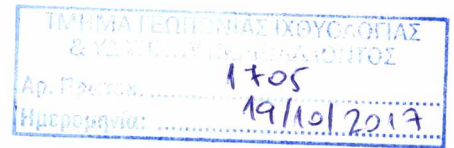


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Απομόνωση και ταυτοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων (homeobox)
Hox A13a και *Hox A13b* στο είδος *Solea solea*”**

“Isolation & characterization of two *Hox* genes (A13a & A13b) in *Solea solea*”

Ελέανα Καραχάλιου

Βόλος 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 17699/1
Ημερ. Εισ.: 15/06/2018
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ-ΙΥΠ
2015
ΚΑΡ

**«Απομόνωση και ταυτοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων (homeobox) *Hox A13a* και *Hox A13b*
στο είδος *Solea solea*»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Αν. Καθ., Επιβλέπων**
- 2. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αν. Καθ. ΠΘ, μέλος**
- 3. Έλενα Γκολομάζου, Λέκτορας ΠΘ, μέλος**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μέσω PCR απομόνωση και ταυτοποίηση των ομοιωτικών γονιδίων (*Hox genes*) *Hox A13a* και *Hox A13b* στην κοινή γλώσσα *Solea solea*, είδος ιχθύος με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το μέλλον της υδατοκαλλιέργειας λόγω της σημαντικής του εμπορικής αξίας. Επειδή δεν ήταν εφικτή η αποστολή του *Hox A13b* για αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε το *Hox A1a*. Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων της αλληλούχισης οδήγησαν στα εξής κύρια συμπεράσματα:

- Με την χρήση *PCA* αποδείχθηκε ότι στα έμβρυα-απόγονοι διαφορετικής προέλευσης γεννητόρων υπάρχουν διαφορές στα πρότυπα έκφρασης γονιδίων *Hox*.
- Μεταξύ των χρόνων δειγματοληψίας 0 και 6 hpf, 24 και 96 hpf, 48 και 72 hpf παρατηρήθηκαν παρόμοιες μορφές έκφρασης γονιδίου *Hox*. Στην περίοδο έκφρασης των 24-96 hpf καταγράφηκαν ακραίες συσχετίσεις μεταξύ των ζευγών *Hox A1a*, αλλά όχι μεταξύ των ζευγών *Hox A13a*.
- Η κατά ζεύγη σύγκριση μεταξύ παρτίδων αυγών υποδεικνύει έντονη μεταβολή στην γονιδιακή έκφραση σε παρτίδες ωοτοκίας γεννητόρων P. Υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή ($p < 0,005$) στην γονιδιακή έκφραση *Hox A13a*, ενώ στις παρτίδες αυγών προερχόμενων από γεννήτορες G1 παρατηρήθηκαν λιγότερες μεταβολές στην έκφραση για *Hox A1a* και *Hox A13a*.
- *Hox A1a* και *Hox A13a* μοιράστηκαν σχεδόν ίσες ποσότητες συνώνυμων και μη συνώνυμων αντικαταστάσεων, ακόμη και στην πιο συντηρημένη περιοχή *homeobox*.
- Παρουσιάζεται σερίνη (S) στο κωδικόνιο 131 (132 στην αλληλουχία συναίνεσης) μόνο για τη βιώσιμη ομάδα αυγών. Στα μη βιώσιμα παρουσιάζονται η προλίνη (P) και η ιστιδίνη (H) σε σχεδόν ίσες συχνότητες.

Abstract

The through PCR isolation and characterization of the *Hox genes* *Hox A13a* and *Hox A13b* for the common sole *Solea solea*, a promising species for the future of aquaculture due to its market value. Due to the inability of sending *Hox A13b* for sequencing *Hox A1a* was used. The resulting sequencing data gave the following:

- Through the use of *PCA*, it was proven that the embryo-progeny of different origin spawners show differentiation in *Hox* gene expression patterns.
- Between the sampling times 0 and 6 hpf, 24 and 96 hpf, 48 and 72 hpf similar *Hox* gene expression forms were observed. During the expression period of 24-96 hpf extreme correlations were observed between the *Hox A1a* pairs, but not between the *Hox A13a* pairs.
- The paired comparison μεταξύ egg batches shows intense alterations in P spawning batches gene expression. A statistically important alteration ($p < 0,005$) exists in the *Hox A13a* gene expression, meanwhile in egg batches originating from G1 spawners less *Hox A1a* and *Hox A13a* expression alteration was observed.
- *Hox A1a* and *Hox A13a* shared the same amount of synonymous and non-synonymous replacements, even in the most conserved *homeobox* area.
- Serine (S) exists in the codon 131 (132 in the consensus sequence) of the viable egg group. For the non viable egg group proline (P) and histidine (H) exist in near equal frequencies.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. <i>Solea solea</i> - Η κοινή γλώσσα.....	1
1.2. <i>Hox</i> genes.....	1
1.2.1. Η προγονική συστάδα <i>Hox</i> και η εξέλιξή της.....	2
1.2.2. Πολυσυγγραμικότητα.....	2
1.2.3. Πρόσθια-πίσθια διαμόρφωση.....	3
1.2.4. Η έκφραση των γονιδίων <i>Hox</i> σε χρονικό και χωρικό επίπεδο.....	3
1.2.5. Τμηματική ταυτότητα.....	4
1.2.6. Η σημασία της μελέτης των γονιδίων <i>Hox</i> και ο στόχος της εργασίας.....	5

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συνθήκες δειγματοληψίας.....	6
2.2. Εξαγωγή DNA.....	6
2.3. PCR.....	6
2.4. Gel purification.....	8
2.5. Κλωνοποίηση.....	9
2.6. Colony PCR.....	9
2.7. Απομόνωση Πλασμιδίου (Plasmid Extraction).....	10
2.8. Αλληλούχιση.....	11

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. <i>Hox A1a</i>	11
3.1.1. <i>Hox A1a</i> αλληλουχία mRNA.....	12
3.1.2. Γονίδιο <i>Hox A1a</i> συνολική αλληλουχία.....	13
3.2. <i>Hox A13a</i>	13
3.2.1. <i>Hox A13a</i> αλληλουχία mRNA.....	13
3.3. Γενικές παρατηρήσεις σχετικά με την έκφραση <i>Hox A1a</i> και <i>Hox A13a</i>	14

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	16
----------------------	----

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Solea solea* - Η κοινή γλώσσα

Κύριο γνώρισμα της κοινής γλώσσας *Solea solea* αποτελεί το αρκετά πεπλατυσμένο οβάλ σώμα της και η χαρακτηριστική θέση των οφθαλμών, οι οποίοι βρίσκονται σε μια πλευρά του κεφαλιού. Η κεφαλή είναι μικρή και στρογγυλεμένη με την στοματική κοιλότητα να βρίσκεται στην τυφλή πλευρά. Διαθέτει μικρά και λεία λέπια και το τυφλό τμήμα της κεφαλής καλύπτεται από δέρμα τριχοειδούς υφής. Η πλευρική γραμμή σχηματίζει τοξοειδή καμπύλη ξεκινώντας οπίσθια της κεφαλής με αριθμό λεπιών να κυμαίνεται μεταξύ 116-163. Στο πλευρικό πτερύγιο της με τους οφθαλμούς πλευράς του σώματος παρατηρείται μαύρη κηλίδα στο άκρο, ενώ το πλευρικό πτερύγιο της τυφλής πλευράς είναι μικρό σε μέγεθος. Ο χρωματισμός του ιχθύος είναι καφέ με σκούρες κηλίδες και λευκά στίγματα στο άνω μέρος του σώματος ενώ η τυφλή πλευρά φέρει λευκό χρώμα. Αποτελεί βενθικό είδος, προτιμώντας αμμάδεις και λασπώδεις πυθμένες. Επιβιώνει σε βάθος μέχρι 150m, σε θερμοκρασίες 8-24°C. Κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Ιανουάριος-Απρίλιος) μπορεί να βρεθεί πελαγικά λόγω μετανάστευσης. Πρόκειται για σαρκοφάγο είδος που τρέφεται κυρίως με καρκινοειδή, μαλάκια, οστρακοειδή και πολύχαιτους. Η εξάπλωση της κοινής γλώσσας εκτείνεται στη Μεσόγειο Θάλασσα, τη Θάλασσα Μαρμαρά, την νοτιοδυτική Μαύρη Θάλασσα, καθώς και στην Βαλτική, τον Ανατολικό Ατλαντικό Ωκεανό, στο Πράσινο Ακρωτήριο και νότια της Σενεγάλης. Θεωρείται σημαντικό είδος ιχθύος για το μέλλον της υδατοκαλλιέργειας καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερη εμπορική αξία.

1.2. *Hox genes*

Τα ομοιωτικά γονίδια *Hox* (*Hox genes*), αξιοσημείωτη κατηγορία της οικογένειας ομοιωτικών γονιδίων (*homeobox*), ελέγχουν τις μορφολογίες του κύριου άξονα του σώματος σε σχεδόν όλα τα μετάζωα. Έρευνες έχουν αποδείξει την παρουσία τους στα είδη της συνομοταξίας *Cnidaria* και σε όλα τα αμφίπλευρα ζώα, ενώ στα φυτά, τα πρωτόζωα και τους σπόγγους την απουσία τους. Μεγάλη ποικιλομορφία έχει παρατηρηθεί στους αριθμούς, την οργάνωση και τα μοτίβα έκφρασης των *Hox* γονιδίων. Αριθμούν μεταξύ 4-48 ανά γονιδίωμα ανάλογα με το ποιο είναι το προς εξέταση ζώο. Κύριο χαρακτηριστικό τους αποτελεί η παρουσία ενός μοτίβου αλληλουχίας DNA 183 bp (*homeobox*) το οποίο κωδικοποιεί μια περιοχική δέσμευση DNA 60 αμινοξέων, το ομοπεδίο (*homeodomain*). Καθορίζονται από την οργάνωσή τους σε γονιδιωματικές συστάδες που εκφράζονται δια μήκους του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα του κάθε οργανισμού. Θεωρούνται αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω της έντονης επίδρασής τους στο εμβρυικό στάδιο των οργανισμών. Στα σπονδυλωτά, η έναρξη της έκφρασης των *Hox* γονιδίων πραγματοποιείται στα κύτταρα της οπίσθιας πρωτόγονης ράβδωσης που συμβάλλει στο εξωεμβρυονικό μεσόδερμα και στη συνέχεια επεκτείνεται πρόσθια στα υποψήφια κύτταρα του *embryo proper* (Deschamps et al., 1999). Εκφράζονται σε ποικίλα είδη κυττάρων και διαθέτουν δυναμικές χωρικές και χρονικές περιοχές που μπορεί να είναι πολύ διαφορετικές μεταξύ τους ακόμα και σε έναν μόνο ιστό ή δομή, ανάλογα πάντα με το στάδιο της ανάλυσης. Υπάρχει επίσης σημαντική αλληλοεπικάλυψη στους τομείς έκφρασης μεταξύ των μελών μιας παράλογης ομάδας, γεγονός που υποδηλώνει τη δυνατότητα λειτουργικού πλεονασμού. Σε περιπτώσεις ενεργοποίησης των *Hox* γονιδίων σε μη επιτρεπτές θέσεις στον άξονα προκαλούνται αντιγραφές στην οπίσθια αξονική δομή του σώματος (*homeotic transformations*), που μπορούν να αποβούν μοιραίες στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης.

1.2.1. Η προγονική συστάδα *Hox* και η εξέλιξή της

Οι γενομικές, δομικές και οργανωτικές ομοιότητες μεταξύ των συστάδων *Hox* των σπονδυλωτών αποδεικνύουν ότι οι συστάδες *Hox/HOM-C* προέκυψαν από την επικάλυψη και απόκλιση μιας κοινής προγονικής συστάδας που θεωρητικά διατηρείται σε ευρύτερο φάσμα ζωικών ειδών. Με βάση τις πολλαπλές περιοχές σχέσεων αλληλουχίας μεταξύ των τεσσάρων συστάδων *Hox* και *HOM-C* προκύπτουν οι ευθυγραμμίσεις, συγκεκριμένα λόγω των πολλαπλών περιοχών ταυτόσημης αλληλουχίας, δομής και των σχετικών θέσεων των γονιδίων μέσα στα αντίστοιχα συμπλέγματα. Υπάρχουν 13 διαφορετικά σύνολα γονιδίων με κοινές ιδιότητες, που ονομάζονται παράλογες ομάδες. Όμως αφού καμία από τις συστάδες δεν διαθέτει μέλη και στις 13 υπάρχουσες παράλογες ομάδες, συμπεραίνεται ότι έχουν χαθεί ορισμένα γονίδια. Κάθε συστάδα έχει διατηρήσει διαφορετικά υποσύνολα παράλογων γονιδίων, και μέσω ανάλυσης σε διάφορα είδη προκύπτει ότι για μια δεδομένη συστάδα έχουν διατηρηθεί τα ίδια παραλογικά υποσύνολα σε όλα τα σπονδυλωτά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ισχυρή επιλεκτική πίεση που προκλήθηκε νωρίς στην διαδικασία απόκτησης χαρακτηριστικών στα σπονδυλωτά, ώστε να διατηρηθούν οι συνδυασμοί διπλών και αποκλινόντων συστάδων *Hox* που παρατηρούνται στα υψηλότερα σπονδυλωτά. Διαδεδομένη είναι η επιστημονική θεωρία που προτάσσει ότι η προγονική συστάδα *Hox* γονιδίου προέκυψε από πολλαπλούς διαδοχικούς διπλασιασμούς, και οι επακόλουθοι διαδοχικοί διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος ανέδειξαν τις πολλαπλές συστάδες που παρατηρούνται στα υψηλότερα σπονδυλωτά (Holland and Garcia-Fernandez, 1996; Holland, 1997; Wittbrot et al., 1998; Meyer and Malaga-Trillo, 1999; Meyer and Schartl, 1999).

Άξια αναφοράς είναι η περίπτωση των τελεόστεων ιχθύων, από τους οποίους έχουν προκύψει πληροφορίες που υποδεικνύουν την μη μεταβλητότητα της δομής των συστάδων *Hox* γονιδίων, από τον τελευταίο κοινό πρόγονο των σπονδυλωτών με σιαγόνες. Παρά την λιγότερη πολυπλοκότητα του πρόσθιου-οπίσθιου άξονά τους, οι τελεόστεοι ιχθύες διαθέτουν περισσότερες συστάδες *Hox* γονιδίων από τα θηλαστικά, παίρνοντας ως παράδειγμα τις 4 συστάδες στο ποντίκι *Mus musculus* συγκριτικά με τον ιχθύ *Danio rerio* που διαθέτει 7 συστάδες. Η ανάλυση των συστάδων *Hox* του *M. musculus* και του ανθρώπου αποτελεί την λεπτομερέστερη που έχει πραγματοποιηθεί στα σπονδυλωτά, και δείχνει ότι υπάρχουν 38 γονίδια που οργανώνονται σε τέσσερα διαφορετικά χρωμοσωμικά συμπλέγματα μήκους περίπου 120 kb και ότι τα γονίδια σε κάθε σύμπλεγμα είναι όλα προσανατολισμένα στην ίδια κατεύθυνση της μεταγραφής 5' προς 3'. Παρόμοιες μελέτες σε άλλα σπονδυλωτά δείχνουν την ίδια οργάνωση *Hox* γονιδίων. Η θέση κάθε γονιδίου κατά μήκος της συστάδας εξαρτάται από τρεις χαρακτηριστικές ιδιότητες:

- την έκταση της έκφρασης κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα (χωρική ή δομική συγγραμμικότητα)
- τον χρόνο της αρχικής ενεργοποίησής τους (χρονική συγγραμμικότητα)
- την κυρίαρχη ιεραρχική επίδραση των οπίσθιων γονιδίων έναντι των πρόσθιων γονιδίων, όταν αυτά εκφράζονται μαζί (ποσοτική συγγραμμικότητα).

Άρα τα 3' γονίδια όπως τα PG1 και PG2 εκφράζονται νωρίτερα στις περισσότερες πρόσθιες περιοχές έναντι των 5', όπως τα PG13 που εκφράζονται αργότερα στην ανάπτυξη και στις περισσότερες οπίσθιες περιοχές του εμβρύου (Lewis, 1978; Krumlauf, 1994; Mallo and Alonso, 2013; Casaca et al., 2014; Soshnikova, 2014; Gaunt, 2015).

1.2.2. Πολυσυγγραμμικότητα

Σημαντικό χαρακτηριστικό των γονιδίων *Hox* είναι το φαινόμενο της πολυσυγγραμμικότητας. Ορίζεται ως το πως η σειρά ενεργοποίησης του κάθε γονιδίου ταιριάζει με τη γραμμική τους σειρά κατά μήκος του χρωμοσωμικού συμπλέγματος. Όλα αυτά μεταγράφονται με προσανατολισμό 5' προς 3', με τα 3' περισσότερα γονίδια να εκφράζονται νωρίτερα και στα πιο πρόσθια όρια της έκφρασης (Pendleton et al. 1993; Akam 1998 McClintock et al. 2001; Prince 2002; Jozefowicz et al. 2003; McClintock et al. 2003; Wang et al. 2009).. Συνεπώς, τα εμπρόσθια όρια διαδοχικά εκφρασμένων γονιδίων ρυθμίζονται περισσότερο οπίσθια από εκείνα των προηγούμενων

εκφρασμένων γονιδίων, δημιουργώντας μια ένθετη και επικαλυπτόμενη σειρά σχημάτων έκφρασης. Η πολυσυγγραμικότητα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή συστάδων πρωτεϊνών *Hox* σε διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του άξονα A-P του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Περαιτέρω ανάλυση των σχημάτων έκφρασης των γονιδίων *Hox* σε κυτταρικές σειρές και στα έμβρυα σπονδυλωτών αποδεικνύει την ύπαρξη διαφόρων τύπων έκφρασης κατά μήκος της ευθείας. Εκδηλώνεται χωρική πολυσυγγραμικότητα της διατεταγμένης σειράς περιοχών περιορισμένων εντός του παρακεντρικού μεσοδερμικού, του νευρικού σωλήνα, της νευρικής κορυφής, των άκρων, των τμημάτων του οπίσθιου εγκεφάλου, του επιφανειακού εξωδερμίου, των διακλαδικών τόξων, του εντέρου και του γοναδικού ιστού. Η πλειοψηφία των ζωνών πρόσθιας ανάπτυξης δημιουργούν αξονικές δομές όπως τη νωτοχορδή και τον νευρωνικό σωλήνα, ενώ από τις οπίσθιες ζώνες ανάπτυξης προκύπτουν προοδευτικά περισσότερες πλευρικές εμβρυϊκές δομές (Sweetman et al., 2008). Τονίζεται η χρονική πολυσυγγραμικότητα, σχέση χρόνου εμφάνισης της έκφρασης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Υπάρχει πολυσυγγραμική ευαισθησία στο επίπεδο και το χρόνο απόκρισης γονιδίων *Hox* σε RA στις κυτταρικές σειρές και στα έμβρυα όπου επάγει την έκφραση γονιδίου *Hox* το ρητινοϊκό οξύ (RA).

1.2.3. Πρόσθια-οπίσθια διαμόρφωση

Τα γονίδια *Hox* αποτελούν τον παράγοντα από τον οποίο εξαρτάται η πρόσθια-οπίσθια διαμόρφωση σε έμβρυα σπονδυλωτών, όπου οι επικαλυπτόμενες περιοχές έκφρασής τους οριοθετούν τις περιοχές ταυτότητας θέσης. Η έκφραση *Hox* γονιδίων ρυθμίζεται κατά πολύπλοκο και αλληλεξαρτώμενο τρόπο. Στην κορυφή της ιεραρχίας βρίσκεται μια ουσιαστική απόκριση συγκεκριμένων γονιδίων *Hox* στο ρητινοϊκό οξύ. Αν και είναι δύσκολο να αποδειχθεί μια κλίση της RA κατά μήκος του άξονα AP, οι φαινότυποι των εμβρύων στους οποίους η σύνθεση RA ή η απόκριση παρεμποδίζονται, είτε γενετικά είτε φαρμακολογικά, υποδηλώνουν έντονα μια απαίτηση για RA σε σχηματισμό AP σπονδυλωτών (van der Wees et al., 1998; Gale et al., 1999; Niederreither et al., 2000; White et al., 2000).

1.2.4. Η έκφραση των γονιδίων *Hox* σε χρονικό και χωρικό επίπεδο

Λόγω του ότι η χρονική και χωρική έκφραση των γονιδίων *Hox* πρέπει να είναι ακριβής, η ρύθμισή της είναι πολύπλοκη, ωστόσο μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια:

- έναρξη
- ίδρυση
- συντήρηση

Τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης και οι διαφορές στην κατανομή του χρόνου είναι σημαντικά για τις λειτουργίες των γονιδίων *Hox*, καθώς εξαρτώνται από οργάνωση συσταδικής μορφής. Η διατήρηση της οργάνωσης μιας συστάδας στα σπονδυλωτά είναι στενά συνδεδεμένη με τον μηχανισμό, απαραίτητο για τη ρύθμιση των περιορισμένων προτύπων έκφρασης γονιδίου, κρίσιμου για τη λειτουργία του *Hox* γονιδίου στην προσθοπίσθια σχηματοποίηση. Τα συμπλέγματα *Hox* θεωρείται ότι ρυθμίζουν διαφορετικές πτυχές της μορφογένεσης στον προσδιορισμό της περιφερειακής ταυτότητας. Άρα οφείλει να περιλαμβάνει τη ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, του πολλαπλασιασμού, του θανάτου, της μετανάστευσης και άλλων κοινών κυτταρικών διεργασιών, οι οποίες θα πρέπει να ρυθμίζονται από παρόμοιους τύπους γονιδίων. Θεωρείται ότι η ρύθμιση της παραγωγής πρωτεΐνης *Hox* σε χωρικό και χρονικό πλαίσιο θα μπορούσε να περιλαμβάνει πολλαπλές ρυθμιστικές διατάξεις ώστε να προκύψει η κατάλληλη κατανομή της δραστηριότητας των *Hox* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Ο ακριβής χρονικός έλεγχος της αρχικής ενεργοποίησης του γονιδίου *Hox* είναι απαραίτητος και για τις διεργασίες σχεδίασης στο παραξονικό μεσόδερμα. Η ενεργοποίηση του γονιδίου *Hox* σύμφωνα με τον χρόνο και η συσχέτιση με τον μεσοδερμικό σχεδιασμό, υποδηλώνει την σημασία της μηχανιστικής και μοριακής βάσης της χρονικής ενεργοποίησης του γονιδίου *Hox* για την μορφογένεση και την εξέλιξη του αξονικού σκελετού των σπονδυλωτών.

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ο χρονισμός της ενεργοποίησης του γονιδίου *Hox* συσχετίζεται με τις δομικές τροποποιήσεις της χρωματίνης της συστάδας σε μια κατεύθυνση 30 έως 50 (Chambeyron and Bickmore, 2004; Chambeyron et al., 2005; Morey et al., 2007; Soshnikova and Duboule, 2009; Noordermeer et al., 2011), οι οποίες έρχονται να στηρίξουν την θεωρία ότι μια συγκεκριμένη δομή χρωματίνης ευθύνεται για το κατασταλακτικό περιβάλλον στην συστάδα και ότι το προοδευτικό άνοιγμα της χρωματίνης θα οδηγούσε σε διαδοχική απελευθέρωση των γονιδίων *Hox* από την καταστολή, και τη μεταγραφική τους ενεργοποίηση (Kmita and Duboule, 2003).

Ο ρυθμός ενεργοποίησης του γονιδίου *Hox* είναι λειτουργικά σημαντικός επειδή οι πειραματικές συνθήκες που οδηγούν σε πρόωρη ή καθυστερημένη ενεργοποίηση του γονιδίου *Hox* έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν φαινοτυπικές αλλοιώσεις, ακόμη και σε περιπτώσεις που διατηρούνται τα τελικά μοτίβα έκφρασης (Zákány et al., 1997; Gérard et al., 1997; Kondo and Duboule, 1999; Juan and Ruddle, 2003). Αυτό συμβαδίζει με την ύπαρξη ξεχωριστών λειτουργικών δραστηριοτήτων που σχετίζονται με τις πρώιμες και τις όψιμες φάσεις της γονιδιακής έκφρασης *Hox* των σπονδυλωτών (Carapuzo et al., 2005). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι κατά την πρώιμη ανάπτυξη σπονδυλωτών η γενική κατεσταλασμένη κατάσταση του συμπλέγματος *Hox* κρατά τα μεταγενέστερα ρυθμιστικά στοιχεία σε αδράνεια και ότι μόνο με τη λήξη της καταστολής τα στοιχεία αυτά καθίστανται προσιτά στις μεταγραφικές ρυθμιστικές αρχές και καθιστούνται λειτουργικά (Tschopp και Duboule, 2011).

1.2.5. Τμηματική ταυτότητα

Η ανάγκη να βρεθεί πώς ενεργοποιούνται τα γονίδια *Hox* σε διαφορετικά τμήματα κατέληξε στην διατύπωση των εξής:

- Η διαρρύθμιση των γονιδίων *Hox* βρέθηκε να ελέγχεται από δύο κατηγορίες γονιδίων. Η μια τάξη, που απαιτείται μόνο προσωρινά για να ενεργοποιήσει την έκφραση των *Hox*, ενσωματώνεται από τα γονίδια που εμπλέκονται στην υποδιαίρεση του εμβρύου σε τμήματα (Nüsslein-Volhard et al., 1984; Ingham and Martínez-Arias, 1986; White and Lehmann, 1986; Harding and Levine, 1988; Irish et al., 1989; Jack and McGinnis, 1990; Casares and Sánchez-Herrero, 1995).
- Η άλλη τάξη, που απαιτείται για τη διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης των *Hox*, ενσωματώνεται από τα γονίδια των ομάδων *Polycomb* και *Trithorax* που είναι απαλλαγμένα από την πρώιμη ενεργοποίηση (Struhl and Akam, 1985; Wedeen et al., 1986; Breen and Harte, 1993).

Από τα παραπάνω προέκυψε η αναθεωρημένη θεωρία των Lawrence and Morata (1994) που ισχυρίζεται πως η πρώιμη ενεργοποίηση ενός γονιδίου *Hox* από τα γονίδια κατακερματισμού σε ένα μεταμερές παρέχει στα κύτταρα που το εκφράζουν μια "τμηματική ταυτότητα". Αυτή η ταυτότητα διατηρείται από τα ομαδικά γονίδια *Polycomb* και *Trithorax* διατηρώντας την πρώιμη κατάσταση της έκφρασης *Hox* κατά την ανάπτυξη. Επομένως, ένα κύτταρο έχει την ίδια ταυτότητα καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και ως εκ τούτου δημιουργεί τις συγκεκριμένες δομές αυτού του τμήματος. Καθώς κάθε τμήμα εκφράζει διαφορετικούς συνδυασμούς γονιδίων *Hox*, το καθένα έχει διαφορετικό κώδικα ο οποίος έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσθια οπίσθια διαφοροποίηση των τμημάτων του οργανισμού. Υπάρχουν όμως έρευνες που ισχυρίζονται πως η τμηματική ταυτότητα είναι μια υποκειμενική έννοια που προέρχεται από την παρατήρηση ότι σε ένα συγκεκριμένο είδος ένα πλήθος κυτταρικών χαρακτηριστικών είναι πάντα συνδεδεμένα με ένα δεδομένο τμήμα. Τα γονίδια *Hox* δεν ελέγχουν την ταυτότητα τμήματος, αλλά την κυτταρική συμπεριφορά που θα οδηγήσει σε ορισμένη μορφολογία τμήματος, για παράδειγμα τα γονίδια *Hox* σε οργανισμούς όπως ο *C. elegans* (Salser and Kenyon, 1996) και πιθανώς έκαναν το ίδιο στον κοινό πρόγονο όλων των μεταζώων.

1.2.6. Η σημασία της μελέτης των γονιδίων *Hox* και ο στόχος της εργασίας

Τα γονίδια *Hox* θεωρούνται θεμελιώδη για την σύγχρονη βιολογία:

- Λόγω της εμπλοκής τους στην κατανομή της τμηματικής ταυτότητας κατά μήκος των αξόνων του σώματος των σπονδυλωτών συμβάλουν στην διερεύνηση του πώς οι μεταγραφικοί παράγοντες οργανώνουν δίκτυα υποδεέστερων γονιδίων ώστε να καθοδηγείται η συμπεριφορά των κυτταρικών πληθυσμών κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης.
- Η μέσω αναπτυξιακών γενετικών αναλύσεων κατανόηση της ανάπτυξης δομικών συστημάτων των οργανισμών. Η σύνθετη γονιδιωματική τους οργάνωση και μοριακή ρύθμιση δίνει την δυνατότητα εξέτασης των μοριακών μηχανισμών που μέσω των οποίων προκύπτουν οι φυσιολογικές και μορφολογικές διεργασίες κατά την ανάπτυξη.
- Η εξελικτική τους διατήρηση σε απομακρυσμένες ζωικές φυλές, αντιπροσωπεύει ένα σύστημα βασικών πληροφοριών ικανών να λειτουργούν σε ένα ευρύ φάσμα ασπόνδυλων και σπονδυλωτών, θέτοντας την πιθανότητα εμπλοκής των αναπτυξιακών γονιδίων σε ποικίλα αναπτυξιακά προγράμματα.
- Η εφαρμογή τους στη έρευνα του εγκεφάλου, ο οποίος μέχρι πρότινος θεωρούνταν ένα εξελικτικά περιορισμένο σύστημα λόγω της αλληλεπικαλυπτόμενης και ολοκληρωμένης οργάνωσης των νευρώνων σε κυκλώματα.
- Η οργάνωσή των “μικροεπεξεργαστών”, με στόχο την κατανόηση της μορφολογικής εξέλιξης ώστε να οριστεί η λειτουργία των γονιδίων *Hox*. Τα μοντέλα για τη λειτουργία του γονιδίου *Hox* θεωρείται ότι εκτείνεται πέρα από την δυαδική ιεραρχική άποψη της δράσης των γονιδίων στην ανάπτυξη. Το νέο μοντέλο που παρατίθεται αναγνωρίζει την πολυπλοκότητα των ρυθμιστικών πληροφοριών που μπορούν να ενσωματωθούν από τους μεμονωμένους υποκινητές, τους “μικροεπεξεργαστές”.
- Ευρέως διαδεδομένο είναι το γεγονός ότι τα γονίδια *Hox* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών στο εμβρυϊκό στάδιο διαφοροποιώντας τη μορφολογία τους κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα (Deschamps et al., 1999; Lemons and McGinnis, 2006; Casaca et al., 2014). Ο εντοπισμός και η ανάλυση των μεταλλάξεων που παρατηρούνται λόγω ενεργοποίησης του σε μη επιτρεπτές θέσεις στον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα αποτελεί βασικό στόχο για μελλοντικές έρευνες. Μέσω της κατανόησης των προτύπων έκφρασης αυτών μπορούν να διαμορφωθούν ιδέες για τη βελτίωση της ποιότητας αυγών και παραγωγής νυμφών και νεαρών ιχθύων στις υδατοεκτροφές.

Στόχος της εργασίας είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση των ομοιοτικών γονιδίων *Hox A13a* και *Hox A13b* και η διατύπωση των παρατηρήσεων που προκύπτουν. Λόγω του ότι δεν ήταν εφικτή η αποστολή του *Hox A13b* για αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ανάλυση το *Hox A1a*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συνθήκες δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε αυγά γεννητόρων *Solea solea* ελεγχόμενης καλλιέργειας, περίπου 40 ατόμων αναλογίας αρσενικά προς θηλυκά 2:1, τα οποία ήδη είχαν περάσει μακροχρόνια περίοδο εγκλιματισμού. Η αναπαραγωγή πραγματοποιήθηκε σχεδόν καθημερινά από τον Ιούνιο μέχρι τέλη Αυγούστου του 2014. Τα δείγματα προήλθαν από τις εγκαταστάσεις του IMARES, στο IJmuiden Ολλανδία, υπό φυσιολογικές συνθήκες περιόδου ωοτοκίας (T, S, φωτοπερίοδος).

Η συλλογή αυγών πραγματοποιούνταν καθημερινά, όπου ζυγίζονταν και διαχωριζόταν βάσει της πλευστότητας τους καθώς τα επιπλέοντα αυγά είναι βιώσιμα. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις κωνικές δεξαμενές των περίπου 80 λίτρων, εφοδιασμένες με σύστημα ανακυκλοφορίας και αραίωσης για τα επιπλέοντα αυγά και θερμοκρασία επώασης 10°C. Όλες οι παρτίδες αυγών εκκολάφθηκαν στις 120 hpf (hours post fertilization).

Στις 0, 24 και 48 hpf απομακρύνθηκαν τα μη επιπλέοντα αυγά από τον επωαστήρα όπου και πραγματοποιήθηκε ζύγιση. Τα επιπλέοντα και μη αυγά τριών παρτίδων συλλέχθηκαν στις 0, 24 και 48 hpf εις τριπλούν, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες eppendorf που περιείχαν RNAlater. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -24°C μέχρι την εξαγωγή του γονιδιωματικού DNA. Μετά τις 48 hpf, δεν υπήρχαν μη επιπλέοντα αυγά και όσα συλλέχθηκαν σε αυτό το χρονικό σημείο αξιοποιήθηκαν στην ανάλυση HRM.

2.2. Εξαγωγή DNA

Για ένα μέρος του DNA η εξαγωγή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το τυποποιημένο kingfisher Flex protocol, και για το υπόλοιπο χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφορμίου.

Πρωτόκολλο φαινόλης- χλωροφορμίου:

- Μέγεθος δείγματος περίπου 20mg αυγά
- 500μL TNE buffer (διάλυμα)
- 100μL TRIS-HCl buffer (διάλυμα)
- 50μL SDS 20% solution (διάλυμα)
- 20μL Πρωτεΐνωση K (συγκέντρωση 10mg/ml)

Υδατόλουτρο στους 55°C για 2 ώρες. Προστίθεται 600μL φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική σε αναλογία 25/24/1. Ανακίνηση για 15 λεπτά και φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 4°C σε 13.000 rpm. Στο υπερκείμενο προστίθενται 600μL χλωροφόρμιο/ισοαμυλική σε αναλογία 24/1. Ανακίνηση για 15 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 4°C σε 13.000 rpm. Στο υπερκείμενο προστίθενται 1ml καθαρή αιθανόλη και 15μL διάλυμα οξικού νατρίου (sodium acetate) συγκέντρωσης 3M. Τοποθετούνται για μισή ώρα (30 λεπτά) στους -20°C. Φυγοκέντριση για 10 λεπτά στους 4°C στις 13.000 rpm. Στο pellet που προκύπτει προστίθενται 200μL 70% κρύα αιθανόλη. Φυγοκέντριση για 5 λεπτά στους 4°C σε 13.000 rpm. Το παραγόμενο pellet στεγνώνεται στην αντλία κενού. Τέλος γίνεται έκλουση με 100μL διαλύματος TE.

2.3. PCR

Οι εκφυλισμένοι primers σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας πληροφορίες γονιδίων προερχόμενα από: *Oryzias latipes*, *Heterodontus francisci*, *Takifugus rubripes*, *Carassius auratus*, *Megalobrama amblycephala*, *Haplochromis burtoni*, *Salmo salar*, *Ictalurus punctatus*, *Callorhinchus milii*.

Η διαδικασία της PCR ξεκινάει παίρνοντας 4 φιαλίδια PCR (Sample, Positive, Negative, Master Mix). Τοποθετούνται στο UV για αποστείρωση για 5 λεπτά μαζί με το H₂O και MgCl₂. Στο

φιαλίδιο Master Mix προστίθενται αρχικά H₂O, και στη συνέχεια MgCl₂, dNTPs, Primer F, Primer R και Taq. Το μείγμα ανακατεύεται σιγά σιγά με το tip. Μοιράζονται 25μL Master mix σε καθένα από τα 3 φιαλίδια του Positive, Negative, Sample. Στο Sample προστίθεται 1μL DNA, στο Positive 1μL DNA το οποίο έχει αποδειχτεί ότι δουλεύει, και στο Negative τίποτα. Τοποθετούνται στην PCR στο ανάλογο πρόγραμμα. Το PCR product που προκύπτει φορτώνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, και αφήνεται να τρέξει σε ηλεκτροφόρηση στα 90V για 1:20 ώρες.

A13aV και A13aNV

Product length: 1200

Primers (name) F: KGT, TRA, TGI, TCS, TST, AGG, A

R: TMG, TGA, CYT, GTC, KCT, CRG, A

Πίνακας 1. Master Mix της PCR για *Hox A13a*

Master Mix	
	μL
DNA	1
Buffer	5
MgCl ₂	3
dNTPs	0,2
Primer F	0,5 (100mM)
Primer R	0,5 (100mM)
Taq	0,1
H ₂ O	14,70

Πίνακας 2. PCR Program για *Hox A13a*

PCR Program	
	T (min)
1	3 min
2	1
3	1
4	1:30
5	Go to step 2
6	15 min
7	forever

A1aV και A1aNV

Product length: 986

Primers (name) F: GAY, TAY, WCK, GTG, ATG, AGC

R: GTA, CTT, GTT, RAA, GTG, GAA, YTC

Πίνακας 3. Master Mix της PCR για *Hox A1a*

Master Mix	
	μL
DNA	1
Buffer	5
MgCl ₂	2
dNTPs	0,2
Primer F	5 (10mM)
Primer R	1,5 (100mM)
Taq	0,1
H ₂ O	10,20

Πίνακας 4. PCR Program για *Hox A1a*

PCR Program	
	T (min)
1	3
2	1
3	1
4	1:30
5	Go to step 2
6	15
7	Forever

2.4. Gel purification

Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, PCR clean-up gel extraction kit.

Οδηγίες:

- Αποκοπή του τμήματος DNA- διαλυτοποίηση του κομματιού πηκτώματος αγαρόζης. Με ένα καθαρό νυστέρι αποκόπτεται το τμήμα DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρείται η περίσσια αγαρόζη. Αφού προσδιοριστεί το βάρος του μεταφέρεται σε καθαρό φιαλίδιο. Για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης <2% προστίθενται 200μL Buffer NT1. Το δείγμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 50°C. Η πλήρης διάλυσή του επιτυγχάνεται με τη χρήση της συσκευής Vortex ανά 2-3 λεπτά.
- Δέσμευση DNA. Τοποθετείται ένα NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column σε φιαλίδιο συλλογής (2mL), στο οποίο φορτώνονται μέχρι και 700μL δείγματος. Φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα σε 11,000xg και απορρίπτεται το παραπροϊόν που προκύπτει στο φιαλίδιο συλλογής.
- Καθαρισμός πηκτώματος πυριτίου. Προστίθενται 700μL Buffer NT3 στο NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column το οποίο φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα σε 11,000xg. Απορρίπτεται το παραπροϊόν.
- Στέγνωμα πηκτώματος πυριτίου. Το Buffer NT3 αφαιρείται πλήρως μέσω φυγοκέντρισης ενός λεπτού σε 11,000xg.
- Έκλυση DNA. Το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column τοποθετείται σε φιαλίδιο φυγοκέντρισης 1,5mL. Προστίθενται 30μL Buffer NE και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό, ακολουθεί φυγοκέντριση ενός λεπτού για 11,000xg.

2.5. Κλωνοποίηση

Χρησιμοποιούνται 4μL φρέσκο προϊόν PCR, 1μL Salt Solution και 1μL Topo Vector, τα οποία παραμένουν στον πάγο. Στη συνέχεια:

- Το αντιδραστήριο μείγμα αναμειγνύεται προσεκτικά και αφήνεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τοποθετείται στον πάγο.
- Από το παραπάνω μείγμα προστίθενται 2μL σε φιαλίδιο που περιέχει τα κύτταρα *E. coli*, το οποίο ανακατεύεται και αφήνεται στον πάγο για 15 λεπτά.
- Τοποθετείται για 30 δευτερόλεπτα στο επωαστήριο στους 42°C και αμέσως μετά στον πάγο.
- Προστίθενται 250μL SOC medium και το φιαλίδιο με τα κύτταρα επωάζεται στο shaking incubator στους 37°C για μια ώρα σε 200rpm.
- Απλώνεται μίγμα κυττάρων και SOC medium σε δυο τριβλία με θρεπτικό υλικό, όπου στο πρώτο 80μL μείγματος και στο δεύτερο 120μL.
- Τα τριβλία αφήνονται στον επωαστήρα στους 37°C για ένα βράδυ.

2.6. Colony PCR

Οι αποικίες που φέρουν το επιθυμητό ένθεμα DNA επιλέγονται μέσω της Colony PCR.

Πίνακας 5. Master Mix της Colony PCR για *Hox A13a*

Master Mix	
	μL
DNA	
Buffer	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTPs	0,2
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Taq	0,1
H ₂ O	19,70

Πίνακας 6. Colony PCR Program για *Hox A13a*

PCR Program	
	T (min)
1	3 min
2	1
3	1
4	1:30
5	Go to step 2
6	15 min
7	forever

Πίνακας 7. Master Mix της Colony PCR για *Hox A1a*

Master Mix	
	μL
DNA	
Buffer	2,5
MgCl ₂	0,5
dNTPs	0,2
Primer F	5/0,5
Primer R	1,5
Taq	0,1
H ₂ O	19,7

Πίνακας 8. Colony PCR Program για *Hox A1a*

PCR Program	
	T (min)
1	3
2	1
3	1
4	1:30
5	Go to step 2
6	15
7	Forever

Ύστερα από την πραγματοποίηση της Colony PCR:

1. Αποστειρώνονται σε ακτίνες UV τα γάντια, μια πιπέτα παστέρ, LB medium και οι φιάλες τύπου Falcon.
2. Στον θάλαμο UV οι φιάλες Falcon γεμίζονται με 4ml LB medium.
3. Οι αριθμημένες αποικίες που επιλέχθηκαν από την Colony PCR μεταφέρονται στις φιάλες Falcon (1 αποικία ανά 1 Falcon), κάτω από καμινέτο.
4. Τοποθετούνται στον επωαστήρα ανακίνησης σε συνθήκες 37°C και 200rpm μέχρι να θολώσει το εσωτερικό των φιαλών.

2.7. Απομόνωση Πλασμιδίου (Plasmid Extraction)

Οδηγίες:

- Από το κάθε δείγμα κορεσμένης αποικίας *E.coli* τοποθετούνται 2mL σε φιαλίδιο φυγοκέντρισης και φυγοκεντρώνονται για 30 δευτερόλεπτα σε 12.000xg, ώστε να προκύψουν σφαιρίδια κυττάρων. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και αφαιρείται όσο δυνατόν περισσότερο υγρό.
- Προστίθενται 150μL Buffer A1. Μέσω της συσκευής Vortex το σφαιρίδιο κυττάρων επαναιωρείται. Προστίθενται 250μL Buffer A2 και γίνεται προσεκτική ανάμιξη με αναστροφή των φιαλιδίων 5 φορές και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για μέχρι 2 λεπτά, ή μέχρι να είναι διαυγές το προϊόν της λύσης. Προστίθενται 350μL Buffer A3 και γίνεται προσεκτική ανάμιξη με αναστροφή των φιαλιδίων μέχρι να γίνει άχρωμο το Lysecontrol καθ' όλη την έκταση του προϊόντος της λύσης, χωρίς ίχνος μπλε χρώματος.
- Διευκρίνιση του προϊόντος της λύσης φυγοκεντρώντας το για 3 λεπτά σε 12.000xg.
- Δέσμευση DNA. Τοποθετούνται NucleoSpin Plasmid EasyPure Columns σε φιαλίδια συλλογής 2mL, και μεταγγίζεται το υπερκείμενο που προέκυψε. Η διαδικασία συνεχίζεται με φυγοκέντριση για 30 δευτερόλεπτα σε 1.000-2.000xg. Απορρίπτεται το παραπροϊόν.

- Καθαρισμός και στέγνωμα πηκτώματος πυριτίου. Προστίθενται 450μL Buffer AQ και φυγοκεντρώνται τα δείγματα για 1 λεπτό σε 12.000xg. Προσεκτικά απορρίπτεται το φιαλίδιο συλλογής που περιέχει το παραπροϊόν.
- Έκλυση DNA. Τα NucleoSpin Plasmid EasyPure Columns τοποθετούνται σε φιαλίδια φυγοκέντρισης 1,5mL και προστίθενται 50μL Buffer AE. Αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρώνται στη μέγιστη ταχύτητα.

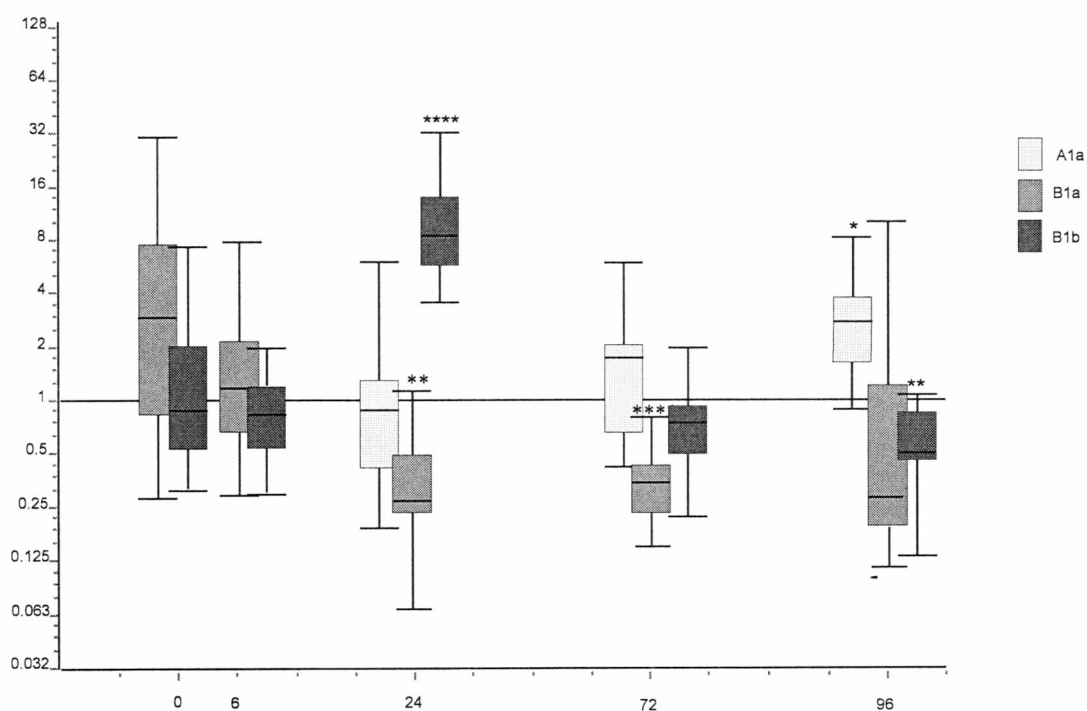
2.8. Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο *VBC Biotech* στη Βιέννη, Αυστρία.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. *Hox A1a*

Τα κοινά έμβρυα γλώσσας που προήλθαν από αλιευμένους γεννήτορες (P) και από γεννήτορες επόμενης γενιάς προερχόμενους από εκκολαπτήριο (G1) διέφεραν στα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *Hox A1a*. Η έκφραση του *Hox A1a* ξεκίνησε στις 24hrpf και παρέμεινε σταθερή έως τις 48hrpf. Σημαντική αύξηση στην έκφραση παρατηρήθηκε χρονικά με κορυφή στα 96hrpf.

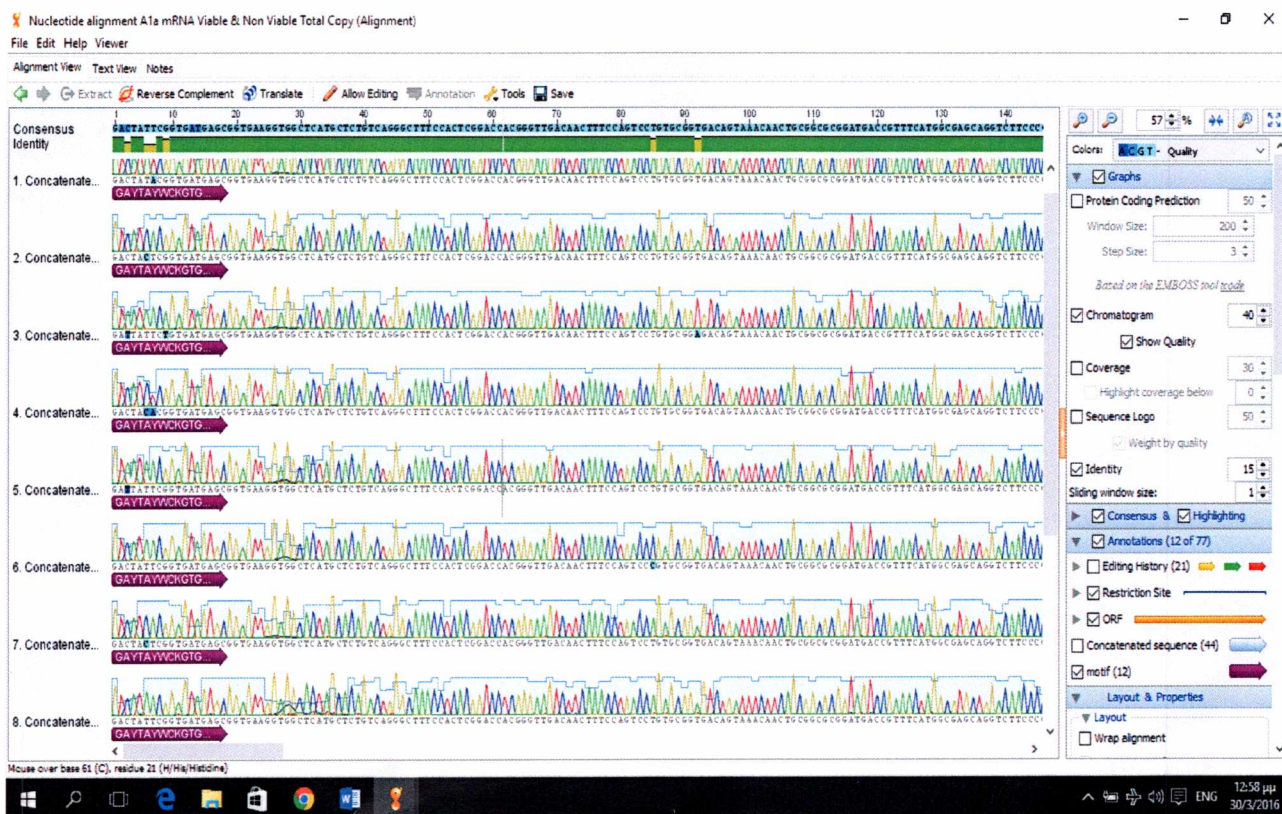


Εικόνα 1. Σχετική γονιδιακή έκφραση ξεχωριστών ομάδων γεννητόρων P vs G1 *Hox A1a* από 0-96hrpf.

3.1.1. *Hox A1a* αλληλουχία mRNA

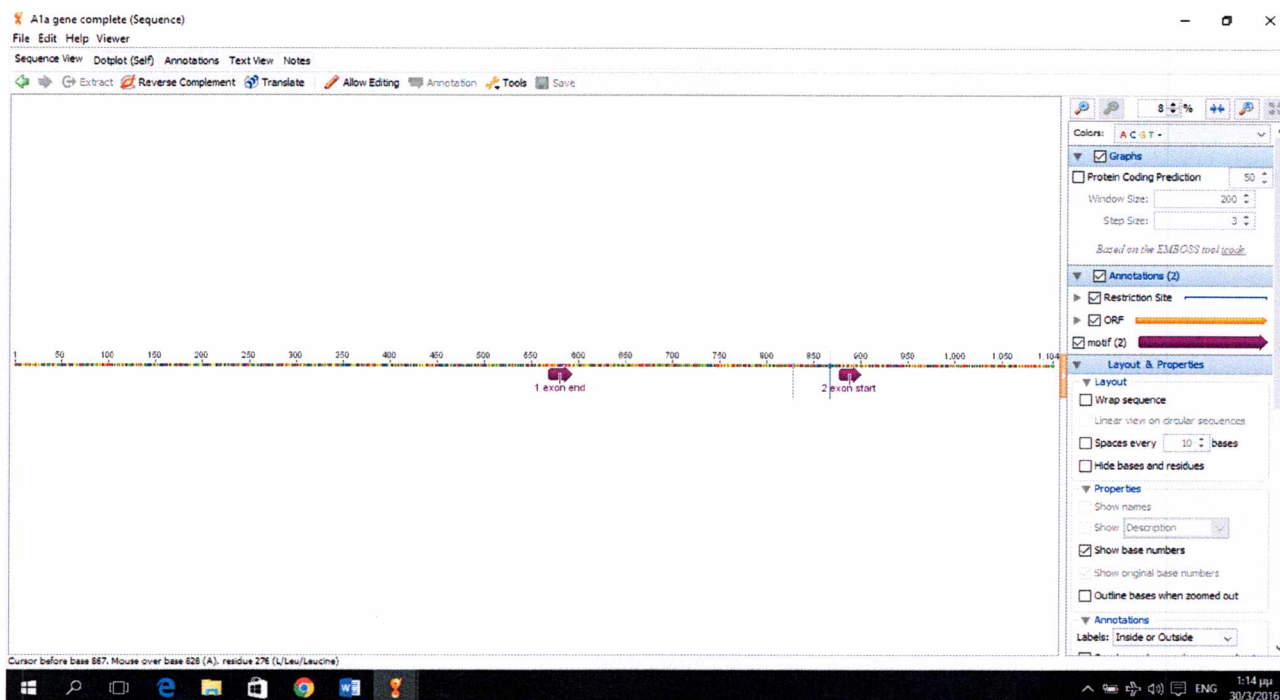
GACTATTCGGTGATGAGCGGTGAAGGTGGCTCATGCTCTGTCAGGGCTTTCCTCACTCGGACCACGGGTTGACAACCTTTCAGTCCTGTGCGGTGACAGTAAACAACCTGCGGGCGCGGATGACCGTTTCATGGCGAGCAGGTCTTCCCCTGACGGCGTCCCCACCAGCCGGGCTCATACCAATCCACTGTGGGCTCTTTGGGTCTCACCTATGGGGCCCATCCGGCCTGCAGCTCCAGCTATGGACCCCAAAGTTTCTGTGCTGCCTATAACCCTTACGGGCTCAACCAGGAAGTGGACTCAACAGCTGGATTTCCTCAGTGCGGCCATTGATGTACTCGGGTAACATTCCTCCC CATGGTGTCCCAGCATCGCCAAAGTTACAGTGGCGCCCCCTGGGCCAGCTGCAGTATGCCACGCTGCCTACGGCGGTGGGCACGAGCAGGCAACCCCTTTCCTCCGGCTGCTCGAACCCGCTGTACCTCTGCACGCAGCTCACCTGGAGGCTTGTTGTTACCTCTGTCTGAA GCTGCTTCTTCGGCACAGACCTTCGACTGGATGAAAGTGAAGAGGAACCCACCAAAGACAGGCAGGTCAGGAGAGTACGGTTATGGAGGTCAGCCGAACACGGTCAGGACCAACTT CACCCTAAACAGCTGACGGAGTTGGAGAAGGAGTTCCTCACTTCAACAAGTAC

Πίνακας 9. Νουκλεοτιδική Αλληλούχηση *Hox A1a* mRNA viable & non-viable eggs



3.1.2. Γονίδιο *Hox A1a* συνολική αλληλουχία

Πίνακας 10. Συνολική αλληλουχία *Hox A1a*



3.2. *Hox A13a*

Η πρόωρη έκφραση του *Hox A13a* πιθανά υποδεικνύει σοβαρό αντίκτυπο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη που οδηγεί σε θνησιμότητα. Τα κοινά έμβρυα γλώσσας που προήλθαν από άγριους γεννήτορες (P) και από γεννήτορες επόμενης γενιάς προερχόμενους από εκκολαπτήριο (G1) διέφεραν στα πρότυπα έκφρασης γονιδίων *Hox A13a*. Η πρόωρη έκφραση του *Hox A13a* ανιχνεύθηκε στα έμβρυα γλώσσας, υποδηλώνοντας πρόωρη παύση της ανάπτυξης και μητρικής έκφρασης. Επίσης παρατηρήθηκε ανίχνευση του *Hox A13a* από την αρχή της γαστρελίσωσης στα 0 hpf, ακολουθούμενη από σημαντική μείωση στα 48 hpf. Ρύθμιση προς τα άνω παρατηρήθηκε από 48 έως 96 hpf.

3.2.1. *Hox A13a* αλληλουχία mRNA

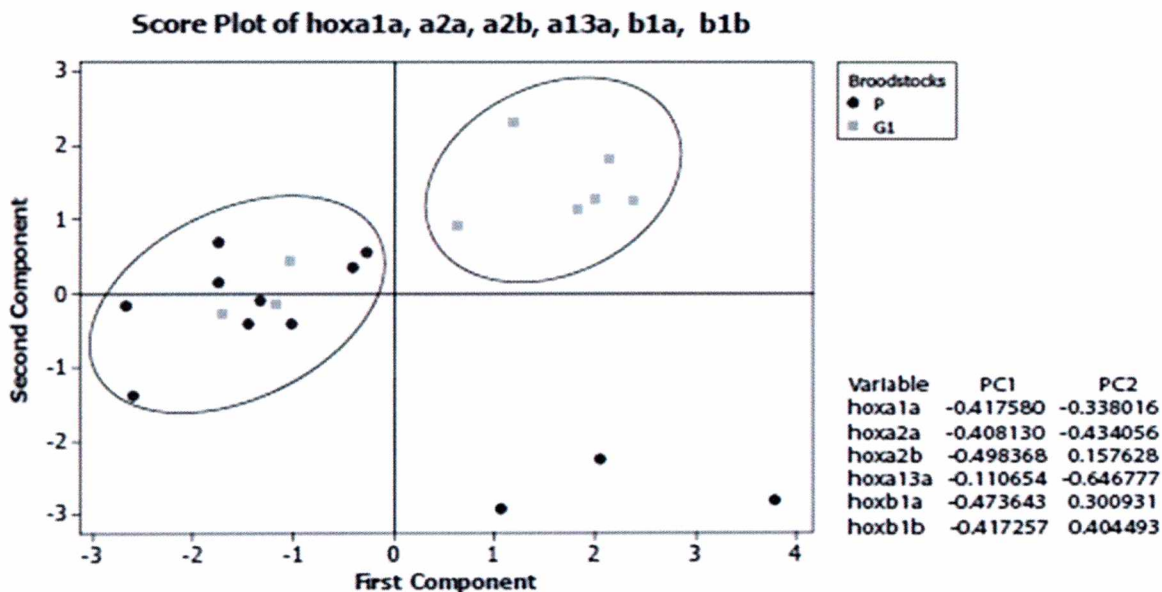
```
GGTGATGTTCTGTACGACAACGGCGGAGGTTCCGATGAACTGAGCAAGAACATGGAG
GGTTTCGCTGGTGGCAACTTTGCTGCGAACCAGTGCAGGAATCTGATGGCGCACCCCGC
GTCCCTGGCACCGAGCACGGCGTACTCCTCCAGCGACGTGCCACCTCCGCTATGAGCG
AGCCAGTCAAGCAGTGCAGCCCCTGCTCTGCAGCTCAGAATTCATCCAGCGCGTCTCTT
CCTTATGGCTACTTCGGTAGCAGTTACTATCCGTGCAGAATGTTCGCATCACAACAGCATA
AAACCGTGCGGCGCGCAGCCTCCCTCTGCGTACGGAGAGAAATACATGGACACATCCG
CCTCGGGGGACGACTTCGCTTCTCGGGCAAAGGAATTCGCGTTTTATCCGACATATCCTT
CAGGCCCATATCAACCTGTTCCCAGTTACCTGGACGTCCCCGTCGTGCCAACTATCAGTG
CGCCGTGAGAAGCCAGACACGAGTCCCTGCTGCCTATGGAGACTTACCAACCGTGGAC
TCTCGCCGCCAACGGCTGGAACGGCCAGGTTTACTGCGCCAAGGAGCAGCCACAGCCT
GGACACATGTGGAAGAGCTCCATACCAGACACGGTGTCTCACGGTGGAGGAGACTCTG
GTTCTTATCGACGTGGAAGAAAGAAGCGCGTGCCATACACCAAGCTGCAACTGAAGGA
ACTCGAGCGCGAGTACGGCGTCAATAAATTTATCACGAAGGACAAAAGGAGGAGGATAT
CTGCGCAGACCAACCTGTCCGAGCGACAAGTCACTA
```

Πίνακας 11. Νουκλεοτιδική αλληλούχιση *Hox A13a* mRNA viable & non-viable eggs



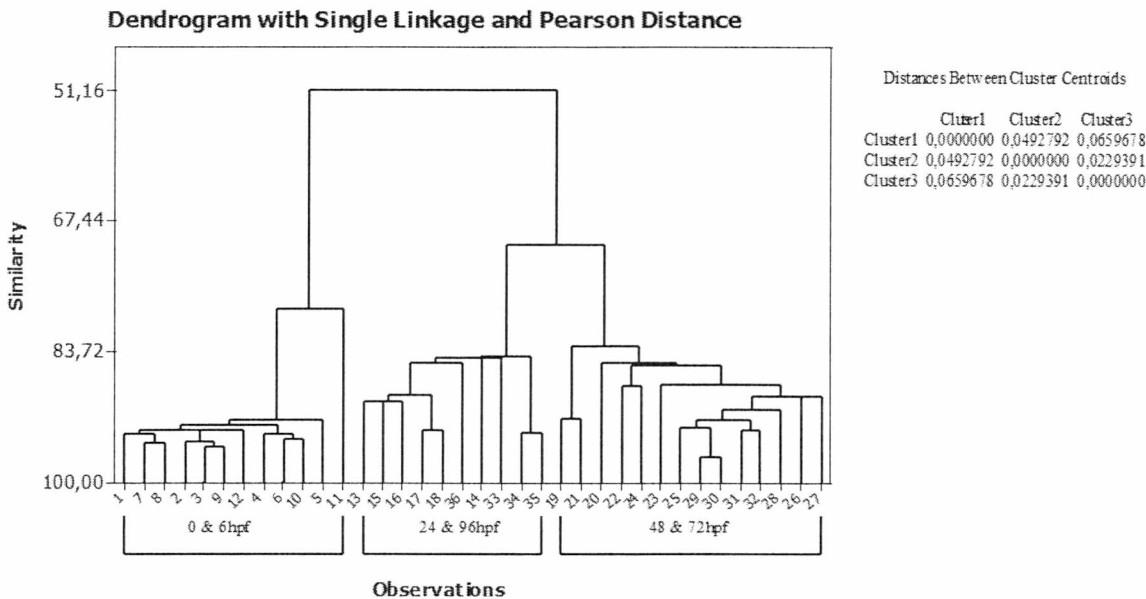
3.3. Γενικές παρατηρήσεις σχετικά με την έκφραση *Hox A1a* και *Hox A13a*

- Η κύρια ανάλυση των συνιστωσών (*Principal Component Analysis-PCA*) έδειξε ότι στα έμβρυα-απόγονοι διαφορετικής προέλευσης γεννητόρων, προέκυψαν διαφορές στα πρότυπα έκφρασης γονιδίων *Hox*. Η ανάλυση στα 48hrf έδειξε δύο διαφορετικές ομάδες μεταξύ των παρτίδων αυγών P και G1. Η πρώτη βασική συνιστώσα (PC) εξήγησε το 57,9% της συνολικής διακύμανσης και η δεύτερη το 32,8%. Οι αναπαραγόμενες συσχετίσεις αποκάλυψαν έλλειψη των μικρών υπολειμμάτων που παρατηρούνται συχνά σε ζεύγη γονιδίων για τα ζεύγη *Hox A1a* και *Hox A13a* (6% μη περιττό). Οι μεταβλητές για *Hox A1a* και *Hox A13a* είχαν υψηλά θετικά φορτία στο δεύτερο συστατικό.



Εικόνα 2. Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών του προτύπου της γενετικής έκφρασης των γονιδίων *Hox* στις 48 hrf για δύο ξεχωριστές ομάδες (P & G1). Η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει το 57,9% της συνολικής διακύμανσης, ενώ η δεύτερη, το 32,8%.

- Η χρονική συγγραμμικότητα των *Hox A1a* και *Hox A13a* προσδιορίστηκε ώστε να ανιχνευθεί το σημείο εκκίνησης της έκφρασής τους, και η διακύμανση τους κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μέχρι την εκκόλαψη.
- Στο δενδρόγραμμα ανάλυσης συστάδας των καταγεγραμμένων παρατηρήσεων (δείγματα που παριστάνονται στον άξονα X), απεικονίστηκαν τρεις διαφορετικές ομάδες. Μεταξύ των χρόνων δειγματοληψίας 0 και 6 hpf, 24 και 96 hpf, 48 και 72 hpf παρατηρήθηκαν παρόμοιες μορφές έκφρασης γονιδίου *Hox*.



Εικόνα 3: Ανάλυση των παρατηρήσεων ανά συστάδες με τις μετρήσεις των δειγμάτων στον X άξονα. Παρατηρούμε ότι σχηματίστηκαν τρεις διαφορετικές ομάδες. Ομοιότητες των προτύπων έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων παρουσιάστηκαν μεταξύ των παρατηρήσεων 0 και 6 hpf, 24 και 96 hpf, 48 και 72 hpf.

- Όσον αφορά την περίοδο έκφρασης των 24-96 hpf, καταγράφηκαν ακραίες συσχετίσεις μεταξύ ζευγών γονιδίων *Hox A1a* (συντελεστές συσχέτισης $>0,7$), αλλά όχι μεταξύ των ζευγών *Hox A13a*.
- Για την περίοδο έκφρασης των 48-96hpf, το γονίδιο *Hox A1a* έδειξε υψηλότερο δείκτη κατάστασης (32,8) και υψηλότερες τιμές VIF, κάτι το οποίο δεν έδειξε το *Hox A13a*, ενώ ο προσδιοριστής συσχέτισης ήταν χαμηλότερος (17×10^{-7}) σε σχέση με την προηγούμενη περίοδο έκφρασης 24-96hpf.
- Η κατά ζεύγη σύγκριση μεταξύ παρτίδων αυγών δείχνει έντονη μεταβολή στην γονιδιακή έκφραση σε παρτίδες ωοτοκίας γεννητόρων P. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή ($p < 0,005$) στην γονιδιακή έκφραση *Hox A13a*, ενώ στις παρτίδες αυγών προερχόμενων από γεννήτορες G1 παρατηρήθηκαν λιγότερες μεταβολές στην έκφραση για *Hox A1a* και *Hox A13a*.
- Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και τα δύο γονίδια μοιράστηκαν σχεδόν ίσες ποσότητες συνώνυμων και μη συνώνυμων αντικαταστάσεων, ακόμη και στην πιο συντηρημένη περιοχή homeobox.
- Άλλη μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η παρουσία σερίνης (S) στο κωδικόνιο 131 (132 στην αλληλουχία συναίνεσης), μόνο για τη βιώσιμη ομάδα αυγών. Για τα μη βιώσιμα, παρουσιάζονται και η προλίνη (P) και η ιστιδίνη (H) σε σχεδόν ίσες συχνότητες, 10/26 και 9/26 αντίστοιχα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amores A., Suzuki T., Yan Y., et al. (2004) Developmental Roles of Pufferfish *Hox* Clusters and Genome Evolution in Ray-Fin Fish. *Genome Res.* 14: 1-10
- Amores A., Force A., Yan Y., Joly L., Amemiya C., Fritz A., Ho R.K., Langeland J., Prince V., Wang Y., Westerfield M., Ekker M., Postlethwait J.H. (1998) Zebrafish *hox* Clusters and Vertebrate Genome Evolution. *Science* 282 1711-1714
- Burke A.C., Nelson C.E., Morgan B.A., Tabin C. (1995) *Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 121, 333-346
- Casaca A., Santos A.C., Mallo M. (2014) Controlling *Hox* Gene Expression and Activity to Build the Vertebrate Axial Skeleton. *Developmental Dynamics* 243:24-36
- Hueber S.D., Weiller G.F., Djordjevic M.A., Frickey T. (2010) *Plos One* 5 1-12
- Hurley I., Hale M.E., Prince V.E. (2005) Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evolution and Development* 7:6, 556-567.
- Hunter M.P., Prince V.E. (2002) Zebrafish *Hox* Paralogue Group 2 Genes Function Redundantly as Selector Genes to Pattern the Second Pharyngeal Arch. *Developmental Biology* 247, 367-389
- Kavouras M.^{1*}, Malandrakis, E.E.¹, Golomazou E.¹, Konstantinidis I.¹, Blom E.², Palstra A.P.³, Anastassiadis, K.⁴, Panagiotaki, P.¹ and Exadactylos, A.¹ *Hox* and LC-PUFA gene expression profiles during embryonic development of common sole
- Kurosawa G., Takamatsu N, Takahashi M., Sumitomo M., Sanaka E., Yamada K., Nishii K., Matsuda M., Asakawa S., Ishiguro H., Miura K., Kurosawa Y., Shimizu N., Kohara Y., Hori H. (2005) Organisation and structure of *hox* gene loci in medaka genome and comparison with those of pufferfish and zebrafish genomes. *Gene* 370 75-82
- Lemons D., McGinnis W. (2006) Genomic Evolution of *Hox* Gene Clusters. *Science* 313, 1918
- Malaga-Trillo E., Meyer A. (2001) Genome Duplications and Accelerated Evolution of *Hox* Genes and Cluster Architecture in Teleost Fishes. *AMER. ZOOL.* 41:676-686
- McClintock J.M., Carlson R., Mann D.M, Prince V.E. (2001). Consequences of *Hox* gene duplication in the vertebrates: an investigation of the zebrafish *Hox* paralogue group 1 genes. *Development* 128: 2471-2484;
- Padros F. Villalta M., Gisbert E., Estevez A. (2011). Morphological and histological study of larval development of the Senegal Sole *Solea senegalensis* : an intergrative study. *Journal of Fish Biology* 79, 3-32.
- Piper D. E., Batchelor A. H., Chang C. P., Cleary M. L., and Wolberger C. (1999). Structure of a *HoxB1*-*Pbx1* heterodimer bound to DNA: Role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* 96, 587–597.
- Postlethwait J.H., Yan Y., Gates M.A., Hornes S., Amores A., Brownlie A., Donovan A., Egan E.S., Force A., Gong Z., Goutel C., Fritz A., Kelsh R., Knapik E., Liao E., Paw B., Ransom D., Singer A., Thomson M., Abduljabbar T.S., Yelick P., Beier D., Joly J.S., Larhammar D., Rosa F., Westerfield M., Zon L.I., Johnson S.L., Talbot W.S. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genetics* 18, 345-349
- Prince V., Joly L., Ekker M., Ho R.K..(1998). Zebrafish *hox* genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk. *Development* 125, 407-420.
- Prince, V. E., Moens, C. B., Kimmel, C. B., and Ho, R. K. (1998). Zebrafish *hox* genes: Expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene *valentino*. *Development* 125, 393–406.
- Rijli, F. M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dolle, P., and Chambon, P. (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell* 75, 1333–1349.

- Soshnikova N., Dewaele R., Janvier P., Krumlauf R., Duboule D. (2013). Duplications of hox gene clusters and the emergence of vertebrates. *Developmental Biology* 378 194-199
- Schilling T.F., Prince V., Ingham P.W.(2001). Plasticity in Zebrafish hox Expression in the Hindbrain and Cranial Neural Crest. *Developmental Biology* 231, 201-216.
- Studer, M., Gavalas, A., Marshall, H., Ariza-McNaughton, L., Rijli, F. M., Chambon, P., and Krumlauf, R. (1998). Genetic interactions between Hoxa1 and Hoxb1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* **125**, 1025–1036.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000137033