



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Πλαστικότητα στα οντογενετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης στο λαβράκι  
(*Dicentrarchus labrax*)»

«Plasticity in the ontogenetic patterns of gene expression in European sea bass  
(*Dicentrarchus labrax*)»



Sea Bass  
*Dicentrarchus labrax*

Φουτσιλή Αλεξία – Ευαγγελία

Λάρισα, 2020

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

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

➤ Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

➤ Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

➤ Σαραφίδου Θεολογία

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

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Κατερίνας Μούτου την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου, την βοήθεια και την συνεχή καθοδήγηση.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο και την υποψήφια διδάκτορα Λαμπρινή Τζιόγα για την πολύτιμη βοήθεια τους, καθώς είχα την χαρά και τύχη να συνεργαστώ καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη που απαρτίζουν το εργαστήριο για τις συμβουλές τους, για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία.

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

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της φαινοτυπικής πολυπλοκότητας είναι ο γονιδιωματικός διπλασιασμός. Δύο γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος οι οποίοι είναι κοινοί για τα σπονδυλωτά είναι ικανοί να δημιουργήσουν ένα πλουραλισμό στη τύχη των γονιδίων και των λειτουργιών αυτών. Ένας επιπλέον γύρος διπλασιασμού που συνέβη πριν περίπου 350 εκατομμύρια χρόνια στη βάση της γενεαλογίας των τελεόστεων οδήγησε στη δημιουργία παραπάνω αντιγράφων. Ένα από τα είδη στα οποία η διερεύνηση του αποτυπώματος του τρίτου διπλασιασμού του γονιδιώματος έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από επιστημονική σκοπιά, είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) καθώς αποτελεί ένα είδος με ποικίλες προσαρμογές και με υψηλή εμπορική αξίας λόγω της συστηματικής εκτροφής του σε ιχθυοκαλλιέργειες τα τελευταία 25 χρόνια. Η μελέτη αυτού του είδους έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από εξελικτικής, λειτουργικής και εμπορικής αξιοποίησής του. Είναι επομένως σημαντικό να προσδιοριστούν τα στάδια, οι μηχανισμοί, τα γονίδια και μια ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ιχθυδίου. Ένας από τους κυρίαρχους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας, η οποία είναι η κινητήριος δύναμη για σχεδόν όλες τις λειτουργίες, είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση η οποία πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια.

Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με τον μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα οποία έχουν προέλθει από τον τρίτο διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του ιχθυδίου. Συγκεκριμένα, μελετώνται δύο γονίδια με καταλυτικό ρόλο από το σύμπλοκο I (οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q) και έξι γονίδια από το σύμπλοκο III (οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c) κάποια με ρυθμιστικό και κάποια με καταλυτικό ρόλο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο έκφρασης των γονιδίων για τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν το οποίο δείχνει μια αρχικά αυξημένη έκφραση κατά το στάδιο του πρώτου ταΐσματος, πτώση και σταδιακή αύξηση για τα δύο επόμενα στάδια ανάπτυξης, κάμψη της νωτοχορδής και τέλος νυμφικής εκτροφής, και εκ νέου αύξηση της έκφρασης κατά το μέσο της μεταμόρφωσης. Το μοτίβο αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με βάση τις αναπτυξιακές μεταβολές και τις ενεργειακές απαιτήσεις.

## ABSTRACT

One of the key mechanisms that plays an important role in the evolution of phenotypic complexity is genomic duplication. Two rounds of whole genome duplication that are common to vertebrates are capable of creating a pluralism in the fate of these genes and their functions. An additional round of duplication that occurred about 350 million years ago on the basis of the genealogy of the teleosts led to the creation of more copies. One of the species in which the investigation fingerprint of the third duplication of the genome has particular interest from a scientific point of view, is the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as it is a species with various adaptations and high commercial value due to its systematic breeding in fish farms for the last 25 years. The study of this species is of particular interest from its evolutionary, functional and commercial utilization. Therefore, it is important to identify the stages, mechanisms, genes and a variety of factors that affect juvenile development. One of the dominant mechanisms of energy production, which is the driving force for almost all functions, is the oxidative phosphorylation that takes place in mitochondria.

The present study investigates the changes in expression levels of specific genes involved in the mechanism of oxidative phosphorylation, which have resulted from the third duplication of the entire genome in early juvenile developmental stages. Specifically, are studied, two genes with a catalytic role from complex I (NADH - ubiquinone oxidoreductase) and six genes from complex III (ubiquinone - cytochrome c oxidoreductase), some of them have a regulatory and some of them have a catalytic role.

The results showed that there is a characteristic pattern of gene expression for the developmental stages under study that shows an initially high expression during the first feeding stage, a decrease and a gradual increase for the next two developmental stages, flexion and end of larval rearing. Finally, re-increase expression through mid metamorphosis. This pattern can be interpreted based on developmental changes and energy requirements.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Το λαβράκι.....	8
1.1.1 Συστηματική κατάταξη και χαρακτηριστικά.....	8
1.1.2 Γεωγραφική αποίκηση.....	8
1.1.3 Οικονομική σημασία.....	9
1.2 Αναπτυξιακά στάδια στους τελεόστεους.....	10
1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	13
1.3.1 Μιτοχόνδριο .....	14
1.3.2 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	16
1.3.3 Ρόλος του πυρηνικού DNA στην οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	18
1.3.4 Συνεξέλιξη των δύο γονιδιωμάτων.....	18
1.3.5 Μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.....	19
1.3.6 Αρχιτεκτονική της αναπνευστικής αλυσίδας.....	21
1.3.7 Σχηματισμός υπερσυμπλόκων.....	32
1.4 Το γονιδίωμα των τελεοστέων.....	34
1.4.1 Πρώτος και δεύτερος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά.....	34
1.4.2 Ο τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στους τελεόστεους.....	35
1.4.3 «Μοίρα» των διπλασιασμένων γονιδίων και επιπτώσεις πολυπλοειδίας.....	36
1.5 Σκοπός .....	38
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων.....	39
2.2 Προσδιορισμός των δειγμάτων.....	39
2.3 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA.....	40

2.4 Γονίδια αναφοράς.....	40
2.5 Γονίδια στόχοι .....	41
2.6 Σχεδιασμός εκκινητών.....	41
2.7 Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης: Real-time PCR.....	43
2.7.1 Αρχή της μεθόδου.....	43
2.7.2 Πρωτόκολλο της Real-time PCR.....	43
2.7.3 Πρότυπη καμπύλη και υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης.....	44
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3.1 Έκφραση γονιδίου <i>ndufs1a</i> .....	47
3.2 Έκφραση γονιδίου <i>ndufs1b</i> .....	48
3.3 Έκφραση γονιδίου <i>uqcr11a</i> .....	50
3.4 Έκφραση γονιδίου <i>uqcr11b</i> .....	51
3.5 Έκφραση γονιδίου <i>uqcrfs1a</i> .....	53
3.6 Έκφραση γονιδίου <i>uqcrfs1b</i> .....	54
3.7 Έκφραση γονιδίου <i>uqcrhb</i> .....	56
3.8 Έκφραση γονιδίου <i>uqcr2a</i> .....	57
3.9 Λόγος των παραλόγων <i>ndufs1a_ndufs1b</i> .....	59
3.10 Λόγος των παραλόγων <i>uqcr11a_uqcr11b</i> .....	60
3.11 Λόγος των παραλόγων <i>uqcrfs1a_uqcrfs1b</i> .....	62
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Το λαβράκι

#### 1.1.1 Συστηματική κατάταξη και χαρακτηριστικά

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) ανήκει στους γονοχωριστικούς τελεόστεους, μια από τις τρεις υπερτάξεις των ακτινοπτερύγιων (Πίνακας 1). Η ομάδα των τελεοστέων είναι η πιο πολυπληθής των σπονδυλωτών με περισσότερα από 30.000 είδη. Το λαβράκι έχει κυκλικό και επίμηκες σώμα, πλατύ στόμα με μικρά μυτερά δόντια. Το χρώμα του είναι ασημί, πιο ανοιχτό στη κοιλία και πιο σκούρο στη πλάτη. Τα μικρά ιχθύδια φέρουν μαύρα στίγματα συνήθως σε πλάτη και πλευρά. Έχει μήκος 40 με 65 εκατοστά, με πιο κοινό τα 50 εκατοστά, αν και μπορεί να φτάσει το 1 μέτρο. Ζυγίζει 5 με 7 κιλά και το μέγιστο είναι τα 12 κιλά (fishbase). Αν και μπορεί να ζήσει σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 5-28 °C αν υπάρχει καλή ανανέωση του νερού, η βέλτιστη είναι 22-24 °C. Αναπαράγεται μία φορά το χρόνο κυρίως χειμώνα προς άνοιξη, από Δεκέμβριο έως Μάρτιο, καθώς χρειάζεται χαμηλές θερμοκρασίες για την ωοτοκία (Bagni, 2005).

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους *Dicentrarchus labrax*

-	Συνομοταξία	Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος
Ζώα	Χορδωτά	Ακτινοπτερύγια	Περκόμορφα	Μορονίδες	<i>Dicentrarchus</i>	<i>D. labrax</i>

#### 1.1.2 Γεωγραφική αποίκηση

Χωρίζεται σε γενετικά διακριτές γενεαλογίες όπου η μία καταλαμβάνει περιοχές του βορειοανατολικού Ατλαντικού Ωκεανού (Νορβηγία προς Μαρόκο, Κανάριοι Νήσοι και Σενεγάλη) και η άλλη Μεσόγειο και Μαύρη θάλασσα. Απουσιάζει από Λευκή, Μπάρεντς, Βαλτική και Κασπία θάλασσα. Αυτές οι γενεαλογίες συναντώνται μεταξύ τους, και υβριδοποιούνται φυσικά στη θάλασσα του Αλμποράν (Εικόνα 1). Εντοπίζεται γεωγραφικά μεταξύ των συντεταγμένων 72 °B - 11 ° B, 19 ° Δ - 42 ° A (Tine et al., 2014).

Ζει σε ρηγά, παράκτια ύδατα, εκβολές ποταμών, λιμνοθάλασσες και λιμάνια, κινούμενο σε βαθύτερα νερά (έως και 100 μέτρα βάθος) καθώς μεγαλώνει. Το είδος



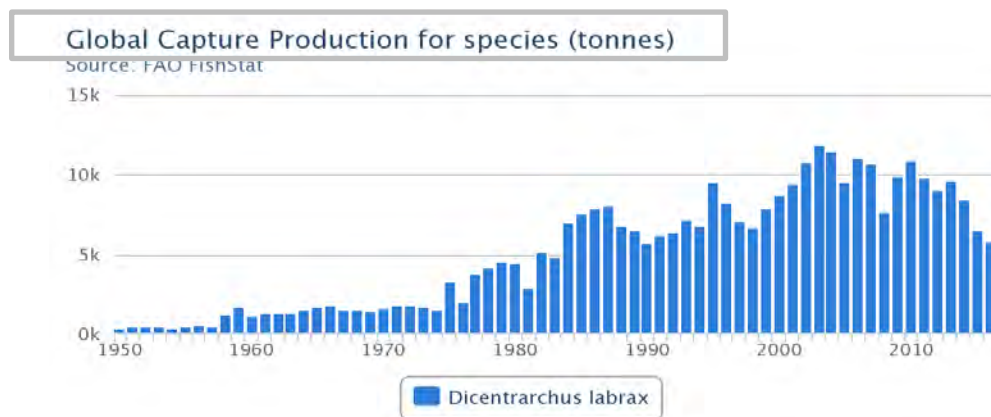
είναι ευρύαλο, δηλαδή έχει την ικανότητα να επιβιώνει σε νερά ποικίλης αλατότητας και έτσι μπορεί να εισέρχεται σε υφάλμυρα και γλυκά νερά. Στο πρώτο στάδιο ανάπτυξης χρειάζεται 20-30% αλατότητα (fishbase, Bagni, 2005).



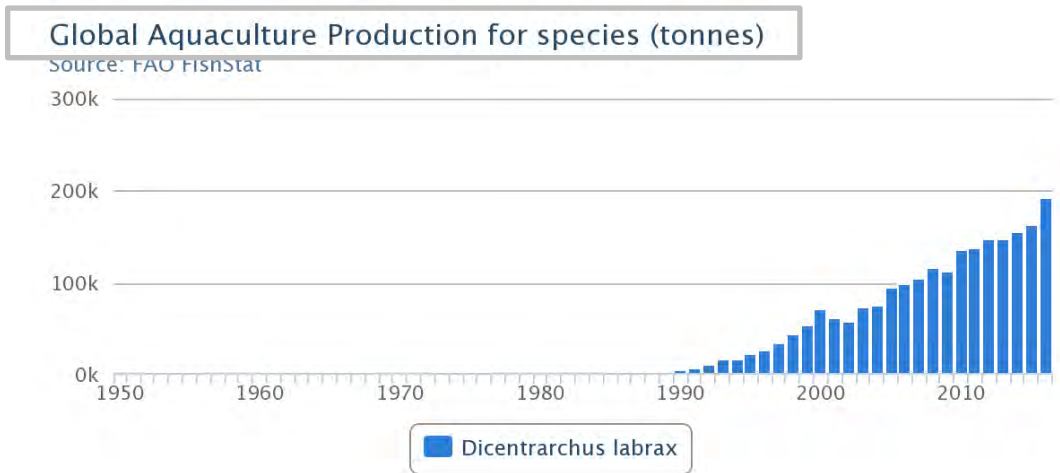
Εικόνα 1: γεωγραφική κατανομή του είδους *Dicentrarchus labrax* (Bagni., 2005).

### 1.1.3 Οικονομική σημασία

Το λαβράκι αποτελεί ένα είδος με υψηλή εμπορική αξίας λόγω της αλιείας (Γράφημα 1), αλλά κυρίως λόγω της συστηματικής εκτροφής του σε ιχθυοκαλλιέργειες το τελευταία 25 χρόνια (Γράφημα 2). Είναι ένα από τα κύρια εκτρεφόμενα είδη της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας και οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή είναι οι: Ισπανία, Ιταλία, Κροατία, Αίγυπτος, Τουρκία και Ελλάδα. Ενδεικτικά το 2010 κινήθηκαν στην αγορά παραπάνω από 120.000 τόνοι λαβρακιού, φέρνοντάς το στην τέταρτη θέση παραγωγής παγκόσμια (Tine et al., 2014).



Γράφημα 1: Στατιστικά στοιχεία αλιείας του λαβρακιού, 1950-2016 (Bagni, 2005).



Γράφημα 2: Στατιστικά στοιχεία παραγωγής του λαβρακιού σε ιχθυοκαλλιέργειες, 1950-2016 (Bagni, 2005).

### 1.2 Αναπτυξιακά στάδια στους τελεόστεους

Το λαβράκι ωοτοκεί σε ανοικτά νερά αργά το χειμώνα - νωρίς την άνοιξη, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος. Γενικά, προτιμούν χαμηλές θερμοκρασίες για ωοτοκία, περίπου 13-15 °C. Τα αυγά τους εκκολάπτονται σε τέσσερις με εννιά ημέρες και τα νεαρά ψάρια μετακινούνται παράκτια στον πρώτο μήνα τους, προς τα θερμότερα νερά, ειδικά στις εκβολές ποταμών. Ανήκει στους γονοχωριστικούς τελεόστεους και δε διαθέτει μορφολογικά διακριτά χρωμοσώματα φύλου. Το λαβράκι δεν παρουσιάζει εξωτερικό σεξουαλικό διμορφισμό, και η ιστολογική διαφοροποίηση των γονάδων δεν έχει ολοκληρωθεί μέχρι σχεδόν το τέλος του πρώτου έτους ζωής (Zanuy et al., 2001).

Ο διαχωρισμός των αναπτυξιακών σταδίων βασίζεται σε μορφολογικά, ιστολογικά και σχετικά με την φυσιολογία χαρακτηριστικά (Εικόνες 2 και 3) (Le Ruyer et al., 1993). Η ζωή ξεκινά με την σύντηξη αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Μόλις γονιμοποιηθεί το ωάριο από σπέρμα, το ζυγωτό σχηματίζεται και η εμβρυϊκή ανάπτυξη ξεκινά και καταλήγει στην εκκόλαση. Αυτό είναι το πρώτο στάδιο που ονομάζεται και στάδιο αυγού (egg stage). Η ονομασία αυτή προτιμάται σε σχέση με την "εμβρυϊκή ανάπτυξη" καθώς υπάρχουν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το αυγό και όχι μόνο με το έμβρυο (Kendall et al., 1984). Κατά την εκκόλαση έχουν μέγεθος περίπου 4mm, βάρος 0,3-0,4 mg και μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικό βαθμό ανάπτυξης ανάλογα με το μέγεθος του λεκιθικού σάκου. Οι προνύμφες από αυγά με μικρούς λεκιθικούς σάκους είναι λιγότερο ανεπτυγμένες κατά την εκκόλαση από εκείνες που εκκολάπτονται από αυγά με μεγαλύτερους. Οι προνύμφες αυτού του σταδίου συνήθως στερούνται λειτουργικότητας

του στόματος, χρωματισμού του οφθαλμού και διαφοροποιημένων πτερυγίων (Kendell et al., 1984). Οι προνύμφες ανοίγουν το στόμα τους κατά την 6 ημερά μετά την εκκόλαψη (DPH, Days Post Hatching), αλλά δεν καταναλώνουν εξωγενή τροφή μόλις ανοίξουν το στόμα τους. Υπάρχει μια μεταβατική περίοδος όπου τρέφεται ακόμα με λεκιθικά θρεπτικά και γίνεται προσπάθεια να τραφεί με εξωγενή τροφή. Αφού τελειώσει η λεκιθοτροφική φάση, το ιχθύδιο πρέπει να αναζητήσει άλλο είδος τροφής και από την 9 - 10 DPH τρέφεται αποκλειστικά από εξωγενή πηγή κυρίως το πλαγκτόν (Deplano et al., 1991). Η επιβίωση της προνύμφης εξαρτάται επιπλέον από τη διαθεσιμότητα της τροφής σε επαρκή ποσότητα και ποιότητα μετά από την ολοκλήρωση του σταδίου εξάντλησης των αποθεμάτων της λεκίθου. Επομένως, υφίστανται ισχυρές επιλεκτικές πιέσεις στο άτομο, γεγονός που καθιστά απαραίτητο τον σωστό συγχρονισμό της ολοκλήρωσης της απορρόφησης της λεκίθου και της ανάπτυξης της δυνατότητας εξωγενούς πρόσληψης τροφής. (Heming et al., 1988). Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου παρατηρείται μια "κρίσιμη" περίοδος θνησιμότητας που ξεκινά κατά την πρώιμη σίτιση και διαρκεί 7-10 ημέρες (Victor China, Holzman, 2014).

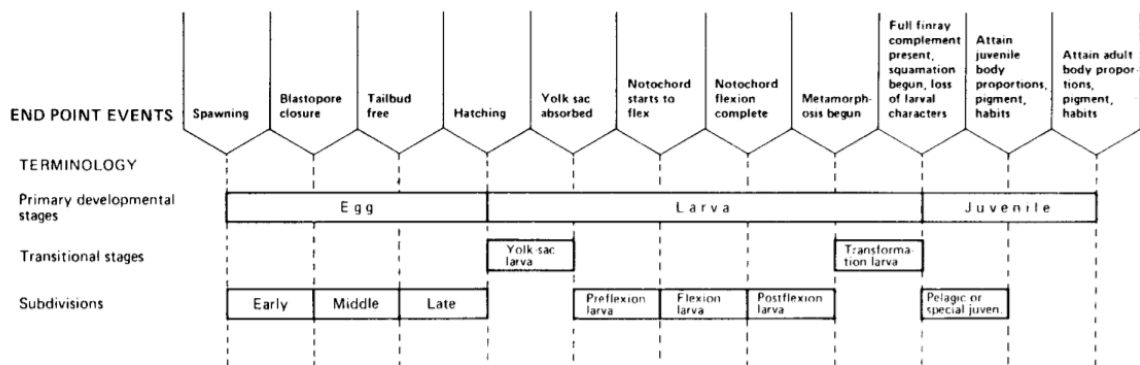
Το δεύτερο στάδιο ή αλλιώς στάδιο της προνύμφης (larvae stage) αφορά την περίοδο μεταξύ της εκκόλαψης και της μεταμόρφωσης. Ένα από τα θεμελιώδη γεγονότα στην ανάπτυξη των περισσότερων ψαριών είναι η κάμψη της νωτοχορδής που συνοδεύει την ανάπτυξη του ουριαίου πτερυγίου, τα οποία πραγματοποιούνται σε αυτό το στάδιο. Το στάδιο αυτό μπορεί να χωριστεί σε προνύμφη προ-κάμψης (preflexion), προνύμφη κάμψης (flexion) και προνύμφη μετά κάμψης (postflexion). Στο στάδιο flexion, υπάρχει ταχεία αύξηση των πτερυγίων, αλλαγή στο σώμα και στο σχήμα, δηλαδή θωρακικά, πτερύγια είναι ιδιαίτερα εμφανή ενώ η ανάπτυξη του εντέρου σε σημείο που αυτό είναι λειτουργικό βρίσκεται σε εξέλιξη. Επιπλέον, εντοπίζεται και ικανή ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης. Το postflexion χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό οργανιδίων κατά την φάση αυτή και η προνύμφη παρουσιάζει όλα τα τυπικά χαρακτηριστικά ενός ενήλικου ατόμου από την άποψη τόσο της εξωτερικής όσο και της εσωτερικής ανατομίας. Το νευρο-μυοσκελετικό σύστημα είναι καλά ανεπτυγμένο ενώ η κινητικότητα της προνύμφης είναι ιδιαίτερα έντονη. Στο τέλος του σταδίου της προνύμφης, πιθανότατα, περνούν μέσω μιας απότομης μεταμόρφωσης στο στάδιο της νεανικής ηλικίας ειδικά εάν υπάρχει μετακίνηση από πελαγικό σε βενθικό βιότοπο αλλιώς ο μετασχηματισμός μπορεί να είναι σταδιακός (Kendall et al., 1984).

Τέλος το τρίτο στάδιο αφορά την ενηλικίωση (juvenile stage), ολοκλήρωση των πτερυγίων και περεταίρω μεταβολές μέχρι να φτάσει στην ενηλικίωση και στη

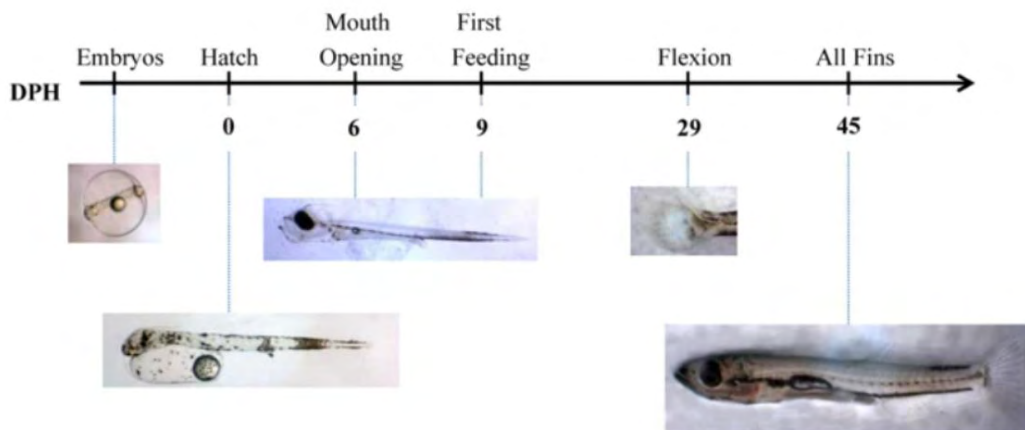
αναπαραγωγική ωριμότητα. Η μεταμόρφωση εμφανίζεται σε αυτό το στάδιο και ολοκληρώνεται όταν το ψάρι αποκτήσει τα χαρακτηριστικά του νεαρού ιχθυδίου. Δεν χαρακτηρίζεται πλέον από τα τυπικά χαρακτηριστικά προνύμφης και τα λέπια καθώς και τα ακτινωτά περύγια είναι καλά σχηματισμένα. Λόγω της αύξησης του μεγέθους του σώματος η ενέργεια που απαιτείται για την κίνηση είναι πολύ αυξημένη (Πίνακας 2).

Τα μεταβατικά στάδια χαρακτηρίζονται και ως:

- α) προνύμφες λεκιθικού σάκου ( yolk-sac larval stage) , από την εκκόλαση έως την εξάντληση της λεκίθου
- β) στάδιο μεταμόρφωσης ( transformation stage), μεταξύ προνύμφης και νεαρού ιχθυδίου (Kendal et al.,1984) (Aral et al., 2011).



Εικόνα 2: ορολογία των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων (Kendall et al., 1993).



Εικόνα 3: ανάπτυξη του λαβρακιού με βάση τις ημέρες μετά την εκκόλαση (Tsalafouta et al., 2014).

Πίνακας 2: Απουσία και ύπαρξη διαφόρων χαρακτηριστικών κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (Kendall et al., 1993) .

Character	Developmental stage					
	Egg	Larvae				
		Yolk-sac	Pre-flexion	Flexion	Post-flexion	Transformation
<b>Meristic characters</b>						
Fin spines/soft rays			(X)	X	X	
Principal caudal rays			X	X	(X)	
Pelvic fin			(X)	X	X	
Dorsal/anal fin				X	X	
Pectoral fin			(X)	X	X	
Vertebrae				X	X	
Branchiostegals			X	X	(X)	
Gill rakers					X	X
<b>Larval characters</b>						
Body shape		X	X	X	X	X
Snout shape			X	X	X	
Pigment patterns	X	X	X	X	X	X
Head spines			X	X	X	
Fin ray elongation			X	X	X	
Fin ray ornamentation			X	X	X	
Fin ray serration				X	X	
Finfold size/shape		X	X			
Preanal finfold		X	X			
Pectoral size shape			X	X	X	
<b>Larval gut</b>						
Shape		X	X	X	X	
Length		(X)	X	X	X	
<b>Larval eye</b>						
Shape			X	X	X	
Stalked			X	X	X	
Choroid tissue			X	X	X	
Migration						X
<b>Other characters</b>						
Egg characters	X					
Osteological development			(X)	X	X	X
Scale formation				X	(X)	X
Photophore formation					X	X
Size at developmental stage	X	X	X	X	X	X
Fin development sequence			(X)	X	X	

### 1.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Το μεγαλύτερο μέρος της χρησιμοποιήσιμης ενέργειας που παράγεται από την αποικοδόμηση υδατανθράκων ή λιπών αποκτάται μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κατά την οποία επιτυγχάνεται η σύνθεση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

Η πρωταρχική λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι η παραγωγή ανηγμένου νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, (NADH) και φλαβίνο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο, (FADH<sub>2</sub>) με οξείδωση του ακετυλο-συνενζύμου Α (ακέτυλο-coA). Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, ηλεκτρόνια από το NADH και FADH<sub>2</sub> χρησιμοποιούνται για την αναγωγή μοριακού οξυγόνου προς νερό. Η ροή ηλεκτρονίων είναι μια πολύ εξώεργη

αντίδραση η οποία αποδίδει ενέργεια (Berg, 2012). Ταυτόχρονα με την μεταφορά ηλεκτρονίων προκαλείται και μια μετατόπιση πρωτονίων από την μήτρα του μιτοχονδρίου προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Τα πρωτόνια αυτά χρησιμοποιούνται για την σύνθεση ATP από διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανο φωσφορικό (Para et al, 2012).

Μέχρι την δεκαετία του 1950 είχε αποδειχθεί πειραματικά ότι κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση συμβαίνει σταδιακή μεταφορά ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη το οξυγόνο μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων φορέων. Ωστόσο παρέμενε άγνωστος ο μηχανισμός με τον οποίο η ενέργεια που παράγεται από αυτές τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων μετατρέπεται σε ATP. Η αρχική υπόθεση ήταν ότι το ADP μετατρέποταν σε ATP με απευθείας μεταφορά των φωσφορικών ομάδων υψηλής ενέργειας από κάποιο ενδιάμεσο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπως ήταν γνωστό ότι συμβαίνει στη γλυκόλυση.

Το 1960 ο Peter Mitchell διατύπωσε μία πρόταση για έναν εντελώς διαφορετικό μηχανισμό ενεργειακή σύζευξης. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, η σύνθεση του ATP ωθείται από μία ηλεκτροχημική διαβάθμιση μεταξύ των δύο πλευρών μιας μεμβράνης και όχι από τα δυνητικά ενδιάμεσα μόρια υψηλής ενέργειας. Το μοντέλο αυτό ονομάστηκε «χημειωσμοτική υπόθεση» και η θεμελιώδης νέα ιδέα που εισήγαγε ήταν ότι το ενδιάμεσο που επιτελούσε τη σύζευξη της μεταφοράς ηλεκτρονίων με τη σύνθεση ATP δεν ήταν κάποιο συγκεκριμένο μόριο αλλά μία ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης. Η βαθμίδωση αυτή προκύπτει ως αποτέλεσμα της μεταφοράς ηλεκτρονίων και η αντίστροφη ροή των πρωτονίων μέσα από τη μεμβράνη προς την ενεργειακά ευνοούμενη κατεύθυνση είναι συνδεδεμένη με τη σύνθεση. Δεκαεπτά χρόνια μετά την αρχική δημοσίευση ο Mitchell πήρε Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1978.

Συμπερασματικά, η ροή ηλεκτρονίων και η σύνθεση ATP είναι βιοχημικά διαφορετικά συστήματα που συνδέονται μόνο μέσω της πρωτονιοκινητής δύναμης. Η διαδικασία παραγωγής ATP παρουσία οξυγόνου καλείται αερόβια αναπνοή και λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (Cooper, Hausman, 2013).

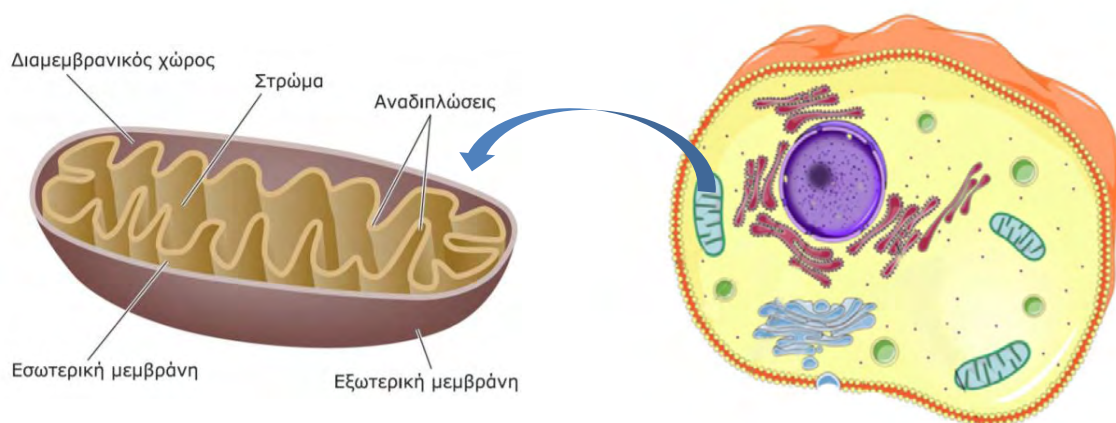
### 1.3.1. Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια είναι τα ενεργειακά οργανίδια του κυττάρου. Παράγουν ενέργεια από τα θρεπτικά συστατικά της τροφής και τη μετατρέπουν σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις δραστηριότητες του κυττάρου. Παράγουν περίπου το 90% της

ενέργειας που χρειάζονται τα κύτταρα και κατά συνέπεια το σύνολο του οργανισμού για την επιβίωση και λειτουργία τους. Ένα κύτταρο μπορεί να περιέχει από εκατό έως και αρκετές χιλιάδες μιτοχόνδρια, ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις του (Sherwood, 2016). Επίσης διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε πολλές μεταβολικές, ρυθμιστικές, αναπτυξιακές διαδικασίες και εμπλέκονται στη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης (Smits et al., 2010).

Έχουν συνήθως ωοειδές σχήμα, μήκος 2  $\mu\text{m}$  και διάμετρο 0,5  $\mu\text{m}$ , δηλαδή έχουν διαστάσεις βακτηρίου. Οι Eugene Kennedy και Albert Lehninger ανακάλυψαν πριν από μισό αιώνα και πλέον ότι τα μιτοχόνδρια περιέχουν το αναπνευστικό συγκρότημα, τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος και ένζυμα της οξειδωσης των λιπαρών οξέων (Berg, 2012).

Μελέτες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των George Palade και Fritjof Sjöstrand αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών, δηλαδή μια εσωτερική μεμβράνη, μια εξωτερική μεμβράνη και τον ενδιάμεσο διαμεμβρανικό χώρο (Berg, 2012). Η εσωτερική μεμβράνη σχηματίζει πολυάριθμες αναδιπλώσεις που ονομάζονται μιτοχονδριακές ακρολοφίες, ο αριθμός των οποίων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και εκτείνονται στο εσωτερικό ή στρώμα του οργανιδίου. Το στρώμα περιέχει το γενετικό σύστημα των μιτοχονδρίων, καθώς και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τις κεντρικές αντιδράσεις του οξειδωτικού μεταβολισμού (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Θέση των μιτοχονδρίων μέσα στο κύτταρο και διαμερισματοποίηση του.

Επιπλέον, η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη περιέχει ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών (άνω του 70%), οι οποίες συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση,

καθώς και στη μεταφορά μεταβολιτών μεταξύ του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων. Ωστόσο, η εσωτερική μεμβράνη δεν είναι διαπερατή για τα περισσότερα ιόντα και μικρά μόρια. Η ιδιότητα αυτή είναι καθοριστική για την διατήρηση της διαβάθμισης πρωτονίων, η οποία δίνει την ενέργεια που ωθεί την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Σε αντίθεση με την εσωτερική μεμβράνη, η εξωτερική μεμβράνη εμφανίζει υψηλή διαπερατότητα σε μικρά ιόντα το οποίο οφείλεται στις πορίνες, οι οποίες σχηματίζουν διαύλους που επιτρέπουν την ελεύθερη διάχυση μορίων με μέγεθος μικρότερο των 1.000 Dalton (Da).

Ωστόσο, υπάρχουν κατηγορίες ειδικών σημάτων στόχευσης που κατευθύνουν πρωτεΐνες από την εξωτερική μεμβράνη στα διαφορετικά διαμερίσματα του μιτοχονδρίου διαμέσου υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου. Οι υποδοχείς αποτελούν τμήμα ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο ονομάζεται τρανσλοκάση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ή σύμπλοκο Tom. Επίσης, υπάρχει το σύμπλοκο Tim, τρανσλοκάση της εσωτερικής μεμβράνης που επιτρέπει στις πρωτεΐνες που είναι σημασμένες με σήμα που οδηγεί στο στρώμα του μιτοχονδρίου να μεταφερθούν εκεί. Απαραίτητη για τη μεταφορά των πρωτεϊνών είναι η συμμετοχή μοριακών συνοδών (Cooper, Hausman, 2013).

### 1.3.2 Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Τα μιτοχόνδρια διακρίνονται από τα άλλα κυτταροπλασματικά οργανίδια των ζωικών κυττάρων γιατί έχουν το δικό τους δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), το οποίο κωδικοποιεί μεταφορικά ριβονουκλεϊκά οξέα (tRNA), ριβοσωμικά ριβονουκλεϊκά οξέα (rRNA) και ορισμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (Εικόνα 6). Επομένως, στη συγκρότηση των μιτοχονδρίων δεν συμμετέχουν μόνο πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και εισάγονται από το κυτταρόπλασμα, αλλά και πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το ίδιο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και μεταφράζονται στο εσωτερικό του οργανιδίου (Cooper, Hausman, 2013).

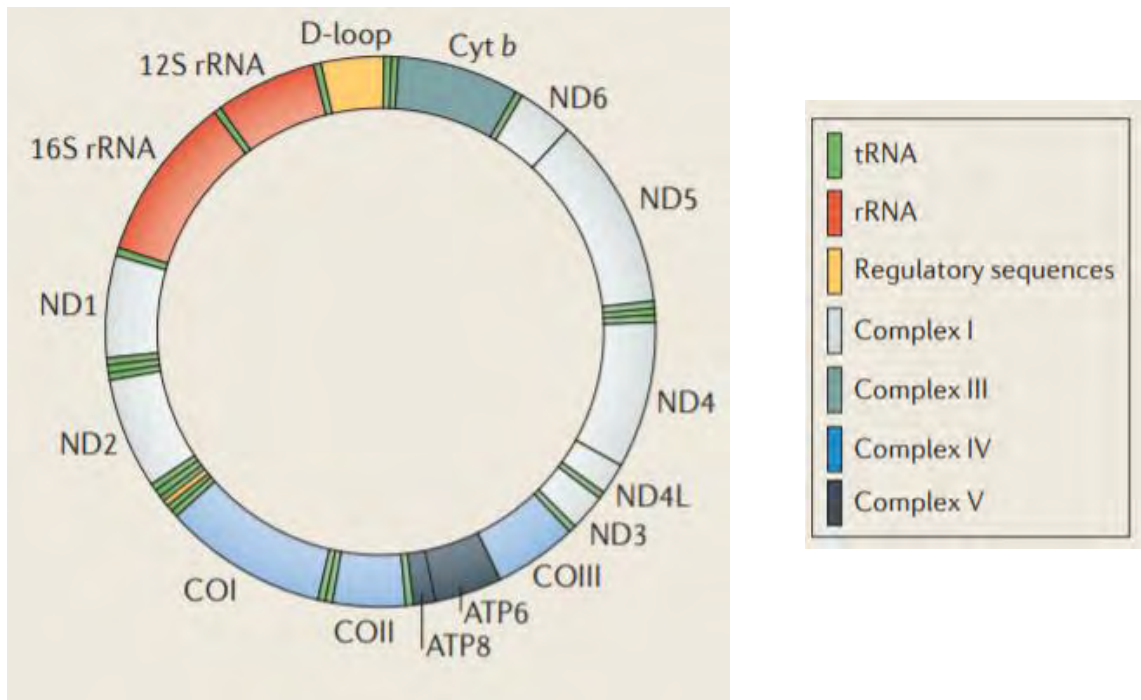
Σύμφωνα με την θεωρία της ενδοσυμβίωσης τα μιτοχόνδρια προήλθαν από ενδοσυμβίωση ενός βακτηρίου με ένα προκαρυωτικό κύτταρο. Το συμβάν της ενδοσυμβίωσης έλαβε χώρα όταν ένας ελεύθερος οργανισμός ικανός για οξειδωτική φωσφορυλίωση εγκολλώθηκε από κάποιο άλλο κύτταρο. Η διπλή μεμβράνη του μιτοχονδρίου, το κυκλικό DNA του και ο ειδικός μηχανισμός μιτοχονδριακής



μεταγραφής και μετάφρασης συνηγορούν υπέρ αυτού του ενδεχομένου. Το βακτηριακό γονιδίωμα με την μεγαλύτερη ομοιότητα με το μιτοχονδριακό είναι εκείνο της *Rickettsia prowazekii*. Το γονιδίωμα αυτού του οργανισμού περιέχει περισσότερα από 1 εκατομμύριο ζεύγη βάσεων και αποτελείται από 834 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Από δεδομένα αλληλουχιών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι όλα τα σημερινά μιτοχόνδρια έχουν προκύψει από κάποιον πρόγονο της *R. prowazekii* ως αποτέλεσμα ενός συμβάντος ενδοσυμβίωσης. Μια τέτοια παροδική σχέση έγινε μόνιμη, καθ' όσον το βακτηριακό κύτταρο έχασε το δικό του DNA, πράγμα που το κατέστησε ανίκανο να ζει ανεξάρτητα, ενώ το κύτταρο ξενιστής έγινε εξαρτώμενο από το ATP που παρήγαγε το βακτήριο (Berg, 2012). Στη συνέχεια, πολλά γονίδια από το βακτήριο πέρασαν στο γονιδίωμα του πρώιμου ευκαρυώτη.

Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα είναι συνήθως κυκλικά μόρια DNA που μοιάζουν με βακτηριακά DNA και υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα σε κάθε μιτοχόνδριο. Το μέγεθός τους διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το είδος. Τα μιτοχονδριακά DNA (mtDNA) του ανθρώπου και των περισσότερων άλλων ζωικών οργανισμών είναι μικρά (περίπου 16 kb), ενώ των ζυμομυκήτων (περίπου 80 kb) και των φυτών (πάνω από 200 kb) είναι πολύ μεγαλύτερα. Τα περισσότερα σημερινά μιτοχονδριακά γονιδιώματα κωδικοποιούν μικρό αριθμό πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν απαραίτητα συστατικά του συστήματος οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επίσης, τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα κωδικοποιούν όλα τα rRNA και τα περισσότερα από τα tRNA που είναι απαραίτητα για να μεταφραστούν οι αντίστοιχες κώδικες αλληλουχίες στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων (Cooper, Hausman, 2013). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα σε όλα τα είδη μεταζώων (με λίγες εξαιρέσεις) έχει σταθερή σύνθεση και κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επίσης, κωδικοποιεί δύο μόρια rRNA (16S και 12S) και 22 μόρια tRNA τα οποία χρειάζονται για τη μετάφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του οργανιδίου αυτού (Εικόνα 6) (Zhang, Broughton, 2013).

Όπως και το DNA των πυρηνικών γονιδιωμάτων έτσι και το μιτοχονδριακό DNA μπορεί να τροποποιηθεί από μεταλλάξεις οι οποίες μπορεί να είναι καταστροφικές για το οργανίδιο. Εφόσον όλα σχεδόν τα μιτοχόνδρια των γονιμοποιημένων ωαρίων παρέχονται από το ωοκύτταρο και όχι από το σπερματοζώαριο οι μεταλλάξεις της γαμετικής κυτταρικής σειράς στο μιτοχονδριακό DNA μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά από τη μητέρα (Cooper, Hausman, 2013).



Εικόνα 6: Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Mishra, Chan, 2014).

### 1.3.3 Ρόλος του πυρηνικού DNA στην οξειδωτική φωσφορυλίωση

Τα περισσότερα μιτοχονδριακά γονιδιώματα κωδικοποιούν τα RNA του μεταφραστικού μηχανισμού των μιτοχονδρίων αλλά όχι τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή, μεταγραφή, μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA. Οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στον πυρήνα. Επιπλέον ο πυρήνας περιέχει τα γονίδια για τις περισσότερες από τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που απαιτούνται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς και για όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των μιτοχονδρίων. Μερικά από τα γονίδια αυτά φαίνεται ότι έχουν μεταφερθεί στον πυρήνα από τον αρχικό προκαρυωτικό πρόγονο των μιτοχονδρίων μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Περίπου 1.500 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια (πάνω από 95% του συνόλου των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών) συντίθενται σε ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροδιαλύματος και εισάγονται στα μιτοχόνδρια ως πλήρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Cooper, Hausman, 2013).

### 1.3.4 Συνεξέλιξη των δύο γονιδιωμάτων

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση περιλαμβάνει πρωτεϊνικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται τόσο από μιτοχονδριακά (mt) όσο και από πυρηνικά (nu) γονιδιώματα. Αυτό σημαίνει ότι οποιαδήποτε αναντιστοιχία μεταξύ των γονιδιωμάτων

πιθανότατα θα οδηγήσει σε επιβράδυνση μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία αυξάνει την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων με οξυγόνο με αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Αν και τα μιτοχονδριακά γονίδια εξελίσσονται ταχύτερα από τα περισσότερα πυρηνικά γονίδια, η διατήρηση της δυναμικής σταθερότητας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η λειτουργική αποτελεσματικότητα, μπορεί να συνεπάγονται εξελικτική συσχέτιση των γονιδίων. Τα πυρηνικά γονίδια μπορεί να προβλεφθεί ότι έχουν επιταχυνόμενους ρυθμούς εξέλιξης για να εξυπηρετούν τα αυξημένα ποσοστά αντικατάστασης των μιτοχονδριακών γονιδίων με τα οποία αλληλεπιδρούν (Zhang, Broughton, 2013). Δηλαδή, πολύ συχνά παρουσιάζεται ένας πολύ μεγαλύτερος ρυθμός εξέλιξης των πυρηνικών πρωτεϊνών ώστε να μπορούν να συμβαδίσουν με τις αλλαγές που συμβαίνουν στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται συνεξέλιξη (Levin et al., 2014).

#### 1.3.5 Μηχανισμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Η αποικοδόμηση της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος αποδίδει συνολικά τέσσερα μόρια ATP, δέκα μόρια NADH και δύο μόρια FADH<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια των NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται στο οξυγόνο μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που αποδίδει συνολικά, μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Γκιμπς,  $\Delta G^{\circ} = -52,5 \text{ kcal/mol}$  για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων. Για την συλλογή αυτού του ποσού ενέργειας σε εκμεταλλεύσιμη μορφή απαιτείται σταδιακή παραγωγή της ενέργειας μέσω της διέλευσης των ηλεκτρονίων από μια σειρά οξειδοαναγωγικών φορέων. Οι φορείς είναι οργανωμένοι σε τέσσερα σύμπλοκα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ή αλλιώς την αναπνευστική αλυσίδα (Cooper, Hausman, 2013). Η έννοια της αναπνευστικής αλυσίδας αναπτύχθηκε από τον Keilin (1966) με την ταυτοποίηση των κυτοχρωμάτων a,b,c, ως οξειδοαναγωγικών φορέων σε αερόβιους οργανισμούς που συνδέουν διαδοχικά την ενεργοποιημένη αφυδρογονάση του Wieland με το ένζυμο ενεργοποίησης οξυγόνου του Warburg (Papa et al., 2012).

Συγκεκριμένα τα ενζυμικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 7):

σύμπλοκο I : Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q

σύμπλοκο II : Αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q

σύμπλοκο III : Οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c

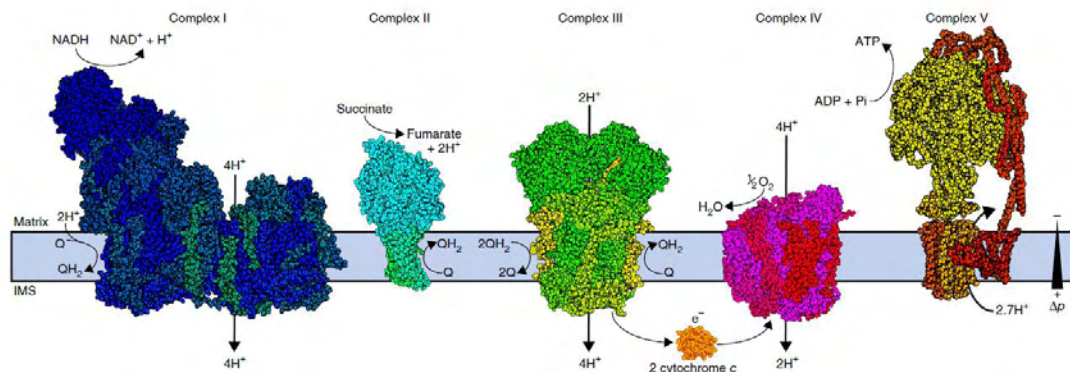
σύμπλοκο IV : Οξειδάση του κυτοχρώματος c

σύμπλοκο V : ATP συνθάση ή  $F_1F_0$

Το σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και ο μηχανισμός που τα συνδέει είναι ο ακόλουθος:

το σύμπλοκο I και το σύμπλοκο II λαμβάνουν ηλεκτρόνια από αναγωγικά ισοδύναμα ( $NADH$ ,  $FADH_2$ ) που παράγονται από τον κύκλο του Krebs και μεταφέρονται στην ουβικινόνη. Η ουβικινόνη είναι μια υδρόφοβη κινόνη, η οποία διαχέεται ελεύθερα εντός της εσωτερικής μεμβράνης και μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο III. Αυτό με την σειρά του μεταφέρει ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα c, μια περιφερειακή μεμβρανική πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης, μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο IV όπου το οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Σε συνδυασμό με την διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων τα σύμπλοκα I, III, IV μεταφέρουν πρωτόνια στο διαμεμβρανικό χώρο. Η παραγόμενη διαβάθμιση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης οδηγεί στη σύνθεση ATP στο σύμπλοκο V (Zhang, Broughton, 2013).

Για κάθε ζεύγος ηλεκτρονίων που τροφοδοτεί την αλυσίδα δέκα συνολικά πρωτόνια μεταφέρονται από το μιτοχονδριακό στρώμα στο διαμεμβρανικό χώρο (Εικόνα 7). Το σύμπλοκο I αντλεί τέσσερα πρωτόνια, το σύμπλοκο III αντλεί από το στρώμα δύο πρωτόνια ενώ απελευθερώνει στον διαμεμβρανικό χώρο δύο ακόμη πρωτόνια τα οποία έχουν μεταφερθεί μέσω του συνενζύμου Q από τα σύμπλοκα I ή III. Τέλος το σύμπλοκο IV αντλεί τέσσερα πρωτόνια από τα οποία δύο αντλούνται στην απέναντι πλευρά της μεμβράνης και τα άλλα δύο συνδέονται με οξυγόνο για να σχηματίσουν νερό στο εσωτερικό του στρώματος (Cooper, Hausman, 2013). Η αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q, σε αντίθεση με την οξειδοαναγωγή του ζεύγους  $NADH-Q$ , δεν αντλεί πρωτόνια από την μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Συνεπώς, σχηματίζονται λιγότερα μόρια ATP από την οξείδωση του  $FADH_2$  παρά από την οξείδωση του  $NADH$  (Berg, 2012).



Εικόνα 7: ενζυμικά συμπλόκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Letts, Sazanov, 2017).

### 1.3.6 Αρχιτεκτονική της αναπνευστικής αλυσίδας

Το σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελείται από πέντε σύμπλοκα όπως αναφέρθηκε. Εκτός από το σύμπλοκο II, τα υπόλοιπα έχουν υπομονάδες που κωδικοποιούνται τόσο από μιτοχondριακό γονιδίωμα όσο και από πυρηνικό γονιδίωμα. Οι κωδικοποιούμενες από μιτοχondριακό DNA υπομονάδες, είναι υδρόφοβες και η μετάφρασή τους πραγματοποιείται κοντά στην εσωτερική μεμβράνη για να διευκολυνθεί η μεταφορά τους. Οι πυρηνικά κωδικοποιούμενες δομικές υπομονάδες, και πολλοί άλλοι παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη σωστή βιογένεση του OXPHOS εκφράζονται στο κυταρόπλασμα και εισάγονται στο εσωτερικό του οργανιδίου. Τα σύμπλοκα περιλαμβάνουν κεντρικές (core) πρωτεΐνες, που εκτελούν δραστηριότητες κατάλυσης, και μεγάλο αριθμό βοηθητικών (supernumerary) υπομονάδων που παίζουν βασικούς ρόλους στη συναρμολόγηση, τη ρύθμιση και τη σταθερότητα. Η σωστή προσθήκη προσθετικών ομάδων καθώς επίσης και η ενσωμάτωση των δομικών συστατικών απαιτούν μεγάλο αριθμό παραγόντων, πολλοί από τους οποίους έχουν υποστεί μεταλλάξεις σε περιπτώσεις μιτοχondριακών παθήσεων (Signes, Vizarra, 2018).

#### Σύμπλοκο I

Τα ηλεκτρόνια του NADH εισέρχονται στην αλυσίδα μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, ένα πολύ μεγάλο ένζυμο με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από περίπου 1.000 έως 550 kd. Το αρχικό βήμα είναι η πρόσδεση του NADH και η μεταφορά των ηλεκτρονίων υψηλού δυναμικού στην προσθετική ομάδα FMN. Τα ηλεκτρόνια τότε μεταφέρονται από το FMNH<sub>2</sub> σε μια σειρά συμπλοκών σιδήρου-θείου, τη δεύτερη προσθετική ομάδα. Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q

περιέχει δύο είδη συμπλόκων, συγκεκριμένα 2Fe-2S και 4Fe-4S. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μετά στο συνένζυμο Q. Η ροή δύο ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q οδηγεί στην άντληση τεσσάρων πρωτονίων. Η αποδοχή δύο ηλεκτρονίων από την ουβικινόνη οδηγεί παράλληλα στην πρόσληψη και δύο πρωτονίων από την μήτρα ώστε να αναχθεί σε QH<sub>2</sub>, η οποία απομακρύνεται με κατεύθυνση προς το εσωτερικό της μεμβράνης (Berg, 2012).

Το σύμπλοκο I αποτελείται από δεκατέσσερις υπομονάδες στα βακτήρια, οι οποίες όλες είναι συντηρημένες στους ευκαρυώτες, και από περίπου 46 διαφορετικές υπομονάδες στα θηλαστικά. Από αυτές οι επτά κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και οι υπόλοιπες από το πυρηνικό. Οι δεκατέσσερις συντηρημένες υπομονάδες αποτελούν τον ελάχιστο πυρήνα του ενζύμου που φιλοξενεί όλα τα συστατικά της οξειδοαναγωγής, ένα φλαβίνο-μονο-νουκλεοτίδιο (FMN), οκτώ με εννιά σύμπλοκα σιδήρου-θείου και ένα με δύο μόρια ουβικινόνης που συνδέονται με πρωτεΐνες (Πίνακας 3). Οι υπόλοιπες βοηθητικές υπομονάδες συμμετέχουν στη συναρμολόγηση του συμπλόκου, κάποιες έχουν ρυθμιστικό ρόλο και κάποιες συμμετέχουν στη βιογένεση του συμπλόκου (Para et al., 2012). Το σύμπλοκο έχει σχήμα L με τον οριζόντιο βραχίονα του να βρίσκεται στο επίπεδο της μεμβράνης, ενώ ο κατακόρυφος προβάλλει προς την μήτρα. Ο διαμεμβρανικός βραχίονας του συμπλόκου αποτελείται από πολύ υδρόφοβες πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από μιτοχονδριακά γονίδια, ενώ ο βραχίονας που προεκτείνεται προς τη μήτρα αποτελείται από υδρόφιλες πρωτεΐνες που έχουν κωδικοποιηθεί από το πυρηνικό γονιδίωμα (Lazarou et al., 2009).

Οι καταλυτικές (core) υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικά γονίδια ορίζονται ως NADH αφυδρογονάσες της ουβικινόνης (NDU) και ακολουθεί η περιγραφή της λειτουργίας, -FS για σιδηροθειούχες πρωτεΐνες και -FV για φλαβινοπρωτεΐνες (NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 και NDUFV2). Αυτές οι υπομονάδες εμπλέκονται στην οξείδωση του NADH και στη μεταφορά ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη. Οι καταλυτικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ορίζονται ως NADH αφυδρογονάσες (ND) και ακολουθούνται από τον αριθμό της υπομονάδας (ND1-6 και ND4L) (Πίνακας 3). Οι κωδικοποιούμενες από μιτοχονδριακό DNA υπομονάδες, μαζί με περίπου δεκατρείς μεμβρανικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα, συνεισφέρουν περισσότερα από 60 διαμεμβρανικά τμήματα για να σχηματίσουν τον βραχίονα του συμπλόκου I. Η υπομονάδα ND1 φιλοξενεί μια

θέση δέσμευσης κινόνης και επομένως προβλέπεται να εμπλέκεται στη δέσμευση ουβικινόνης. Οι υπομονάδες ND4 και ND5 μπορεί επίσης να εμπλέκονται στη δέσμευση ουβικινόνης. Πιστεύεται ότι οι ND2, ND4 και ND5 υποβοηθούν στην άντληση πρωτονίων και κάποια συστατικά τους φαίνεται να έχουν εξελιχθεί από βακτηριακούς αντιμεταφορείς  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (Lazarou et al., 2009).

Πίνακας 3: κεντρικές υπομονάδες του συμπλόκου I (Brandt et al., 2006).

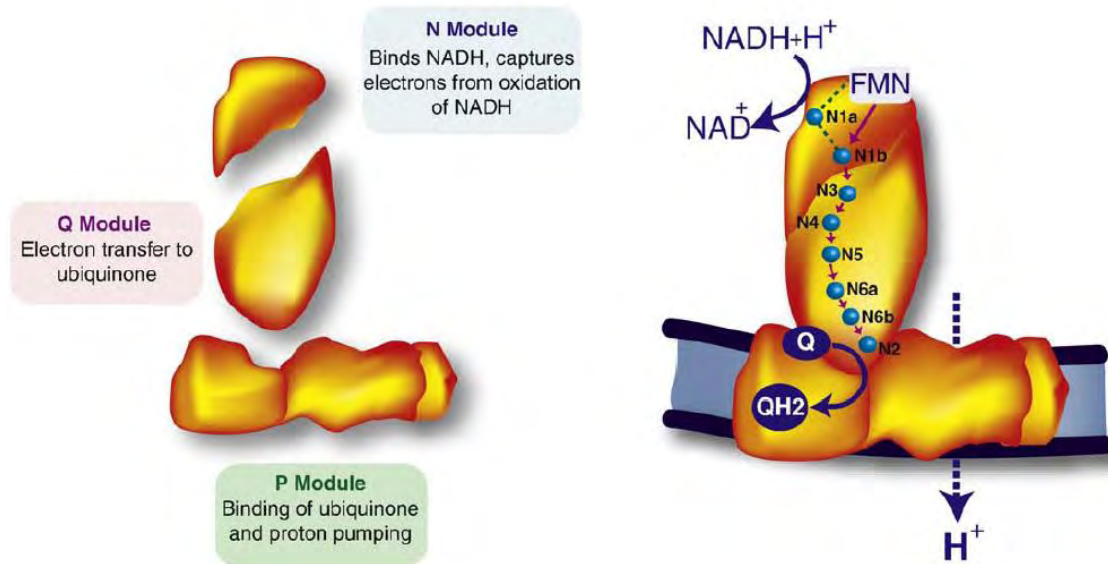
Όνομα υπομονάδας				Θεση γονιδίου
Bos taurus	SwissProt	Homo sapiens	Prokaryotes	
75 kDa	NUAM	NDUFS1	NUOG/NQO3	nDNA
51 kDa	NUBM	NDUFV1	NUOF/NQO1	
49 kDa	NUCM	NDUFS2	NUOD/NQO4	
30 kDa	NUGM	NDUFS3	NUOC/NQO5	
24 kDa	NUHM	NDUFV2	NUOE/NQO2	
TYKY	NUIM	NDUFS8	NUOI/NQO9	
PSST	NUKM	NDUFS7	NUOB/NQO6	
ND1	NU1M	ND1	NUOH/NQO8	mtDNA
ND2	NU2M	ND2	NUON/NQO14	
ND3	NU3M	ND3	NUOA/NQO7	
ND4	NU4M	ND4	NUOM/NQO13	
ND4L	NULM	ND4L	NUOK/NQO11	
ND5	NU5M	ND5	NUOL/NQO12	
ND6	NU6M	ND6	NUOJ/NQO10	

Το σύμπλοκο χωρίζεται σε τρία λειτουργικά μέρη

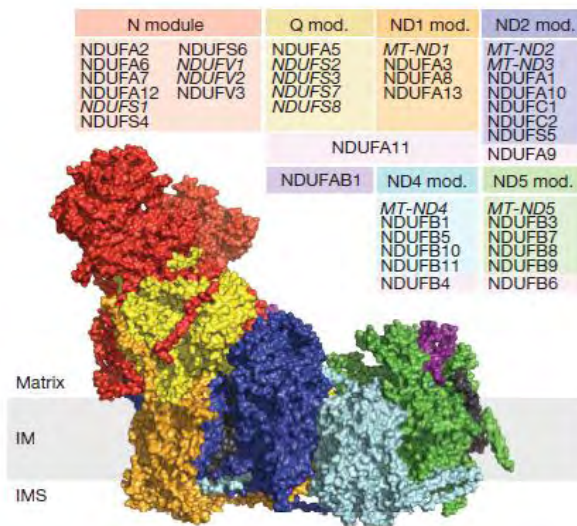
- στοιχείο N (N-module) : είναι η επικράτεια εισαγωγής των ηλεκτρονίων, όπου προσδένεται και οξειδώνεται το NADH μεταφέροντας ηλεκτρόνια μέσω του FMN σε μία αλυσίδα συμπλόκων σιδήρου-θείου. Αποτελεί το άκρο του υδρόφιλου τμήματος και αυτό που θα ενσωματωθεί τελευταίο.
- στοιχείο Q (Q-module): δέχεται τα ηλεκτρόνια από τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου και τα μεταφέρει μέσω τριών ακόμα συμπλόκων σιδήρου-θείου στην ουβικινόνη. Τα N και Q module αποτελούν τον περιφερειακό βραχίονα
- στοιχείο P (P-module): είναι βυθισμένο στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και εκεί συμβαίνει η άντληση πρωτονίων και αποτελείται από τις ND1-5 υπομονάδες (Εικόνα 8) (Lazarou et al., 2009).

Το Q module ενσωματώνεται στη υπομονάδα ND1 και συνδέεται περαιτέρω με τη υπομονάδα ND2. Οι ND4 και ND5 συνδέονται μεταξύ τους ακολουθούμενες από

ενσωμάτωση με το Q / ND1 / ND2 για να σχηματίσουν ένα ενδιάμεσο στάδιο αποτελούμενο από το Q-module και τον ολοκληρωμένο βραχίονα του συμπλόκου I. Το N-module συνδέεται με αυτό στο τελευταίο στάδιο για να σχηματιστεί το πλήρως λειτουργικό σύμπλοκο I (Εικόνες 8, 9 και 10) (Formosa et al., 2017).

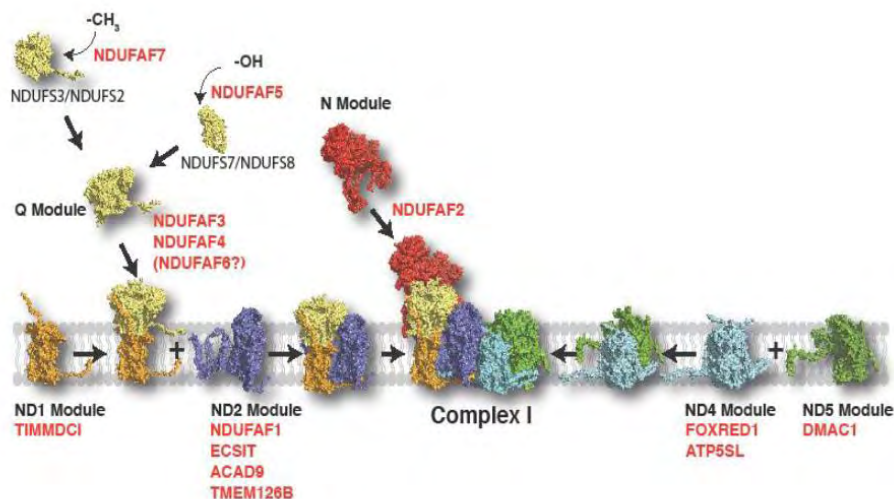


Εικόνα 8: Τα διακριτά μέρη και το μονοπάτι δράσης του συμπλόκου I (Lazarou et al., 2009).



Εικόνα 9: Προσδιορισμός των υποομάδων του συμπλόκου I (Stroud et al., 2016).





Εικόνα 10: Συναρμολόγηση του συμπλόκου I (Signes, Vizarra, 2018).

## Σύμπλοκο II

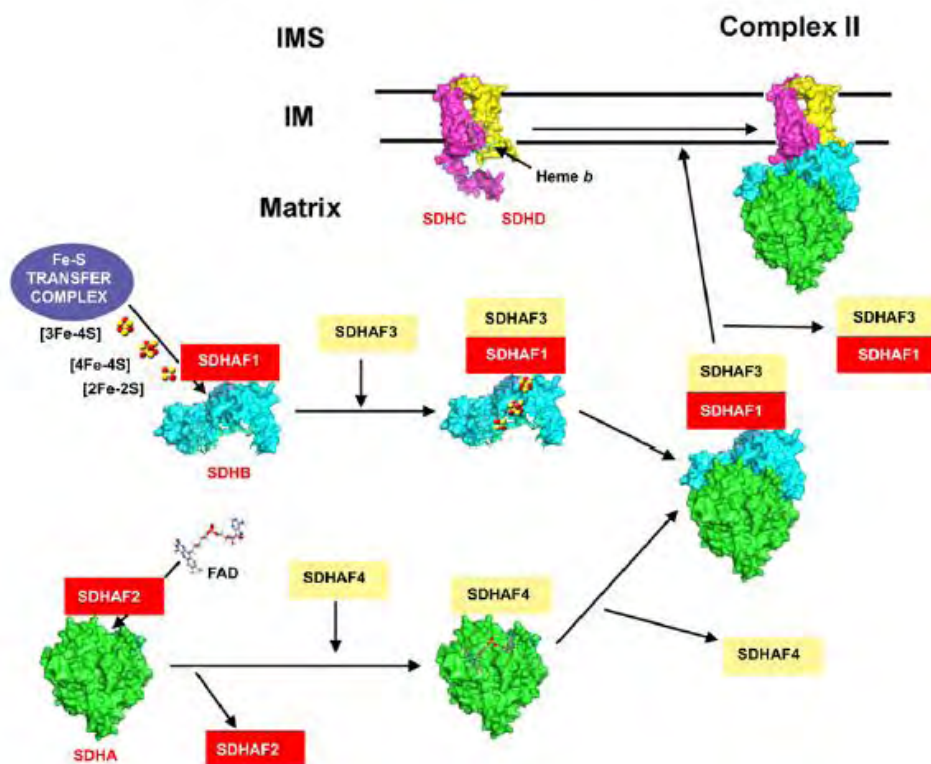
Είναι ένα ενδογενές ένζυμο που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και παράγει  $FADH_2$ . Έχει τέσσερις υπομονάδες οι οποίες κωδικοποιούνται από πυρηνικό DNA και εμφανίζουν υψηλή ομοιότητα αλληλουχίας με *E.coli*. Οι δύο καταλυτικές υδρόφιλες υπομονάδες είναι οι SDHA/SDH1 και SDHB/SDH2. Οι υδρόφοβες SDHC/SDH3 και SDHD/SDH4 αποτελούν το αγκυροβολημένο μεμβρανικό τμήμα και περιέχουν ένα μόριο αίμης b και δύο θέσεις σύνδεσης για την Q. Επίσης, περιέχει τρία κέντρα σιδήρου-θείου τα οποία συνδέονται με την υπομονάδα B και η μεγαλύτερη υδρόφιλη μονάδα A φέρει ένα ομοιοπολικά δεσμευμένο μόριο FAD (Para et al., 2012, Signes, Vizarra, 2018). Το  $FADH_2$  δεν εγκαταλείπει το σύμπλοκο και τα ηλεκτρόνια του μεταφέρονται στα κέντρα Fe-S και τελικά στην ουβικινόνη για τον σχηματισμό  $QH_2$ , η οποία στη συνέχεια μπορεί να δώσει τα ηλεκτρόνια καθοδικά στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Berg, 2012).

Η συναρμολόγηση του συμπλόκου II συμβαίνει μέσω της ανεξάρτητης προετοιμασίας των υπομονάδων με τη μεσολάβηση των ειδικών πρωτεϊνών συνοδών.

- SDHA: φλαβινυλιώνεται πριν συναρμολογηθεί στο σύμπλοκο και ο παράγοντας συναρμολόγησης SDHAF2 / Sdh5 μεσολαβεί σε αυτό το στάδιο. Μετά την ενσωμάτωση του FAD, το SDHA συνδέεται με τον SDHAF4 / Sdh8, ο οποίος διατηρεί την υπομονάδα σταθερή και ικανή για συναρμολόγηση με SDHB, προστατεύοντάς την από την αυτο-οξείδωση.

- SDHB: ενσωματώνει ομάδες σιδήρου – θείου προτού ενωθεί με τις υπόλοιπες υπομονάδες, αυτό το βήμα διαμεσολαβείτε από το SDHAF1. Όταν τόσο το SDHA όσο και το SDHB αποκτούν τις αντίστοιχες προσθετικές ομάδες τους, ενώνονται μαζί, απελευθερώνοντας το SDHAF4 αλλά διατηρώντας τη δέσμευση με SDHAF1 και SDHAF3.
- SDHC και SDHD: συναρμολογούνται μαζί στην εσωτερική μεμβράνη. Η ομάδα αίμης b, βρίσκεται στη διεπαφή και των δύο υπομονάδων, δεν παίζει καταλυτικό ρόλο, αλλά απαιτείται για τη σταθερότητά τους.

Αν δεν συναρμολογηθεί ολόκληρο το σύμπλοκο δεν είναι δυνατή η λειτουργία του (Εικόνα 11) (Signes, Vizarra, 2018).



Εικόνα 11: Συναρμολόγηση του συμπλόκου II (Signes, Vizarra, 2018).

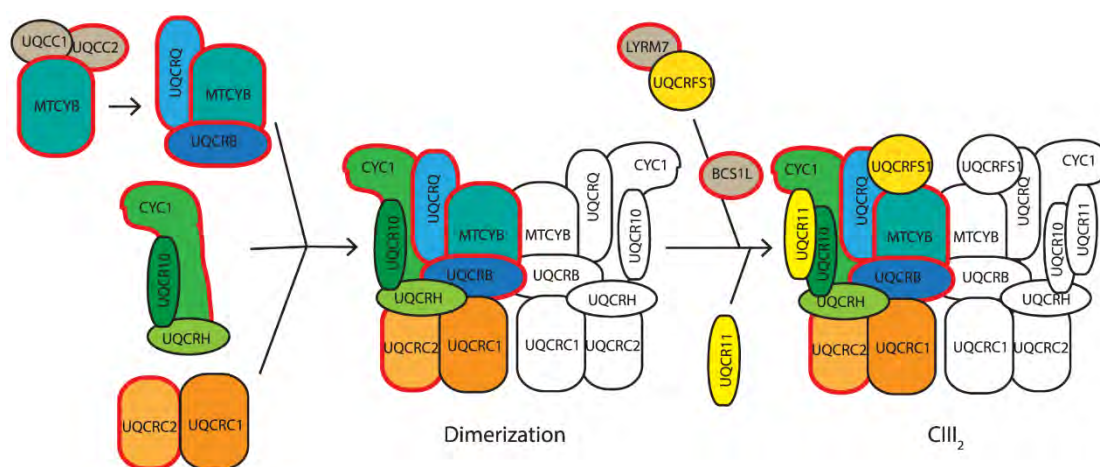
### Σύμπλοκο III

Τα ηλεκτρόνια από την QH<sub>2</sub> προωθούνται στο κυτόχρωμα c, στη δεύτερη από τις τρεις αντλίες πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1961 από βόειο καρδιακό ιστό. Το κυτόχρωμα είναι πρωτεΐνη μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία

περιέχει μια προσθετική ομάδα αίμης. Η λειτουργία αυτού του συμπλόκου είναι η κατάλυση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την  $QH_2$  προς το οξειδωμένο κυτόχρωμα  $c$ , και η ταυτόχρονη άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο, μέσω του κύκλου του συνενζύμου  $Q$ , ο οποίος διοχετεύει ηλεκτρόνια από τον έναν φορέα δύο ηλεκτρονίων σε ένα φορέα ενός ηλεκτρονίου. Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους  $Q$ -κυτοχρώματος  $c$  περιέχει δύο τύπους κυτοχρωμάτων που ονομάζονται  $b$  και  $c_1$ . Οι δύο υπομονάδες κυτοχρωμάτων περιέχουν στο σύνολό τους τρία μόρια αίμης: δύο μόρια μέσα στο κυτόχρωμα  $b$ , που ονομάζονται  $b_L$  και αίμη  $b_H$ , και μια αίμη τύπου  $c$  στο κυτόχρωμα  $c_1$ . Η προσθετική ομάδα των κυτοχρωμάτων είναι μια σιδηροπρωτοπορφυρίνη IX. Επιπλέον των μορίων αίμης, το ένζυμο περιέχει ακόμη μια πρωτεΐνη σιδήρου θείου με ένα κέντρο  $2Fe-2S$ . Αυτό το κέντρο, που ονομάζεται κέντρο Rieske είναι σπάνιο διότι το ένα ιόν σιδήρου σχηματίζει σύμπλοκο συναρμογής με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης, αντί με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης. Αυτό σταθεροποιεί το κέντρο στην ανηγμένη μορφή του, αυξάνοντας το αναγωγικό δυναμικό του, ώστε να μπορεί να δεχτεί εύκολα ηλεκτρόνια από  $QH_2$ . Το σύμπλοκο, περιέχει δυο διακριτές θέσεις για πρόσδεση ουβικινόνης που ονομάζονται  $Q_0$  και  $Q_i$ , με τη θέση  $Q_i$  να βρίσκεται πιο κοντά στη μήτρα (Berg, 2012). Τέλος, το κυτόχρωμα  $b$ ,  $c_1$  και το Rieske διατηρούνται εξελικτικά σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά είδη, αποτελώντας τον ελάχιστο λειτουργικό πυρήνα του συμπλόκου (Para et al, 2012).

Το  $bc_1$  σύμπλοκο στα θηλαστικά έχει μοριακό μέγεθος περίπου 240 kDa, αποτελείται από δεκατρείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες και είναι οργανωμένο σε έντεκα διαφορετικές υπομονάδες, από τις οποίες η υπομονάδα του κυτοχρώματος  $b$  κωδικοποιείται από mtDNA και όλες οι υπόλοιπες από πυρηνικό. Εμφανίζεται ως ομοδιμερές, αποτελούμενο από δύο  $bc_1$  μονομερή και εμφανίζει μια διπλή συμμετρία γύρω από έναν άξονα κάθετο στο επίπεδο της μεμβράνης. Έχει σχήμα αχλαδιού με μέγιστη διάμετρο 130 Å και ύψος 155 Å. Οι πολλές επαφές μεταξύ των μονομερών υποδηλώνουν ότι το διμερές είναι η λειτουργική κατάσταση του συμπλόκου. Δομικά, το κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις καταλυτικούς πυρήνες (MT-CYB, CYC1 και UQCRC1) και επτά βοηθητικές υπομονάδες. Η συναρμολόγηση του συμπλόκου ξεκινά με την ενεργοποίηση της μετάφρασης και τη σταθεροποίηση του κυτοχρώματος  $b$  (MYTCYB) μέσω των παραγόντων συναρμολόγησης UQCRC1 UQCRC2 που το μεταφέρουν σε ένα ενδιάμεσο σύμπλεγμα που περιέχει τις υπομονάδες UQCRQ και UQCRB. Αυτό το σύμπλοκο μπορεί να ενωθεί με το

σύμπλεγμα που περιέχει CYC1, UQCRH και UQCR10 και με το σύμπλεγμα που περιέχει UQCRC2 και UQCRC1. Αφού έχουν συνδεθεί αυτές οι οκτώ υπομονάδες υπάρχει η δυνατότητα διμερισμού. Το UQCRFS1 δεσμεύεται και σταθεροποιείται από τον παράγοντα συναρμολόγησης LYRM7, προτού ενσωματωθεί στο σύμπλοκο με τη βοήθεια του συντελεστή συναρμολόγησης, BCS1L που το μεταφέρει στην εσωτερική μεμβράνη αφού αποκτήσει τα κέντρα σιδήρου-θείου. Η ενσωμάτωση αυτής της υπομονάδας αναφέρεται ως το κρίσιμο στάδιο ωρίμανσης επειδή τότε το ένζυμο γίνεται καταλυτικά ενεργό. Τέλος προστίθεται η υπομονάδα UQCR11, σχηματίζοντας το πλήρες σύμπλοκο (Εικόνα 12) (Tucker et al., 2013).



Εικόνα 12: Συναρμολόγηση του συμπλόκου III (Tucker et al., 2013).

#### Σύμπλοκο IV

Το τελευταίο από τα τρία συγκροτήματα άντλησης πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας. Η δομή της βόειας οξειδάσης του κυτοχρώματος c είναι δομικά γνωστή σε ικανοποιητικό βαθμό. Αποτελείται από 13 υπομονάδες, από τις οποίες τρεις κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Περιέχει δύο ομάδες αίμης A και τρία ιόντα χαλκού, σε διάταξη δύο κέντρων χαλκού που ονομάζονται A και B (Berg, 2012). Τα ηλεκτρόνια δωρίζονται στο  $Cu_A$ , ένα κέντρο διπυρηνικού χαλκού το οποίο περιέχει δύο ιόντα χαλκού ενωμένα με άτομα θείου. Ακολούθως, τα ηλεκτρόνια πηγαίνουν στην αίμη a και μετά κινούνται στην αίμη  $a_3$ . Μια μεταβολή της διαμόρφωσης οδηγεί στην άντληση πρωτονίων με έναν τρόπο παρόμοιο με εκείνο του συμπλόκου I. Τα ηλεκτρόνια περνούν στη συνέχεια στο άλλο ιόν χαλκού  $Cu_B$ , που σχηματίζει σύμπλοκο συναρμογής με τρία κατάλοιπα ιστιδίνης. Μαζί, η αίμη  $a_3$  και το  $Cu_B$  αποτελούν το ενεργό κέντρο όπου το  $O_2$  ανάγεται τελικά σε  $H_2O$ . Τέσσερα

ηλεκτρόνια ρέουν μέσα από το σύμπλοκο και σχηματίζουν δύο μόρια ύδατος. Τα πρωτόνια που καταναλώνονται στον σχηματισμό του νερού συνεισφέρουν επίσης και στην βαθμίδωση πρωτονίων μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται εξαΰλωση. Άρα, αντλούνται συνολικά οκτώ πρωτόνια από την μήτρα σε κάθε κύκλο (Raymond, 2016). Δομικά, αποτελείται από τρεις κύριες υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από mtDNA:

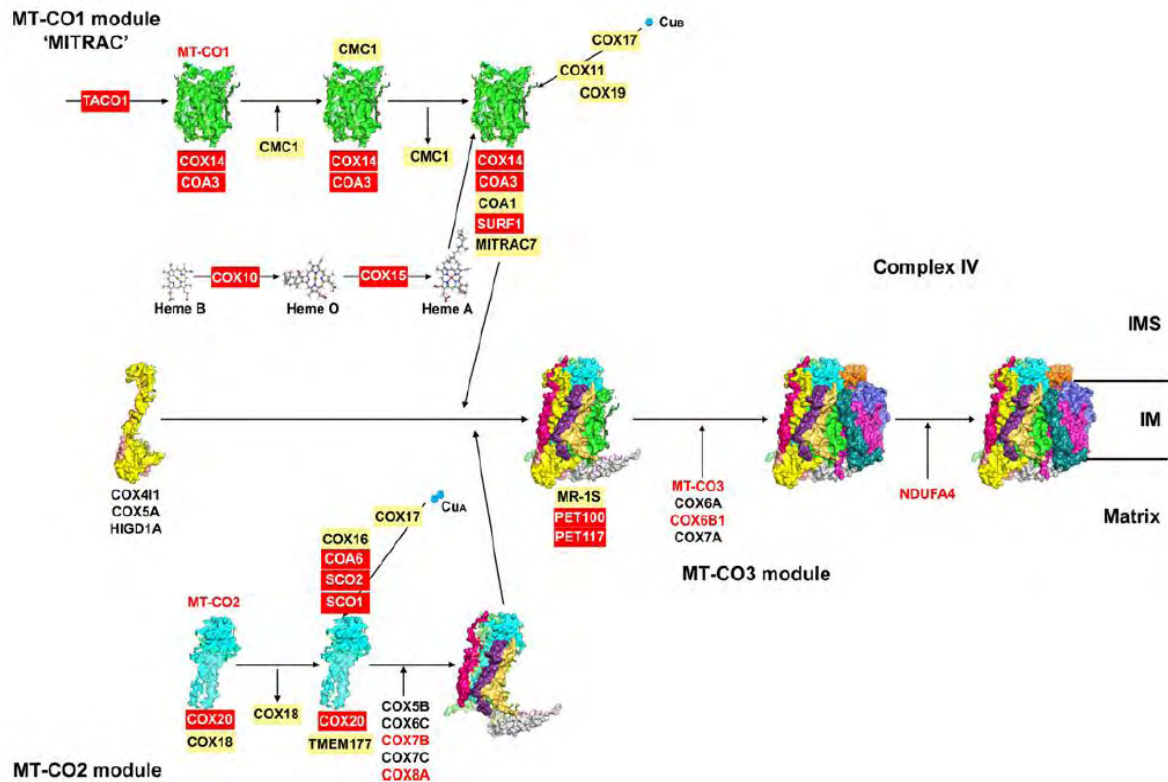
- MT-CO1: μεγαλύτερη καταλυτική υπομονάδα που περιέχει  $a_3$ -CuB
- MT-CO2: δεύτερη βασική υπομονάδα και στεγάζει το κέντρο CuA
- MT-CO3: τρίτη βασική υπομονάδα, δεν παίζει άμεσο καταλυτικό ρόλο

Οι υπόλοιπες βοηθητικές υπομονάδες πιστεύεται ότι είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση του καταλυτικού πυρήνα και τη ρύθμιση της δραστηριότητάς του. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το MT-CO1 είναι ο «σπόρος» γύρω από τον οποίο συσσωρεύονται οι υπόλοιπες υπομονάδες, ξεκινώντας από τις COX4I1 και COX5A.

Οι COX14 / C12ORF62 και COA3 / CCDC56 / MITRAC12 δεσμεύουν το MT-CO1 και εμπλέκονται στη συναρμολόγηση είτε με μεταφραστικούς είτε με μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς. Αργότερα, το CMC1 δεσμεύει το MT-CO1 COA3 COX14 πριν ή κατά τη διάρκεια της προσθήκης των προσθετικών ομάδων. Η βιοσύνθεση της αίμης A πραγματοποιείται από τις COX10 και COX15. Η συναρμολόγηση CuB απαιτεί τη COX11, με το COX17 να δίνει τα χαλκό και το COX19 να διατηρεί το COX11 στη σωστή κατάσταση οξειδοαναγωγής.

Το ενδιάμεσο βήμα στη συναρμολόγηση COX είναι η ένωση των COX4I1/COX5A/MT-CO1 και της μονάδας MT-CO2 (MT-CO2/ COX5B /COX6C/ COX7C/ COX8A και πιθανότατα COX7B). Οι πρωτεΐνες δέσμευσης χαλκού COX17, SCO1 και SCO2 μαζί με COA6 και COX16 εμπλέκονται στη συναρμολόγηση του κέντρου CuA.

Η τελευταία υπομονάδα που θα ενσωματωθεί είναι το NDUFA4, που αρχικά θεωρήθηκε μέρος του συμπλέγματος I, αλλά αργότερα ανατέθηκε στο σύμπλοκο IV (Εικόνα 13) (Signes, Vizarra, 2018).



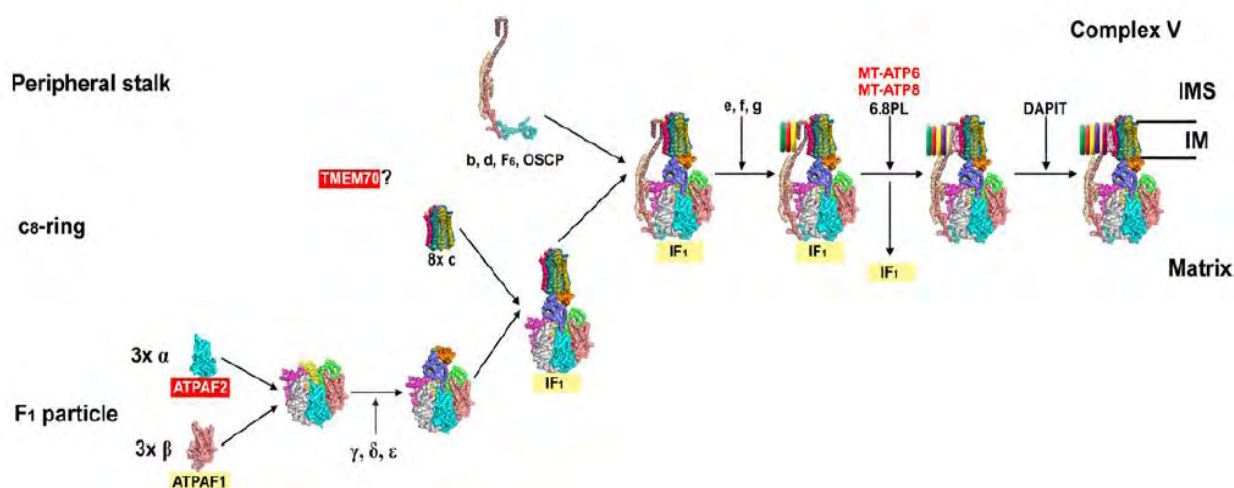
Εικόνα 13: Συναρμολόγηση του συμπλόκου IV (Signes, Vizarra, 2018).

## Σύμπλοκο V

Είναι ένα μεγάλο, πολύπλοκο ένζυμο, με μοριακό βάρος 550 kDa, βυθισμένο στην εσωτερική μεμβράνη, που μοιάζει με σφαίρα πάνω σε ράβδο. Ένα μεγάλο τμήμα της «ράβδου», που ονομάζεται υπομονάδα  $F_0$ , είναι βυθισμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η σφαίρα ονομάζεται υπομονάδα  $F_1$  προβάλλει στη μιτοχονδριακή μήτρα. Επομένως, αποτελείται από μια μονάδα αγωγής πρωτονίων ( $F_0$ ) και μια καταλυτική μονάδα την  $F_1$ , η οποία και απομονωμένη εμφανίζει δραστηριότητα ATPάσης. Χρησιμοποιεί την ηλεκτροχημική βαθμίδωση πρωτονίων που δημιουργείται από την αναπνοή για τη σύνθεση ATP από ADP και  $P_i$ . Η αντίδραση είναι αμφίδρομη με αποτέλεσμα την άντληση  $H^+$  στην αντίθετη κατεύθυνση σε συνδυασμό με υδρόλυση ATP. Στα θηλαστικά αποτελείται από δεκαέξι υπομονάδες από τις οποίες δυο οι  $a$  (MT-ATP6) και  $A6L$  (MT-ATP8) της περιοχής  $F_0$  κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια και οι υπόλοιπες από πυρηνικά.

Δομικά, υπάρχει είτε ως διμερές είτε ως ολιγομερές. Η  $F_1$  υπομονάδα αποτελείται από πέντε υπομονάδες με στοιχειομετρία  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  που προεκβάλουν στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η υπομονάδα  $F_0$  είναι ένα υδρόφοβο τμήμα που διασχίζει την εσωτερική

μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελείται από έναν δακτύλιο ο οποίος έχει από δέκα έως δεκατέσσερις υπομονάδες c ανάλογα το είδος του οργανισμού που είναι βυθισμένες στη μεμβράνη. Μια μόνο υπομονάδα a προσδένεται στο εξωτερικό αυτού του δακτυλίου. Οι δύο υπομονάδες συνδέονται με δύο τρόπους: με τον κεντρικό μίσχο γε και με μια εξωτερική στήλη η οποία αποτελείται από μια υπομονάδα a, δύο υπομονάδες b και μια υπομονάδα δ (Para et al, 2012). Οι βασικές υπομονάδες των F<sub>1</sub> (α,β,γ) και F<sub>0</sub> (a,b,c) συναρμολογούνται ξεχωριστά για να συνδυαστούν σε άλλες υπομονάδες για να σχηματίσουν το λειτουργικό σύμπλοκο (Para et al, 2012). Συγκεκριμένα, το F<sub>1</sub> συναρμολογείται με τη βοήθεια των συνοδευτικών ATPAF1 / ATP11 και ATPAF2 / ATP12, που συνδέουν τα ATP5B και ATP5A1, αντίστοιχα. Ο δακτύλιος c, αποτελείται από ATPG1, ATPG2 και ATPG3, συναρμολογείται στη μεμβράνη. Ένα υποσύμπλεγμα που περιέχει υπομονάδες της εξωτερικής στήλης είναι επίσης προσχηματισμένο. Κατά τη διάρκεια αυτών των αρχικών σταδίων, η ανασταλτική πρωτεΐνη IF<sub>1</sub> συνδέεται με τα ενδιάμεσα και απελευθερώνεται με την εισαγωγή των δύο mtDNA-κωδικοποιούμενων υπομονάδων. Η αλληλεπίδραση των τελευταίων υπομονάδων σταθεροποιείται μέσω των 6.8L / MLQ / C14ORF2 και η περιφερειακή υπομονάδα DAPIT / USMG5 ενσωματώνεται για να ολοκληρώσει τη συναρμολόγηση (Εικόνα 14) (Signes, Vizarra, 2018).



Εικόνα 14: Συναρμολόγηση του συμπλόκου V (Signes, Vizarra, 2018).

### 1.3.7 Σχηματισμός υπερσυμπλόκων

Η φράση «αναπνευστική αλυσίδα» υπονοεί ότι η ενέργεια που τελικά προέρχεται από τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγεται μέσω μιας γραμμικής διάταξης διακριτών συμπλόκων μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ωστόσο, η άποψη αυτή έχει εγείρει τον προβληματισμό. (Schon, Nenchner, 2009).

Έχουν προταθεί δύο μοντέλα για την οργάνωση της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας:

α) "ρευστή κατάσταση" (fluid-state): όλα τα σύμπλοκα OXPHOS διαχέονται ξεχωριστά στη μεμβράνη και τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται τυχαία μέσω παροδικών σχηματισμών των τεσσάρων μεμονωμένων συμπλόκων και των δύο μικρότερων κινητών φορέων ηλεκτρονίων (CoQ και κυτοχρώματος c). Η ATP συνθάση θεωρείται ότι διαχέεται πλευρικά στη μεμβράνη ως μεμονωμένο μόριο ή ως ομο-ολιγομερές.

β) "στερεά κατάσταση" (solid-state): το υπόστρωμα διοχετεύεται απευθείας από το ένα ένζυμο στο άλλο με τις υπομονάδες του ενζύμου να συναρμολογούνται σε μια τεράστια υπερμοριακή μηχανή μεταφοράς ενέργειας (Schon, Dencher, 2009).

Όμως, μεταγενέστερα πειράματα έδειξαν την ύπαρξη δομών που ονομάζονται υπερσύμπλοκα και προκύπτουν από τη σύνδεση των συμπλόκων. Επομένως, το πιο πιθανό σενάριο είναι ένας συνδυασμός των δύο προηγούμενων μοντέλων όπου, μεμονωμένα σύμπλοκα και διαφορετικοί τύποι υπερσυμπλόκων συνυπάρχουν στην εσωτερική μεμβράνη, τα οποία μπορούν να πραγματοποιήσουν πλευρική διάχυση. Το μοντέλο αυτό καλείται "μοντέλο πλαστικότητας" (plasticity model) και είναι το πλέον αποδεκτό (Smits et al, 2010).

Τα υπερσύμπλοκα απομονώθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα μπλε φυσικού πολυακρυλαμιδίου (blue native poly-acrylamide gel electrophoresis BN-PAGE), κυμαίνονται από 750 – 2100 kDa και μπορούν να διαφέρουν μεταξύ των οργανισμών ανάλογα με τις μεταβολικές, φυσιολογικές καταστάσεις και με το λιπιδικό περιεχόμενο της μιτοχονδριακής εσωτερικής μεμβράνης. Τα σύμπλοκα I, III, IV είναι κατά κύριο λόγο αυτά που συμμετέχουν στο σχηματισμό των υπερσυμπλόκων ενώ τα σύμπλοκα II, V σχηματίζουν ολιγομερή που δεν αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα σύμπλοκα υπό φυσιολογικές καταστάσεις. Η στοιχειομετρία των κύριων υπερσυμπλόκων είναι η ακόλουθη:

- III<sub>2</sub> IV<sub>1</sub>
- I<sub>1</sub> III<sub>2</sub>



- $I_1 III_2 IV_1$  (αναπνεόσωμα – διαθέτει όλα τα στοιχεία που απαιτούνται για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στο μοριακό οξυγόνο)
- $I_2 III_2 IV_{1-2}$

Διάφοροι παράγοντες και υπομονάδες των συμπλόκων εμπλέκονται στη δημιουργία αυτών των δομών. Παράγοντες όπως τα COX7A2L/ COX7R/ SCAFI είναι απαραίτητοι για την ενσωμάτωση του IV στα υπεрсύμπλοκα και πιθανότατα συμβάλουν και στο σχηματισμό του  $III_2 IV_1$  ( Signes, Vizarra, 2018).

Υπάρχουν δύο λύσεις για να εξηγήσουν τη συναρμολόγηση των υπεрсυμπλόκων:

- τα μεμονωμένα σύμπλοκα συναρμολογούνται πλήρως προτού ενωθούν στα υπεрсύμπλοκα το οποίο τους επιτρέπει να προσαρμόζονται σε ποικίλες ενεργειακές απαιτήσεις αν και ο κύριος ρόλος τους πιθανότατα είναι η αύξηση της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς ηλεκτρονίων
- η συναρμολόγηση του υπεрсυμπλόκου γίνεται ταυτόχρονα με την παράλληλη συναρμολόγηση (co-assembly) των υπομονάδων των διαφορετικών συμπλόκων πριν ολοκληρωθεί η συναρμολόγηση αυτών. Για παράδειγμα, η ωρίμανση του συμπλόκου I δεν θα συμβεί εάν τα σύμπλοκα  $III_2$  και IV δεν ενωθούν σε ένα προ-σύμπλοκο ( Signes, Vizarra, 2018).

Αναφορικά με το αναπνεόσωμα που είναι το πιο άφθονο στα θηλαστικά η συναρμολόγηση του γίνεται ως εξής:

Παρόλο που υπάρχουν αρκετά σημεία αλληλεπίδρασης μεταξύ των συμπλόκων I, III και IV, οι πιο εκτεταμένες και σταθερές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται μεταξύ των υπομονάδων NDUFA11 (B14.7 σε βοοειδή) και NDUFB4 (B15) του συμπλόκου I οι οποίες αλληλεπιδρούν απευθείας με την υπομονάδα UQCRQ του συμπλόκου III στη διασύνδεση μήτρας και εσωτερικής μεμβράνης. Επίσης, οι υπομονάδες NDUFB4 και NDUFB9 (B22) του συμπλόκου I συνδέουν τις υπομονάδες UQCRC1 και UQCRFS1 του συμπλόκου III στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Τέλος, εμφανίζεται μια άλλη σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της υπομονάδας NDUFB7 (B18) του συμπλόκου I και της υπομονάδας UQCRH στο σύμπλοκο III. Και οι δύο υπομονάδες περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της οξειδοαναγωγής μπορεί να ρυθμίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπλόκων (Jarne, Ugalde, 2017).

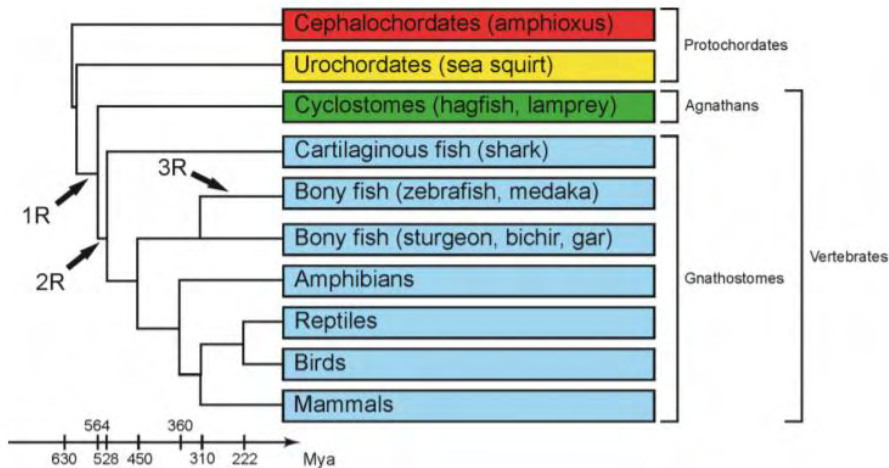
#### 1.4 Το γονιδίωμα των τελεοστέων

Όπως αναφέρθηκε, το λαβράκι κατατάσσεται στους τελεοστέους και το ιδιαίτερο ενδιαφέρον αυτής της ταξινομικής ομάδας είναι ο τρίτος γύρος διπλασιασμού του γονιδιώματος που είναι ειδικός γι' αυτή (Kasahara et al., 2007).

##### 1.4.1 Πρώτος και δεύτερος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά (the 2R hypothesis).

Μέχρι πρόσφατα, η πιο δημοφιλής υπόθεση υποστήριζε ότι υπάρχουν δύο γύροι διπλασιασμού (Whole Genome Duplication → WGD). Ο διπλασιασμός οδηγεί στο σχηματισμό δύο πανομοιότυπων αντιγράφων κάθε γονιδίου τα οποία ονομάζονται παράλογα και είναι τουλάχιστον αρχικά πανομοιότυπα και λειτουργικά όμοια. Οι δύο γύροι διπλασιασμού υποστηριζόταν ότι πραγματοποιήθηκαν μετά την εμφάνιση των κεφαλοχορδωτών (Cephalochordates) και πριν την εξάπλωση των γναθοστομάτων (Gnathostomata) στο μέσο της Ορδοβίκιας περιόδου (Kasahara et al., 2007).

Όμως, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα ουροχορδωτά (Urochordata) και όχι τα κεφαλοχορδωτά είναι τα ασπόνδυλα που σχετίζονται στενότερα με τα σπονδυλωτά. Έτσι, η τελευταία τοποθέτηση σχετικά με την 2R υπόθεση προϋποθέτει δύο γύρους WGD μετά την εμφάνιση των ουροχορδωτών και πριν την εξάπλωση των γναθόστομων. Ο πρώτος γύρος τοποθετείται σε ένα κοινό πρόγονο από των αγνάθων και των γναθόστομων και ο δεύτερος σε ένα κοινό πρόγονο σπονδυλωτών και γναθοστομάτων. Επομένως, προβλέπει ότι το γονιδίωμα των σπονδυλωτών διαθέτει τέσσερα παράλογα για κάθε αρχικό ορθόλογο του κεφαλοχορδωτού προγόνου (Εικόνα 4). Η παρατήρηση ότι ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος καλύπτεται από τέσσερα σύνολα παράλογων που αποτελούνται από ομόλογα είναι δύσκολο να εξηγηθούν χωρίς την ύπαρξη της υπόθεσης 2R (Kasahara et al., 2007).



Εικόνα 4: Χρονική κλίμακα της υπόθεσης 2R (Fernández, 2013).

#### 1.4.2 Ο τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στους τελεόστεους (3R).

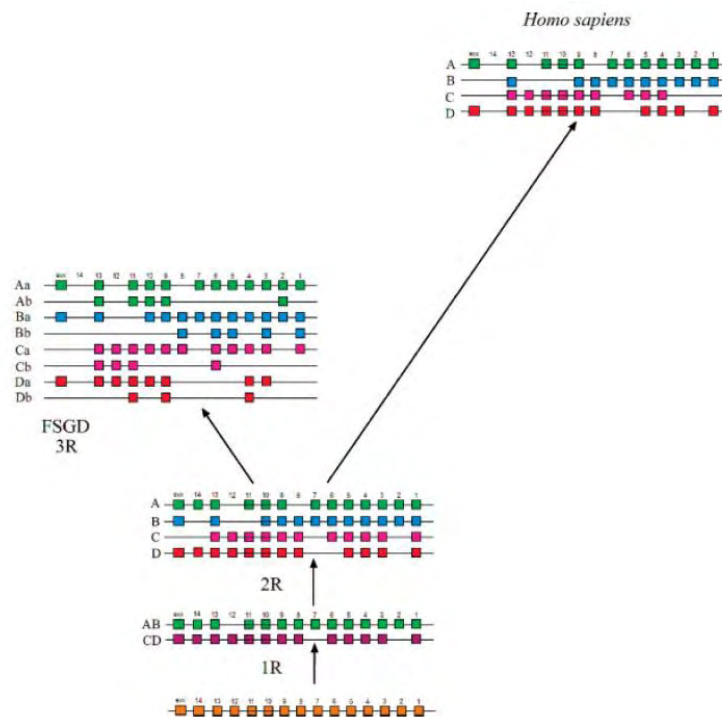
Ο τρίτος διπλασιασμός (Teleost-specific Genome Duplication → TGD) έλαβε χώρα στον κοινό πρόγονο όλων των τελεόστεων. Πραγματοποιήθηκε περίπου 350 εκατομμύρια χρόνια, κατά τα τέλη της Δεβόνιας περιόδου, πριν στη γενεαλογία των ακτινοπερυγίων, αλλά όχι σε αυτά των σπονδυλωτών της ξηράς, οδηγώντας τουλάχιστον αρχικά σε οκτώ αντίγραφα του προγονικού γονιδιώματος. Έγινε δηλαδή επέκταση του κανόνα “1-2-4” σε “1-2-4-8”. Ως εκ τούτου, οι σαρκοπερύγιοι τα τετράποδα είχαν το ήμισυ από τα περισσότερα γονίδια των απογόνων ιχθύων (Meyer et al., 2005).

Ο WGD όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οδηγεί σε διπλασιασμό του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Ωστόσο είναι πολύ γνωστό ότι τα χρωμοσώματα συμπεριφέρονται δυναμικά κατά την διάρκεια της εξέλιξης και υφίστανται αναδιατάξεις. Πριν τον TGD η απλοειδής σειρά χρωμοσωμάτων αποτελούνταν από 12-13 χρωμοσώματα. Κατά συνέπεια ο TGD-WGD είχε ως αποτέλεσμα η απλοειδής σειρά να αποτελείται από 24 ή 26 χρωμοσώματα. Περισσότερο από το 50% όλων των υφιστάμενων τελεόστεων έχουν πράγματι 24 ή 26 χρωμοσώματα που πιθανώς αντιπροσωπεύουν την προγονική κατάσταση. Έτσι, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος κατά την διάρκεια της εξέλιξης των περισσότερων ειδών (Glasauer, Neuhauss, 2014).

Μελέτη των γονιδίων HOX αποκάλυψε επτά συστάδες HOX στο zebrafish σε αντίθεση με τις τέσσερις που βρέθηκαν στα τετράποδα. Αν και τα διπλασιασμένα γονίδια HOX έχουν εντοπιστεί σε πολλούς τελεόστεους, αρχικά δεν ήταν σαφές εάν τα

διπλασιασμένα γονίδια HOX βρίσκονται καθολικά σε όλους τους τελεόστεους (Glasauer, Neuhauss 2014). Ακολούθησε η ανίχνευση συντηρημένης συνταϊνικότητας συστάδων HOX και άλλων γονιδίων σε ένα αριθμό τελεόστεων, κάτι το οποίο αποτελεί ισχυρή απόδειξη για TS-WGD (Amores et al., 2004). Τέλος η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός αριθμού ιχθύων παρείχε πειστικά στοιχεία για τουλάχιστον ένα WGD σε ολόκληρη την οικογένεια των τελεόστεων (Apericio et al., 2002). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στην αποδοχή της πραγμάτωσης και του τρίτου διπλασιασμού (Γράφημα 3).

Αυτό που είναι βασικό να τονιστεί είναι ότι τα ρυθμιστικά γονίδια στους τελεόστεους ακόμα και μετά τον τρίτο διπλασιασμό έχουν αυστηρή συντήρηση (Glasauer, Neuhauss, 2014).



Γράφημα 3: Εξέλιξη συστάδων Hox γονιδίων (Glasauer, Neuhauss, 2014).

#### 1.4.3 «Μοίρα» των διπλασιασμένων γονιδίων και επιπτώσεις πολυπλοειδίας

Από τη στιγμή που συμβεί ο διπλασιασμός του γενώματος σε ένα άτομο, ασκείται στα διπλασιασμένα γονίδια η εξελικτική πίεση για να σταθεροποιηθούν στον πληθυσμό του ατόμου, ή να απενεργοποιηθούν/χαθούν (Glasauer, Neuhauss, 2014). Ωστόσο, η τύχη των διπλασιασμένων γονιδίων είναι πιο περίπλοκη.

Τα αντίγραφα αυτά μπορούν να ακολουθήσουν διαφορετικές πορείες:

α) απώλεια λειτουργίας: είναι το πιο πιθανό σενάριο της εξέλιξης των διπλασιασμένων γονιδίων. Αυτή η υπόθεση βασίζεται στο απλό γεγονός ότι οι βλαβερές μεταλλάξεις είναι πολύ πιο πιθανό να συμβούν από τις ωφέλιμες. Έτσι, ένα από τα αντίγραφα αναμένεται να συσσωρεύσει βλαβερές μεταλλάξεις, μέχρις ότου τα δομικά χαρακτηριστικά του γονιδίου εκλείψουν πλήρως (Zhang, 2003)

β) μερική απώλεια λειτουργίας μέσω του μηχανισμού: διπλασιασμός → εκφυλισμός → συμπλήρωση (DCC), όπου οι λειτουργίες ενός γονιδίου μπορούν να υποδιαιρεθούν μεταξύ των θυγατρικών γονιδίων, τα οποία - μαζί - συνεχίζουν να εκτελούν τις λειτουργίες του προγονικού τους γονιδίου. Μετά από συμπληρωματική απώλεια λειτουργίας, και τα δύο γονίδια θα σταθεροποιηθούν στο γονιδίωμα, επειδή η απώλεια ενός από αυτά θα διαταράξει τη βασική γονιδιακή λειτουργία.

γ) εμφάνιση νέας λειτουργίας: απαιτεί ποικίλους αριθμούς αντικαταστάσεων αμινοξέων. Η ανάπτυξη μιας νέας λειτουργίας συμβαίνει όταν ένα από τα δύο αντίγραφα διατηρεί τις λειτουργίες του προγονικού γονιδίου και έτσι το δεύτερο έχει την δυνατότητα να αναπτύξει νέες λειτουργίες. Ωστόσο, οι ευεργετικές μεταλλάξεις εμφανίζονται μόνο με χαμηλό ρυθμό. Επομένως, αυτό το σενάριο αναμένεται να αντιμετωπιστεί λιγότερο συχνά από τα δύο προηγούμενα (Glasauer, Neuhauss, 2014).

δ) επιλογή δόσης – υπόθεση ισορροπίας γονιδίου: Ορισμένα γονίδια παραμένουν αμετάβλητα μετά τον διπλασιασμό. Σύμφωνα με την υπόθεση της γονιδιακής ισορροπίας, όσον αφορά μακρομοριακά σύμπλοκα, η διατήρηση της σωστής γονιδιακής ισορροπίας είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του (Edger, Pires, 2009). Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την ανάλυση των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτών παρέχει τη βάση για την κατανόηση της διατήρησης αντιγράφων. Επίσης, παρέχει έναν καλά υποστηριζόμενο μηχανισμό για να εξηγήσει τη σημαντική υπερ-διατήρηση γονιδίων με συγκεκριμένες λειτουργίες (Edger, Pires, 2009).

Παρόλο που η πολυπλοειδία πολλές φορές οδηγεί σε ένα εξελικτικό τέλμα, φαίνεται ότι πολυπλοειδείς οργανισμοί μερικές φορές παρουσιάζουν εξελικτικό πλεονέκτημα έναντι των αντίστοιχων διπλοειδών (Glasauer, Neuhauss, 2014). Συγκεκριμένα, ορισμένοι πολυπλοειδείς οργανισμοί εμφανίζουν:

α) ανθεκτικότητα στα μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα που οδηγεί σε μείωση κινδύνου εξαφάνισης

β) αυξημένη αντοχή σε μεταλλάξεις καθώς τα πλεονάζοντα αντίγραφα καλύπτουν την επίδραση των βλαβερών μεταλλάξεων των παράλογων τους

γ) Οι διπλασιασμοί γονιδιωμάτων έχουν επίσης προταθεί ότι διευκολύνουν άμεσα την

ειδογένεση, μέσω αμοιβαίας απώλειας γονιδίων, όπου διαφορετικά παράλογα χάνονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς, οδηγώντας τελικά σε γενετική απομόνωση και ειδογένεση αυτών των πληθυσμών

δ) Είναι επίσης γνωστό ότι η πολυπλοειδία διευκολύνει την αυτο-γονιμοποίηση και το σχηματισμό ασεξουαλικά αναπαραγόμενων ειδών (απομικτικά), τα οποία χαρακτηρίζονται από επιλεκτικό πλεονέκτημα, όταν οι σεξουαλικοί σύντροφοι είναι σπάνιοι (Glasauer, Neuhauss, 2014).

Όσον αφορά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στο λαβράκι σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας έχει πραγματοποιηθεί χαρτογράφηση για τα σύμπλοκα I και III όπου εντοπίστηκαν 3 οικογένειες γονιδίων για το σύμπλοκο I, συγκεκριμένα, *ndufv1*, *ndufs1*, *ndufs8* με δύο παράλογα για το κάθε γονίδιο (*a&b*) και 4 οικογένειες γονιδίων για το σύμπλοκο III, συγκεκριμένα, *uqcr11*, *uqcrfs1*, *uqcrh*, *uqcrc2* με δύο παράλογα για το κάθε γονίδιο (*a&b*) οι οποίες αποτελούν προϊόντα του τρίτου γύρου διπλασιασμού που είναι ειδικός για τους τελεόστεους.

### 1.5 Σκοπός

Το λαβράκι ανήκει στους τελεόστεους, μια ταξινομική ομάδα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των ποικίλων προσαρμογών της (ενδιαιτήματα, λήψη τροφής, στρατηγικές ζευγαρώματος, κλπ.), αλλά και λόγω του ειδικού για αυτή διπλασιασμού του γονιδιώματος. Παράλληλα αποτελεί ένα είδος με ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον καθώς αποτελεί ένα από τα πιο μαζικά εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες.

Η μελέτη των διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών του έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από εξελικτικής και λειτουργικής σκοπιάς, και ταυτόχρονα μπορεί να μας εφοδιάσει με χρήσιμες γνώσεις για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής στη σύγχρονη ιχθυοκαλλιέργεια.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου μιας σειράς γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία αποτελεί τον κύριο μηχανισμό παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο και κατ' επέκταση για τον οργανισμό. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκαν παράλογα γονίδια που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και έχουν προκύψει από τον ειδικό για τους τελεόστεους διπλασιασμό του γονιδιώματος σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων

Τα ιχθύδια λαβρακιού συλλέχθηκαν από εμπορικούς ιχθυογεννητικούς σταθμούς στην Ιταλία και την Ελλάδα κατά τη διάρκεια μιας παραγωγικής περιόδου. Σε κάθε σταθμό, η δειγματοληψία ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε α) για τις ημέρες μετά την εκκόλαψη DPH 8-10 που αντιστοιχούν στην έναρξη της εξωγενούς τροφοληψίας (first feeding) (ανήκει στο στάδιο preflexion) β) για τις dph 20-25 που αντιστοιχούν στο στάδιο της κάμψης της νωτοχορδής (flexion) γ) για τις dph 30-44 που αντιστοιχούν στο τέλος της νυμφικής εκτροφής (end of larvae rearing) ή αλλιώς postflexion και δ) για τις dph 50-57 που αντιστοιχούν στο μέσο μεταμόρφωσης (mid metamorphosis). Τα δείγματα για την ανάλυση της έκφρασης γονιδίων τοποθετήθηκαν σε αντιδραστήριο RNAlater Reagent (Sigma-Aldrich, R0901) και διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι την χρήση τους.

#### Συγκεκριμένα

- Για την παρτίδα ιταλικής προέλευσης υπάρχουν: 6 δείγματα για το πρώτο αναπτυξιακό στάδιο, 11 για το τρίτο αναπτυξιακό στάδιο και 16 για το τέταρτο αναπτυξιακό στάδιο.
- Για την παρτίδα ελληνικής προέλευσης υπάρχουν από 24 δείγματα για το πρώτο, τρίτο και τέταρτο αναπτυξιακό στάδιο και 18 για το δεύτερο στάδιο.

### 2.2 Προσδιορισμός των δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από δύο διαφορετικές χώρες προέλευσης. Συνολικά, για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 123 δείγματα από ιχθυογεννητικούς σταθμούς στην Ιταλία (Πίνακας 4) και την Ελλάδα (Πίνακας 5).

Πίνακας 4: παρτίδες ιταλικής προέλευσης

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	DPH	ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ
4	9	1 <sup>ST</sup> feed
2	8	
8	44	end of larvae rearing
3	42	
8	51	mid metamorphosis
8	50	

Πίνακας 5: παρτίδες ελληνικής προέλευσης

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	DPH	ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟ ΣΤΑΔΙΟ
6	8	1 <sup>st</sup> feed
12	9	
6	10	
6	20	flexion
6	22	
6	25	
6	30	end of larvae rearing
6	35	
6	37	
6	38	
6	52	mid metamorphosis
6	53	
6	55	
6	57	

### 2.3 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κάθε ιχθύδιο με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος E.Z.N.A total RNA kit (Omega) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η απομόνωση RNA καθώς και η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) πραγματοποιήθηκαν από το CCMAR – Center of Marine Sciences Portugal και αποστάλθηκαν στο εργαστήριο για τη συνέχιση του πειράματος.

### 2.4 Γονίδια αναφοράς (*Housekeeping genes*)

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



βάση αυτά, γίνεται η κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης που προκύπτουν από την Real-Time PCR. (Arya, 2005)

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

- FAU (FAU ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion): Κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη S30 συντηγμένη με μια ubiquitin-like πρωτεΐνη. Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S30 είναι συστατικό της 40S υπομονάδας του κυτταροπλασματικού ριβοσώματος (NCBI).
- RPL13 (Ribosomal Protein L13): Κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη που αποτελεί συστατικό της υπομονάδας 60S του ριβοσώματος. Η πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια ριβοσωμικών πρωτεϊνών L13E και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (GeneCards<sup>R</sup> The human gene database).

## 2.5 Γονίδια στόχοι

Τα γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα:

- *ndufs1a* και το παράλογο *ndufs1b*
- *uqcr11a* και το παράλογο *uqcr11b*
- *uqcrfs1a* και το παράλογο *uqcrfs1b*
- *uqcrc2a*
- *uqcrhb*

## 2.6 Σχεδιασμός εκκινήτων

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της QPCR απαραίτητο βήμα είναι ο σχεδιασμός των εκκινήτων τόσο των γονιδίων ενδιαφέροντος όσο και των ιδιοστατικών γονιδίων. Οι εκκινήτες είναι απαραίτητοι ώστε να ενισχυθεί το υπό εξέταση γονίδιο μέσω της πολυμεράσης. Για τον σχεδιασμό τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer3 (v.0.4.0) (Untergasser, 2012), στο οποίο εισάγεται η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει

και το πρόγραμμα προχωρά στο σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων ανά ζεύγη τα οποία αποτελούν τους δύο εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση. Οι εκκινητές που προέκυψαν ελέγχθηκαν για τον σχηματισμό διμερών και δευτεροταγών δομών μέσω του προγράμματος Beacon Designer (Beacon Designer 5.10, 2006). Τέλος ελέγχθηκε ότι οι εκκινητές είναι ειδικοί μόνο για το υπό εξέταση γονίδιο μέσω της ομοπαράθεσης τους έναντι του γονιδιώματος του λαβρακιού, με την χρήση του αλγορίθμου BLAST (Korf et al., 2003).

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό και τον έλεγχο των εκκινητών παρέχουν μια πληθώρα πληροφοριών που αφορά τα ολιγονουκλεοτίδια. Οι πληροφορίες αυτές, όπως τα σημεία τήξης των εκκινητών, η πιθανότητα υβριδισμού των μορίων αυτών μας βοήθησαν ώστε να επιλέξουμε τις κατάλληλες αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια αναφοράς και για τα γονίδια ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, παρατίθεται ένας πίνακας με τις αλληλουχίες των εκκινητών και με τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: αλληλουχίες εκκινητών και συγκεντρώσεις

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ FORWARD ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ REVERSE ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>ndufs1a</i>	GGCTCCTCTCTTCAATGCAC	CAACCACAACAACAGGATGC	450 <u>nM</u>
<i>ndufs1b</i>	TGGTCTGAAGAGGCAGAGGT	TCCAGCAACACGAGTGAGAG	450 <u>nM</u>
<i>uqcr11a</i>	GATCCCAACTTTGGCTGTATGG	TGCCACTGATGTAGGGAACGT	300 <u>nM</u>
<i>uqcr11b</i>	GGCGGCAAATACATTGCTA	ATCGCCAGTCTGTGAAGTGA	300 <u>nM</u>
<i>uqcrfs1a</i>	TTGCCACACAGACATTAGG	CTTCTGGATTCAGTCTCTCC	300 <u>nM</u>
<i>uqcrfs1a</i>	GGCAAAAACATGACCTTCAA	GCTCCCCCATATTCACAGAC	300 <u>nM</u>
<i>uqcrc2a</i>	AGAACTACTCCCCGTGTCC	GCCAGTCGTAGCACATGAGA	300 <u>nM</u>
<i>uqcrhb</i>	TACGAGCCAAGTGTGAGCAG	GTGCAGTCCTCCAAAGTGGT	300 <u>nM</u>

## 2.7 Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης – Real time PCR

### 2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με πολύπλοκα συστήματα κατόπτρων και φίλτρων που διαβάζουν τον φθορισμό των χρωστικών που έχουν ενσωματωθεί στα υπό μελέτη δείγματα. Βασίζεται στην ανίχνευση και καταμέτρηση των προϊόντων κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τα οποία είναι ευθέως ανάλογα της αρχική ποσότητας του νουκλεϊκού οξέος. Η ανίχνευση αυτή πραγματοποιείται με την βοήθεια μιας φθορίζουσας χρωστικής, της SYBR Green I στη συγκεκριμένη περίπτωση. Η χρωστική αυτή παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα και φθορίζει όταν ενσωματωθεί στο δίκλωνο προϊόν της PCR. Έτσι η παραγωγή των προϊόντων της Q - PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό (Arya, 2005).

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να είναι είτε απόλυτη, στην οποία γίνεται ποσοτικοποίηση βάσει μιας πρότυπης καμπύλης η οποία δημιουργείται από δείγματα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να προσδιοριστεί, είτε σχετική. Στη δεύτερη μέθοδο γίνεται μέτρηση της σχετικής συγκέντρωσης του γονιδίου ενδιαφέροντος σε άγνωστα δείγματα σε σύγκριση με ένα δείγμα ελέγχου με γονίδια αναφοράς. Στη παρούσα διπλωματική εργασία η ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν σχετική και κανονικοποιήθηκε με την βοήθεια γονιδίων αναφοράς (Introduction to Quantitative PCR, 2007 ).

### 2.7.2 Πρωτόκολλο της Real-time PCR

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μηχανήματα ABI ONEPLUS.

Κάθε αντίδραση είχε τελική ποσότητα 10  $\mu$ L.

Τα συστατικά των αντιδράσεων ήταν τα ακόλουθα:

- α) SYBR Green I (αρχική συγκέντρωση 2x  $\rightarrow$  τελική συγκέντρωση 1x)
- β) cDNA με αραιώση 1/30
- γ) ειδικοί εκκινητές (10 pmol/  $\mu$ l)

δ) H<sub>2</sub>O μέχρι η τελική ποσότητα να συμπληρώσει τα 10μl. Κάποιες αντιδράσεις περιείχαν 300 nM/μL για κάθε εκκινητή και κάποιες άλλες 450 nM/μL ώστε να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση στην αντίδραση.

Για 300 nM/μL :

SYBR	5 μl
cDNA	2 μl
Εκκινητές	0,3 μl + 0,3 μl
H <sub>2</sub> O	2,4 μl

Για 450 nM/μL :

SYBR	5 μl
cDNA	2 μl
Εκκινητές	0,45 μl + 0,45 μl
H <sub>2</sub> O	2,1 μl

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες για την Q-PCR:

- αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95,0°C για 10:00 min,
- 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος αποτελείται από 00:15 sec στους 95,0 °C και 01:00 min στους 60°C)
- τέλος ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης διαχωρισμού (00:15 sec στους 95,0°C και 01:00 min στους 50,0 °C), ώστε να επαληθευτεί η ενίσχυση ενός μόνο προϊόντος.

### 2.7.3 Πρότυπη καμπύλη και υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης

Από τα δείγματα cDNA λήφθηκε ποσότητα 1,5 μl από το καθένα και αναμείχθηκαν για την παραγωγή ενός νέου δείγματος (pool). Στο pool πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100, 1:200 με σκοπό να πραγματοποιηθούν πρότυπες καμπύλες για να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών. Για να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπολογιστεί ο βαθμός απόδοσης (efficiency) για κάθε αντίδραση που δίνεται από τον τύπο:  $Efficiency = 10^{(-1/slope)} - 1$ .

Η κλίση (slope) πρέπει να κυμαίνεται από -3.10 έως -3.59, η οποία θα αντιστοιχεί σε εύρος απόδοσης 90–110%. Η τιμή R<sup>2</sup> για την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης πρέπει να είναι 0,985 ή μεγαλύτερη. Το R<sup>2</sup> δείχνει πόσο καλά ταιριάζουν τα σημεία

δεδομένων σε μια ευθεία γραμμή, υποδηλώνοντας τη συμφωνία μεταξύ των αντιγράφων και το γραμμικό εύρος της ανάλυσης (Introduction to Quantitative PCR, 2007).

Όπως αναφέρθηκε με βάση της πρότυπες καμπύλες υπολογίστηκαν οι αποδόσεις για τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν. Τα efficiency φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 7):

Πίνακας 7: αποδόσεις αντιδράσεων (%)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ (%) ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ
<i>ndufs1a</i>	105,2
<i>ndufs1b</i>	106,4
<i>uqcr11a</i>	99,5
<i>uqcr11b</i>	98,4
<i>uqcrfs1a</i>	106,9
<i>uqcrfs1a</i>	100,6
<i>uqcrc2a</i>	96,3
<i>uqcrhb</i>	97

## 2.8 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο περιβάλλον της γλώσσας προγραμματισμού R (R Core Team). Για κάθε ένα από τα υπό εξέταση γονίδια εντοπίστηκαν η μέγιστη και ελάχιστη τιμή επίσης πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός των τιμών διάφορων περιγραφικών στατιστικών, όπως η μέση τιμή, η διάμεσος, η τυπική απόκλιση καθώς και το πρώτο και τρίτο τεταρτημόριο για κάθε ένα από τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά

σημαντικών διαφορών ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκε το t-test. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το Welch's t-test το οποίο είναι πιο αξιόπιστο όταν τα δύο δείγματα έχουν άνισες διακυμάνσεις ή / και άνισα μεγέθη δείγματος. Ως συμπληρωματική μελέτη πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις συσχέτισης μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων ανά αναπτυξιακό στάδιο αλλά και σαν σύνολο.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Έκφραση γονιδίου *ndufs1a*

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *ndufs1a* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση, με την μεγαλύτερη τιμή τυπικής απόκλισης να εμφανίζεται στο τέταρτο και την μικρότερη τιμή στο τρίτο στάδιο.

Συγκρίνοντας τις διαμέσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο τέταρτο στάδιο (0,114) ενώ η ελάχιστη στο δεύτερο στάδιο (0,082).

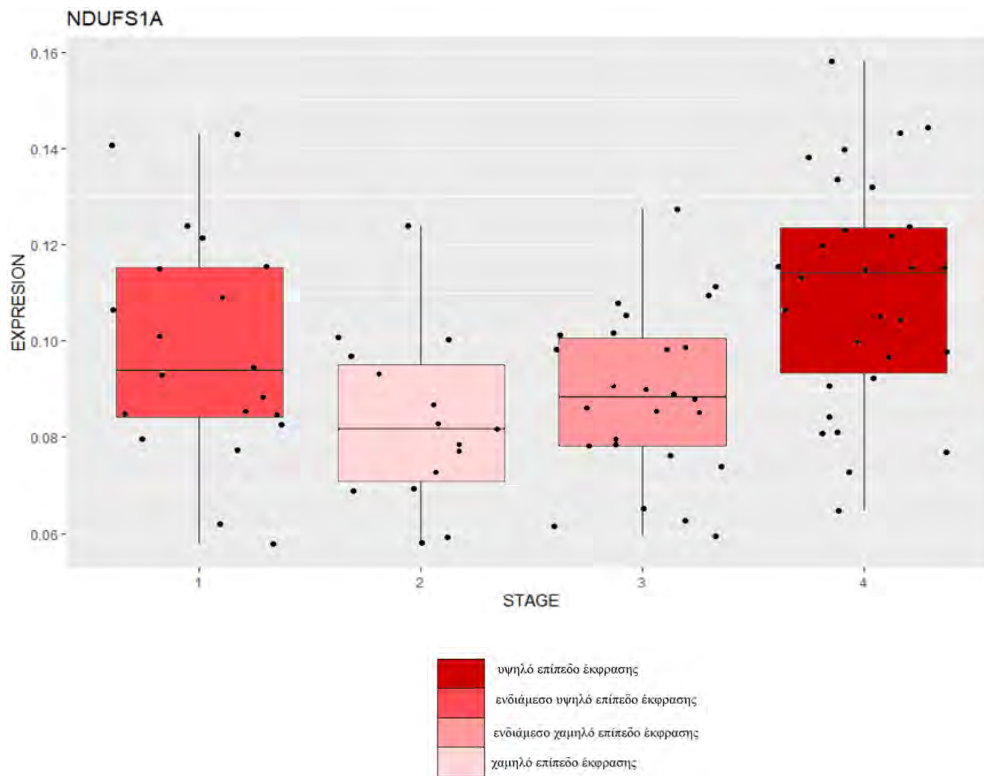
Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 1 \_ στάδιο 2:  $p=0,038$
- στάδιο 3 \_ στάδιο 4:  $p=0,0003$
- στάδιο 2 \_ στάδιο 4:  $p=0,0001$

Τέλος η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων φαίνεται να σχηματίζει ένα διακριτό μοτίβο σχήματος U (Εικόνα 15)

Πίνακας 8: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ndufs1a* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1° αναπτυξιακό στάδιο	2° αναπτυξιακό στάδιο	3° αναπτυξιακό στάδιο	4° αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	0,143	0,124	0,127	0,158
ελάχιστη	0,058	0,058	0,059	0,065
<b>διάμεσος</b>	<b>0,094</b>	<b>0,082</b>	<b>0,088</b>	<b>0,114</b>
μέση τιμή	0,098	0,083	0,089	0,110
τυπική απόκλιση (SD)	0,023	0,018	0,017	0,024



Εικόνα 15: θηκογράμματα box plots με όλα τα δείγματα για κάθε αναπτυξιακό στάδιο του γονιδίου *ndufs1a*.

### 3.2 Έκφραση γονιδίου *ndufs1b*

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *ndufs1b* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο δεύτερο και την μικρότερη στο τέταρτο στάδιο.

Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο 1<sup>ο</sup> στάδιο (0,384) ενώ η ελάχιστη στο 3<sup>ο</sup> στάδιο (0,282). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο1 \_ στάδιο3:  $p=0,011$

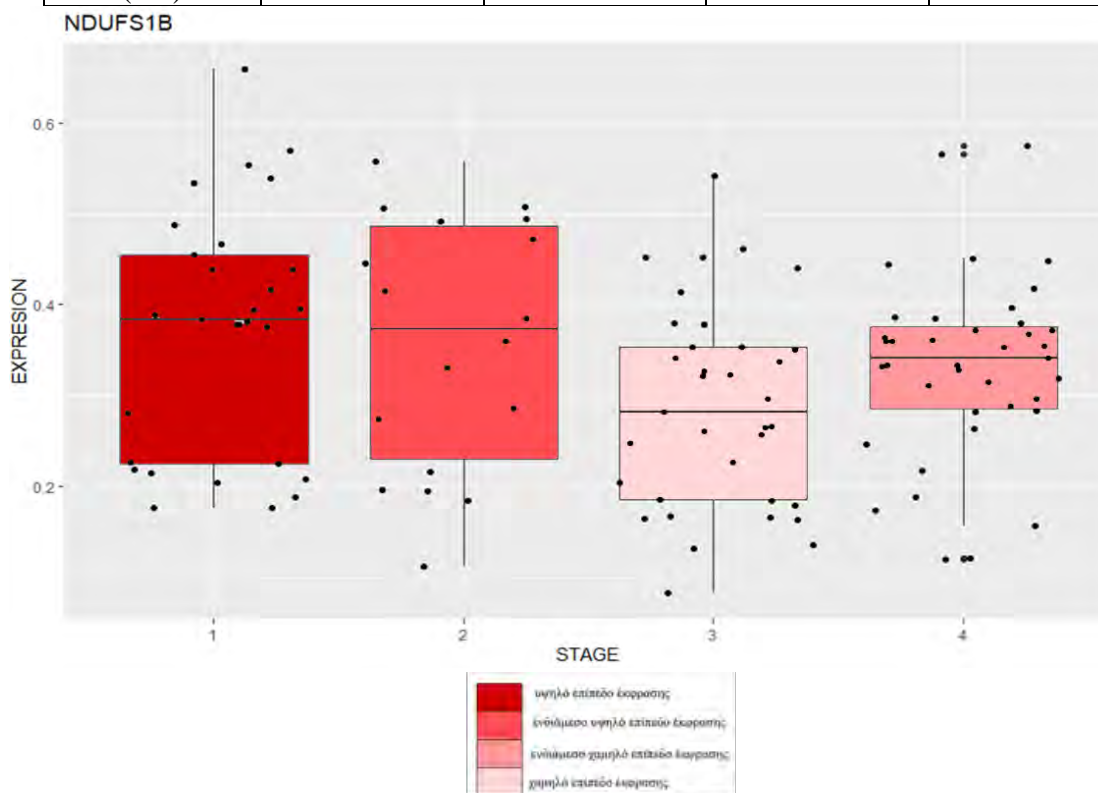
Τέλος, στη συγκεκριμένη περίπτωση η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων δεν σχηματίζει ξεκάθαρα διακριτό μοτίβο σχήματος U το οποίο μπορεί να οφείλεται μικρό αριθμό δειγμάτων και στο



περιορισμένο εύρος διακύμανσης του δευτέρου σταδίου αλλά παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση από τον σχηματισμό του μοτίβου (Εικόνα 16).

Πίνακας 9: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ndufs1b* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1° αναπτυξιακό στάδιο	2° αναπτυξιακό στάδιο	3° αναπτυξιακό στάδιο	4° αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	0,66	0,558	0,541	0,575
ελάχιστη	0,176	0,112	0,082	0,12
<b>διάμεσος</b>	<b>0,384</b>	<b>0,373</b>	<b>0,282</b>	<b>0,342</b>
μέση τιμή	0,371	0,357	0,288	0,332
τυπική απόκλιση (SD)	0,136	0,138	0,112	0,101



Εικόνα 16: box plots με όλες τις παρτίδες για κάθε αναπτυξιακό στάδιο του γονιδίου *ndufs1b*.

### 3.3 Έκφραση γονιδίου *uqr11a*

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *uqr11a* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο πρώτο και την μικρότερη στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο.

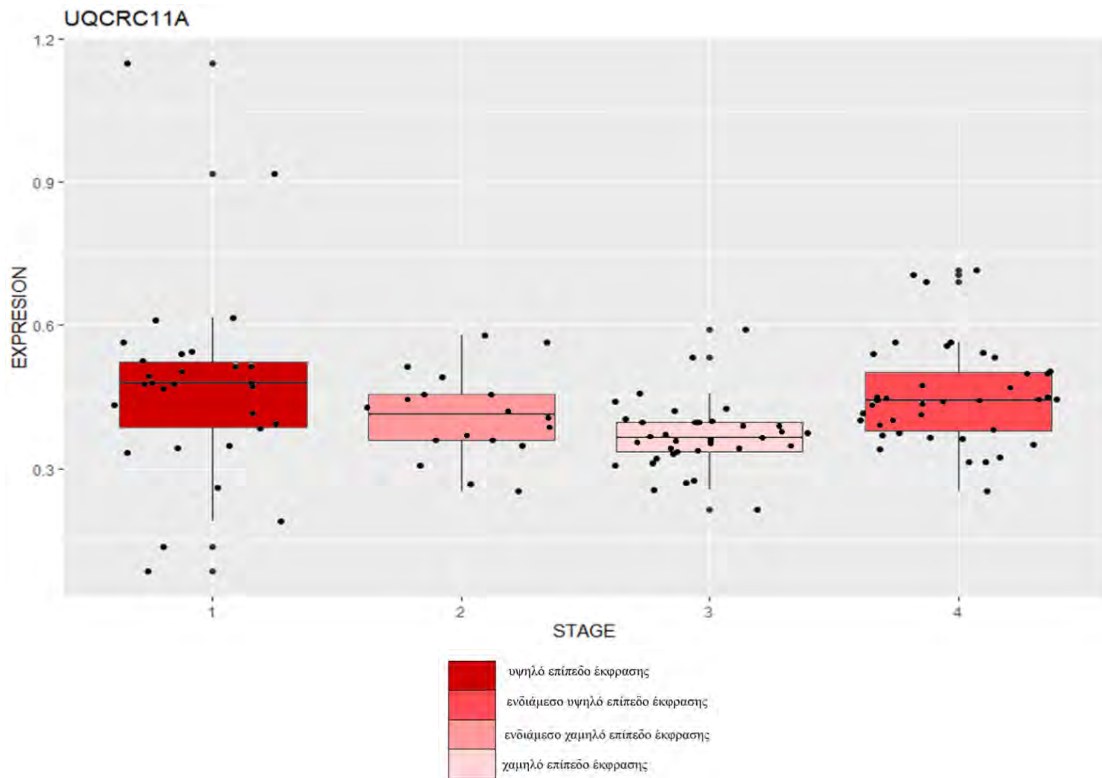
Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο 1<sup>ο</sup> στάδιο (0,478) ενώ η ελάχιστη στο 3<sup>ο</sup> στάδιο (0,366). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 3 \_ στάδιο 4:  $p=0,0001$

Τέλος, η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων φαίνεται να σχηματίζει ένα διακριτό μοτίβο σχήματος U (Εικόνα 17).

Πίνακας 10: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *uqr11a* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	2 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	3 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	4 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	1,149	0,58	0,591	0,714
ελάχιστη	0,0849	0,253	0,214	0,253
<b>διάμεσος</b>	<b>0,478</b>	<b>0,413</b>	<b>0,366</b>	<b>0,443</b>
μέση τιμή	0,472	0,417	0,369	0,452
τυπική απόκλιση (SD)	0,201	0,092	0,071	0,104



Εικόνα 17: box plots με όλες τις παρτίδες για κάθε αναπτυξιακό στάδιο του γονιδίου *uqcr11a*.

### 3.4 Έκφραση γονιδίου *uqcr11b*

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *uqcr11b* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο τρίτο και την μικρότερη στο τέταρτο αναπτυξιακό στάδιο.

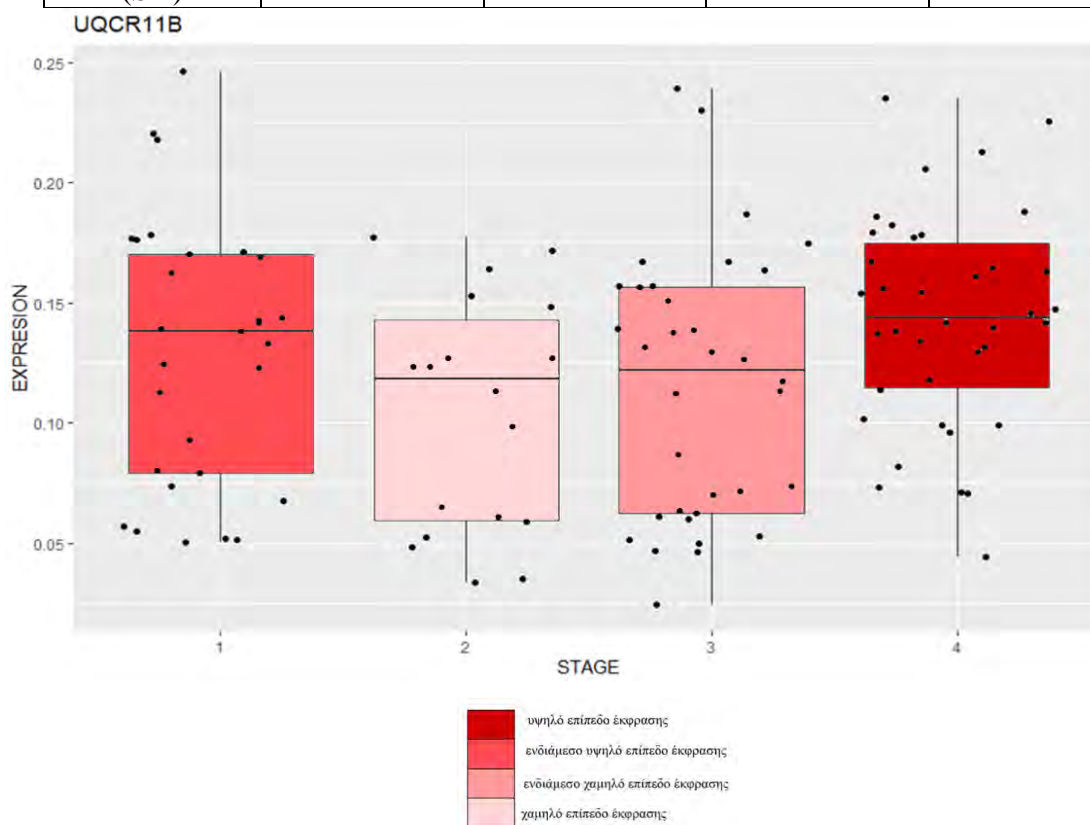
Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο 4<sup>ο</sup> στάδιο (0,144) ενώ η ελάχιστη στο 2<sup>ο</sup> στάδιο (0,118). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 2 \_ στάδιο 4 :  $p=0,008$

Τέλος η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων φαίνεται να σχηματίζει ένα διακριτό μοτίβο σχήματος U (Εικόνα 18).

Πίνακας 11: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *uqcr11b* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1° αναπτυξιακό στάδιο	2° αναπτυξιακό στάδιο	3° αναπτυξιακό στάδιο	4° αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	0,246	0,177	0,239	0,235
ελάχιστη	0,05	0,034	0,024	0,044
<b>διάμεσος</b>	<b>0,138</b>	<b>0,118</b>	<b>0,122</b>	<b>0,144</b>
μέση τιμή	0,129	0,105	0,115	0,143
τυπική απόκλιση (SD)	0,05541	0,049	0,05544	0,045



Εικόνα 18: box plots όλων των δειγμάτων για το γονίδιο *uqcr11b*.

### 3.5 Έκφραση γονιδίου *uqcrfs1a*

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *uqcrfs1a* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο δεύτερο και την μικρότερη στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο.

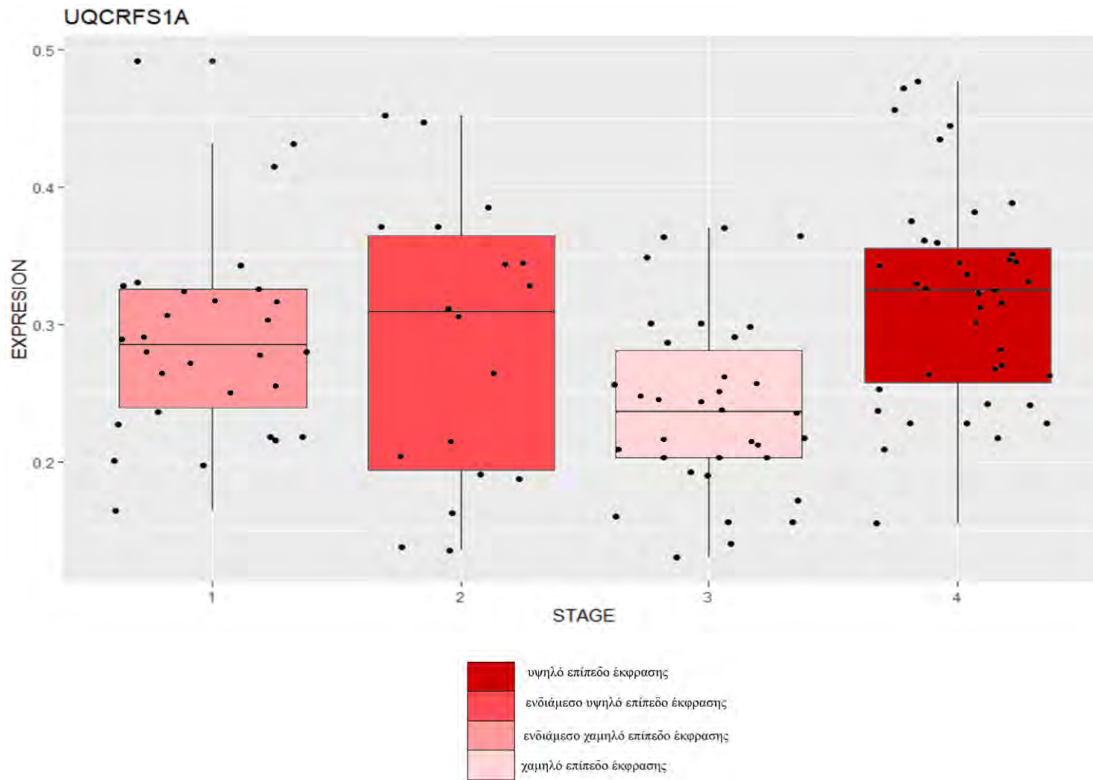
Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο 4<sup>ο</sup> στάδιο (0,325) ενώ η ελάχιστη στο 3<sup>ο</sup> στάδιο (0,237). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 1 \_ στάδιο 3 :  $p = 0,003$

Τέλος, στη συγκεκριμένη περίπτωση η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων δεν σχηματίζει ξεκάθαρα διακριτό μοτίβο σχήματος U το οποίο μπορεί να οφείλεται μικρό αριθμό δειγμάτων και στο περιορισμένο εύρος διακύμανσης του δευτέρου σταδίου αλλά παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση από τον σχηματισμό του μοτίβου (Εικόνα 19).

Πίνακας 12: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *uqcrfs1a* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	2 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	3 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	4 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	0,492	0,452	0,37	0,477
ελάχιστη	0,165	0,136	0,13	0,155
<b>διάμεσος</b>	<b>0,285</b>	<b>0,309</b>	<b>0,237</b>	<b>0,325</b>
μέση τιμή	0,293	0,287	0,239	0,317
Τυπική απόκλιση (SD)	0,075	0,102	0,064	0,078



Εικόνα 19: box plots όλων των δειγμάτων για τα αναπτυξιακά στάδια αναφορικά με το *uqcrfs1a*.

### 3.6 Έκφραση γονιδίου *uqcrfs1b*

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *uqcrfs1b* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο πρώτο και την μικρότερη στο τρίτο στάδιο.

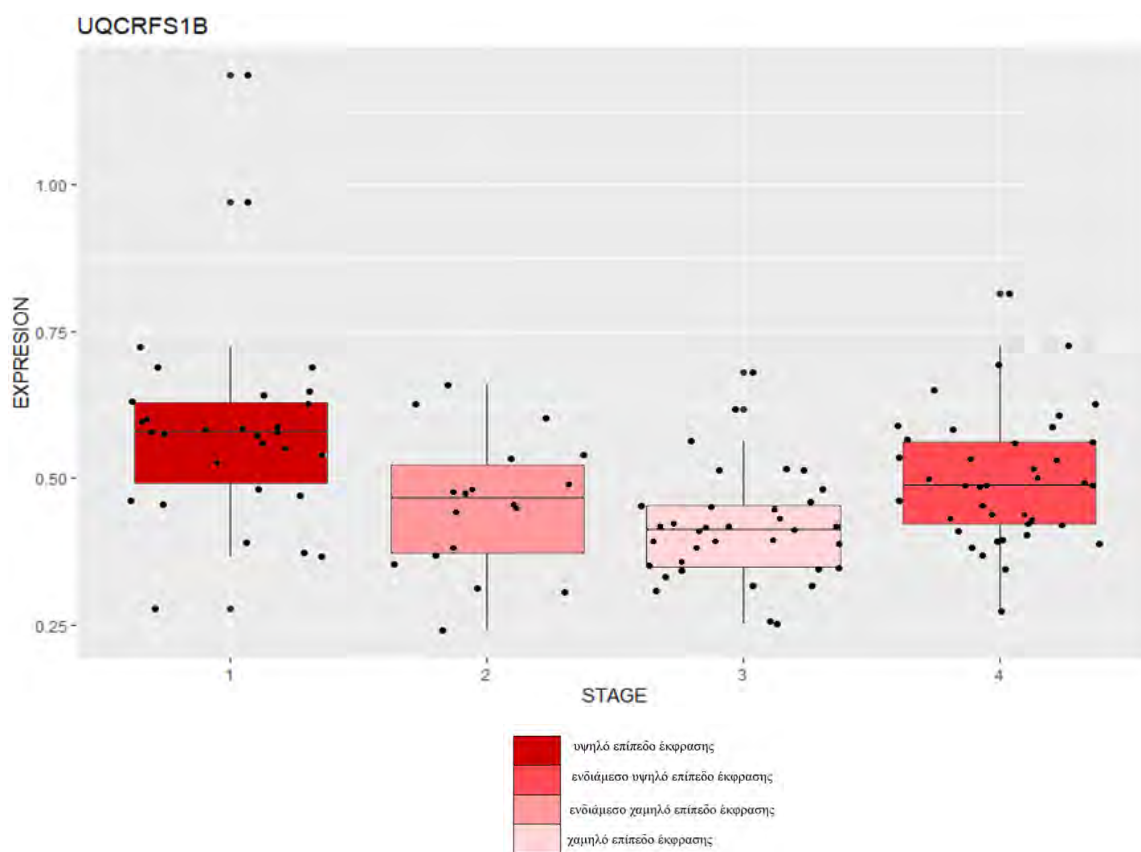
Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο 1<sup>ο</sup> στάδιο (0,579) ενώ η ελάχιστη στο 3<sup>ο</sup> στάδιο (0,413). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 1 \_ στάδιο 2:  $p=0,003$
- στάδιο 3 \_ στάδιο 4:  $p=0,0005$

Τέλος η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων φαίνεται να σχηματίζει ένα μοτίβο σχήματος U (Εικόνα 20).

Πίνακας 13 : περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *uqcrfs1b* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	2 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	3 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	4 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	1,187	0,658	0,681	0,815
ελάχιστη	0,277	0,241	0,251	0,273
<b>διάμεσος</b>	<b>0,579</b>	<b>0,466</b>	<b>0,413</b>	<b>0,488</b>
μέση τιμή	0,584	0,455	0,415	0,499
τυπική απόκλιση (SD)	0,171	0,114	0,092	0,12



Εικόνα 20: box plots όλων των δειγμάτων για τα αναπτυξιακά στάδια αναφορικά με το *uqcrfs1b*.

### 3.7 Έκφραση γονιδίου *uqcrhb*

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *uqcrhb* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο πρώτο και την μικρότερη στο δεύτερο αναπτυξιακό στάδιο.

Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο 1<sup>ο</sup> στάδιο (0,629) ενώ η ελάχιστη στο 3<sup>ο</sup> στάδιο (0,486). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

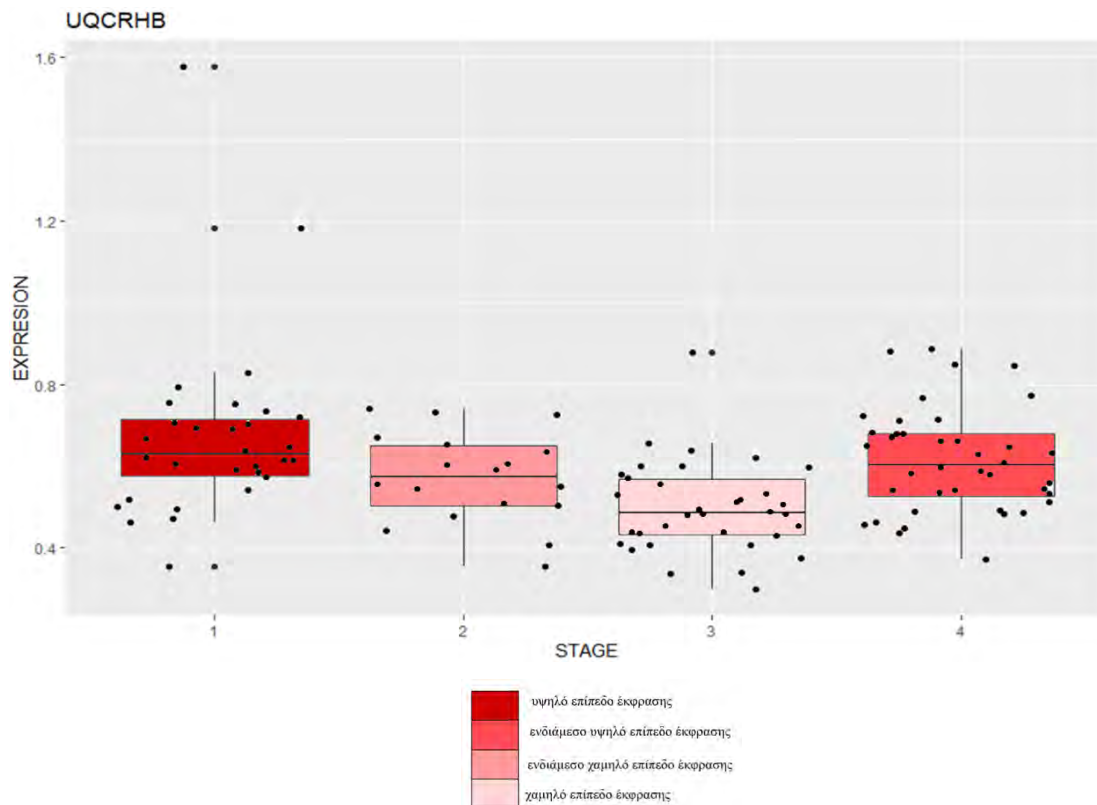
- στάδιο 1 \_ στάδιο 3 :  $p=0,0004$

Τέλος η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων φαίνεται να σχηματίζει ένα διακριτό μοτίβο σχήματος U (Εικόνα 21).

Πίνακας 14 : περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *uqcrhb* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	2 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	3 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	4 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	1,578	0,74	0,877	0,886
ελάχιστη	0,354	0,354	0,298	0,371
<b>διάμεσος</b>	<b>0,629</b>	<b>0,574</b>	<b>0,486</b>	<b>0,603</b>
μέση τιμή	0,675	0,572	0,499	0,6145
Τυπική απόκλιση (SD)	0,226	0,111	0,112	0,127





Εικόνα 21: box plots σχετικά με το γονίδιο *uqcrhb*.

### 3.8 Έκφραση γονιδίου *uqcrc2a*

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν την έκφραση του γονιδίου *uqcrc2a* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο δεύτερο και την μικρότερη στο τέταρτο αναπτυξιακό στάδιο.

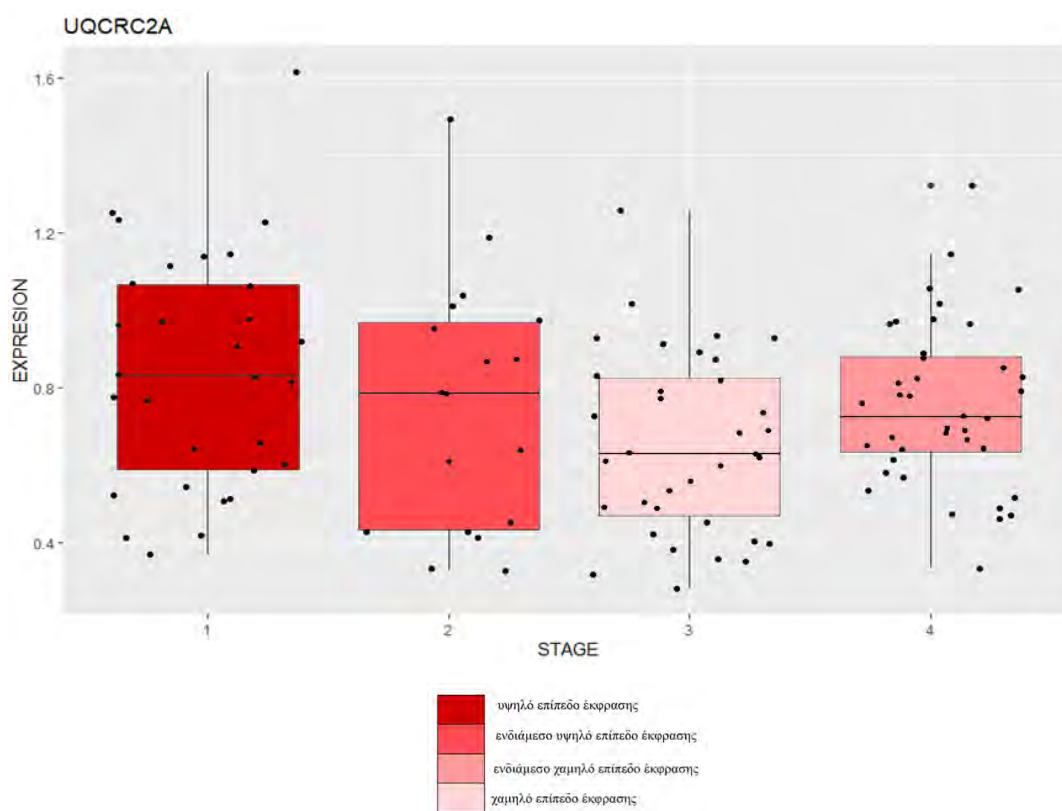
Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι η έκφραση του γονιδίου μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο πρώτο στάδιο (0,831) ενώ η ελάχιστη στο τρίτο στάδιο (0,628). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 1 \_ στάδιο 3:  $p=0,006$

Τέλος η διαφοροποίηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την εναλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων φαίνεται να σχηματίζει ένα διακριτό μοτίβο σχήματος U (Εικόνα 22).

Πίνακας 15: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονίδιου *uqcrc2a* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1° αναπτυξιακό στάδιο	2° αναπτυξιακό στάδιο	3° αναπτυξιακό στάδιο	4° αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	1,614	1,491	1,258	1,320
ελάχιστη	0,368	0,327	0,281	0,332
<b>διάμεσος</b>	<b>0,831</b>	<b>0,786</b>	<b>0,628</b>	<b>0,723</b>
μέση τιμή	0,846	0,755	0,652	0,754
Τυπική απόκλιση (SD)	0,304	0,326	0,232	0,21



Εικόνα 22: box plots όλων των δειγμάτων για το γονίδιο *uqcrc2a*.

### 3.9 Λόγος των παραλόγων *ndufs1a\_ndufs1b*

Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά που αφορούν τον λόγο έκφρασης του *ndufs1a* προς το *ndufs1b* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Ο λόγος μας δείχνει την σχέση των επιπέδων έκφρασης για τα δύο γονίδια και άρα υψηλός λόγος σημαίνει μειωμένη έκφραση του αριθμητή (*ndufs1a*) σε σχέση με τον παρονομαστή (*ndufs1b*) και χαμηλός λόγος το αντίστροφο. Συγκεκριμένα, εδώ παρατηρούμε συνολικά βαθμιαία αύξηση του λόγου επομένως έχουμε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *b* παραλόγου. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά μικρή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο τρίτο και την μικρότερη στο πρώτο αναπτυξιακό στάδιο.

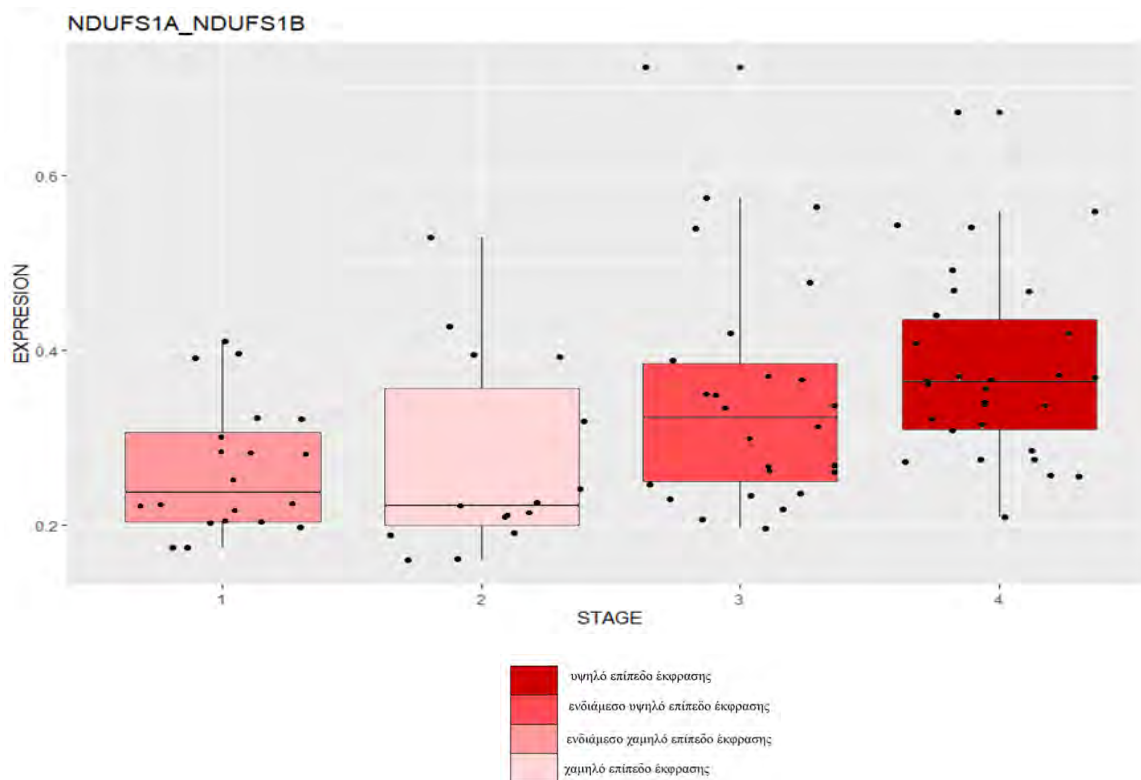
Συγκρίνοντας τις διαμέσους παρατηρούμε ότι ο λόγος αυτών των δύο γονιδίων μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια όχι όμως σε μεγάλο βαθμό. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο τέταρτο στάδιο (0,363) ενώ η ελάχιστη στο δεύτερο στάδιο (0,222). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 2\_στάδιο 4:  $p=0,005$
- στάδιο 1\_στάδιο 3:  $p=0,01$

Πίνακας 16: περιγραφικά στατιστικά για τον λόγο των επιπέδων έκφρασης των παραλόγων *ndufs1a\_ndufs1b* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1° αναπτυξιακό στάδιο	2° αναπτυξιακό στάδιο	3° αναπτυξιακό στάδιο	4° αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	0,41	0,529	0,724	0,672
ελάχιστη	0,174	0,16	0,197	0,209
<b>διάμεσος</b>	<b>0,237</b>	<b>0,222</b>	<b>0,323</b>	<b>0,363</b>
μέση τιμή	0,264	0,272	0,347	0,378
τυπική απόκλιση (SD)	0,074	0,112	0,133	0,106

Επιπλέον, στην Εικόνα 23 φαίνεται η εναλλαγή του λόγου, ανά αναπτυξιακό στάδιο, η οποία μας δίνει πληροφορίες για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των παραλόγων.



Εικόνα 23: box plots όλων των δειγμάτων για *ndufs1a* / *ndufs1b*.

### 3.10 Λόγος των παραλόγων *uqcr11a*\_*uqcr11b*

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζονται διαφορά περιγραφικά στατιστικά που αφορούν τον λόγο έκφρασης του *uqcr11a* προς το *uqcr11b* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Ο λόγος μας δείχνει την σχέση των επιπέδων έκφρασης για τα δύο γονίδια. Άρα υψηλός λόγος σημαίνει μειωμένη έκφραση του αριθμητή (*uqcr11a*) σε σχέση με τον παρονομαστή (*uqcr11b*) και χαμηλός λόγος το αντίστροφο. Συγκεκριμένα, εδώ παρατηρούμε μείωση του λόγου επομένως έχουμε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *a* παραλόγου και μείωση των επιπέδων έκφρασης του *b* παραλόγου. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά υψηλή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο δεύτερο και την μικρότερη στο τελευταίο αναπτυξιακό στάδιο.

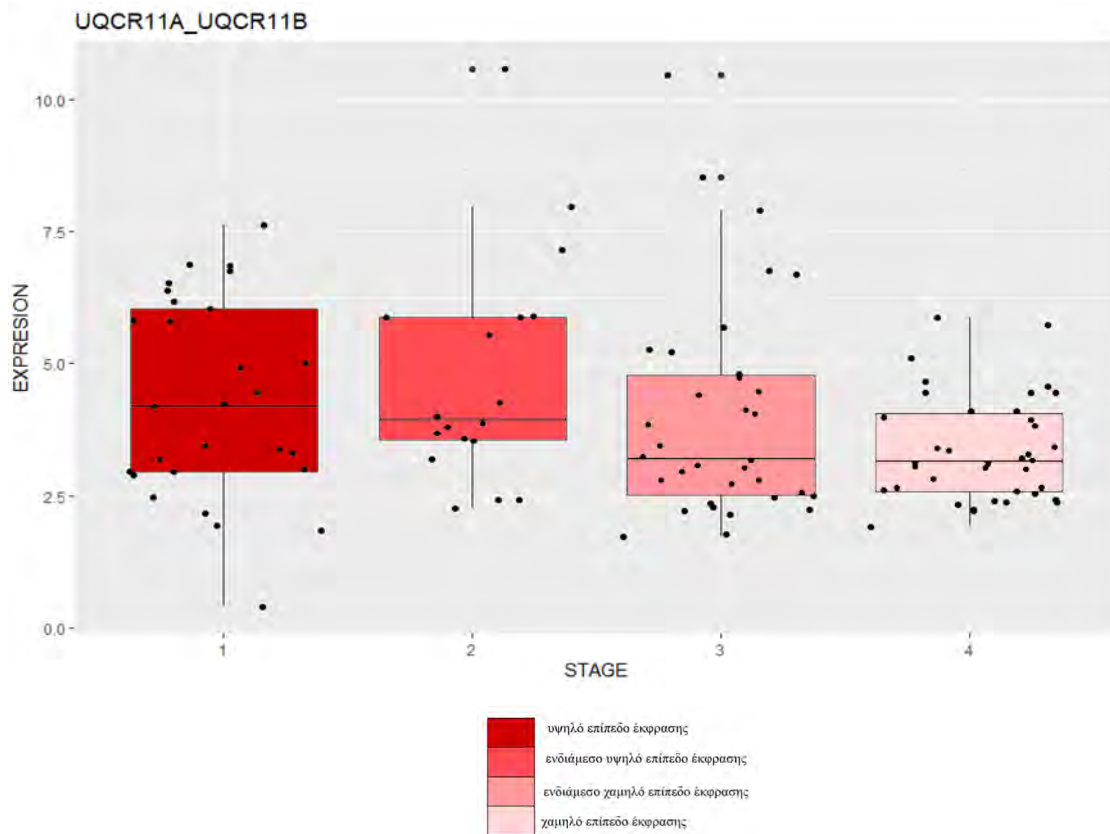
Συγκρίνοντας τις διάμεσους παρατηρούμε ότι ο λόγος αυτών των δύο γονιδίων μεταβάλλεται αναμεσά στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο πρώτο στάδιο (4,189) ενώ η ελάχιστη στο τέταρτο στάδιο (3,14). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

- στάδιο 1\_στάδιο 4:  $p=0,023$
- στάδιο 2\_στάδιο 4:  $p=0,017$

Πίνακας 17: περιγραφικά στατιστικά για τον λόγο των επιπέδων έκφρασης των παράλογων *uqcr11a\_uqcr11b* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1° αναπτυξιακό στάδιο	2° αναπτυξιακό στάδιο	3° αναπτυξιακό στάδιο	4° αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	7,613	10,584	10,462	5,871
ελάχιστη	0,39	2,249	1,726	1,903
<b>διάμεσος</b>	<b>4,189</b>	<b>3,939</b>	<b>3,193</b>	<b>3,14</b>
μέση τιμή	4,292	4,776	4,01	3,38
τυπική απόκλιση (SD)	1,884	2,178	2,07	0,996

Επιπλέον, στην Εικόνα 24 φαίνεται η εναλλαγή του λόγου, ανά αναπτυξιακό στάδιο, η οποία μας δίνει πληροφορίες για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των παραλόγων.



Εικόνα 24: box plots όλων των δειγμάτων για *uqcr11a / uqcr11b*.

### 3.11 Λόγος των παραλόγων *uqcrfs1a\_uqcrfs1b*

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται διαφορά περιγραφικά στατιστικά που αφορούν τον λόγο έκφρασης του *uqcrfs1a* προς το *uqcrfs1b* για τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια. Ο λόγος μας δείχνει την σχέση των επιπέδων έκφρασης για τα δύο γονίδια. Άρα υψηλός λόγος σημαίνει μειωμένη έκφραση του αριθμητή (*uqcrfs1a*) σε σχέση με τον παρονομαστή (*uqcrfs1b*) και χαμηλός λόγος το αντίστροφο. Εδώ παρατηρούμε αύξηση του λόγου επομένως μείωση των επιπέδων έκφρασης του *a* παραλόγου σε συνδυασμό με μείωση των επιπέδων έκφρασης του παρονομαστή. Σε όλα τα στάδια παρατηρείται σχετικά χαμηλή τυπική απόκλιση με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται στο δεύτερο και την μικρότερη στο τρίτο αναπτυξιακό στάδιο.

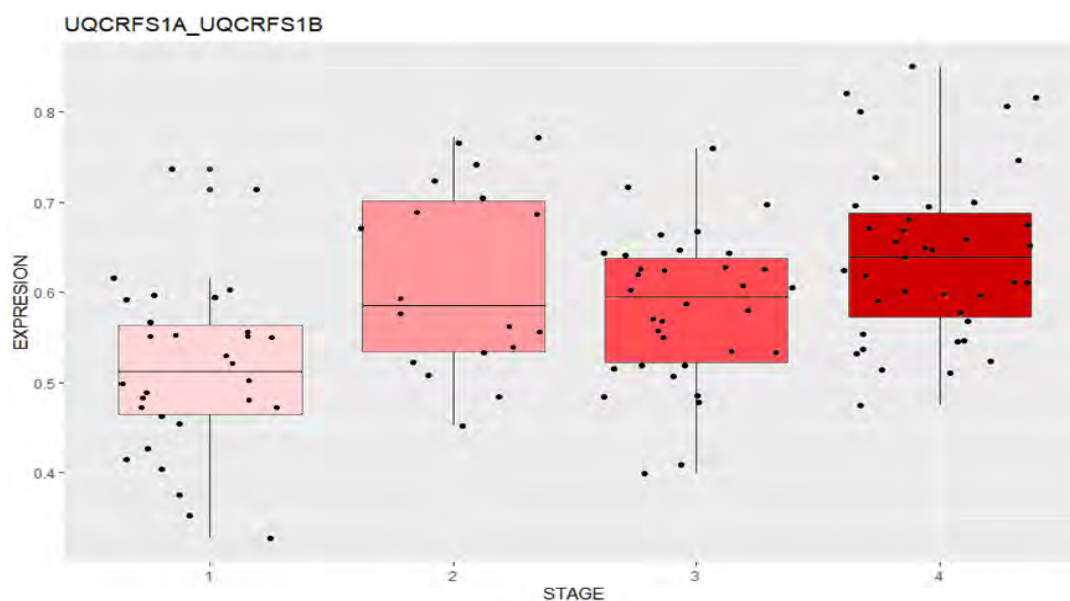
Συγκρίνοντας τις διαμέσους παρατηρούμε ότι ο λόγος αυτών των δύο γονιδίων μεταβάλλεται ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται στο τέταρτο στάδιο (0,64) ενώ η ελάχιστη στο πρώτο στάδιο (0,511). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ) παρατηρούνται μεταξύ των σταδίων:

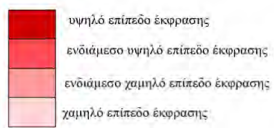
- στάδιο 1\_στάδιο 2:  $p=0,002$
- στάδιο 3\_στάδιο 4:  $p=0,006$
- στάδιο 1\_στάδιο 3:  $p=0,003$

Πίνακας 18: περιγραφικά στατιστικά για τον λόγο των επιπέδων έκφρασης των παραλόγων *uqcrfs1a\_uqcrfs1b* ανά αναπτυξιακό στάδιο.

	1 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	2 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	3 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο	4 <sup>ο</sup> αναπτυξιακό στάδιο
μέγιστη	0,737	0,772	0,76	0,851
ελάχιστη	0,327	0,452	0,399	0,474
<b>διάμεσος</b>	<b>0,511</b>	<b>0,585</b>	<b>0,595</b>	<b>0,640</b>
μέση τιμή	0,515	0,616	0,583	0,641
τυπική απόκλιση (SD)	0,095	0,103	0,082	0,094

Επιπλέον, στην Εικόνα 25 φαίνεται η εναλλαγή του λόγου, ανά αναπτυξιακό στάδιο, η οποία μας δίνει πληροφορίες για την σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των παραλόγων.





Εικόνα 25: box plots όλων των δειγμάτων για *uqcrfs1a* / *uqcrfs1b*.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου μιας σειράς γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση σε ιχθύδια λαβρακιού τεσσάρων αντιπροσωπευτικών πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων του είδους. Μελετήθηκαν τα γονίδια, *ndufs1 (a&b)*, *uqcr11 (a&b)*, *uqcrfs1 (a&b)*, *uqcrhb*, *uqcr2a* διότι αποτελούν υπομονάδες με καταλυτικό ή βοηθητικό ρόλο των συμπλόκων I και III που συμμετέχουν στην μεταφορά ηλεκτρονίων ώστε να πραγματοποιηθεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών μας βοηθάει να κατανοήσουμε το λειτουργικό τους ρόλο στα αναπτυξιακά στάδια υπό μελέτη, αλλά και να αντλήσουμε δεδομένα που σκιαγραφούν την πλαστικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ως σύνολο στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του ψαριού. Επίσης μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τον λειτουργικό ρόλο των παράλογων γονιδίων που έχουν προκύψει από τον ειδικό για τους τελεόστεους διπλασιασμό του γονιδιώματος, γεγονός που διαφοροποιεί την ικανότητα ρύθμισης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα ψάρια σε σχέση με τα θηλαστικά για τα οποία έχουμε και τις περισσότερες πληροφορίες.

Πιο αναλυτικά, το γονίδιο *ndufs1* (NADH ubiquinone oxidoreductase core subunit s1) κωδικοποιείται από το πυρηνικό γονιδίωμα, βρίσκεται στο N-module του συμπλόκου I και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου. Έχει καταλυτική δράση και εμφανίζει υψηλή συντήρηση στους ευκαρυώτες (Bermejo-Nogales et al., 2015). Το γονίδιο *ndufs1b* σε σύγκριση με το παράλογό του έχει μεγαλύτερη έκφραση (περίπου 0,2 μονάδες) σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Επίσης, το πρώτο εμφανίζει μέγιστο επίπεδο έκφρασης με βάση τη διάμεσο στο πρώτο στάδιο ενώ το *ndufs1a* εμφανίζει μέγιστη έκφραση στο τελευταίο στάδιο μελέτης. Κοινό χαρακτηριστικό είναι ο σχηματισμός U των επιπέδων έκφρασης. Το γονίδιο *uqcr11* (cytochrome b-c1 complex subunit 10) κωδικοποιείται από το πυρηνικό γονιδίωμα, ανήκει στο σύμπλοκο III και αποτελεί μέρος του λειτουργικού πυρήνα του κυτοχρώματος b-c1. Έχει ρυθμιστικό/βοηθητικό ρόλο (Bermejo-Nogales et al., 2015). Το γονίδιο *uqcr11a* έχει υψηλότερη έκφραση (περίπου 0,3 μονάδες) σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια σε σχέση με το παράλογό του. Επίσης το πρώτο εμφανίζει την μέγιστη έκφραση με βάση την διάμεσο στο πρώτο αναπτυξιακό στάδιο ενώ το *uqcr11b* έχει μέγιστη έκφραση στο τελευταίο στάδιο. Το κοινό τους είναι ο σχηματισμός U των επιπέδων έκφρασης. Το γονίδιο

*uqcrfs1* (cytochrome b-c1 complex subunit Rieske) κωδικοποιείται από πυρηνικό γονιδίωμα και μαζί με τα MT-CYB, CYC1 αποτελούν τους τρεις καταλυτικούς πυρήνες του συμπλόκου III (Bermejo-Nogales et al., 2015). Συγκεκριμένα, το γονίδιο *uqcrfs1b* εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (0,2 μονάδες περίπου) σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια σε σύγκριση με το παράλογό του. Το πρώτο έχει μέγιστο επίπεδο έκφρασης στο πρώτο αναπτυξιακό στάδιο ενώ το γονίδιο *uqcrfs1a* στο τέταρτο στάδιο. Και τα δύο εμφανίζουν το χαρακτηριστικό μοτίβο U στο σύνολο των αναπτυξιακών σταδίων. Το γονίδιο *uqcrhb* (cytochrome b-c1 complex subunit 6) κωδικοποιείται από πυρηνικό γονιδίωμα και έχει ρυθμιστικό/βοηθητικό ρόλο (Bermejo-Nogales et al., 2015). Όπως και στα προηγούμενα έτσι και σε αυτό υπάρχει το μοτίβο U. Να σημειωθεί ότι έχει εντοπιστεί παράλογο γονίδιο του γονιδίου *uqcrhb* στο γονιδίωμα του λαβρακιού και ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του είναι στα άμεσα ερευνητικά σχέδια.

Συγκρίνοντας το με το ρυθμιστικό *uqcr11a* παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση (0,2 μονάδες περίπου) του *uqcrhb* σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και επίσης το *uqcrhb* έχει μέγιστη γονιδιακή έκφραση με βάση τη διάμεσο στο πρώτο αναπτυξιακό στάδιο σε αντίθεση με το άλλο ρυθμιστικό που έχει μέγιστη έκφραση στο τελευταίο στάδιο. Το *uqcrc2a* (cytochrome b-c1 complex subunit 2) κωδικοποιείται από πυρηνικό γονιδίωμα και έχει ρυθμιστικό/βοηθητικό ρόλο (Bermejo-Nogales et al., 2015). Συγκρίνοντας το με τα δύο προηγούμενα ρυθμιστικά γονίδια, έχει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Επίσης και αυτό εμφανίζει το μοτίβο U. Να σημειωθεί ότι και για αυτό το γονίδιο έχει εντοπιστεί παράλογο στο γονιδίωμα του λαβρακιού και ο υπολογισμός των επιπέδων έκφρασης του είναι στα άμεσα ερευνητικά σχέδια.

Κάνοντας μια πιο σφαιρική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων του συμπλόκου III παρατηρείται ότι οι ρυθμιστικές υπομονάδες (*uqcr11*, *uqcrh*, *uqcrc2*) έχουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την καταλυτική υπομονάδα (*uqcrfs1*) το οποίο μπορεί να υποδηλώνει ότι η συναρμολόγηση των συμπλόκων και η τέλεση βοηθητικών λειτουργιών αποτελούν πεδίο ρύθμισης της λειτουργίας του συμπλόκου.

Μια πιθανή εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων και συγκεκριμένα για το μοτίβο U που παρατηρείτε είναι η ακόλουθη: στο πρώτο αναπτυξιακό στάδιο (first feeding) το ιχθύδιο βρίσκεται σε μια κατάσταση κατά την οποία πρέπει για πρώτη φορά να

αναζητήσει εξωγενή πηγή θρέψης καθώς τα λεκιθικά αποθέματα εξαντλούνται και πρέπει να αναζητήσει άλλη πηγή θρεπτικών. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο πραγματοποιεί μικρές, άτακτες κινήσεις καθώς δεν έχουν σχηματιστεί πτερύγια για να μπορεί να κολυμπήσει και πρέπει να αναζητήσει την εξωγενή τροφή του με αυτό τον τρόπο. Αυτή η κατάσταση θα μπορούσε να δικαιολογήσει αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις καθώς πρέπει να αναζητήσει (όχι με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο) και να μεταβολίσει μια νέα πηγή θρέψης. Στα δύο επόμενα αναπτυξιακά στάδια το flexion και το end of larvae rearing παρατηρείται μια σταδιακή πτώση στην έκφραση και στη συνέχεια αυξάνει ξανά. Σε αυτά τα στάδια έχει αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις καθώς αυξάνει σε μέγεθος και πραγματοποιούνται μορφολογικές αλλαγές αλλά έχουν σχηματιστεί πλέον τα πτερύγια και η ουρά, επομένως τα ιχθύδια έχουν αναπτύξει κολυμβητική ικανότητα γεγονός που καθιστά την εύρεση τροφής πιο αποτελεσματική και λιγότερο ενεργοβόρα. Στο τελευταίο υπό μελέτη αναπτυξιακό στάδιο, mid metamorphosis, τα ιχθύδια αυξάνουν σημαντικά σε μέγεθος, σε αυτό το στάδιο διαδραματίζονται σημαντικές αλλαγές στην μορφολογία την φυσιολογία και των μεταβολισμό τους. Οι παραπάνω διαδικασίες χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα ενεργοβόρες και θα δικαιολογούσαν αύξηση στα επίπεδα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Τέλος, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή τα σύμπλοκα έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης και την δημιουργία υπερσυμπλόκων. Ένα από τα βασικότερα είναι το αναπνεόσωμα με στοιχειομετρία  $I_1III_2IV_1$ . Με βάση την στοιχειομετρία αυτή είναι πιθανό τα γονίδια του συμπλόκου III να εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης από τα γονίδια του συμπλόκου I, κάτι το οποίο παρατηρείται με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς όλα τα γονίδια του συμπλόκου III έχουν κατά πολύ μεγαλύτερη έκφραση από τα γονίδια *ndufs1a* και *ndufs1b*. Συγκεκριμένα, ο λόγος *uqcr11/ndufs1* ισούται με 1,26 (1,76/2,22), ο λόγος *uqcrfs1/ndufs1* ισούται με 1,76 (3,10/1,76), ο λόγος *uqcrhb/ndufs1* ισούται με 1,30 (2,30 /1,76) και ο λόγος *uqcrc2a/ndufs1* ισούται με 1,69 (2,97/1,76). Η ολοκλήρωση της ανάλυσης για τα γονίδια που αναφερθήκαν παραπάνω αλλά και για τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα υπόλοιπα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης θα μας βοηθήσει να εξάγουμε πιο ασφαλή και εμπειριστατόμενα συμπεράσματα.

Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και ο αριθμός των μιτοχονδρίων ο οποίος δεν είναι σταθερός, καθώς η έκφραση και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σχετίζονται

άμεσα με τον αριθμό των μιτοχονδρίων. Η βιογένεση του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει το σχηματισμό του οργανιδίου κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του κυττάρου. Τα αρχικά μιτοχόνδρια μεγαλώνουν και διαιρούνται κατά την μίτωση παρέχοντας τον απαιτούμενο αριθμό θυγατρικών μιτοχονδρίων. Η διαίρεση των μιτοχονδρίων ελέγχεται από ένα πλαίσιο κυτταρικής σηματοδότησης που καταλήγει στη συντονισμένη έκφραση των δύο γονιδιωμάτων· πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA (Para et al., 2012). Λόγω της περιορισμένης βιβλιογραφίας για τους τελεόστεους παρατίθενται παραδείγματα αυτής της μιτοχονδριακής μεταβολής από άλλα είδη. Μια αναφορά σχετιζόμενη με την μιτοχονδριακή βιογένεση αφορά το είδος *Xenopus laevis* στου οποίου τα μη γονιμοποιημένα αυγά, το ωάριο παρέχει αρκετά μιτοχόνδρια για να εξοπλίσει τα κύτταρα. Μετά την γονιμοποίηση δεν παρατηρείται αύξηση της μιτοχονδριακής μάζας ή του μιτοχονδριακού DNA μέχρι το στάδιο της προνούμφης κολύμβησης. Ωστόσο, παρά την έλλειψη μιτοχονδριακής βιογένεσης παρατηρούνται εντυπωσιακές αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία μετά την γονιμοποίηση, ιδιαίτερα στην αποτελεσματικότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά την διάρκεια περιόδων ταχείας ανάπτυξης – μεταμόρφωσης παρατηρείται συχνά μιτοχονδριακή βιογένεση (Pollak, Sutton, 1980). Ένα άλλο παράδειγμα μιτοχονδριακής διαφοροποίησης σχετίζεται με την ρύθμιση των μιτοχονδρίων σε μυς σχετιζόμενους με την πτήση στο *Locusta migratoria*, στο οποίο παρατηρήθηκε αύξηση του μιτοχονδριακού όγκου στο τετραπλάσιο στις δύο εβδομάδες μεταξύ της εισόδου στο τελευταίο προνυμφικό στάδιο και στο στάδιο ικανότητας πτήσης (ενήλικο). Εντός της ίδιας περιόδου η δραστηριότητα του κυτοχρώματος οξειδάσης c διπλασιάστηκε. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στον αριθμό αντιγράφων mtDNA, ενώ υπήρχε τριπλάσια μείωση των μιτοχονδριακών μεταγράφων. Ο ρυθμός μετάφρασης ήταν διπλάσιος στους μυς των προνυμφών, κάτι που μπορεί να εξηγηθεί μόνο εν μέρει από την υψηλότερη περιεκτικότητα σε μιτοχονδριακό RNA. Επομένως, η ωρίμανση των μυών είναι αποτέλεσμα μιτοχονδριακής διαφοροποίησης, μια αύξηση της ικανότητας μεταγραφής γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των προϋπαρχόντων οργανιδίων (Sog1 et al., 2000). Συνεπώς, η διαφοροποίηση είναι μια σύνθετη διαδικασία η οποία μπορεί να εννοηθεί ως πρόγραμμα γεγονότων το οποίο προωθείται από συνεχείς και επακόλουθες αλλαγές στο εσωτερικό μικροπεριβάλλον του κυττάρου και αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων, οι οποίοι εξαρτώνται από τον τρόπο με τον οποίο τα διαφοροποιημένα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιήσουν την

μιτοχονδριακή δραστηριότητα και μορφολογία εναρμονισμένη με την δική τους αναπτυξιακή κατάσταση (Sog1 et al., 2000).

Μέσα από αυτά τα παραδείγματα, γίνεται κατανοητό ότι ο μιτοχονδριακός πολλαπλασιασμός και η μιτοχονδριακή διαφοροποίηση είναι δύο διαδικασίες οι οποίες βρίσκονται σε άμεση σύνδεση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Μια τέτοια μεταβολή είτε στον αριθμό των μιτοχονδρίων είτε στη μεταγραφική ικανότητα αυτών θα μπορούσε να είναι η αιτία της αρχικά αυξημένης έκφρασης των γονιδίων στο πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο, της μείωσης και στη συνέχεια της εκ νέου αύξησης των επιπέδων έκφρασης κατά τη μεταμόρφωση.

Για να διασαφηνιστεί το παραπάνω είναι αναγκαία η διερεύνηση του αριθμού μιτοχονδρίων στο κύτταρο καθώς και του αριθμού αντιγράφων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στο μιτοχόνδριο. Οι λεγόμενοι « κύριοι ρυθμιστές » της μιτοχονδριακής βιογένεσης είναι μέλη της οικογένειας PGC (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator) συμμεταγραφικών ρυθμιστικών παραγόντων. Για παράδειγμα το PGC-1α είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί διαφορετικούς παράγοντες μεταγραφής που αλληλεπιδρούν με το Tfam ( μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A) ο οποίος συμμετέχει στην αντιγραφή και μεταγραφή του mtDNA και στη μεταγραφή πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών συστατικών (Cole, 2016). Συμπερασματικά, προσδιορίζοντας τα επίπεδα αυτών των παραγόντων και πιθανόν κάποιων επιπλέον μπορεί να διερευνηθεί εάν όντως αυτή η αρχική υπόθεση επιβεβαιώνεται.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω της Real-time PCR έγινε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης οκτώ γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση η οποία αποτελεί την κύρια διαδικασία παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο. Τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων εμφανίζουν διακυμάνσεις σε σχέση με το σύμπλοκο στο οποίο ανήκουν, των λειτουργικό ρόλο που έχουν στο σύμπλοκο αλλά και μεταξύ των τεσσάρων αναπτυξιακών σταδίων που μελετήθηκαν. Σε όλα τα υπό μελέτη γονίδια παρατηρήθηκε ένα μοτίβο έκφρασης στο οποίο κατά το στάδιο έναρξης εξωγενούς τροφοληψίας υπάρχει συγκριτικά, υψηλή έκφραση πιθανότατα λόγω της πολύπλευρης προσαρμογής του ιχθυδίου στις νέες συνθήκες που αντιμετωπίζει, στο επόμενο στάδιο κατά το οποίο γίνεται η κύρτωση της νωτοχορδής, ολοκλήρωση πτερυγίου και ο σχηματισμός της ουράς αλλά και κατά το τρίτο στάδιο δηλαδή κατά το τέλος της νυμφικής εκτροφής παρατηρείται μια μείωση και στη συνέχεια βαθμιαία αύξηση των επιπέδων έκφρασης γεγονός που πιθανώς αντανακλά μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων ή πιο αποδοτική κάλυψη των ενεργειακών αναγκών λόγω προσαρμογής στις νέες συνθήκες. Τέλος, κατά το μέσο της μεταμόρφωσης επειδή είναι ένα κρίσιμο αναπτυξιακό στάδιο σε συνδυασμό με την αύξηση του μεγέθους του ιχθυδίου αναμένεται αυξημένη ενεργειακή απαίτηση η οποία αντανακλάται στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης. Να σημειωθεί ότι δεδομένα για τα υπόλοιπα γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ο προσδιορισμός του αριθμού μιτοχονδρίων και των αντιγράφων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος θα μας επιτρέψει να συνάγουμε ασφαλέστερα συμπεράσματα.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://www.fishbase.de/>
2. Amores A., Suzuki T., Yan Y.L., Pomeroy J., Singer A., et al., (2004), Developmental Roles of Pufferfish Hox Clusters and Genome Evolution in Ray-Fin Fish. *Genome Research*, 14:1–10. doi: 10.1101/gr.1717804.
3. Aparicio S., Chapman J., Stupka E., Putnam N., Chia J.M., Dehal P., et al., (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*. 23;297(5585):1301-10. doi: 10.1126/science.1072104.
4. Aral F., Şahmöz E., Doğu Z., (2011), Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish. *ResearchGate*. DOI: 10.5772/17687.
5. Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel R.H., (2005), Basic principles of real-time quantitative PCR. *Journal Expert Review of Molecular Diagnostics*. 5:2. DOI: 10.1586/14737159.5.2.209.
6. Bagni M., (2005), Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchus labrax*, FAO Fisheries Division.
7. Berg J.M, (2012), ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
8. Bermejo-Nogales A., Calduch-Giner J.A., Pérez-Sánchez J., (2015) Unraveling the Molecular Signatures of Oxidative Phosphorylation to Cope with the Nutritionally Changing Metabolic Capabilities of Liver and Muscle Tissues in Farmed Fish. *PLoS ONE* 10(4): e0122889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122889>.
9. Brandt U., (2006), Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Review of Biochemistry*. 75:69–92. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142539.
10. Cole L.W., (2016), The Evolution of Per-cell Organelle Number, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 4:85. DOI=10.3389/fcell.2016.00085.
11. Cooper G.M., Hausman R.E., (2013), Το κύτταρο: μια μοριακή προσέγγιση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
12. Deplano, M., Diaz J.P., Connes R., et al., (1991), Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Biol.* 108, 361–371. <https://doi.org/10.1007/BF01313645>.
13. Edger P.P., Pires J.C., (2009), Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Res* 17, 699. doi: 10.1007/s10577-009-9055-9.
14. Fernández J. P., (2013), Characterization of Y and dopamine receptors in lampreys by using in situ hybridization: an evolutionary approach., *Universida de Vigo*.
15. Formosa L.E., Dibley M.G., Stroud D.A., Ryan M.T., (2018), Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Semin Cell Dev Biol*. 76:154-162. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.011.

16. Glasauer S.M., Neuhauss S.C., (2014), Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics*. 289(6):1045-60. doi: 10.1007/s00438-014-0889-2.
17. Heming T.A., 1988, YOLK ABSORPTION IN EMBRYONIC AND LARVAL FISHES. *The physiology of developing fish-eggs and larvae*, Copyright, 407-446.
18. Kasahara M., (2007), The 2R hypothesis: an update, *Current Opinion in Immunology*. Volume 19, Issue 5, Pages 547-552, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.009>.
19. Kendall A.W., Ahlstroman E.H., Moser D.H.G., (1984), Early Life History Stages of Fishes and Their Characters, In: Cohen: *Ontogeny, Systematics Phylogeny*.
20. Korf I., Yandell M., Bedell J., (2003), BLAST. O'Reilly Media, Inc.
21. Lazarou M., Thorburn D.R., Ryan M.T., McKenzie M., (2009), Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta*.1793(1):78-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.04.015.
22. Le Ruyer J.P., Alexandre J.C., Thebaud L., Mugnier C., (1993), Marine Fish Larvae Feeding: Formulated Diets or Live Prey? *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY*. 24: 211-224. doi:10.1111/j.1749-7345.1993.tb00010.x.
23. Letts J.A., Sazanov L.A., (2017), Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol*. 5;24(10):800-808. doi: 10.1038/nsmb.3460.
24. Levin L., Blumberg A., Barshad G., Mishmar D., (2014), Mito-nuclear co-evolution: the positive and negative sides of functional ancient mutations. *Frontiers in Genetics*. DOI:10.3389/fgene.2014.00448.
25. Lobo-Jarne T., Ugalde C., (2018), Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 76:179-190. doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.021.
26. Meyer A., Van de Peer Y., (2005), From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 27: 937-945. doi:10.1002/bies.20293.
27. Mishra P., Chan D., (2014), Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>.
28. Papa S., Martino P.L., Capitanio G., Gaballo A., Rasmø D., Signorile A., Petruzzella V., (2012), The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. In: Scatena R., Bottoni P., Giardina B. (eds) *Advances in Mitochondrial Medicine*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 942. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1).
29. Pasquier J., Braasch I., Batzel P., et al., (2017), Evolution of gene expression after whole-genome duplication: New insights from the spotted gar genome. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 328(7):709-721. doi:10.1002/jez.b.22770.



30. Pollak J.K., Sutton R., (1980), The differentiation of animal mitochondria during development. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(80\)80073-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(80)80073-9).
31. Raymond S. Ochs, (2016), BIOXHMEIA. Επιστημονικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ.
32. Scannell D.R., Byrne K.P., Gordon J.L., Wong S., Wolfe K.H., (2006), Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts. *Nature*. 16;440(7082):341-5. doi: 10.1038/nature04562.
33. Schon E.A., Dencher A., (2009), Heavy Breathing: Energy Conversion by Mitochondrial Respiratory Supercomplexes, *Cell Metabolism*. Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.cmet.2008.12.011.
34. Sherwood L., (2016), Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου: από τα κύτταρα στα συστήματα. Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
35. Signes A., Fernandez-Vizarra E., (2018), Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays Biochem*. 62(3):255-270. Published 2018 Jul 20. doi:10.1042/EBC20170098.
36. Smits P., Smeitink J., Heuvel L., (2010), Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *BioMed Research International*. doi: <https://doi.org/10.1155/2010/737385>.
37. Sogl B., Gellissen G., Wiesner R.J., (2000), Biogenesis of giant mitochondria during insect flight muscle development in the locust, *Locusta migratoria* (L.). *FEBS*, 267, 11-17. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00936>.
38. Stroud D.A., Surgenor E.E., Formosa L.E., Reljic B., Frazier A.E., Dibley M.G., et al., (2016), Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*. 6;538(7623):123-126. doi: 10.1038/nature19754.
39. Tine M., Kuhl H., Gagnaire P., et al., (2014), European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nat Commun* 5, 5770. <https://doi.org/10.1038/ncomms6770>.
40. Tsalafouta A., Papandroulakis N., Gorissen M., Katharios P., Flik G., Pavlidis M., (2014), Ontogenesis of the HPI axis and molecular regulation of the cortisol stress response during early development in *Dicentrarchus labrax*. *Sci Rep*. 4:5525. Published. doi:10.1038/srep05525.
41. Tucker E.J., Wanschers B.F.J., Szklarczyk R., Mountford H.S., Wijeyeratne X.W., van den Brand M.A.M., et al. (2013) Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLoS Genet* 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004034>.
42. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2006), Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40:15.
43. Victor China V., Holzman R., 2014, Hydrodynamic starvation in first-feeding larval fishes. *PNAS*, 111:22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323205111>.

44. Wei T., Simko V., (2017), R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84).
45. Wickham H., (2016), ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4.
46. Zanuy S., Carrillo M., Felip A., et al., (2001), Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Elsevier, Aquaculture, 202(3-4): 187-203. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00771-2.
47. Zhang F., Broughton R.E., (2013), Mitochondrial-nuclear interactions: compensatory evolution or variable functional constraint among vertebrate oxidative phosphorylation genes?. *Genome Biol Evol.* 5(10):1781-1791. doi:10.1093/gbe/evt129.
48. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide, (2007), Stratagene USA. Copyright.
49. Beacon Designer 5.10 Manual, (2006), Copyright. PREMIER Biosoft International.
50. R Core Team, (2013), R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.