

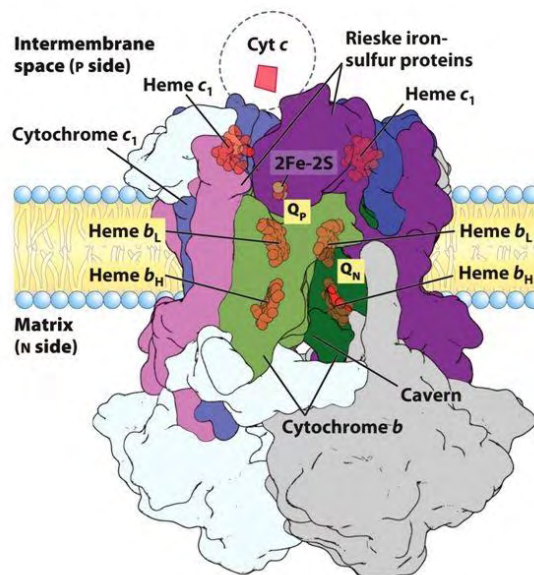


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΤΗΝ  
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ

Complex III: cytochrome  $bc_1$  complex



ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ  
ΛΑΡΙΣΑ 2018

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ**

—

**EFFECT OF WHOLE GENOME DUPLICATION ON GENE STRUCTURE OF COMPLEX III OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION**

**Υπεύθυνη καθηγήτρια:**

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

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA	Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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 για την ευκαιρία που μου έδωσε για να βιώσω αυτή την εμπειρία, τη βοήθεια και τη συνεργασία της.

Ιδιαίτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά και τον κ. Ζήση Μαμούρη.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η βοήθεια και η στήριξη του υποψήφιου διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνου τόσο στο κομμάτι της Επιστήμης όσο και στο ψυχολογικό. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Μαρκαντώνη Μαρία καθώς και τον υπεύθυνο του εργαστηρίου και διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους υπόλοιπους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την άριστη συνεργασία τους.

Τέλος, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια και τους φίλους μου για την ανιδιοτελή, καθολική και αποτελεσματική στήριξη προς το προσωπό μου.

Την παρούσα γραπτή πτυχιακή εργασία την αφιερώνω στον εκλιπόντα θείο μου Ιωάννη.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός που παίζει ρόλο στην εξέλιξη της φαινοτυπικής πολυπλοκότητας, της ανάπτυξης νέων λειτουργιών καθώς και στην εγκαθίδρυση της ειδογένεσης είναι ο γονιδιωματικός διπλασιασμός. Ύστερα από έναν διπλασιασμό μπορεί να υπάρξει πλουραλισμός στην τύχη των γονιδίων, δηλαδή μπορεί να χαθεί το θυγατρικό γονίδιο, να διατηρηθεί ή να υπάρξει αλλαγή στη λειτουργία του. Δύο γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος θεωρείται ότι διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία νέων γονιδίων και στην εγκαθίδρυσή τους στα Σπονδυλωτά, όπως είναι για παράδειγμα τα Hox γονίδια. Ένας ακόμη διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος που συνέβη στα ψάρια 350 εκατομμύρια χρόνια πριν οδήγησε στη δημιουργία παραπάνω αντίγραφων. Στην παρούσα μελέτη διερευνάται πώς οι γονιδιωματικοί διπλασιασμοί επιδρούν στη γονιδιακή δομή και πιθανώς τη λειτουργία του συμπλόκου των κυτοχρωμάτων  $bc_1$  της αναπνευστικής αλυσίδας στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, δηλαδή σε έναν πολύ καλά συντηρημένο και παράλληλα σημαντικό μηχανισμό για την ύπαρξη ζωής. Με φυλογενετικές μελέτες και με τη βοήθεια της υπολογιστικής γονιδιωματικής συγκρίνονται τα γονιδιώματα των Σπονδυλωτών με επίκεντρο τους Τελεοστέους, στους οποίους συνέβη ο τρίτος γύρος διπλασιασμού και αναζητήθηκαν παράλογα γονίδια και καλά διατηρημένες περιοχές που έχουν ως σημείο αναφοράς αυτά.

## ABSTRACT

A very important mechanism that holds a pivotal role in the development of phenotypic complexity and new functions as well as in the process of speciation is whole genome duplication (WGD). Following a WGD there may be pluralism in the fate of the genes, that is, the daughter gene may be lost, maintained or changed in function. Two rounds of duplication of the entire genome have been assumed to have played an important role in generating new genes and establishing them in vertebrates, such as the Hox genes. Another round of duplication in the entire genome that occurred in fish 350 million years ago led to the creation of more copies. In the present study we investigate how the WGD events have affected the gene structure and the complexity of cytochrome  $bc_1$  complex of the respiratory chain in the oxidative phosphorylation, a very well preserved and highly important mechanism for life. By the means of phylogenetic studies and with the assistance of computational genomics, the Vertebrate genomes, with a special focus on the Teleosts in which the third round of duplication occurred, were searched for paralogue genes and well-conserved regions encoding for protein of complex III.

## Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 Διπλασιασμοί γονιδίου και ολόκληρου του γονιδιώματος .....	8
1.1.1 Γονιδιακός Διπλασιασμός .....	8
1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί .....	9
1.1.3 Πλεονεκτήματα της πολυπλοειδίας.....	11
1.1.4 Αποτελέσματα από τον διπλασιασμό των γονιδίων .....	12
1.1.5 Πρώτος και Δεύτερος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στα Σπονδυλωτά .....	17
1.1.6 Τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στους Τελεοστέους .	19
1.1.7 Επιδράσεις των διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος στη γονιδιακή δόση .....	21
1.2.ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ.....	23
1.2.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ.....	23
1.2.2.ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ.....	24
1.2.3 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ.....	26
1.2.4.ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ-ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III.....	29
1.2.5 Συναρμολόγηση του Συμπλόκου III.....	32
ΣΚΟΠΟΣ .....	35
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
2.1. Είδη μελέτης.....	36
2.2.Εξαγωγή Δεδομένων .....	37
2.2.1.Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων .....	37
2.2.2 Blast .....	38
2.3. Πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνικών ακολουθιών .....	39
2.4. Φυλογενετική Ανάλυση.....	40
2.5.Μελέτη Συντανικότητας.....	41
2.5.1 Συντανικότητα .....	41
2.5.2 Genomicus & Ensembl Biomart .....	42
2.5.3 Μεθοδολογική προσέγγιση .....	42
3.Αποτελέσματα .....	43
3.1.Blast .....	43
3.2.Στοίχιση Αλληλουχιών.....	43
3.3. Φυλογενετική Ανάλυση.....	46
3.4. Συντανικότητα .....	51

4. Συζήτηση.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	62

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Διπλασιασμοί γονιδίου και ολόκληρου του γονιδιώματος

#### 1.1.1 Γονιδιακός Διπλασιασμός

Ο διπλασιασμός των γονιδίων και ολόκληρου του γονιδιώματος θεωρείτο ότι παίζει σημαντικό ρόλο κατά την εξέλιξη από τη δεκαετία του 1930 (Bridges, 1936 ; Stephens, 1951; Ohno, 1967; Ohno, 1970). Το 1936, ο Bridges έκανε την πρώτη παρατήρηση γονιδιακού διπλασιασμού ύστερα από τον διπλασιασμό μιας χρωμοσωματικής περιοχής σε ένα μετάλλαγμα της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*, η οποία παρουσίασε εξαιρετική μείωση του μεγέθους των ματιών, ενώ ο Ohno το 1970 πρότεινε ότι τα πλεονάζοντα γονίδια είναι πιθανοί υποψήφιοι για την παροχή πρώτων γενετικών υλικών με σκοπό την εξελικτική καινοτομία. Επίσης, στο βιβλίο του *Evolution by Gene Duplication* σημειώνει ότι «αν η εξέλιξη ήταν εξ ολοκλήρου εξαρτώμενη από τη φυσική επιλογή, από ένα βακτήριο θα προέκυπταν μόνο πολυάριθμες μορφές βακτηρίων. Η δημιουργία σπονδυλωτών και τελικά θηλαστικών από μονοκύτταρους οργανισμούς θα ήταν εντελώς αδύνατη. Για τέτοια μεγάλα άλματα στην εξέλιξη απαιτείται η δημιουργία νέων γονιδιακών τόπων με προηγουμένως ανύπαρκτη λειτουργία. Μόνο το γονίδιο που κατέστη πλεονάζον μπορούσε να ξεφύγει από την αδιάκοπη πίεση της φυσικής επιλογής. Αφού ξέφυγε, συσσωρεύτηκαν σ'αυτό βλαβερές μεταλλάξεις για να αναδυθεί ως καινούριος γονιδιακός τόπος» (Ohno, 1970). Έτσι, λοιπόν, η γονιδιακή επανάληψη [ή ο διπλασιασμός χρωμοσωμάτων ή η γονιδιακή αύξηση (η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων ενός γονιδίου σε ένα κύτταρο)] είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μέσω του οποίου παράγεται νέο γενετικό υλικό κατά τη διάρκεια της μοριακής εξέλιξης. Μπορεί να οριστεί ως οποιαδήποτε επανάληψη μιας περιοχής DNA που περιέχει ένα γονίδιο. Οι διπλασιασμοί γονιδίων μπορούν να προκύψουν ως προϊόντα διαφόρων τύπων σφαλμάτων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA και κατά την επιδιόρθωση ( Zhang, 2003).



### 1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί

Συνολικά έχουν διαπιστωθεί τέσσερις μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το DNA διπλασιάζεται (Li, 1997; Lynch, 2007a; Hahn, 2009):

#### 1) Άνισος επιχιασμός (*Unequal crossing over*)

Ο άνισος επιχιασμός είναι ένας αμοιβαίος ανασυνδυασμός μεταξύ ομόλογων χρωμοσωμάτων ή αδελφών χρωματίδων ( διπλή έλικα DNA), στον οποίο δεν χάνεται γενετικό υλικό. Ο άνισος επιχιασμός αλλάζει τον αριθμό των επαναλήψεων επηρεάζοντας τη «δόση» των γονιδίων. Συμβαίνει κατά τη μείωση αλλά και στον εν ηρεμία μεσοφασικό πυρήνα. Αφορά περιοχές ίδιες ή πολύ όμοιες μεταξύ τους με μήκος όχι απαραίτητα μεγάλο. Ο ανασυνδυασμός μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων συμβαίνει ανάμεσα σε δύο βραχείες, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στα δύο άκρα ενός γονιδίου. Μόλις διπλασιαστεί ένα γονίδιο με αυτό τον τρόπο, επακόλουθοι άνισοι επιχιασμοί μπορεί εύκολα να προσθέσουν και άλλα αντίγραφα ταιριάζοντας ένα γονίδιο πάνω στο ένα χρωμόσωμα με το γενετικό του αντίγραφο πάνω στο δεύτερο χρωμόσωμα. Έτσι, αποτελεί το βασικό μηχανισμό διπλασιασμού των γονιδίων και δημιουργίας ολόκληρης ομάδας πολύ συγγενικών γονιδίων διατεταγμένων εν σειρά, όπως η οικογένεια των γονιδίων σφαιρίνης και άλλων πολυγονιδιακών οικογενειών (Alberts et al., 2011).

#### 2) DNA Αντιμετάθεση (*DNA Transposition*)

Είναι η διαδικασία, κατά την οποία τμήματα DNA μπορούν και μετακινούνται σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος. Παλαιότερα ονομάζονταν και αναπηδήσεις γονιδίων (*jumping genes*), ενώ τα τμήματα που μετακινούνται ονομάζονται μεταθετόνια (*transposons*). Έτσι, ανάλογα με τον τύπο της αντιμετάθεσης, ένα τμήμα DNA αντιγράφεται ή αποκόπτεται από μία περιοχή του γονιδιώματος και προσκολλάται σε μία άλλη με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων (*transposase enzyme*), ενώ είναι δυνατό να προκύψουν δομικές αλλαγές. Η DNA αντιμετάθεση που παίρνει μέρος στον διπλασιασμό των γονιδίων μπορεί να επιτευχθεί μέσω 1 ή 2 σημαντικών μονοπατιών (Hahn, 2009). Τα οποία είναι τα εξής :

A) Το NAHR (Non-allelic homologous recombination), είναι η γένεση μεγάλων ανακατατάξεων σε ομόλογα τμήματα, με συχνότητα  $10^{-4}$  ανά γενεά. Μπορεί να δημιουργηθούν ανακατατάξεις ως αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού των γονιδίων και να προκύψουν παραλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων τους (Hurles et al., 2006).

B) Το NHEJ ( Non-Homologous End Joining), είναι το μονοπάτι το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναδόμηση μιας “σπασμένης” ακολουθίας DNA. Σε αντίθεση με το NAHR, εμφανίζονται σε μη ομόλογα τμήματα και σε συχνότητα περίπου  $10^{-7}$  ανά γενεά (Moore & Haber, 2006).

### 3) Ρετρομετάθεση (*Retroposition*)

Τα αντίγραφα του γονιδίου που προκύπτουν από αυτό τον μηχανισμό είναι αποτέλεσμα της αντίστροφης μεταγραφής του mRNA σε cDNA, το οποίο εισέρχεται σε μία καινούρια θέση στο γονιδίωμα. Με αυτό το μηχανισμό τα παράλογα που προκύπτουν δεν διαθέτουν πολύ-A-ουρά και ιντρόνια. Τα αντίγραφα αυτά φέρουν μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες γύρω τους και γι'αυτό το λόγο είναι λιγότερο πιθανό να μπορούν να εκφραστούν ύστερα από τον διπλασιασμό (Vinckenbosch et al., 2006).

### 4) Πολυπλοειδία (*Polyploidy*)

Οι διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία καινούριων αντιγράφων από κάθε γονίδιο του γονιδιώματος. Αν και κάθε γονίδιο διπλασιάζεται, μόνο το 10-30% απ' όλα τα γονίδια διατηρείται στο γονιδίωμα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Byrne & Wolfe, 2005; Maere et al., 2005; Paterson et al., 2006). Ο τύπος ή η λειτουργία των γονιδίων που διατηρείται μετά την πολυπλοειδία φαίνεται να διαφέρει από αυτά που διπλασιάστηκαν από τους διπλασιασμούς που αφορούν μικρότερα τμήματα.

### 5) Τμηματικοί Διπλασιασμοί (*Segmental Duplications*)

Είναι τμήματα του DNA, που το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1kb έως 400kb και επαναλαμβάνονται στο γονιδίωμα. Οι ακολουθίες αυτές, θα πρέπει να έχουν ομοιότητα μεγαλύτερη από 90% σε σχέση με μία ακολουθία αναφοράς. Υπάρχουν σε διάφορες περιοχές ως αποτέλεσμα του φαινομένου του διπλασιασμού. Ορισμένοι αντιλαμβάνονται τον όρο τμηματικοί διπλασιασμοί ως διπλασιασμοί μεγάλης κλίμακας, που περιλαμβάνουν παραπάνω από ένα γονίδια ή όταν αναφέρονται σε τμηματικούς διπλασιασμούς αναφέρονται σε οποιοδήποτε γεγονός διπλασιασμού που δεν οφείλεται στην πολυπλοειδία ή σε διπλασιασμό με παράλογες αλληλουχίες που είναι πάνω από 90% παρόμοιες (Bailey et al., 2001, 2002; Hahn, 2009).

#### 1.1.3 Πλεονεκτήματα της πολυπλοειδίας.

Οι εξελικτικοί βιολόγοι έχουν υποθέσει ότι ο διπλασιασμός των γονιδίων έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των ειδών, ιδιαίτερα στους ευκαρυώτες, τα γονιδιώματα των οποίων χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολυάριθμων πολυγονιδιακών οικογενειών. Με τη δημιουργία πολλών αντιγράφων των εκάστοτε γονιδίων, ο διπλασιασμός των γονιδίων επέτρεψε την εξέλιξη νέων λειτουργιών στις πρωτεΐνες παίζοντας σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστική εξέλιξη. Παρόλο που η πολυπλοειδία οδηγεί συχνότερα σε εξελικτικό αδιέξοδο, φαίνεται ότι οι πολυπλοειδείς οργανισμοί μερικές φορές έχουν πλεονεκτήματα έναντι των διπλοειδών συγγενών τους. Συγκεκριμένα, μερικοί πολυπλοειδείς οργανισμοί είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, συνεπώς έχουν μειωμένο κίνδυνο εξαφάνισης. Οι επιταχυνόμενες γονιδιωματικές και επιγενετικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα μετά τον διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος πιθανόν να επιτρέψουν ταχύτερη προσαρμογή των πολυπλοειδών απ' ό,τι των διπλοειδών. Επιπλέον, οι πολυπλοειδείς έχουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις μεταλλάξεις, το οποίο σημαίνει ότι τα πλεονάζοντα αντίγραφα γονιδίων μπορούν προσωρινά να επισκιάσουν τις επιδράσεις των βλαβερών μεταλλάξεων στο παράλογό τους. Ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος

οδηγεί σε ταχεία επέκταση όλων των οικογενειών των γονιδίων, οι οποίες μπορούν να διατηρηθούν για να εξελιχθούν και να παράγουν γονίδια με παρόμοια, αλλά όχι ταυτόσημη λειτουργία. Έτσι, είναι λογικό να υποτεθεί ότι ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος επιτρέπει τη βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχουσών λειτουργιών. Διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν, επίσης, διαπιστωθεί και σε μονοκύτταρους οργανισμούς. Ο πρώτος αρχαίος διπλασιασμός γονιδιώματος που ανακαλύφθηκε στους ευκαρυώτες ήταν αυτός του σαγχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (Wolfe & Shields, 1997). Επειδή οι αρχαίοι διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος στα φυτά και στα ζώα δημιούργησαν ιδιαίτερα πλούσιες σε είδη ομάδες, για παράδειγμα > 25.000 είδη στα ψάρια και >350.000 είδη αγγειόσπερμων, η πολυπλοειδία παρέχει ευκαιρίες για εξελικτική επιτυχία και διευκολύνει την διαφοροποίηση και την ειδογένεση των οργανισμών. Στην αλλοπολυπλοειδία και στην αυτοπολυπλοειδία, η αυξημένη ετεροζυγωτία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ευρωστία και σε ταχύτερη προσαρμογή σε νέες συνθήκες. Η αυξημένη μεταβολή φαινότυπου και οι συνέπειες της ετέρωσης, δηλαδή η αύξηση της αρμοστικότητας που εμφανίζεται σε διασταυρώσεις μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, δίνουν την δυνατότητα στους πολυπλοειδείς οργανισμούς να επιβιώνουν σε περιβαλλοντικές συνθήκες που δεν είναι ευνοϊκές για τους διπλοειδείς προγόνους τους (Glasauer & Neuhauss, 2014; Van de Peer et al., 2005).

#### **1.1.4 Αποτελέσματα από τον διπλασιασμό των γονιδίων**

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι δύο εξελικτικές δυνάμεις, η τυχαία γενετική παρέκκλιση, δηλαδή η τυχαία αλλαγή γονιδιακών συχνοτήτων (Masel, 2011) και η θετική επιλογή ή κατευθύνουσα επιλογή, δηλαδή η επιλογή που ευνοεί ένα αλληλόμορφο έναντι κάποιου άλλου ή ευνοεί αυξημένες τιμές κάποιου ποσοτικού χαρακτήρα (Molles, 2010) διαφέρουν ανάλογα με την τελική τύχη που θα έχουν τα ζεύγη γονιδίων ως προς τη λειτουργία. Η γενετική παρέκκλιση, επίσης, αποτελεί σημαντική εξελικτική διαδικασία που οδηγεί σε τυχαία αύξηση ή ελάττωση των αλληλομόρφων από γενιά σε γενιά, στην τυχαία εγκαθίδρυση ή και απώλειά τους

και εντοπίζεται σε μικρότερους πληθυσμούς (Barton et al, 2007). Ο γονιδιακός διπλασιασμός μπορεί να οδηγήσει σε κάποιες λειτουργικές σχέσεις μεταξύ των αντιγράφων, όπως απώλεια γονιδιακής λειτουργίας με το σχηματισμό ψευδογονιδίων που συνήθως συμβαίνει τα πρώτα εκατομμύρια χρόνια μετά τον διπλασιασμό, με την προϋπόθεση ότι το γονίδιο δεν βρίσκεται κάτω από κάποια εξελικτική πίεση. Η διατήρηση ενός μη συνδεδεμένου διπλασιασμένου γονιδίου μέσω της διαφοροποίησης της προγονικής λειτουργίας συμβαίνει λόγω γενετικής παρέκκλισης. Από την άλλη, η διατήρηση των γονιδίων είτε μέσω της απόκτησης νέας λειτουργίας είτε μέσω της απόκλισης λειτουργίας καθοδηγείται από το εκλεκτικό πλεονέκτημα του γονιδιακού τύπου που έχει υποβληθεί σε διπλασιασμό (Zhang, 2003). Ο ακριβής μηχανισμός της σταθεροποίησης των διπλασιασμένων γονιδιακών τύπων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των σχετικών επιπέδων των ουδέτερων και επιβλαβών μεταλλάξεων που δρουν πάνω στο ζεύγος γονιδίων, των συντελεστών επιλογής και σε ορισμένες περιπτώσεις από το πραγματικό μέγεθος του πληθυσμού (Moore & Purugganan, 2003; Lynch & Force, 2000; Walsh, 1995; Nowak et al. 1997; Zhang, 2003).

Ο Susumu Ohno (1970) επεσήμανε τρία κύρια αποτελέσματα στην εξέλιξη των διπλασιασμένων γονιδίων, τα οποία είναι η διατήρηση των γονιδίων, η διαφοροποίηση της λειτουργίας τους και η ανάπτυξη μιας νέας λειτουργίας. Άλλα αποτελέσματα είναι να χαθεί το ένα από τα δύο γονίδια καθώς και η αμοιβαία απώλεια και των δύο αντιγράφων.

### **Γονιδιακή Διατήρηση**

Στο πρώτο σενάριο, και οι δύο γονιδιακοί τύποι διατηρούν τις αρχικές λειτουργίες, και ονομάστηκε γονιδιακή διατήρηση (gene conservation). Ύστερα από επανειλημμένη γονιδιακή μετατροπή τα δύο παράλογα γονίδια που θα προκύψουν θα έχουν παρόμοιες αλληλουχίες και λειτουργίες (Zhang, 2003). Πολλές μελέτες έχουν προτείνει ότι αυτή είναι η βασική εξελικτική δύναμη για τη διατήρηση των διπλασιασμένων γονιδίων (Hahn, 2009; Kondrashov & Kondrashov, 2006; Kondrashov et al 2002; Sugino & Innan, 2006) . Έχει προβλεφθεί από διάφορους συγγραφείς ότι η γονιδιακή σύγκλιση (gene conversion) μεταξύ των παράλογων

αναμένεται να συμβαίνει μαζί με την γονιδιακή διατήρηση (gene conservation) με στόχο την διατήρηση της υψηλής ομοιότητας στην αλληλουχία (Sugino & Innan, 2006).

### **Νέα ή διαφοροποιημένη λειτουργία – απώλεια λειτουργίας**

Εναλλακτικά, η ισχυρή αρνητική επιλογή δρα ενάντια σε μεταλλάξεις, που τροποποιούν τη λειτουργία των γονιδίων και μπορεί να αποτρέψει την διαφοροποίηση των γονιδίων που έχουν προκύψει από διπλασιασμό. Η γενετική πληθυσμών προβλέπει ότι τα δύο αντίγραφα μπορούν να παραμείνουν σταθερά, όταν διαφέρουν σε μερικές λειτουργίες τους, όπου μπορεί να έχει συμβεί διαφοροποίηση της λειτουργίας τους (Subfunctionalization, SF) και κάθε θυγατρικό γονίδιο υιοθετεί μέρος των λειτουργιών του προγονικού γονιδίου. Μια μορφή της διαφοροποίησης της λειτουργίας που είναι δυνητικά σημαντική στην εξέλιξη της ανάπτυξης είναι η διαίρεση της γονιδιακής έκφρασης μετά τον διπλασιασμό. Πολλά διπλασιασμένα γονίδια έχουν αποδειχθεί ότι εξελίσσονται ακολουθώντας αυτό το μοντέλο. Ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα του γονιδιακού διπλασιασμού είναι η προέλευση της νέας λειτουργίας. Σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, μια σχετική λειτουργία, παρά μια εντελώς νέα λειτουργία, εξελίσσεται μετά το φαινόμενο του διπλασιασμού.

Η ανάπτυξη μιας νέας λειτουργίας (Neofunctionalization, NF) στα διπλασιασμένα γονίδια απαιτεί ποικίλους αριθμούς αντικαταστάσεων αμινοξέων. Η ανάπτυξη νέας λειτουργίας συμβαίνει όταν το ένα από τα δύο γονίδια διατηρεί τις λειτουργίες του προγονικού γονιδίου, ενώ το δεύτερο αφήνεται ελεύθερο να αναπτύξει κάποιες νέες λειτουργίες. Είναι δηλαδή, μια προσαρμοστική διαδικασία και ένα από τα γονιδιακά αντίγραφα πρέπει να μεταλλαχθεί για να αναπτύξει μια λειτουργία που δεν υπήρχε στο προγονικό γονίδιο (Force et al., 1999).

Μια άλλη πιθανή έκβαση είναι ένα από τα γονίδια να διατηρήσει τις λειτουργίες του προγονικού γονιδίου, ενώ το δεύτερο να χαθεί (Non-functionalization). Η τρίτη περίπτωση είναι και η πιο συνηθισμένη. Στην πρώτη και δεύτερη περίπτωση, όλες οι αλληλεπιδράσεις του προγονικού γονιδίου κληρονομούνται αυτούσιες στο ζεύγος και ανάλογα με την έκταση των μεταλλάξεων που συμβαίνουν αργότερα, ένας αριθμός αλληλεπιδράσεων είναι δυνατόν να χαθεί, ενώ ένας άλλος αριθμός

αλληλεπιδράσεων είναι δυνατόν να εμφανιστεί. Αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι και η διαφοροποίηση λειτουργίας καθώς και η απώλεια λειτουργίας παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη μοίρα των γονιδίων στα οποία έχει επέλθει διπλασιασμός. Επιπλέον, η διαφοροποίηση της λειτουργίας εμφανίζεται ταχέως μετά τον διπλασιασμό των γονιδίων ενώ το μοντέλο της ανάπτυξης της νέας λειτουργίας είναι μια μακρά διαδικασία η οποία συνεχίζεται ακόμη και πολύ μετά τον διπλασιασμό. Έτσι, η βραχυχρόνια διατήρηση των διπλασιασμένων γονιδίων στο γονιδίωμα των οργανισμών οφείλεται κυρίως στο μοντέλο της διαφοροποίησης λειτουργίας, το οποίο είναι σύμφωνο με το πολύ υψηλότερο ποσοστό εκφυλισμένων μεταλλάξεων παρά αυτών που είναι ωφέλιμες (Lynch & Force, 2000; Wolfe 1995; Rastogi & Liberles, 2005; Ohno, 1970; Zhang, 2003). Η διατήρηση των διπλασιασμένων γονιδίων στο γονιδίωμα και η μερική λειτουργική χαλάρωση που προκαλείται από την απώλεια των προγονικών λειτουργιών παρέχουν στη συνέχεια την ευκαιρία για ωφέλιμες μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε νέες λειτουργίες, δηλαδή ταχεία SF σε συνδυασμό με παρατεταμένη NF. Από τα τελικά αποτελέσματα από ένα μεγάλο ποσοστό διπλασιασμένων γονιδίων υποστηρίζεται η παραπάνω άποψη και προτείνεται το μοντέλο SNF (Subneofunctionalization), ταχεία διαφοροποίηση της λειτουργίας συνοδευόμενη από παρατεταμένη και σημαντική ανάπτυξη μιας νέας λειτουργίας (He & Zhang, 2005).

### **Αμοιβαία Απώλεια Γονιδίου (reciprocal gene loss)**

Είναι πιθανό, ο διαφοροποιημένος διπλασιασμός των γονιδίων και η ψευδογένεση σε γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς προκαλεί αναπαραγωγική απομόνωση και ειδογένεση (Lynch, 2007a). Ωστόσο, μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1990, όταν προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν πολλές αλληλουχίες γονιδιώματος, αποδείχθηκε σαφώς η επικράτηση και η σημασία του διπλασιασμού γονιδίων. Μέσω της ανάλυσης του γονιδιώματος, της γενετικής πληθυσμών και μοριακών πειραματισμών, έχει σημειωθεί ταχεία πρόοδος στην αποκάλυψη των μηχανισμών με τους οποίους διπλασιασμένα γονίδια διαφοροποιούνται στη λειτουργία και συμβάλλουν στην εξέλιξη (Lynch & Conery, 2001; Zhang 2003). Οι

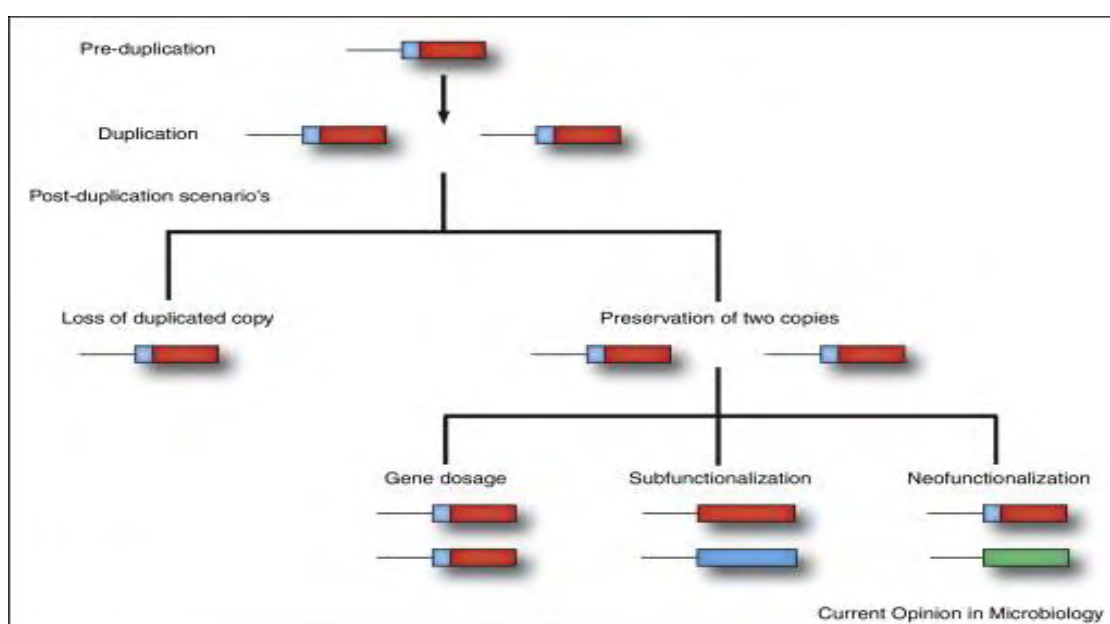
διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος διευκολύνουν άμεσα την ειδογένεση μέσω της αμοιβαίας απώλειας γονιδίου (reciprocal gene loss). Η αμοιβαία απώλεια γονιδίου (reciprocal gene loss) των δεκάδων χιλιάδων γονιδίων και ρυθμιστικών RNAs που παράγονται από τον διπλασιασμό του γονιδιώματος διευκολύνει τη δημιουργία ειδογένεσης (Lynch & Force, 2000). Εάν η αμοιβαία απώλεια γονιδίου των διπλασιασμένων γονιδίων συνεχίσει με το χρόνο, γεγονότα ειδογένεσης θα συμβαίνουν. Υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν ότι συνέβη αμοιβαία απώλεια γονιδίου στη γενεαλογία των τελεοστέων. Έχει βρεθεί ότι το 8% των γονιδιακών τόπων του είδους *Tetraodon nigroviridis* και του *Danio rerio* υπέστησαν αμοιβαία απώλεια γονιδίου (Semon & Wolfe, 2007).

### **Υπόθεση Ισορροπίας Γονιδίου**

Μετά από έναν διπλασιασμό του γονιδιώματος, το διπλασιασμένο γονίδιο θα βιώσει ένα από τα αποτελέσματα κατά την διάρκεια του διπλασιασμού, είτε θα διατηρηθεί είτε θα χαθεί το ένα αντίγραφο. Η Υπόθεση της ισορροπίας των γονιδίων (Gene balance hypothesis) προβλέπει την τύχη των πυρηνικών γονιδίων που έχουν προκύψει από διπλασιασμούς που αφορούν όλο το γονιδίωμα και διπλασιασμούς μικρότερης κλίμακας. Η Υπόθεση ισορροπίας γονιδίων προβλέπει ότι μια ανισορροπία στη συγκέντρωση πρωτεϊνικών υπομονάδων σε ένα μακρομοριακό σύμπλεγμα ή μεταξύ πρωτεϊνών με αντίθετες λειτουργίες σε ένα δίκτυο μεταγραφής ή σηματοδότησης μπορεί είτε να οδηγήσει σε μειωμένη αρμοστικότητα ή και θνησιμότητα. Η διατήρηση της σωστής πρωτεΐνης και της ισορροπίας στη διαδικασία της μεταγραφής είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας. Για παράδειγμα, μεγάλη συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης που είναι συνδεδεμένη με το πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο πιθανώς θα είχε ως αποτέλεσμα μεγάλες αρνητικές πλειοτροπικές επιδράσεις. Αυτή η υπόθεση υποστηριζόμενη από την ανάλυση των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτών παρέχει τη βάση για την κατανόηση της διατήρησης αντιγράφων. Η παραπάνω υπόθεση παρέχει επίσης έναν καλά υποστηριζόμενο μηχανισμό για να εξηγήσει τη σημαντική υπερ-διατήρηση γονιδίων με συγκεκριμένες λειτουργίες. Οι δύο εναλλακτικές υποθέσεις [η διαφοροποίηση της λειτουργίας (Subfunctionalization)



και η ανάπτυξη μιας νέας λειτουργίας (Neofunctionalization)] προβλέπουν ότι οποιοδήποτε γονίδιο μπορεί να διατηρηθεί μετά από οποιοδήποτε είδος διπλασιασμού. Με άλλα λόγια, αυτές οι υποθέσεις δεν κάνουν καμία προβλέψη μεταξύ της γονιδιακής λειτουργίας και της συχνότητας διατήρησης μετά τον διπλασιασμό. Αυτές εμφανίζονται σε μεγάλο βαθμό αφότου θα γονίδια έχουν διατηρηθεί διπλασιασμένα λόγω του φαινομένου της δόσης (dosage effect; Edger & Pires, 2009; Freeling, 2009). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται τα πιθανά αποτελέσματα από τον διπλασιασμό (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1. Πιθανές τύχες των διπλασιασμένων γονιδίων.** Οι διαφορετικές προγονικές λειτουργίες χρωματίζονται με κόκκινο και γαλάζιο, ενώ με πράσινο μια νέα λειτουργία (Voordeckers & Verstrepen, 2015)

### 1.1.5 Πρώτος και Δεύτερος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στα Σπονδυλωτά

Ο Ohno στο περίφημο βιβλίο του που κυκλοφόρησε το 1970 προώθησε την ιδέα ότι τα Σπονδυλωτά υποβλήθηκαν σε 2 γύρους διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιωμάτων τους. Ο κανόνας 1-2-4 είναι το πλέον επικρατέστερο μοντέλο για να εξηγήσει την εξέλιξη των γονιδιακών οικογενειών και του γονιδιώματος γενικότερα. Με βάση αυτό το μοντέλο, οι δύο γύροι του διπλασιασμού ολόκληρου του

γονιδιώματος συνέβησαν νωρίς στην εξέλιξη των Δευτεροστομίων (Meyer & Van de Peer, 2005). Μέχρι πρόσφατα, η πιο δημοφιλής εκδοχή της υπόθεσης των δύο γύρων διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος ήταν μετά την εμφάνιση των Κεφαλοχορδωτών και πριν την εξάπλωση των Γναθοστομάτων. Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία έχουν αποδείξει ότι τα Ουροχορδωτά είναι πιο συγγενικά με τα Σπονδυλωτά απ'ότι τα Κεφαλοχορδωτά (Delsuc et al., 2006; Bourlat et al., 2006). Και έτσι η σύγχρονη έκδοση της υπόθεσης θεωρεί ότι οι διπλασιασμοί συνέβησαν μετά την εμφάνιση των Ουροχορδωτών. Τα Άγναθα, τα οποία αντιπροσωπεύονται από τους Μυξίνους και τους Κυκλόστομους καταλαμβάνουν μια ενδιάμεση φυλογενετική θέση μεταξύ των Ουροχορδωτών και των Γναθοστομάτων. Οι πιο πρόσφατες εκδοχές των υποθέσεων του πρώτου γύρου(1R) και του δεύτερου γύρου(2R) τοποθετούν τον πρώτο στη συμβολή του κοινού προγόνου των Γναθοστομάτων και των Άγναθων, ενώ ο δεύτερος γύρος στον πρόγονο των Γναθοστομάτων. Τα Γναθοστόματα υποβλήθηκαν σε δύο γύρους γεγονότων τετραπλοειδίας. Ο ακριβής χρόνος αυτών των γεγονότων παραμένει ασαφής, αλλά η συστηματική μελέτη της ομάδας των γονιδίων *Hox* έδωσε μια πιο ακριβή εκτίμηση.

Το πρώτο γεγονός τετραπλοειδίας διαχώρισε τα Κεφαλοχορδωτα από τα Άγναθα. Ο Αμφίοξος που ανήκει στα Κεφαλοχορδωτά εξακολουθεί να διαθέτει ένα γονίδιο από την ομάδα των *Hox* γονιδίων, ενώ οι Κυκλόστομοι διαθέτουν δύο ή τρία ανεξάρτητα σετ από την ομάδα των *Hox* γονιδίων.

Το δεύτερο γεγονός τετραπλοειδίας συνέβη μέσα στα τετράποδα. Συνεπώς, όλα τα Γναθοστόματα που εξετάστηκαν, από τα ψάρια μέχρι τον άνθρωπο, διαθέτουν τουλάχιστον 4 ξεχωριστες ομάδες *Hox* γονιδίων. Επομένως, το δεύτερο γεγονός συνέπεσε με την ανάπτυξη των γνάθων από το δεύτερο βραγχιακό τόξο, το οποίο έλαβε χώρα στην Ορδοβίκια περίοδο (485.4–443.8 εκατομμύρια χρόνια πριν) (Οηνο, 1999). Η σύγκριση των κυτταρογενετικών δεδομένων και των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ άγναθων και γναθοστομάτων φαίνεται να υποστηρίζει την υπόθεση ότι οι 1R και 2R εμφανίστηκαν πριν από την εξελικτική απόκλιση των γναθοστομάτων και των άγναθων. Το συμβάν του 1R εμφανίζει ξεκάθαρα την απόκλιση των σπονδυλωτών, του Αμφίοξου και των Ουροχορδωτών, αλλά ο χρόνος

που συνέβη ο δεύτερος διπλασιασμός του γονιδιώματος (2R) σε σχέση με την απόκλιση των κυκλόστομων και των γναθόστομων παραμένει ασαφής. Επίσης, είναι πιθανό οι 2 γύροι διπλασιασμού να συνέβησαν στις αρχικές γενεαλογίες των σπονδυλωτών ή τα επιπλέον γονίδια των κυκλοστόμων να προέκυψαν από ανεξάρτητο διπλασιασμό ή από το συνδυσμό κοινών και ανεξάρτητων διπλασιασμών (Caruto Barucchi et al., 2013). Μαζί με τις ομάδες των *Hox* γονιδίων υπάρχουν κι άλλα παραδείγματα παράλογων γονιδίων ή περιοχών που δημιουργήθηκαν στην αρχή της εξελικτικής πορείας των σπονδυλωτών (Vanderpoele et al., 2004; McLysaght et al., 2002; Gu et al., 2002).

#### **1.1.6 Τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στους Τελεοστέους**

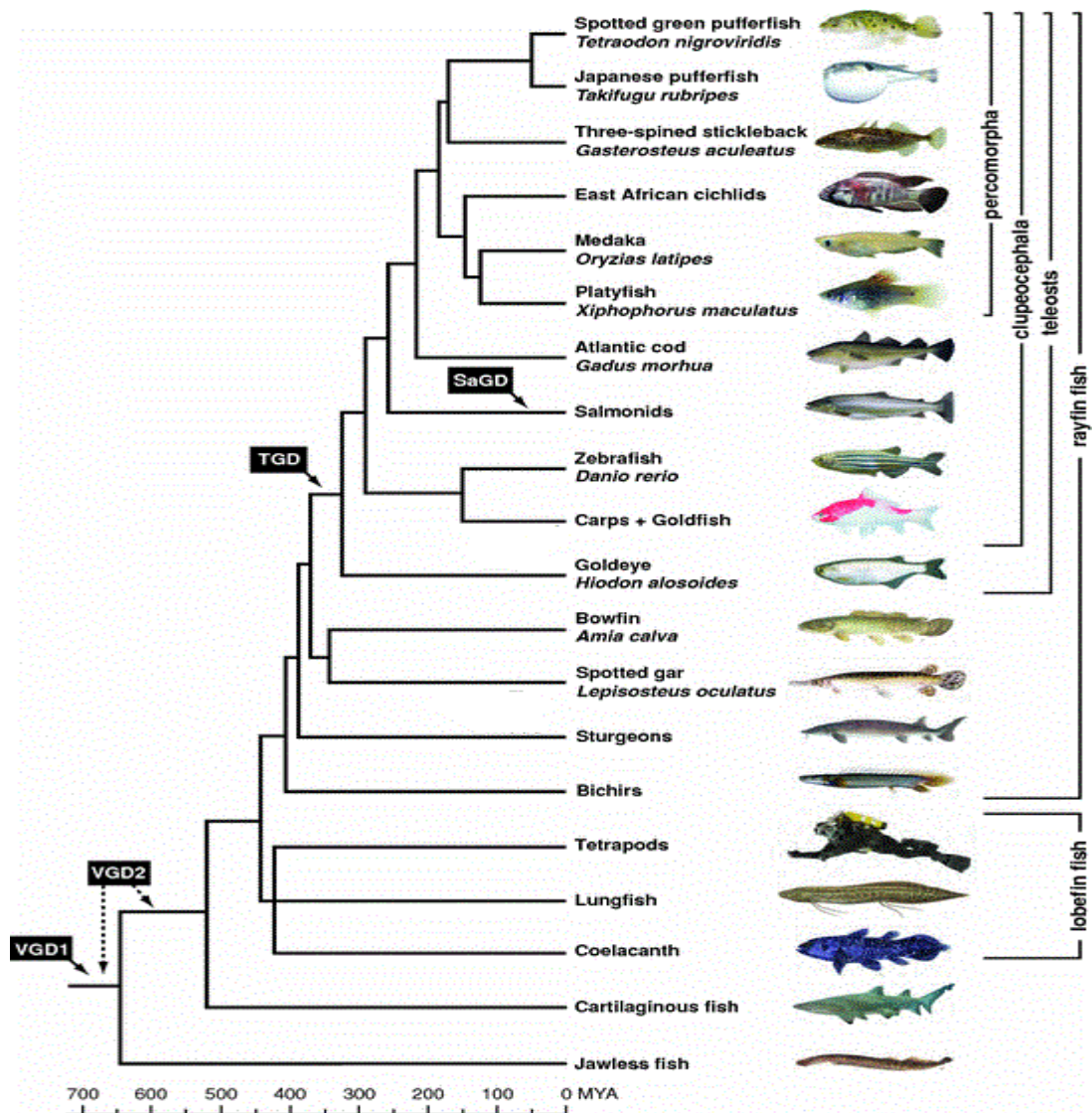
Οι Τελεόστεοι ανήκουν στη μεγάλη ομοταξία των Οστεϊχθύων στην οποία και υπάγονται οι Ακτινοπτερύγιοι. Από μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι πολλά ψάρια μπορεί να έχουν ακόμη περισσότερα γονίδια από αυτά των ανθρώπων και έρευνες δείχνουν ότι παρατηρήθηκε επιπλέον διπλασιασμός γονιδιώματος στους Τελεόστεους, δηλαδή την προέκταση του κανόνα 1-2-4 σε 1-2-4-8 (Meyer & Schartl, 1999; Wittbrodt et al., 1998; Aparicio et al., 2002). Η διατήρηση μεγάλων εκτάσεων από σειρές γονιδίων μέσα στη γενεαλογία των Τελεοστέων και η ανίχνευση συντηρημένων συνταινικών περιοχών (μεγάλες χρωμοσωματικές περιοχές που έχουν συντηρηθεί μεταξύ των οργανισμών) στις ομάδες των *Hox* γονιδίων και σε άλλα γονίδια στους Τελεόστεους θεωρήθηκε ως ισχυρή απόδειξη για τον επιπλέον διπλασιασμό του γονιδιώματος που συνέβη στους Τελεόστεους. Από μελέτες ταυτοποίησης διπλασιασμένων γονιδίων στο *Takifugu rubripes* υπολογίστηκε ότι ο τρίτος γύρος διπλασιασμού συνέβη 350-320 εκατομύρια χρόνια πριν. Οι πιο πειστικές αποδείξεις για τον επιπλέον διπλασιασμό στους Τελεόστεους προέκυψαν από τις συγκριτικές αναλύσεις μεταξύ της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *Tetraodon* με αυτή του ανθρώπου. Ο Jallion και οι συνεργάτες του (2004) συνέκριναν την κατανομή των γονιδίων στα χρωμοσώματα του *Tetraodon* με αυτά του ανθρώπου και διαπίστωσαν ότι πολλές ομάδες γονιδίων που παραμένουν συνδεδεμένες, με την ίδια σειρά, σε διαφορετικά χρωμοσώματα του ανθρώπου (γονιδιακές γειτονιές ή αλλιώς synteny) βρέθηκαν εις διπλούν σε δύο διαφορετικά

χρωμοσώματα του *Tetraodon* (Glasauer & Neuhauss, 2014; Jailon et al., 2004). Η χρονολόγηση του 3R αποδεικνύει ότι ο διπλασιασμός του γονιδιώματος στα ψάρια μπορεί να σχετίζεται τόσο με την αύξηση του αριθμού των ειδών όσο και με την βιοποικιλότητα (Εικόνα 2). Ο χρόνος που συνέβη το φαινόμενο του τρίτου γύρου διπλασιασμού, που έπεται της διαφοροποίησης των μη Τελεοστέων, δηλαδή βασικών-πρώιμων Ακτινοπτερυγίων που αποτελούνται από 44 είδη και ανήκουν σε 5 οικογένειες και προηγείται της προέλευσης των Τελεοστέων, παρέχει περαιτέρω αποδείξεις για την σύνδεση μεταξύ του 3R και της ποικιλίας των οργανισμών. Οι υποκατατάξεις Οστεογλωσσόμορφα (217 είδη) και Ελοπόμορφα (37 είδη) που αντιπροσωπεύουν την πρώτη γενιά που αποκλίνει μετά τον διπλασιασμό του γονιδιώματος εμφανίζουν κάπως μεγαλύτερο αριθμό ειδών συγκριτικά με τους βασικούς Ακτινοπτερυγίους. Η υπόθεση μιας σχέσης αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ του διπλασιασμού του γονιδιώματος που συνέβη στους τελεοστέους και της εκπληκτικά πλούσιας σε είδη κατηγορίας αυτών υποστηρίζεται από το γεγονός ότι «φτωχές» σε είδη γενεές διακλαδίζονται από την αρχική γενιά Ακτινοπτερυγίων πριν ο διπλασιασμός 3R οδηγήσει σε αρχικό διπλασιασμό του αριθμού των γονιδίων τους (Meyer & Van De Peer, 2005; Sato & Nishida, 2010). Οι φυλογενετικές αναλύσεις πολλών διπλασιασμένων γονιδίων στα γονιδιώματα, οι συγκριτικές αναλύσεις των χρωμοσωματικών τους θέσεων και τα εξελικτικά συμπεράσματα των προγονικών καρυότυπων επιβεβαιώνουν τους δύο γύρους των διπλασιασμών του γονιδιώματος στους προγόνους των σπονδυλωτών (Dehal & Boore, 2005; Panopoulou & Roustka, 2005; Nakatani et al., 2007; Putnam et al., 2008). Ολόκληρα τα γονιδιώματα διάφορων σπονδυλωτών, από το *Petromyzon marinus* μέχρι τον άνθρωπο, έχουν αλληλουχηθεί, συμπεριλαμβανομένων και πολλών Τελεοστέων. Αυτά τα δεδομένα αλληλουχιών και σχετικές βιολογικές πληροφορίες είναι ελεύθερα διαθέσιμα μέσω κάποιων βάσεων δεδομένων, όπως είναι η Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Ομάδες που υπάγονται στην ταξινομική ομάδα των Τελεοστέων είναι γνωστό ότι έχουν υποβληθεί σε έναν ή περισσότερους γύρους ανεξάρτητων διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος μετά από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού του γονιδιώματος (3R-WGD). Στους εκπροσώπους αυτούς περιλαμβάνονται οι εξής: Cyprinidae, Catostomidae, Cobitidae, Characiformes, Siluriformes, Salmoniformes, Diretmidae, Poeciliidae, και Channidae. Οι

περισσότεροι από αυτούς τους επιπρόσθετους διπλασιασμούς (Leggatt & Iwama, 2003) θεωρείται ότι απαντώνται στα γένη αυτών των παραπάνω ομάδων εκτός από την τάξη των Salmoniformes, στην οποία έχουμε ένα επιπρόσθετο τέταρτο γύρο διπλασιασμού (4R- WGD) που εμφανίζεται πιθανότατα σε όλα τα είδη αυτής της τάξης (Allendorf & Thorgaard, 1984; Moghadam et al., 2005).

### **1.1.7 Επιδράσεις των διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος στη γονιδιακή δόση**

Στα Σπονδυλωτά οι 2 γύροι διπλασιασμών ευνοούν την διατήρηση και την επέκταση των γονιδίων, όπως τον αριθμό των ομάδων *Hox* γονιδίων, αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς ινσουλίνης και πυρηνικούς υποδοχείς. Ρυθμιστές της ανάπτυξης και της μεταγραφής και μεταγωγείς του σήματος έχουν διατηρηθεί σε 2 αντίγραφα ύστερα από τον πρώτο και δεύτερο γύρο διπλασιασμού του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά (Van De Peer et al., 2009; Blomme et al., 2006) και από τον τρίτο γύρο που ακολούθησε στα ψάρια (Van De Peer et al., 2009; Blomme et al., 2006; Brunet et al., 2006). Επιπλέον, αυτές οι κατηγορίες ρυθμιστικών γονιδίων δεν μπορούν να επεκταθούν εύκολα μέσω διπλασιασμών που αφορούν μεμονωμένα γονίδια, γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία του διπλασιασμού του γονιδιώματος στην επέκταση του ρεπερτορίου των ρυθμιστικών γονιδίων. Οι δύο επιδράσεις των διπλασιασμών (γονιδίου-γονιδιώματος) μπορούν να εξηγηθούν από το φαινόμενο της ισορροπίας στη δόση γονιδίου (Van De Peer et al., 2009; Papp & Hurst, 2003; Birchler et al., 2005). Μετά το διπλασιασμό του γονιδιώματος, ολόκληρες λειτουργικές μονάδες διατηρούνται εγγενώς διπλασιασμένες μέσω μη προσαρμοστικών φαινομένων ισορροπίας στη γονιδιακή δόση (non-adaptive dosage balance effect) και έπειτα εξελίσσουν με προσαρμοστικό τρόπο καινούργιες λειτουργίες με αποτέλεσμα την αύξηση στην μορφολογική πολυπλοκότητα (Freeling & Thomas, 2006; Freeling, 2009).



Εικόνα 2. Αναπαράσταση της εξελικτικής πορείας με σημείο αναφοράς τη χρονολογία των γονιδιωματικών διπλασιασμών με δεδομένα από τη μελέτη (Satiamarga, 2009) και από τον ιστότοπο [www.timetree.org](http://www.timetree.org). VGD1 & VGD2 είναι οι πρώτοι δύο γύροι διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος που συνέβησαν στα Σπονδυλωτά, ενώ ο TGD είναι ο επιπλέον διπλασιασμός στους Τελεοστέους και ο SaGD υποδηλώνεται ο τέταρτος γύρος διπλασιασμού που συνέβη στα Σολομοειδή. Επιπλέον, παραμένει ασαφής, όπως αναπαριστάται εδώ αν ο δεύτερος γύρος διπλασιασμού συνέβη πριν τη διαφοροποίηση των Άγναθων (Soltis & Soltis, 2012).

## 1.2.ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

### 1.2.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι το απόγειο του ενεργειακού μεταβολισμού στους αερόβιους οργανισμούς. Όλα τα οξειδωτικά βήματα στην αποδόμηση των υδατανθράκων, των αμινοξέων, των λιπών συγκλίνουν σε αυτό το τελικό στάδιο της κυτταρικής αναπνοής, στο οποίο η ενέργεια της οξείδωσης προωθεί τη σύνθεση του ATP. Στους ευκαρυώτες, η οξειδωτική φωσφορυλίωση συμβαίνει στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια, τα οποία βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι τα οργανίδια στα οποία συντίθεται το μεγαλύτερο μέρος του ATP ενός κυττάρου. Κάθε μιτοχόνδριο περιβάλλεται από δύο πολύ εξειδικευμένες μεμβράνες, η μία γύρω από την άλλη, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του. Η εξωτερική και η εσωτερική μεμβράνη δημιουργούν δύο μιτοχονδριακά διαμερίσματα, έναν μεγάλο εσωτερικό χώρο, το στρώμα και τον διαμεμβρανικό χώρο.

Το 1961 ο Peter Mitchell διατύπωσε την υπόθεση ότι οι διαμεμβρανικές διαφορές στη συγκέντρωση των πρωτονίων είναι το απόθεμα της ενέργειας που εξάγεται από τις αντιδράσεις βιολογικής οξείδωσης. Αυτή η θεωρία ονομάστηκε χημειωσμοτική και αποτελεί θεμελιώδη αρχή της βιολογίας του εικοστού αιώνα. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αρχίζει με την είσοδο ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα ηλεκτρόνια αυτά προκύπτουν με την δράση δεϋδρογονασών, οι οποίες συλλέγουν ηλεκτρόνια από καταβολικές οδούς και τα διοχετεύουν σε οικουμενικούς δέκτες ηλεκτρονίων: νικοτιναμιδο- νουκλεοτίδια ( $\text{NAD}^+$  ή  $\text{NADP}^+$ ) ή φλαβινο-νουκλεοτίδια (FMN ή FAD).

Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση συμβαίνουν τρεις τύποι μεταφοράς ηλεκτρονίων :

- 1) άμεση μεταφορά, όπως κατά την αναγωγή του  $\text{Fe}^{3+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$ ,
- 2) μεταφορά υπό μορφή ατόμου υδρογόνου ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ),
- 3) μεταφορά υπό μορφή ιόντος υδριδίου ( $:\text{H}^-$ )

Εκτός από το NAD και τις φλαβοπρωτεΐνες, οι οποίες περιέχουν ένα σφιχτά συνδεδεμένο φλαβινο-νουκλεοτίδιο (FMN ή FAD) και άλλοι 3 τύποι μορίων παίζουν ρόλο στην μεταφορά των ηλεκτρονίων. Μία υδρόφοβη κινόνη και δύο διαφορετικοί τύποι σιδηρούχων πρωτεϊνών (κυτοχρώματα και σιδηροθειούχες πρωτεΐνες). Η ουβικινόνη, επίσης γνωστή ως συνένζυμο Q ή απλώς Q είναι μία λιποδιαλυτή βενζοκινόνη με μακριά αλυσίδα ισοπρενίου και αποτελεί τον μοναδικό μεταφορέα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που δεν είναι μέρος κάποιας πρωτεΐνης. Μπορεί και διακινεί αναγωγικά ισοδύναμα, και επειδή μεταφέρει τόσο ηλεκτρόνια όσο και πρωτόνια παίζει σημαντικό ρόλο στη σύζευξη της ροής των ηλεκτρονίων με τη μετακίνηση των πρωτονίων. Τα μιτοχόνδρια περιέχουν τρεις τάξεις κυτοχρωμάτων που ορίζονται ως a, b, c. Τα κυτοχρώματα a και b και ορισμένα c είναι εσωτερικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το κυτόχρωμα c αποτελεί εξαίρεση καθώς σχετίζεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την εξωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης.

Στις σιδηρο-θειούχες πρωτεΐνες (iron-sulfur proteins), ο σίδηρος δεν βρίσκεται στην αίμη αλλά αλληλεπιδρά με ανόργανα άτομα θείου. Συμμετέχουν σε μεταφορές μεμονωμένων ηλεκτρονίων, στις οποίες ένα άτομο σιδήρου του σιδηροθειούχου αθροίσματος υφίσταται αναγωγή ή οξείδωση (Nelson & Cox, 2007; Alberts et al., 2011).

### **1.2.2.ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ**

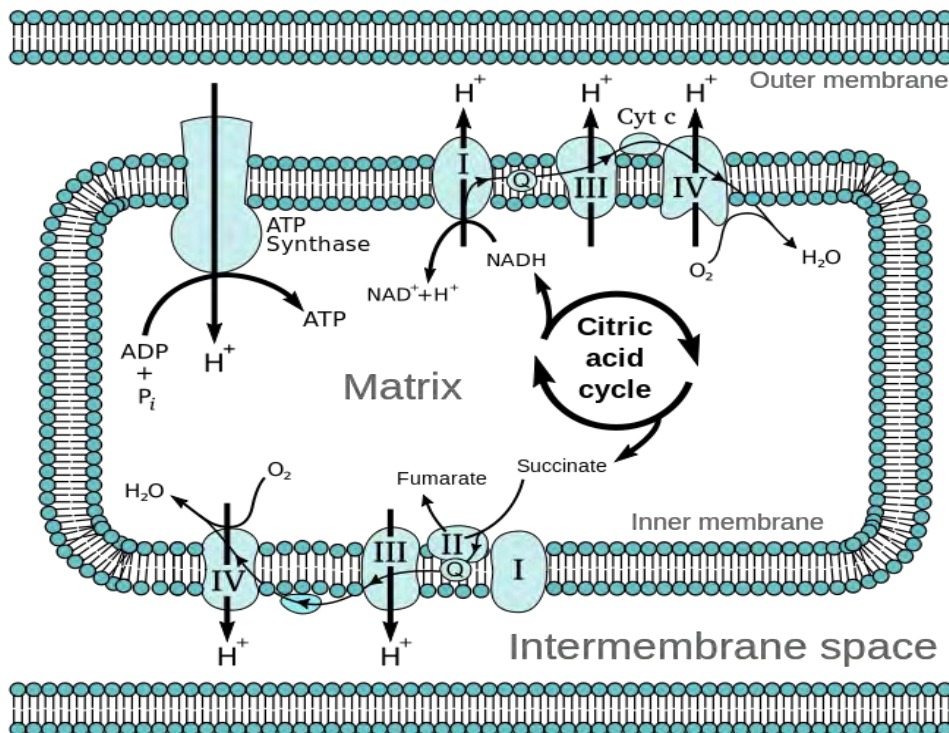
Η ανάπτυξη των αρχέγονων κυττάρων ίσως να βασίστηκε στην αποδόμηση με αναερόβια ζύμωση οργανικών μορίων που είχαν παραμείνει από γεωχημικές διεργασίες. Οι αντιδράσεις της ζύμωσης πραγματοποιούνται στο κυτταρόπλασμα και η ενέργεια που λαμβάνουν προέρχεται από τα πλούσια σ' ενέργεια μόρια της τροφής προς σχηματισμό ATP. Η απέκκριση των οργανικών οξέων φαίνεται ότι ελάττωσε το pH του περιβάλλοντος, και αυτό ευνόησε την επιβίωση κυττάρων τα οποία ανέπτυξαν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ικανές ν' αντλούν  $H^+$  έξω από το κυτταρόπλασμα. Έτσι, το κύτταρο απέφευγε τον κίνδυνο να γίνει πολύ όξινο. Μία από τις αντλίες αυτές πιθανόν χρησιμοποιούσε την ενέργεια της υδρόλυσης του ATP για να αποβάλλει  $H^+$  από το κύτταρο. Έτσι αυτή η αντλία θα μπορούσε να είναι πρόγονος της σύγχρονης συνθάσης του ATP. Με την ελάττωση των αποθεμάτων της



Γης σε ουσίες κατάλληλες για ζύμωση, κάποιοι οργανισμοί βρέθηκαν σε πλεονεκτική θέση λαθώς αντλούσαν  $H^+$  χωρίς περαιτέρω κατανάλωση ATP. Άρα, αποταμίευαν την μικρή ποσότητα ATP για άλλες κυτταρικές διεργασίες, εκτός της ζύμωσης. Έτσι, η έλλειψη τροφής ίσως οδήγησε στην ανάπτυξη των πρωτεϊνών μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτές προσέφεραν στα κύτταρα τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν τη μετακίνηση των ηλεκτρονίων μεταξύ μορίων με διαφορετικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό ως πηγή ενέργειας για τη μεταφορά  $H^+$  διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Με το πέρασ του χρόνου, ορισμένα βακτήρια ανέπτυξαν αποτελεσματικά συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων συζευγμένης με άντληση  $H^+$  και έτσι «αιχμαλώτιζαν» περισσότερη οξειδοαναγωγική ενέργεια απ'όσο χρειαζόταν για να διατηρήσουν το εσωτερικό pH τους. Αυτά τα κύτταρα πιθανόν ανέπτυξαν μεγάλες ηλεκτροχημικές βαθμιδώσεις πρωτονίων, τις οποίες μπορούσαν στη συνέχεια ν' αξιοποιήσουν για παραγωγή ATP. Η επάνοδος των  $H^+$  στο κύτταρο πιθανότατα γινόταν μέσω των προωθούμενων από το ATP αντλιών  $H^+$ . Συνεπώς, οι αντλίες λειτουργούσαν στην αντίθετη κατεύθυνση προς παραγωγή ATP. Με την εξέλιξη της μεμβρανικής διεργασίας της φωτοσύνθεσης, οι έτοιμες οργανικές χημικές ενώσεις δεν ήταν απαραίτητες για τους οργανισμούς. Έτσι, παρήγαγαν τα δικά τους οργανικά μόρια από αέριο  $CO_2$ . Το διάστημά μεταξύ της εμφάνισης βακτηρίων που διασπούσαν το νερό και απελευθέρωναν  $O_2$  κατά την φωτοσύνθεση και της συσσώρευσης  $O_2$  στην ατμόσφαιρα ήταν πάνω από 1 δισεκατομμύριο χρόνια. Η αντίδραση του αρχικά παραγόμενου  $O_2$  με τον άφθονο  $Fe^{2+}$  των ωκεανών οδήγησε στο σχηματισμό μεγάλων ποσοτήτων οξειδίων του σιδήρου με ταυτόχρονη απομάκρυνση οξυγόνου. Το τελευταίο με τη σειρά του άρχισε να αυξάνεται μετά την κατανάλωση του σιδήρου. Στην αερόβια αναπνοή η πλήρης οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος, που έχει παραχθεί κατά τη γλυκόλυση, γίνεται σε δύο στάδια: τον κύκλο του κιτρικού οξέος ή κύκλο του Krebs και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η αερόβια αναπνοή, λοιπόν, που βασίζεται στις μεμβράνες μάλλον αναπτύχθηκε σε απάντηση προς την αυξανόμενη συγκέντρωση  $O_2$  στην ατμόσφαιρα. Η έναρξη της ταχείας συσσώρευσης  $O_2$  άρχισε περίπου πριν από 2 δισεκατομμύρια χρόνια και συρρικνώθηκε λόγω εμφάνισης μη φωτοσυνθετικών οργανισμών (Alberts et al., 2011).

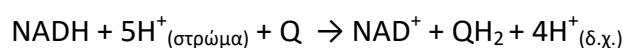
### 1.2.3 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, γνωστή επίσης και ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, διεκπεραιώνει την οξειδωτική φωσφορυλίωση και βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη σε πολλά αντίγραφα. Περιέχει πάνω από 40 πρωτεΐνες, από τις οποίες περίπου 15 εμπλέκονται άμεσα στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι περισσότερες είναι ενσωματωμένες στη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων και λειτουργούν μόνο όταν η μεμβράνη είναι ακέραιη. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατατάσσονται σε μεγάλα σύμπλοκα αναπνευστικών ενζύμων, καθένα από τα οποία περιέχει πολλαπλά αντίγραφα των ξεχωριστών πρωτεϊνών. Κάθε σύμπλοκο περιλαμβάνει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που το συγκρατούν στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα σύμπλοκα I και II καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη από δύο διαφορετικούς δότες ηλεκτρονίων, το NADH (Σύμπλοκο I) και το ηλεκτρικό (Σύμπλοκο II). Το σύμπλοκο III μεταφέρει ηλεκτρόνια από την ανηγμένη ουβικινόνη στο κυτόχρωμα c. Τέλος, το σύμπλοκο IV ολοκληρώνει την ακολουθία μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c στο O<sub>2</sub> (Εικόνα 3).



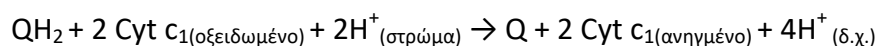
**Εικόνα 3. Αναπαράσταση και των 5 συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας (Fvasconcellos, 2007).**

Το σύμπλοκο I, γνωστό και ως οξειδοαναγωγή NADH:ουβικινόνης ή δεϋδρογονάση του NADH, αποτελείται από 42 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μεταξύ των οποίων μια φλαβοπρωτεΐνη που περιέχει FMN και τουλάχιστον έξι κέντρα Fe-S. Το Σύμπλοκο I αποτελεί μια αντλία πρωτονίων που προωθείται από την ενέργεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων και η αντίδραση που καταλύει έχει μεταφορικό χαρακτήρα: μεταφορά πρωτονίων από το στρώμα προς τον διαμεμβρανικό χώρο.



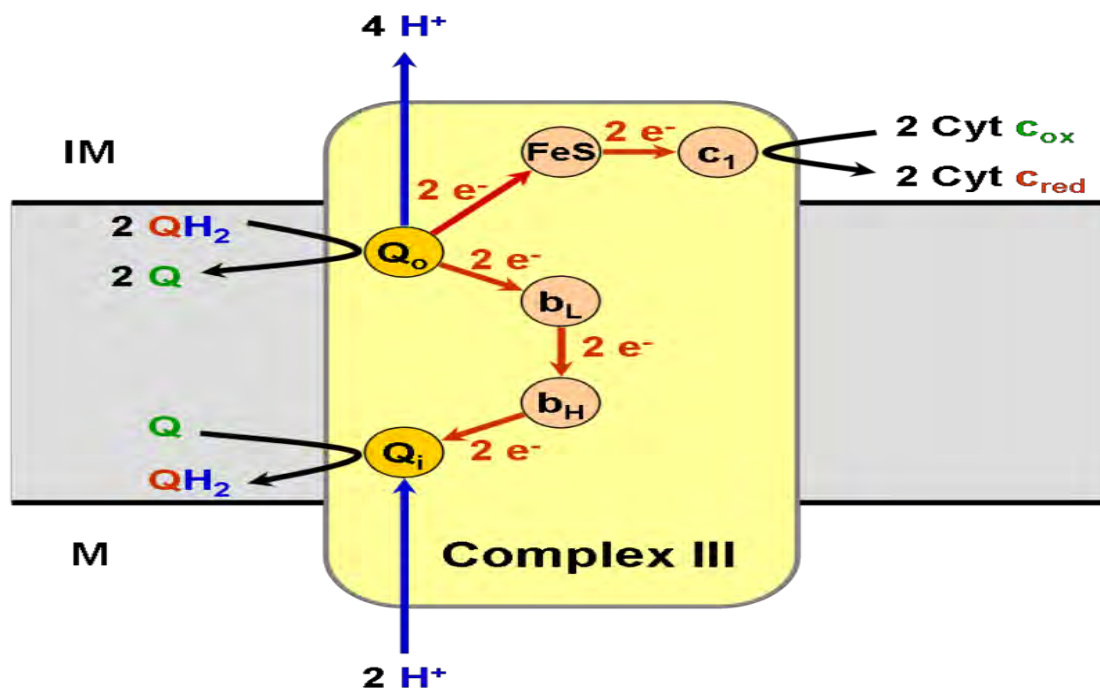
Η ουβικινόνη διαχέεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από το Σύμπλοκο I στο Σύμπλοκο II και οξειδώνεται με παράλληλη μετακίνηση  $\text{H}^+$  προς τα έξω. Το Σύμπλοκο II, ή αλλιώς δεϋδρογονάση του ηλεκτρικού είναι υπεύθυνη για την οξείδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό. Το ένζυμο περιέχει τρία διαφορετικά κέντρα σιδήρου-θείου και ένα μόριο ομοιοπολικά συνδεδεμένου FAD. Τα ηλεκτρόνια διέρχονται από το ηλεκτρικό διαμέσου του FAD και των κέντρων σιδήρου-θείου προτού εισέλθουν στην αλυσίδα των φορέων ηλεκτρονίων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και μεταφερθούν στην ουβικινόνη.

Το σύμπλοκο III, το οποίο είναι και γνωστό ως σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων  $\text{bc}_1$  ή αλλιώς οξειδοαναγωγή ουβικινόνης: κυτοχρώματος c, συνδέει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη ( $\text{QH}_2$ ) στο κυτόχρωμα c με την ταυτόχρονη μεταφορά πρωτονίων από το στρώμα στο διαμεμβρανικό χώρο. Η συνολική εξίσωση για τις οξειδοαναγωγικές αντιδρασεις είναι οι εξής:



*Κύκλος του συνενζύμου Q*

Ο κύκλος του συνενζύμου Q λαμβάνει χώρα στο Σύμπλοκο III (Εικόνα 4). Στο πρώτο ήμισυ του κύκλου, τα δύο  $e^-$  μιας προσδεδεμένης  $QH_2$  μεταφέρονται, ένα στο κυτόχρωμα c και ένα σε μια προσδεδεμένη Q σε μια δεύτερη θέση πρόσδεσης, ώστε να σχηματιστεί το ανιόν της ρίζας ημικινόνης. Η μόλις σχηματηθείσα Q δίσταται και εισέρχεται στη δεξαμενή Q. Στο δεύτερο μέρος αυτού του κύκλου, μια δεύτερη  $QH_2$ , προσφέρει τα ηλεκτρόνιά της στο Σύμπλοκο III, το ένα από τα δύο ηλεκτρόνια χρησιμοποιείται για την αναγωγή του ανιόντος ρίζας ημικινόνης σε  $QH_2$ , ενώ το άλλο μεταφέρεται σε ένα δεύτερο μόριο κυτοχρώματος c. Η δεύτερη μεταφορά ηλεκτρονίων έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη δύο πρωτονίων από τη μήτρα.



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου III και οι αντιδράσεις που περιλαμβάνει ο κύκλος Q (Hoffmeier, 2006).

Ο κύκλος Q «γεφυρώνει» την ουβικινόνη που είναι φορέας δύο ηλεκτρονίων με τους φορείς μεμονομένων ηλεκτρονίων και υποδηλώνει τη στοιχειομετρία των τεσσάρων πρωτονίων ανά ζεύγος ηλεκτρονίων που διέρχονται διαμέσου του Συμπλόκου III προς το κυτόχρωμα c. Το καθαρό αποτέλεσμα της μεταφοράς είναι η

οξειδωση της QH<sub>2</sub> σε Q ενώ παράλληλα ανάγονται δύο μόρια κυτοχρώματος c. Το κυτόχρωμα c είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη του διαμεμβρανικού χώρου. Μόλις παραλάβει ένα ηλεκτρόνιο από το σύμπλοκο III στην προσθετική ομάδα της αίμης, το κυτόχρωμα c μετακινείται στο Σύμπλοκο IV για να προσφέρει το ηλεκτρόνιο σ' ένα διπύρρο κέντρο χαλκού (Nelson & Cox, 2007)

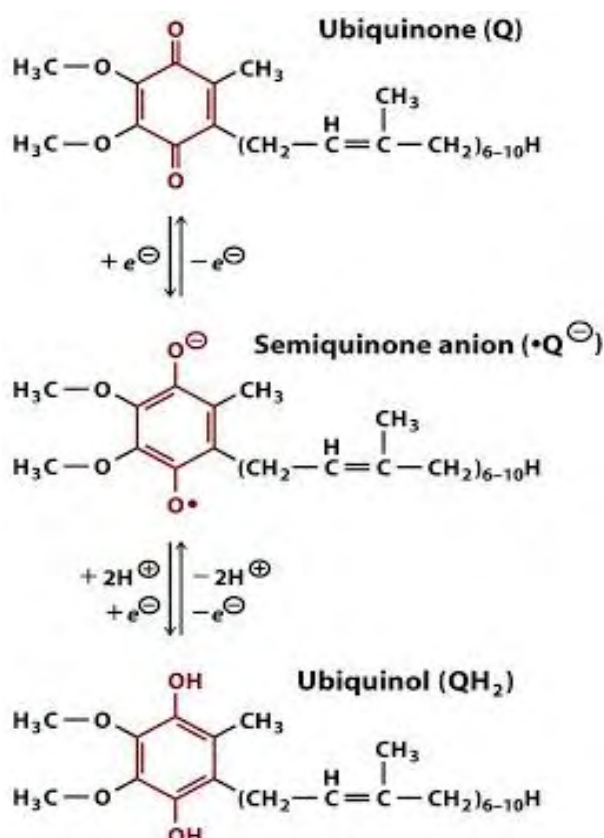
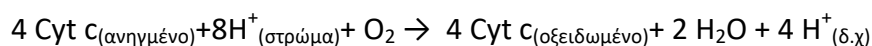


Figure 7-31 Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

**Εικόνα 5:** Οξείδωση της Ουβικινόλης ( QH<sub>2</sub>) σε Ουβικινόνη ( Q) μέσω του κύκλου Q (Van Holde et al., 2006).

#### 1.2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ-ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ III

Το ένζυμο οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (κυτόχρωμα bc<sub>1</sub>) είναι ομοδιμερές με 11 διακριτές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Ο λειτουργικός «πυρήνας» ενός μονομερούς αποτελείται από τρεις υπομονάδες: 8 διαμεμβρανικές έλικες του κυτοχρώματος b, με δύο μόρια αίμης, μια σιδηροθειούχο πρωτεΐνη (Rieske) με

κέντρα 2Fe- 2S και το κυτόχρωμα  $c_1$  με μια προσθετική ομάδα αίμης. Στη διμερή λειτουργική μονάδα το κυτόχρωμα  $c_1$  και η σιδηροθειούχος πρωτεΐνη Rieske προεξέχουν προς το διαμεμβρανικό χώρο και μπορούν να αλληλεπιδράσουν εκεί με το κυτόχρωμα  $c$ . Το κυτόχρωμα  $c_1$  και η σιδηροθειούχος πρωτεΐνη Rieske βρίσκονται αγκυροβολημένες στην εσωτερική μεμβράνη μέσω των διαμεμβρανικών περιοχών τους, εκθέτοντας με αυτό τον τρόπο τις περιοχές σφαιρίνης στον διαμεμβρανικό χώρο. Εκτός από αυτό τον λειτουργικό «πυρήνα» ένα ευκαρυωτικό σύμπλοκο  $bc_1$  περιέχει επτά ή οκτώ προσθετικές πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν προσθετικές ομάδες και δεν συμμετέχουν άμεσα στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην άντληση πρωτονίων. Αυτές οι υπομονάδες αποτελούνται από τις δύο βασικές πρωτεΐνες, Cor1 και Cor2, και τις υπεράριθμες υπομονάδες Qcr6-Qcr10. Ανάμεσα στα σύμπλοκα  $bc_1$  στον άνθρωπο και στη ζύμη παρατηρούνται δομικές ομοιότητες και έτσι η ζύμη καθίσταται βασικό μοντέλο για το πώς γίνεται η συγκρότηση του συμπλόκου στους ευκαρυώτες. Το κυτόχρωμα  $b$  κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό DNA σε όλους τους ευκαρυώτες. Τα δύο μόρια αίμης  $b_H$  και  $b_L$  αντίστοιχα, προσδέονται μη-ομοιοπολικά στο κυτόχρωμα  $b$  με τα συντηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης που βρίσκονται στην δεύτερη και στην τέταρτη διαμεμβρανική ελικάση με τη βοήθεια δεσμών υδρογόνου. Η αίμη  $b_L$  τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη, ενώ η αίμη  $b_H$  βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της μήτρας του κυτοχρώματος  $b$  σε μια στιβάδα διάλυσης, δηλαδή ένα οργανωμένο κέλυφος με μόρια ύδατος, το οποίο είναι προσβάσιμο από τις Cor1, Cor2 και Qcr8, όπου εκεί μπορεί η ίδια να προσλάβει ηλεκτρόνια από την αίμη  $b_L$  για την ανασύσταση του κύκλου Q. Οι Cor1 και Cor2 βρίσκονται τοποθετημένες μέσα στην μιτοχονδριακή μήτρα με την Cor1 να βρίσκεται δεσμευμένη στην εσωτερική μεμβράνη. Η Cor1 μοιράζεται μια διασύνδεση με το κυτόχρωμα  $b$  στο ίδιο μονομερές. Η Cor2 αγκυροβολείται στο σύμπλεγμα μόνο μέσω της ένωσης με την Cor1 στο ίδιο μονομερές και μέσω της ένωσής της με την πρωτεΐνη Qcr7 που βρίσκεται στο άλλο μονομερές. Η Qcr7 βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Επίσης, το  $cyt1$  αποτελεί τη μοναδική υπομονάδα, όπου το C- τελικό άκρο βρίσκεται στην μήτρα, ενώ το N-τελικό άκρο στον διαμεμβρανικό χώρο. Η Cyt1 αλληλεπιδρά τόσο με το κυτόχρωμα  $c$  όσο και με την πρωτεΐνη Qcr6. Η Qcr6 είναι μία πολύ όξινη πρωτεΐνη και αυτό μπορεί να συμβάλλει σε λειτουργικούς ρόλους για το σύμπλοκο, όπως είναι η

διατήρηση του περιβάλλοντος της αίμης της Cyt1 και μια πιο αποτελεσματική σύνδεση με το κυτόχρωμα c. Απουσία αυτής το σύμπλοκο παρουσιάζει μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα, αλλά μπορεί να σχηματιστεί αυτό καθ' αυτό, καθώς και να σχηματίσει υπερσύμπλοκο με το Σύμπλοκο IV. Η πρώιμη σιδηροθειούχος πρωτεΐνη Rieske φέρει μία N-τελική αλληλουχία στόχευσης στο μιτοχόνδριο που έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη μεταφορά στη μήτρα, παρά την τελική τοποθέτησή της στην εσωτερική μεμβράνη και μία C-τελική περιοχή που βρίσκεται στον διαμεμβρανικό χώρο. Με την αρχική εισαγωγή της στη μήτρα έχουμε άμεση πρωτεόλυση κάποιων αμινοξέων της. Αυτή η πρωτεΐνη Rieske (SU5) που προκύπτει στα θηλαστικά διαχωρίζεται σε ένα μόνο βήμα και μετατρέπεται στην SU9 που συμπεριλαμβάνεται στο ώριμο πλέον σύμπλοκο. Η καρβοξυτελική περιοχή που είναι υψηλά συντηρημένη περιέχει δύο κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν δισουλφιδικό δεσμό που είναι υπεύθυνος για τη σταθεροποίηση της γέφυρας σιδήρου-θείου. Η ευκαμψία στη διαμόρφωση του καρβοξυτελικού άκρου, του επιτρέπει να κινείται μεταξύ των κυτοχρωμάτων b και c<sub>1</sub> κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Μεταλλάξεις της καρβοξυτελικής περιοχής περιορίζουν την καταλυτική δραστηριότητα. Επίσης στην καρβοξυτελική περιοχή, η οποία είναι υδρόφιλη φιλοξενεί ένα σύμπλεγμα 2 ατόμων σιδήρου- 2 ατόμων θείου με υψηλό δυναμικό. Η πρωτεΐνη αυτή λαμβάνει ένα από τα δύο ηλεκτρόνια από την οξειδωση ενός μορίου ουβικινόλης και το μεταφέρει στη CYC1 (αντίστοιχα CYT1 στη ζύμη). Για να συμβεί αυτή η αντίδραση πρέπει η Rieske να κινηθεί προς τη CYC1 σε ένα από τα δύο μονομερή του συμπλόκου, ενώ η αμινοτελική διαμεμβρανική της περιοχή πρέπει να γειτνιάζει με την MT-CYB (αντίστοιχα COB στη ζύμη). Αυτές οι αλλαγές στη διαμόρφωση παίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση του διμερισμού του συμπλόκου. Οι Qcr8, Qcr9, Qcr10 είναι μικρές υπομονάδες με μία διαμεμβρανική περιοχή και βρίσκονται στην περιφέρεια του συμπλόκου. Το Qcr8 συσχετίζεται με το κυτόχρωμα b και το σταθεροποιεί. Το Qcr9 είναι απαραίτητο για το σχηματισμό διμερούς, ενώ το Qcr10 σχετίζεται χαλαρά με το σύμπλοκο. Ενδεικτικά στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται τα ονόματα των διάφορων υπομονάδων στα θηλαστικά και στο σαγχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν και θα χρησιμοποιηθούν στο παρακάτω κείμενο, καθώς και τα γονίδια από τα οποία προκύπτουν (Πίνακας 1).

### 1.2.5 Συναρμολόγηση του Συμπλόκου III

Η συγκρότηση του συμπλέγματος III ξεκινά με την ενεργοποίηση της μετάφρασης και τη σταθεροποίηση του κυτοχρώματος b (MTCYB) μέσω των παραγόντων συναρμολόγησης UQCRC1 και UQCRC2 που το μεταφέρουν σε ένα ενδιάμεσο σύμπλεγμα που περιέχει τις υπομονάδες UQCRQ και UQCRB (Εικόνα 6). Οι δύο παράγοντες συναρμολόγησης απελευθερώνονται μετά τη σύνδεση του κυτοχρώματος b σε αυτές τις υπομονάδες και μπορούν να συνδεθούν και πάλι στα ριβοσώματα των μιτοχονδρίων και να δράσουν ως ενεργοποιητές της μετάφρασης του. Το σύμπλοκο MTCYB-UQCRQ-UQCRB μπορεί τώρα να συνδεθεί με το σύμπλεγμα που περιέχει τα CYC1, UQCRH και UQCR10 και παράλληλα με το σύμπλεγμα που φέρει τις υπομονάδες UQCRC1 και UQCRC2. Με την ένωση αυτών 8 υπομονάδων έχουμε και ταυτόχρονο διμερισμό. Η υπομονάδα UQCRFS1 δεσμεύεται και σταθεροποιείται από τον παράγοντα συναρμολόγησης LYRM7, προτού ενσωματωθεί στο σύμπλοκο με τη βοήθεια του παράγοντα συναρμολόγησης BCS1L που το μεταφέρει στην εσωτερική μεμβράνη, αφού αποκτήσει τα κέντρα 2Fe-2S.

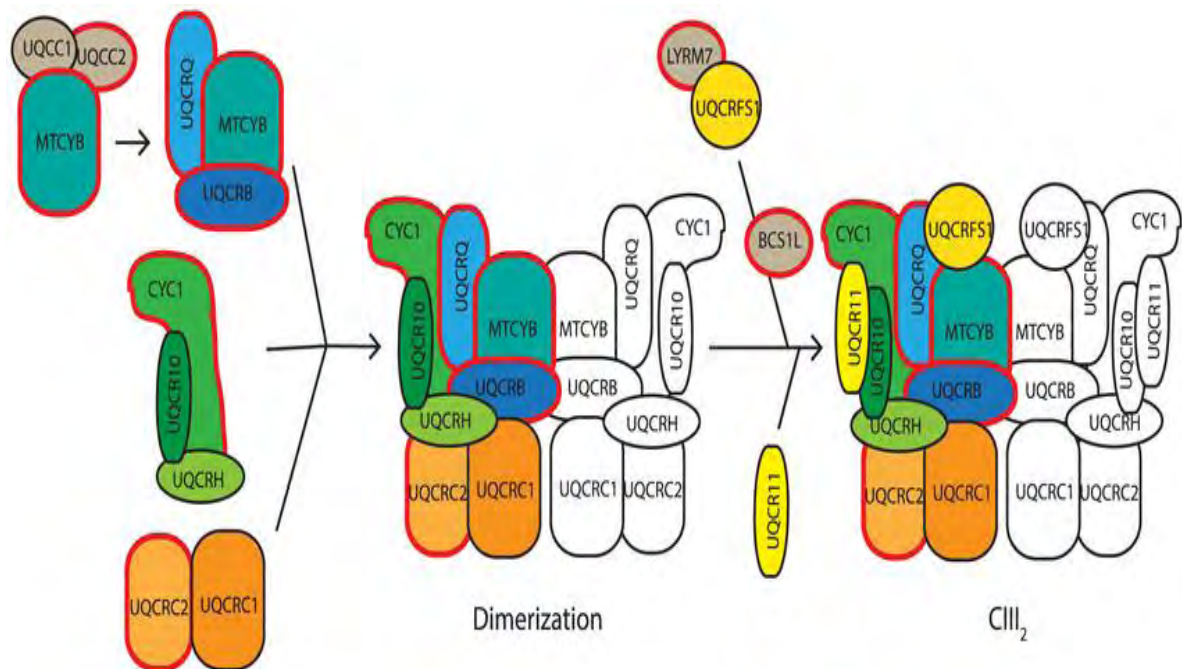
**Πίνακας 1.** Σύγκριση της ονοματολογίας των υπομονάδων του συμπλόκου III από αποτελέσματα που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων PDB

ΟΝΟΜΑ	ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ	<i>S.cerevisiae</i>
Cor 1	SU1 (UQCRC1)	Qcr1 (COR1)
Cor 2	SU2 (UQCRC2)	Qcr2 (COR2)
Cyt b	SU3 (MT-CYB)	Qcr3 (COB)
Cyt c	SU4 (CYC1)	Qcr4 (CYT1)
Σιδηροθειούχος Rieske	SU5 (UQCRFS1)	Qcr5 (RIP1)
Σιδηροθειούχος Rieske	SU6 (UQCRQ)	Qcr7 (QCR7)
Σιδηροθειούχος Rieske	SU7 (UQCRB)	Qcr8 (QCR8)
Όξινη πρωτεΐνη με	SU8 (UQCRH)	Qcr6 (QCR6)



περιοχή άρθρωσης		
Όξινη πρωτεΐνη με περιοχή άρθρωσης	SU10 (UQCR10)	Qcr9 (QCR9)
Όξινη πρωτεΐνη με περιοχή άρθρωσης	SU11 (UQCR11)	Qcr10 (QCR10)

Μεταλλάξεις στο BCS1L είναι η συχνότερη αιτία των μιτοχονδριακών νόσων που σχετίζονται με την ανεπάρκεια του συμπλόκου. Στην τελική ευθεία συνδέεται η μικρότερη υπομονάδα απ' όλες, η UQCR11. Η ενσωμάτωση της UQCRFS1 θεωρείται ως το κρίσιμο στάδιο ωρίμανσης του συμπλόκου επειδή τότε το ένζυμο καθίσταται καταλυτικά ενεργό (Smith et al., 2012; Tucker et al., 2013; Fernandez- Vizzara et al., 2009).



**Εικόνα 6. Προτεινόμενο μοντέλο συναρμολόγησης.** Με γκρι διακρίνονται οι παράγοντες συναρμολόγησης, χωρίς χρώμα παρουσιάζονται οι υπομονάδες που αποτελούν το δεύτερο μονομερές. Ενώ με τα υπόλοιπα χρώματα παρουσιάζονται οι

υπομονάδες που συγκροτούν το σύμπλοκο, με τις υπομονάδες που σχετίζονται με την ανεπάρκεια του συμπλόκου λόγω μεταλλάξεων να περικλείονται με κόκκινο (Tucker et al., 2013).

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συγκριτική ανάλυση γονιδιωμάτων μιας σειράς ζωικών ειδών με επίκεντρο τα γονίδια που κωδικοποιούν το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων  $bc_1$ . Τελεόστεοι και Τετράποδα αποτελούν το κέντρο ενδιαφέροντος, μαζί με είδη που σχετίζονται φυλογενετικά. Το επιστημονικό ερώτημα που αναδύεται από αυτή την εργασία είναι το κατά πόσο οι διπλασιασμοί που αφορούν ολόκληρο το γονιδίωμα επιδρούν στη γονιδιακή δομή του συμπλόκου και πώς μπορεί να σχετίζονται με τη συναρμολόγηση και τη λειτουργία του, αλλά και η διερεύνηση του αποτυπώματος του τρίτου γύρου διπλασιασμού του γονιδιώματος όσων αφορά το μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στους Τελεόστεους.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται η συγκριτική γονιδιωματική ως ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη εξελικτικών αλλαγών μεταξύ των οργανισμών, συμβάλλοντας στην ταυτοποίηση των γονιδίων που διατηρούνται ή είναι κοινά μεταξύ των ειδών, καθώς και γονίδια που δίνουν σε κάθε οργανισμό τα μοναδικά χαρακτηριστικά του. Μέσω της εύρεσης των ομολογιών μεταξύ των γονιδιωμάτων προσδιορίζεται αν δύο γονίδια σε δύο οργανισμούς είναι ορθόλογα (έχουν προκύψει δηλαδή με διπλασιασμό σε έναν κοινό πρόγονο και πιθανώς επιτελούν την ίδια λειτουργία) ή παράλογα (δεν υπάρχει άμεσος κοινός πρόγονος σε ένα προγενέστερο είδος, αλλά έχουν προκύψει από διπλασιασμό γονιδίου σε κάποιο πολύ παλιότερο είδος, και επιτελούν παρόμοια αλλά όχι ίδια λειτουργία).

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Είδη μελέτης

Για την πραγματοποίηση της συγκριτικής ανάλυσης επιλέχθηκαν διάφορα είδη με βάση την εξέλιξη των γονιδιωμάτων τους και την φυλογενετική τους θέση. Μελετήθηκαν κάποια είδη που ανήκουν σε υποσυνομοταξίες των Χορδωτών και πιο συγκεκριμένα στις υποσυνομοταξίες των Ουροχορδωτών και των Κρανιωτών. Τα Ασκίδια *Ciona intestinalis* και *Ciona savignyi*, που αποτελούν ομοταξία των Ουροχορδωτών προσφέρονται ως οργανισμοί μοντέλα για την κατανόηση της εξέλιξης της ανάπτυξης και της οργάνωσης του γονιδιώματος των χορδωτών και εδώ χρησιμοποιούνται ως εξωομάδες (outgroups) στις φυλογενετικές μελέτες λόγω του ότι δεν συμμετείχαν στους δύο γύρους διπλασιασμούς του γονιδιώματος. Τα υπόλοιπα είδη ανήκουν στα Κρανιωτά, τα οποία περιλαμβάνουν και τα Σπονδυλωτά. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το είδος *Callorhinchus milii* που διαθέτει μικρό γονιδίωμα (~910 Mb) σε σχέση με τα άλλα είδη των Χονδριχθύων και το γονιδίωμα του εξελίσσεται βραδύτερα απ' όλα τα σπονδυλωτά (Venkatesh et al., 2005). Το είδος *Petromyzon marinus* που ανήκει στην ομάδα των Κυκλοστομάτων και αντιπροσωπεύει τους Αγνάθους μελετήθηκε καθώς και η κοιλάκανθος *Latimeria chalumnae*, το «ζωντανό απολίθωμα» του οποίου το γονιδίωμα αλληλουχήθηκε το 2013 (Anemiya et al., 2013).

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν και κάποια αντιπροσωπευτικά είδη των τετραπόδων, συγκεκριμένα τα είδη *Xenopus tropicalis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, που έχουν υποστεί τους δυο πρώτους διπλασιασμούς του γονιδιώματος, ειδικούς για τη γενεαλογία των σπονδυλωτών (1R-2R). Η σύνδεση των Τετραπόδων με τους Τελεοστέους πραγματοποιείται από το ψάρι *Lepisosteus oculatus*, το οποίο αποτελεί γέφυρα του δεύτερου γύρου διπλασιασμού και του τρίτου που έγινε ειδικά στη γενεαλογία των Τελεοστέων. Αυτό συμβαίνει επειδή το συγκεκριμένο ψάρι αν και πολύ κοντινό στη γενεαλογία των τελεόστεων έχει διαφοροποιηθεί πριν τον τρίτο γύρο διπλασιασμού του γονιδιώματος και γι' αυτό αποτελεί σημαντικό μοντέλο για μελέτη και λόγω της φυλογενετικής θέσης και του αργού ρυθμού εξέλιξης του γονιδιώματος του (Braasch et al., 2016). Τα είδη των

Τελεόστεων που εξετάστηκαν είναι τα εξής : *Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, *Xiphophorus maculatus*, *Gadus morhua*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Gasterosteus aculeatus*, *Poecilia formosa*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*. Τα είδη που προαναφέρθηκαν και η ταξινόμησή τους φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Λίστα με τα είδη **Χορδωτών** που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη και η ταξινόμησή τους

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΟΝΟΜΑ (ΕΙΔΟΣ)	ΥΠΟΦΥΛΟ	ΑΝΘΥΠΟ-ΣΥΝΟΜΟΤΑΞΙΑ	ΥΠΕΡΤΑΞΗ/ΤΑΞΗ
<i>Ciona intestinalis</i>	Ουροχορδωτά	-	Ascidacea
<i>Ciona savignyi</i>	Ουροχορδωτά	-	Ascidacea
<i>Callorhynchus milii</i>	Σπονδυλωτά	ΑΓΝΑΘΑ	Chondrichthyes
<i>Petromyzon marinus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Cephalaspidomorphi
<i>Latimeria chalumnae</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Sarcopterygii/ Coelacanthi
<i>Xenopus tropicalis</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Tetrapoda/ Amphibia
<i>Gallus gallus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Tetrapoda/ Mammalia
<i>Mus musculus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Tetrapoda/ Mammalia
<i>Homo sapiens</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Tetrapoda/ Mammalia
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Holostei
<i>Oreochromis niloticus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Oryzias latipes</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Gadus morhua</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Takifugu rubripes</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Poecilia formosa</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Sparus aurata</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Σπονδυλωτά	ΓΝΑΘΟΣΤΟΜΑΤΑ	Actinopterygii/ Teleostei

## 2.2.Εξαγωγή Δεδομένων

### 2.2.1.Βιολογικές Βάσεις Δεδομένων

Οι βιολογικές βάσεις δεδομένων αποτελούν βιβλιοθήκες που περιλαμβάνουν πληροφορίες των βιολογικών επιστημών, οι οποίες συλλέγονται από επιστημονικά

πειράματα, από δημοσιευμένη βιβλιογραφία και από την Υπολογιστική ανάλυση. Περιλαμβάνουν πληροφορίες από τομείς όπως, η γονιδιωματική, πρωτεομική και η φυλογενετική. Οι πληροφορίες οι οποίες περιέχουν είναι οι εξής: γονιδιακή λειτουργία, γονιδιακή δομή, γονιδιακό εντοπισμό σε επίπεδο κυττάρου ή χρωμοσώματος, κλινικές επιδράσεις των μεταλλάξεων καθώς και ομοιότητες των βιολογικών ακολουθιών και δομών (Attwood et al., 2011; Altman, 2004). Στις γονιδιωματικές βάσεις δεδομένων αποθηκεύεται η πληροφορία για το σύνολο ή ένα μέρος του γονιδιώματος διαφόρων οργανισμών. Αυτές διαθέτουν κάποια περιβάλλοντα που είναι γνωστά ως περιηγητές γονιδιώματος (Genome Browser) και διευκολύνουν την διεπαφή με τον χρήστη κάνοντας ορατές τις πληροφορίες που συνδέονται με την αλληλουχία του γονιδιώματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η Ensembl, που αποτελεί έναν τέτοιο περιηγητή για τα γονιδιώματα κυρίως των Σπονδυλωτών και ερμηνεύει τα γονίδια, προβλέπει τη ρυθμιστική λειτουργία, υπολογίζει πολλαπλές στοιχίσεις (Hubbard et al., 2002). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και η βάση δεδομένων του NCBI για την εύρεση αλληλουχιών γονιδίων στα είδη, όταν δεν υπήρχαν στην προαναφερθείσα βάση Ensembl. Επιπλέον, για τη μελέτη των ειδών *Dicentrarchus labrax* και *Callorhinchus milii* οι πληροφορίες ανακτήθηκαν από δύο ξεχωριστές βάσεις δεδομένων αντίστοιχα, που περιέχουν πληροφορίες για το γονιδίωμα τους. Για το πρώτο ο γονιδιωματικός «περιηγητής» UCSC βρίσκεται στην ιστοσελίδα (<http://seabass.mpirz.mpg.de/>), ενώ για το δεύτερο οι πληροφορίες για το γονιδίωμά του ανακτήθηκαν από την ιστοσελίδα (<http://esharkgenome.imcb.a-star.edu.sg/>).

### 2.2.2 Blast

Η ανίχνευση ομοιότητας μεταξύ των μελετούμενων ακολουθιών πραγματοποιήθηκε από το εργαλείο αναζήτησης βασικής τοπικής στοίχισης (Basic Local Alignment Search Tool: Blast (Altschul, 1990)). Το BLAST είναι μια μέθοδος τοπικής στοίχισης που ανιχνεύει όχι μόνο την καλύτερη περιοχή τοπικής στοίχισης μεταξύ μιας εξεταζόμενης ακολουθίας (query) και του στόχου αναζήτησης, αλλά και το εάν υπάρχουν άλλες πιθανές στοιχίσεις μεταξύ της ακολουθίας και του στόχου (Baxevanis & Quillette, 2004).

Η στρατηγική που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αναζήτηση των πυρηνικών γονιδίων του ανθρώπου που κωδικοποιούν το Σύμπλοκο III της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω της βάσης δεδομένων HGNC. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η εύρεση των παρακάτω 9 γονιδίων που απαντώνται στον άνθρωπο: CYC1, UQCRB, UQCR10, UQCRFS1, UQCRH, UQCR11, UQCRQ, UQCRC1, UQCRC2. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αντίστοιχα γονίδια στα άλλα είδη είχαν πολλές φορές διαφορετική ονοματολογία.

Στη συνέχεια, έγινε αναζήτηση μέσω του αλγόριθμου BLAST, χρησιμοποιώντας την αμινοξική αλληλουχία του εκάστοτε γονιδίου ως αλληλουχία επερώτησης στις βάσεις δεδομένων που αναφέρθηκαν προηγουμένως, για να εντοπιστούν οι ομόλογες αλληλουχίες στα προς εξέταση είδη. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για τον εντοπισμό παράλογων γονιδίων ήταν η έρευνα μέσω BLAST, χρησιμοποιώντας ως ακολουθία επερώτησης την αλληλουχία για το εκάστοτε γονίδιο και ως βάση δεδομένων αναφοράς το γονιδίωμα από το οποίο ανακτήθηκε για όλα τα είδη που συμπεριλάβαμε στην ανάλυση. Αφού, εντοπίστηκαν τα ομόλογα γονίδια ανακτήθηκαν οι αμινοξικές και οι κωδικές ( CDS) αλληλουχίες τους σε μορφή FASTA και παράλληλα ανακτήθηκαν σημαντικές πληροφορίες για τα ομόλογα γονίδια από το κάθε είδος. Τέτοιες πληροφορίες είναι η τοποθεσία του εκάστοτε γονιδίου στο χρωμόσωμα, ο αριθμός εξονίων, τα ονόματα που δίνει η κάθε βάση δεδομένων στα γονίδια ή στην πρωτεΐνη. Μετά την εύρεση των πρωτεϊνικών ακολουθιών επιλέχθηκαν τα γονίδια που έχουν υποστεί διπλασιασμό.

### **2.3. Πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνικών ακολουθιών**

Η πολλαπλή στοίχιση πρωτεϊνικών ακολουθιών είναι ένα βασικό εργαλείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη λειτουργία μια πρωτεΐνης με βάση τη σύγκριση των ακολουθιών τους. Δημιουργείται όταν αμινοξικά κατάλοιπα μιας ακολουθίας στοιχίζονται με τα κατάλοιπα τουλάχιστον μίας άλλης ακολουθίας. Προγράμματα αυτόματης στοίχισης, όπως το Clustal W (Thompson et al., 1994) και το Aliview (Larsson, 2014), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δίνουν στοιχίσεις καλής ποιότητας για σημαντικά όμοιες ακολουθίες. Η στοίχιση μπορεί να πραγματοποιηθεί διαθέτοντας οποιοδήποτε αλγόριθμο ειδικό για

αυτόματες στοιχίσεις. Το Aliview για παράδειγμα περιλαμβάνει ενσωματωμένο τον αλγόριθμο MUSCLE ως προεπιλεγμένο πρόγραμμα στοίχισης (Edgar, 2004). Ο αλγόριθμος MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) είναι αρκετά γρήγορος αλγόριθμος και αυτό το επιτυγχάνει με τη χρήση μιας ταχείας μεθόδου σύγκρισης μέσω κατακερματισμού (hashing comparison) βάσει των σημείων απόλυτης ταύτισης. Μετά την ανάκτηση των πρωτεϊνικών και των CDS αλληλουχιών εκτελέστηκε το πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης Aliview. Για το κάθε γονίδιο υπό μελέτη έγιναν διαφορετικές πολλαπλές στοιχίσεις και ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητά τους. Ιδιαίτερη προσοχή υπήρξε στις περιοχές της στοίχισης όπου εντοπίστηκαν διάσπαρτα κενά και αναγνωρίστηκαν συντηρημένες αλληλουχίες. Στην περίπτωση που δεν εντοπιζόταν μοτίβα τέτοιων θέσεων εξετάζονταν υποσύνολα του συνόλου των ακολουθιών. Επίσης, αφαιρέθηκαν ολόκληρες ακολουθίες που διατάρασσαν σημαντικά τη στοίχιση και τα μεγάλα κενά (gaps) για απλοποίηση και πιο ακριβή στοίχιση. Πριν γίνει η «χειρουργική» αυτή αφαίρεση πραγματοποιήθηκε επαναστοίχιση όλων των ακολουθιών (realign), η οποία χρησιμοποιείται από τον αλγόριθμο MUSCLE και έτσι αυξάνεται κατά μεγάλο βαθμό η ακρίβεια αυτού. Αυτό γίνεται, έτσι ώστε λάθη που έχουν προκύψει από την αρχική στοίχιση να αφαιρούνται.

## 2.4. Φυλογενετική Ανάλυση

Η φυλογενετική είναι η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Με την φυλογενετική ανάλυση εξάγονται συμπεράσματα ή εκτιμήσεις των σχέσεων τους. Η εξελικτική ιστορία που «ξεδιπλώνεται» από τις φυλογενετικές αναλύσεις αποτυπώνεται συχνά με διακλαδιζόμενα (δενδροειδή) διαγράμματα που αντιπροσωπεύουν το γενεαλογικό δένδρο των κληρονομικών σχέσεων μεταξύ μορίων (π.χ. γονιδίων) ή οργανισμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) το οποίο αποτελεί ένα ελεύθερα διαθέσιμο λογισμικό για τη στατιστική ανάλυση της μοριακής εξέλιξης και την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων. Παράλληλα, περιλαμβάνει πολλές εξελιγμένες μεθόδους και εργαλεία της φυλογενωμικής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η τελευταία έκδοση του, το MEGA7 (Kumar et al., 2017). Οι



μέθοδοι κατασκευής δένδρων διακρίνονται σε μεθόδους βασισμένες στην απόσταση (distance-based) και σε μεθόδους βασισμένες σε χαρακτήρες (character-based). Συγκεκριμένα, εδώ, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Neighbor Joining (NJ) και Maximum Likelihood (ML). Ο αλγόριθμος NJ εφαρμόζεται στην κατασκευή δένδρων βάσει απόστασης ανεξάρτητα από το κριτήριο βελτιστοποίησης. Ο αλγόριθμος ML αντιστρέφει το φυλογενετικό πρόβλημα και αναζητεί το δένδρο που έχει την υψηλότερη πιθανότητα να παράγει τα παρατηρούμενα δεδομένα. Η κατασκευή δένδρων ακολουθεί την πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών. Έτσι, κατασκευάστηκαν δένδρα με βάσει τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν για τα γονίδια που βρέθηκαν ότι έχει επέλθει διπλασιασμός. Αφού, κατασκευάστηκαν τα δένδρα για το κάθε γονίδιο, ακολούθησε η τοποθέτηση ρίζας στο σημείο όπου το δένδρο συνδέεται σε μια ταξινομική μονάδα αναφοράς (outgroup). Ακολούθησε αξιολόγηση των δένδρων και πιο συγκεκριμένα της αξιοπιστίας των δένδρων (Swofford et al., 1996), όπου εκεί διενεργήθηκαν έλεγχοι υποστήριξης των δένδρων από επαναδειγματοληψία των παρατηρούμενων δεδομένων. Η μέθοδος bootstrap είναι μία μέθοδος αξιολόγησης και το αποτέλεσμα από την ανάλυση είναι συνήθως ένας αριθμός αντιστοιχισμένος σε έναν ορισμένο κλάδο του φυλογενετικού δένδρου, ο οποίος δείχνει το ποσοστό των αντιγράφων που υποστηρίζουν τη μονοφυλετικότητα του συγκεκριμένου κλάδου. Περιλαμβάνει παραγωγή νέων συνόλων δεδομένων μέσω τυχαίας δειγματοληψίας από το αρχικό σύνολο και ταυτόχρονο υπολογισμό ενός αριθμού που δείχνει το ποσοστό των φορών τις οποίες μια ορισμένη διακλάδωση κάνει την εμφάνισή της στο δένδρο. Αυτή ονομάζεται τιμή bootstrap (Hillis & Bull, 1993). Η επιλογή του κατάλληλου δένδρου για το κάθε γονίδιο βασίζεται στην κατάλληλη στοίχιση που προηγήθηκε.

## **2.5.Μελέτη Συνταινικότητας**

### **2.5.1 Συνταινικότητα**

Η συνταινικότητα είναι η ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμικών περιοχών σε διαφορετικά είδη. Οι συνταινικές σχέσεις καθορίστηκαν αρχικά με σύγκριση των χαρτών ανασυνδυασμού για ομόλογους τόπους μεταξύ των ειδών. Η φύση και η έκταση της συνταινικότητας ποικίλλει από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα.

### 2.5.2 Genomicus & Ensembl Biomart

Ο «περιηγητής» γονιδιώματων Genomicus και η βάση δεδομένων Ensembl Biomart χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των συνταινικών περιοχών των γονιδίων, όπου βρέθηκαν διπλασιασμοί. Το Genomicus επιτρέπει στον χρήστη να περιηγείται στα γονιδιώματα των οργανισμών, δηλαδή γραμμικά κατά μήκος των χρωμοσωμάτων και χρονολογικά κατά τον εξελικτικό χρόνο. Όλα τα δεδομένα που περιλαμβάνει προέρχονται από την Ensembl. Η βάση δεδομένων Ensembl Biomart δίνει τη δυνατότητα ανάκτησης δεδομένων σχολιασμού (annotation data) για συγκεκριμένους οργανισμούς.

### 2.5.3 Μεθοδολογική προσέγγιση

Δεδομένα που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για αυτή τη μελέτη είναι ποια γονίδια ανάμεσα στα υπό μελέτη είδη γειτνιάζουν με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (το όνομα που αποδίδει η Ensembl), σε ποια χρωμοσωματική περιοχή βρίσκονται, σε ποια αλυσίδα DNA βρίσκονται. Επίσης, εντοπίστηκαν συνταινικές περιοχές ανάμεσα στα τετράποδα με τους Τελεοστέους, αλλά και μόνο στα είδη των Τετραπόδων και αντίστοιχα στα είδη των Τελεοστέων καθώς και της κοιλάκανθου και του *Lepisosteus oculatus*. Έτσι, εντοπίστηκαν μεγάλες χρωμοσωματικές περιοχές που έχουν συντηρηθεί μεταξύ των οργανισμών και έγινε σύγκριση των συνταινικών περιοχών με σκοπό τη συλλογή χρήσιμων πληροφοριών για τα γονίδια που περιέχονται μέσα σε αυτές. Πολλές φορές γονίδια που έχουν συντηρηθεί μπορεί να βρίσκονται εκατομμύρια βάσεις μακριά από το γονίδιο που μελετάται, αλλά κυρίως η γύρω περιοχή αυτού προκαλεί το ενδιαφέρον. Είναι, επίσης, σημαντικό να γίνει και σύγκριση μεταξύ συντηρημένων περιοχών είτε από δεδομένα που προσφέρει η Ensembl Biomart είτε το Genomicus μέσα στο ίδιο είδος, δηλαδή ανάμεσα στα δύο αντίγραφα (παράλογα γονίδια). Με την ανακάλυψη αυτών των γονιδίων και των ονομάτων που δίνει η Ensembl το επόμενο βήμα ήταν η επαλήθευση αυτών με την παρατήρηση του κάθε γονιδίου μέσα στο χρωμόσωμα μέσω της επιλογής region in detail που παρέχει η Ensembl. Αυτή η επιλογή έδωσε τη δυνατότητα για περιήγηση των γονιδίων μέσα στο χρωμόσωμα που ανακτήθηκαν από τις Genomicus και Biomart και annotation για την περιοχή που περιλαμβάνει τα γύρω γονίδια καθώς και το γονίδιο υπό μελέτη.

## 3.Αποτελέσματα

### 3.1.Blast

Αφού έγινε αναζήτηση και σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών μέσω του Blast Search βρέθηκε ο αριθμός των γονιδίων που περιέχεται στο κάθε είδος και η ομολογία μεταξύ αυτών. Ορισμένα είδη διαθέτουν δύο αντίγραφα από το εκάστοτε γονίδιο που μελετήθηκε (π.χ UQCRC2a, UQCRC2b), ενώ άλλα διαθέτουν ένα ή κανένα. Η τελευταία περίπτωση συναντάται αρκετά συχνά στα δύο Ασκίδια, διότι το ομόλογο γονίδιο που υπάρχει κανονικά στα άλλα είδη πιθανόν να χάθηκε κατά την εξελικτική πορεία ή να μην υπήρχε. Αυτό υποδηλώνει την εξελικτική απόσταση που χωρίζει αυτά τα Ουροχορδωτά από τα Σπονδυλωτά που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, ορισμένοι Τελεοστέοι εμφανίζουν σε 4 συγκεκριμένα γονίδια υπό μελέτη (UQCRC2,UQCRH,UQCRFS1,UQCR11) 2 αντίγραφα, ενώ μόνο ο άνθρωπος από τα Τετράποδα εμφανίζει σε δύο από αυτά (UQCRH,UQCR11) 2 αντίγραφα. Τα αποτελέσματα και των αριθμών των αντιγράφων των γονιδίων, καθώς και τα είδη, στα οποία συμπεριλαμβάνονται απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

### 3.2.Στοιχίση Αλληλουχιών

Όπως, αναφέρθηκε ακολούθησε στοιχίση των αμινοξικών αλληλουχιών των ειδών στα τρία από τα τέσσερα γονίδια (UQCRC2,UQCRFS1,UQCRH), ενώ για το τέταρτο (UQCR11), όπου βρέθηκαν παράλογα έγινε στοιχίση των CDS, καθώς οι πρωτεϊνικές ακολουθίες αυτού είχαν μικρό μήκος και κατ' επέκταση χαμηλό φυλογενετικό σήμα. Οι πρωτεΐνες αυτές καθώς και οι αλληλουχίες των CDS είναι μεταξύ τους ομόλογες και η στοιχίση πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Aliview. Η εισαγωγή κενών στις στοιχίσεις οφείλεται σε ενθέσεις και ή διαγραφές, ενώ η αντιστοιχίση ανόμοιων καταλοίπων (mismatch) υποδεικνύει αντικαταστάσεις αμινοξέων. Κατά κανόνα υπάρχουν εκατομμύρια διαφορετικές πιθανές στοιχίσεις των ακολουθιών, και γι' αυτό είναι δύσκολο να βρεθεί μια στοιχίση που αντιπροσωπεύει με τον καλύτερο τρόπο τις χημικές και τις βιολογικές ομοιότητες μεταξύ των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η εξελικτική στοιχίση αποκλινουσών πρωτεϊνών, όπως στην παρούσα μελέτη, δεν προσδιορίζεται με απόλυτη βεβαιότητα καθώς θα έπρεπε να υπάρχει η

προέλευση των αντικαταστάσεων, των ενθέσεων και των ελλείψεων που οδήγησαν στις στις πρωτεΐνες αυτές από τον κοινό τους πρόγονο. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν τα βήματα που αναφέρθηκαν στην υποενότητα 2.3, όπως ήταν η αφαίρεση των ακολουθιών που διατάρασσαν σοβαρά τη στοίχιση, απαλοιφή των μεγάλων κενών .

Ας πάρουμε για παράδειγμα την περίπτωση της πολλαπλής στοίχισης στο γονίδιο UQCRFS1. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρείται στο τέλος της στοίχισης ένα μεγάλο κενό και πιο συγκεκριμένα στην αλληλουχία του *Tetraodon nigroviridis*, το οποίο θα πρέπει να αφαιρεθεί, καθώς δυσχεραίνει την στοίχιση των υπολοίπων, ενώ κρατείται η παράλογη αμινοξική αλληλουχία αυτού (Εικόνα 7).

**Πίνακας 3.** Απεικόνιση του αριθμού του αντιγράφων των 10 γονιδίων που κωδικοποιούν το σύμπλοκο III. Με κόκκινο φαίνονται τα 2 αντίγραφα που διαθέτει το κάθε είδος για το εκάστοτε γονίδιο και τα είδη των Τελεόστεων αντίστοιχα.

	CYC1	UQCRB	UQCR10	UQCRC1	UQCRC2	UQCRFS1	UQCRH	UQCRQ	UQCR10	UQCR11
<i>C.savignyi</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
<i>C.intestinalis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
<i>C.milii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>P.marinus</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>L.chalumnae</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>X.tropicalis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>G.gallus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>M.musculus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>H.sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
<i>L.oculatus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>O.niloticus</i>	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
<i>O.latipes</i>	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
<i>X.maculatus</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
<i>G.morhua</i>	1	1	1	1	2	1	2	1	1	0
<i>T.rubipes</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
<i>T.nigroviridis</i>	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
<i>G.aculeatus</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	0
<i>P.formosa</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2
<i>S.aurata</i>	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2
<i>D.labrax</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2



**Εικόνα 7.** Απεικόνιση από του ενός άκρου της στοίχισης των πρωτεϊνικών αλληλουχιών και του μεγάλου κενού που εμφανίζει η αλληλουχία του *Tetraodon nigroviridis*.

Στην δεύτερη περίπτωση διαπιστώνονται πάλι στο γονίδιο UQCRCF1 μεγάλα κενά στην αρχή των ακολουθιών στους διάφορους χαρακτήρες αυτών, και αφαιρέθηκαν οι συγκεκριμένες περιοχές με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης στοίχισης ( Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Απεικόνιση του αρχικού μέρους των πρωτεϊνικών αλληλουχιών προς στοίχιση.

Το τελικό αποτέλεσμα στο οποίο οδηγηθήκαμε είναι το παρακάτω ύστερα από πολλές προσπάθειες για την εύρεση της κατάλληλης στοίχισης, η οποία είναι αρκετά υποκειμενική δεδομένου ότι δεν είναι γνωστή η εξελικτική σημασία και πορεία των ανόμοιων καταλοίπων των αμινοξέων καθώς και των κενών που παρατηρούνται. Σημειώνεται, ότι τα κενά που εμφανίζονται δεν διαγράφονται, καθώς θα χαθεί αρκετά μεγάλη εξελικτική πληροφορία, επειδή θα διαγράφονταν ορισμένα είδη (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Το τελικό αποτέλεσμα της στοίχισης.

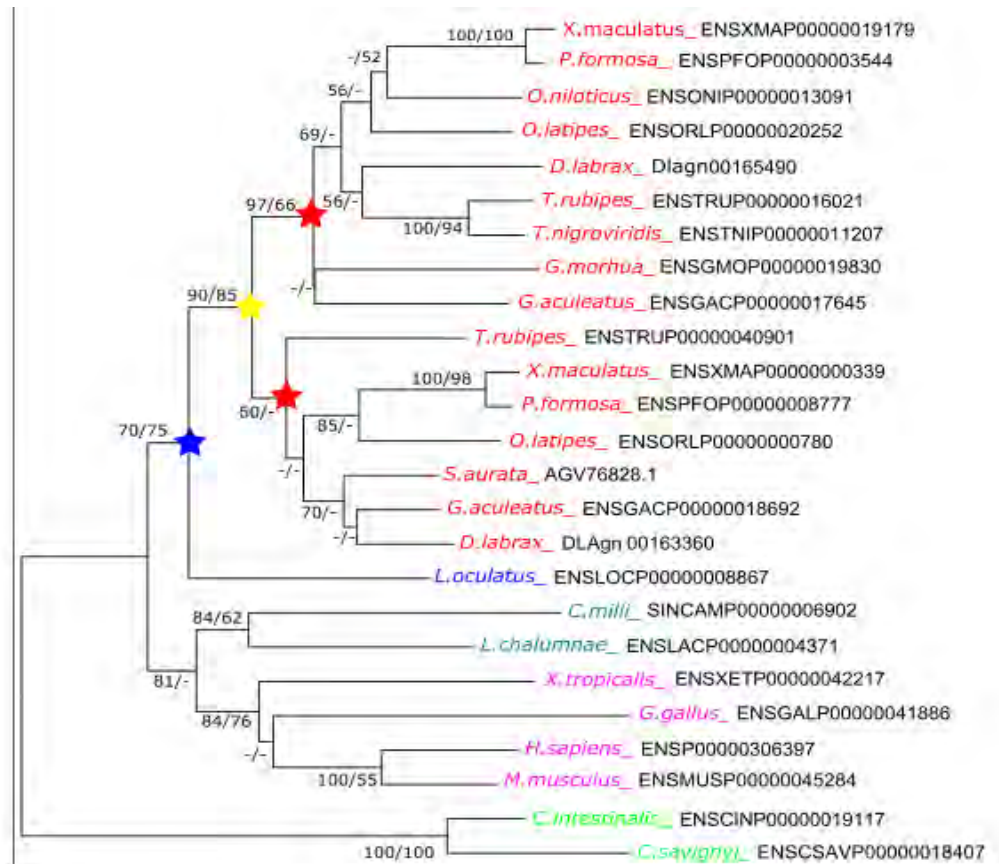
### 3.3. Φυλογενετική Ανάλυση

Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση μέσω του προγράμματος MEGA7 με σκοπό την κατασκευή γενεαλογικών δένδρων, όπου αναπαριστώνται οι κληρονομικές σχέσεις μεταξύ των ομόλογων ακολουθιών που προέκυψαν από τις 4 στοίχισεις. Κατασκευάστηκαν 8 φυλογενετικά δένδρα, 2 για κάθε διπλασιασμένο γονίδιο, ένα με τη μέθοδο Neighbor Joining και το άλλο με τη μέθοδο Maximum Likelihood, και τα 8 αξιολογήθηκαν με την στατιστική μέθοδο bootstrap. Για διευκόλυνση της αναπαράστασης και απλοποίησης των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύντμηση των 2 φυλογενετικών δένδρων από το κάθε γονίδιο σε ένα και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το φυλογενετικό δένδρο που προέκυψε με τη μέθοδο Neighbor Joining για τα πρώτα τρία γονίδια, ενώ για το UQCRC2 η μέθοδος Maximum Likelihood. Αυτό επιτράπηκε, καθώς δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στην τοπολογία μεταξύ των δύο δένδρων και επειδή η εξελικτική πληροφορία που ανακτήσαμε ήταν παρόμοια. Αλλά, οι τιμές bootstrap που παρατίθενται

προκύπτουν και από τα 2 (στα πρώτα τρία γονίδια η αριστερή τιμή στις εικόνες είναι η τιμή που προκύπτει από τη μέθοδο neighbor joining, ενώ η δεξιά από τη μέθοδο maximum likelihood, ενώ στο τέταρτο αντίθετα.). Επίσης, τα είδη με κόκκινο χρώμα ανήκουν τους Τελεόστεους, με μπλε το *Callorhinchus milii* και η Κοιλάκανθος, με ροζ τα Τετράποδα, ενώ με πράσινο τα δύο Ασκίδια. Τέλος, με σχήμα αστεριού αναπαριστώνται 4 γεγονότα που συνέβησαν στους κοινούς πρόγονους. Πιο αναλυτικά, το μπλε αστέρι τοποθετείται στον κοινό πρόγονο του *Lepisosteus oculatus* και των Τελεόστεων, με κίτρινο ο διπλασιασμός που συνέβη στους Τελεόστεους και με κόκκινο ο κοινός πρόγονος κάθε υπό-ομάδας μέσα στη γενεαλογία των Τελεόστεων.

Σε όλα τα δένδρα που κατασκευάστηκαν παρατηρείται ξεχωριστή ομαδοποίηση των Τετραπόδων και των Τελεόστεων. Η διάταξη των δένδρων και των τεσσάρων γονιδίων αποκαλύπτει ότι τα αντίγραφα του κάθε γονιδίου που περιέχουν οι Τελεόστεοι είναι παράλογα, με ομόλογο τους το ένα γονίδιο στα Τετράποδα, στα άλλα Σπονδυλωτά και τα Ασκίδια αντίστοιχα, που δεν έχουν υποστεί 3R. Επίσης, το είδος *Lepisosteus oculatus* φαίνεται από τα παρακάτω δένδρα ότι αποτελεί σημείο ή έξω-ομάδα για τους Τελεοστέους που τους διαχωρίζει από τα Τετράποδα.

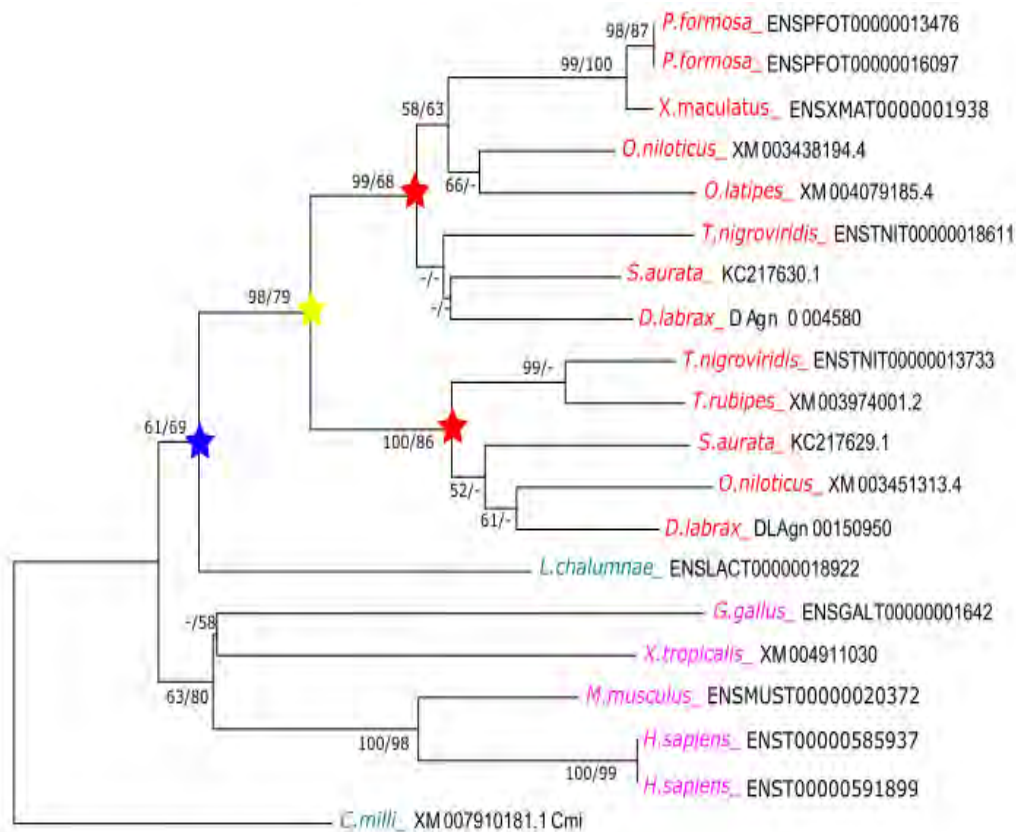
Στο φυλογενετικό δένδρο του γονιδίου **UQCRFS1** (Εικόνα 10) τα δύο είδη από τα Ασκίδια χρησιμοποιούνται ως outgroup, τα Τετράποδα ομαδοποιούνται μαζί και με το *Callorhinchus milii* και την κοιλάκανθο και διαχωρίζονται από τους Τελεοστέους μέσω του *Lepisosteus oculatus* και όπως φαίνεται με πολύ καλή τιμή bootstrap. Τα παράλογα γονίδια διακρίνεται ότι είναι διαχωρισμένα σε 2 ομάδες και αναπαριστάται με 2 κόκκινα αστέρια και οι τιμές bootstrap, εκεί που υπάρχει ο κοινός πρόγονος των δύο ομάδων είναι αρκετά υψηλές.



**Εικόνα 10.** Αναπαράσταση του φυλογενετικού δένδρου για το γονίδιο UQCRFS1.

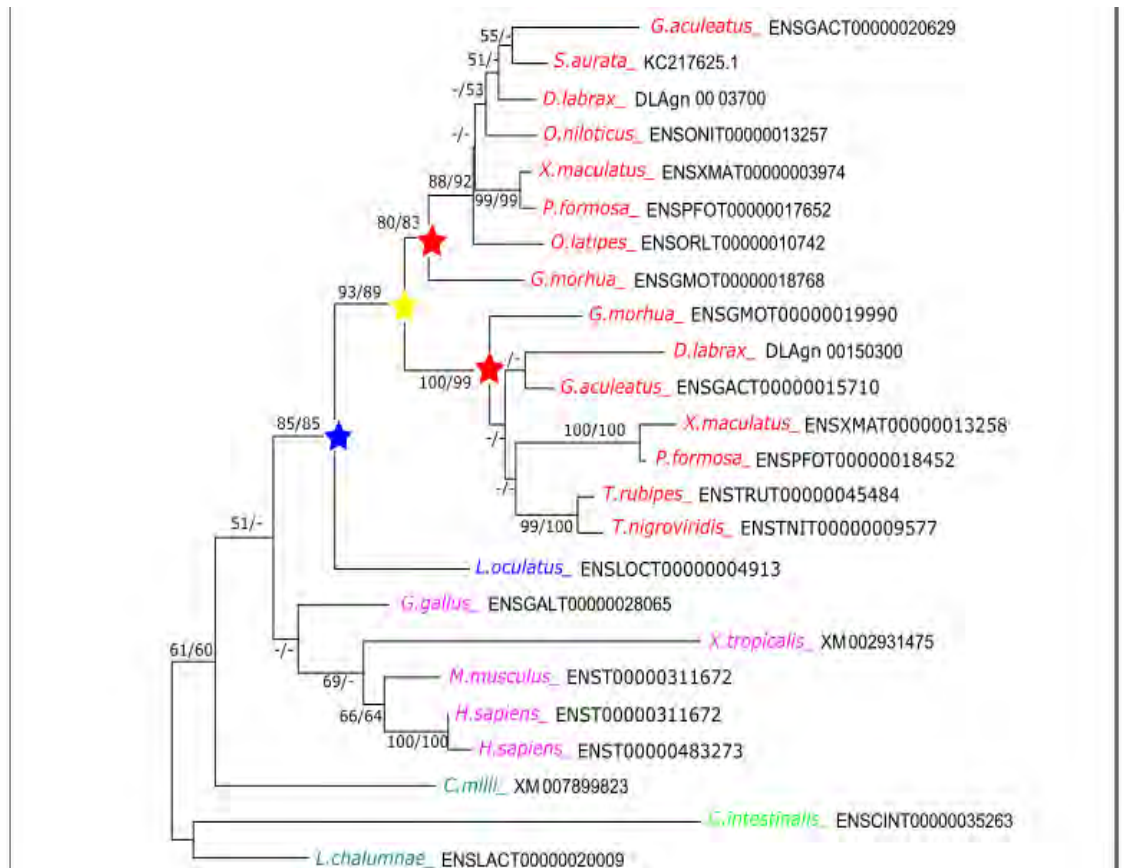
Για το γονίδιο **UQCR11** χρησιμοποιήθηκε ως outgroup το *Callorhynchus milii*, καθώς τα δύο Ασκίδια δεν φέρουν κάποιο ομόλογο γονίδιο (Εικόνα 11). Ο άνθρωπος διαθέτει δύο παράλογα, τα οποία είναι σχεδόν ίδια και αυτό αποδεικνύεται και από τις τιμές 100/99, αλλά και από την χαρακτηριστική κάθετη γραμμή. Το *Lepisosteus oculatus* δεν διαθέτει ομόλογο και έτσι η κοιλάκανθος αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ των Τετραπόδων και των Τελεοστέων. Όπως, παρατηρείται και στην Εικόνα 11 υπάρχουν δύο ομαδοποιήσεις στους Τελεοστέους με αρκετά υψηλή τιμή bootstrap (98/79), και στη μία ομάδα (cluster) έχουμε τις αλληλουχίες cds που έχουν προκύψει από το ένα αντίγραφο και στην άλλη ομάδα από το δεύτερο παράλογο.





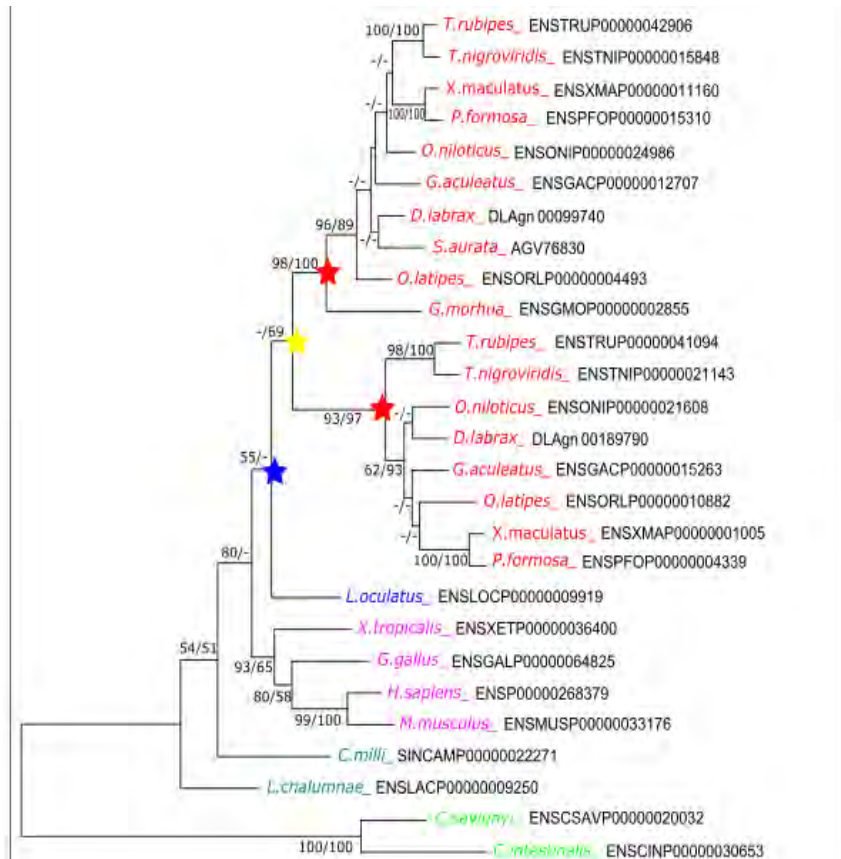
**Εικόνα 11.** Αναπαράσταση του φυλογενετικού δένδρου για το γονίδιο UQCR11, όπου παρατηρείται ο τρίτος γύρος διπλασιασμού που συνέβη στον κόμβο που υπάρχει το κίτρινο αστέρι.

Στο γονίδιο **UQCRH** έχουμε ως έξω-ομάδα την κοιλάκανθο που ομαδοποιείται μαζί με το Ασκίδιο *C. intestinalis* (Εικόνα 12). Στα Τετράποδα έχουμε πολύ χαμηλές τιμές bootstrap στο διαχωρισμό του είδους *G. gallus* και όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12 στον άνθρωπο τα δύο παράλογα είναι παρόμοια, όπως και στην περίπτωση του γονιδίου UQCR11. Επίσης, παρατηρείται ότι το *Lepisosteus oculatus* με αρκετά υψηλή τιμή bootstrap (85) διαχωρίζεται από τους Τελεόστεους και οι τελευταίοι διαχωρίζονται σε δύο σημαντικούς κόμβους που προκύπτουν από ένα κοινό πρόγονο με υψηλή τιμή bootstrap (93/89). Ο κάθε κόμβος διακλαδίζεται σε περισσότερους κόμβους. Σε καθένα από τους δύο εμπεριέχεται ένα από τα δύο παράλογα του γονιδίου UQCRH (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Αναπαράσταση του φυλογενετικού δένδρου για το γονίδιο UQCRH, όπου διακρίνεται δύο αντίγραφα στους Τελεόστεους και ένας διπλασιασμός στα Τετράποδα, και πιο συγκεκριμένα στον άνθρωπο.

Και τέλος, στο γονίδιο **UQCRC2**, που το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε με τη μέθοδο Maximum Likelihood, τα δύο Ασκίδια αποτελούν την έξω-ομάδα και τα Τετράποδα διαφοροποιούνται από τους Τελεοστέους με μια πολύ μεγάλη τιμή bootstrap (Εικόνα 13). Ο κοινός πρόγονος του *Lepisosteus oculatus* και των Τελεόστεων δίνει μια μέτρια τιμή bootstrap (55) σύμφωνα με τη μέθοδο ML, ενώ με τον αλγόριθμο NJ το *Lepisosteus oculatus* τοποθετείται μέσα στη γενεαλογία των Τελεόστεων (δεν φαίνεται εδώ). Οι Τελεόστεοι με τη σειρά τους σχηματίζουν δύο ομάδες, όπου η κάθε ομάδα φέρει ένα αντίγραφο και ο κοινός πρόγονος αυτών των δύο έχει μια τιμή γύρω στο 70 με τη μέθοδο ML, ενώ με τη μέθοδο NJ η τιμή bootstrap είναι 40 (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13.** Αναπαράσταση του φυλογενετικού δένδρου για το γονίδιο UQCRC2. Και εδώ παρατηρείται ο διαχωρισμός σε δύο ομάδες (clusters) που προκύπτουν από έναν κοινό πρόγονο (με κίτρινο αστέρι), και η κάθε μία αποτελείται από είδη που φέρουν ένα από τα δύο αντίγραφα.

### 3.4. Συνταινικότητα

Από τη συγκριτική μελέτη των συνταινικών περιοχών των γονιδίων προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα στα οποία φαίνονται οι συντηρημένες περιοχές μεταξύ των διάφορων ειδών στα Τετράποδα, κοιλάκανθο, *Lepisosteus oculatus* και Τελεοστέων. Στα τετράποδα (*Gallus gallus*, *Homo sapiens*) καθώς και στην

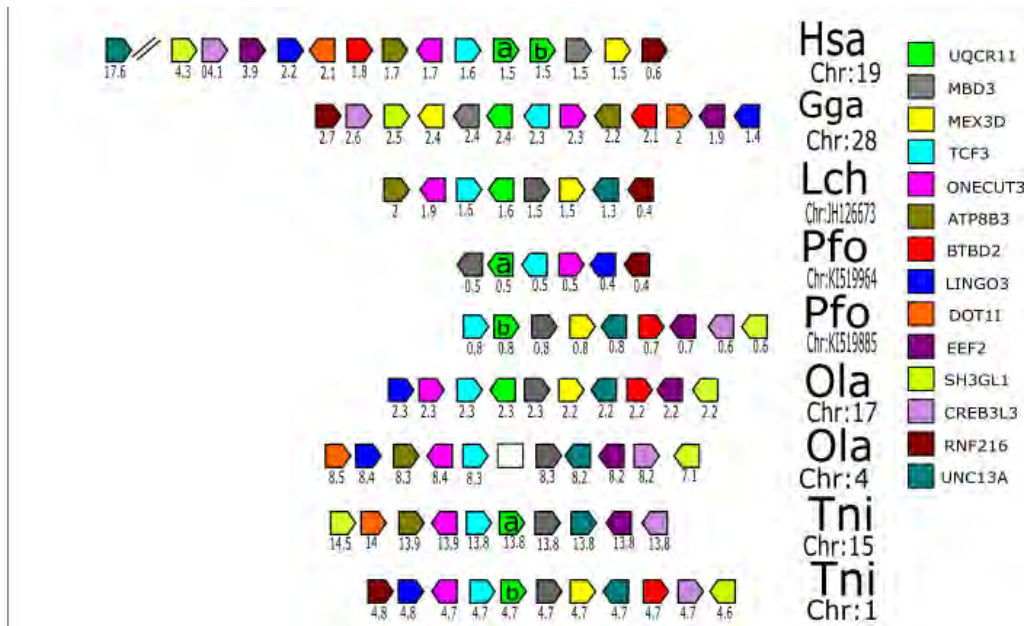
κοιλάκανθο παρατηρείται σημαντική διατήρηση μεταξύ των περιοχών γύρω από το καθένα από τα 4 γονίδια. Το *Lepisosteus oculatus* που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη για τους ίδιους λόγους, όπως και στις προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιείται για να γίνει η σύνδεση μεταξύ των δύο ομάδων. Παρακάτω παρατίθενται εικόνες, όπου αναπαριστούν τις διατηρημένες χρωμοσομικές περιοχές μεταξύ των ειδών. Οι συντομογραφίες Has, Gga, Lch, Loc, Pfo, Tni, Ola, Gmo, Gac χρησιμοποιούνται για τα είδη *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Latimeria chalumnae*, *Lepisosteus oculatus*, *Poecilia formosa*, *Tetraodon nigroviridis*, *Oryzias latipes*, *Gadus morhua* και *Gasterosteus aculeatus*, αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 14 απεικονίζεται το γονίδιο UQCRFS1 και τα εξής γονίδια: VSTM2B, POP4, C19orf12, CCNE1, URI1, ZNF536, TSHZ3, ZNF507, PDCD5, rxy1t1, PDCD7. Τα δύο τελευταία δεν υπάρχουν στα Τετράποδα. Η διατήρηση στα Τετράποδα είναι εμφανής. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η κοιλάκανθος (Lch) όσο και το *Lepisosteus oculatus* (Loc) διαθέτουν το γονίδιο UQCRFS1, αλλά δεν προστέθηκε καθώς η γύρω περιοχή από το γονίδιο δεν βρέθηκε να σημειώνει κάποια διατήρηση και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε σαν σημείο αναφοράς το γονίδιο CCNE και όπως παρατηρούμε οι δύο περιοχές είναι αρκετά συντηρημένες. Στους Τελεοστέους, το Gac δεν διαθέτει το γονίδιο UQCRFS1 και το Gmo διαθέτει ένα αντίγραφο. Όλα σχεδόν τα γονίδια των Τετραπόδων διατηρούνται και στους Τελεοστέους. Ανάμεσα στα παράλογα έχουμε διατήρηση δύο γονιδίων C19orf12 (με γαλάζιο) και TSHZ3 (με μπλε), τα οποία είναι και αυτά σε δύο αντίγραφα. Τα υπόλοιπα γονίδια φέρουν ένα αντίγραφο (π.χ τα rxy1t1, URI1 βρίσκουν συντήρηση μόνο γύρω από την περιοχή του αντιγράφου b του UQCRFS1)



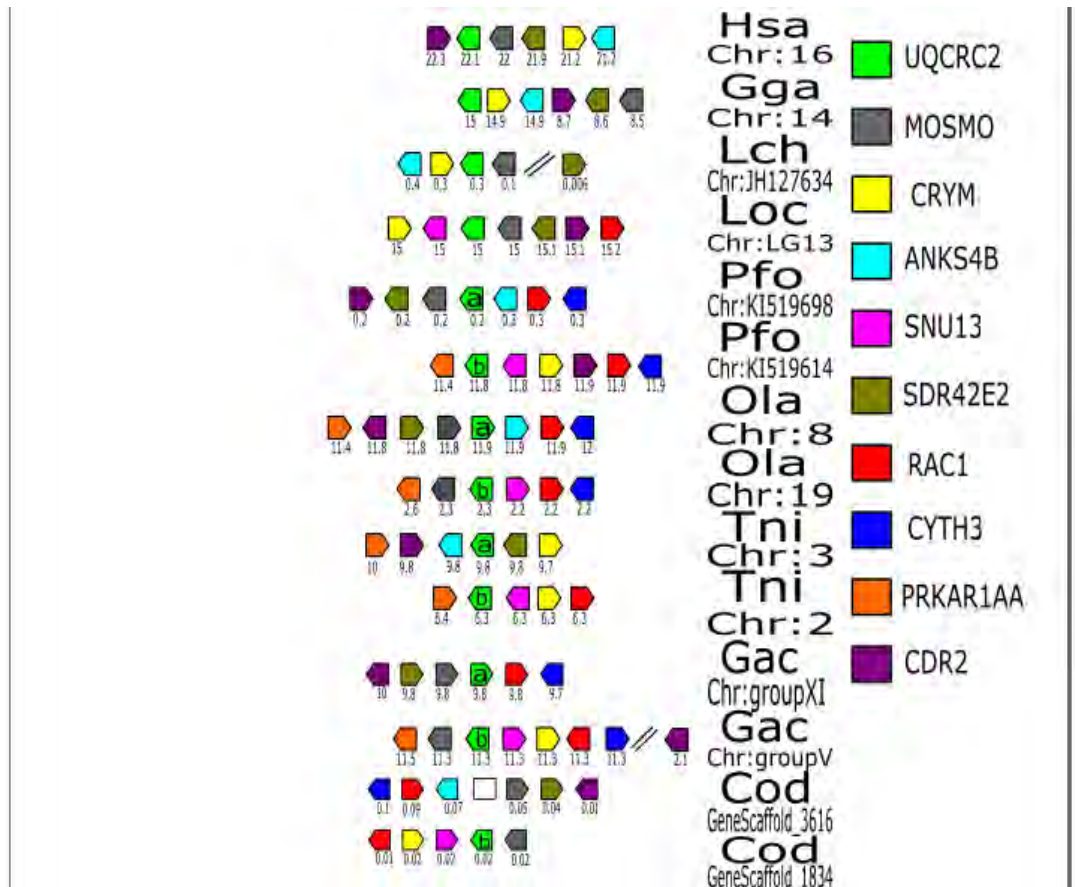
**Εικόνα 14.** Συντηρημένες γειτονιές γονιδίων γύρω από το γονίδιο UQCRFS1.

Η μελέτη της συνταινικότητας συνεχίστηκε με το γονίδιο UQCR11, όπου όπως είχε διαπιστωθεί από τις αναζητήσεις στις βάσεις δεδομένων τα είδη Has, Gga, Lch, Loc, Pfo, Tni, Ola, Gmo, Gac χρησιμοποιούνται για τα είδη *Lepisosteus oculatus*, *Tetraodon nigroviridis*, και *Gasterosteus aculeatus* δεν διέθεταν κάποιο ομόλογο αυτού του γονιδίου. Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: MBD3, MEX3D, TCF3, ONECUT3, ATP8B3, BTBD2, LINGO3, DOT1I, EEF2, SH3GL1, CREB3L3, RNF216, UNC13A (Εικόνα 15). Φαίνεται η διατήρηση της χρωμοσωματικής περιοχής γύρω από το UQCR11 στα Τετράποδα και διακρίνονται τα δύο παράλογα στον Άνθρωπο τα οποία απέχουν λίγες δεκάδες βάσεις το ένα από το άλλο. Η χρωμοσωματική περιοχή στην κουλάκανθο είναι συντηρημένη. Το *Oryzias latipes* δεν διαθέτει δεύτερο αντίγραφο. Επίσης, διακρίνονται αρκετά γονίδια ανάμεσα στα δύο παράλογα (a & b) των Τελεόστεων που βρίσκονται διπλασιασμένα μέσα στο γονιδίωμα του κάθε είδους (π.χ. τα MBD3, TCF3 βρίσκονται σε όλες τις περιοχές). Επίσης, δύο αντίγραφα φέρει και το ONECUT3, SH3GL1, UNC13A και CREB3L3, ενώ τα υπόλοιπα γονίδια βρίσκονται είτε γύρω από το ένα αντίγραφο είτε από το άλλο.



**Εικόνα 15.** Μελέτη των συνταινικών περιοχών του γονιδίου UQCR11.

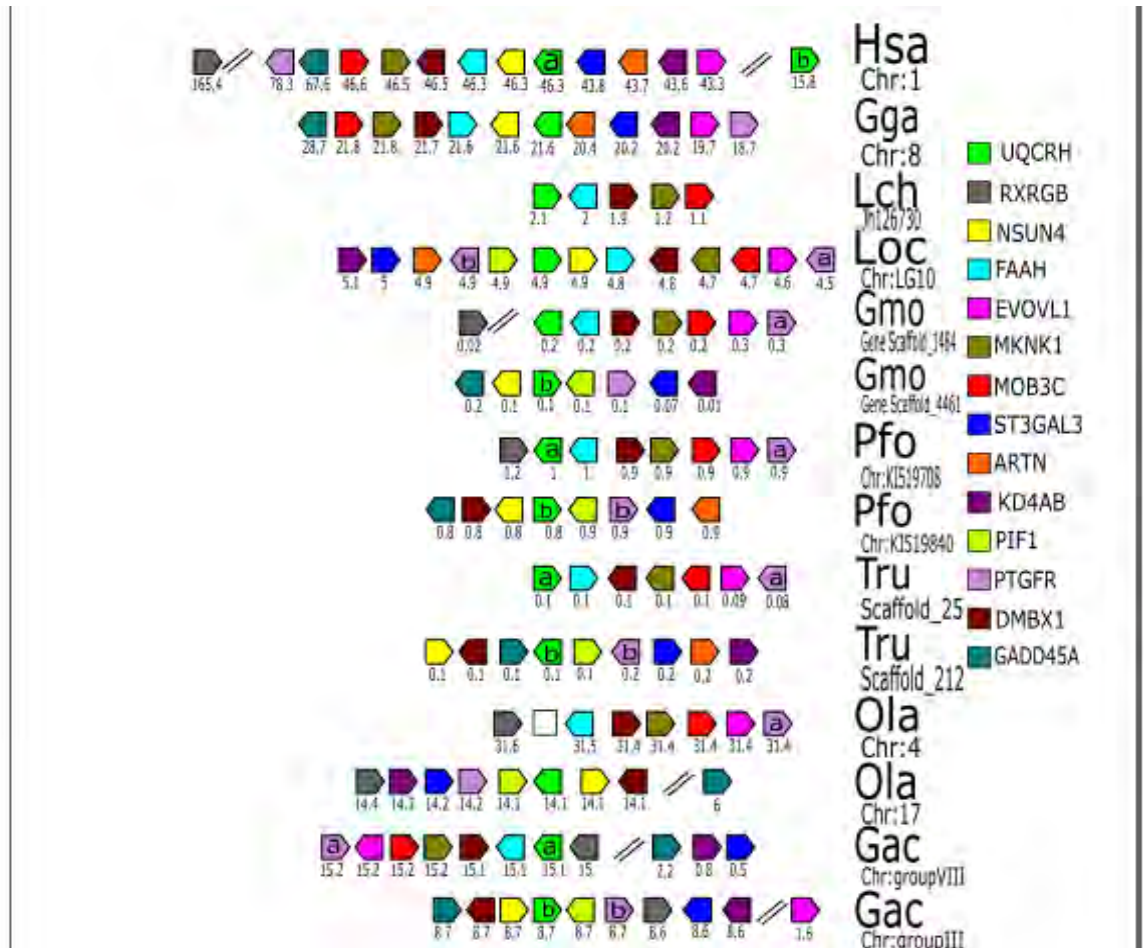
Στην τρίτη περίπτωση, μελετήθηκε το γονίδιο *uqrc2* και τα γειτονικά γονίδια που υπάρχουν στην γύρω χρωμοσωματική περιοχή. Τα γονίδια που βρέθηκαν είναι τα *MOSMO*, *CRYM*, *ANKS4B*, *SNU13*, *SDR42E2*, *RAC1*, *CYTH3*, *PRKAR1AA*, *CDR2* (Εικόνα 16). Στα Τετράποδα και στην κοιλάκανθο παρατηρούμε συντηρημένες χρωμοσωματικές περιοχές, ενώ στο *Lepisosteus oculatus* υπάρχει προσθήκη δύο γονιδίων (*SNU13*, *RAC1*) που δεν απαντώνται στις συντηρημένες περιοχές των προηγούμενων. Οι τελεοστέοι διατηρούν όλα τα γονίδια που βρίσκονται γύρω από το γονίδιο *UQCRC2* στα προαναφερθέντα είδη. Ανάμεσα στις χρωμοσωματικές περιοχές των 5 Τελεοστέων όπου υπάρχουν τα παράλογα γονίδια εμφανίζονται διάφορα γονίδια (π.χ. το *CDR2* που υπάρχει σε 2 αντίγραφα στο γονιδίωμα του *Gadus morhua*). Ιδιαίτερα, πρέπει να σημειωθεί ότι σε όλα τα είδη των Τελεοστέων, τα γονίδια *RAC1* (κόκκινο) και *CYTH3* (μπλε) εμφανίζουν 2 αντίγραφα που βρίσκεται το καθένα λίγες βάσεις μακρύτερα από το καθένα αντίγραφο του γονιδίου *UQCRC2*.



**Εικόνα 16.** Αναπαράσταση συνταϊνικών περιοχών με σημείο αναφοράς το γονίδιο UQCRC2.

Τέλος, στο γονίδιο UQCRH, καθώς και στα γειτονικά γονίδια (RXRGB, NSUN4, FAAH, EVOVL1, MKNK1, MOB3C, ST3GAL3, ARTN, KD4AB, PIF1, PTGFR, DMBX1, GADD45A) τα οποία ανακτήθηκαν από το Genomicus έγινε συγκριτική μελέτη μέσα και κατά μήκος του χρωμοσώματος που ανήκουν (Εικόνα 17). Παρατηρείται για άλλη μία φορά διατήρηση ανάμεσα στα δύο Τετράποδα, καθώς και στην κοιλάκανθο, ενώ ο άνθρωπος διαθέτει δύο αντίγραφα, τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 1. Η χρωμοσωματική περιοχή γύρω από το UQCRH του *Lepisosteus oculatus* είναι επίσης διατηρημένη. Ενώ, τα είδη των Τελεοστέων φαίνεται και αυτά να διατηρούν τα γονίδια που διαθέτουν και τα Τετράποδα. Το *Oryzia latipes* δεν φέρει δεύτερο αντίγραφο, αλλά μελετήθηκε η χρωμοσωματική περιοχή με σημείο αναφοράς το γονίδιο που θεωρητικά θα ήταν δίπλα στο δεύτερο αντίγραφο. Δύο αντίγραφα φέρουν μόνο τα γονίδια DMBX1, PTGFR στα είδη *Poecilia formosa*, *Tetraodon nigroviridis*, *Gadus morhua*. Ενώ στα *Gasterosteus aculeatus* και *Oryzia latipes* αρκετά γονίδια φέρουν 2 αντίγραφα στις δύο χρωμοσωματικές περιοχές του κάθε

είδους. Συγκεκριμένα, στο γονιδίωμα του *Gasterosteus aculeatus* τα γονίδια RXRGB, GADD45A, EVOVL1, DMBX1, PTGFR, ST3GAL3 βρίσκονται σε δύο αντίγραφα.



**Εικόνα 17.** Συντακτικές περιοχές του γονιδίου UQCRH.



#### 4. Συζήτηση

Σε όλους τους ευκαρυώτες τα συστατικά του μιτοχονδρίου προκύπτουν από το πυρηνικό γονιδίωμα και ελάχιστα από αυτά κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η συνεισφορά του μιτοχονδριακού DNA περιορίζεται στη μετάφραση 13 πρωτεϊνών, 2 rRNAs και 22 tRNAs. Η πλαστικότητα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος διατηρείται μέσω διάφορων γεγονότων, όπως είναι οι αλλαγές νουκλεοτιδίων, μικρές προσθήκες και διαγραφές, διαφορετική γονιδιακή κατανομή και η ύπαρξη μιας μεταβλητής ρυθμιστικής περιοχής. Σε αντίθεση με αυτό, το πυρηνικό γονιδίωμα εξελίσσεται ακολουθώντας διαφορετικά μονοπάτια σε διάφορους οργανισμούς. Το πυρηνικό γονιδίωμα είναι αρκετά άφθονο λόγω διπλασιασμού που συμβαίνει σε ένα γονίδιο ή σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Τόσο οι κωδικές όσο και οι μη κωδικές περιοχές αυξάνονται, αυξάνοντας έτσι και την ποικιλομορφία ανάμεσα στα είδη. Τα παράλογα γονίδια που προκύπτουν από την κωδικοποιούσα περιοχή ομαδοποιούνται σε οικογένειες, όπως είναι τα *Hox* γονίδια, και το μέγεθος αυτών των οικογενειών διαφέρει.

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι ένας από τους αρχαιότερους και πιο καλά συντηρημένους μηχανισμούς όλων των αερόβιων οργανισμών, όπως επισημάνθηκε και στην υποενότητα 1.2.2 και τα συστατικά των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας σχετίζονται μεταξύ τους τόσο υποκυττάρια όσο και με την τοποθετησή τους στα σύμπλοκα και κωδικοποιούνται τόσο από το μιτοχονδριακό όσο και από το πυρηνικό γονιδίωμα. Η συμπεριφορά των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες των συμπλόκων και πιο συγκεκριμένα του Συμπλόκου III που μελετήθηκε εδώ, κατά την εξέλιξη φαίνεται να έχει αρκετές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα είδη. Αυτή η διαφοροποίηση προκύπτει από τους διπλασιασμούς. Το γεγονός ότι στους Τελεόστεους εμφανίζονται παράλογα γονίδια, υποστηρίζεται από την υπόθεση του τρίτου γύρου διπλασιασμού (3R Hypothesis) που έχει συμβεί ειδικά μέσα στη γενεαολογία των Τελεοστέων και γι' αυτό το λόγο δεν βρέθηκαν στα υπόλοιπα Σπονδυλωτά, παρά μόνο στον άνθρωπο. Όμως, τα δύο γονίδια (UQCRH, UQCR11) που βρέθηκαν να φέρουν δύο αντίγραφα στον άνθρωπο μπορεί να μην είναι αποτέλεσμα των δύο γύρων διπλασιασμού, καθώς όπως προέκυψε από την συγκριτική ανάλυση δεν υπήρχαν συντηρημένες παράλογες περιοχές μέσα

στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Πολύ πιθανό να είναι αποτέλεσμα σημειακού γονιδιακού διπλασιασμού ή αντιμεταθέσεων. Όπως διαπιστώθηκε από μία συγκριτική μελέτη των γονιδιακών οικογενειών ανάμεσα σε αυτές τις οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και άλλων πυρηνικών, τα γονίδια που παίζουν ρόλο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι λιγότερο πιθανά να εμφανίσουν αντίγραφα ή ακόμα και να διατηρηθούν τα τελευταία απ' ότι άλλων πυρηνικών γονιδίων (De Grassi et al., 2005). Σε αυτό συνηγορεί και η παρούσα μελέτη καθώς διπλασιασμοί βρέθηκαν στους Τελεόστεους μόνο σε 4 γονίδια από τα 10 και στον άνθρωπο σε 2 από αυτά.

Δεδομένου ότι στα Σπονδυλωτά τα διπλασιασμένα γονίδια δεν είναι επιρρεπή στο να διατηρηθούν, αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την υπόθεση ισορροπίας που υπογραμμίστηκε ο ρόλος της στις υποενότητες 1.1.4 και 1.1.7. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, από τη στιγμή που τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-πρωτεΐνης είναι «ευαίσθητα» στο φαινόμενο της δόσης, τα διπλασιασμένα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων αυτών είναι αδύνατο να διατηρηθούν σε ένα πληθυσμό. Η ανισορροπία στον αριθμό των συμπλοκων θα είχε αρνητικές επιδράσεις στη συναρμολόγηση τους και θα μείωνε την αρμοστικότητα των ειδών.

Τα γονίδια που φέρουν 2 αντίγραφα κωδικοποιούν τις υπομονάδες UQCRFS1, UQCRH, UQCRC2 και UQCR11. Οι 3 πρώτες παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του συμπλόκου, ενώ η τέταρτη δεν έχει κάποια καταλυτική δραστηριότητα. Οι άλλες τρεις, όμως, που ο ρόλος τους διερευνήθηκε στην υποενότητα 1.2.4 είναι απαραίτητες για την καταλυτική ενεργότητα του συμπλόκου, όπως είναι η Rieske (UQCRFS1), που η υδρόφιλη καρβοξυτελική περιοχή της φιλοξενεί τα κέντρα  $2\text{Fe}^{2+}$  τα οποία διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στη λειτουργία του κύκλου Q. Η UQCRFS1 λαμβάνει ένα από τα ηλεκτρόνια από την οξείδωση ενός μορίου ουβικινόλης και το μεταφέρει στην πρωτεΐνη CYC1. Κατά τη διάρκεια αυτής της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, οι κεφαλές της UQCRFS1 γειτνιάζουν προς την CYC1 στο ένα μονομερές, ενώ η διαμεμβρανική αμινοτελική περιοχή της βρίσκεται σε στενή επαφή με την MT- CYB του άλλου μονομερούς.

Η UQCRH επηρεάζει άμεσα την UQCRFS1 και την CYC1 και συνδέεται με το κυτόχρωμα c. Επειδή είναι πολύ όξινη παίζει καταλυτικό ρόλο διατηρώντας σταθερό το περιβάλλον που βρίσκεται η αίμη της υπομονάδας CYC1 και προωθώντας την αλληλεπίδρασή της με τον μεταφορέα ηλεκτρονίων, κυτόχρωμα c. Η UQCRC2 με τη σειρά της είναι απαραίτητη για τον διμερισμό και αγκυστρώνεται πάνω στο σύμπλοκο μόνο μετά την επαφή της με την υπομονάδα UQCRC1 στο ένα μονομερές και με την UQCRQ στο άλλο (Smith et al., 2012).

Ίσως, η διατήρηση αυτών των παράλογων γονιδίων να εξηγείται από τη λειτουργική σημαντικότητα που έχουν τα προϊόντα τους. Η υπομονάδα UQCR11 παίζει ρόλο μόνο στη συναρμολόγηση και ίσως αυτή η έλλειψη αρνητικής και θετικής επιλογής να επέτρεψε τη διατήρηση των 2 αντιγράφων. Παρόλο που έχουν διαπιστωθεί μικρού μεγέθους οικογένειες γονιδίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (δηλαδή με μικρό αριθμό παράλογων γονιδίων), οι Τελεόστεοι φέρουν περισσότερα αντίγραφα απ' ό,τι τα άλλα Σπονδυλωτά. Αυτό, ίσως, εξηγείται από το πιο πρόσφατο τρίτο γύρο διπλασιασμού και από το ότι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία με πολλά περισσότερα ενδιατήματα απ' ό,τι τα άλλα Σπονδυλωτά. Τέτοιοι διπλασιασμοί γονιδίων προσδίδουν περισσότερα οφέλη και πλεονεκτήματα που διευκολύνουν τις προσαρμογές των Τελεόστεων. Τα γονίδια που βρέθηκαν να διατηρούνται από τους διπλασιασμούς και μένουν αναλλοίωτα μπορεί σε βάθος χρόνου εξελικτικά να αλλάζει η ρυθμισή τους και να υπάρχει διαφορική έκφραση στους ιστούς. Τα παράλογα γονίδια UQCRFS1, UQCRH και UQCRC2 που είναι διατηρημένα και παίζουν καταλυτικό ρόλο μπορεί να έχουν προκύψει από τα αποτελέσματα της διαφοροποίησης από την προγονική λειτουργία ή της διατήρησης της προγονικής λειτουργίας, ενώ όσον αφορά τα αντίγραφα του UQCR11 υποθέτουμε ότι επιλέγονται ουδέτερα, αφού παρατηρήθηκαν παράλογα όχι μόνο στους Τελεόστεους, αλλά και στον άνθρωπο και ίσως να έχουν προκύψει από την ανάπτυξη μιας νέας λειτουργίας, καθώς δεν είχαμε επίδραση κάποιας εξελικτικής πίεσης, όπως η δράση της αρνητικής επιλογής (purifying selection). Αυτό προκύπτει, επειδή η υπομονάδα δεν έχει κάποιο λειτουργικό ρόλο, καθώς και με απώλεια αυτής και παράλληλη προσθήκη φωσφολιπιδίων το σύμπλοκο διμερίζεται και λειτουργεί κανονικά. Από μία έρευνα που βασίστηκε στην απομόνωση και το

χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης Qcr10 στη ζύμη που αντιστοιχεί στην υπομονάδα UQCR11 στα θηλαστικά, έδειξε ότι η παρουσία της στα τελικά στάδια της συναρμολόγησης του Συμπλόκου είναι επιτακτική για τη σταθερή σύνδεση της σιδηροθειούχο πρωτεΐνη Rieske με το τελευταίο (Brandt et al., 1994). Τα επίπεδα έκφρασης και η ιστοειδικότητα των παράλογων γονιδίων αποτελεί σημάδι της λειτουργικής απόκλισης αυτών. Στα θηλαστικά που ανήκει και ο άνθρωπος, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των παράλογων σε μια οικογένεια, τόσο τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται, ενώ η ιστοειδικότητα αυξάνεται (Huminięski & Wolfe, 2004). Η απόκλιση στη λειτουργία μπορεί να συμβεί είτε μέσω της απόκτησης μιας καινούργιας λειτουργίας του ενός αντιγράφου είτε μέσω διαφοροποίησης της προγονικής λειτουργίας (Force et al., 1999). Τέτοιες αποκλίσεις στα διπλασιασμένα γονίδια, όπως αυτά που βρέθηκαν εδώ είναι δύσκολο να προσδιοριστούν, επειδή τα γονίδια ασκούν τους βιολογικούς τους ρόλους με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Επιπλέον, γονίδια με παρόμοια βιοχημική λειτουργία μπορούν και εκφράζονται σε διαφορετικούς χρόνους και σε διαφορετικούς ιστούς. Παρ' όλη την δυσκολία στην ενσωμάτωση και στη μέτρηση όλων των πολλαπλών πτυχών της γονιδιακής λειτουργικότητας σε ένα σύνολο, πολλά δεδομένα λειτουργικότητας είναι διαθέσιμα σε βάσεις δεδομένων. Για παράδειγμα, δεδομένα από μικροσυστοιχίες που περιέχουν τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε διαφορετικά περιβάλλοντα και με διαφορετική ιστοειδικότητα (Blanc & Wolfe, 2004). Με αυτό τον τρόπο μπορούν να παρέχεται το πρωτογενές υλικό για την μεγάλης κλίμακας ανάλυση των προτύπων έκφρασης των γονιδίων. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στη χρήση των δομημένων ελεγχόμενων λεξιλογίων (γνωστά ως οντολογίες) από τις βάσεις δεδομένων για την αντιπροσώπευση και αποθήκευση βιολογικών πληροφοριών με αποτέλεσμα την ταξινόμηση των γονιδίων σε οντολογίες με βάση τη λειτουργικότητα τους, ένας τομέας που μπορεί να βοηθήσει στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της λειτουργικής ανάλυσης. Είναι σημαντικό να διεξαχθούν στο μέλλον λειτουργικές μελέτες με εξειδίκευση στα γονίδια που συναποτελούν το Σύμπλοκο III καθώς και μελέτες για τις υπόλοιπες οικογένειες γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με τη σύγκριση και ανάλυση γονιδιωμάτων για την εύρεση αντιστοιχίας των διπλασιασμών στη

γονιδιακή δομή των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επίσης, εξελικτικά μοντέλα θα πρέπει να εξεταστούν για τη μη διατήρηση των παράλογων γονιδίων μέσα στις πολυγονιδιακές οικογένειες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αναλύσεις της έκφρασης αυτών των γονιδίων και φυλογενετικές αναλύσεις των υπόλοιπων Συμπλόκων που θα αναδείξουν την εξελικτική ιστορία των διάφορων παράλογων μέσα στις οικογένειες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι πιθανό να οδηγήσουν σε μία πιο πλήρη εικόνα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bridges, C.B. (1936) The Bar 'gene' a duplication. *Science* 83, 210-211.
2. Stephens, S.G. (1951) Possible significance of duplication in evolution. *Adv. Genet.* 4, 247–265
3. Ohno, S. (1967) *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*, Springer
4. Susumu, O. (1970). *Evolution by gene duplication*. New York : Springer-Verlag
5. Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: An update. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(6), 292–298
6. Li W-H. 1997. *Molecular evolution*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
7. Lynch M. 2007a. *The origins of genome architecture*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
8. Hahn, M. W. (2009). Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates. *Journal of Heredity*, 100(5), 605–617.
9. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2011). *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
10. Hurles, Matthew; et al. (2006), "Recombination Hotspots in Nonallelic Homologous Recombination", *Genomic Disorders: The Genomic Basis of Disease*, Humana Press, pp. 341–355
11. Moore JK, Haber JE (May 1996). "Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and Cellular Biology*. **16** (5): 2164–73
12. Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H. 2006. Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:3220–3225.
13. Maere, S., De Bodt, S., Raes, J., Casneuf, T., Van Montagu, M., Kuiper, M., & Van de Peer, Y. (2005). Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15), 5454–5459.
14. Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research*, 15(10), 1456–1461.
15. Paterson AH, Chapman BA, Kissinger JC, Bowers JE, Feltus FA, Estill JC. 2006. Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in *Arabidopsis*, *Oryza*, *Saccharomyces* and *Tetraodon*. *Trends Genet.* 22:597–602
16. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. 2001. Segmental duplications: organization and impact within the current Human Genome Project assembly. *Genome Res.* 11:1005–1017.
17. Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. 2001. Segmental duplications: organization and impact within the current Human Genome Project assembly. *Genome Res.* 11:1005–1017.
18. Wolfe, K. H. & Shields, D. C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–713 (1997).
19. Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045–1060.
20. Van De Peer, Y., Maere, S., & Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 725–732.
21. Masel, Joanna (25 October 2011). "Genetic drift". *Current Biology*. Cambridge, MA: Cell Press. **21** (20): R837–R838.
22. Molles, MC (2010). *Ecology Concepts and Applications*. McGraw-Hill Higher Learning.
23. Moore, R. C., & Purugganan, M. D. (2003). The early stages of duplicate gene evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15682–15687.
24. Lynch, M., & Force, A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, 154(1), 459–473.
25. Walsh JB. How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics*. 1995 Jan;139(1):421–428

26. Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, Smith JM. Evolution of genetic redundancy. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):167–171.
27. Kondrashov FA, Kondrashov AS. 2006. Role of selection in fixation of gene duplications. *J Theor Biol*. 239:141–151.
28. Kondrashov FA, Rogozin I, Wolf Y, Koonin E. 2002. Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biol*. 3:research0008.1–research0008.9.
29. Sugino RP, Innan H. 2006. Selection for more of the same product as a force to enhance concerted evolution of duplicated genes. *Trends Genet*. 22:642–644.
30. Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*. 1999;151:1531–1545
31. Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045–1060.
32. Meyer, A., & Van De Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays*, 27(9), 937–945.
33. Rastogi, S.; Liberles, D. A. (2005). "Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization". *BMC Evolutionary Biology*. 5 (1): 28
34. He, X., & Zhang, J. (2005). Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics*, 169(2), 1157–1164.
35. Lynch, M., & Conery, J. S. (2001). The Evolutionary fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science*, 290(5494), 1151–1155.
36. Semon, M. & Wolfe, K. H. Reciprocal gene loss between Tetraodon and zebrafish after whole genome duplication in their ancestor. *Trends Genet*. 23,108–112 (2007).2
37. Edger, P. P., & Pires, J. C. (2009). Gene and genome duplications: The impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Research*, 17(5), 699–717.
38. Freeling, M. (2009). Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome segmental, or by transposition. *Annu. Rev. Plant Biol*. 60, 433–453.
39. Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2015). Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 28(Figure 1), 1–9.
40. Friedman, R., and A. L. Hughes. 2001. Pattern and timing of gene duplication in animal genomes. *Genome Research* 11:1842–1847.
41. Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H: Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 2006, 439:965-968
42. Boulrat SJ, Juliusdottir T, Lowe CJ, Freeman R, Aronowicz J, Kirschner M, Lander ES, Thorndyke M, Nakano H, Kohn AB et al.: Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature* 2006, 444:85-88.
43. Ohno, S. (1999). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970–1999. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10(5), 517–522.
44. Caputo Barucchi, V., Giovannotti, M., Nisi Cerioni, P., & Splendiani, A. (2013). Genome duplication in early vertebrates: Insights from agnathan cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2–3), 80–89.
45. Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Van de Peer Y: Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between rayfined fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:1638-1643.
46. McLysaght A, Hokamp K, Wolfe KH: Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat Genet* 2002, 31:200-204.
47. Gu X, Wang Y, Gu J: Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate evolution. *Nat Genet* 2002, 31:205-209

48. Meyer, A., & Schartl, M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: The one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 699–704.
49. Wittbrodt J, Meyer A, Schartl M. 1998. More genes in fish? *BioEssays* 20:511–515
50. Aparicio S, et al. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301–1310.
51. Jaillon O, et al. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 31:946–957.
52. Sato, Y., & Nishida, M. (2010). Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution. *Environmental Biology of Fishes*, 88(2), 169–188.
53. Dehal P, Boore JL (2005) Two Rounds of Whole Genome Duplication in the Ancestral Vertebrate. *PLOS Biology* 3(10): e314.
54. Panopoulou, G., & Poustka, A. J. (2005). Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications - The adventure of a hypothesis. *Trends in Genetics*, 21(10), 559–567.
55. Nakatani, Y., Takeda, H., Kohara, Y., & Morishita, S. (2007). Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Research*, 17(9), 1254–1265.
56. Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E. K., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., ... Rokhsar, D. S. (2008). The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453(7198), 1064–1071.
57. Allendorf, F.W. and G.H. Thorgaard, 1984. Tetraploidy and the evolution of Salmonid fishes. p. 1-53. In B.J. Turner (ed.) *Evolutionary genetics of fishes*. Plenum Publishing Corporation, New York.
58. Moghadam, H.K., Ferguson, M.M., Danzmann, R.G., 2005. Evolution of Hox clusters in Salmonidae: a comparative analysis between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Mol. Evol.* 61,636–649.
59. Blomme, T. et al. The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution. *Genome Biol.* 7, R43 (2006).
60. Brunet, F. G. et al. Gene loss and evolutionary rates following whole-genome duplication in teleost fishes. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1808–1816 (2006).
61. Papp, B., Pal, C. & Hurst, L. D. Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* 424,194–197 (2003).
62. Birchler, J. A., Riddle, N. C., Auger, D. L. & Veitia, R. A. Dosage balance in gene regulation: biological implications. *Trends Genet.* 21, 219–226 (2005).
63. Freeling, M. & Thomas, B. C. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity. *Genome Res.* 16, 805–814 (2006).
64. Setiamarga DH, Miya M, Yamanoue Y, Azuma Y, Inoue JG, Ishiguro NB, Mabuchi K, Nishida M (2009) Divergence time of the two regional medaka populations in Japan as a new time scale for comparative genomics of vertebrates. *Biol Lett* 5(6):812–816
65. Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2012). Polyploidy and genome evolution. *Polyploidy and Genome Evolution* (Vol. 9783642314421).
66. “Lehninger Βασικές Αρχές Βιοχημείας”, D. L.Nelson, M. Cox, Μετάφραση, 4<sup>η</sup> έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2007
67. Crofts, A. R. (2004). The Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex: Function in the Context of Structure. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 689–733.
68. Van Holde, K., Ho, P. and Johnson, W. (2006). *Principles of physical biochemistry*. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Education International.
69. Smith, P. M., Fox, J. L., & Winge, D. R. (2012). Biogenesis of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex and role of assembly factors. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(2), 276–286



70. Fernandez-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M (2009) Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 1793: 200–211.
71. M.A. Ramos-Arroyo, J. Hualde, A. Ayechu, L. De Meirleir, S. Seneca, N. Nadal, P. Briones, Clinical and biochemical spectrum of mitochondrial complex III deficiency caused by mutations in the BCS1L gene, *Clin. Genet.* 75 (2009) 585–587.
72. Tucker, E. J., Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., Mountford, H. S., Wijeyeratne, X.W., van den Brand, M. A. M., ... Thorburn, D. R. (2013). Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLoS Genetics*, 9(12).
73. Baxevanis A.D. & Ouellette F. (Ελληνική έκδοση). 2004. Βιοπληροφορική. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. Αθήνα (Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Ευάγγελος Ν. Μουδριανάκης, Σταύρος Ι. Χαμόδρακας).
74. Luscombe, N. M., Greenbaum, D., & Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods of Information in Medicine*, 40(4), 346–358.
75. Searls, D.B. and Rogers, K. "Computational Biology". *Encyclopedia Britannica Online*. Encyclopedia Britannica Inc., n.d. Web. 15 Nov. 2012.
76. Wei, L., Liu, Y., Dubchak, I., Shon, J., & Park, J. (2002). Comparative genomics approaches to study organism similarities and differences. *Journal of Biomedical Informatics*, 35(2), 142–150.
77. Venkatesh B, Tay A, Dandona N, Patil JG, Brenner S. A compact cartilaginous fish model genome. *Curr Biol.* 2005;15:R82–R83
78. Amemiya CT, Alfoldi J, Lee AP, et al. (2013). "The African coelacanth genome provides insight into tetrapod evolution". *Nature*. 496 (7445): 311–316
79. Braasch, I., Gehrke, A. R., Smith, J. J., Kawasaki, K., Manousaki, T., Pasquier, J., ... Postlethwait, J. H. (2016). The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genetics*, 48(4), 427–437
80. Attwood T.K., Gisel A.; Eriksson N-E. & Bongcam-Rudloff E. (2011). "Concepts, Historical Milestones and the Central Place of Bioinformatics in Modern Biology: A European Perspective". *Bioinformatics - Trends and Methodologies*. InTech. Retrieved 8 Jan 2012.
81. Altman RB (March 2004). "Building successful biological databases". *Brief. Bioinformatics*. 5 (1): 4–5).
82. Hubbard T, Barker D, Birney E, Cameron G, Chen Y, Clark L, et al. The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):38–41
83. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
84. Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30(22): 3276-3278
85. Edgar R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32 1792–1797.
86. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2017). MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
87. Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ & Hillis DM (1996). Phylogenetic Inference. In Hillis DM, Moritz D, and Mable BK, editors, *Molecular Systematics*, pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
88. Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42(2), 182–192.
89. De Grassi, A., Caggese, C., D'Elia, D., Lanave, C., Pesole, G., & Saccone, C. (2005). Evolution of nuclear encoded mitochondrial genes in Metazoa. *Gene*, 354(1–2 SPEC. ISS.), 181–188.
90. U. Brandt, S. Uribe, H. Schagger, B.L. Trumpower, Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 12947–12953.
91. Huminięcki, L., Wolfe, K.H., 2004. Divergence of spatial gene expression profiles following species-specific gene duplications in human and mouse. *Genome Res.* 14, 1870–1879.
92. Blanc, G., & Wolfe, K. H. (2004). Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during Arabidopsis Evolution Author ( s ): Guillaume Blanc and Kenneth H . Wolfe Source : *The Plant Cell* , Vol . 16 , No . 7 ( Jul . , 2004 ) , pp . 1679-1691 Published by : American Society of The Plant Cell, 16(7), 1679–1691.

