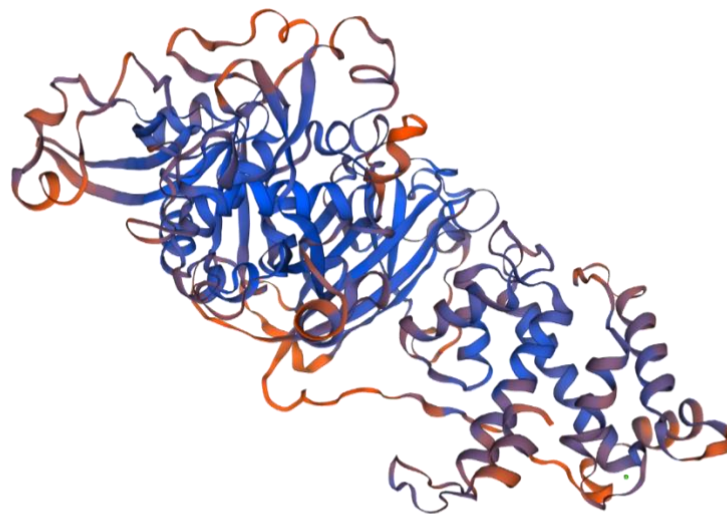




Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Το αποτύπωμα του γονιδιωματικού διπλασιασμού στην  
έκφραση του γονιδίου *CAPN2* στο λαβράκι (*Dicentrarchus  
labrax*)



D.labrax Capn2 catalytic subunit (Waterhouse et al., 2018)

Όνοματεπώνυμο: Κελλάρη Λουκία Μαρία

Πατρώνυμο: Κωνσταντίνος

Λάρισα 2020

Το αποτύπωμα του γονιδιωματικού διπλασιασμού στην έκφραση του  
γονιδίου *CAPN2* στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)



The effect of whole genome duplication on the expression of *CAPN2* in  
European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών – Τμήμα Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία

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

Σταμάτης Κωνσταντίνος

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) στο Εκπαιδευτικό Εργαστήριο  
Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας - Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας –  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μούτου Αικατερίνη, υπό την επίβλεψη της οποίας εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, για την καθοδήγησή της στην πειραματική διαδικασία και τις υποδείξεις της ως προς την συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Σαραφίδου Θεολογία και κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, όπως και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, για την άριστη συνεργασία τους.

Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική ήταν η στήριξη και η καθοδήγηση του υποψήφιου διδάκτορα Αγγελακόπουλου Ραφαήλ σε κάθε στάδιο πραγματοποίησης της εργασίας, τόσο στο επιστημονικό κομμάτι, όσο και στο ψυχολογικό.

## Περίληψη

Οι καλπαΐνες αποτελούν μία οικογένεια ενδοκυτταρικών πρωτεασών κυστεΐνης, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των παπαϊνών. Βρίσκονται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυώτες και σε μερικά βακτήρια και η δραστηριότητά τους εξαρτάται από τα επίπεδα ασβεστίου. Η δράση που έχουν οι καλπαΐνες στα υποστρώματά τους αναφέρεται ως πρωτεολυτική επεξεργασία σε αντίθεση με άλλα πρωτεολυτικά συστήματα, όπου το υπόστρωμα καταλήγει αποδομημένο. Οι περισσότερες έρευνες τόσο δομικές όσο και λειτουργικές στις καλπαΐνες, έχουν πραγματοποιηθεί στα θηλαστικά. Τα δύο κύρια μέλη της οικογένειας είναι η CAPN1 και CAPN2 οι οποίες δρουν ως διμερή και συνδέονται με μία μικρή ρυθμιστική υπομονάδα, σχηματίζοντας την μ- και m-καλπαΐνη, που διαφέρουν ως προς τις απαιτήσεις τους σε ασβέστιο. Το γονίδιο της καλπαΐνης 2 φαίνεται να σχετίζεται με την αποδόμηση μυϊκών πρωτεϊνών κατά την αποθήκευση, μετά την εξαλίευση του ψαριού. Επομένως, συμμετέχει στη διαμόρφωση της υφής του φιλέτου και άρα της ποιότητας του φρέσκου προϊόντος. Το λαβράκι, ένα είδος με μεγάλη οικονομική σημασία και κατανάλωση, έχει δύο αντίγραφα του γονιδίου της *capn2*. Είναι γνωστό πως η εξάπλωση των σπονδυλωτών έχει συνοδευτεί από γεγονότα διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος. Οι Τελεόστεοι, στους οποίους ανήκει και το λαβράκι έχουν υποστεί τρία τέτοια γεγονότα.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας λοιπόν, ήταν αρχικά να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης των δύο γονιδίων της *Capn2a* και *Capn2b*, σε διάφορους ιστούς από λαβράκι με χρήση Real-time PCR. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και φυλογενετική ανάλυση και μελέτη συνταϊνικότητας, σε μία προσπάθεια να διαλευκανθεί η εξελικτική πορεία του διπλασιασμού της *Capn2* σε διάφορα είδη Σπονδυλωτών.

## Abstract

Calpains are a family of intracellular cysteine proteases, that belong to the papain superfamily. Calpains are found in almost all eukaryotes and some bacteria and they are calcium dependent. In contrast with other proteolytic systems that degrade their protein substrate, the action of calpain on its substrate is called 'proteolytic processing'. Most of the research on calpains is focused on mammals. The two main members of the calpain family are CAPN1 and CAPN2 that form heterodimers with a small regulatory subunit, forming  $\mu$ - and m-calpain respectively, that have different requirements in calcium concentration for their activation. Calpain 2 is thought to play a role in protein degradation during postmortem storage. Thus, it affects fillet texture and the quality of the fresh product. European sea bass (*D.labrax*) is a species of great economic significance and demand, and possesses two copies of the *capn2* gene. It is known that whole genome duplication events (WGD) have driven vertebrate evolution. The Teleost lineage, to which European sea bass belongs, has experienced three such WGD events.

The present study examined the expression levels of the two paralogue genes *Capn2a* and *Capn2b* in different tissues of European sea bass, using Real-time PCR. In addition, a second objective was to study the evolution of *Capn2* duplication in vertebrates using comparative genomics.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	7
1.1 Το Λαβράκι .....	7
1.1.1 Βιολογία του λαβρακιού.....	7
1.1.2 Η οικονομική σημασία του λαβρακιού.....	8
1.2 Γονιδιωματικοί διπλασιασμοί .....	9
1.2.1 Πρώτος και δεύτερος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά .....	10
1.2.2 Τρίτος γονιδιωματικός διπλασιασμός στη γενεαλογία των Τελεόστεων .....	11
1.2.3 Μηχανισμοί διπλασιασμού γονιδίων και η μοίρα των παράλογων γονιδίων .....	12
1.2.4. Συνέπειες των γονιδιωματικών διπλασιασμών .....	15
1.3 Οι καλπαΐνες.....	16
1.3.1 Δομή συμβατικών καλπαϊνών .....	17
1.3.2 Ενεργοποίηση των συμβατικών καλπαϊνών .....	19
1.3.3 Αναστολή του συστήματος των καλπαϊνών .....	21
1.3.4 Ρόλος των καλπαϊνών στους μυς.....	22
2. Σκοπός .....	25
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	26
3.1 Συγκριτικές Μέθοδοι .....	26
3.1.1 Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων .....	26
3.1.2 Τοπική στοίχιση αλληλουχιών .....	26
3.1.3 Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών.....	27
3.1.4 Φυλογένεση.....	28
3.1.5 Μελέτη/Ανάλυση συνταϊνικότητας .....	29
3.2 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων μέσω Q-PCR.....	29
3.2.1 Υπολογισμός αρχικής ποσότητας αντιγράφων .....	31
3.2.2 Στατιστική Ανάλυση.....	32
4. Αποτελέσματα .....	33
4.1 Έκφραση των γονιδίων της <i>Capn2</i> .....	33
4.2 Φυλογένεση.....	36
4.3 Ανάλυση Συνταϊνικότητας .....	38
5. Συζήτηση.....	40
Βιβλιογραφία.....	46

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Το Λαβράκι

Το Ευρωπαϊκό λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), είναι ψάρι της οικογένειας Moronidae και αποτελεί βενθοπελαγικό είδος που βρίσκεται στα βορειοανατολικά ύδατα του Ατλαντικού και στη Μεσόγειο. Η λεπτομερής ταξινόμηση του φαίνεται στον Πίνακα 1 (marinespecies.org). Το λαβράκι ενδημεί σε παράκτια νερά βάθους συνήθως 10 μέτρων αλλά μπορεί να βρεθεί και στα 100, καθώς και σε υφάλμυρα νερά στις εκβολές ποταμών και σε λιμνοθάλασσες. Περιστασιακά συναντάται και σε ποτάμια. Εντοπίζεται από τη Νορβηγία μέχρι τη Σενεγάλη, συμπεριλαμβανομένης της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας (Cardoso et al., 2015). Είναι ψάρι ευρύαλο (0–40 ppt salinity) και ευρύθερμο (2–32 °C), δηλαδή αντέχει σε μεγάλες μεταβολές τόσο στην αλατότητα όσο και στην θερμοκρασία του νερού. Κατά τη χειμερινή περίοδο μεταναστεύει σε βαθύτερα νερά, όπου η θερμοκρασία του νερού διατηρείται πιο σταθερή (Vanderputte et al., 2019).

**Πίνακας 1.** Ταξινομική κατάταξη λαβρακιού

Βασίλειο	Ζώα
Φύλο	Χορδωτά
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά
Τάξη	Ακτινοπτερύγιοι
Οικογένεια	Μορονίδες
Γένος	<i>Dicentrarchus</i>

#### 1.1.1 Βιολογία του λαβρακιού

Το λαβράκι έχει επίμηκες σώμα και το όνομα δικέντραρχος προέκυψε λόγω της παρουσίας δύο ραχιαίων πτερυγίων, ένα πρόσθιο τριγωνικό και ένα οπίσθιο τραπεζοειδές. Παρουσιάζει έντονο ουραίο μίσχο και αρκετά διχαλωτό ουραίο πτερύγιο (Froese and Luna, 2019). Ακόμη, έχει ασημί χρώμα, ενώ η κοιλιά μπορεί να εμφανίζει έναν ελαφρύ κίτρινο χρωματισμό. Τα νεαρά ιχθύδια φέρουν μαύρα στίγματα ιδιαίτερα στο πάνω μέρος του σώματος, τα οποία τείνουν να εξαφανίζονται στα ενήλικα ψάρια (Bagni, 2019). Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται ένα ενήλικο λαβράκι.



**Εικόνα 1:** Ενήλικο λαβράκι (Crocetta,2003)

Στα ελεύθερα λαβράκια, τα ενήλικα άτομα μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι ένα μέτρο μήκος, και βάρος 9-10 κιλά και ο χρόνος ζωής τους μπορεί να φτάσει τα 20 χρόνια. Το ευρωπαϊκό λαβράκι είναι ευκαιριακός σαρκοφάγος θηρευτής, τρέφεται με πλαγκτόν και ασπόνδυλα στο στάδιο της προνύμφης, ενώ όταν ενηλικιωθεί τρέφεται με σκουλήκια, γαρίδες, καλαμάρια, μαλάκια και μικρά ψάρια (Pickett & Pawson, 1994).

Το λαβράκι της Μεσογείου συνήθως ωριμάζει σε ηλικία από δύο έως τριών ετών για τα αρσενικά άτομα και από τριών μέχρι τεσσάρων ετών για τα θηλυκά (Perez-Ruzafa & Marcos, 2014). Η αναπαραγωγή πραγματοποιείται μία φορά τον χρόνο, μεταξύ Δεκέμβρη και Μάρτη. Η θερμοκρασία και η φωτοπερίοδος φαίνεται να είναι οι δύο σημαντικότεροι παράγοντες που καθορίζουν πότε τα ψάρια θα αναπαραχθούν. Επομένως είναι σπάνιο να βρεθούν αυγά σε νερά πιο κρύα από 8,5–9 °C και πιο ζεστά από 15-17 °C. Τα θηλυκά γεννούν κατά μέσο όρο 200.000 αυγά/κιλό με διάμετρο 1,1-1,3 mm, τα οποία γονιμοποιούνται εξωτερικά. Τα αυγά εκκολάπτονται μετά από τρεις έως πέντε ημέρες και οι προνύμφες (4 mm κατά την εκκόλαψη), ολοκληρώνουν την προνυμφική περίοδο (>22 mm) σε διάστημα δύο έως τριών μηνών (Pickett & Pawson, 1994). Οι προνύμφες αναπτύσσονται σε υφάλμυρα ύδατα και στη συνέχεια μεταναστεύουν σε προστατευμένες παράκτιες περιοχές ή εκβολές ποταμών όπου τα νεαρά άτομα περνούν τα επόμενα χρόνια της ζωής τους. Οι εκβολές των ποταμών αποτελούν περιοχές που προωθούν την ανάπτυξη του λαβρακιού λόγω της ύπαρξης ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών (Cardoso et al., 2015).

### **1.1.2 Η οικονομική σημασία του λαβρακιού**

Το λαβράκι αποτελεί βασικό αλιευτικό είδος όσο αναφορά την επαγγελματική, αλλά και την ψυχαγωγική αλιεία. Ο βορειοανατολικός Ατλαντικός Ωκεανός, ιδιαίτερα η Μάγχη, η Ιρλανδική Θάλασσα, ο Βισκαϊκός κόλπος, αλλά και η Μεσόγειος Θάλασσα είναι οι βασικές περιοχές αλιείας του. Εξαιτίας της μεγάλης ζήτησής του, έγινε επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης υδατοκαλλιέργειας. Ήδη από το 1992 παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα μέσω υδατοκαλλιεργειών σε σχέση με την αλιεία. Το 2016 η παραγωγή από τις υδατοκαλλιεργείες έφτασε τους 165.915 τόνους (96% της συνολικής παραγωγής), ενώ μέσω αλιείας παρήχθησαν μόνο 6.919 τόνοι. Η Μεσόγειος αποτελεί την περιοχή με τις περισσότερες υδατοκαλλιεργείες



λαβρακιού (94% της συνολικής παραγωγής μέσω υδατοκαλλιέργειας), οι οποίες βρίσκονται κυρίως στην Τουρκία, την Ελλάδα, την Αίγυπτο και την Ισπανία (FEAP, 2017).

Η παραγωγή μέσω υδατοκαλλιέργειας περιλαμβάνει δύο φάσεις: το εκκολαπτήριο, όπου παράγονται ψάρια 1-20 γραμμαρίων μέσα σε τρεις με οκτώ μήνες και τη φάση της εκτροφής, που το ψάρι φτάνει τα 250-450 γραμμάρια μέσα σε 12 με 20 μήνες. Το εκκολαπτήριο χαρακτηρίζεται από συστήματα με ελεγχόμενη θερμοκρασία, ενώ η εκτροφή γίνεται σε κλωβούς στη θάλασσα. Το κύριο προϊόν που διατίθεται στην αγορά είναι 250-400 γραμμάρια, αλλά υπάρχει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την παραγωγή μεγαλύτερων ψαριών μεγέθους 800-1000 γραμμαρίων για την πώληση είτε ως ολόκληρου ψαριού είτε ως επεξεργασμένα φιλέτα (EUMOFA 2018). Η 'εξημέρωση' του λαβρακιού είναι σχετικά πρόσφατη. Ήταν το πρώτο είδος που δεν ανήκε στις Σαλμονίδες που καλλιεργήθηκε στην Ευρώπη (Baghi, 2019). Το 2016 υπολογίστηκε πως το 50% των εκτρεφόμενων λαβρακιών προήλθαν από προγράμματα επιλεκτικής αναπαραγωγής (Janssen et al., 2017). Όπως για όλα τα είδη ψαριών που παράγονται μέσω καλλιέργειας ο ρυθμός αύξησης τους είναι πολύ σημαντικός και ειδικά για το λαβράκι που χρειάζεται 18 με 24 μήνες για να φτάσει το τελικό μέγεθος που εξάγεται στην αγορά. Επομένως η μείωση του χρόνου εκτροφής, η αποφυγή ασθενειών, αλλά και η βελτιστοποίηση της ποιότητας του φιλέτου είναι στοιχεία που ενδιαφέρουν τους εκτροφείς (Vanderputte et al., 2019).

## 1.2 Γονιδιωματικοί διπλασιασμοί

Το γονιδίωμα του λαβρακιού αποτελείται από 675 Mb και περιέχει συνολικά 26.719 γονίδια, που οργανώνονται σε 24 χρωμοσώματα. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA αποτελούν το 21,47% του γονιδιώματος του και το περιεχόμενο σε GC βάσεις το 40,4%, που είναι συγκρίσιμο με τα γονιδιώματα άλλων Τελεόστεων (Tine et al., 2014). Πολλά από τα γονίδια στο λαβράκι είναι διπλασιασμένα, όπως και το γονίδιο της καλπαΐνης 2 που αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Το θέμα των γονιδιωματικών διπλασιασμών απασχολεί την επιστήμη της εξέλιξης πολλές δεκαετίες. Ένα σημαντικό ερώτημα είναι πως τα γονιδιώματα εξελίχθηκαν από μερικά πρωταρχικά γονίδια σε ανώτερους οργανισμούς με πάνω από 20.000 γονίδια. Η επικρατούσα θεωρία είναι πως αυτό ήταν δυνατό λόγω γονιδιακών διπλασιασμών (Hurles, 2004). Ο Ohno (1970) κατέληξε πως 'ο γονιδιακός διπλασιασμός είναι ο μοναδικός τρόπος με τον οποίον μπορεί να προκύψει ένα νέο γονίδιο'. Υποστήριξε επίσης πως όχι μόνο μεμονωμένα γονίδια αλλά ολόκληρα γονιδιώματα έχουν διπλασιαστεί στο παρελθόν και έχουν προκαλέσει μεγάλα άλματα εξέλιξης, όπως η μετάβαση από τα ασπόνδυλα στα σπονδυλωτά (Magadum et al., 2013). Μετά την παρουσίαση του γονιδιακού διπλασιασμού ως εξελικτική δύναμη από τον Ohno ανοίχτηκε ένα μεγάλο ερευνητικό πεδίο για τις πιθανές εξελικτικές συνέπειες του γονιδιακού διπλασιασμού. Μετά το 1980 όπου αναπτύχθηκε η τεχνική των μοριακών δεικτών και το 1990 όπου η αλληλούχηση γονιδιωμάτων έγινε συνηθισμένη πρακτική, η ανάλυση των γονιδιακών διπλασιασμών, αλλά και ο καθορισμός των εξελικτικών μονοπατιών που ακολούθησαν οι οργανισμοί, έγινε επίσημο πεδίο έρευνας (Magadum et al., 2013).

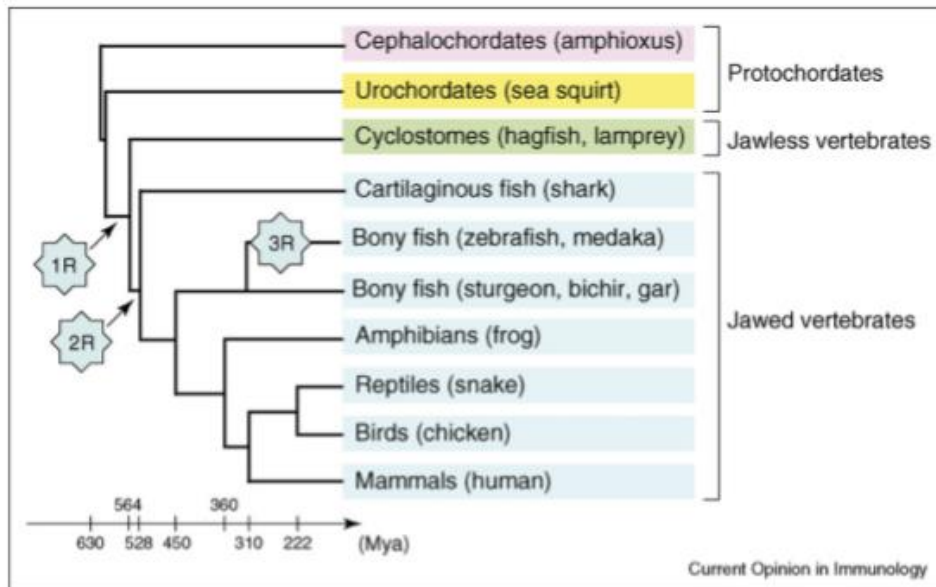
Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης τα γονίδια μπορούν να έρθουν αντιμέτωπα με γεγονότα διπλασιασμού. Ο διπλασιασμός μπορεί να επηρεάσει ένα γονίδιο, μία ομάδα γονιδίων, ολόκληρα χρωμοσώματα ακόμα και ολόκληρα γονιδιώματα. Ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD: whole genome duplication) οδηγεί αρχικά σε πολυπλοειδία, δηλαδή σε

διπλασιασμό όλων των χρωμοσωμάτων του οργανισμού (Stella et al., 2014). Ο διπλασιασμός ενός γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο θυγατρικών γονιδίων που ονομάζονται παράλογα στον ίδιο οργανισμό και ορθόλογα ανάμεσα στα διαφορετικά είδη. Ο διπλασιασμός όλου του γονιδιώματος είναι πολύ σημαντικός για την παραγωγή νέων γονιδίων. Η σημαντικότητα των γεγονότων πολυπλοειδισμού έγινε αρχικά κατανοητή στα φυτά, όμως πολλά ζώα έχουν υποστεί WGDs. Ακόμα και μεταξύ των θηλαστικών, που πιστεύεται πως δεν είναι ανεκτικά στον πολυπλοειδισμό, έχει αναφερθεί διπλασιασμένο γονιδίωμα σε είδος τρωκτικού. Υπάρχουν πλέον αποδείξεις πως πριν την εξάπλωση των σπονδυλωτών προηγήθηκαν δύο γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος. Αυτά τα γεγονότα βοήθησαν στην διαφοροποίηση και την δημιουργία καινοτομιών στα σπονδυλωτά. Το τρίτο γεγονός διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος που έχει συμβεί στα σπονδυλωτά αφορά την γενεαλογία των Τελεόστεων, γι' αυτό και αποκαλείται διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος ειδικός για τους Τελεόστεους (teleost-specific, TS WGD) (Stella et al., 2014).

### **1.2.1 Πρώτος και δεύτερος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά**

Στο βιβλίο του ο Susumu Ohno το 1970 ανέφερε πως το γονιδίωμα των σπονδυλωτών υπέστη έναν ή δύο γύρους διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στο στάδιο των ψαριών ή των αμφιβίων μέσω μίας διαδικασίας τετραπλοειδίας. Η ιδέα αυτή βασίστηκε κυρίως στην σύγκριση του μεγέθους των γονιδιωμάτων και των καρυοτύπων διαφορετικών οργανισμών και στην παρατήρηση πως υπάρχουν τετραπλοειδή είδη που ανήκουν στα ψάρια ή στα αμφίβια. Τα WGD γεγονότα επηρεάζουν όλες τις ομάδες γονιδίων ενός οργανισμού ταυτοχρόνως, επομένως παράγεται μεγάλη ποσότητα γενετικού υλικού που μπορεί δυναμικά να αποκτήσει νέες λειτουργίες. Σε σχέση με τα γεγονότα γονιδιακών διπλασιασμών, μέσω του διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος τα γονίδια που προκύπτουν, μπορούν να συνεχισθούν πιο αποτελεσματικά, δημιουργώντας έτσι ολόκληρα δίκτυα γονιδίων που μπορούν να συμμετέχουν σε λειτουργικές καινοτομίες. Η υπόθεση αυτή του Ohno έχει αποτελέσει θέμα έντονης συζήτησης και πλέον υπάρχουν πολλοί υποστηρικτές μίας πιο εξελιγμένης μορφής της που ονομάζεται 2R υπόθεση (2 round hypothesis) (Kasahara, 2007).

Μέχρι πρότινος η επικρατούσα θεωρία υπέθετε δύο γύρους διπλασιασμού μετά την εμφάνιση των Κεφαλοχορδωτών και πριν την εξάπλωση των Γναθοστόματων. Όμως, η πιο πρόσφατη 2R υπόθεση υποστηρίζει πως έγιναν δύο γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος μετά την εμφάνιση των Ουροχορδωτών και πριν την εξάπλωση των Γναθοστόματων σπονδυλωτών. Τα Άγναθα σπονδυλωτά που περιλαμβάνουν τους Μυξίνους και τους Κυκλόστομους, βρίσκονται φυλογενετικά ανάμεσα στα Ουροχορδωτά και τα Γναθοστόματα. Η κυρίαρχη άποψη λοιπόν, είναι πως ο πρώτος γύρος WGD έγινε σε έναν κοινό πρόγονο των Γναθοστόματων και των Άγναθων σπονδυλωτών, ενώ ο δεύτερος γύρος σε έναν κοινό πρόγονο των Γναθοστόματων. Αυτό απεικονίζεται και στην Εικόνα 2 (Kasahara, 2007).



**Εικόνα 2.** Η 2R υπόθεση. Τα 1R,2R,3R υποδηλώνουν τα σημεία των γονιδιωματικών διπλασιασμών (Kasahara,2007)

Αποδείξεις για τους δύο γύρους διπλασιασμού έφεραν οι μελέτες των γονιδίων *HOX*. Τα γονίδια *HOX* είναι τα ομόλογα των ομοιοτικών γονιδίων της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*. Είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση και έχουν ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου και την δημιουργία του εμπροσθοπίσθιου άξονα. Οργανώνονται στο γονιδίωμα σε χρωμοσωματικές συστοιχίες. Σε απλούς αρχαίους οργανισμούς υπάρχει μία μόνο συστοιχία, ενώ όσο περνάμε σε ανώτερα ζώα χάρι στους διπλασιασμούς ολόκληρου του γονιδιώματος ο αριθμός των συστοιχιών αυξάνεται (Gavalas et al., 2001). Τα γονιδιώματα των Γναθοστόματων σπονδυλωτών περιέχουν στενά συνδεδεμένες ομάδες παράλογων γονιδίων σε πάνω από δύο, συνήθως τέσσερα χρωμοσώματα, ενώ τα Ουροχορδωτά και τα Κεφαλοχορδωτά συνήθως περιέχουν μία μόνο ομάδα. Η ομάδα αυτών των γονιδίων αντιπροσωπεύει τις προ-διπλασιασμένες μορφές των αντίστοιχων παράλογων γονιδίων στα Γναθοστόματα. Για παράδειγμα ο αμφίοξος που ανήκει στα Κεφαλοχορδωτά, έχει ένα μοναδικό σύμπλεγμα γονιδίων *HOX*, ενώ ο άνθρωπος περιέχει τέσσερα συμπλέγματα, καθένα από τα οποία βρίσκεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα. Εκτός από τα ίδια τα γονίδια *HOX* που είναι τετραπλασιασμένα, τα διπλανά γονίδια που γειτνιάζουν με τα συμπλέγματα των *HOX* γονιδίων εμφανίζονται τετραπλασιασμένα, τριπλασιασμένα ή διπλασιασμένα. Αυτό υποδεικνύει πως τα τέσσερα συμπλέγματα *HOX* γονιδίων αλλά και οι γειτονικές περιοχές, προέκυψαν από δύο γύρους διπλασιασμού (Kasahara, 2007).

### 1.2.2 Τρίτος γονιδιωματικός διπλασιασμός στη γενεαλογία των Τελεόστεων

Οι Τελεόστεοι αποτελούν μία μονοφυλετική ομάδα Ακτινοπτερύγιων ιχθύων και είναι η μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη ομάδα σπονδυλωτών. Περιλαμβάνουν περίπου 24.000 είδη, το 50 % όλων των σπονδυλωτών και παραπάνω από το 99% των Ακτινοπτερύγιων που απέκλιναν από τους Σαρκοπτερύγιους περίπου 450 MYA (Christoffels et al., 2004). Οι πρώτες υποθέσεις για WDG στην γενεαλογία των Τελεόστεων προέκυψαν από την παρατήρηση πως πολλά γονίδια στα τετράποδα έχουν δύο ορθόλογα στους Τελεόστεους. Ήταν αβέβαιο αν αυτά τα ορθόλογα προέκυψαν από ένα WDG γεγονός ή από πολλούς μικρότερους διπλασιασμούς

σε επίπεδο χρωμοσώματος ή χρωμοσωμικών τμημάτων. Υπάρχουν πλέον ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι συνέβη διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στη βάση της γενεαλογίας των Τελεόστεων. Η πρώτη αφορά στα γονίδια *Hox*. Συγκεκριμένα έχουν βρεθεί επτά γονιδιακές συστοιχίες *Hox* στους ιχθύες *Danio rerio*, *Takifugu rubripes* και *Oryzias latipes*, σε αντίθεση με τα τετράποδα που έχουν τέσσερις (Christoffels et al., 2004; Stella et al., 2014). Επίσης, βρέθηκαν διπλασιασμένες συστοιχίες *Hox* γονιδίων στις δύο πιο αρχαίες υπάρχουσες ομάδες Τελεόστεων, τα *Eloporomorpha* που περιλαμβάνουν τα χέλια και τα *Osteoglossomorpha* που περιλαμβάνουν τις ρέγγες. Τα χέλια (Ευρωπαϊκό και Ιαπωνικό χέλι) είναι τα μόνα ψάρια που έχουν διατηρήσει τα αρχικά οκτώ συμπλέγματα γονιδίων *Hox*. Αφού τα *Eloporomorpha* βρίσκονται στη βάση της γενεαλογίας των Τελεόστεων, υπάρχει ισχυρή ένδειξη πως ο πρόγονος όλων των ζώντων Τελεόστεων είχε οκτώ *HOX* συμπλέγματα (Stella et al., 2014).

Επιπλέον ενδείξεις για το Teleost Specific Whole Genome Duplication προέκυψαν από μελέτες μοριακής εξέλιξης. Ένας γονιδιωμικός διπλασιασμός αναμένεται να οδηγήσει στην απόκλιση όλων των παράλογων γονιδίων την ίδια χρονική στιγμή. Πράγματι, χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα του *T.rubripes* και μέσω δύο διαφορετικών μελετών με χρήση μοριακών ρολογιών οι οποίες αποκλίνουν λίγο στα αποτελέσματά τους, τοποθετούν τον διπλασιασμό του γονιδιώματος 350 MYA (Christoffels et al., 2004) και 320 MYA (Vandepoele et al., 2004). Και στις δύο περιπτώσεις όμως, είναι πριν από την εξάπλωση των Τελεόστεων. Τέλος, εκτός από τον διπλασιασμό στη βάση της γενεαλογίας των Τελεόστεων, πιο πρόσφατα γεγονότα WGD πραγματοποιήθηκαν στη γενεαλογία των Σολομονίδων και Κυπρινίδων. Ο πρόγονος όλων των ζώντων Σολομονίδων υπέστη έναν τετραπλοειδισμό που τοποθετείται περίπου 80-50 MYA. Από τους Κυπρινίδες, ο κυπρίνος και το χρυσόψαρο είναι επίσης τετραπλοειδή (Stella et al., 2014).

### 1.2.3 Μηχανισμοί διπλασιασμού γονιδίων και η μοίρα των παράλογων γονιδίων

Οι αλλαγές στον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων αποτελούν από τις πιο συχνές μεταλλάξεις που μπορούν να συμβούν σε ένα γονιδίωμα. Ιδιαίτερα οι γονιδιακοί διπλασιασμοί είναι από τις πιο αρχαίες μορφές μεταλλαξιγένεσης (Reams et al., 2015). Τα διπλασιασμένα γονίδια μπορούν να προκύψουν μέσω τεσσάρων διαφορετικών μοριακών μηχανισμών.

Ο πρώτος μηχανισμός αποτελεί τον άνισο επιχιασμό (unequal crossing over). Ο επιχιασμός είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει φυσιολογικά κατά την μείωση. Αποτελεί την αμοιβαία φυσική ανταλλαγή χρωμοσωμικών τμημάτων μεταξύ μη αδελφών χρωματίδων κατά μήκος των ζευγών των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Η ανταλλαγή διευκολύνεται λόγω της στοίχισης των ομόλογων χρωμοσωμάτων μέσω δημιουργίας του συναπτονημικού συμπλόκου. Ο επιχιασμός δεν περιλαμβάνει απώλεια ή προσθήκη γενετικού υλικού σε κανένα από τα δύο χρωμοσώματα, αφού ο διασκελισμός περιλαμβάνει αμοιβαίες ανταλλαγές (Russel, 2006) Ο άνισος επιχιασμός αναφέρεται στην ανταλλαγή τμημάτων μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων που όμως δεν έχουν στοιχηθεί ορθά και οδηγεί στην παραγωγή επαναλαμβανόμενων ακολουθιών DNA. Ανάλογα με την θέση του επιχιασμού, η διπλασιασμένη περιοχή μπορεί να περιέχει ένα μέρος ενός γονιδίου, ολόκληρο το γονίδιο ή μία ομάδα γονιδίων (Magadum et al., 2013). Ο άνισος επιχιασμός πάντα οδηγεί στην παραγωγή δύο χρωμοσωμικών προϊόντων το ένα θα έχει το διπλασιασμένο τμήμα και το άλλο θα έχει έλλειψη στο συγκεκριμένο τμήμα (Silver, 2001).

Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η ρετρομετάθεση (retroposition). Η ρετρομετάθεση είναι η διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής ενός mRNA σε cDNA το οποίο στη συνέχεια ενσωματώνεται στο γονιδίωμα. Υπάρχουν κάποια μοριακά χαρακτηριστικά αναγνώρισης της ρετρομετάθεσης, όπως η απουσία ιντρονίων και ρυθμιστικών στοιχείων ενός γονιδίου, η παρουσία πολύ-A αλληλουχίας και η παρουσία μικρών επαναλήψεων στα άκρα (flanking short direct repeats). Η βασική διαφορά με τον άνισο επιχιασμό είναι πως αν το αρχικό γονίδιο περιέχει ιντρόνια, στα διπλασιασμένα γονίδια θα είναι επίσης παρόντα, ενώ θα είναι απόντα από τα ρετρογονίδια. Το διπλασιασμένο γονίδιο που προκύπτει από την ρετρομετάθεση δεν σχετίζεται συνήθως με το αρχικό, καθώς η ενσωμάτωση του cDNA στο γονιδίωμα είναι τυχαία (Magadum et al., 2013).

Ο τρίτος μηχανισμός γονιδιακών διπλασιασμών είναι η DNA αντιμετάθεση (DNA Transposition) η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο μονοπατιών. Το πρώτο αποκαλείται NAHR (non-allelic homologous recombination) και το δεύτερο NHEJ (nonhomologous end joining) (Magadum et al., 2013). Η DNA αντιμετάθεση ορίζεται ως η μεταφορά ενός τμήματος DNA (τρανσποζόνιο) από μία γενωμική περιοχή σε μία άλλη. Η μεταφορά καταλύεται από μία τρανσποζάση που κωδικοποιείται από το τρανσποζόνιο (Grindley, 2001). Το NHEJ μονοπάτι είναι το κυριότερο μονοπάτι επιδιόρθωσης δίκλωνων ρήξεων που συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, εκτός από την φάση S και G2. Απαιτείται πολύ μικρή έως ελάχιστη ομολογία μικρότερη των 4 bp για να πραγματοποιηθεί (Pannunzio et al., 2018). Το μονοπάτι NAHR πραγματοποιείται κατά την μείωση και περιλαμβάνει ανασυνδυασμό μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών που περιέχουν τμηματικούς διπλασιασμούς (Colnaghi et al., 2011). Η διαφορά μεταξύ των μονοπατιών βασίζεται στο αν χρησιμοποιούνται ομόλογες αλληλουχίες ως πρότυπο για την επιδιόρθωση των δίκλωνων ρήξεων. Η διαφορά αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υποδηλώσει τον μηχανισμό διπλασιασμού μεμονωμένων γονιδίων. Για παράδειγμα ο άνισος επιχιασμός είναι μία μορφή NAHR (Magadum et al., 2013).

Τέλος, ο τέταρτος σημαντικότερος μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε διπλασιασμό γονιδίων είναι ο πολυπλοειδισμός. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία εξελικτική διαδικασία όπου δύο ή περισσότερα γονιδιώματα συγχωνεύονται στον ίδιο πυρήνα, συνήθως μέσω υβριδισμού που ακολουθείται από διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων (Magadum et al., 2013). Εκτός από τις υποθέσεις του Ohno που υποστήριξε πως δύο διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν συμβεί στα σπονδυλωτά υπάρχουν και ενδείξεις πως ακόμα και το *S. cerevisiae* είναι τετραπλοειδής οργανισμός που μετά το WGD γεγονός ακολούθησαν πολλές γονιδιακές απώλειες. Στα φυτά, έχει προταθεί πως ο πολυπλοειδισμός έχει πραγματοποιηθεί τουλάχιστον στο 70% των αγγειόσπερμων και στο 95% των πτεριδόφυτων. Επομένως, ο πολυπλοειδισμός φαίνεται να είναι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες που έχει οδηγήσει και διαμορφώσει την εξέλιξη των ανώτερων οργανισμών (Magadum et al., 2013).

Έχει παρατηρηθεί πως ο πολυπλοειδισμός δεν διατηρείται από τους οργανισμούς με το πέρας της εξέλιξης. Γενικώς, δεν είναι πλεονεκτικό για τους οργανισμούς να φέρουν δύο πανομοιότυπα γονίδια, καθώς λειτουργικά είναι περιττό (Magadum et al., 2013). Μετά το WGD τα διπλασιασμένα γονίδια αναμένεται να απαλλαχθούν από την εξελικτική πίεση και άρα με το πέρας του χρόνου να εξαφανιστούν. Στην πραγματικότητα όμως η μοίρα των διπλασιασμένων γονιδίων είναι πιο περίπλοκη και μπορεί να διαφέρει. Ένα από τα δύο αντίγραφα μπορεί να χαθεί (non-functionalization), και τα δύο αντίγραφα μπορεί να διατηρηθούν σχεδόν αναλλοίωτα, και στα δύο αντίγραφα μπορούν να συσσωρευτούν αλλαγές

ώστε η λειτουργία του πρωταρχικού γονιδίου να μοιραστεί ανάμεσα στα αντίγραφα (subfunctionalization) και τέλος ένα από τα δύο αντίγραφα μπορεί να αποκτήσει μία νέα λειτουργία (neofunctionalization) (Stella et al., 2014).

#### *Δημιουργία ψευδογονιδίων – απώλεια λειτουργίας (Non-functionalization)*

Αμέσως μετά τον διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος τα δύο αντίγραφα κάθε πρωταρχικού γονιδίου είναι πανομοιότυπα και λειτουργικά υπάρχει μία περίσσεια (Stella et al., 2014). Μεταλλάξεις που αλλάζουν την δομή και τη φυσιολογική λειτουργία του ενός από τα δύο γονίδια δεν είναι επιβλαβείς και έτσι δεν απομακρύνονται από την φυσική επιλογή. Σταδιακά το γονίδιο με τις μεταλλάξεις μετατρέπεται σε ψευδογονίδιο, που είτε δεν εκφράζεται είτε δεν έχει σωστή λειτουργία. Σε βάθος χρόνου το ψευδογονίδιο θα αφαιρεθεί από το γονιδίωμα ή θα έχει παρεκκλίνει σε τόσο μεγάλο βαθμό από το αρχικό γονίδιο, που πλέον δεν θα μπορεί να συσχετιστεί μαζί του. Μόνο τα σχετικώς πρόσφατα ψευδογονίδια μπορούν να ταυτοποιηθούν λόγω αλληλουχικής ομοιότητας με το πρωταρχικό γονίδιο. Συγκεκριμένα, στο *C.elegans* υπάρχει ένα ψευδογονίδιο για κάθε οκτώ λειτουργικά γονίδια, ενώ στον άνθρωπο υπάρχει ένα ψευδογονίδιο για κάθε δύο λειτουργικά γονίδια. Η διαδικασία μετατροπής του διπλασιασμένου γονιδίου σε ψευδογονίδιο πραγματοποιείται μέσα στα πρώτα εκατομμύρια χρόνια μετά τον διπλασιασμό, αν το γονίδιο δεν επιλέγεται μέσω φυσικής επιλογής (Zhang, 2003).

#### *Διατήρηση της γονιδιακής λειτουργίας*

Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί πως διατηρούνται και τα δύο αντίγραφα. Ο πρώτος που πρότεινε κάποια εξήγηση για αυτό ήταν ο Ohno (1970). Πρότεινε συγκεκριμένα δύο διαφορετικές εξηγήσεις. Σύμφωνα με την πρώτη, το δεύτερο αντίγραφο του γονιδίου διατηρείται ώστε να μπορέσει να αποκαταστήσει την λειτουργία στην περίπτωση που το πρωταρχικό γονίδιο αποκτήσει κάποια επιβλαβή μετάλλαξη και απενεργοποιηθεί (Magadum et al., 2013). Σύμφωνα με τη δεύτερη, το να υπάρχουν δύο αντίγραφα του ίδιου γονιδίου δίνει το πλεονέκτημα της παραγωγής περισσότερης πρωτεΐνης όπως στις περιπτώσεις των ιστονών και των ριβοσωμικών RNAs που χρειάζονται σε μεγάλη ποσότητα μέσα στο κύτταρο (Magadum et al., 2013 ; Zhang, 2003). Πως όμως δύο παράλογα γονίδια μπορούν τελικά να διατηρήσουν την ίδια λειτουργία; Ο ένας τρόπος είναι μέσω γονιδιακής μετατροπής (gene conversion) (Zhang, 2003). Η γονιδιακή μετατροπή ορίζεται ως μία διαδικασία ανασυνδυασμού όπου υπάρχει μη αμοιβαία ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας ανάμεσα σε ομόλογες αλληλουχίες (Stella et al., 2014 ; Zhang, 2003; Cañestro et al., 2013). Μέσω συνεχούς γονιδιακής μετατροπής τα γονίδια δεν θα εξελίσσονται ανεξάρτητα, αλλά μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται εναρμονισμένη εξέλιξη (concerted evolution). Το αποτέλεσμα της εναρμονισμένης εξέλιξης είναι πως τα γονίδια παραμένουν όμοια μεταξύ τους σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις περιπτώσεις που δεν συμβαίνει γονιδιακή μετατροπή (Stella et al., 2014). Εναλλακτικά, μέσω αρνητικής επιλογής, δηλαδή φυσικής επιλογής που εμποδίζει την εγκαθίδρυση των αλληλομόρφων που περιέχουν βλαβερές μεταλλάξεις, μπορούν να συνεχίσουν τα διπλασιασμένα γονίδια να διατηρούνται (Zhang, 2003).

#### *Διαφοροποίηση λειτουργίας (subfunctionalization)*

Εκτός από την περίπτωση που το έξτρα αντίγραφο γονιδίου προσφέρει κάποιο πλεονέκτημα, τις περισσότερες φορές δύο γονίδια με πανομοιότυπη λειτουργία δεν συνηθίζεται να διατηρούνται. Η πληθυσμιακή γενετική υποστηρίζει πως για να διατηρηθούν και τα δύο αντίγραφα του ίδιου γονιδίου, θα πρέπει να διαφέρουν σε ορισμένες πτυχές της λειτουργίας

τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω διαφοροποίησης λειτουργίας, όπου και τα δύο θυγατρικά γονίδια αποκτούν ένα μέρος της συνολικής λειτουργίας του αρχικού γονιδίου. Μία μορφή διαφοροποίησης λειτουργίας είναι ο διαχωρισμός της γονιδιακής έκφρασης μετά τον διπλασιασμό. Για παράδειγμα στο ψάρι *D. rerio* τα *engrailed-1a* και *engrailed-1b* είναι ένα ζευγάρι γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων, που δημιουργήθηκαν από χρωμοσωμικό τμηματικό διπλασιασμό στη γενεαλογία των Ακτινοπτερύγιων. Το *engrailed-1a* εκφράζεται στο βλάστημα του θωρακικού πτερυγίου (pectoral appendage bud), ενώ το *engrailed-1b* εκφράζεται σε συγκεκριμένους νευρώνες στην σπονδυλική στήλη. Το γονίδιο *engrailed-1* στο ποντίκι που δεν είναι διπλασιασμένο και είναι ορθόλογο με τα δύο αντίστοιχα γονίδια στο *D. rerio* εκφράζεται και στο βλάστημα της θωρακικής ζώνης και στην σπονδυλική στήλη. Η διαφοροποίηση λειτουργίας μπορεί να επιτευχθεί και σε επίπεδο πρωτεϊνικής λειτουργίας όταν ένα από τα διπλασιασμένα γονίδια πραγματοποιεί καλύτερα μία από τις αρχικές λειτουργίες του αρχικού γονιδίου (Zhang, 2003).

#### *Νέα λειτουργία (neofunctionalization)*

Μία από τις σημαντικότερες συνέπειες του διπλασιασμού γονιδίων είναι η απόκτηση νέας λειτουργίας από το ένα παράλογο γονίδιο. Χάριν της έλλειψης της εξελικτικής πίεσης για τη διατήρηση και των δύο αντιγράφων, το ένα παράλογο μπορεί να αποκτήσει μεταλλάξεις και τελικά μία νέα λειτουργία. Η πιθανότητα οι μεταλλάξεις να είναι επωφελείς είναι χαμηλή σε σχέση με το να είναι επιβλαβείς. Επομένως η απόκτηση νέας λειτουργίας μετά τον διπλασιασμό δεν συμβαίνει τόσο συχνά (Stella et al., 2014). Ένα παράδειγμα είναι τα γονίδια *EDN* (eosinophil-derived neurotoxin) και *ECP* (eosinophil cationic protein) του ανθρώπου, τα οποία προήλθαν από διπλασιασμό στη γενεαλογία των Ανθρωπίδων και των πιθήκων του Παλαιού Κόσμου. Και τα δύο γονίδια ανήκουν στην οικογένεια γονιδίων της RNaseA, αλλά το *ECP* ανέπτυξε μετά τον διπλασιασμό μία αντιβακτηριδιακή λειτουργία, πιθανώς λόγω πολλών αντικαταστάσεων σε αμινοξέα αργινίνης. Το *EDN* γονίδιο του ανθρώπου όπως και των πιθήκων του Παλαιού Κόσμου που αντιπροσωπεύει το προγονικό γονίδιο, δεν εμφανίζουν αυτή την λειτουργία. Στις περισσότερες περιπτώσεις βέβαια, αναπτύσσεται μία παρόμοια λειτουργία και όχι μία εξολοκλήρου νέα. Παράδειγμα αποτελούν τα δύο ανθρώπινα γονίδια της οψίνης ευαίσθητα στο κόκκινο και πράσινο αντίστοιχα. Οι δύο οψίνες μετά τον διπλασιασμό απέκτησαν μία διαφορά 30-ημ στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης. Αυτό, προσδίδει μεγαλύτερη ευαισθησία σε μία μεγάλη γκάμα χρωμάτων που έχουν οι άνθρωποι (Zhang, 2003).

#### **1.2.4. Συνέπειες των γονιδιωματικών διπλασιασμών**

Μετά τον γονιδιωματικό διπλασιασμό όλα τα χρωμοσώματα και γονίδια του οργανισμού έχουν διπλασιαστεί και μπορούμε να υποθέσουμε πως τα διπλασιασμένα γονίδια εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό. Η σχετική γονιδιακή έκφραση όμως δεν επηρεάζεται μετά το WGD. Η διατήρηση της γονιδιακής δοσολογίας είναι απαραίτητη για ορισμένα γονίδια και το χάσιμο των δόσο-ευαίσθητων γονιδίων εξαιτίας μεταλλάξεων στο ένα παράλογο, μπορεί να αποβεί καταστροφικό. Η γονιδιακή δοσολογία είναι σημαντική στα ριβοσωμικά γονίδια, στα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με πολλές αλληλεπιδράσεις, καθώς και πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια και δίκτυα. Επιπλέον αποδείξεις για την υπόθεση της διατήρησης της γονιδιακής δοσολογίας προκύπτουν από μελέτες σχετικές με τη διατήρηση των αντιγράφων μετά από μοναδικούς διπλασιασμούς γονιδίων σε σχέση με

διπλασιασμούς ολόκληρου του γονιδιώματος. Όταν διπλασιάζονται μεμονωμένα γονίδια η γονιδιακή δοσολογία επηρεάζεται αυτόματα, επομένως θα περιμέναμε πως τα γονίδια αυτά δεν θα διατηρηθούν (Stella et al., 2014). Πράγματι, τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα φυτά τα γονίδια που εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες ή κωδικοποιούν για μεγαλύτερες πρωτεΐνες που έχουν περισσότερες λειτουργικές επικράτειες και αλληλεπιδρούν με πολλά μόρια, διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό μετά από ένα WGD, αλλά όχι μετά από μεμονωμένους γονιδιακούς διπλασιασμούς (Stella et al., 2014 ; Guo, 2017). Επομένως, η πολυπλοκότητα του γονιδίου ή το προϊόν που κωδικοποιεί είναι καθοριστικά στοιχεία για την διατήρηση του γονιδίου (Guo, 2017).

Όσο αφορά στα πλεονεκτήματα των γεγονότων WGD, οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβάλουν τα διπλασιασμένα γονίδια στην φαινοτυπική εξέλιξη ή διαφοροποίηση των οργανισμών δεν έχουν ακόμα εξακριβωθεί (Guo, 2017). Οι εξελικτικοί βιολόγοι βέβαια υποστηρίζουν πως παρότι ο πολυπλοειδισμός οδηγεί συχνά σε αδιέξοδο, έχει παρατηρηθεί πως οι πολυπλοειδείς οργανισμοί έχουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τους διπλοειδείς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, αρκετοί πολυπλοειδείς οργανισμοί εμφανίζονται πιο ανθεκτικοί στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και άρα έχουν χαμηλότερες πιθανότητες εξαφάνισης. Γενωμικές και επιγενετικές αλλαγές που συμβαίνουν γρήγορα μετά το WGD, επιτρέπουν στους πολυπλοειδείς οργανισμούς να προσαρμοστούν πιο εύκολα. Επιπλέον, το γεγονός ότι έχουν πλεονάζοντα αντίγραφα γονιδίων τους δίνει τη δυνατότητα να καλύψουν λειτουργικά τις αρνητικές επιδράσεις των μεταλλάξεων στο παράλογο γονίδιο. Έχει προταθεί επίσης πως μέσω των γεγονότων γονιδιωματικού διπλασιασμού προωθείται η ειδογένεση, καθώς υπάρχει αμοιβαία απώλεια γονιδίων (reciprocal gene loss), όπου διαφορετικά παράλογα χάνονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς, οδηγώντας τελικά σε γενετική απομόνωση. Έχουν βρεθεί αποδείξεις αμοιβαίας απώλειας γονιδίων σε γενεαλογίες Τελεόστεων. Περίπου το 8% των γενετικών τύπων του *Tetraodon nigroviridis* και του *D. rerio* υποβλήθηκαν σε αμοιβαία γονιδιακή απώλεια (Stella et al., 2014).

Συμπερασματικά, αξίζει να τονιστεί πως τα γεγονότα διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος δεν είναι ούτε απαραίτητα ούτε και καθοριστικά για τη διαφοροποίηση και εξάπλωση των οργανισμών. Γεγονότα WGD έχουν πραγματοποιηθεί στη βάση της γενεαλογίας των σπονδυλωτών και των ανθοφόρων φυτών, αλλά δεν έχουν συμβεί σε πολλές γενεαλογίες που είναι πλούσιες σε είδη όπως τα Κολεόπτερα που αποτελούν την πιο ποικιλόμορφη ομάδα εντόμων με πάνω από 360.000 είδη. Αντιθέτως, γενεαλογίες που δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή ποικιλομορφία όπως οι Σολομονίδες είναι πολυπλοειδείς. Επομένως, για να υπάρξει ένα οριστικό συμπέρασμα που θα συσχετίζει τους WGD με την εξέλιξη ή την εξάπλωση των οργανισμών απαιτείται μία ευρύτερη εικόνα για τους γονιδιωματικούς διπλασιασμούς που έχουν συμβεί σε όλους τους οργανισμούς (Stella et al., 2014).

### 1.3 Οι καλπαΐνες

Οι καλπαΐνες αποτελούν μία ομάδα ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση ασβεστίου και βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ευκαρυώτες, σε μερικά βακτήρια, αλλά όχι σε αρχαιοβακτήρια (Ono et al., 2012). Κόβουν πρωτεΐνες ως απόκριση στην σηματοδότηση του ασβεστίου και επομένως ελέγχουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση (Hanna et al., 2008). Ανακαλύφθηκαν το 1964 από τον Gordon Guroff σε εγκέφαλο αρουραίου και



απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1978 από τον Imahori και τους συναδέλφους του από κοτόπουλο (Sorimachi et al., 2011a). Ανήκουν στην υπεροικογένεια των παπαϊνών, που αποτελείται από τρεις ξεχωριστές οικογένειες, τις καλπαΐνες, τις παπαΐνες και την οικογένεια της μπλεομυκίνης-υδρολάσης (Sorimachi et al., 2010).

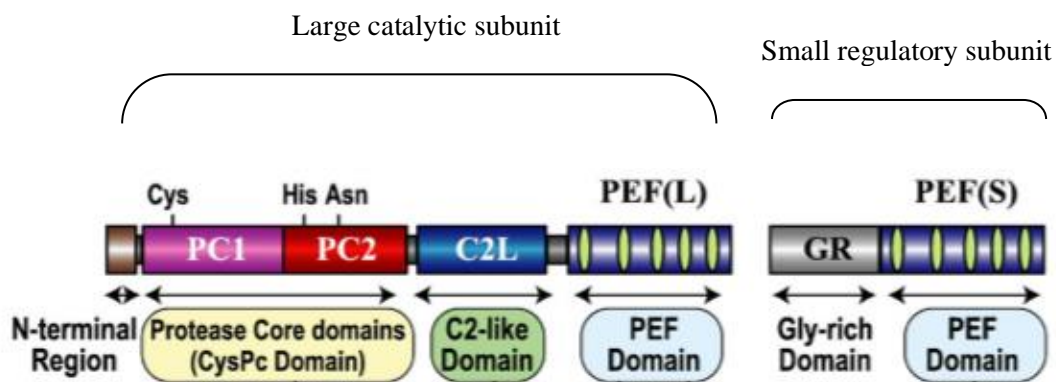
Οι καλπαΐνες ορίστηκαν αρχικά ως κυτοσολικές πρωτεάσες με ασβέστιο-εξαρτώμενη πρωτεολυτική δραστηριότητα σε ουδέτερο pH. Στην πλειοψηφία τους είναι ενδοκυτταρικές και η ενεργότητα τους ρυθμίζεται αυστηρά, όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα ενδοκυτταρικά πρωτεολυτικά συστήματα, δηλαδή το σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος, το σύστημα αυτοφαγίας-λυσosώματος και τις κασπάσες (Sorimachi et al., 2011 a). Οι καλπαΐνες διαφέρουν από τα υπόλοιπα ενδοκυτταρικά πρωτεολυτικά συστήματα σε δύο σημεία. Αρχικά, η δράση που έχει η καλπαΐνη στο υπόστρωμα της αναφέρεται ως πρωτεολυτική επεξεργασία (proteolytic processing) και το προϊόν, ενώ είναι διαφορετικό από το αρχικό υπόστρωμα, δεν είναι αποδομημένο (Ono et al., 2012). Δηλαδή, η καλπαΐνη δρα πρωτεολύοντας συγκεκριμένες θέσεις στο υπόστρωμα της αλλάζοντας ή ρυθμίζοντας έτσι τη δομή και τη λειτουργία του, γι' αυτό αναφέρονται και ως ενδοκυτταρικές 'ρυθμιστικές' πρωτεάσες (intracellular 'modulator' protease) (Sorimachi et al., 2011 a). Αντιθέτως, μέσω του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας το πρωτεϊνικό υπόστρωμα αποδομείται (Ono et al., 2012). Επιπλέον, η ίδια η καλπαΐνη συμμετέχει στην αναγνώριση του υποστρώματος της, ενώ το πρωτεάσωμα και οι λυσοσωματικές πρωτεάσες που συμμετέχουν στην αυτοφαγία, βασίζονται σε άλλα συστήματα, όπως η ουβικουΐτινωση και ο σχηματισμός αυτοφαγωσώματων (autophagosome formation), που θα στοχεύσουν τα υποστρώματα τους (Sorimachi & Ono, 2012). Το σύστημα των κασπασών αναγνωρίζει τα υποστρώματά του μέσω μικρών αμινοξικών αλληλουχιών (Ono et al., 2012). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός υποστρωμάτων που έχουν αναφερθεί για τις καλπαΐνες, αλλά λίγα από αυτά αποτελούν και τα *in vivo* υποστρώματά τους. Οι πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφατάσες, φωσφολιπάσες, κυταρροσκελετικές πρωτεΐνες, μεμβρανικές πρωτεΐνες, κυτοκίνες, μεταγραφικοί παράγοντες, οι πρωτεΐνες lens καθώς και πρωτεΐνες που δένονται με καλμοδουλίνη είναι μερικές από τις πρωτεΐνες που έχουν προταθεί ως τα *in vivo* υποστρώματά τους (Sorimachi et al., 2010).

### 1.3.1 Δομή συμβατικών καλπαϊνών

Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στην μ- και m-καλπαΐνη των θηλαστικών. Ονομάζονται καλπαΐνη I ή μ-καλπαΐνη και καλπαΐνη II ή m-καλπαΐνη. Και οι δύο αυτές καλπαΐνες εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, αλλά διαφέρουν σημαντικά στην *in vitro* απαίτησή τους σε Ca<sup>2+</sup> για την πρωτεολυτική τους δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, η μ-καλπαΐνη απαιτεί 5-50 μM ασβεστίου για την ενεργοποίησή της, ενώ η m-καλπαΐνη απαιτεί 0,2-1,0 mM ασβεστίου (Khorchid et al., 2002). Επομένως οι δύο αυτές καλπαΐνες αποτελούν τον πυρήνα της οικογένειας και πάνω σε αυτές έχει βασιστεί και η δομή των καλπαϊνών. Συγκεκριμένα, οι μ- και m-καλπαΐνες, είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από μία μικρή ρυθμιστική υπομονάδα 30 kDa (CAPNS1) και μία μεγάλη διακριτή καταλυτική υπομονάδα 80 kDa (CAPN1/mCL ή CAPN2/mCL). Ο συμβολισμός CAPN1/2 αναφέρεται στην μεγάλη καταλυτική υπομονάδα του ενζύμου, ενώ αντίθετα ο συμβολισμός καλπαΐνη-I (ή μ-καλπαΐνη) και καλπαΐνη-II (ή m-καλπαΐνη), προσδιορίζει το ολόενζυμο (Sorimachi et al., 2011 a). Οι μεγάλες υπομονάδες των δύο καλπαϊνών εμφανίζουν περίπου 60 % ομολογία σε αμινοξέα και σχεδόν δυσδιάκριτη ευαισθησία σε υποστρώματα και αναστολείς (Sorimachi et al., 2011b).

Όσο αναφορά την καταλυτική υπομονάδα, μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω σε τέσσερις επικράτειες (Domains I-IV). Η επικράτεια I αποτελείται από μία N-τελική anchor α-έλικα. Η επικράτεια II ή αλλιώς επικράτεια πρωτεάσης CysPc, χωρίζεται σε δύο επιμέρους επικράτειες την IIa ή PC1 και IIb ή PC2, μεταξύ των οποίων βρίσκεται η σχισμή στην οποία δένεται το υπόστρωμα. Οι PC1 και PC2 περιοχές της CysPc υπομονάδας περιέχουν από μία θέση πρόσδεσης του ασβεστίου την CBS-1 και CBS-2, αντίστοιχα. Στην επικράτεια πρωτεάσης περιέχεται και η καταλυτική τριάδα αμινοξέων, συγκεκριμένα η Cys-105 στην IIa και τα αμινοξέα His-262 και Asn-286 στην IIb (Suzuki et al., 2004). Η επικράτεια CysPc είναι αρκετά συντηρημένη στα μέλη της οικογένειας των καλπαϊνών, υποδεικνύοντας την σημαντικότητα της. Η επικράτεια III αποτελείται από οκτώ αντιπαράλληλα β-ελάσματα και σχηματίζει μία δομή β-sandwich. Αυτή η C2-like ή C2L υπομονάδα προσδένει επίσης ασβέστιο. Τέλος, η IV υπομονάδα αποτελείται από πέντε μοτίβα EF-hands. Για αυτό τον λόγο αναφέρεται και ως penta EF-hand domain (PEF) (Sorimachi et al., 2010; 2011a).

Όσο αναφορά την μικρή ρυθμιστική υπομονάδα, αυτή χωρίζεται σε δύο επιμέρους τμήματα (Domains V-VI). Η επικράτεια V απαρτίζεται από υδρόφοβα συμπλέγματα καταλοίπων γλυκίνης (Sorimachi et al., 2010). Η VI επικράτεια αποτελείται από 5 EF-hands (PEF motif) και έχει 3D δομή όμοια με την επικράτεια IV της καταλυτικής υπομονάδας. Το 5<sup>ο</sup>EF-hand κάθε PEF μοτίβου δεν έχει την ικανότητα πρόσδεσης ασβεστίου, αλλά συμμετέχει στον διμερισμό της καταλυτικής με τη ρυθμιστική υπομονάδα (Suzuki et al., 2004). Στην Εικόνα 3 απεικονίζονται οι δύο υπομονάδες της καλπαΐνης με τις διαφορετικές επικράτειες. Αξίζει να αναφερθεί πως μέσω πειραμάτων παρατηρήθηκε πως όταν η καταλυτική υπομονάδα της καλπαΐνης αναδιπλώνεται σωστά, έχει την ικανότητα να αποκτήσει την μέγιστη πρωτεολυτική της δραστηριότητα. Επίσης, το μεγαλύτερο κομμάτι της επικράτειας V της ρυθμιστικής υπομονάδας αυτολύεται κατά την ενεργοποίηση, άρα δεν παρουσιάζει ενεργότητα πρωτεάσης (Sorimachi et al., 2010). Επομένως, η μικρή ρυθμιστική υπομονάδα, δεν είναι απαραίτητη για την ενεργότητα πρωτεάσης, αλλά λειτουργεί ως chaperone-like μόριο βοηθώντας τις καλπαΐνες να πάρουν τη σωστή διαμόρφωση που απαιτείται για την ενεργοποίησή τους (Suzuki et al., 2004). Χωρίς αυτή, η *in vitro* ενεργοποίηση της CAPN2 είναι πολύ αργή. Τέλος, βρέθηκε πως σε *Capns1<sup>-/-</sup>* μεταλλάγματα ποντικών, η CAPN1 και CAPN2 είναι σχεδόν πλήρως υποεκφρασμένες και προκαλείται εμβρυονική θνησιμότητα (Sorimachi & Ono, 2012).



Εικόνα 3. Δομή των συμβατικών καλπαϊνών. (Ono & Sorimachi, 2012)

Οι μ- και m-καλπαΐνες των θηλαστικών, καθώς και η μ/η καλπαΐνη στα πτηνά είναι οι πιο καλά μελετημένες και αναφέρονται ως συμβατικές. Τα ομόλογα της καλπαΐνης ορίζονται με βάση τα χαρακτηριστικά της πρωτοταγούς δομής της επικράτειας πρωτεάσης (CysPc). Δηλαδή, για να θεωρηθεί πως μία πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των καλπαϊνών θα πρέπει να εμφανίζει αμινοξική ομοιότητα με την CysPc περιοχή της CAPN1 και CAPN2. Αυτό το κριτήριο έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση πολλών ομόλογων καλπαΐνης σε διάφορους οργανισμούς. Τα μέλη της υπεροικογένειας της καλπαΐνης ταξινομούνται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες με βάση τα επίπεδα έκφρασής τους ή τη δομή των επικρατειών τους. Πιο αναλυτικά, η δομή των καταλυτικών υπομονάδων των συμβατικών καλπαϊνών στα θηλαστικά αναφέρεται ως 'κλασική'. Η κλασική δομή περιλαμβάνει την CysPc επικράτεια, την C2L, καθώς και τα μοτίβα PEF. Αντιστοίχως, στις μη κλασικές καλπαΐνες απουσιάζουν οι C2L περιοχή ή/και τα μοτίβα PEF (Ono et al., 2012).

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί για δεκαπέντε γονίδια καλπαϊνών, εκ των οποίων τα εννέα ανήκουν στις κλασικές καλπαΐνες που είναι οι CAPN1, CAPN2, CAPN3, CAPN8, CAPN9, CAPN11, CAPN12, CAPN13, CAPN14. Οι περισσότερες κλασικές καλπαΐνες είναι συντηρημένες στα σπονδυλωτά και στα ψάρια εμφανίζονται διπλασιασμένες. Αντιθέτως, μικρός αριθμός οργανισμών που ανήκουν στα ασπόνδυλα έχουν γονίδια που κωδικοποιούν για κλασικές καλπαΐνες. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως η αμινοξική ομοιότητα δεν αντιπροσωπεύει και δομική ή βιοχημική ομοιότητα. Παραδειγματος χάριν, από τις ανθρώπινες κλασικές καλπαΐνες μόνο η CAPN1 και CAPN2 σχηματίζουν ετεροδιμερή με την CAPNS1 *in vivo*. Παρομοίως, τα ορθόλογα γονίδια των καλπαϊνών δεν εμφανίζουν απαραίτητα την ίδια λειτουργία. Στα πτηνά, η CAPN11 σχηματίζει ετεροδιμερές με την CAPNS1 για να σχηματίσει την συμβατική μ/η-καλπαΐνη (CAPN11/S1), που έχει καθολική έκφραση, ενώ η έκφραση των CAPN1 και CAPN2 είναι είτε χαμηλή, είτε περιορίζεται σε συγκεκριμένους ιστούς. Αντιθέτως, στα ευθήρια θηλαστικά στα οποία περιλαμβάνεται και ο άνθρωπος, η CAPN11 εκφράζεται μόνο στους όρχεις και δεν υπάρχουν ενδείξεις για σχηματισμό ετεροδιμερούς με τη ρυθμιστική υπομονάδα (Ono et al., 2012).

Όσο αναφορά το προφίλ έκφρασης οι καλπαΐνες μπορεί να εκφράζονται καθολικά ή σε συγκεκριμένους ιστούς. Από τα 15 γονίδια στα θηλαστικά, τα έξι παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση. Οι υπόλοιπες καλπαΐνες συμπεριλαμβανομένων και των συμβατικών CAPN1 και CAPN2 έχουν καθολική έκφραση. Οι καλπαΐνες που εκφράζονται καθολικά έχουν σημαντικό ρόλο σε όλα τα κύτταρα, ενώ οι ιστοειδικές συμμετέχουν σε πιο συγκεκριμένες κυτταρικές διαδικασίες. Οι καλπαΐνες που εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς είναι η CAPN3 στον σκελετικό μυ, η CAPN6 στον πλακούντα και στο ραβδωτό εμβρυικό μυ, η CAPN8 και 9 στον γαστρεντερικό σωλήνα, η CAPN11 στους όρχεις και η CAPN12 στους θύλακες των τριχών (Ono et al., 2012).

### 1.3.2 Ενεργοποίηση των συμβατικών καλπαϊνών

Γνωρίζουμε πως για την ενεργοποίηση των καλπαϊνών *in vitro* απαιτούνται τουλάχιστον  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , που σπανίως υπάρχουν *in vivo*. Η πλασματική μεμβράνη έχει προταθεί ως η περιοχή που γίνεται η ενεργοποίηση της καλπαΐνης και συμμετέχουν και τα φωσφολιπίδια, ένα σημαντικό συστατικό της μεμβράνης, που βοηθά στη μείωση των απαιτήσεων της καλπαΐνης σε ασβέστιο (Ono et al., 2012). Πειράματα *in vitro* στην μ-καλπαΐνη έδειξαν πως τα φωσφατιδυλοϊνοσιτίδια, αλλά όχι άλλοι τύποι λιπιδίων, μειώνουν την συγκέντρωση του ασβεστίου που απαιτείται για

την αυτόλυση και άρα ενεργοποίηση της καλπαΐνης και αυξάνουν και την Vmax ταχύτητα της κατάλυσης του υποστρώματος από την καλπαΐνη (Saido et al., 1992). Επίσης, άλλες δομικές μελέτες που αποσαφήνισαν την δομή της m-καλπαΐνης έδειξαν πως η C2L επικράτεια της καλπαΐνης μπορεί να προσδένει φωσφολιπίδια με ασβέστιο-εξαρτώμενο τρόπο. Είναι γνωστό πως η C2L επικράτεια της καλπαΐνης μοιάζει δομικά με επικράτειες C2 άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να προσδέσουν ασβέστιο και φωσφολιπίδια, χάριν της ύπαρξης βρόχων που αποτελούνται από όξινα αμινοξέα. Και η C2L επικράτεια της καλπαΐνης περιέχει ένα βρόχο με όξινα αμινοξέα (Tompa et al., 2001). Επομένως, το ανενεργό ολοένζυμο της καλπαΐνης βρίσκεται στο κυτοσόλιο και μεταναστεύει στην πλασματική μεμβράνη ως απόκριση στην ενδοκυτταρική αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου. Στην πλασματική μεμβράνη, η καλπαΐνη ενεργοποιείται λόγω της παρουσίας Ca<sup>2+</sup> και φωσφολιπιδίων (Suzuki et al., 2004).

Όταν το ασβέστιο απουσιάζει, οι PC1 και PC2 υπομονάδες είναι διαχωρισμένες λόγω δομικών περιορισμών, οι οποίοι πρέπει να απομακρυνθούν για να έρθει η καταλυτική τριάδα αμινοξέων στη σωστή διαμόρφωση και να ενεργοποιηθεί η καλπαΐνη (Suzuki et al., 2004). Συγκεκριμένα, η N-τελική α-έλικα της βρίσκεται προσδεμένη στο 2<sup>ο</sup>EF-hand της επικράτειας VI και η PC2 υπομονάδα αλληλεπιδρά με την επικράτεια C2L και έτσι διατηρείται η καλπαΐνη στην κυκλική της ανενεργή διαμόρφωση (Khorchid et al., 2002). Προκειμένου να ενεργοποιηθεί η καλπαΐνη είναι απαραίτητο να προηγηθεί η πρόσδεση του ασβεστίου, το οποίο δεν συμμετέχει άμεσα στην κατάλυση, αλλά προκαλεί την αναδιαμόρφωση της καλπαΐνης που θα επιτρέψει στην καταλυτική τριάδα αμινοξέων να ευθυγραμμιστεί σωστά (Moldoveanu et al., 2004).

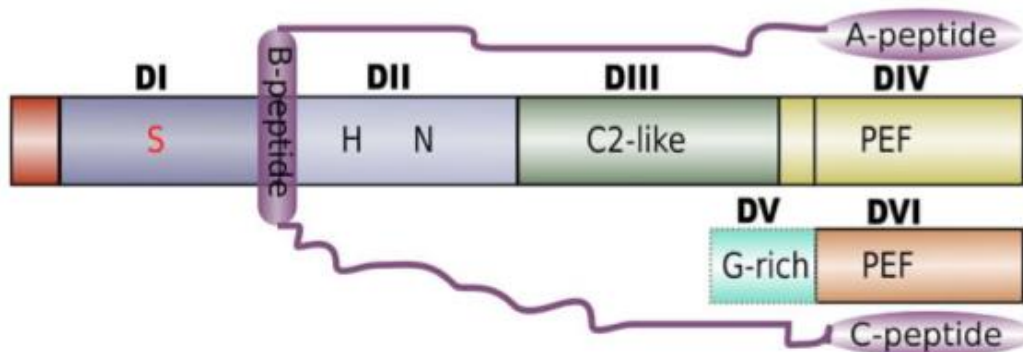
Έτσι, ο *in vitro* μηχανισμός που έχει προταθεί για την ενεργοποίηση των συμβατικών καλπαϊνών αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται η άρση των δομικών περιορισμών λόγω της κυκλικής διαμόρφωσης του μορίου. Η πρόσδεση του ασβεστίου στην C2L επικράτεια και στα EF-hand μοτίβα, απομακρύνει την επικράτεια I από την VI και την επικράτεια II από την III και οδηγεί στην απομάκρυνση της μεγάλης καταλυτικής από την μικρή ρυθμιστική υπομονάδα (Suzuki et al., 2004). Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται και η υδρόλυση της N-τελικής α-έλικας που χαμηλώνει την απαίτηση της καλπαΐνης σε ασβέστιο για να λειτουργήσει (Sorimachi et al., 2011b; Moldoveanu et al., 2002). Το δεύτερο στάδιο αποτελεί την αναδιαμόρφωση της σχισμής του ενεργού κέντρου (active site cleft), που προκαλείται από την πρόσδεση δύο ατόμων Ca<sup>2+</sup> στις CBD-1 και CBD-2 στην επικράτεια πρωτεάσης της καλπαΐνης (Suzuki et al., 2004; Moldoveanu et al., 2002). Το αποτέλεσμα είναι οι PC1 και PC2 περιοχές να έρθουν πιο κοντά, χωρίς να μεταβληθούν οι δευτεροταγείς τους δομές, και να ενεργοποιηθεί έτσι η περιοχή πρωτεάσης (Ono et al., 2012). Η ενεργοποιημένη πλέον καταλυτική υπομονάδα μπορεί να υδρολύσει τα υποστρώματά της (Suzuki et al., 2004).

Το ασβέστιο όπως μπορεί να διαπιστωθεί κατέχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της καλπαΐνης. Όταν προσδέεται στην καλπαΐνη προκαλούνται τα εξής: η μετακίνηση της καλπαΐνης στην πλασματική μεμβράνη, αυτόλυση στην καταλυτική και στη ρυθμιστική υπομονάδα της καλπαΐνης και αποχωρισμός των δύο αυτών υπομονάδων. Η πολυπλοκότητα αυτού του μηχανισμού καθώς και ότι οι καλπαΐνες ενεργοποιούνται σε δύο στάδια αποτελεί επιπλέον έλεγχο στη δράση τους. Ένας τέτοιος πιο αυστηρός έλεγχος είναι απαραίτητος, καθώς οι καλπαΐνες εκφράζονται καθολικά και βρίσκονται στο κυτοσόλιο, όπου έρχονται σε επαφή με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών και μπορούν να μεταβάλουν την δομή και την δραστηριότητά τους (Khorchid et al., 2002 ; Sorimachi et al., 2011b).

### 1.3.3 Αναστολή του συστήματος των καλπαϊνών

Η καλπαστατίνη, είναι ο μοναδικός γνωστός ειδικός ενδογενής αναστολέας των συμβατικών καλπαϊνών. Έχει παρατηρηθεί πως η καλπαστατίνη μπορεί να αναστείλει *in vitro* και την CAPN8 και CAPN9, που ανήκουν στις μη συμβατικές καλπαΐνες (Ono et al., 2012). Κάθε μόριο καλπαστατίνης αποτελείται από τέσσερις επαναλαμβανόμενες ανασταλτικές επικράτειες, μήκους 140 αμινοξέων περίπου (domains I-IV), καθώς και από μία N-τελική επικράτεια που ονομάστηκε επικράτεια L, η οποία δεν εμφανίζει ιδιότητα αναστολής. Η κάθε ανασταλτική μονάδα είναι ικανή να αναστείλει ένα μόριο καλπαΐνης (Wendt et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί πως οι καλπαστατίνες δεν έχουν καλά συντηρημένες πρωτοταγείς δομές ανάμεσα στα είδη, παρά την υψηλή εξειδίκευσή τους ως προς την αναστολή συγκεκριμένων καλπαϊνών (Ono et al., 2012). Στο εσωτερικό κάθε ανασταλτικής επικράτειας ταυτοποιήθηκε επίσης και η ύπαρξη τριών υπομονάδων (A,B,C). Οι υπομονάδες A και C προσδέονται στις επικράτειες IV και VI της καλπαΐνης αντιστοίχως, μέσω α-ελίκων. Η υπομονάδα B δένεται στις δύο πλευρές του ενεργού κέντρου του ενζύμου και το αναστέλλει. Πιο συγκεκριμένα στην N-τελική πλευρά, η καλπαστατίνη σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την επικράτεια III της καλπαΐνης, ενώ στην C-τελική πλευρά σχηματίζει μία α-έλικα που προσδέεται στην επικράτεια I. Επομένως, η υπομονάδα B είναι υπεύθυνη για την αναστολή της καλπαΐνης, ενώ οι υπομονάδες A και C αυξάνουν την συνολική συγγένεια της αλληλεπίδρασης (Hanna et al., 2008). Μία σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της καλπαστατίνης με την καλπαΐνη φαίνεται στην Εικόνα 4.

Προκειμένου η καλπαστατίνη να προσδεθεί στις καλπαΐνες είναι απαραίτητη η παρουσία ασβεστίου και η πρόσδεση μπορεί να αναστραφεί. Μέσω πειραμάτων το 1987 και 1989 καταδείχθηκε πως η συγκέντρωση ασβεστίου που απαιτείται για την πρόσδεση της καλπαστατίνης στις συμβατικές καλπαΐνες, είναι χαμηλότερη από την συγκέντρωση που απαιτείται ώστε να αποκτήσουν οι καλπαΐνες τη μισή από την ολική τους πρωτεολυτική δραστηριότητα. Αυτό υποδηλώνει πως όταν η καλπαΐνη βρίσκεται μαζί με την καλπαστατίνη στο κύτταρο, η αύξηση στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου θα οδηγούσε στην πρόσδεση της καλπαστατίνης με την καλπαΐνη προτού η δεύτερη αποκτήσει την πρωτεολυτική της δραστηριότητα (Wendt et al., 2004). Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό προκειμένου η καλπαΐνη να αποκτήσει την ικανότητα πρωτεόλυσης, μόνο υπό την προϋπόθεση ότι μπορεί ανά πάσα στιγμή να απενεργοποιηθεί από την καλπαστατίνη. Η 3D δομή της CAPN2 συν-κρυσταλλωμένης με μία από τις ανασταλτικές υπομονάδες της καλπαστατίνης και με ασβέστιο, αποκάλυψε ότι η δομή της καλπαστατίνης που έχει χαρακτηριστεί ως 'εγγενώς μη δομημένη' (intrinsically unstructured), επιτρέπει αφενός την ισχυρή πρόσδεση της στην καλπαΐνη και αφετέρου δίνει τη δυνατότητα σε παρακείμενα κατάλοιπα αμινοξέων να απομακρυνθούν από το ενεργό κέντρο της καλπαΐνης και άρα να προστατευτούν από την πρωτεολυτική της δραστηριότητα (Ono et al., 2012).

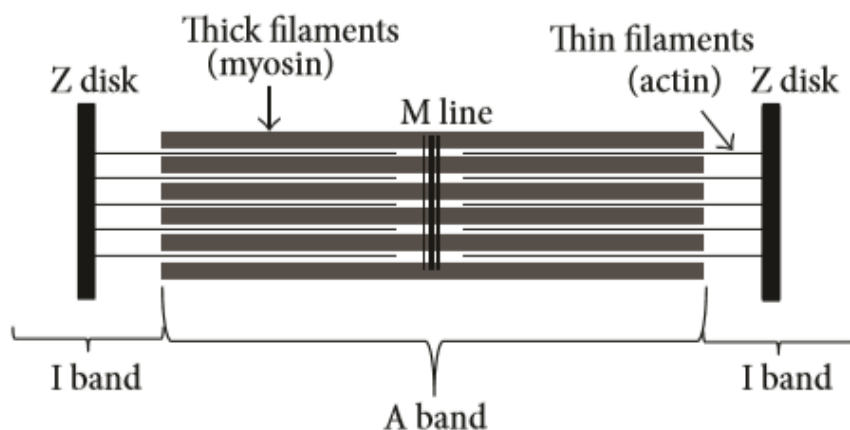


Εικόνα 4 : Η αλληλεπίδραση της καλπαστατίνης με την καλπαΐνη (Hanna et al.,2008)

### 1.3.4 Ρόλος των καλπαϊνών στους μύς

Η υφή θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που υποδηλώνει την ποιότητα του κρέατος σε ψάρια και θηλαστικά. Καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την προτίμηση από τους καταναλωτές, επομένως και την αγοραστική δυναμικότητα του προϊόντος. Η σφριγηλότητα του φιλέτου του ψαριού αποτελεί το επιθυμητό χαρακτηριστικό για κατανάλωση, σε σχέση με την τρυφερότητα που προτιμάται στο κρέας των θηλαστικών (Chéret et al., 2007).

Στα ψάρια, το φιλέτο που είναι το βρώσιμο μέρος του ψαριού είναι οργανωμένο σε δεσμίδες μυομεριδίων που έχουν διάταξη W. Σε κάθε μυομερίδιο οι μυϊκές ίνες είναι συγκεντρωμένες μαζί, με παράλληλη διάταξη προς τη σπονδυλική στήλη και είναι τριών ειδών. Λευκές που τοποθετούνται στα βαθύτερα στρώματα, κόκκινες που βρίσκονται επιφανειακά και ροζ που είναι διάσπαρτες στο ενδιάμεσο. Η πλασματική μεμβράνη των μυϊκών ινών ονομάζεται σαρκείλημα. Κάθε μυϊκή ίνα απαρτίζεται από ένα μεγάλο αριθμό μυοϊνιδίων (myofibrils) που έχουν διάμετρο περίπου 1μm και αποτελούνται από δύο τύπους κυτταροσκελετικών μικροϊνιδίων τα παχέα και τα λεπτά νημάτια (myofilaments). Τα παχέα νημάτια αποτελούνται από συμπλέγματα μορίων μυσίνης, ενώ τα λεπτά νημάτια αποτελούνται κυρίως από ακτίνη, αλλά και τις πρωτεΐνες τροπομυσίνη και τροπονίνη (Listrat et al.,2016 ; Delbarre-Ladrat et al., 2006) . Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κάθε μυϊκό νημάτιο εμφανίζει εναλλασσόμενες σκούρες και ανοιχτές ζώνες που ονομάζονται Ζώνες A και I αντίστοιχα. Κάθε Ζώνη I χωρίζεται σε δύο μέρη από τη γραμμή Z. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα που ορίζεται μεταξύ δύο γραμμών Z ονομάζεται σαρκομερές και αποτελεί την λειτουργική μονάδα των σκελετικών μυών (Listrat et al.,2016). Το σαρκομερές φαίνεται και στην Εικόνα 5.



**Εικόνα 5.** Σχηματική απεικόνιση του σαρκομερούς (Listrat et al., 2016).

Τα νημάτια ακτίνης με τα νημάτια μυοσίνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας εγκάρσιες γέφυρες. Κατά τη συστολή του μυ, τα λεπτά νημάτια ολισθαίνουν πάνω στα σταθερά παχέα νημάτια προς το κέντρο των ζωνών A, έλκοντας παράλληλα και τις γραμμές Z στις οποίες είναι προσκολλημένα. Έτσι, μειώνεται το μήκος του σαρκομεριδίου. Η δύναμη για την διολίσθηση των νημάτων και κατ' επέκταση την συστολή του μυ παρέχεται από την υδρόλυση του ATP. Συγκεκριμένα, η μυοσίνη έχει δραστηριότητα ATPάσης και υδρολύει το ATP σε ADP και P<sub>i</sub> και η ενέργεια που απελευθερώνεται αποθηκεύεται στην εγκάρσια γέφυρα (Listrat et al., 2016 ; Delbarre-Ladrat et al., 2006).

Μετά την εξαλίευση των ψαριών, μέσα σε λίγα λεπτά αρχίζουν να συμβαίνουν βιοχημικές αλλαγές στους μυς. Η κυκλοφορία του αίματος σταματά, επομένως η συγκέντρωση του οξυγόνου πέφτει δραματικά και οι μύες λειτουργούν κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Επίσης, μειώνεται απότομα και η φωσφορική κρεατίνη, το γλυκογόνο και το ATP, ενώ αυξάνεται το γαλακτικό οξύ ( Delbarre-Ladrat et al., 2006). Εξαιτίας της συσσώρευσης γαλακτικού οξέος το pH μειώνεται από 7,4 σε 6,0 ή χαμηλότερα. Αντίθετα η οσμωτική πίεση αυξάνεται και οι συνθήκες αυτές διαταράσσουν τις μεμβράνες του σαρκοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων και των λυσοσωμάτων, προκαλώντας την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο (Ahmed et al., 2016 ; Delbarre-Ladrat et al., 2006). Η σημαντικότερη αλλαγή στον μυ είναι η έναρξη της νεκρικής ακαμψίας μέσα σε μία με έξι ώρες μετά το θάνατο του ψαριού (Delbarre-Ladrat et al., 2006). Η διαδικασία της νεκρικής ακαμψίας χωρίζεται σε τρία στάδια πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την ολοκλήρωσή της. Στην πρώτη φάση, ο μυ παραμένει κινητικός για μερικές ώρες και χρησιμοποιεί την φωσφορική κρεατίνη και τα αποθέματα γλυκογόνου για να εκπληρώσει τις ανάγκες σε ATP. Η μείωση των επιπέδων του ATP, σε ενδοκυτταρικά επίπεδα κάτω των 2μM, σηματοδοτεί την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας. Μεταξύ της ακτίνης και της μυοσίνης σχηματίζονται μόνιμοι δεσμοί που οδηγούν στην απώλεια της ικανότητας του μυ να συστέλλεται και να διαστέλλεται και άρα προκαλείται μυϊκή ακαμψία.

Μερικές ώρες μετά τον θάνατο ξεκινά μία αντίστροφη διαδικασία το μαλάκωμα του μυ, το οποίο συνεχίζεται κατά την αποθήκευση του ψαριού. Η αλλοίωση του κρέατος του ψαριού

οφείλεται σε βιοχημικές, δομικές και μικροβιακές διαδικασίες. Βέβαια, οι πρώτες αλλαγές που παρατηρούνται στους μυς συμβαίνουν λόγω της δράσης ενδογενών ενζύμων που πρωτεολύουν μυϊκές πρωτεΐνες, συνδετικό ιστό και λιπαρά οξέα (Delbarre-Ladtrat et al., 2006). Οι κύριες πρωτεάσες που συμμετέχουν στην πρωτεόλυση είναι οι καλπαΐνες και καθεψίνες (Ahmed et al., 2016). Οι περισσότερες έρευνες δείχνουν ότι υπάρχει συνεργιστική δράση και των δύο αυτών συστημάτων (Chéret et al., 2007; Delbarre-Ladtrat et al., 2006). Οι καθεψίνες είναι όξινες λυσοσωματικές πρωτεάσες. Διαφέρουν μεταξύ τους λόγω των διαφορετικών ενεργών κέντρων (πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης και ασπαρτικού), της ευαισθησίας σε αναστολείς και τα διαφορετικά υποστρώματα που πρωτεολύουν. Τα λυσοσώματα περιέχουν τουλάχιστον 13 καθεψίνες εκ των οποίων οι B, D, H και L κατέχουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση του μυ *post mortem* (Ahmed et al., 2016).

Το μαλάκωμα του μυ του ψαριού αποδίδεται κυρίως στην αποδυνάμωση της γραμμής Z και στην αποσύνθεση της τιτίνης και της δεσμίνης, οδηγώντας στην αποσταθεροποίηση των μυοϊνιδίων κατά την αποθήκευση (Daskalova, 2019). Μετά το θάνατο του ψαριού το pH μειώνεται, επομένως ενισχύεται η διαρροή των καθεψινών στο κυτοσόλιο (Ahmed et al., 2016). Επίσης, η συγκέντρωση του ασβεστίου αυξάνεται και φτάνει περίπου 300  $\mu\text{M}$  *post mortem*, επομένως η δράση των καλπαϊνών ευνοείται. Γενικώς έχει παρατηρηθεί πως η δράση των καλπαϊνών πραγματοποιείται κυρίως κατά τις πρώτες ημέρες, όπου η τιμή του pH δεν έχει μειωθεί ακόμα σε μεγάλο βαθμό, ενώ οι καθεψίνες ενεργοποιούνται κατά την αποθήκευση των ψαριών όταν το pH του μυ φτάνει τα κατώτερα επίπεδα. (Ahmed et al., 2016).

Μέσω *in vitro* μελετών αποδείχθηκε η ευαισθησία πολλών πρωτεϊνών των μυοϊνιδίων σε πρωτεάσες. Οι καλπαΐνες συμβάλουν κυρίως στην αποσύνθεση της γραμμής Z λόγω της πρωτεόλυσης της τιτίνης. Η τιτίνη βοηθά στη σταθεροποίηση της θέσης των παχέων νηματίων σε σχέση με τα λεπτά νημάτια (Delbarre-Ladtrat et al., 2006). Αυτό οδηγεί σε αποδυνάμωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ τιτίνης και  $\alpha$ -ακτινίνης και απελευθέρωση της  $\alpha$ -ακτινίνης από τις γραμμές Z (Singh et al., 2018 ; Ahmed et al., 2016). Η  $\alpha$ -ακτινίνη βοηθά στην αγκυροβόληση των νηματίων της ακτίνης πάνω στη γραμμή Z (Ahmed et al., 2016). Επομένως, οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην αποσταθεροποίηση της δομής του σαρκομερούς. Οι καλπαΐνες, καθώς και η καθεψίνη B μπορούν και αποικοδομούν την δεσμίνη, μία πρωτεΐνη των ενδιάμεσων νηματίων που βοηθούν στην σύνδεση των μυοϊνιδίων πάνω στη γραμμή Z. Όσο αναφορά τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες την τροπονίνη και την τροπομυοσίνη που σχετίζονται με τα λεπτά νημάτια της ακτίνης, εμφανίζουν κυρίως ευαισθησία στις καθεψίνες. Συγκεκριμένα η καθεψίνη B, D και L δρουν στην τροπομυοσίνη (Ahmed et al., 2016; Delbarre-Ladtrat et al., 2006), ενώ η τροπονίνη επηρεάζεται κυρίως από τις καθεψίνες D και L (Delbarre-Ladtrat et al., 2006). Τέλος, όσο αναφορά τις δύο βασικές πρωτεΐνες των μυοϊνιδίων την ακτίνη και την μυοσίνη, έχει βρεθεί πως οι καλπαΐνες δεν τις επηρεάζουν, ενώ οι καθεψίνες αποικοδομούν την βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (Delbarre-Ladtrat et al., 2006).



## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της καλπαΐνης 2 στο λαβράκι. Η γενεαλογία των Τελεόστεων στους οποίους ανήκει και το λαβράκι, έχει υποστεί συνολικά τρεις διπλασιασμούς ολόκληρου του γονιδιώματος κατά την εξέλιξη. Επομένως, το γονίδιο της *Carpi2* μπορεί να υπάρχει πλέον σε δύο αντίγραφα. Μέσω της συγκριτικής ανάλυσης, αλλά και της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου που πραγματοποιήθηκε, μελετήθηκε η προέλευση των διπλασιασμένων *Carpi2* γονιδίων και τα πρότυπα έκφρασης τους σε διαφορετικούς ιστούς στο λαβράκι.

Το είδος του λαβρακιού επιλέχθηκε σαν οργανισμός μελέτης στην παρούσα εργασία, διότι αποτελεί ένα από τα κυριότερα εκτρεφόμενα ψάρια στην περιοχή της Μεσογείου με μεγάλη εμπορική ζήτηση. Επιπλέον, το γονίδιο της καλπαΐνης 2 επιλέχθηκε καθώς συμμετέχει στην αποικοδόμηση του μυ μετά την αλίευση του ψαριού. Έτσι, σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη διαμόρφωση της υφής του φιλέτου και κατ' επέκταση την ποιότητα του. Επομένως, μία πιθανή γνώση της εξελικτικής πορείας που ακολούθησε το γονίδιο, αλλά και των προτύπων έκφρασης των παράλογων του γονιδίου θα μπορούσε να συμβάλει στην προσπάθεια βελτίωσης του φιλέτου που διατίθεται προς κατανάλωση.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Συγκριτικές Μέθοδοι

Η συγκριτική ανάλυση είναι ένα απαραίτητο εργαλείο στη βιολογία. Λόγω της συντήρησης που υπάρχει ανάμεσα στα είδη, είναι δυνατή η πρόβλεψη της γονιδιακής λειτουργίας, των ρυθμιστικών στοιχείων και των λειτουργικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια μελετάται σε μεγάλο βαθμό η γονιδιακή έκφραση και οι διαφορές που παρουσιάζονται στην έκφραση των ίδιων γονιδίων ανάμεσα σε διαφορετικά είδη. Δίνεται ιδιαίτερη σημασία στα φαινόμενα γονιδιωματικών διπλασιασμών, που οδηγούν σε διπλασιασμένα γονίδια των οποίων η μοίρα μπορεί να διαφέρει. Δηλαδή, είναι δυνατόν να διατηρούνται, να χάνονται ή να αποκτούν διαφορετικές λειτουργίες, τόσο μέσα στο ίδιο είδος, όσο και σε διαφορετικούς οργανισμούς (Tirosh et al., 2007).

##### 3.1.1 Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων

Για την πραγματοποίηση της συγκριτικής ανάλυσης επιλέχθηκαν κάποιοι οργανισμοί με βάση την εξέλιξη των γονιδιωμάτων τους, αλλά και τη συγγένεια τους με το γονιδίωμα του *D.labrax*. Συγκεκριμένα, τα είδη που ανήκουν στους Τελεόστεους και μελετήθηκαν είναι τα εξής: *Oryzias latipes*, *Takifugu rubripes*, *Sparus aurata*, *Gasterosteus aculeatus*, *Oreochromis niloticus* και *Xiphophorus maculatus*. Επιλέχθηκαν επίσης και κάποια είδη που ανήκουν στα τετράποδα τα *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, τα οποία έχουν υποστεί δύο γύρους διπλασιασμού (1R,2R) στο γονιδίωμα τους, σε σχέση με τους Τελεόστεους που έχουν υποστεί και τρίτο (3R). Επίσης, επιλέχθηκε και το είδος *Lepisosteus oculatus*, που ανήκει στους Ακτινοπτερύγιους αλλά η γενεαλογία του διαφοροποιήθηκε από τους Τελεόστεους πριν τον τρίτο γύρο διπλασιασμού. Επομένως έχει υποστεί δύο γύρους διπλασιασμού, όπως και τα τετράποδα και αποτελεί την σύνδεση μεταξύ Τελεόστεων και τετραπόδων. Τέλος, επιλέχθηκε και το είδος *Callorhincus milli*, που ανήκει στην αρχαιότερη ομάδα ζωντανών γναθόστομων σπονδυλωτών, επομένως αποτελεί γονιδίωμα αναφοράς για την μελέτη της εξέλιξης των σπονδυλωτών και χρησιμεύει και στην τοποθέτηση της ρίζας του δέντρου. Προκειμένου να συλλεχθούν οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των παραπάνω ειδών χρησιμοποιήθηκαν βιολογικές βάσεις δεδομένων. Η πρώτη βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για αυτόν το σκοπό ήταν η Ensembl. Η Ensembl περιέχει πληροφορίες για τα γονιδιώματα κυρίως σπονδυλωτών οργανισμών (ensembl.org). Για όλους τους οργανισμούς εκτός από το λαβράκι, τα δεδομένα συλλέχθηκαν μέσω της Ensembl. Το γονιδίωμα του *D.labrax* βρίσκεται στην βάση δεδομένων <http://seabass.mpipz.mpg.de>.

##### 3.1.2 Τοπική στοίχιση αλληλουχιών

Το δεύτερο βήμα για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου, είναι η συλλογή των αλληλουχιών του γονιδίου ή των γονιδίων της καλπαΐνης 2 που περιέχει κάθε οργανισμός. Για να πραγματοποιηθεί αυτό έγινε χρήση του αλγορίθμου BLAST. Το BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, είναι ένα εργαλείο που επιτρέπει την εύρεση περιοχών με τοπική ομοιότητα ανάμεσα σε αλληλουχίες. Συγκρίνει νουκλεοτιδικές ή πρωτεϊνικές αλληλουχίες και μέσω βάσεων με δεδομένα αλληλουχιών υπολογίζει την στατιστική σημαντικότητα της στοίχισης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό λειτουργικών και εξελικτικών σχέσεων μεταξύ αλληλουχιών, καθώς και για την ταυτοποίηση γονιδίων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια

(blast.ncbi.nlm.nih.gov). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος BLASTP, δηλαδή έγινε τοπική στοίχιση μεταξύ της εξεταζόμενης πρωτεϊνικής ακολουθίας (query sequence) και της ακολουθίας στόχου. Συγκεκριμένα, με βάση το όνομα του γονιδίου βρέθηκε πρώτα η αμινοξική αλληλουχία της *Capn2* του ανθρώπου. Ακολούθησε Blast της αλληλουχίας αυτής στο γονιδίωμα του *D.labrax* και έγινε εύρεση των δύο γονιδίων της *Capn2* (*Capn2a*, *Capn2b*) που υπάρχουν στο λαβράκι. Στη συνέχεια, μέσω Blast χρησιμοποιώντας την αμινοξική αλληλουχία των δύο αυτών γονιδίων ως αλληλουχία επερώτησης, βρέθηκαν οι ομόλογες αλληλουχίες για τα υπόλοιπα είδη στη βάση δεδομένων Ensemble. Αφού εντοπίστηκαν τα ομόλογα γονίδια, συλλέχθηκαν οι αμινοξικές αλληλουχίες τους στη μορφή FASTA.

### 3.1.3 Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών

Η πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνικών αλληλουχιών στοχεύει στην ανακατανομή καταλοίπων σύμφωνα με την κοινή εξελικτική τους προέλευση ή με την δομική ή λειτουργική ομοιότητά τους για έναν αριθμό αλληλουχιών. Μέσω της μεθόδου αυτής, είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την θέση, τη λειτουργία ή τη συντήρηση των καταλοίπων και βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες μελέτες (Pei, 2008). Το πρώτο πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το πρόγραμμα MAFFT, που περιλαμβάνει διάφορους αλγόριθμους για την εκτέλεση της στοίχισης. Ο αλγόριθμος που επιλέχθηκε ήταν ο G-INS-I που βασίζεται στη στοίχιση με διαδοχικές βελτιώσεις (iterative refinement). Συγκεκριμένα χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Needleman-Wunsch και υπολογίζει την βέλτιστη ολική στοίχιση μεταξύ των αλληλουχιών (mafft.cbrc.jp). Το δεύτερο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Aliview, που επιτρέπει την στοίχιση, την οπτικοποίηση, αλλά και την επεξεργασία πολλαπλών αλληλουχιών. Ο αλγόριθμος που είναι ενσωματωμένος στο Aliview και πραγματοποιεί τη στοίχιση είναι ο αλγόριθμος MUSCLE: Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation, ο οποίος βασίζεται στη στοίχιση με διαδοχικές βελτιώσεις (Pei, 2008). Το Aliview στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μόνο για την επεξεργασία των αλληλουχιών έπειτα από τη στοίχισή τους με το MAFFT.

Αφού έγινε η συλλογή των πρωτεϊνικών αλληλουχιών από τα είδη μελέτης και χωρίστηκαν στις τέσσερις ομάδες εκτελέστηκε το πρόγραμμα MAFFT. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε τμηματική στοίχιση για την ομάδα των Τελεόστεων. Για την βελτίωση της στοίχισης αφαιρέθηκαν περιοχές όπου οι αλληλουχίες εμφάνιζαν την μεγαλύτερη ασυμβατότητα μέσω του προγράμματος Aliview. Για τον έλεγχο της στοίχισης μετά την πρώτη επεξεργασία με το πρόγραμμα Aliview, ακολουθούσε επανάληψη του αλγορίθμου MAFFT. Αυτό, σε μερικές περιπτώσεις οδήγησε σε διαφορετική στοίχιση, οπότε αφαιρέθηκαν εκ νέου τμήματα από τις αλληλουχίες όπου ήταν απαραίτητο. Μόλις η παραπάνω διαδικασία για τους Τελεόστεους ολοκληρώθηκε, ενώθηκε το αρχείο με την αλληλουχία του *L.oculatus* και επαναλήφθηκε η διαδικασία της εκτέλεσης του αλγορίθμου MAFFT και της επεξεργασίας με το Aliview. Στη συνέχεια ακολούθησε η ενσωμάτωση των αλληλουχιών των σαρκοπτερύγιων και επανάληψη της διαδικασίας. Τέλος ενσωματώθηκαν και οι αλληλουχίες του είδους *C.milli* και η διαδικασία επαναλήφθηκε για τελευταία φορά, προκειμένου να επιτευχθεί τελικά η καλύτερη δυνατή πολλαπλή στοίχιση όλων των ακολουθιών.

### 3.1.4 Φυλογένεση

Μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής στοίχισης των αλληλουχιών από τα είδη μελέτης ήταν δυνατή η πραγματοποίηση Φυλογενετικής ανάλυσης. Με τον όρο Μοριακή Φυλογένεση στη βιολογία, αναφερόμαστε στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης είναι δυνατόν να διεξαχθούν συμπεράσματα ή εκτιμήσεις για τις σχέσεις αυτές. Η κατασκευή φυλογενετικών δένδρων που αποτελούν διακλαδιζόμενα διαγράμματα, μπορεί να αποτυπώσει και να οπτικοποιήσει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ συγκεκριμένων ταξινομικών ομάδων (Ajawatanawong, 2016). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms (Kumar et al., 2018), ένα λογισμικό που επιτρέπει την ανάλυση γονιδιωματικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών, καθώς και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων (megasoftware.net). Η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου μπορεί να βασιστεί είτε σε μεθόδους βασισμένες στην απόσταση (distance-based), είτε σε μεθόδους βασισμένες σε χαρακτήρες (character-based). Στην παρούσα περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Maximum likelihood (ML), σε συνδυασμό με το μοντέλο υποκατάστασης LG + G. Ο αλγόριθμος ML κατασκευάζει όλα τα πιθανά δέντρα που μπορεί να προκύψουν και επιλέγει το δέντρο που είναι πιο πιθανό να είναι αληθοφανές, σύμφωνα με τα παρατηρούμενα δεδομένα. Είναι ένας αργός αλγόριθμος, αλλά το τελικό αποτέλεσμα είναι αρκετά αξιόπιστο (Ajawatanawong, 2016). Τα μοντέλα υποκατάστασης (substitution models) αμινοξέων είναι πολύ βασικά για την φυλογένεση. Η εξελικτική απόσταση μεταξύ δύο πρωτεϊνικών αλληλουχιών υπολογίζεται σύμφωνα με τον αριθμό των αμινοξικών αντικαταστάσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ τους. Είναι γνωστό πως οι θέσεις μία πρωτεΐνης δεν εξελίσσονται όλες στον ίδιο βαθμό, κάποιες θέσεις πιο αργά λόγω δομικών ή λειτουργικών περιορισμών, κάποιες άλλες που δέχονται μικρή εξελικτική πίεση εξελίσσονται πιο γρήγορα (Le & Gascuel, 2008). Επομένως τα μοντέλα υποκατάστασης, υπολογίζουν την πιθανότητα αντικατάστασης των αμινοξικών καταλοίπων στους διάφορους κλάδους του δέντρου (megasoftware.net) και στην περίπτωση των ML δέντρων δείχνουν την πιθανότητα του δέντρου (Le & Gascuel, 2008). Για την εύρεση του καταλληλότερου μοντέλου υποκατάστασης για τις αλληλουχίες μας, έγινε ένα model test με τη βοήθεια του προγράμματος MEGAX, που προσδιόρισε ότι το καλύτερο μοντέλο ήταν το LG + G. Το συγκεκριμένο αποτελεί συνέχεια του μοντέλου που προτάθηκε από τους Whelan και Goldman (2001), αλλά εμπεριέχει επιπλέον την μεταβλητότητα του ρυθμού των αντικαταστάσεων ως υπολογισμούς πιθανότητας και εκτιμήσεων του ρυθμού αντικατάστασης (Le & Gascuel, 2008).

Μετά την εκτέλεση της πολλαπλής στοίχισης όλων των αλληλουχιών, έγινε αναδημιουργία του δέντρου με την μέθοδο ML. Ακολούθησε η τοποθέτηση ρίζας, στον βραχίονα που περιέχει την ταξινομική ομάδα αναφοράς (outgroup), που στην περίπτωσή μας είναι οι αλληλουχίες του είδους *C.milli*. Παράλληλα με την κατασκευή του δέντρου, έγινε και αξιολόγηση της αξιοπιστίας του με τον αλγόριθμο Bootstrap. Ο αλγόριθμος Bootstrap κατασκευάζει όλα τα πιθανά δέντρα που μπορούν να προκύψουν και δίνει σε κάθε κλάδο του δέντρου μία τιμή, που αντιπροσωπεύει την εμφάνιση της συγκεκριμένης διακλάδωσης σε ένα σύνολο 100 δέντρων. Οι τιμές που προσεγγίζουν την τιμή 100 θεωρούνται περισσότερο αξιόπιστες, αφού αυξάνεται η πιθανότητα ανάκτησης της ίδια διακλάδωσης χρησιμοποιώντας ένα ανεξάρτητο σύνολο δεδομένων για την κατασκευή του δέντρου όπως άλλοι μοριακοί δείκτες (De Moraes Russo et al., 2018).

### 3.1.5 Μελέτη/Ανάλυση συνταινικότητας

Σε συνδυασμό με το φυλογενετικό δέντρο πραγματοποιήθηκε και ανάλυση συνταινικότητας για τα είδη που επιλέχθηκαν στη Φυλογενετική ανάλυση. Η συνταινικότητα αποτελεί την γονιδιακή ομολογία που εμφανίζουν τα διάφορα είδη και η οποία μπορεί να προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τις γονιδιακές αναδιατάξεις δύο ειδών, μετά την απόκλισή τους από τον κοινό πρόγονο (Koonin, 2005). Η βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτόν τον σκοπό ήταν το Genomicus ([genomicus.biologie.ens.fr](http://genomicus.biologie.ens.fr)), το οποίο επιτρέπει την περιήγηση στα γονιδιώματα κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών κατά τον εξελικτικό χρόνο. Όλα τα δεδομένα για τα είδη που περιέχει, προέρχονται από την βάση Ensembl.

Για την καλύτερη κατανόηση της εξελικτικής πορείας του διπλασιασμού του γονιδίου της *Capn2*, η ανάλυση συνταινικότητας συλλέγει πληροφορίες σχετικά με το ποια γονίδια γειτνιάζουν με τα γονίδια υπό μελέτη, καθώς και σε ποιο χρωμόσωμα βρίσκονται. Αυτό μπορεί να μας δείξει τις χρωμοσωματικές περιοχές που έχουν διατηρηθεί στους διάφορους οργανισμούς και αποτελεί ενδιαφέρον όχι μόνο η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών, αλλά και η σύγκριση μεταξύ των δύο αντιγράφων στο ίδιο είδος (Koonin, 2005). Η ανάλυση συνταινικότητας έγινε για τα τετράποδα (*H.sapiens*, *G.gallus*, *M.musculus*), τους ακτινοπτερύγιους (*T.rubripes*, *G.aculeatus*, *X.maculatus*, *O.niloticus*, *L.oculatus*, *S.aurata*, *L.oculatus*) και το *C.milli*, χωρίς το λαβράκι, καθώς δεν είναι από τα είδη που περιέχονται στη βάση δεδομένων Genomicus.

### 3.2 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων μέσω Q-PCR

Προκειμένου να μετρηθεί η έκφραση των γονιδίων της *CAPN2* (*Capn2a*, *Capn2b*), εφαρμόστηκε η μέθοδος της Real-time PCR (q-PCR). Η q-PCR αποτελεί μία μέθοδο ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των ενισχυμένων αντιγράφων σε κάθε κύκλο, καθώς και τον υπολογισμό της αρχικής ποσότητας αντιγράφων που περιέχονταν σε κάθε δείγμα. Η ανίχνευση των ενισχυμένων προϊόντων γίνεται από έναν θερμοκυκλοποιητή με τη βοήθεια φθορίζουσας χρωστικής, ενώ ο υπολογισμός των αρχικών αντιγράφων προκύπτει από την εκθετική φάση της αντίδρασης (Arya et al., 2005). Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι το Rotor-Gene Q (Qiagen). Συνολικά, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 79 ιστούς από 4 λαβράκια, εκ των οποίων δύο ήταν αρσενικά και δύο θηλυκά. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι 21 ιστοί.

Η κανονικοποίηση της έκφρασης έγινε με τη βοήθεια πέντε (5) ιδιοστατικών γονιδίων, RPL19: ribosomal protein L19, RPL13A: ribosomal protein L13A, FAU: Ubiquitin-Like-S30 Fusion Protein, ACTB: actin b, TUB: Tubulin. Τα ιδιοστατικά γονίδια αναμένεται να παρουσιάζουν σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και θεωρητικά δεν επηρεάζονται από αλλαγές στις πειραματικές συνθήκες. Κατά την διεξαγωγή της q-PCR μπορούν να προκύψουν κάποια λάθη λόγω μικροδιαφορών στην αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων, στην ποιότητα του RNA ή στην σύνθεση του cDNA, καθώς και στην ενίσχυση του προϊόντος. Επομένως, η χρήση των ιδιοστατικών γονιδίων είναι απαραίτητη για την αποφυγή αυτών των λαθών και την κανονικοποίηση των δειγμάτων (Arya et al., 2005).

Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλάμβαναν ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 5min και ακολούθησαν 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού, ο καθένας από τους οποίους

αποτελούνται από 20 sec στους 95°C και 20 sec στους 60 °C. Η κατασκευή της καμπύλης διαχωρισμού (dissociation or melting curve), περιλαμβάνει 90 sec αναμονή στο πρώτο στάδιο αποδιάταξης και 5 sec αναμονή μετά από το τέλος κάθε κύκλου, προκειμένου να ελεγχθεί ανεπιθύμητη ενίσχυση επιπλέον τμημάτων και σχηματισμός διμερών εκκινητών. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 20 µl όπου περιείχαν 1,5 µl cDNA (αραίωση 1:5) και 18,5 µl από το mix. Η αρχική συγκέντρωση του cDNA ήταν 1 mg, οπότε μετά από αραίωση 1:5 η τελική συγκέντρωση ήταν περίπου 200 ng cDNA σε κάθε αντίδραση. Η αρχική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 10 pmol/µl. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal (cat no: KK4618-07959567001). Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται αναλυτικά οι αλληλουχίες των εκκινητών, καθώς και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις τους στην αντίδραση.

Επιπρόσθετα, η απόδοση της real-time PCR (E) υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

και ήταν 100.08% για το FAU, 100.04% για την *TUB*, 100.03% για το *L13A*, 100.01% για την *ACTB* και το *RPL19*, 100.03% για το *Capn2a* και 100.03% για το *Capn2b*. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως για κάθε δείγμα η αντίδραση πραγματοποιήθηκε δύο φορές.

**Πίνακας 2.** Οι 79 ιστοί από τα 4 λαβράκια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Index	Individual 1	Individual 2	Individual 3	Individual 4
BR: brain	1BR	2BR	3BR	4BR
PIT: pituitary gland		2PIT	3PIT	4PIT
E: eye	1E	2E	3E	3E
G: gill	1G	2G	3G	4G
H: heart	1H	2H	3H	4H
BL: blood	1BL	2BL	3BL	4BL
SK: skin	1SK	2SK	3SK	4SK
SC: scales	1SC	2SC	3SC	4SC
B: bone	1B	2B	3B	4B
RM: red muscle	1RM	2RM	3RM	4RM
WM: white muscle	1WM	2WM	3WM	4WM
S: stomach	1S	2S	3S	4S
PC: pyloric caeca	1PC	2PC	3PC	4PC
AI: anterior intestine	1AI	2AI	3AI	4AI
PI: posterior intestine	1PI	2PI	3PI	4PI
AT: adipose tissue	1AT	2AT	3AT	4AT

L: liver	1L	2L	3L	4L
SP: spleen	1SP	2SP	3SP	4SP
K: kidney	1K	2K	3K	4K
OV: ovaries	1OV		3OV	
TE: testis		2TE		4TE

**Πίνακας 3.** Αλληλουχίες εκκινητών και οι συγκεντρώσεις τους στις αντιδράσεις Real-time PCR

gene	Forward primer	Reverse primer	Primer Concentration nmol/μl
<i>Capn2a</i>	AACGCCACCAGGACGGATA	GGGACAACACGAGACAGAACC	200
<i>Capn2b</i>	GGAGCCACAAGGACGGACATT	GCACCACACGAGCCAGGATT	200
<i>FAU</i>	CTTCGTGAATGTTGTGCC	ACTGATGGATGGTGATGA	150
<i>L13A</i>	GAAGGCATCAACATCTCC	CTCTGAAGTGGTAAGGTC	200
<i>TUB</i>	TGTCGCCACTGATTGTA	ATCTCACTGCTCTTGTC	200
<i>RPL19</i>	ATCAGGTGCGGACAGTAT	ACACAGCGGAATCAATGG	150
<i>actb</i>	AAGCAGGAGTATGATGAGTC	GAAGTTGTTGGGCGTTTG	150+100

### 3.2.1 Υπολογισμός αρχικής ποσότητας αντιγράφων

Μετά την ολοκλήρωση της real-time PCR, είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση προκειμένου να βρεθεί η αρχική ποσότητα των αντιγράφων που περιέχει κάθε δείγμα. Δύο είναι οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης που εφαρμόζονται. Η σχετική ποσοτικοποίηση, που βασίζεται στην σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου υπό μελέτη με την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς και η απόλυτη που βασίζεται στην κατασκευή μίας πρότυπης καμπύλης (Pfaffl, 2001). Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης. Αρχικά για να βρεθεί η σχετική αρχική ποσότητα αντιγράφων σε κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος  $Initial\ quantity = (threshold * 1000) / (E+1)^{Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001), όπου threshold είναι το κατώφλι που ορίστηκε στο 0,5, E είναι η απόδοση της real-time PCR και Ct (cycle threshold), είναι ο αριθμός των κύκλων που απαιτείται ώστε το δείγμα να φτάσει το κατώφλι. Ο συγκεκριμένος τύπος υπολογίστηκε και για τα housekeeping γονίδια και για τα γονίδια υπό μελέτη. Στη συνέχεια, ακολούθησε η κανονικοποίηση της τιμής που προέκυψε από τον παραπάνω τύπο. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού του NF (normalization factor), ο οποίος βασίζεται στα επίπεδα έκφρασης των ιδιοστατικών γονιδίων. Ο NF προκύπτει από τον γεωμετρικό μέσο των αρχικών ποσοτήτων των πιο σταθερά

εκφραζόμενων ιδιοστατικών γονιδίων. Η χρήση παραπάνω του ενός ιδιοστατικών γονιδίων προσφέρει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα δεδομένων γονιδιακή έκφρασης, καθώς τα ιδιοστατικά γονίδια παρόλο που πιστεύεται ότι εμφανίζουν σταθερή έκφραση σε όλους τους ιστούς κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, συχνά διαφέρουν (Vandesompele et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη, έγινε κατασκευή διαγραμμάτων διασποράς χρησιμοποιώντας τις αρχικές ποσότητες των ιδιοστατικών γονιδίων για να εξακριβωθεί ποια εμφανίζουν την σταθερότερη έκφραση. Αυτά που παρουσίασαν την μικρότερη διακύμανση ήταν το *fau* και η *actb*, οπότε και επιλέχθηκαν για τον υπολογισμό του NF. Τέλος, για κάθε δείγμα έγινε διαίρεση της Initial quantity με τον NF που επιλέχθηκε. Προκειμένου να επιστρέψουν οι τιμές στην κανονική κατανομή υπολογίστηκε η τετραγωνική ρίζα των τιμών που προέκυψαν, μετά την διαίρεση.

### 3.2.2 Στατιστική Ανάλυση

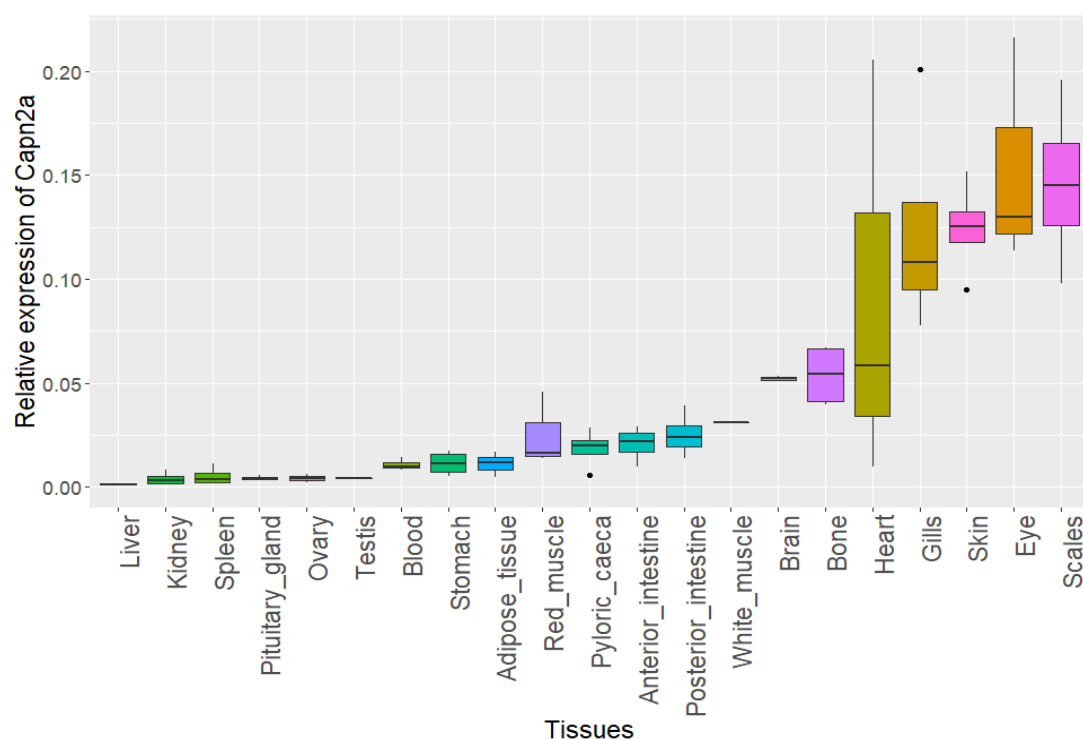
Για τη σύγκριση των διαφορών της έκφρασης των δύο γονιδίων στους διαφορετικούς ιστούς πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, με τη χρήση του R studio. Συγκεκριμένα, έγινε one-way ANOVA και pairwise t-test για να εξεταστεί αν η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο γονιδίων στο σύνολο των ιστών είναι στατιστικά σημαντική. Εφαρμόστηκε και το Tukey's HSD test για να ελεγχθεί αν η διαφορά στην έκφραση που παρατηρείται μεταξύ της *Carn2a* και *Carn2b* σε κάθε ιστό ξεχωριστά είναι στατιστικά σημαντική. Το επίπεδο σημαντικότητας στις στατιστικές μεθόδους τέθηκε ως  $p \text{ value} < 0,05$ .



## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Έκφραση των γονιδίων της *Carh2*

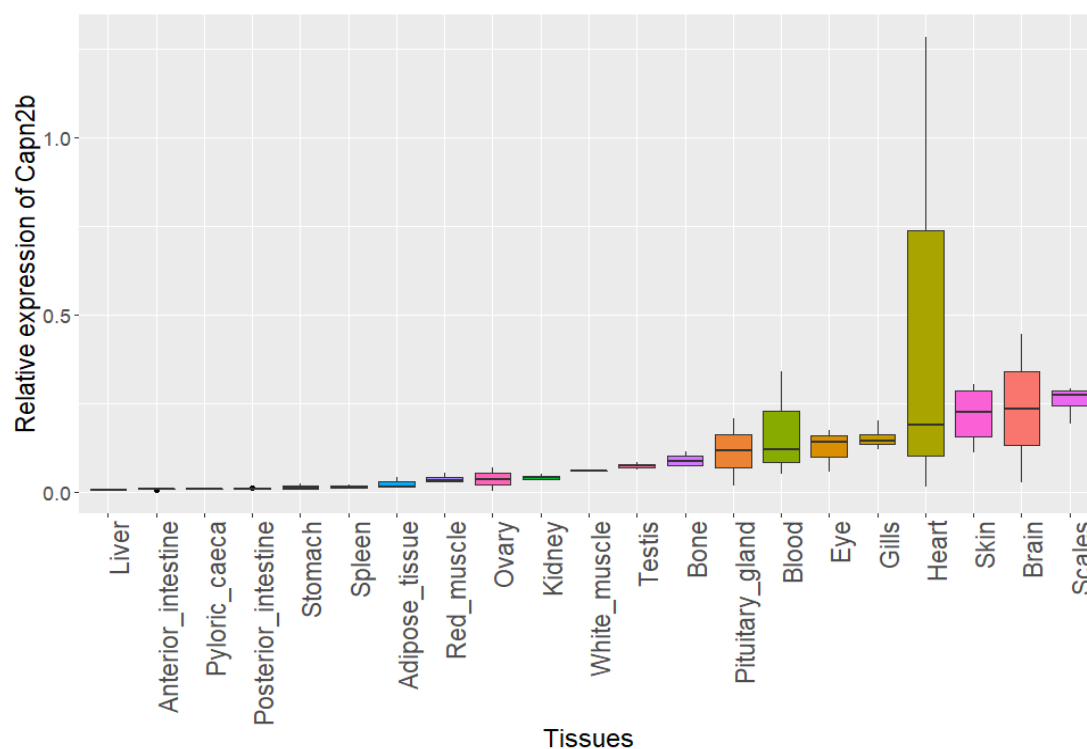
Για την μελέτη της έκφρασης των δύο παράλογων γονιδίων της *Carh2* στο λαβράκι έγινε Q-PCR σε 21 διαφορετικούς ιστούς. Το γονίδιο της *Carh2a*, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 6, εκφράζεται σε ένα βαθμό σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν. Οι ιστοί είναι διατεταγμένοι από τον ιστό με την χαμηλότερη μέση τιμή έκφρασης (συκώτι) προς τον ιστό με την υψηλότερη (λέπια). Συγκεκριμένα, οι ιστοί που παρουσιάζουν την μικρότερη έκφραση *Carh2a* είναι το συκώτι, οι νεφροί, ο σπλήνας, η υπόφυση, οι ωσθήκες και οι όρχεις. Στη συνέχεια ακολουθούν το αίμα, το στομάχι, ο λιπώδης ιστός, ο κόκκινος μυς, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και οπίσθιο έντερο και ο λευκός μυς. Τέλος οι ιστοί που εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης είναι ο εγκέφαλος, τα οστά, η καρδιά, τα βράγχια, το δέρμα, τα μάτια και τα λέπια.



**Εικόνα 6:** Διάγραμμα boxplot των σχετικών επιπέδων έκφρασης της *Carh2a* στους 21 ιστούς που μελετήθηκαν. Οι ιστοί διατάσσονται από τον ιστό με την μικρότερη μέση τιμή έκφρασης (liver) προς τον ιστό με την μεγαλύτερη (scales). Η τιμή απεικονίζει την σχετική αρχική ποσότητα αντιγράφων σε κάθε ιστό, όπως προέκυψε μετά από την κανονικοποίηση των τιμών της Real-time PCR. Η μαύρη οριζόντια γραμμή σε κάθε boxplot απεικονίζει την διάμεσο.

Όσο αναφορά το γονίδιο της *Carh2b* (Εικόνα 7), επίσης εκφράζεται σε όλους τους ιστούς μελέτης στο λαβράκι. Οι ιστοί παρουσιάζονται πάλι διατεταγμένοι από τον ιστό με την χαμηλότερη μέση τιμή έκφρασης (συκώτι) προς τον ιστό με την υψηλότερη (λέπια). Πιο αναλυτικά, οι ιστοί που εμφανίζουν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης είναι το συκώτι, το εμπρόσθιο έντερο, τα πυλωρικά τυφλά, το οπίσθιο έντερο, το στομάχι, η σπλήνα, ο λιπώδης

ιστός, ο κόκκινος μυς, οι ωθήκες και οι νεφροί. Ακολουθούν ο λευκός μυς, οι όρχεις, τα οστά, η υπόφυση και το αίμα και τέλος την υψηλότερη έκφραση εμφανίζουν τα μάτια, τα βράγχια, η καρδιά, το δέρμα, ο εγκέφαλος και τα λέπια.



**Εικόνα 7:** Διάγραμμα boxplot των σχετικών επιπέδων έκφρασης της Capn2b στους 21 ιστούς που μελετήθηκαν. Οι ιστοί διατάσσονται από τον ιστό με την μικρότερη μέση τιμή έκφρασης (liver) προς τον ιστό με την μεγαλύτερη (scales). Η τιμή απεικονίζει την σχετική αρχική ποσότητα αντιγράφων σε κάθε ιστό, όπως προέκυψε μετά από την κανονικοποίηση των τιμών της Real-time PCR. Η μαύρη οριζόντια γραμμή σε κάθε boxplot απεικονίζει την διάμεσο.

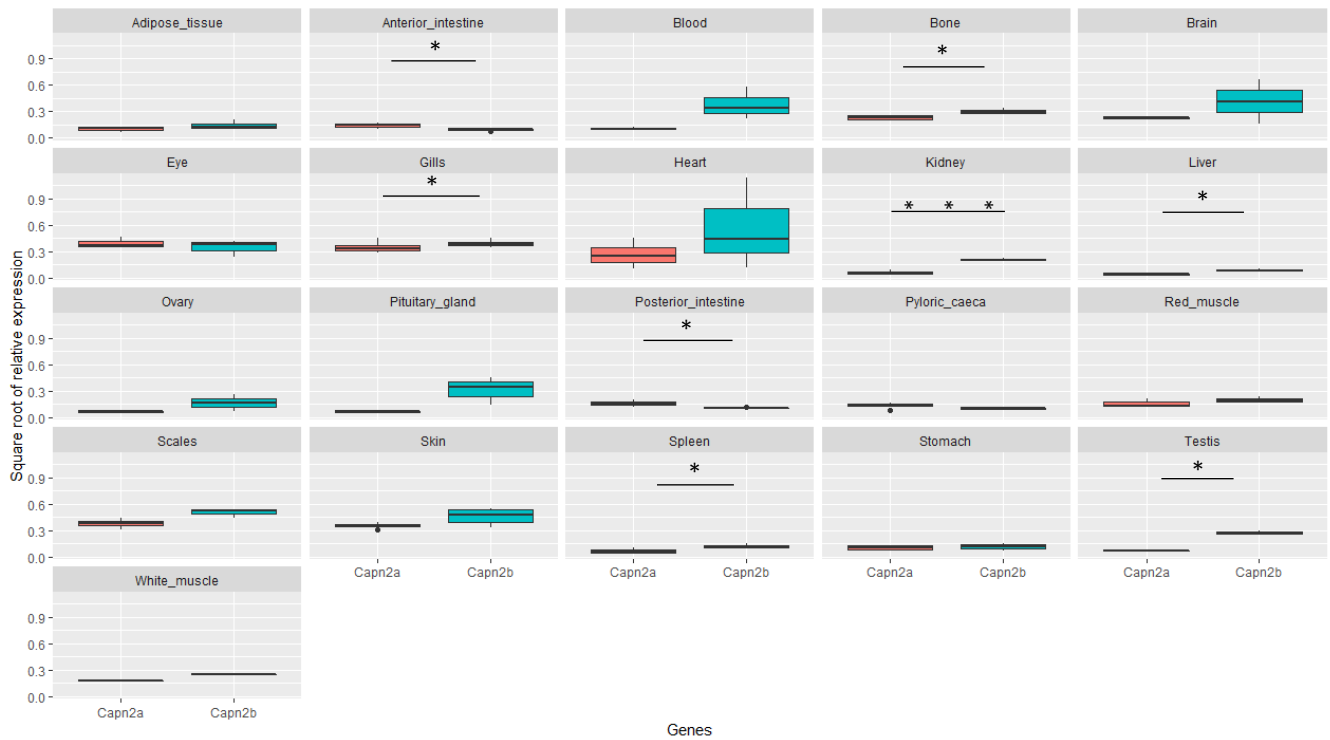
Προκειμένου να καθοριστεί αν η διαφορά που παρουσιάζει η έκφραση της Capn2a στους διαφορετικούς ιστούς και η Capn2b είναι στατιστικά σημαντική, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως  $p$  value  $< 0.05$ . Το αποτέλεσμα ήταν  $p$  value = 0.014183. Επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε πως η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης κάθε γονιδίου που παρατηρούνται ανάμεσα στους 21 ιστούς είναι στατιστικά σημαντική. Πραγματοποιήθηκε επίσης και μια ανάλυση pairwise t-test. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε επίσης ως  $p$  value  $< 0.05$  και το αποτέλεσμα ήταν  $p$  value = 0.002825, επομένως οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές. Οι τιμές των  $p$  value ήταν αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με το όριο του επιπέδου σημαντικότητας, επομένως παρουσιάζεται ισχυρή στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των διαφορών στις τιμές τόσο μεταξύ των δύο γονιδίων συνολικά. Για να ελεγχθεί αν σε κάθε ιστό ξεχωριστά, η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης που παρατηρείται μεταξύ της Capn2a και Capn2b είναι στατιστικά σημαντική πραγματοποιήθηκε Tukey's HSD test, με το επίπεδο σημαντικότητας  $p$  value  $< 0,5$ . Ο ιστός λευκός μυς δεν περιλήφθηκε στην ανάλυση αυτή, καθώς από την Real-time PCR πήραμε μία

μόνο αξιόπιστη μέτρηση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 4. Οι ιστοί που εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα ήταν το πρόσθιο και οπίσθιο έντερο, οι όρχεις, οι νεφροί, το συκώτι, η σπλήνα, τα λέπια και τα οστά.

**Πίνακας 4:** Οι τιμές p value όπως προέκυψαν από το Tukey's HSD test.

Tissue	P value	Tissue	P value
Brain	0.4708434	Blood	0.1420017
Pituitary gland	0.1136741	Skin	0.0926677
Eye	0.581553	Scales	0.0108902
Gills	0.3825832	Bone	0.0225425
Heart	0.3825832	Stomach	0.6650256
Pyloric caeca	0.1214685	Anterior Intestine	0.0270359
Posterior Intestine	0.0392873	Liver	0.0223507
Adipose tissue	0.2919768	Kidney	4.19e-05
Spleen	0.0304959	Red muscle	0.3473776
Ovaries	0.4255393	Testicles	0.0263087

Η σύγκριση στα επίπεδα έκφρασης της *Carπ2a* και *Carπ2b* απεικονίζονται στην Εικόνα 8, όπου φαίνεται για κάθε ιστό ξεχωριστά η έκφραση των δύο γονιδίων. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα για την καλύτερη οπτικοποίηση των δεδομένων και για να είναι δυνατή η διάκριση στη διαφορά της έκφρασης μεταξύ των δύο γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε η τετραγωνική ρίζα των τιμών. Σε τρεις μόνο ιστούς συγκεκριμένα στα πυλωρικά τυφλά, στο πρόσθιο και οπίσθιο έντερο η έκφραση της *Carπ2a* ξεπέρασε την έκφραση της *Carπ2b*, κατά περίπου 2 φορές. Στους υπόλοιπους 18 ιστούς το γονίδιο της *Carπ2b* εκφράζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. Ιδιαίτερα, η υπόφυση εμφανίζει τη μεγαλύτερη διαφορά, ακολουθούν οι όρχεις, οι νεφροί, το αίμα και οι ωσθήκες. Και ο εγκέφαλος, το συκώτι, η καρδιά, η σπλήνα, ο κόκκινος και ο λευκός μυς εκφράζουν την *Carπ2b* σε μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με την *Carπ2a*. Τέλος, στο μάτι, στα βράγχια, στο δέρμα, στα λέπια, στα οστά, στο στομάχι και στον λιπώδη ιστό η διαφορά της έκφρασης μεταξύ των δύο γονιδίων είναι αρκετά μικρότερη.



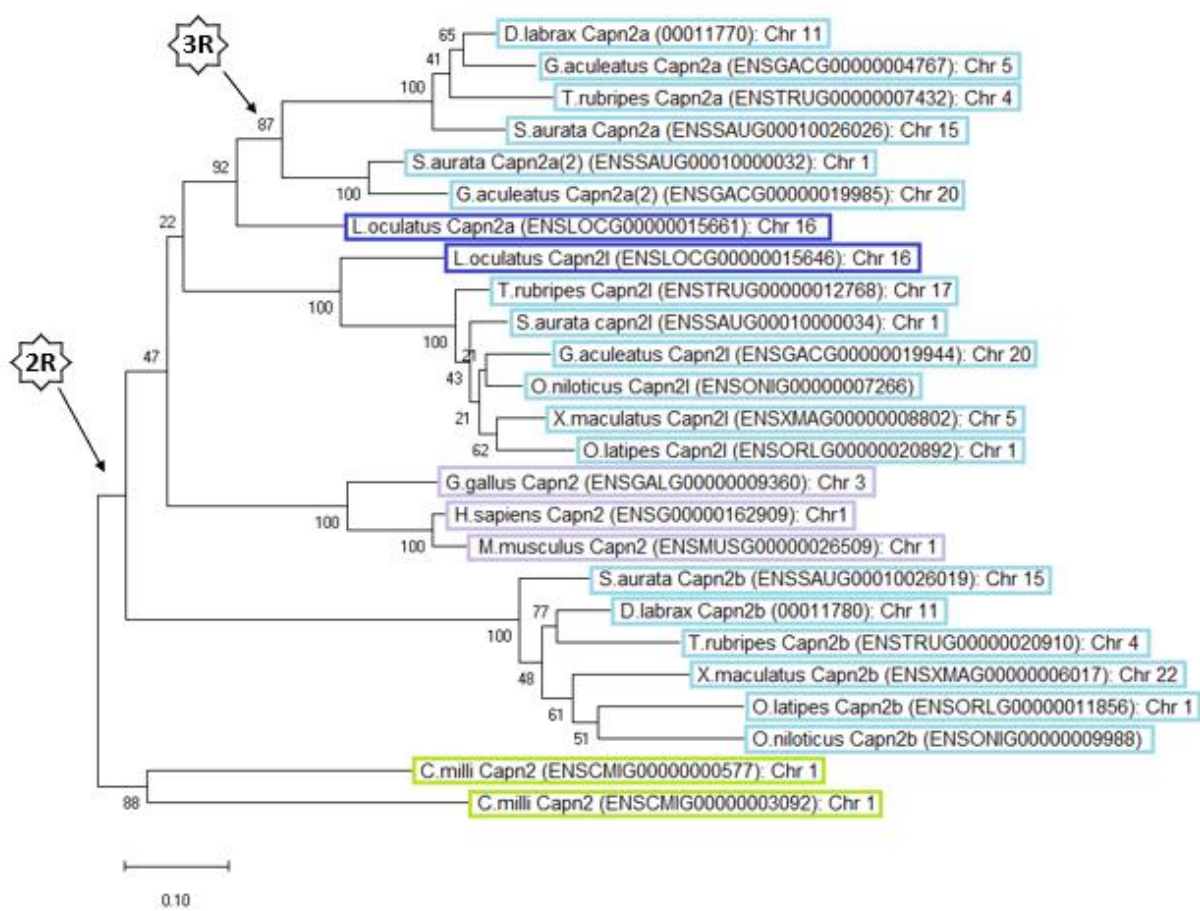
**Εικόνα 8:** Διάγραμμα Boxplot που απεικονίζει την τετραγωνική ρίζα των σχετικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της *Capn2a* και της *Capn2b* ανά ιστό μελέτης .

## 4.2 Φυλογένεση

Για την κατανόηση της εξελικτικής πορείας του γονιδίου της καλπαΐνης 2, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με τη χρήση του προγράμματος MEGA-X. Το δέντρο που κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Maximum Likelihood φαίνεται στην Εικόνα 9. Παρατίθενται και οι τιμές bootstrap όπως προέκυψαν από το πρόγραμμα. Τα είδη που ανήκουν στους Τελεόστεους απεικονίζονται με γαλάζιο, το είδος *L. oculatus* που ανήκει στους Ακτινοπτερύγιους, αλλά δεν έχει περάσει τρεις γύρους διπλασιασμού (3R) απεικονίζεται με μπλε, τα τετράποδα απεικονίζονται με μωβ και τέλος το *C. milli* που επιλέχθηκε ως ρίζα του δέντρου με πράσινο. Η ονοματολογία των αντιγράφων δηλαδή 2a, 2b, 2l για τα είδη που έχουν παραπάνω του ενός γονίδια καλπαΐνης 2, έγινε για διευκόλυνση με βάση τα δύο γονίδια της καλπαΐνης 2 του λαβρακιού. Δηλαδή, όσα είδη δημιούργησαν ομάδα με το αντίγραφο *Capn2a* του *D. labrax* ονομάστηκαν 2a και αντίστοιχα τα είδη που δημιούργησαν ομάδα με το *Capn2b*, ονομάστηκαν 2b. Τα υπόλοιπα γονίδια ονομάστηκαν 2l. Στο είδος *S. aurata* και *G. aculeatus* που δύο γονίδια δημιούργησαν ομάδα με το αντίγραφο *Capn2a*, τα δεύτερα αντίγραφα ονομάστηκαν ως 2a(2).

Στο δέντρο που προέκυψε τελικά (Εικόνα 9), μπορούμε να παρατηρήσουμε πως οι Τελεόστεοι δημιουργούν τρεις ξεχωριστές ομάδες με υψηλά bootstrap. Η πρώτη ομάδα των Τελεόστεων περιέχει ένα αντίγραφο γονιδίου για το *D. labrax* και το *T. rubripes* και από δύο αντίγραφα για το *G. aculeatus* και το *S. aurata*, τα δεύτερα αντίγραφα των οποίων ομαδοποιούνται σε

ξεχωριστή υπο-ομάδα. Οι άλλες δύο ομάδες Τελεόστεων φέρουν από ένα αντίγραφο. Το *L. oculatus* που έχει δύο παράλογα *capn2* αποτελεί έξω-ομάδα στις δύο πρώτες ομάδες των Τελεόστεων. Επίσης, τα τετράποδα ομαδοποιούνται ξεχωριστά σε σχέση με τους Τελεόστεους και έχουν ένα μόνο αντίγραφο του γονιδίου. Τέλος, το *C. milli* που εμφανίζει δύο παράλογα ομαδοποιείται επίσης ξεχωριστά από τα τετράποδα και τους Τελεόστεους. Με τα δύο βέλη φαίνονται τα γεγονότα διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (2R και 3R). Σύμφωνα με την τοπολογία του δέντρου, το 2R τοποθετήθηκε μετά τον διαχωρισμό του *C. milli* από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά. Το *C. milli* ανήκει στους Χονδροϊχθύες, η γενεαλογία των οποίων διαχωρίστηκε πριν την εμφάνιση των Σαρκοπτερύγων και των Ακτινοπτερύγων. Το 3R γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία πως συνέβει ειδικά στην γενεαλογία των Τελεόστεων, οπότε στο δέντρο τοποθετήθηκε στον κλάδο που διαχωρίζει το *L. oculatus* έναν Ακτινοπτερύγιο που δεν έχει υποστεί 3R, από τους Τελεόστεους. Στον κλάδο αυτό συμπεριλαμβάνονται 2 αντίγραφα για τα είδη *S. aurata* και *G. aculeatus*.

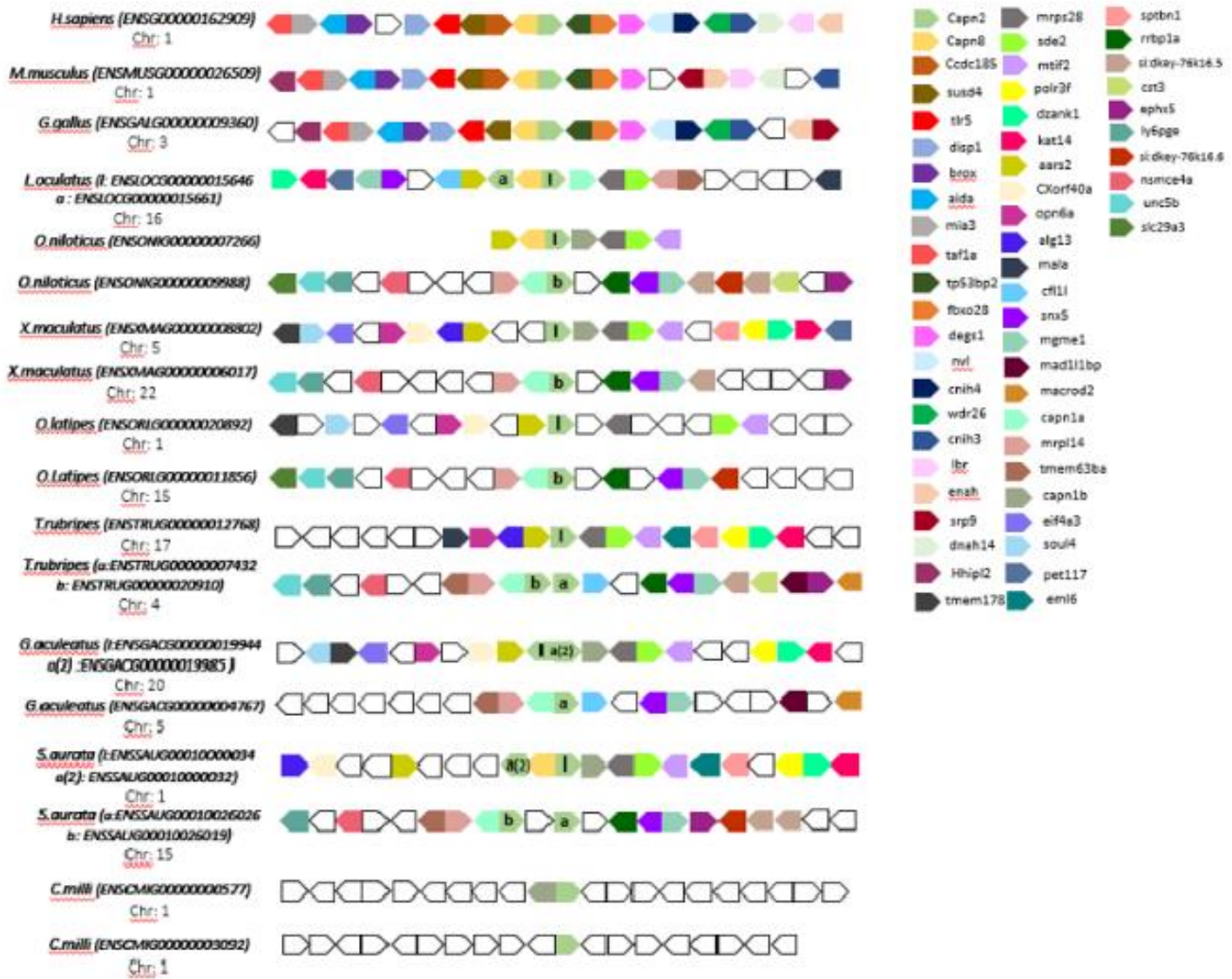


**Εικόνα 9 :** Φυλογενετικό δέντρο με τη μέθοδο Maximum Likelihood για το γονίδιο *Capn2*. Τα τετράποδα φαίνονται με μωβ, οι Τελεόστεοι με γαλάζιο, το *L. oculatus* με μπλε και η ρίζα του δέντρου με πράσινο.

### 4.3 Ανάλυση Συνταινικότητας

Στην Εικόνα 10 φαίνεται η ανάλυση συνταινικότητας σύμφωνα με την βάση δεδομένων Genomicus για τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Συγκεκριμένα, απεικονίζονται το γονίδιο της καλπαΐνης 2 στο κέντρο και 10 γονίδια ανοδικά και καθοδικά. Τα γονίδια που εμφανίζουν συντήρηση ανάμεσα στα είδη παρουσιάζονται με χρώμα και κάθε διαφορετικό χρώμα αντιπροσωπεύει και ένα διαφορετικό γονίδιο. Τα άχρωμα γονίδια δεν εμφανίζουν συντήρηση ανάμεσα στους διαφορετικούς οργανισμούς. Στα αριστερά αναγράφεται το κάθε είδος, το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται το γονίδιο της καλπαΐνης 2, καθώς και σε παρένθεση ο κωδικός του γονιδίου της *Capn2* σύμφωνα με την βάση δεδομένων Ensembl, ο οποίος είναι ταυτόσημος με τον κωδικό του γονιδίου στο φυλογενετικό δέντρο. Στα είδη όπου έχουν παραπάνω από ένα γονίδια καλπαΐνης 2, όπως οι Τελεόστεοι και το *L. oculatus*, αναγράφεται με a, b και l το κάθε αντίγραφο, σύμφωνα με την τοπολογία του δέντρου.

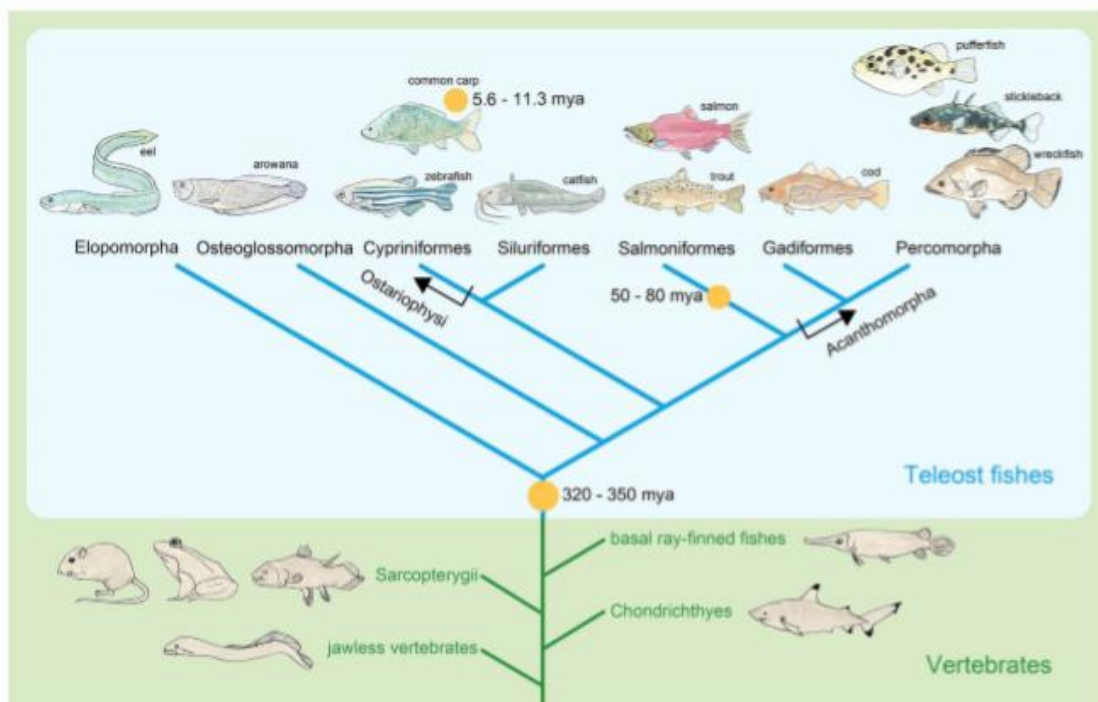
Στα τετράποδα, που έχουν ένα μόνο αντίγραφο του γονιδίου της καλπαΐνης 2 παρατηρείται πολύ μεγάλος βαθμός συντήρησης. Σχεδόν όλα τα γονίδια πλην μερικών εξαιρέσεων έχουν διατηρηθεί στους οργανισμούς αυτούς, καθώς και η σειρά τους πάνω στο γονιδίωμα. Όσο αφορά το *L. oculatus* που δεν έχει περάσει τρίτο γύρο διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος όπως οι Τελεόστεοι, εκτός από το γονίδιο της καλπαΐνης 2, εμφανίζει συντήρηση με τα τετράποδα μόνο στο γονίδιο της καλπαΐνης 8. Στους Τελεόστεους, ο βαθμός συντήρησης παρουσιάζεται μικρότερος. Τα χρωμοσώματα με το αντίγραφο b παρουσιάζουν συντήρηση μεταξύ τους, όπως και τα χρωμοσώματα που έχουν το l αντίγραφο. Τέλος, το είδος *C. milli* που επιλέχθηκε ως ρίζα του δέντρου εμφανίζει σχεδόν μηδενική συντήρηση τόσο με τα τετράποδα, όσο και με τους Τελεόστεους.



Εικόνα 10 : Μελέτη των συνταινικών περιοχών γειτονικά του γονιδίου της *Capn2*.

## 5. Συζήτηση

Οι καλπαίνες αποτελούν μια υπεροικογένεια πρωτεασών που ρυθμίζονται από ιόντα  $Ca^{2+}$  και παρουσιάζουν συντήρηση στις περισσότερες μορφές ζωής. Σε αντίθεση με τα λυσοσώματα και τα πρωτεασώματα οι καλπαίνες δεν αποδομούν πλήρως το υπόστρωμά τους, αλλά αλλάζουν τη διαμόρφωση του μέσω πρωτεόλυσης σε συγκεκριμένες θέσεις (Ono et al., 2012). Βρίσκονται στο κυτοσόλιο και συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές διαδικασίες όπως η απόπτωση, η κινητικότητα του κυττάρου, η μεταγωγή σήματος και η σύντηξη των μεμβρανών (Goll et al., 2003). Τα πιο καλά μελετημένα μέλη της οικογένειας αυτής, είναι η CAPN1 και CAPN2 που ανήκουν στις τυπικές καλπαίνες και εμφανίζονται συντηρημένες σε όλα τα σπονδυλωτά (Macqueen et al., 2010). Η περισσότερη έρευνα πάνω στις καλπαίνες έχει επικεντρωθεί στα θηλαστικά, επομένως η ταξινόμηση των καλπαϊνών των υπόλοιπων ειδών είναι βασισμένη εκεί. Γνωρίζουμε πως η εξάπλωση των σπονδυλωτών έχει συνοδευθεί από γεγονότα διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος. Το πρώτο έγινε σε έναν κοινό πρόγονο των Άγναθων και Γναθοστόματων σπονδυλωτών, το δεύτερο στη βάση της γενεαλογίας των Γναθοστόματων και το τρίτο στη γενεαλογία των Τελεόστεων, ενώ έχουν ακολουθήσει και μικρότερης κλίμακας γονιδιωματικοί διπλασιασμοί όπως αυτός στη γενεαλογία των Σολομονίδων (Εικόνα 11) (Kasahara, 2007). Το λαβράκι, που είναι το είδος υπό μελέτη της παρούσας εργασίας ανήκει στους Τελεόστεους και έχει δύο αντίγραφα του γονιδίου της καλπαϊνης 2 στο γονιδίωμα του. Είναι ένα από τα κύρια εκτρεφόμενα ψάρια της Μεσογείου με μεγάλη οικονομική αξία και το γονίδιο της *Capn2* συμμετέχει στη διαμόρφωση της υφής του φιλέτου μετά την αλίευση. Επομένως, ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν αφενός να μελετηθούν τα πρότυπα έκφρασης των δύο γονιδίων της καλπαϊνης 2 στο λαβράκι, μέσω Q-PCR και αφετέρου η εξελικτική πορεία του διπλασιασμού τους, μέσω φυλογένεσης και ανάλυσης συνταϊνικότητας.

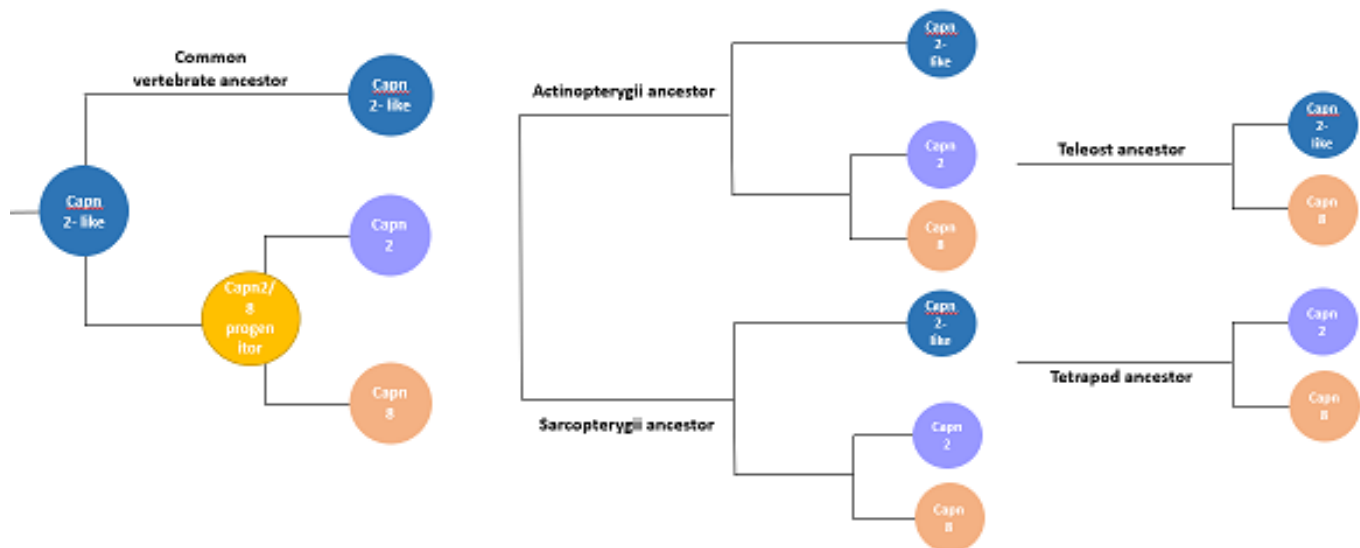


**Εικόνα 11:** Η διαφοροποίηση των Τελεόστεων σε σχέση με τα υπόλοιπα σπονδυλωτά. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα γεγονότα γονιδιωματικών διπλασιασμών (WGD). Το ειδικό για την γενεαλογία των Τελεόστεων έγινε 320-350 mya (Glasauer & Neuhauss, 2014).



Η βιβλιογραφία σχετικά με τις καλπαΐνες των ψαριών τόσο για τον ρόλο τους όσο και για την εξελικτική τους πορεία είναι αρκετά ελλιπής. Στο *Oncorhynchus mykiss* βρέθηκαν ορθόλογα των *carp1* και *carp2* των θηλαστικών, με παρόμοια αλληλουχία και δομή (Salem et al., 2005). Στο ίδιο είδος έγινε απομόνωση της *carp2* η οποία είχε *in vitro* παρόμοιες απαιτήσεις σε ασβέστιο με άλλων σπονδυλωτών και σχημάτιζε και ετεροδιμερές με μία μικρή υπομονάδα 26 kDa (Saito et al., 2007). Επίσης, στο γονιδίωμα του zebrafish βρέθηκαν δύο παράλογα *carp2* γονίδια (LePage and Bruce, 2008). Φυλογενετική μελέτη του 1999 υποδεικνύει πως τα γονίδια *Carp1*, 2 και 8 εμφανίστηκαν μετά από δύο γύρους γονιδιωματικού διπλασιασμού στα Χορδωτά, στον κλάδο των Σπονδυλωτών. Αρχικά συνέβει ένας μεγάλης κλίμακας διπλασιασμός ή τετραπλοειδία που οδήγησε στο *Carp1* και στο προγονικό γονίδιο των *Carp2/8* και ακολούθησε διαδοχικός διπλασιασμός που οδήγησε στην εμφάνιση των *Carp2* και *Carp8*. Έτσι η καλπαΐνη 8 συγγενεύει εξελικτικά σε μεγάλο βαθμό με την καλπαΐνη 2 (Jékely & Friedrich, 1999).

Μελέτη πάνω στο *Hippoglossus hippoglossus L.*, ένα είδος που ανήκει στους Τελεόστεους, για τις καλπαΐνες 1,2,3 και 11 και την εξελικτική τους πορεία σε σχέση με τις καλπαΐνες άλλων σπονδυλωτών έδειξε το εξής: οι αλληλουχίες της καλπαΐνης 2 των Τελεόστεων σχημάτιζαν μία ξεχωριστή μονοφυλετική ομάδα, εξωτερική από τους δύο κλάδους που περιλάμβαναν τις αλληλουχίες της καλπαΐνης 2 των τετραπόδων ή της καλπαΐνης 8 των τετραπόδων και των Τελεόστεων (Macqueen et al., 2010). Το ίδιο έδειξε και φυλογενετική μελέτη πάνω στις καλπαΐνες στο *S. aurata* (Salmerón et al., 2013). Αυτή η παρατήρηση συνάδει με την τοπολογία του δέντρου που προέκυψε και στην παρούσα εργασία. Όσο αναφορά την καλπαΐνη 2 των Τελεόστεων οι ερευνητές προτείνουν πως τα γονίδια της δεν αποτελούν άμεσα ορθόλογα με των τετραπόδων, γι' αυτό και τα αναφέρουν ως *calpain 2-like*. Πιο συγκεκριμένα, η καλπαΐνη 2-like των Τελεόστεων αναπαριστά ένα στενά συγγενικό μέλος με την καλπαΐνη 2 των τετραπόδων, που εμφανίστηκε πριν τον διαχωρισμό των Σαρκοπτερύγιων από τους Ακτινοπτερύγιους. Μία θεωρία που θα εξηγούσε την παραπάνω παρατήρηση, είναι πως ο κοινός πρόγονος των σπονδυλωτών είχε ένα *carp2-like* γονίδιο, το οποίο διπλασιάστηκε και έδωσε γένεση στο προγονικό γονίδιο *carp2/8*, που στη συνέχεια οδήγησε στην εμφάνιση των γονιδίων της *carp2* και *carp8* ξεχωριστά. Το γεγονός του διπλασιασμού που οδήγησε στα γονίδια *carp2* και *carp8* πραγματοποιήθηκε και σε κάποιον κοινό πρόγονο των σπονδυλωτών και τα τετράποδα έχασαν το *carp2-like* γονίδιο, ενώ οι Τελεόστεοι το *carp2* (Macqueen et al., 2010). Η παραπάνω θεωρία φαίνεται σχηματικά και στην εικόνα 12.



**Εικόνα 12:** Διαγραμματική αναπαράσταση της πιθανής εξελικτικής πορείας του γονιδίου *Carpn2* στα τετράποδα και στους Τελεόστεους.

Παρόλο που η καλπαΐνη 2 των τετραπόδων με την καλπαΐνη 2-like των Τελεόστεων διαφέρουν εξελικτικά και δεν είναι ορθόλογες, εμφανίζουν πολύ μεγάλη συντήρηση στις αλληλουχίες τους. Επίσης, η *carpn2-like* εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς όπως έδειξαν μελέτες στο *H. hippoglossus* (Macqueen et al., 2010), στο zebrafish (Macqueen & Wilcox, 2014), αλλά και η συγκεκριμένη εργασία στο λαβράκι. Το ίδιο ισχύει και για την *carpn2* των κυριότερων γενεαλογιών στα τετράποδα. Επίσης έχει αναφερθεί στην πέστροφα (*O. mykiss*) ότι το γονίδιο της *carpn2-like* σχηματίζει ετεροδιμερές με μία μικρή υπομονάδα και εμφανίζει *in vitro* όμοιες απαιτήσεις σε ασβέστιο για την ενεργοποίησή της όπως και η καλπαΐνη 2 των τετραπόδων (Saito et al., 2007). Όλες αυτές οι ομοιότητες υποδεικνύουν πως η *carpn2-like* των Τελεόστεων και η *carpn2* των τετραπόδων, έχουν συντηρηθεί από ένα κοινό προγονικό γονίδιο. Όσο αναφορά την καλπαΐνη 8 των Τελεόστεων το αν αποτελεί ορθόλογο γονίδιο με την καλπαΐνη 8 των τετράποδων δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο (Macqueen et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση συνταϊνικότητας της παρούσας εργασίας έδειξε πως μεταξύ των τετραπόδων και των Τελεόστεων το μόνο γονίδιο που εμφανίζεται συντηρημένο εκτός του γονιδίου της καλπαΐνης 2, είναι αυτό της καλπαΐνης 8. Συγκεκριμένα, φαίνεται να είναι συντηρημένη και η κατεύθυνσή του πάνω στο γονιδίωμα, αλλά και η θέση του σε σχέση με το *carpn2*. Το *carpn8* υπάρχει σε όλα τα τετράποδα, καθώς και στο *O. niloticus*, στο *S. aurata* και στο *L. oculatus*. Οι υπόλοιποι Τελεόστεοι δεν έχουν κανένα άλλο κοινό γονίδιο με τα τετράποδα, στις θέσεις που μελετήθηκαν ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου *carpn2*.

Όσο αναφορά τα επίπεδα έκφρασή της, η καλπαΐνη 2 παρουσιάζει ευρεία έκφραση στους ιστούς στις κυριότερες γενεαλογίες των σπονδυλωτών (Macqueen et al., 2010). Στους Τελεόστεους, καθολική έκφραση καλπαΐνης 2 έχει αναφερθεί στην πέστροφα (*Oncorhynchus*

*mykiss*) (Salem et al., 2005), στον Ιππόγλωσσο Ατλαντικού (Atlantic halibut) (Macqueen et al., 2010), στο zebrafish (Macqueen & Wilcox, 2014) και στο λαβράκι όπως προέκυψε από την παρούσα εργασία. Στο zebrafish που έχει δύο παράλογα *carp2* όπως και το λαβράκι, το ένα παράλογο εμφάνισε αυξημένη έκφραση στο δέρμα, στην καρδιά, στα νεφρά και στον εγκέφαλο, ενώ το δεύτερο παράλογο εμφάνισε υψηλότερη έκφραση στις ωσθήκες (Macqueen & Wilcox, 2014). Στην πέστροφα όπου έγινε σύγκριση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της *carp1* με την *carp2* στο συκώτι, στον εγκέφαλο, στους μυς, στα βράγχια, στο στομάχι και στο έντερο, ο μυς παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης των δύο γονιδίων, ενώ ο εγκέφαλος και το έντερο τα χαμηλότερα (Salem et al., 2005). Όπως προέκυψε από την παρούσα μελέτη, το ένα παράλογο (*Carp2a*) εκφράζεται περισσότερο στα λέπια, στα μάτια, στο δέρμα, στα βράγχια και καρδιά, ενώ το δεύτερο παράλογο (*Carp2b*) στα λέπια, στον εγκέφαλο, στο δέρμα, στα βράγχια και στην καρδιά. Διαπιστώνουμε πως και τα δύο παράλογα εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης τους στους ίδιους σχεδόν ιστούς, με το παράλογο *carp2b* να ξεπερνά την έκφραση του *carp2a* στους ιστούς που αναφέρθηκαν. Διαπιστώνουμε λοιπόν, πως η ενώ η καλπαΐνη 2 παρουσιάζει καθολική έκφραση, οι ιστοί που εμφανίζουν τα υψηλότερα και χαμηλότερα ποσοστά διαφέρουν ανά είδος, επομένως μπορεί να διαφέρει και ο ρόλος της καλπαΐνης σε κάθε ιστό.

Η έκφραση των καλπαϊνών των Τελεόστων φαίνεται να επηρεάζεται από την διατροφική κατάσταση του ψαριού. Πολλά ψάρια είναι προσαρμοσμένα σε μακρόχρονη στέρση τροφής. Ως απόκριση, το ψάρι χρησιμοποιεί τα ενεργειακά αποθέματα και μετά από μεγάλες χρονικές περιόδους νηστείας καταβολίζονται και οι πρωτεΐνες των σκελετικών μυών, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μυϊκή ατροφία (Navarro & Gutierrez, 1995). Στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*), 35 ημέρες νηστείας αύξησαν τα επίπεδα της καλπαΐνης 2 στους μυς (Preziosa et al., 2013) όπως και στην πέστροφα, όπου αυξήθηκε και η έκφραση της καλπασταΐνης. Αυτό δείχνει τον πιθανό ρόλο των καλπαϊνών στην χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών ως πηγή ενέργειας κάτω από καταβολικές συνθήκες (Salem et al., 2005). Αντιθέτως στον Ιππόγλωσσο του Ατλαντικού (*Hirroglossus hirroglossus*), 60 ημέρες νηστείας δεν έδειξαν να επηρεάζουν τα επίπεδα της καλπαΐνης 2 (Macqueen et al., 2010), επομένως η απόκριση στη νηστεία εξαρτάται από το είδος. Μία άλλη μελέτη στο λαβράκι αναφέρει πως σε μυς με υψηλή περιεκτικότητα λίπους παρατηρείται γρηγορότερη πρωτεόλυση post mortem, κάτι που μπορεί να συσχετίζει την ενεργοποίηση των καλπαϊνών με την συσσώρευση λιπιδίων (Bonnal et al., 2001).

Σχετικά με τον ρόλο της *Carp2* στους μυς του ψαριού γνωρίζουμε πως μετά την εξαλίευση, προκαλούνται διάφορες βιοχημικές αλλαγές στον μυϊκό ιστό που οδηγούν στην αποσύνθεση του. Το pH πέφτει λόγω της συσσώρευσης γαλακτικού οξέος, το ATP μειώνεται και η αποσύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών οδηγεί στην απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου στο κυτσοσόλιο. Αυτές οι αλλαγές συνδυάζονται με την πρωτεόλυση των μυοϊνιδίων και την αποσύνθεση της μυϊκής δομής και έτσι κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης η ποιότητα και η φρεσκάδα του φιλέτου μειώνεται (Delbarre-Ladrat et al., 2004). Στα θηλαστικά ο ρόλος των καλπαϊνών έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό διότι συμμετέχουν στην post mortem πρωτεόλυση που επηρεάζει την υφή του κρέατος (Koochmaraie, 1992). Συγκεκριμένα, έχουν ρόλο στην αποδόμηση των πρωτεϊνών των μυοϊνιδίων στα πρωταρχικά στάδια μετά τον θάνατο (Goll et al., 1992) και το μαλάκωμα του κρέατος επιταχύνεται από τη δράση τους (Koochmaraie, 1996). Όσο αναφορά τα υποστρώματά τους έχει βρεθεί πως υδρολύουν την

δεσμίνη, την τροπονίνη T, την τιτίνη και την νεμπουλίνη, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζουν την μυοσίνη ή την ακτίνη (Koochmaraie, 1992).

Στα ψάρια ο ρόλος των καλπαϊνών post mortem παραμένει αμφιλεγόμενος. Έχει αναφερθεί ότι συμμετέχουν στην αποδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών των ψαριών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, σε συνεργασία με τις καθεψίνες (Chéret et al., 2007; Delbarre-Ladrat et al., 2006). Επίσης, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, οι καλπαΐνες των ψαριών μπορούν και πρωτεολύουν την βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (Muramoto et al., 1989). Ανάλογα με το είδος του ψαριού ο βαθμός της πρωτεόλυσης αλλά και τα μόρια που πρωτεολύονται μπορεί να διαφέρουν. Για παράδειγμα στο λαβράκι οι αλλαγές περιλαμβάνουν την απόσπαση της πλασματικής μεμβράνης των μυοϊνιδίων (σαρκεϊλημμα), την αποδόμηση της τιτίνης και νεμπουλίνης, την αποκόλληση της α-ακτινίνης από την γραμμή Z, όπως και την αποικοδόμηση της δυστροφίνης (Astier et al., 1991 ; Para et al., 1996 ; Para et al., 1997). Η δυστροφίνη παρουσιάζεται ιδιαίτερα ευαίσθητη στην δράση των καλπαϊνών και μελέτες σε λευκό μυ από λαβράκι έδειξαν ότι το 60% του συνόλου της δυστροφίνης είχε διασπαστεί στις πρώτες 24 ώρες και διασπάστηκε πλήρως μετά από 2 ημέρες αποθήκευσης στους 4° C (Para et al., 1997). Η δεσμίνη αντίθετως δεν φαίνεται να επηρεάζεται στο λαβράκι, αλλά υδρολύεται στο καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) και τη σαρδέλα (*Sardina pilchardus*) (Verrez-Bagnis et al., 1999).

Επιπλέον, ο ρυθμός και ο βαθμός αποικοδόμησης εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα οι μύες των πελαγικών ψαριών αποικοδομούνται γρηγορότερα σε σχέση με τους μύες των ψαριών που ζουν στους ωκεανούς. Και αυτό διότι τα πελαγικά ψάρια έχουν υψηλό μεταβολικό ρυθμό και κατ' επέκταση μεγαλύτερο ρυθμό νεκρικής ακαμψίας (Daskalova, A, 2019). Επίσης, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, αλλά και οι πρωτεάσες μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με την εποχή. Η σεξουαλική ωρίμανση και η περίοδος ωοτοκίας οδηγούν σε αλλαγές στα ψάρια εξαιτίας της μεταβολής των ορμονών (Ando et al., 1985). Αυτές οι αλλαγές αφορούν τόσο την μυϊκή σύνθεση όσο και τις πρωτεάσες όπως έχει αναφερθεί στο *Plecoglossus altivelis* (Toyohara et al., 1985) και στη σαρδέλα (Gómez-Guillén & Batista, 1997). Για παράδειγμα, στο λαβράκι η μ-καλπαΐνη εντοπίζεται στους μύς μόνο κατά την περίοδο της ωοτοκίας (Delbarre-Ladrat et al., 2006), όπου έχει βρεθεί πως η αποδόμηση των μυϊκών πρωτεϊνών είναι αυξημένη (Ladrat et al., 2000).

Τέλος, πολύ σημαντικό ρόλο έχουν και οι συνθήκες κατά την αποθήκευση του ψαριού. Η δραστηριότητα των καλπαϊνών post mortem μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες όπως το pH, η συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου, η διαμερισματοποίηση στο κύτταρο, καθώς και συγκέντρωση της καλπαστατίνης, του ενδογενούς αναστολέα της (Delbarre-Ladrat et al., 2004). Έχει αναφερθεί γρήγορη μείωση στην ενεργότητα της μ-καλπαΐνης σε κρύες συνθήκες αποθήκευσης (Hultmann and Rustad, 2007), ενώ αντίθετα η m-καλπαΐνη παρέμεινε σταθερή 7 ημέρες post mortem στους μύς σε λαβράκι (Chéret et al., 2006). Η προσθήκη αλατιού κατά την αποθήκευση φαίνεται να αναστέλλει την πρωτεολυτική δράση των καλπαϊνών στους μύς στην τιλάπια (Wang & Jiang, 1991). Επίσης η μείωση του pH από ουδέτερο σε όξινο κατά τη διάρκεια της postmortem αποθήκευσης οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα καλπαϊνών (Wang and Jiang, 1991), καθώς είναι γνωστό πως η μέγιστη δραστηριότητά τους εμφανίζεται σε pH>7 (Sorimachi et al., 2011 a). Όσο αναφορά την καλπαστατίνη, γνωρίζουμε πως εμποδίζει την αυτόλυση των καλπαϊνών και άρα την ενεργοποίησή τους, παρουσία ασβεστίου (Delbarre-Ladrat et al., 2004). Στα θηλαστικά τα επίπεδα της καλπαστατίνης στους μύς μειώνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Thomson et al., 1996; Zamora et al., 1996). Στο λαβράκι τα επίπεδα της καλπαστατίνης κατά την αποθήκευση παρέμειναν σταθερά (Delbarre-Ladrat et al., 2004), ενώ στον μπακαλιάρο (*Ghadhus morhua*) (Hultmann & Rustad, 2007) και στον σολομό (*Salmo salar* L) η δράση της καλπαστατίνης αυξήθηκε (Gaarder et al., 2012).

Καταλήγοντας, είναι σημαντικό να συνεχίσουν οι έρευνες σχετικά με την CAPN2, ώστε να διασαφηνιστεί αν επηρεάζει την υφή του μυ του ψαριού, ποιες πρωτεΐνες υδρολύει και σε ποιο βαθμό. Εκτός από την καλπαΐνη 2, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί παράλληλα και ο ενδογενής της αναστολέας η καλπαστατίνη, η οποία επηρεάζει την ενεργοποίησή της. Οι έρευνες θα πρέπει να επεκταθούν σε διάφορα είδη ψαριών, ιδιαίτερα σε αυτά που έχουν οικονομική σημασία και ζήτηση προς κατανάλωση, διότι η διαδικασία της *post mortem* πρωτεόλυσης εμφανίζει μεγάλη διακύμανση στους διαφορετικούς οργανισμούς. Περαιτέρω φυλογενετικές μελέτες αλλά και λειτουργικές, θα μπορούσαν να διεξαχθούν και σε άλλα μέλη της οικογένειας των καλπαϊνών, τόσο για να εμπλουτιστεί η βιβλιογραφία σχετικά με την εξελικτική πορεία των καλπαϊνών στους ιχθύες, όσο και για να καθοριστεί η συμβολή άλλων καλπαϊνών στην μυϊκή πρωτεόλυση.

## Βιβλιογραφία

Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W. A. & Vasiljevic, T. Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.* **45**, 130–146 (2015).

Ajawatanawong, P. Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **123**, 127–141 (2016).

Ando, M., Yoshimoto, Y., Inabu, K., Nakagawa, T., and Makinodan, Y. 1995. Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization. *Fisheries Sci.*, 61(2), 327–330.

Arya, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **5**, 209–219 (2005).

Astier, C., Labbe, J.-P., Roustan, C., and Benyamin, Y. 1991. Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100B**(3):459–465.

Bagni, M. (2019, December). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchus labrax*. Retrieved from

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus\\_labrax/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en)

Bonnal C, Raynaud F, Astier F, Lebart MC, Marcilhac A, et al. (2001) Postmortem degradation of white fish skeletal muscle sea bass, (*Dicentrarchus labrax*): fat diet effects on in situ dystrophin proteolysis during the prerigor stage. *Mar Biotech* 3: 172–180.

Cañestro, C., Albalat, R., Irimia, M. & Garcia-Fernández, J. Impact of gene gains, losses and duplication modes on the origin and diversification of vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 83–94 (2013).

Cardoso, J. F. M. F. *et al.* The European sea bass *Dicentrarchus labrax* in the Dutch Wadden Sea: From visitor to resident species. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **95**, 839–850 (2015).

Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M. de & Verrez-Bagnis, V. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.* **101**, 1474–1479 (2007).

Chéret, R., Hernandez-Andres, A., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie, M., Verrez-Bagnis, V., 2006. Proteins and proteolytic activity changes during refrigerated storage in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle after high-pressure treatment. *European Food Research and Technology* 222, 527–535.

Christoffels, A. *et al.* Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1146–1151 (2004).

Colnaghi, R., Carpenter, G., Volker, M. & O'Driscoll, M. The consequences of structural genomic alterations in humans: Genomic Disorders, genomic instability and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 875–885 (2011).

Crocetta, F. (2003, May 17). Dicentrarchus labrax. Retrieved from

<https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?StartRow=8&ID=63&what=species&TotRec=15>

Daskalova, A. Farmed fish welfare: stress, post-mortem muscle metabolism, and stress-related meat quality changes. *Int. Aquat. Res.* **11**, 113–124 (2019).

De Moraes Russo, C. A. & Selvatti, A. P. Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 2327–2333 (2018).

Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. & Verrez-Bagnis, V. Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 409–421 (2006).

Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: Time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chem.* **84**, 441–446 (2004).

EUMOFA (2018) Case Study: Seabass in the EU. European Commission, Brussels.

Froese, R. & Luna, S.M., (2019, December). Dicentrarchus Labrax. Retrieved from <https://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?ID=63&AT=european+bass>

Gaarder, M., Bahuaud, D., Veiseth-Kent, E., Mørkøre, T. & Thomassen, M. S. Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chem.* **132**, 9–17 (2012).

Gavalas, A., Krumlauf, R. Hox Genes. *Encycl. Genet.* 978 (2001). doi:10.1006/rwgn.2001.0639

Glasauer, S. M. K. & Neuhauss, S. C. F. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics* **289**, 1045–1060 (2014).

Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R.G., Christiansen, J.A., 1992. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie* 74, 225– 237.

Gómez-Guillén, M. C. & Batista, I. Seasonal changes and preliminary characterization of cathepsin D-like activity in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.* **32**, 255–260 (1997).

Grindley, N. D. F. Specialized Recombination. *Encycl. Genet.* 1857–1858 (2001). doi:10.1006/rwgn.2001.1215

Guo, B. Complex Genes Are Preferentially Retained After Whole-Genome Duplication in Teleost Fish. *J. Mol. Evol.* **84**, 253–258 (2017).

Hanna, R. A., Campbell, R. L. & Davies, P. L. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. **456**, 409–413 (2008).

Hultmann, L., Rustad, T., 2007. Effects of temperature abuse on textural properties and proteolytic activities during post mortem iced storage of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry* 104, 1687–1697.

Hurles, M. Gene duplication: The genomic trade in spare parts. *PLoS Biol.* **2**, (2004).

Janssen K., Chavanne H., Berentsen P. & Komen H. (2017) Impact of selective breeding on European aquaculture. *Aquaculture* 472, 8–16.

Jékely G, Friedrich P. 1999 The evolution of the calpain family as reflected in paralogous chromosome regions. *J. Mol. Evol.* 49, 272–281.

Kasahara, M. The 2R hypothesis: an update. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 547–552 (2007).

Khorchid, A. & Ikura, M. How calpain is activated by calcium. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 239–241 (2002).

Koohmaraie, M., 1992. The role of Ca<sup>2+</sup>- dependent proteases in post-mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie* 74, 239-245

Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.* 43(suppl.), S193–S201.

Koonin, E. V. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309–338 (2005).

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).

Ladrat, C., Chaplet, M., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: Polymorphism and biochemical studies. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **125**, 83–95 (2000).

Le, S. Q. & Gascuel, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1307–1320 (2008).

Lepage SE, Bruce AE. (2008) Characterization and comparative expression of zebrafish calpain system genes during early development. *Dev. Dyn.* 237, 819–829.

Listrat, A. *et al.* How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.* **2016**, (2016).

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Macqueen, D. J. *et al.* Characterisation of capn1, capn2-like, capn3 and capn11 genes in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Transcriptional regulation across tissues and in skeletal muscle at distinct nutritional states. *Gene* **453**, 45–58 (2010).

Macqueen, D. J. & Wilcox, A. H. Characterization of the definitive classical calpain family of vertebrates using phylogenetic, evolutionary and expression analyses. *Open Biol.* **4**, (2014).



- Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D. & Ravikesavan, R. Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* **92**, 155–161 (2013).
- Moldoveanu, T. *et al.* A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649–660 (2002).
- Moldoveanu, T., Jia, Z. & Davies, P. L. Calpain Activation by Cooperative Ca<sup>2+</sup> Binding at Two Non-EF-hand Sites. *J. Biol. Chem.* **279**, 6106–6114 (2004).
- Muramoto, M., Yamamoto, Y., Seki, N., 1989. Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bull. Jpn.Soc. Sci. Fish.* **55**, 917– 923.
- Navarro I, Gutierrez J (1995) Fasting and starvation. In: Hochachka PW, Mommsen TP editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4. Elsevier Science BV. pp. 393–434.
- Ohno, S. ed., (1970). *Evolution by Gene duplication*. New York: Springer-Verlag.
- Ono, Y. & Sorimachi, H. Calpains - An elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 224–236 (2012).
- Pannunzio, N. R., Watanabe, G. & Lieber, M. R. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **293**, 10512–10523 (2018).
- Papa, I., Taylor, R.G., Astier, C., Ventre, F., Lebart, M.C., Roustan, C., Ouali, A., and Benyamin, Y. 1997. Dystrophin cleavage and sarcolemma detachment are early post mortem changes on bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle. *J. Food Sci.*, **62**(5):917–921.
- Papa, I., Alvarez, C., Verrez-Bagnis, V., Fleurence, J., and Benyamin, Y. 1996. *Post mortem* release of fish white muscle  $\alpha$ -actinin as a marker of disorganisation. *J. Sci. Food Agric.*, **72**(1):63–70
- Pei, J. Multiple protein sequence alignment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 382–386 (2008).
- Perez-Ruzafa, A. and Marcos, C. (2014). Ecology and distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758). In: Sanchez
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res.* **29**, 2002–2007 (2001)
- Pickett G.D. & Pawson M.G. (1994) *Seabass – Biology, Exploitation and Conservation*. Chapman & Hall, London.
- Reams, A. and Amplification of. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **7**, 1–25 (2015).
- Russell, P. J. (2006). *IGenetics: A Mendelian approach*. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.
- Saido, T. C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H. & Suzuki, K. Positive regulation of  $\mu$ -calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **267**, 24585–24590 (1992).

- Saito, M., Li, H., Thompson, V. F., Kunisaki, N. & Goll, D. E. Purification and characterization of calpain and calpastatin from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **146**, 445–455 (2007).
- Salem, M., Nath, J., Rexroad, C. E., Killefer, J. & Yao, J. Identification and molecular characterization of the rainbow trout calpains (Capn1 and Capn2): Their expression in muscle wasting during starvation. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **140**, 63–71 (2005).
- Salmerón, C. *et al.* Characterisation and Expression of Calpain Family Members in Relation to Nutritional Status, Diet Composition and Flesh Texture in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *PLoS One* **8**, (2013).
- Singh, A. & Benjakul, S. Proteolysis and Its Control Using Protease Inhibitors in Fish and Fish Products: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **17**, 496–509 (2018).
- Sorimachi, H., Hata, S., Ono, Y. Review Calpain chronicle — an enzyme family under multidisciplinary characterization. **87**, 287–327 (2011a).
- Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.* **150**, 23–37 (2011b).
- Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp. Anim.* **59**, 549–566 (2010).
- Sorimachi, H. & Ono, Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc. Res.* **96**, 11–22 (2012).
- Stella, M. K. & Stephan, C. F. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. University of Zurich, Institute of Molecular Life Sciences, Neuroscience Center Zurich and Molecula. **289**, 1045–1060 (2014).
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y. & Sorimachi, H. Structure, Activation, and Biology of Calpain. *Diabetes* **53**, (2004).
- Tine, M. *et al.* European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nat. Commun.* **5**, 5770 (2014).
- Tirosh, I., Bilu, Y. & Barkai, N. Comparative biology: beyond sequence analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 371–377 (2007).
- Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. & Friedrich, P. Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1333–1339 (2001).
- Thomson, B. C., Dobbie, P. M., Singh, K. & Speck, P. A. (1996). Post-mortem kinetics of meat tenderness and the components of the calpain system in bull skeletal muscle. *Meat Science*, **44**(3), 151–157.
- Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J. S., Meyer, A. & Van De Peer, Y. Major events in the genome evolution of vertebrates: Paraneome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1638–1643 (2004).

Vandeputte, M., Gagnaire, P. A. & Allal, F. The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Anim. Genet.* **50**, 195–206 (2019).

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 1–12 (2002).

Verrez-Bagnis, V., Noël, J., Sauterau, C., and Fleurence, J. 1999. Desmin degradation in postmortem fish muscle. *J. Food Sci.*, **64**(2):240–242.

Wang J-H, Jiang S-T. 1991. Properties of calpain II from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* × *Tilapia aurea*). *Agric Biol Chem* 55(2):339–45.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296-W303 (2018).

Wendt, A., Thompson, V. F. & Goll, D. E. Interaction of calpastatin with calpain: A review. *Biol. Chem.* **385**, 465–472 (2004).

Whelan, S. & Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 691–699 (2001).

Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E., & Ouali, A. (1996). Prediction variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Science*, 43(3–4), 321–333

Zhang, J. Evolution by gene duplication: An update. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 292–298 (2003).