανού της ρόλου στην ανάπτυξη του είδους. Συγκεκριμένα τα αντικείμενα μελέτης ήταν:

1. Η ταυτοποίηση των γονιδίων *lpl* και *lpl-like* σε τελεόστεους.
2. Η σύγκριση των γονιδίων *lpl* και *lpl-like* με μη τελεόστεους.
3. Η οντογενετική έκφραση της *lpl-like* στις προνύμφες της τσιπούρας
4. Η ανεύρεση διαφορών στην έκφραση της *lpl-like* σε προνύμφες τσιπούρας διαφορετικού μεγέθους, αλλά ίδιου αναπτυξιακού σταδίου.

#### 5. Υλικά και Μέθοδοι

##### 5.1 Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας

Οι προνύμφες της τσιπούρας ελήφθησαν από εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας ΔΙΑΣ ΑΕ που βρίσκεται στον Μαλιακό κόλπο στην Ελλάδα. Οι προνύμφες διατηρήθηκαν σε φιλτραρισμένο και συνεχώς αεριζόμενο θαλασσινό νερό (αλατότητα 29ppt). Οι προνύμφες σιτίστηκαν σε περίσσεια, δυο φορές την ημέρα με τροχόζωα (rotifers) μέχρι την 23 dph και από την 13-25dph τους δόθηκε επίσης και *Artemia nauplii*. Τα τροχόζωα εμπλουτίστηκαν με επώαση 24h σε DHA Master (Inve, Belgium) και η *Artemia nauplii* με επώαση 24h σε S.presso (Inve). Την 20 dph η διατροφή περιλάμβανε ξηρή εμπορική τροφή (INVE O.range start, wean). Η προσθήκη των μικροάλγεων *Chlorella minutissima* έγινε κατά τη διάρκεια σίτισης με τροχόζωα. Οι προνύμφες βρισκόντουσαν κάτω από 24 h σύστημα φωτισμού μέχρι την 25dph και μετά έγινε εναλλαγή σε 15:9, φως:σκοτάδι. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στο αλατόνερο ήταν  $7 \pm 2 \text{ mg}^{-1}$  και η θερμοκρασία του νερού κατά την εμβρυϊκή περίοδο, την περίοδο του λεκιθικού σάκου (0-4 dph) και το στάδιο προνύμφης-ιχθυδίου (5-60 dph) ήταν  $19.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  (18.0-20.5  $^\circ\text{C}$ ).

Η δειγματοληψία για τις προνύμφες της τσιπούρας έγινε τις ημέρες 5, 15, 25, 35, 48 και 58 dph. Οι προνύμφες αναισθητοποιήθηκαν σε 2-φαινοξαιθανόλη (1:5000, Sigma-

Aldrich,P1126). Τα δείγματα για την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων τοποθετήθηκαν σε αντιδραστήριο RNAlater Reagent (Sigma-Aldrich, R0901) και διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι την χρήση τους.

## 5.2 Απομόνωση RNA

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κάθε άτομο προνύμφης των 5, 15, 25, 35,45, 48 και 58 (shorted SM και LA) dph με τη χρήση του TRI Reagent (Sigma, T9424) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έπειτα, το ολικό RNA υποβλήθηκε σε αντίδραση με DNase DNA-free (Ambion,AM1906) για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα γενωμικού DNA ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση και τέλος αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι την χρήση του. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε παράλληλα για όλα τα δείγματα για να εξασφαλιστεί η ίδια απόδοση της αντίδρασης. Το cDNA παράχθηκε από 1μg ολικού RNA με χρήση 200 U/μl SuperScript II transcriptase (Invitrogen, 18064-014), 3μg τυχαίων εκκινητών (Invitrogen, 48190-011) και 40 U/μl ανασυνδυασμένης RNaseOUT αναστολέα ριβονουκλεάσης (Invitrogen, 10777-019) σε τελικό όγκο αντίδρασης 27 μl.

## 5.3 Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων με Q-PCR

Έγινε ο καθορισμός της έκφρασης του γονιδίου LPL-like. Η Q-PCR (real-time PCR) έγινε με μηχάνημα MXPro 2000 (Stratagene) με KAPA SYBR FAST qPCR (2x; KAPA Biosystems, KK4602). Όλες οι αντιδράσεις περιείχαν 200 nmoI/l για κάθε εκκινητή και 0.17 μg/μl cDNA (αραίωση 1:5) σε όγκο αντίδρασης 20μl. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 2.Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες για την Q-PCR: δυο αρχικά στάδια αποδιάταξης, πρώτα στους 50 °C για 2min και έπειτα στους 95 °C για ακόμα 2min, 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος αποτελείται από 15sec στους 95 °C, 1min στους 61 °C και 1min στους 72 °C) και τέλος ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης διαχωρισμού (dissociation curve) (1min στους 95 °C, 30sec στους 55 °C και 30 sec στους 95 °C) ώστε να επαληθευτεί ο πολλαπλασιασμός ενός μόνο προϊόντος. Η απόδοση της real-time PCR (E) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο  $E=10^{-1/\text{slope}}$  (99) και ήταν 98,89. Χρησιμοποιήθηκε σειρά ιδιοστατικών γονιδίων (ef1a, b-actin, rp113a) για την κανονικοποίηση της έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 2. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την real-time PCR

Γονίδιο	Forward εκκινητής	Reverse εκκινητής
<i>Lpl-like</i>	CAAGCTCGGCTACAACATCA	GAAATCTTCATCGGCTGCTC



#### 5.4 Συλλογή δεδομένων για φυλογενετική ανάλυση

Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε μεθόδους βιοπληροφορικής για την συλλογή των αλληλουχιών του γονιδίου της *lpl* και της *lpl-like*. Οι αλληλουχίες των γονιδίων αυτών αντλήθηκαν από την βάση δεδομένων Ensemble για συνολικά 20 είδη, εκτός των αλληλουχιών του elephant shark (*Callorhynchus milii*) που αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων esharkgenome.imcb.a-star.edu.sg και της τσιπούρας από την Genebank). Από αυτά τα είδη τα 11 ανήκουν στην ταξινομική ομάδα των τελεόστεων (Πίνακας 3).

	Κοινό όνομα	Επιστημονικό όνομα	Συντομογραφίες φυλογενετικού δέντρου	Protein accession numbers	
				LPL	LPL-like
Tetrapods	Άνθρωπος	<i>Homo sapiens</i>	Hsa	ENSP00000309757	-
	Ποντικός	<i>Mus musculus</i>	Mus	ENSMUSP00000015712	-
	Anole lizard	<i>Anolis carolinensis</i>	Aca	ENSACAP0000001 3797	-
	Όρνιθα	<i>Gallus gallus</i>	Gal	ENSGALP00000036979	-
	Xenopus	<i>Xenopus tropicalis</i>	Xet	ENSXETP00000009696	-
Teleost fishes	Green spotted puffer	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tni	ENSTNIP00000018541	ENSTNIP00000018542
	Pufferfish	<i>Takifugu rubripes</i>	Tru	ENSTRUP00000005929	ENSTRUP00000004363
	Stickleback	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gac	ENSGACP00000015044	ENSGACP00000014996
	Τσιπούρα	<i>Sparus aurata</i>	Sau	AY495672	JQ390609
	Λαβράκι	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Dla	DLAgn_00149800	DLAgn_00149780
	Platyfish	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Xma	ENSXMAP00000003457	ENSXMAP00000003409
	Amazon molly	<i>Poecilia formosa</i>	Pfo	ENSPFOP00000008179	ENSPFOP00000008309
	Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Oni	ENSONIP00000002900	ENSONIP00000002911
	Βακαλάος	<i>Gadus morhua</i>	Gmo	ENSGMOP00000015240 ENSGMOP00000013375*	ENSGMOP00000015213
	Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	Dre	ENSDARP00000109101 ENSDARP00000135122*	ENSDARP00000048762
	Cavefish	<i>Astyanax mexicanus</i>	Ame	ENSAMXP00000018762 ENSAMXP00000002869*	ENSAMXP00000018741
Non Teleost fishes	Spotted gar	<i>Lepisosteus oculatus</i>	Loc	ENSLOCP00000004209	ENSLOCP00000004232
	Κουλάκανθος	<i>Latimeria chalumnae</i>	Lch	ENSLACP00000020495	ENSLACP00000020522
	Elephant shark	<i>Callorhynchus milii</i>	Cmi	SINCAMP00000009769	SINCAMP00000009777
	Πετρόμυζον	<i>Petromyzus marinus</i>	Pma	ENSPMAP00000008214	-

**Πίνακας 3.** Παράθεση των Accession Numbers των πρωτεϊνών της LPL και της LPL-like για τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία του φυλογενετικού δένδρου. Οι \* δηλώνουν την ύπαρξη δεύτερου γονιδίου της LPL. Τα είδη που εμφανίζονται σκιασμένα χρησιμοποιήθηκαν επίσης και στην δημιουργία της συνταινικότητας των δυο γονιδίων.

## 5.5 Φυλογενετική ανάλυση και συνταινικότητα

Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε από την στοίχιση των 37 αλληλουχιών των 20 ειδών (Πίνακας 4). Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) και η επεξεργασία των αλληλουχιών για την αφαίρεση κενών έγινε με το πρόγραμμα Aliview. Το πρόγραμμα ProtTest ([http://darwin.uvigo.es/software/prottest2\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/prottest2_server.html)) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του καλύτερου μοντέλου (LG+I+G, σύμφωνα με το στατιστικό μοντέλο AIC) για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Για την δημιουργία του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μέγιστης πιθανότητας και τέλος η αξιοπιστία του δέντρου εκτιμήθηκε με bootstrap 100 (Εικόνα 3). Κατασκευάστηκε ένα δέντρο με τη χρήση του PhyML στην διαδικτυακή πλατφόρμα του ATGC (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Η συνταινικότητα μελετήθηκε με το πρόγραμμα Genomicus που επιτρέπει την διερεύνηση των ορθόλογων και παράλογων γονιδίων σε συντηρημένες συνταινίες (Εικόνα 4). Για την διερεύνηση της συνταινικότητας χαρτογραφήθηκαν συνολικά 18 γονίδια ανοδικά και καθοδικά των γονιδίων των *lpl* και *lpl-like*. Η επαλήθευση για τα δυο γονίδια που αντιστοιχούν στην LPL έγινε με Blast των πρωτεϊνικών αλληλουχιών τόσο μεταξύ του zebrafish όσο και με την LPL του ανθρώπου. Η LPL του zebrafish στο Chr 22 έχει ομοιότητα 61,74 % με αυτή του ανθρώπου και αντίστοιχα 66,53 % με την LPL του Chr 19 του zebrafish.

## 5.6 Στατιστική Ανάλυση

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε η στατιστική ανάλυση one-way ANOVA για την σύγκριση των διαφορών της έκφρασης του γονιδίου της *lpl-like* στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (5,15,25,35,45,48 dph). Στην τελική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων αποκλείστηκαν τα δεδομένα των 5 dph και των 45dph λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων. Το T-test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των ατόμων των 58 dph στα οποία είχε γίνει διαλογή βάσει του μεγέθους τους (58SM, 58LA). Η αναπαράσταση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων έγινε ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση και για όλες τις στατιστικές αναλύσεις το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ .

## 6. Αποτελέσματα

### 6.1 Φυλογένεση και απόκλιση της LPL και της *lpl-like*

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου, τα γονίδια της LPL και *lpl-like* αναγνωρίστηκαν για τα είκοσι είδη του πίνακα, βάσει της πρωτεϊνικής τους ομοιότητας τους

με την με την ανθρώπινη LPL. Η *lpl-like* αναγνωρίστηκε μετά από σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών μεταξύ των διαφόρων ειδών με την ήδη τεκμηριωμένη αλληλουχία *lpl-like* (31). Επίσης, βρέθηκαν τρεις επιπλέον πρωτεϊνικές αλληλουχίες που είχαν υψηλή ομοιότητα με την LPL για τα είδη zebrafish (ENSDARP00000135122),cavefish (ENSAMXP00000002869), βακαλάος (ENSGMOP00000013375), οπότε και χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί με ποιο από τα δυο γονίδια (*lpl*, *lpl-like*) ομαδοποιούνται.

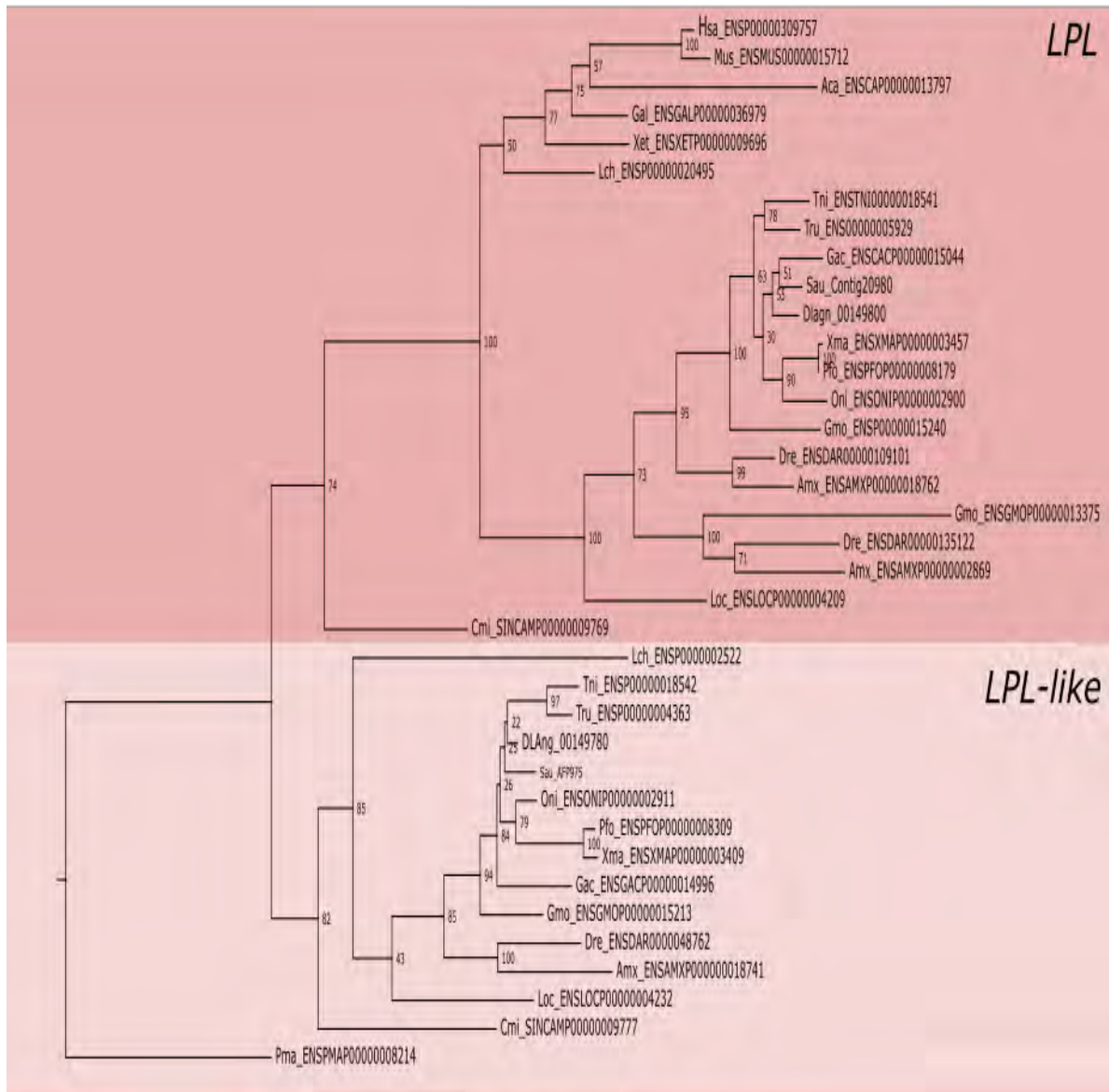
Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν είδη που ανήκουν στα σπονδυλωτά, αλλά είναι εξελικτικά διαχωρισμένα όπως: τα τετράποδα (άνθρωπος, κότα, Xenopus, anole lizard, ποντικός), η κοιλάκανθος, που ανήκει στους Σαρκοπτερύγιους), είδη που ανήκουν στους τελεόστεους ιχθύες (green spotted puffer,pufferfish, stickleback, τσιπούρα, λαβράκι, platyfish, amazon molly, tilapia, βακαλάος, zebrafish ,cavefish), το elephant shark που ανήκει χονδριχθύες και τέλος το πετρόμυζον της ομοιοταξίας των άγναθων.

Η LPL και η LPL-like συγκρίθηκαν για το ίδιο φυλογενετικό δέντρο. Το φυλογενετικό δέντρο έδειξε ομαδοποίηση των αλληλουχιών της LPL και LPL-like, το οποίο είναι λογικό από τη στιγμή που και τα δυο γονίδια ανήκουν στην οικογένεια των λιπασών. Στον κλάδο που αντιστοιχεί στην LPL δημιουργήθηκε μια επιπλέον ομάδα για την LPL για τα είδη που ανιχνεύτηκε δεύτερο *lpl* γονίδιο (Danio rerio, Astyanax mexicanus, Gadus morhua), και αποτελεί δεδομένο το οποίο δεν έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι το δεύτερο γονίδιο της *lpl* προήλθε πιθανώς από ειδικό διπλασιασμό που συνέβη συγκεκριμένα σε αυτά τα είδη.

Επιπλέον είναι φανερό από το φυλογενετικό δέντρο ότι δεν υπάρχουν αλληλουχίες που να αντιστοιχούν στην LPL-like για τα είδη που ανήκουν στα τετράποδα, αν και στην κοιλάκανθο βρέθηκε ομόλογο γονίδιο για την *lpl-like* (όλα τα τετράποδα αποτελούν απογόνους των sarcopterygii). Αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο της *lpl-like* χάθηκε κάπου στην πορεία της εξέλιξης των τετράποδων.

Από τα υπόλοιπα είδη για τα οποία ομαδοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των LPL και LPL-like, τα 11 ανήκουν στους τελεόστεους ιχθύες και τα 3 στους μη τελεόστεους ιχθύες (spotted gar, κοιλάκανθος, elephant shark).

Ως ρίζα του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική αλληλουχία του πετρόμυζον (245aa), που αν και το γονιδίωμα του δεν είναι επαρκώς τεκμηριωμένο, μπορεί να θεωρηθεί ως είδος αναφοράς για τους γονιδιακούς διπλασιασμούς (R1, R2) στην εξέλιξη των χορδωτών κατά τον διαχωρισμό των άγναθων από τα γναθοστόματα περίπου 500 mya (the (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Φυλογενετικό δέντρο της *LPL* και *LPL-like* από 20 είδη. Στο δέντρο εμφανίζονται τα accession numbers των πρωτεϊνών και το δέντρο έχει ως ρίζα την αλληλουχία *LPL* του πετρομούζον. Οι συντομογραφίες αντιστοιχούν στα είδη του Πίνακα 4. Οι αριθμοί στην βάση κάθε κλάδου αντιπροσωπεύουν το bootstrap. Συντομογραφίες *Hsa* (άνθρωπος), *Mus* (ποντικός), *Aca* (anole lizard), *Gal* (όρνιθα), *Xet* (frog), *Tni* (tetraodon), *Tru* (pupperfish), *Gac* (stickleback), *Sau* (τσιπούρα), *Dla* (λαβράκι), *Xma* (platyfish), *Pfo* (amazon molly), *Oni* (tilapia), *Gmo* (βακαλάος), *Dre* (zebrafish), *Amx* (cavefish), *Loc* (spotted gar), *Lch* (κοιλάκανθος), *Cmi* (elephant shark), *Pma* (πετρόμυζον).

## 6.2 Συνταινικότητα των γονιδίων *lpl* και *lpl-like*

Η συνταινικότητα των γονιδίων της *lpl* και *lpl-like* έγινε με σκοπό να μελετηθεί η εξέλιξη τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εννιά είδη (άνθρωπος, όρνιθα, κοιλάκανθος, zebrafish, λαβράκι, tilapia, takifugu, spotted gar, elephant shark) και χαρτογραφήθηκαν 14 συνολικά γονίδια δεξιά και αριστερά από αυτά των *LPL* και *lpl-like* (*pole4*, *tax1bp3*, *rad8a*, *trpm4a*, *adam10*, *saftb*, *tmem38a*, *slc35e1*, *cherp*, *c19orf44*, *eps1511a*,

*klfba, hsh2d, malt2, mrp154, fam32a, ap1m1*). Αν και η μελέτη είναι βασισμένη στη τσιπούρα, λόγω απουσίας δεδομένων για την συντηνικότητα του, χρησιμοποιήθηκε το λαβράκι το οποίο αποτελεί το πιο φυλογενετικά συγγενικό είδος στην τσιπούρα στη παρούσα μελέτη.

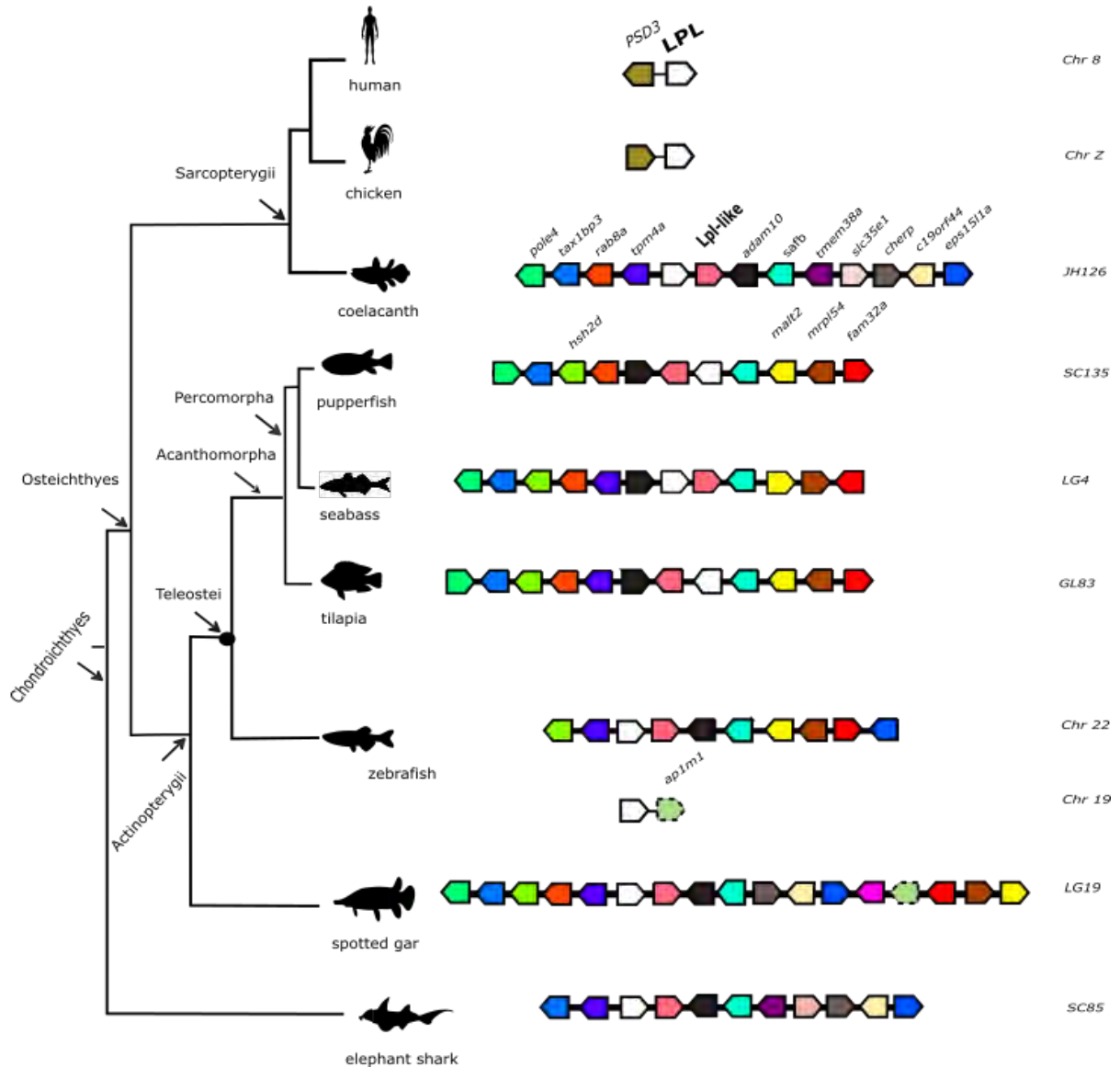
Η ανάλυση των γονιδίων έδειξε ότι υπάρχει συντηρημένη συντηνικότητα σε όλα τα είδη εκτός από άνθρωπο και την όρνιθα (σε αυτά τα είδη δεν βρέθηκε *lpl-like*). Σε όλα τα υπόλοιπα είδη (τελεόστεους και μη τελεόστεους ιχθύες), το γονιδιακό περιβάλλον των *lpl* και *lpl-like* είναι καλά συντηρημένο με τα δυο γονίδια να βρίσκονται στα ίδια χρωμοσώματα ή ικρίωματα (scaffolds).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το γονίδιο της *lpl-like* βρίσκεται ακριβώς δίπλα από το γονίδιο της *lpl*, ακόμα σε στο πιο προγονικό είδος που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα έρευνα (elephant shark), υποδηλώνοντας ότι το *lpl-like* προήλθε πιθανώς έπειτα από διπλασιασμό εν σειρά (tandem) πριν ή κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού των σπονδυλωτών.

Η ανάλυση του μοτίβου για τα τρία από τα τέσσερα είδη που ανήκουν στους τελεόστεους (λαβράκι, *tilapia*, *takifugu*) έδειξε ότι η τοποθέτηση των ακόλουθων γονιδίων *role4, tax1bp3, hsh2d, rad8a, tpm4a, lpl, lpl-like, safb, malt2, mrp154* και *fam32a* είναι η ίδια (με μόνη εξαίρεση το γονίδιο *tpm4a* που υπάρχει στο *takifugu* ως ισομορφή *tpm4b* και γι αυτό το λόγο δεν συμπεριλήφθηκε στο μελέτη).

Στο zebrafish βρέθηκαν δυο γονίδια *lpl*, το ένα στο χρωμόσωμα 22 και το άλλο στο χρωμόσωμα 19. Το γονίδιο της *lpl* στο χρωμόσωμα 19 παρόλα αυτά δεν παρουσιάζει συντηνικότητα με κανένα από τα υπόλοιπα είδη της μελέτης. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει ότι το γονίδιο *ap1m1* που βρίσκεται στο LG19 του spotted gar (μη τελεόστεος ιχθύς) είναι τοποθετημένο δίπλα με είναι διπλανό με αυτό το δεύτερο γονίδιο της LPL του χρωμοσώματος 19 του zebrafish (τελεόστεος ιχθύς). Στο χρωμόσωμα 19 του zebrafish όμως δεν υπάρχει το γονίδιο της *lpl-like*. Αυτό να υποδηλώνει πιθανώς κάποια χρωμοσωμική μετατόπιση της περιοχής που περιέχει τα γονίδια της *lpl* και του *ap1m1*, ύστερα από το διπλασιασμό που συνέβη στην γενεαλογία των τελεόστεων (TS-WGD).

Στη κοιλάκανθο, στο spotted gar (μη τελεόστεους) καθώς και στο elephant shark (Chondrichthyes) που υπέστησαν μόνο δυο κύκλους διπλασιασμού (όχι τον TS-WGD), βλέπουμε να υπάρχει ένα σετ γονιδίων (*tmem38a, slc35e1, cherp, c19orf44*) το οποίο δεν φαίνεται να βρίσκεται στο άμεσο γονιδιακό περιβάλλον σε κανένα άλλο από τα είδη (Εικόνα 13).



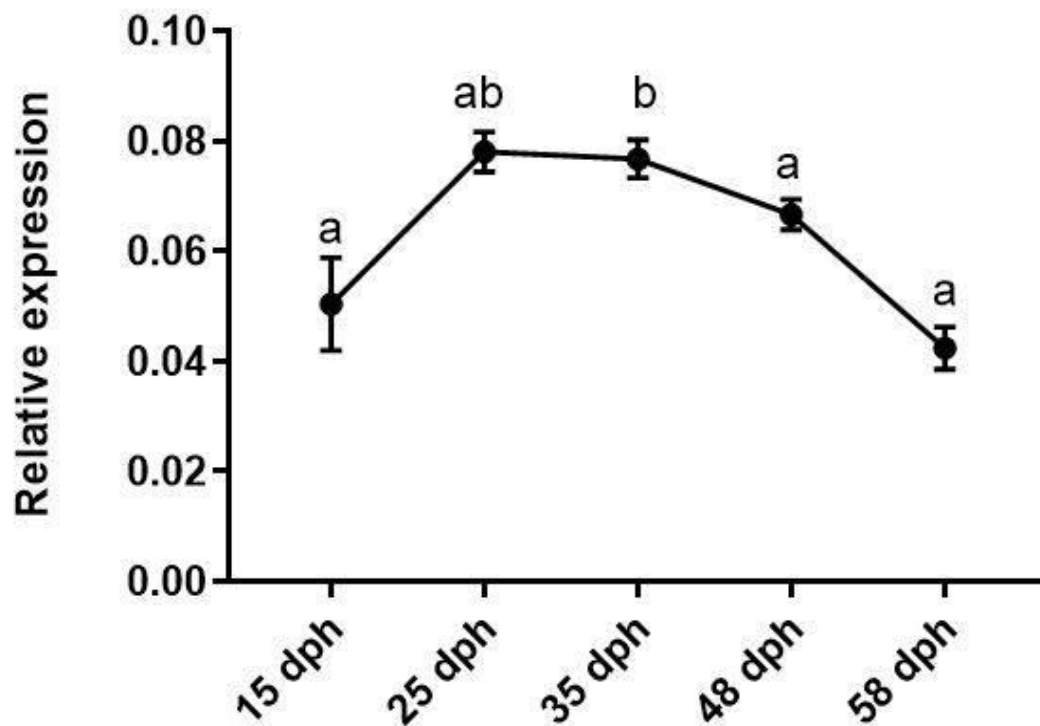
**Εικόνα 13.** Συνταϊνικότητα των γονιδίων LPL και LPL-like σε 9 είδη. Η στήλη δεξιά απεικονίζει την χρωμοσωμική θέση (Chr) ή την θέση πάνω στα Scaffolds (SC, LG) των γονιδίων. Το γονίδιο PSD3 χρησιμοποιήθηκε για να δείξει μια μικρή αντιστοιχία στους γενετικούς τόπους του ανθρώπου και της όρνιθας.

### 6.3 Έκφραση της *lpl-like* στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας

Η έκφραση του γονιδίου της *lpl-like* μελετήθηκε με τη μέθοδο της qPCR σε προνύμφες τσιπούρας κατά τη διάρκεια των 5, 15, 25, 35 και 48 dph. Επιπλέον, αναλύθηκαν είκοσι άτομα συνολικά των 58dph που είχαν υποβληθεί σε διαχωρισμό βάσει μεγέθους: Μεγαλύτερα (LA) και Μικρότερα (SM). Για την κανονικοποίηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα ιδιοστατικά γονίδια *Ef1a*,  $\beta$ -actin και *rpl13a*. Τα άτομα των 5dph δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική αναπαράσταση των δεδομένων λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων.

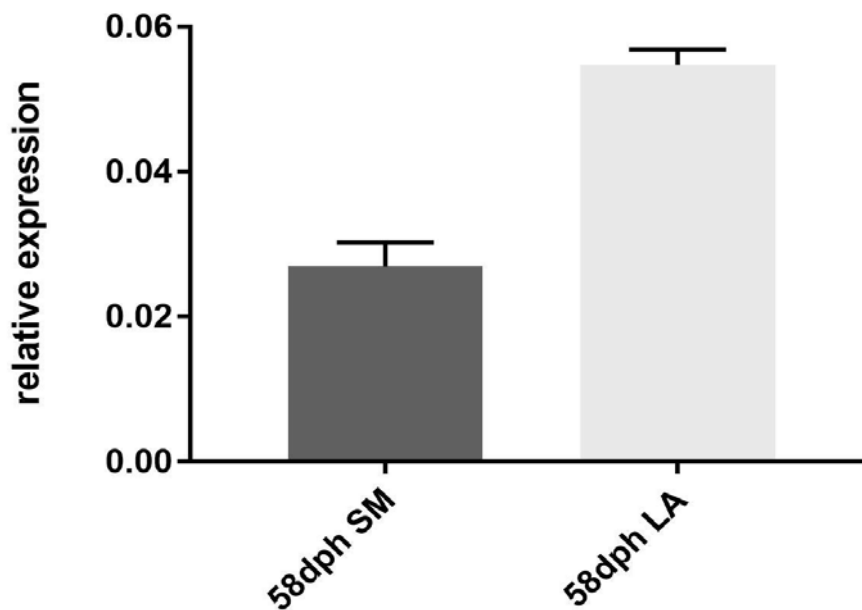
Η LPL-like φαίνεται να έχει μια γενική έκφραση σε όλα τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Κατά την 15 dph τα επίπεδα έκφρασης ήταν χαμηλά και στη συνέχεια αυξήθηκαν

στατιστικώς σημαντικά μέχρι την 25 dph, οπότε και κατέκτησαν τη μέγιστη τιμή. Η έκφραση παρέμεινε σε ανάλογα επίπεδα και μέχρι τις 35 dph, πριν αρχίσει η σταδιακή μείωσή τους. Μέχρι την 48 dph είχαν μειωθεί στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με την 35 dph για να μειωθούν ακόμα περισσότερο μέχρι την 58 dph, οπότε και επανήλθαν στα ίδια επίπεδα με αυτά των 15 dph (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14.** Σχετική έκφραση της *lpl-like* στη τσιπούρα στα αναπτυξιακά στάδια των 15, 25, 35, και 48 dph. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν με one-way ANOVA. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ . Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους.

Η έκφραση του γονιδίου της *lpl-like*, μετρήθηκε επίσης κατά την 58 dph στα άτομα των προνυμφών που χαρακτηρίστηκαν από διαφορετικό μέγεθος (SM και LA). Στο σχήμα είναι φανερό ότι τα άτομα με το μικρότερο μέγεθος (SM) είχαν και τη μικρότερη έκφραση του γονιδίου της *lpl-like*, η οποία όμως αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στα άτομα που είχαν μεγαλύτερο μέγεθος (LA) (Εικόνα 15). Τα LA άτομα είχαν μέσο βάρος 0.0067g και το μήκος τους κυμαίνονταν 1.4-2.1 cm. Αντίστοιχα τα SM είχαν μέσο βάρος 0.029g και το μήκος τους κυμαίνονταν 1.3-1.8 cm.



**Εικόνα 15:** Σχετική έκφραση του γονιδίου της *lpl-like* στην τσιπούρα κατά την 58dph σε άτομα διαφορετικού μεγέθους (SM, LA). Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $P < 0.05$ .

## 7. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία είχε δυο βασικά αντικείμενα μελέτης. Πρώτον την ανεύρεση και τον χαρακτηρισμό των ομόλογων γονιδίων της *lpl* και της *lpl-like* στους τελεόστεους ιχθύες και κατά επέκταση στη τσιπούρα και δεύτερον τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της *lpl-like* στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας.

Τα γονίδια της *lpl* και *lpl-like* ανήκουν στην οικογένεια των λιπασών και σχηματίζουν δυο διαφορετικούς κλάδους γεγονός που υποδηλώνει ότι έχουν προέλθει από κάποιο κοινό προγονικό γονίδιο. Επίσης αναγνωρίστηκε *in silico* μέσω ομοιότητας πρωτεϊνικών αλληλουχιών ένα δεύτερο γονίδιο που αντιστοιχεί στην LPL σε τρία είδη που ανήκουν στους τελεόστεους: zebrafish, cavefish και βακαλάο και αποτελεί μια νέα πληροφορία χωρίς προηγούμενη αναφορά στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, η συνταινικότητα αυτών το δυο γονιδίων είναι συντηρημένη τόσο μεταξύ των τελεόστεων ιχθύων όσο και μεταξύ μη των τελεόστεων ενώ στα είδη που ανήκουν στα τετράποδα δεν παρατηρήθηκε συνταινικότητα.

Η έκφραση του γονιδίου της *lpl-like* στα διάφορα αρχικά αναπτυξιακά στάδια βρέθηκε να είναι χαμηλή κατά την 15 dph, και αυξήθηκε σημαντικά μέχρι τις 25 dph για να μειωθεί πάλι σταδιακά μεταξύ των 35 και 58 dph. Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της *lpl-like*



κατά την διάρκεια των 58 dph στα άτομα διαφορετικού μεγέθους έδειξε ότι στα άτομα με μικρότερο μέγεθος η έκφραση της *lpl-like* ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου στα άτομα μεγαλύτερου μεγέθους.

### **7.1 Η εξέλιξη των γονιδίων της *lpl* και *lpl-like***

Η ανεύρεση *in silico* των πρωτεϊνικών αλληλουχιών που βρίσκονται σε ομολογία με την LPL του ανθρώπου, έγινε σε διαφορετικές βάσεις δεδομένων βιοπληροφορικής και το γονίδιο βρέθηκε να υπάρχει σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν (Πίνακας 4), υποδηλώνοντας έτσι ότι το γονίδιο εμφανίστηκε νωρίς στην εξέλιξη των σπονδυλωτών. Για την LPL-like η ανεύρεση των ομόλογων πρωτεϊνικών αλληλουχιών βασίστηκε στην ομοιότητα των αλληλουχιών αυτών με την ήδη αναγνωρισμένη LPL-like της τσιπούρας (27).

Οι ομόλογες αλληλουχίες για την LPL-like βρέθηκαν σε όλα τα είδη της παρούσας μελέτης με μόνες εξαιρέσεις τα είδη που ανήκουν στα σπονδυλωτά καθώς και στο πετρόμυζον.

Η απουσία της *lpl-like* στα σπονδυλωτά δείχνει ότι το γονίδιο αυτό χάθηκε κάπου στην εξελικτική διαδρομή από τον διαχωρισμό των *Sarcopterygii* και μετά, διότι το γονίδιο υπάρχει στη κοιλάκανθο που επίσης ανήκει σε αυτή την ομοταξία. Αυτό συνάδει με τη Vienne και τους συνεργάτες της (100), οι οποίοι χαρτογράφησαν τη χρωμοσωμική περιοχή 8p11.21-8p21.3 του ανθρώπου (στην οποία βρίσκεται και το γονίδιο της *lpl*) και βρήκαν παράλογα γονίδια της *lpl* σε άλλες χρωμοσωμικές περιοχές κανένα όμως από τα οποία δεν αντιστοιχούσαν σε αυτό της *lpl-like*. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι η σημαντικά αυξημένη παρουσία των μεταθετών στοιχείων στα θηλαστικά, η οποία κατέστησε “ευκολότερη” την αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων και συνεπώς και την απώλεια αριθμού γονιδίων ή χρωμοσωμικών περιοχών (101).

Στο πετρόμυζον επίσης δεν αναγνωρίστηκε LPL-like και η LPL βρέθηκε να περιέχει σχεδόν τον μισό αριθμό αμινοξέων σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες αλληλουχίες. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει λόγω κακής τεκμηρίωσης του γονιδιώματος του πετρόμυζον και συνεπώς θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για αυτά τα δυο γονίδια σε αυτό το είδος. Παρόλα αυτά σύμφωνα με τον Birnbaum και τους συνεργάτες του (98) στο πετρόμυζον μπορεί όντως να μην υπάρχει γονίδιο αντίστοιχο της *lpl-like*, σε συμφωνία με άλλα γονίδια που μελετήσαν βρέθηκαν να υπάρχουν σαν ένα μόνο ορθόλογο στο πετρόμυζον χωρίς να μπορέσουν να αναγνωρίσουν αντίστοιχα παράλογα που υπήρχαν στα υπόλοιπα γναθόστομα σπονδυλωτά. Συνεπώς μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι το αντίστοιχο

γονίδιο της LPL να προήλθε από R2 που συνέβη κατά τον διαχωρισμό των γναθόστομων σπονδυλωτών και ύστερα από αυτό να δημιουργήθηκε το παράλογο της *lpl-like*.

Σύμφωνα με την μελέτη της συνταινικότητας, η *lpl-like* φαίνεται ότι προήλθε από διπλασιασμό εν σειρά (tandem duplication) από το γονίδιο της LPL λόγω του ότι αυτά τα δυο γονίδια είναι παρακαείμενα πάνω στις χρωμοσωμικές περιοχές. Γνωρίζοντας ότι η *lpl* και η *lpl-like* ανήκουν στην οικογένεια των λιπασών, αλλά ότι η *lpl-like* δεν υπάρχει στα τετράποδα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το γονίδιο της *lpl-like* στα προνονικά είδη διατηρήθηκε βοηθώντας πιθανώς με κάποιο τρόπο στην εξελικτική τους προσαρμογή.

Στη παρούσα μελέτη επίσης περιγράφεται για πρώτη φορά η παρουσία δυο γονιδίων που αντιστοιχούν στην LPL για τα είδη zebrafish, βακαλάος και cavfish, αλλά μόνο ένα γονίδιο της *lpl-like*. Τα δυο αυτά αντίγραφα βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι μετά τον 3R διπλασιασμό που συνέβη στους τελεόστεους αυτά τα τρία είδη να υπέστησαν επιπλέον ειδο-ειδικό διπλασιασμό με αποτέλεσμα να καθιερωθεί ένα δεύτερο γονίδιο που κωδικοποιεί για την LPL. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με το γεγονός, ότι στο zebrafish, η περιοχή γύρω από το δεύτερο γονίδιο της LPL (Chr 19) δεν εμφανίζει συνταινικότητα με την αντίστοιχη χρωμοσωμική περιοχή που ανήκουν οι LPL και η *lpl-like* (Chr 22). Αξιοσημείωτο είναι επίσης, ότι δίπλα στην LPL του Chr 19 υπάρχει το γονίδιο *ap1m1*. Παρόλα αυτά στο spotted gar, το *ap1m1* εμφανίζεται να είναι συνταινικό με τα γονίδια των LPL και *lpl-like*.

Μπορούμε συνεπώς να θεωρήσουμε ότι το zebrafish υπέστη ανεξάρτητο διπλασιασμό μικρότερου χρωμοσωμικού μεγέθους με αποτέλεσμα τα υπόλοιπα γονίδια να χαθούν και το δεύτερο γονίδιο της LPL διατηρηθεί. Οι Lu και οι συνεργάτες τους (102) μελέτησαν τον διπλασιασμό των γονιδίων καθώς και τα μοτίβα αυτών των διπλασιασμών σε διάφορα γονιδιώματα τελεόστεων ιχθύων. Μέσα από την έρευνα τους κατέληξαν ότι ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων υπέστη διπλασιασμό τόσο μεταξύ των χρωμοσωμάτων όσο και διπλασιασμό εν σειρά (tandemly), υποδηλώνοντας έτσι ένα συνεχές και ανεξάρτητο φαινόμενο διπλασιασμού μέσα σε κάθε συγκεκριμένο είδος, με κύριο αντιπρόσωπο το zebrafish. Αυτή η έρευνα ενισχύει τη θεωρία της δικής μας μελέτης, αν και πρέπει να γίνουν επιπλέον εργασίες για τη διευκρίνιση και τον τρόπο λειτουργίας του δεύτερου γονιδίου της LPL τόσο στο zebrafish, όσο και στο βακαλάο και το cavfish στα οποία αναγνωρίστηκε αυτό το δεύτερο γονίδιο.

Γενικότερα μετά από έναν WGD, όλα τα διπλασιασμένα γονίδια θα πρέπει να έχουν απαλλαγεί από την επιλεκτική πίεση και συνεπώς θα ήταν αναμενόμενο να εξαφανιστούν σε βάθος χρόνου.

Παρόλα αυτά, η τύχη των γονιδίων αυτών είναι πιο περίπλοκη. Τα διπλασιασμένα γονίδια που προήλθαν από τον WGD μπορούν να έχουν διαφορετικές μοίρες: ένα από τα αντίγραφα μπορεί να χαθεί (non-functionalization), και τα δυο αντίγραφα μπορούν να διατηρηθούν σχεδόν χωρίς αλλαγές, ένα από τα αντίγραφα να αποκτήσει καινούργια λειτουργία (neofunctionalization) και τέλος και τα δυο αντίγραφα μπορεί να υποστούν αλλαγές έτσι ώστε η λειτουργία του προγονικού γονιδίου να μοιραστεί και στα δυο διπλασιασμένα γονίδια (subfunctionalization). Σύμφωνα με τα ευρήματά μας η μοίρα της *lpl-like* φαίνεται να εντάσσεται στην τελευταία κατηγορία (subfunctionalization) καθώς σύμφωνα με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία η *lpl-like* λειτουργεί παρομοίως με την LPL με τη βασική διαφορά την ιστοεξειδίκευση.

## 7.2 Έκφραση της *lpl-like* στην τσιπούρα

Τα λιποκύτταρα αποτελούν σημαντική περιοχή εναπόθεσης λιπιδίων στα ψάρια. Η κατανομή στους ιστούς και ο αριθμός των λιποκυττάρων στο σώμα του ψαριού αποτελούν κριτικούς παράγοντες στον καθορισμό της σύστασης των λιπιδίων στο σώμα και της ποιότητας του κρέατος των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας (103).

Η LPL παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων, υδρολύοντας τριγλυκερίδια που βρίσκονται στη μορφή των χυλομικρών και VLDL για την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) και 2-μονοακυλογλυκερόλης. Η LPL εκφράζεται στα θηλαστικά σε διάφορους ιστούς μεταξύ των οποίων είναι ο λιπώδης ιστός, οι σκελετικοί μύες, η καρδιά και τα μακροφάγα αλλά δεν εκφράζεται στο ενήλικο ήπαρ. Αντίθετα, στα ψάρια η LPL εκφράζεται και στο ήπαρ των ενήλικων ψαριών (41).

Η διατροφική ρύθμιση της LPL έχει μελετηθεί σε διάφορα είδη. Στην πέστροφα, η ενεργότητα της LPL στον λιπώδη ιστό αυξάνεται μετά το γεύμα και μειώνεται κατά τη περίοδο νηστείας και η ενεργότητα αυτή ελέγχεται από την ινσουλίνη (41). Αντίθετα, η διαφορετική διατροφική σύσταση δεν βρέθηκε να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση της LPL στους σκελετικούς μύες στην τσιπούρα (38).

Η LPL-like ανήκει στην οικογένεια των λιπασών και ομαδοποιείται με την LPL. Προηγούμενες μελέτες σε ενήλικα ψάρια έδειξαν ότι η *lpl-like* εκφράζεται στους ιστούς που εκφράζεται και η *lpl*. Ωστόσο, η LPL αποτελεί την κύρια λιπάση στους ιστούς αυτούς πλίντων μυών στους οποίους η κύρια λιπάση είναι η *lpl-like* (71). Επιπλέον η έκφραση της *lpl-like* στην τσιπούρα έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σημαντικά όταν μειώνεται η ποσότητα της τροφής. Διαφορετική ιστοειδική έκφραση της *lpl* και *lpl-like* έχει διαπιστωθεί επίσης και στη φαγκρί

φαγκρί, υποδηλώνοντας ότι στα σπαροειδή η Irl-like εκφράζεται στους σκελετικούς μύες με καλά ρυθμιζόμενο τρόπο (27).

Η δική μας μελέτη έγινε σε προνύμφες τσιπούρας πράγμα που κατέστησε δύσκολη την ταυτοποίηση της ιστικής κατανομής της Irl-like. Κατά την 15dph η συνολική έκφραση της Irl-like ήταν μειωμένη πιθανώς λόγω του ότι κατά αυτό το στάδιο η προνύμφη δεν βασίζεται πλέον στο λεκιθικό σάκο ο οποίος καλύπτει τις διατροφικές ανάγκες της αναπτυσσόμενης προνύμφης κατά τις πρώτες 15 dph. Συνήθως η κινητοποίηση των τριακυλογλυκερολών γίνεται μετά την εκκόλαψη ως απάντηση στις υψηλές απαιτήσεις ενέργειας (11).

Η μελέτη μας έδειξε ότι η έκφραση της Irl-like αυξάνει κατά την 25 dph και παραμένει ανάλογα αυξημένη μέχρι και την 35 dph. Η 35 dph στην τσιπούρα χαρακτηρίζεται ως ένα αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο σταματά η ζωνική υπερπλασία των μυϊκών ινών και αντικαθίσταται από το στάδιο της υπερτροφίας το οποίο διαρκεί μέχρι και το στάδιο της μεταμόρφωσης που ολοκληρώνεται ύστερα από τις 58 dph (104). Ουσιαστικά, φαίνεται ότι η Irl-like αυξάνει σημαντικά στο διάστημα που ξεκινά η υπερτροφία των μυϊκών ινών και μειώνεται σημαντικά κατά την διάρκεια της μεταμόρφωσης που και η ζωνική υπερπλασία έχει ήδη ολοκληρωθεί. Είναι λοιπόν πιθανό η Irl-like να σχετίζεται με την στρατολόγηση και την αύξηση νέων μυϊκών ινών στην τσιπούρα, γνωρίζοντας ότι εκφράζεται κυρίως στους σκελετικούς μύες.

Ένα επιπλέον κύριο γεγονός στην ανάπτυξη των προνυμφών αποτελεί η κάμψη της νοτοχορδής που ξεκινά κατά την 18dph και ολοκληρώνεται μέχρι την 30-45 dph. Αυτό το αναπτυξιακό γεγονός συμβάλει στην έντονη κινητικότητα της προνύμφης με κύριο αποτέλεσμα να υποβοηθά την γρήγορη πρόσληψη τροφής (104). Συνεπώς για την έντονη κινητικότητα οι μύες χρειάζονται περισσότερη ενέργεια η οποία μπορεί να προέλθει από τα FFA που είναι θεωρητικά, προϊόντα της ιστοειδικής δράσης της Irl-like.

Στην παρούσα μελέτη στις προνύμφες 58 dph που είχαν διαφορετικό μέγεθος η έκφραση της Irl-like βρέθηκε να είναι αυξημένη στα άτομα μεγαλύτερου μεγέθους και μειωμένη στα μικρότερα άτομα. Αυτό το γεγονός μπορεί να ερμηνευθεί από την αυξημένη κυτταροβρίθεια του μυϊκού ιστού η οποία σχετίζεται άμεσα με το τελικό μέγεθος που θα αποκτήσει το ψάρι (104) και συνεπώς τις μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις των μεγαλύτερων ατόμων.

Οι Kaneko και οι συνεργάτες (105) μελέτησαν τις επιπτώσεις της σύντομης νηστείας (short-term fasting) στην περιεκτικότητα των λιπιδίων των μυών. Σε ενήλικα άτομα φαγκριού βρέθηκε ότι η νηστεία των 10 ημερών προκάλεσε αύξηση του mRNA της LPL και της Irl-like στους μύες καθώς και του PPAR $\gamma$ . Σε άπαχα ιχθύδια του ίδιου είδους (θεωρούνται άγρια

ψάρια) η νηστεία 5 ημερών προκάλεσε σημαντική αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου των μυών, αλλά μόνο το mRNA της LPL βρέθηκε αυξημένο. Το ποσό των λιπιδίων μειώθηκε αρκετά στο ήπαρ κατά την νηστεία και ο λιπώδης ιστός εξαφανίστηκε μετά από νηστεία 10 ημερών. Συμπεράναν λοιπόν ότι τόσο το ήπαρ όσο και ο λιπώδης ιστός προσαρμόστηκαν στην κινητοποίηση των λιπιδίων για τη χρήση τους στους μύες, γεγονός που δικαιολογεί την αντιφατική αύξηση των λιπιδίων στους μύες κατά τη διάρκεια της νηστείας. Σε μελέτη λιπαρών ιχθυδίων φαγκριού (θεωρούνται ιχθυοκαλλιέργειας) τα οποία υποβλήθηκαν σε νηστεία 10 ημερών δεν διαπιστώθηκε αύξηση ούτε του λιπιδικού περιεχομένου στους μύες ούτε των επιπέδων mRNA της LPL. Το λιπιδικό ποσοστό μειώθηκε στο ήπαρ αλλά όχι στον λιπώδη ιστό, γεγονός που έδειξε ότι στα ψάρια που είχαν σταθερή πρόσληψη τροφής, οι 10 μέρες νηστείας δεν ήταν αρκετές για να προκαλέσουν κινητοποίηση των λιπιδίων. Οι ερευνητές κατέδειξαν μια αντίστροφη σχέση στα mRNA επίπεδα της LPL και στο ποσό των λιπιδίων στο ήπαρ, η οποία μπορεί να υποδηλώνει ότι τα επίπεδα της LPL αντικατοπτρίζουν μια δεδομένη χρονική απαίτηση των ιστών για λιπίδια.

#### **8. Συμπεράσματα**

Το γονίδιο της *lpl-like* βρέθηκε να ομαδοποιείται πλησιέστερα με την LPL σε σχέση με τις άλλες λιπάσες. Επιπλέον η *lpl-like* ενώ βρέθηκε σε όλους τους τελεόστεους και μη τελεόστεους, απουσιάζει από τα τετράποδα υποδηλώνοντας έτσι ότι το γονίδιο αυτό χάθηκε κάπου στην εξελικτική πορεία ενώ η διατήρηση του στα προγονικά είδη και κυρίως στους τελεόστεους πιθανώς να εξυπηρετεί την προσαρμογή τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα, λόγω της μεγάλης τους ποικιλομορφίας. Επιπλέον βασισμένοι στη συνταινικότητα μπορούμε να υποθέσουμε ότι η *lpl-like* είναι προϊόν διπλασιασμού εν σειρά (tandem duplication). Αναγνωρίστηκε επίσης ένα δεύτερο γονίδιο της LPL σε τρία είδη (zebrafish, cavefish, βακαλάος) σε διαφορετική χρωμοσωμική περιοχή πιθανώς λόγω ανεξάρτητων διπλασιασμών που συνέβησαν ειδικά σε αυτά τα είδη, αλλά ο ρόλος του πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η έκφραση της *lpl-like* επάγεται στις προνύμφες ψαριών της τσιπούρας κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης με το μέγιστο να εμφανίζεται κατά την 25 dph και αυτό το γεγονός μπορεί να συμπίπτει με την έναρξη της εξωγενούς σίτισης και της έντονης κινητικότητας της προνύμφης, εξυπηρετώντας τις ενεργειακές ανάγκες της περιόδου αυτής.

Επιπλέον φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της *lpl-like* με την ανάπτυξη και την αύξηση των μυών γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει μια είδους σχέση κατά τη μετάβαση από την ζωνική υπερπλασία στην υπερτροφία των μυϊκών ινών.

Η έκφραση της *lpl-like* φαίνεται επίσης να μεταβάλλεται και ανάλογα με το μέγεθος της προνύμφης κατά την 58 dph πράγμα που φαίνεται λογικό γνωρίζοντας ότι ένα μεγαλύτερο άτομο χρειάζεται περισσότερη ενέργεια για να κινείται σε σύγκριση με ένα μικρότερο και το γεγονός ότι η *lpl-like* εκφράζεται κυρίως στους σκελετικούς μύες ενισχύει την άποψη αυτή.

## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the World*, 4th Ed., pp 601
2. Pavlidis, M. A. (2011). *Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species* Edited by. pp 31
3. Watanabe, T. & Kiron, V. (1995) Chapter 16. Red sea bream (*Pagrus major*). In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, pp. 395–413
4. Brian Eddy F., Handy Richard D, (2012) *Ecological and Environmental Physiology*, pp 83
5. Heming, T. A. and Buddington, R. K. (1988). Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In *Fish Physiology*, vol. XIA (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 407-446.
6. Kendall, A.W., Ahlstrom, E.H., Moser, H.G. (1984) Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser HG (ed) *Ontogeny and systemics of fishes*. Am Soc Ichthyol Herpetol, Allen Press, Lawrence, Kansas pp 11-22
7. Moretti A., Criado, M.P.F., Cittolin, G, Guidastrì, R., (1999) *Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream*. Food and Agriculture Organization of the United Nation Vol. 1, pp 194
8. Carnevali, M. D. C., Patrino, M., Radaelli, G., Mascarello, F., (1998) Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* ( L .) during development from hatching to juvenile, pp. 487–504
9. Bone, Q., Marshall, N.B., Blaxter, J.H.S., (1995) *Biology of fishes*. Chapman and Hall London Weinheim New York, pp 1–328
10. Slack, J. M.W, (2013), *Essential developmental biology* 3rd ed. pp 23, 531
11. Imrie, D. and Sadler, K. C. (2010) White Adipose Tissue Development in Zebrafish Is Regulated by Both Developmental Time and Fish Size, no. October, pp. 3013–3023
12. Schlegel, A., Stainier, D. Y. (2007) Lessons from “lower” organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet.* 3: e199.
13. Sheridan, M. A. (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 90: 679–690
14. Oku, H., Tokuda, M., Okumura, T., Umino, T. (2006). Effects of insulin, triiodothyronine and fat soluble vitamins on adipocyte differentiation and LPL gene expression in the stromal-vascular cells of red sea bream, *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem.*
15. Jones, K. S., Alimov, A. P., Rilo, H. L., Jandacek, R. J., Woollett L. A., Penberthy, W. T. (2008). A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutr. Metab. (Lond).* 5: 23
16. Iii E. J. F., Trent C. M. and Rawls J. F., (2009) Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio* ), vol. 50, pp. 1641–1652
17. Dani, C., Amri, E.Z., Bertrand, B., Enerback, S., Bjursell, G., Grimaldi, P., Ailhaud, G., (1990) Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipocyte conversion. *J. Cell. Biochem.* 43, 103-110.
18. Sargent, J., Mcevoy, L., Estevez A., Bell M., Bell G. Henderson J., and Tocher D, (1999) Lipid nutrition of marine fish during early development : current status and future directions, pp. 217–229

19. Tocher D.R., Bendiksen E. Å., P. J. Campbell P. J., and Bell J. G.(2008) , The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish, vol. 280, pp. 21–34
20. Simopoulos A. P., Sidossis, L. S. (2000). What is so special about the traditional diet of Greece. The scientific evidence. *Mediterranean Diets*. Vol. 87. Basel, Karger: World Rev. Nutr. Diet, pp 24–42
21. Sargent J.R., McEvoy L.A., Bell J.G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117–127.
22. Lauritzen L, Hansen H. S., Jørgensen M. H., and Michaelsen K. F. (2001) The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina,” vol. 40
23. Sargent J.R., Tocher D.R. & Bell J.G. (2002) The lipids. In: Halver J E, Hardy R W (ed.). *Fish Nutrition*, 3rd ed, San Diego, California: Elsevier (Academic Press), pp. 181-257
24. Bell J.G., Sargent J.R. (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491–499.
25. Izquierdo M. S., Socorro J., Arantzamendi L., and Hern C. M.,(2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae,” pp. 97–107.
26. Yamada S., Yamamura H.I., Roeske W.R. (1980) Characterization of alpha-1 adrenergic receptors in the heart using [3H]WB4101: effect of 6-hydroxydomine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 215:176–185
27. Benedito-palos L., Calduch-giner J. A., Ballester-lozano G. F., and Pe J.,(2013) Effect of ration size on fillet fatty acid composition , phospholipid allostasis and mRNA expression patterns of lipid regulatory genes in gilthead sea bream ( *Sparus aurata* ), pp. 1175–1187
28. Hiji A. K., Michalik L., Wahli W.(2002) PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.*;59:790–8.
29. Steger D. J., Grant G. R., Schupp M., Tomaru T., Lefterova M. I.,Schug J., Manduchi E., C. J. S. Jr, and Lazar M. A.,(2010) Propagation of adipogenic signals through an epigenomic transition state, pp. 1035–1044
30. Poulsen C., Siersbæk M., and Mandrup S., (2012) Seminars in Cell & Developmental Biology PPARs : Fatty acid sensors controlling metabolism, *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 631–639
31. Robinson-Rechavi M., Marchand O., Escriva H., Bardet P.L., Zelus D., Hughes S. & Laudet (2001) Euteleost fish genomes are characterised by expansion of gene families. *Genome Research* 11 781–788.
32. Wang H., Eckel R. H., (2013) Lipoprotein lipase : from gene to obesity *Lipoprotein lipase : from gene to obesity*, no. March 2009
33. Scanu A. (1966) Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. *Science* 153:640–641
34. Garfinkel A.S., Schotz M.C. (1987) Lipoprotein lipase. In: Gotto AM (ed) *Plasma lipoproteins*. Elsevier, Amsterdam, pp 335-358
35. Arnault F., Etienne J., Noé L., Raisonnier A., Brault D., Harney J.W., Berry M.J., Tse C., Fromental-Ramain C., Hamelin J., Galibert F. (1996) Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates. *J Mol Evol* 43:109-115
36. Lindberg A, Olivecrona G.(2002) Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals,” vol. 292, pp. 213–223



37. Liang X., Oku H., and H. Y. O. U, (2002) The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*, pp. 335–342
38. Saera-Vila A., Calduch-Gi ner J.A., Gomez-Requeni P., Me-dale F., Kaushik S. & Perez-Sanchez J. (2005) Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 142, 224-232.
39. Robert V. Farese Jr, Trudy J. Yost, Robert H. Eckel. (1991). Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans vol. 40, no. 2, pp. 214–216
40. Black, D., Skinner, E.R., (1987). Changes in plasma lipoproteins and tissue lipoprotein lipase and salt-resistant lipase activities during spawning in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 88, 261–267.
41. Albalat, A., Sánchez-Gurmaches, J., Gutiérrez, J., Navarro, I., (2006). Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 226–235.
42. Liang, X.F., Oku, H., Ogata, H.Y., (2002). The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 131, 335–342.
43. Auwerx J., Leroy P. and Schoonjans K. (1992) Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 29, 243-268.
44. Mead J.R., Ramji D.P. (2002) The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 55:261–269
45. Merkel M., Kako Y., Radner H., Cho I.S., Ramasamy R., Brunzell J.D., Goldberg, I.J., Breslow JL (1998) Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13841–13846
46. Merkel M., Heeren J., Dudeck W., Rinninger F., Radner H., Breslow J.L., Goldberg I.J., Zechner R., Greten H., (2002) Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 277:7405–7411
47. Mead J.R., Cryer A., Ramji D.P. (1999) Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett* 462:1–6
48. Afinsen C.B., Boyle E., Brown R.K. (1952) The role of heparin in lipoprotein metabolism. *Science* 115:583–586
49. Goldberg, I. J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis : central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis, vol. 37
50. Wong H., & Schotz, M. C. (2002). The lipase gene family. vol. 43, pp. 993–999
51. Braun J.E.A., Severson D.L. (1992) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287:337–347
52. Enerback S., Gimble J.M. (1993) Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and posttranscriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169:107–125

53. Mahmood Hussain M, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A (1996) Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta* 1300:151–170
54. Fielding PE, Fielding CJ (1991) Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. In: Vance DE, Vance J (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier, Amsterdam, pp 427–459
55. Miller AL, Smith LC (1973) Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein glutamic acid. Formation of a stable surface film. *J Biol Chem* 248:3359–3362
56. Eisenberg S, Rachmilewitz D (1975) Interaction of rat plasma very low density lipoprotein with lipoprotein lipase-rich (postheparin) plasma. *J Lipid Res* 16:341–351
57. Scow RO, Olivecrona T (1977) Effect of albumin on products formed from chylomicron triacylglycerol by lipoprotein lipase in vitro. *Biochim Biophys Acta* 487:472–486
58. Lucas M, Iverius PH, Strickland DK, Mazzone T (1997) Lipoprotein lipase reduces secretion of apolipoprotein E from macrophages. *J Biol Chem* 272:13000–13005
59. Vilella E, Joven J, Fernandez M, Vilaro S, Brunzell JD, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G (1993) Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J Lipid Res* 34:1555–1564
60. Mamputu JC, Levesque L, Renier G (2000) Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2212–2219
61. Obunike JC, Lutz EP, Li Z, Paka L, Katopodis T, Strickland DK, Kozarsky KF, Pillarisetti S, Goldberg IJ (2001) Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 276:8934–8941
62. Fielding CJ, Fielding PE (1976) Mechanism of salt-mediated inhibition of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17:248–256
63. Henderson HE, Hassan F, Marais D, Hayden MR. (1996) A new mutation destroying disulphide bridging in the c-terminal domain of lipoprotein lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227:189-94
64. Brault D, Noe L, Etienne J, Hamelin J, Raisonnier A, Souli A, Chuat J-C, Dugail I, Quignard-Boulangé A, Lavau M, Galibert F. (1992) Sequence of rat lipoprotein lipase-encoding cDNA. *Gene* 121:237-46
65. Dugi KA, Dichek HL, Talley GD, Brewer HB Jr, Santamarina Fojo S (1992) Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem* 267:25086–25091
66. Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noé L, Chuat JC, Galibert F (1995) Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111:385–398
67. Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL (1992) Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 267:13284–13292

68. Nielsen MS, Brejning J, Garcia R, Zhang H, Hayden MR, Vilaro S, Gliemann J (1997) Segments in the C-terminal folding domain of lipoprotein lipase important for binding to the low density lipoprotein receptor-related protein and to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 272:5821–5827 78.
69. Salinelli S, Lo JY, Mims MP, Zsigmond E, Smith LC, Chan L (1996) Structure-function relationship of lipoprotein lipasemediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density lipoprotein receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. *J Biol Chem* 271:21906–21913
70. Kwon, J.Y., Prat, F., Randall, C., Tyler, C.R., 2001. Molecular characterization of putativeyolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesisin rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 65, 1701–1709.
71. Oku,H.,Koizumi,N.,Okumura,T.,Kobayashi,T.,Umino,T.,2006.Molecularcharacterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes:effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrusmajor*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 145, 168–178.
72. Goldberg IJ, Soprano DR, Wyatt ML, Vanni TM, Kirchgessner TG, Schotz MC (1989) Localization of lipoprotein lipase mRNA in selected rat tissues. *J Lipid Res* 30:1569–1577
73. Staels B, Martin G, Martinez M, Albert C, Peinado-Onsurbe J, Saladin R, Hum DW, Reina M, Vilaro S, Auwerx J (1996) Expression and regulation of the lipoprotein lipase gene in human adrenal cortex. *J Biol Chem* 271:17425–17432 83.
74. Staels B, Auwerx J (1992) Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. *Development* 115:1035– 1043
75. Semenkovich CF, Chen SH, Wims M, Luo CC, Li WH, Chan L (1989) Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J Lipid Res* 30:423–431
76. Pe´rez-Sa´nchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubi´n de Celis, S., Go´mez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., (2002). Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243 – 258. Special Issue ‘‘Fish Growth and Metabolism. In: Plisetskaya, E.M. (Ed.), Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation.
77. Mingarro, M., Vega-Rubi´n de Celis, S., Astola, A., Pendo´ n, C., Valdivia, M.M., Pe´rez-Sa´nchez, J., (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102 – 111.
78. James R. Mead, Scott A. Irvine, Dipak P. Ramji Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease
79. Alfonso Saera-Vilaa, Josep Alvar Calduch-Ginera, Isabel Navarrob, Jaume Pe´rez-Sa´nchez Tumour necrosis factor (TNF) $\alpha$  as a regulator of fat tissue mass in the Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)
80. Eckel RH, Yost TJ, Jensen DR (1995) Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int J Obe* 19:S16–S21
81. Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L (1989) Insulin regulation of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. *J Biol Chem* 264:9030–9038

82. Kern PA, Ranganathan G, Yukht A, Ong JM, Davis RC (1996) Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J Lipid Res* 37:2332–2340
83. Ranganathan G, Li C, Kern PA (2000) The translational regulation of lipoprotein lipase in diabetic rats involves the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *J Biol Chem* 275:40986–40991
84. Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ (1989) Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J Biol Chem* 264:4349–4355
85. Hughes TR, Tengku-Muhammad TS, Irvine SA, Ramji DP (2002) A novel role of Sp1 and Sp3 in the interferon- $\gamma$ -mediated suppression of macrophage lipoprotein lipase gene transcription. *J Biol Chem* 277:11097–11106
86. Beauchamp MC, Renier G (2002) Homocysteine induces protein kinase C activation and stimulates c-fos and lipoprotein lipase expression in macrophages. *Diabetes* 51:1180–1187
87. Ranganathan G, Kaakaji R, Kern PA (1999) Role of protein kinase C in the translational regulation of lipoprotein lipase in adipocytes. *J Biol Chem* 274:9122–9127
88. Desanctis JB, Varesio L, Radzioch D (1994) Prostaglandins inhibit lipoprotein lipase gene expression in macrophages. *Immunology* 81:605–610
89. Mead J. R., Irvine S. A., and Ramji D. P., Lipoprotein lipase : structure , function , regulation , and role in disease, pp. 753–769, 2002.
90. Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J. AceView: A comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biol.* 2006; 7:S12.
91. Canestro C, Albalat R, Irimia M, Garcia-Fernandez J (2013) Impact of gene gains, losses and duplication modes on the origin and diversification of vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 24:83–94
92. 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
93. Sato Y, Hashiguchi Y, Nishida M (2009) Temporal pattern of loss/persistence of duplicate genes involved in signal transduction and metabolic pathways after teleost-specific genome duplication. *BMC Evol Biol* 9:127
94. Alexandrou MA, Swartz BA, Matzke NJ, Oakley TH (2013) Genome duplication and multiple evolutionary origins of complex migratory behavior in Salmonidae. *Mol Phylogenet Evol* 69:514–523
95. Ohno S (1970a) Evolution by gene duplication. Springer, New York
96. Henkel CV, Burgerhout E, de Wijze DL, Dirks RP, Minegishi Y, Jansen HJ, Spaink HP, Dufour S, Weltzien F-A, Tsukamoto K, van den Thillart GEEJM, Schubert M (2012) Primitive duplicate hox clusters in the European Eel's genome. *PLoS ONE* 7:e32231
97. Schartl M, Walter RB, Shen Y, Garcia T, Catchen J, Amores A, Braasch I, Chalopin D, Volff J-N, Lesch K-P, Bisazza A, Minx P, Hillier L, Wilson RK, Fuerstenberg S, Boore J, Searle S, Postlethwait JH, Warren WC (2013) The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. *Nat Genet* 45:567–572
98. Birnbaum D., Pontarotti P., (1997) Ancient Large-Scale Genome Duplications : Phylogenetic and Linkage Analyses Shed Light on Chordate Genome Evolution. pp. 1145–1159

99. Pfaffl M. W., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR,” vol. 29, no. 9, pp. 16–21
100. Vienne A., Rasmussen J., Abi-rached L., and Pontarotti P.,(2003) “Systematic Phylogenomic Evidence of en Bloc Duplication of the Ancestral,” vol. 20, no. 8. pp. 1290–1298
101. Petit J., Stange-thomann N., Mauceli E., Bouneau L., L. Jaillon L., J. Aury, C. Ozouf-costaz, A. Bernot, S. Nicaud, D. Jaffe, S. Fisher, G. Lutfalla, C. Dossat, C. Bie, C. Jubin, V. Castelli, M. Katinka, M. C. Zody, J. Mesirov, K. Lindblad-toh, B. Birren, C. Nusbaum, D. Kahn, W. Saurin, C. Scarpelli, and P. Wincker, (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype, vol. 431, no. October,
102. Lu J., Peatman E., Tang H., Lewis J., and Liu Z., (2012) Profiling of gene duplication patterns of sequenced teleost genomes : evidence for rapid lineage-specific genome expansion mediated by recent tandem duplications.
103. Zhou S., Ackman R. G., and Morrison C., (1996), Adipocytes and lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon ( *Salmo salar* ),” vol. 332, pp. 326–332, 122
104. S. Georgiou, H. Alami-Durante, D. M. Power, E. Sarropoulou, Z. Mamuris, and K. a. Moutou, “Transient up- and down-regulation of expression of myosin light chain 2 and myostatin mRNA mark the changes from stratified hyperplasia to muscle fiber hypertrophy in larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.),” *Cell Tissue Res.*, vol. 363, no. 2, pp. 541–554, 2016.
105. Kaneko G., Shirakami H., Yamada T., Ide S., Haga Y., Satoh S., and Ushio H.,(2016) Short-term fasting increases skeletal muscle lipid content in association with enhanced mRNA levels of lipoprotein lipase 1 in lean juvenile red seabream ( *Pagrus major* ), *Aquaculture*, vol. 452. Elsevier B.V., pp. 160–168