



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΜΠΟΥΜΠΑ ΔΗΜΗΤΡΗ

“Ανάλυση πολυμορφισμών του γονιδίου *ndufs8b* σε άτομα του είδους *Dicentrarchus labrax*”

“Polymorphism analysis of *ndufs8b* gene in the teleost *Dicentrarchus labrax*”



Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία

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

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Το γονιδίωμα των σπονδυλωτών και γενωμικοί διπλασιασμοί (WGD).....	6
1.2 Το λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>) και η οικονομική του σημασία.....	7
1.3 Η πολυπλοειδία των τελεοστέων σαν εξελικτικός παράγοντας	8
1.4 Η σημασία του γενωμικού διπλασιασμού(WGD) στην εξέλιξη των διπλασιασμένων γονιδίων.....	9
1.5 Το πεπρωμένο των διπλασιασμένων γονιδίων	10
1.6 Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	13
1.7 Ο ρόλος του συμπλόκου I.....	13
1.8 Δομή του συμπλόκου I	15
1.9 Υπομονάδες του συμπλόκου I και λειτουργίες τους.....	16
1.10 Διπλός γενωμικός έλεγχος των υπομονάδων του συμπλόκου I	17
1.11 Οργάνωση του συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.....	18
1.12 Η συναρμολόγηση του συμπλόκου I.....	18
1.13 Το γονίδιο <i>ndufs8</i> και ο ρόλος του στο σύμπλοκο I.....	19
1.14 Σκοπός της διπλωματικής	20
2. Υλικά και Μέθοδοι	21
2.1 Πειραματική διαδικασία	21
2.2 Επιλογή δειγμάτων	21
2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από βιολογικούς ιστούς	21
2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	23
2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA	25
2.6 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)	26
2.7 Καθαρισμός των δειγμάτων	28
3. Αποτελέσματα	29
3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από βιολογικούς ιστούς	29
3.2 PCR	29
3.3 SSCP.....	30
3.4 Αλληλούχηση.....	31

4. Συζήτηση	33
4.1 Ο ρόλος του γονιδίου ndufs8b.....	33
4.2 Ο βαθμός συντήρησης του γονιδίου ndufs8b	33
4.3 Μελλοντικές έρευνες.....	34
4.4 Συμπέρασμα	34

Περίληψη

Ο γενωμικός διπλασιασμός που συνέβη στους τελεόστους (fish-specific genome duplication) είχε αποτέλεσμα πολλά γονίδια, όπως και το γονίδιο *ndufs8* του είδους *Dicentrarchus labrax* να βρίσκονται σε δύο αντίγραφα. Τα δύο παράλογα γονίδια *ndufs8a* και *ndufs8b* αποτελούν μέρος του πρώτου συμπλόκου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και προς το παρόν δεν είναι γνωστές οι διαφορές αυτών των γονιδίων τόσο στη λειτουργία τους, αλλά και στον τρόπο που επηρεάζουν το φαινότυπο ενός ατόμου. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία στοχεύει στη διερεύνηση του γενετικού πολυμορφισμού *ndufs8b* σε άτομα του είδους *Dicentrarchus labrax*. Τα αποτελέσματα του πειράματος βέβαια, έδειξαν ότι όλα άτομα που εξετάστηκαν για πολυμορφισμούς στο γονίδιο *ndufs8b*, είχαν το ίδιο αλληλόμορφο.

Abstract

The whole genome duplication which occurred in the teleost lineage (fish-specific genome duplication) resulted in the duplication of many genes, including gene *ndufs8* in the species *Dicentrarchus labrax*. The two paralog genes, *ndufs8a* and *ndufs8b*, are part of the first complex of oxidative phosphorylation, and for the time being, differences on the way they work and affect the phenotype of individual are unknown. **This bachelor's thesis plans in** exploring polymorphisms of gene *ndufs8b* in members of the species *Dicentrarchus labrax*. The results of this experiment however, showed that all of the samples which were tested for polymorphisms in the gene *ndufs8b*, had the same allele.

1. Εισαγωγή

1.1 Το γονιδίωμα των σπονδυλωτών και γενωμικοί διπλασιασμοί (WGD)

Ο πιο απλός τρόπος περιγραφής του γενώματος των σπονδυλωτών είναι μέσω της χρήσης του μοντέλου 1-2-4, σύμφωνα με το οποίο συνέβησαν 2 γενωμικοί διπλασιασμοί (Whole Genome Duplications WGD) νωρίς στην εξέλιξη των δευτεροστόμιων (Meyer & Schartl 1999). Ο πρώτος διπλασιασμός είναι πιθανό να προηγείται της Κάμβριας έκρηξης οδηγώντας τα χορδωτά να έχουν σε δύο αντίγραφα το αρχέγονο γονιδίωμα των πρωτοχορδωτών. Ο δεύτερος έγινε στις αρχές της Δεβόνιας περιόδου ανεβάζοντας τον αριθμό των αντιγράφων σε 4 (1-2-4) (Sidow 1996). Αποδείξεις του παραπάνω μοντέλου αποτελούν έρευνες σε σπονδυλωτά που έχουν δείξει ότι γονίδια από την ίδια οικογένεια πολύ συχνά οργανώνονται σε συμπλέγματα γονιδίων (gene clusters) και διατηρούν την ίδια σειρά εντός αυτού του συμπλέγματος ακόμα και αν βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Εμφανίζουν δηλαδή μια συνταινία (synteny) (Pebusque et al. 1998). Οι συνταίνιες διατηρούνται για μεγάλες εξελικτικές αποστάσεις και ως αποτέλεσμα εντοπίζεται η ίδια σειρά γονιδίων μέσα στα ορθόλογα γονιδιακά συμπλέγματα σε μακρινούς απογόνους: π.χ. μεταξύ ψαριών και ποντικών, ή ανθρώπων. Η εκτεταμένη ομολογία γενετικών τόπων μεταξύ μακρινών εξελικτικά απογόνων αποτελεί το μεγαλύτερο επιχείρημα ότι οι διπλασιασμοί αυτοί που παρατηρούνται σε πολλαπλά γονίδια των χορδωτών δεν αποτελούν μεμονωμένα γεγονότα, αλλά είναι πολύ πιο πιθανό να είναι αποτελέσματα ενός μοναδιαίου διπλασιασμού όλου του γονιδιώματος (WGD) που συνέβη στον κοινό πρόγονο των χορδωτών (Meyer & Schartl 1999).

Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχουν μαζευτεί αρκετά στοιχεία για να υποθέσουν έναν επιπλέον γονιδιωματικό διπλασιασμό που συνέβη κατά τη Δεβόνια περίοδο πριν από 320-400 εκατομμύρια χρόνια μέσα στη γενεολογία των ακτινοπτερυγίων (fish-specific genome duplication FSGD)(Tailor et al. 2001). Η πρώτη υπόθεση έγινε όταν ανακαλύφθηκε ότι το είδος ψάρι-ζέβρα και άλλα είδη τελεοστέων έχουν παραπάνω από 4 γονιδιακά συμπλέγματα *Hox* (συνήθως 5 με 7) που δε δικαιολογούνται από το

μοντέλο 1-2-4 (Meyer & Schartl 1999). Αργότερα ανακαλύφθηκαν πολλαπλά γονίδια τα οποία υπάρχουν σε δύο αντίγραφα στους ακτινοπερυγίους, αλλά μόνο σε ένα αντίγραφο στα υπόλοιπα χορδωτά. Επιπλέον, συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση έδειξε ότι όλα τα διπλασιασμένα αυτά γονίδια εμφανίζουν συνταινία και προέκυψαν την ίδια χρονική περίοδο. Όλα αυτά κάνουν την υπόθεση για ένα διπλασιασμό της γενετικής πληροφορίας των ακτινοπερυγίων (FSGD) πολύ πιο πιθανή από πολυάριθμους μοναδιαίους διπλασιασμούς περιοχών του DNA που έτυχε να γίνουν την ίδια χρονική στιγμή (Meyer & Van de Peer 2003).

1.2 Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η οικονομική του σημασία

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση του είδους *D. labrax*

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

Γονιδίωμα και Συστηματική κατάταξη

Το λαβράκι κατατάσσεται στους τελεοστέους, μία από τις τρεις υπερτάξεις των ακτινοπερυγίων (βλ. Πίνακα 1 για την συστηματική κατάταξη του *D. labrax*). Αυτό σημαίνει ότι το γονιδίωμα του, που σήμερα είναι οργανωμένο σε 24 χρωμοσώματα, επηρεάστηκε από το διπλασιασμό που συνέβη μέσα στη γενεολογία των ακτινοπερυγίων κατά τα τέλη της Δεβόνιας περιόδου, με αποτέλεσμα πολλά γονίδια και οικογένειες γονιδίων να βρίσκονται σε δύο αντίγραφα (Tine et al. 2014).

Γεωγραφική αποίκηση

Το λαβράκι συναντάται συνήθως σε παράκτια ύδατα, στα οποία και αναπαράγεται, αλλά έχει και τη δυνατότητα να εισέλθει και να επιβιώσει και σε υφάλμυρα νερά, μέχρι και νερά ποταμών. Το γεγονός ότι τα λαβράκια επιβιώνουν σε ποσοστά αλατότητας 0-60 psu, τα κατατάσσει στα ευρύαλα ψάρια (euzyhaline), δηλαδή

ψάρια που λόγω ειδικών προσαρμογών του ωσμωρυθμιστικού τους συστήματός τους, έχουν την δυνατότητα να επιβιώσουν σε νερά ποικίλης αλατότητας. Επιπλέον, τα λαβράκια χωρίζονται σε δύο ξεχωριστές γενεολογικές γραμμές όπου η μία καταλαμβάνει περιοχές του βορειοανατολικού Ατλαντικού ωκεανού και η άλλη συναντάται στη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα. Αυτές οι γενεολογικές γραμμές συναντώνται μεταξύ τους, και υβριδοποιούνται φυσικά στη θάλασσα του Αλμποράν (Tine et al. 2014). Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η έρευνα έγινε πάνω σε άτομα της γενεολογίας της Μεσογείου.

Οικονομική σημασία

Το λαβράκι είναι από τα πρώτα είδη ψαριών που άρχισαν να εκτρέφονται μαζικά σε ιχθυοκαλλιέργειες στην Ευρώπη. Σήμερα η παραγωγή του αποτελεί την τέταρτη μεγαλύτερη, αφού το 2010 κινήθηκαν στην αγορά παραπάνω από 120.000 τόνοι λαβρακιού. Από τις χώρες με μεγαλύτερη παραγωγή στο λαβράκι αποτελούν η Ισπανία, Ιταλία, Κροατία, Αίγυπτος, Τουρκία και Ελλάδα (Tine et al. 2014).

1.3 Η πολυπλοικότητα των τελεοστέων σαν εξελικτικός παράγοντας

Αρχικά θεωρούνταν ότι ο γενωμικός διπλασιασμός των ακτινοπετερύγιων ήταν το αίτιο που οδήγησε στη ραγδαία αποκλίνουσα εξέλιξη των τελεοστέων ώστε να είναι σήμερα το πολυπληθέστερο φύλο των σπονδυλωτών με τον μεγαλύτερο αριθμό ειδών, που καταλαμβάνουν τόσο διαφορετικές οικολογικές θέσεις (Meyer & Van de Peer 2003). Αντιθέτως, αν τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από απολιθώματα είναι ακριβή, φαίνεται ότι υπήρξε μια μεγάλη χρονική περίοδος μεταξύ του γενωμικού διπλασιασμού μέσα στη γενεολογία των ακτινοπετερύγιων και την απότομη αύξηση των ειδών των τελεοστέων, όπως και των οικολογικών θέσεων που καταλαμβάνουν (Postlethwait et al. 2004). Συνεπώς, είναι δύσκολο ο γενωμικός διπλασιασμός αυτός να ήταν η μοναδική κινητήρια δύναμη πίσω από την εξέλιξη των τελεοστέων (Meyer & Van de Peer 2003).

Βέβαια, είναι αναμφισβήτητο ότι η περίσσεια γενετικής πληροφορίας ήταν απαραίτητη για την εξέλιξη των τελεοστέων. Συνήθως η πολυπλοικότητα οδηγεί σε

εξελικτικό αδιέξοδο, αλλά υπάρχουν και αρκετά παραδείγματα πολυπλοειδών οργανισμών που φαίνεται να είχαν πλεονεκτήματα συγκριτικά με αντίστοιχους διπλοειδείς οργανισμούς (Meyer and Van de Peer 2003). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι πολυπλοειδείς οργανισμοί μπορούν πιο εύκολα να αλλάξουν περιβάλλον και οικοσύστημα ή να επεκταθούν πιο εύκολα σε καινούρια οικοσυστήματα, συγκριτικά με αντίστοιχους απλοειδείς οργανισμούς, έχοντας έτσι σημαντικά χαμηλότερο ρίσκο αφανισμού (Fawcett et al. 2009). Επιπροσθέτως, ταχύτατες γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν μετά από διπλασιασμό όλου του γενώματος επιτρέπουν στους πολυπλοειδείς οργανισμούς να προσαρμοστούν πολύ πιο γρήγορα σε καινούριο περιβάλλον (Osborn et al. 2003). Τέλος, η ύπαρξη της γενετικής πληροφορίας σε παραπάνω από ένα αντίγραφα κάνει τον οργανισμό πολύ πιο ανθεκτικό σε μεταλλάξεις, ή τροποποιήσεις που οδηγούν στην έλλειψη ή τη διαγραφή σημαντικών μερών ενός γονιδίου, διότι το ένα παράλογο γονίδιο μπορεί να υποκαταστήσει τη δράση του άλλου (Otto & Whitton, 2000). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι ο διπλασιασμός του γενώματος των ακτινοπτερύγιων έδωσε την απαραίτητη βάση για την ραγδαία εξέλιξη και αύξηση πολυπλοκότητας που έλαβε χώρα στους τελοστέους και ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες και η εξελικτική πίεση που ακολούθησε του διπλασιασμού «ανάγκασε» και οδήγησε στη χρήση των επιπρόσθετων πλεονεκτημάτων που προσέφερε η πολυπλοειδία (Meyer and Van de Peer 2003).

1.4 Η σημασία του γενωμικού διπλασιασμού(WGD) στην εξέλιξη των διπλασιασμένων γονιδίων

Σύμφωνα με τη θεωρία της ισορροπίας γονιδιακής δόσης (gene dosage-balance hypothesis) το πόσο εκφράζεται ένα γονίδιο σε έναν οργανισμό ελέγχεται αυστηρά από εσωτερικούς μηχανισμούς ρύθμισης του οργανισμού (π.χ. επιγενετικές τροποποιήσεις, μεταγραφικοί παράγοντες) ώστε τα προϊόντα του γονιδίου να βρίσκονται πάντα σε μια συγκεκριμένη «δόση». Αυτός είναι ο λόγος που πολλοί μοναδιαίοι διπλασιασμοί γονιδίων χάνονται λόγω ανενεργότητας το ενός παραλόγου. Εάν, για παράδειγμα, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο διπλασιαστεί σε έναν οργανισμό, οι μεταγραφικοί παράγοντες

που θα επάγουν την έκφραση του γονιδίου μένουν στον ίδιο βαθμό. Ως αποτέλεσμα, η έκφραση του γονιδίου θα παραμείνει στον ίδιο βαθμό, ανεξαρτήτως του γεγονότος ότι πλέον η γενετική πληροφορία υπάρχει σε 2 αντίγραφα (Birchler and Veitia 2007). Σε περιπτώσεις διπλασιασμού ολόκληρου του γενώματος (WGD) συνεχίζει να ισχύει η θεωρία της ισορροπίας γονιδιακής δόσης διότι δεν αλλάζει η έκφραση ενός ή δύο γονιδίων. Όλη η γενετική πληροφορία, μαζί με τους μηχανισμούς ρύθμισης που περιλαμβάνει, απλά βρίσκεται σε διπλάσια ποσότητα. Παραδόξως, ο διπλασιασμός ολόκληρου του γενώματος μπορεί να φέρει αλλαγές στη «δόση» (έκφραση) κάποιων γονιδίων σε βάθος χρόνου. Μετά από ένα γενωμικό διπλασιασμό συμβαίνουν απότομες ανακατατάξεις της περίσσειας γενετικής πληροφορίας οδηγώντας έτσι στην ταχύτερη απενεργοποίηση ή την απώλεια ενός μέρους αυτής. Κατά την διάρκεια αυτών των ανακατατάξεων, ένα μέρος της γενετικής πληροφορίας θα μπορούσε να μείνει अपαράλλακτη, δηλαδή απλά να συνεχίζει να εκφράζεται σε διπλάσιο βαθμό ενώ τα περισσότερα διπλασιασμένα γονίδια που είχαν προκύψει σταδιακά να χάνονται (Conant & Wolfe 2008).

Όπως φαίνεται, έχει μεγάλη σημασία αν η προέλευση ενός διπλασιασμένου γονιδίου είναι από μερικό διπλασιασμό της γενετικής πληροφορίας, ή από διπλασιασμό ολόκληρου του γενώματος. Για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, έχει αποδειχθεί ότι διπλασιασμένα γονίδια που προκύπτουν από WGD (Whole Genome Duplication) εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης (Seoighe & Wolfe 1999), μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με πρωτεϊνικά μόρια και μεγαλύτερο βαθμό αποκλίνουσας εξέλιξης συγκριτικά με γονίδια που προκύπτουν από μερικό διπλασιασμό του γενώματος ενός οργανισμού (Guan et al. 2007).

1.5 Το πεπρωμένο των διπλασιασμένων γονιδίων

Από τη στιγμή που συμβεί ο διπλασιασμός του γενώματος σε ένα άτομο, ασκείται στα διπλασιασμένα γονίδια η εξελικτική πίεση για να σταθεροποιηθούν στον πληθυσμό του ατόμου, ή να απενεργοποιηθούν/χαθούν (Glasauer & Neuhauss 2014). Αν ο διπλασιασμός δεν προσφέρει κανένα πλεονέκτημα ή μειονέκτημα, δηλαδή είναι

εξελικτικά ουδέτερος, έχει πιθανότητα $1/2N$ (N = ενεργό μέγεθος πληθυσμού) να σταθεροποιηθεί σε έναν πληθυσμό και απαιτούνται περίπου $4N$ γενιές μέχρι να γίνει. Όπως φαίνεται ένας εξελικτικά ουδέτερος διπλασιασμός είναι πολύ δύσκολο να σταθεροποιηθεί στον πληθυσμό και χρειάζεται αρκετό χρόνο, επομένως ένα μεγάλο μέρος των διπλασιασμένων γονιδίων μετά από διπλασιασμό όλου του γενώματος χάνεται (Zhang 2003). Παραπάνω περιγράφεται η ευκολία με την οποία εξαφανίζεται ένα από τα δύο παράλογα γονίδια, αλλά υπάρχουν και οι πιθανότητες να σταθεροποιηθούν και να έχουν κάποια λειτουργία μέσα στον πληθυσμό. Τα πεπρωμένα στα οποία επάγεται ένα διπλασιασμένο γονίδιο είναι τα παρακάτω:

- 1) Δημιουργία Ψευδογονιδίου (Pseudogenization)/Παύση λειτουργίας (Non-functionalization)
- 2) Διατήρηση της αρχικής γονιδιακής λειτουργίας
- 3) Εξειδίκευση λειτουργίας (Subfunctionalization)
- 4) Εύρεση καινούριας λειτουργίας (Neofunctionalization)

Δημιουργία ψευδογονιδίων/Παύση λειτουργίας

Ο διπλασιασμός ενός γονιδίου σημαίνει ότι προκύπτουν δύο ταυτόσημα γονίδια που περιέχουν ακριβώς την ίδια γενετική πληροφορία. Πολύ συχνά λόγω αυτής της περισσεύσεως γενετικής πληροφορίας υπάρχει πολύ χαμηλή εξελικτική πίεση όσον αφορά την επιλογή των γονιδίων με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε ένα από τα δύο παράλογα γονίδια. Οι πιθανότητες να συμβεί μια συμφέρουσα μετάλλαξη είναι πολύ μικρότερη από την πιθανότητα να σχηματιστεί ένα κωδικόνιο λήξης μέσα σε κωδική περιοχή του γονιδίου, ή γενικά οποιαδήποτε άλλη μετάλλαξη που δεν ωφελεί τον οργανισμό. Συνεπώς, σε ένα από τα 2 παράλογα γονίδια συσσωρεύονται μεταλλάξεις που το κάνουν όλο και λιγότερο λειτουργικό και τελικά το γονίδιο είτε απενεργοποιείται και μετατρέπεται σε ψευδογονίδιο, ή με την πάροδο του χρόνου χάνεται εντελώς (Zhang 2003, Glasauer & Neuhauss 2014). Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι η ταχύτητα με την οποία χάνονται γονίδια μετά από γενωμικό διπλασιασμό είναι πολύ μικρότερη από την αναμενόμενη, γεγονός που ίσως υποδεικνύει περισσότερους μηχανισμούς επιλογής

που δεν είναι ακόμα τελείως κατανοητοί (Meyer & Schartl 1999, Glasauer & Neuhauss 2014).

Διατήρηση της αρχικής γονιδιακής λειτουργίας

Πολλές φορές ο διπλασιασμός ενός γονιδίου είναι ωφέλιμος για τον οργανισμό απλά επειδή το επιπλέον ενεργό αντίγραφο οδηγεί σε περισσότερη παραγωγή της πρωτεΐνης η οποία σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι ωφέλιμη προς το άτομο που την παράγει. Σε τέτοιες περιπτώσεις, το φαινόμενο κατά το οποίο τα γονίδια παραμένουν και τα δύο μεταγραφικά ενεργά, ενώ αποκλίνουν ελάχιστα μεταξύ τους και ασκείται και πολύ μεγάλη εξελικτική πίεση έτσι ώστε να διατηρούν την αρχική τους λειτουργία λέγεται συντονισμένη εξέλιξη (concerted evolution (Zhang 2003).

Εξειδίκευση λειτουργίας

Συνήθως είναι σπάνιο ένας οργανισμός να επωφελείται από την ύπαρξη και την ενεργότητα δύο ταυτόσημων γονιδίων χωρίς να χαθεί το ένα παράλογο στην πορεία του χρόνου (Zhang 2003). Επίσης τα περισσότερα γονίδια έχουν παραπάνω από μία λειτουργίες, οπότε συχνά μεταλλάξεις οδηγούν τα παράλογα γονίδια να χάσουν ένα κομμάτι της λειτουργίας τους και έτσι να εξειδικευτούν περισσότερο σε ένα άλλο κομμάτι, ενώ οι δράσεις τους αλληλοσυμπληρώνονται. Τελικώς σταθεροποιούνται στον πληθυσμό, διότι πλέον η απώλεια του ενός σημαίνει έλλειψη μιας βασικής λειτουργίας που είχε το μητρικό γονίδιο. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται εκτός εξελικτικής πίεσης, αλλά λόγω γενετικής παρέκκλισης (Force et al.1999). Πάραυτα, έχουν υπάρξει και περιπτώσεις όπου παράλογα γονίδια έχουν αποκλίνει και έχουν σταθεροποιεί σε έναν πληθυσμό λόγω της μεγάλης εξελικτικής πίεσης και ανάγκης που υπήρχε για εξειδίκευση σε συγκεκριμένες λειτουργίες (DesMarais & Rausher 2008, Glasauer & Neuhauss 2014).

Εμφάνιση καινούριας λειτουργίας

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, πολύ σπάνια θα παραμείνουν απaráλλακτα δυο παράλογα γονίδια μετά από γενωμικό διπλασιασμό. Πολύ συχνά η δράση του μητρικού γονιδίου θα υποκατασταθεί από το πρώτο από τα δύο παράλογα, ενώ το άλλο

λόγω της χαμηλής εξελικτικής πίεσης θα συσσωρεύσει μεταλλάξεις. Σπανίως μπορεί να συμβεί μια ωφέλιμη μετάλλαξη στο δεύτερο παράλογο που να του δώσει μια καινούρια λειτουργία, δίνοντας στο άτομο που το φέρει εξελικτικό πλεονέκτημα και έτσι και τα δύο παράλογα να σταθεροποιηθούν στον πληθυσμό, με διαφορετικές πλέον δράσεις (Hughes 1994, Conant & Wolfe 2008).

1.6 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Ως οξειδωτική φωσφορυλίωση ορίζεται το σύνολο των χημικών αντιδράσεων που γίνονται στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την αερόβια αναπνοή με τελικό σκοπό τη σύνθεση ATP από ADP και ανόργανα συστατικά, χάρη της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά την οξείδωση τροφών. Οι ενζυμικές διαδικασίες πραγματοποιούνται από συνολικά 5 ενζυμικά σύμπλοκα, των οποίων οι δράσεις αναφέρονται παρακάτω:

Σύμπλοκο I: οξείδωση του NADH κατά δύο ηλεκτρόνια μέσω ουβικινόνης

Σύμπλοκο II: οξείδωση ηλεκτρικού σε φουμαρικό και αναγωγή ουβικινόνης

Σύμπλοκο III: οξείδωση ουβικινόλης και αναγωγή κυτοχρώματος C

Σύμπλοκο IV: μεταφορά ηλεκτρονίων σε οξυγόνο και άντληση πρωτονίων διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου

Σύμπλοκο V: σύνθεση ATP από ADP και φωσφορικό μέσω χρήσης της βαθμίδωσης πρωτονίων

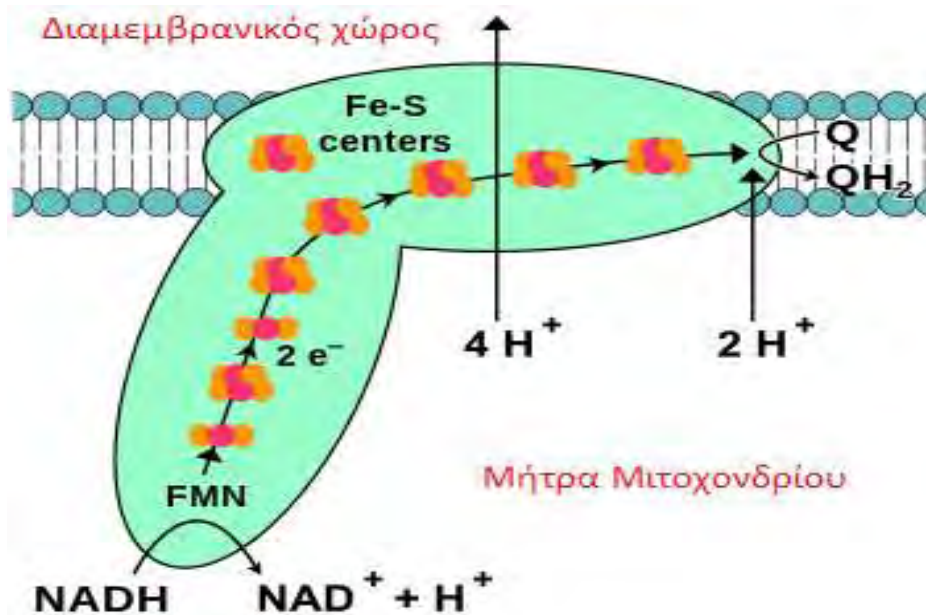
1.7 Ο ρόλος του συμπλόκου I

Το πρώτο σύμπλοκο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ονομάζεται και NADH αφυδρογονάση επειδή καταλύει την οξείδωση του NADH κατά δύο ηλεκτρόνια μέσω της ουβικινόνης (συνένζυμο Q10).



Η τοποθεσία του ενζύμου είναι στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με ένα χέρι του να προεξέχει προς τη μήτρα του μιτοχονδρίου (βλ. Εικόνα 1, Lazarou et al.

2009). Η αντίδραση ξεκινάει με τη δέσμευση ενός NADH μορίου από το σύμπλεγμα αφυδρογονάσης και την απόσπαση από αυτό δύο ηλεκτρονίων, τα οποία στη συνέχεια εισέρχονται στο κύριο σώμα του ενζύμου μέσω του μονονουκλεοτιδίου φλαβίνης (FMN, παράγωγο της βιταμίνης B2, ριβοφλαβίνη). Η προσθήκη των 2 ηλεκτρονίων μετατρέπει τη φλαβίνη στην ανηγμένη της μορφή (FMNH₂) και στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται πιο βαθιά στο σύμπλεγμα μέσω πρωτεΐνες σιδηροθείου (Sazanov & Hinchliffe 2006). Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων μέσω των πρωτεϊνών σιδηροθείου, 4 πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα του μιτοχονδρίου στον διαμεμβρανικό χώρο. Ο ακριβής μηχανισμός άντλησης πρωτονίων δεν είναι τελείως γνωστός, αλλά πιστεύεται ότι αλλάζει η στερεοδιάταξη όλου του συμπλέγματος ώστε να υποβοηθήσει αυτή τη διαδικασία. Τέλος, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται σε ένα μόριο ουβικινόνης που βρίσκεται στην μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η οξείδωση της ουβικινόνης συμβάλει επίσης στην εγκαθίδρυση της αντλίας πρωτονίων καθώς 2 πρωτόνια μεταφέρονται από τη μήτρα στη μεμβράνη και ενώνονται με την ουβικινόνη (QH₂) (Hirst 2005).



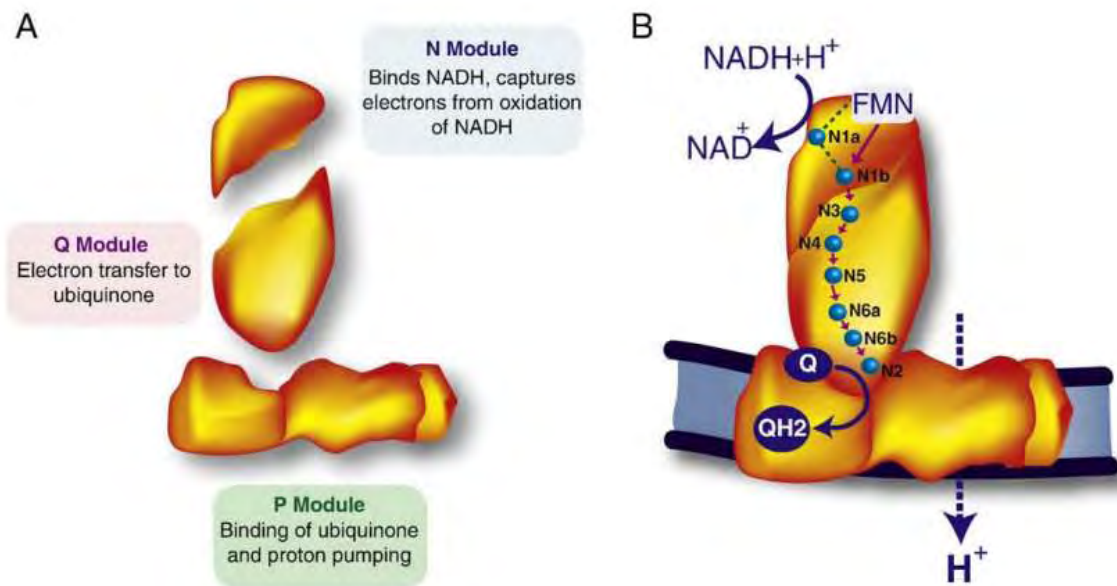
Εικόνα 1: Παραπάνω φαίνεται η δομή του συμπλόκου I και η θέση του στις μεμβράνες του μιτοχονδρίου. Εικόνα προσαρμοσμένη από Wikipedia

1.8 Δομή του συμπλόκου I

Στα θηλαστικά, η NADH αφυδρογονάση είναι ένα γιγαντιαίο μόριο βάρους ~1 MDa που αποτελείται συνολικά από 45 υπομονάδες, εκ των οποίων 7 είναι μιτοχονδριακής προέλευσης και οι υπόλοιπες 38 πυρηνικής (Carroll et al. 2006). Ομόλογα του συμπλόκου I των θηλαστικών συναντούνται και στα βακτήρια όπου η κρυσταλλική του δομή έχει μελετηθεί καλύτερα (βλ. Εικόνα 2). Στο *E coli* το σύμπλοκο I αποτελείται από 14 υπομονάδες που όλες έχουν ομολογία με υπομονάδες του συμπλέγματος ευκαρυώτων (Gabaldon et al. 2005). Το βακτηριακό σύμπλεγμα έχει βάρος ~550 kDa και μπορεί να χωριστεί σε 3 λειτουργικά μέρη:

- 1) Στο σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων (N-περιοχή), όπου προσδένεται και οξειδώνεται το NADH στο σύμπλοκο, οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση 2 ηλεκτρονίων που κατευθύνονται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών σιδεροθείου.
- 2) Στο σημείο εξόδου του ηλεκτρονίου (Q-περιοχή), όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τις πρωτεΐνες σιδερούθειου στην ουβικινόνη που βρίσκεται στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου.
- 3) Στο σημείο μεταφοράς πρωτονίων (P-περιοχή), το οποίο σε αντίθεση με τα άλλα 2 μέρη, δεν προεξέχει προς τη μήτρα του μιτοχονδρίου (ή το κυτοσόλιο του βακτηρίου), αλλά είναι βυθισμένο στη διπλή μεμβράνη. Πιστεύεται ότι αυτό το μέρος υποβοηθά την άντληση πρωτονίων και κάποια συστατικά του φαίνεται να έχουν εξελιχθεί από βακτηριακούς αντιμεταφορείς Na^+/H^+ , K^+/H^+ (Fearnley & Walker 1992)

Και τα 3 μοντέλα είναι εξελικτικά συντηρημένα σε σχεδόν όλους τους ευκαρυώτες και προκαρυώτες (Friedrich 2001, Brandt 2006).



Εικόνα 2: Στην εικόνα παρουσιάζεται το σύμπλοκο I με την χαρακτηριστική L δομή. Ο διαμεμβρανικός βραχίονας του συμπλόκου αποτελείται από πολύ υδροφοβικές πρωτεΐνες κωδικοποιημένες από μιτοχονδριακά γονίδια, ενώ ο βραχίονας που προεκτείνεται προς το διαμεμβρανικό χώρο αποτελείται από υδρόφιλες πρωτεΐνες που έχουν κωδικοποιηθεί από το πυρηνικό γονιδίωμα. Επίσης φαίνονται οι N,Q,P περιοχές του συμπλόκου και οι σχετικές τους θέσεις στο ένζυμο. Εικόνα από M. Lazarou et al. 2009

1.9 Υπομονάδες του συμπλόκου I και λειτουργίες τους

Όπως προαναφέρθηκε, το βακτηριακό σύμπλοκο I αποτελείται από 14 υπομονάδες που είναι άκρως συντηρημένες. Αυτές οι 14 υπομονάδες αποτελούν τον πυρήνα του συμπλόκου και απαρτίζουν την μικρότερη δυνατή κατασκευή που απαιτείται για τις σωστές λειτουργίες του ενζύμου (Lazarou et al. 2009).

Από αυτές τις υπομονάδες 7 είναι πυρηνικής προέλευσης: NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 και NDUFV2. Αυτές οι υπομονάδες συμμετέχουν στην οξείδωση του NADH και τη μετέπειτα μεταφορά των ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη.

Οι υπόλοιπες υπομονάδες ND1-6 και ND4L είναι μιτοχονδριακής προέλευσης και είναι άκρως υδροφοβικές, οπότε βρίσκονται στη μεμβρανική περιοχή του συμπλόκου. Η υπομονάδα ND1 έχει μια θέση δέσμευσης ουβικινόνης, συνεπώς υποτίθεται ότι είναι το σημείο όπου συνδέεται η ουβικινόνη με το σύμπλεγμα. Οι υπομονάδες ND4 και ND5 επίσης πιθανολογείται να έχουν θέση δέσμευσης με ουβικινόνη (Fisher & Rich 2000).

Επιπλέον συγκριτικές αναλύσεις αλληλουχιών έδειξαν ότι οι υπομονάδες ND2, ND4 και ND5 έχουν συγγένεια με βακτηριακούς αντιμεταφορείς Na^+/H^+ , K^+/H^+ , συμπερασματικά ίσως υποδεικνύεται η λειτουργία τους στην άντληση πρωτονίων (Friedrich 2001).

Στα θηλαστικά, από τις 45 υπομονάδες που απαρτίζουν το σύμπλοκο, 38 υπομονάδες είναι πυρηνικής προέλευσης και 7 από αυτές, που εμφανίζουν και ομολογία με τις βακτηριακές υπομονάδες, θεωρείται ότι αποτελούν τον πυρήνα του ενζύμου. Οι υπόλοιπες πυρηνικές υπομονάδες δεν έχουν αντιστοιχία σε βακτηριακές πρωτεΐνες και οι δράσεις τους μέσα στο σύμπλεγμα είναι άσχετες με τη μεταφορά ηλεκτρονίων και άντληση πρωτονίων. Αντιθέτως μπορεί να έχουν πιο γενικευμένες λειτουργίες όπως τη σταθεροποίηση του όλου συμπλόκου, ή την προστασία του συμπλόκου από οξειδωτική βλάβη από οξειδωτικές ρίζες (ROS) (Hirst et al. 2003, Lazarou et al. 2009). Έρευνες για την εύρεση πυρηνικών γονιδίων που με τη δράση τους υποβοηθούν το κεντρικό λειτουργικό πυρήνα της αφυδρογονάσης δεν έχουν γίνει ακόμα σε αυτόν το βαθμό για τα ψάρια.

1.10 Συνεργασία μιτοχονδριακού και πυρηνικού γονιδιώματος

Οι υπομονάδες του συμπόκου I έχουν και πυρηνική αλλά και μιτοχονδριακή προέλευση. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει ένας μεγάλος βαθμός αλληλεπίδρασης μεταξύ του πυρήνα και του μιτοχονδρίου και την έκφραση των επιμέρους γονιδίων, αλλά και τη συναρμολόγηση του συμπλόκου I. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι μιτοχονδριακά γονίδια έχουν πολύ μεγαλύτερο ρυθμό εξέλιξης και ότι οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με πυρηνικές πρωτεΐνες που εμφανίζουν πιο αργούς ρυθμούς εξέλιξης. Για τη σωστή λειτουργία του συμπλόκου I πρέπει να υπάρχει απόλυτη συμβατότητα μεταξύ των πρωτεϊνών από τα δύο γονιδιώματα. Πολύ συχνά σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ μιτοχονδριακών και πυρηνικών πρωτεϊνών παρουσιάζεται ένας πολύ μεγαλύτερος ρυθμός εξέλιξης των πυρηνικών πρωτεϊνών ώστε να μπορούν να συμβαδίσουν με τις αλλαγές που συμβαίνουν στις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται συνεξέλιξη (Levin et al. 2014).

1.11 Οργάνωση του συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης

Στα βακτήρια, κάποιους μύκητες, φυτά και θηλαστικά έχει βρεθεί ότι τα ενζυμικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης οργανώνονται μεταξύ τους σε δομές που αποκαλούνται υπερσύμπλοκα (supercomplex, Dudkina et al. 2005). Στα θηλαστικά τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συναντούνται σε 2 υπερσύμπλοκα: τα σύμπλοκα I,III,IV με αναλογία 1:2:4 απαρτίζουν ένα υπερσύμπλοκο, και ένα μικρότερο υπερσύμπλοκο αποτελείται από τα σύμπλοκα III και IV. Το σύμπλοκο II βρίσκεται ως μονομερές και το σύμπλοκο V συναντάται ως διμερές. Το μοντέλο της αναπνευστικής γραμμής (respiratory string) υποθέτει ότι η αναπνευστική αλυσίδα αποτελείται από μία «γραμμή» ενωμένων υπερσυμπλόκων $I_1III_2IV_4$ and III_2IV_4 σε αναλογία 2:1 (Schagger 2002). Τα λειτουργικά πλεονεκτήματα σχηματισμού υπερσυμπλόκων είναι:

- 1) Η αποφυγή ανταγωνισμού με άλλα ένζυμα για τα υποστρώματα (κυτόχρωμα C, ουβικινόνη)
- 2) Η αυξημένη καταλυτική δράση λόγω αύξησης της ταχύτητας αποδέσμευσης των υποστρωμάτων
- 3) Η ικανότητα απομόνωσης της ουβισεμικινόνης και έτσι η πρόληψη οξειδωτικής ζημιάς από υπεροξειδία (Schagger & Pfeiffer 2000)

1.12 Η συναρμολόγηση του συμπλόκου I

Η συναρμολόγηση του πρώτου συμπλόκου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελεί ένα μυστήριο που μέχρι στιγμής δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Το μέγεθος του ενζύμου, το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που το αποτελούν παράγονται από δύο διαφορετικά γονιδιώματα, η ύπαρξη άγνωστης ενδοκυτταρικής επικοινωνίας και σηματοδότησης μεταξύ του πυρήνα και του μιτοχονδρίου και η έλλειψη ενός ξεκάθαρου κρυσταλλικού μοντέλου δομής του συμπλόκου, συμβάλουν στην δυσκολία αποκρυπτογράφησης του τρόπου συναρμολόγησής του (Butow & Avadhani 2004). Οι περισσότερες πληροφορίες για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου I προέρχονται από μελέτες που έχουν γίνει στο είδος *N.crassa*. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι συσσώρευση μεταλλάξεων στα πυρηνικά γονίδια του συμπλόκου, είχαν σαν αποτέλεσμα

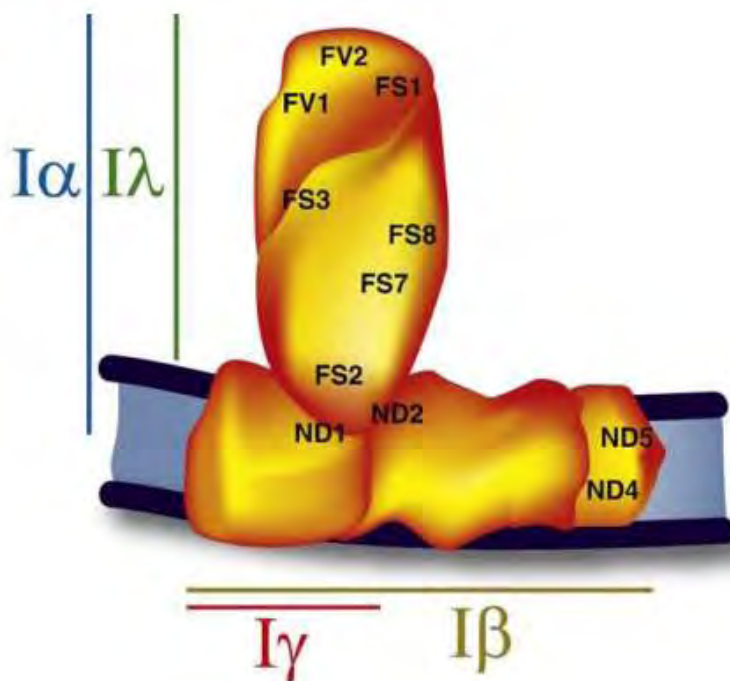
την απουσία του υδρόφιλου βραχίονα και τη συσσώρευση του μεμβρανικού, υδροφοβικού βραχίονα μιτοχονδριακής προέλευσης. Αυτό υποθέτει ότι οι βραχίονες συναρμολογούνται ξεχωριστά (Friedrich & Weiss 1997). Ακόμα και σε μιτοχόνδρια θηλαστικών, παρατηρήθηκε ότι ο μεμβρανικός υδροφοβικός βραχίονας και ο υδρόφιλος βραχίονας του συμπλόκου συναρμολογούνται ξεχωριστά. Σε περιπτώσεις μετάλλαξης στις υπομονάδες του μεμβρανικού βραχίονα, τα επίπεδα σύνθεσης του υδρόφιλου βραχίονα παραμένουν τα ίδια. Έτσι γίνεται η υπόθεση ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση κατά τη συναρμολόγηση των δύο βραχιόνων και ενώνονται αργότερα για να σχηματίσουν ολόκληρο το σύμπλοκο (Bourges et al. 2004, Ugalde et al. 2004).

Παρά ταύτα, έχει βρεθεί ότι η συναρμολόγηση του υπερσυμπλόκου $I_1III_2IV_4$ είναι απαραίτητη για τη σωστή δομή και λειτουργία του συμπλόκου I σε πολλά είδη. Στους ανθρώπους για παράδειγμα ελαττώματα στην συναρμολόγηση του συμπλόκου III οδηγεί σε δευτερεύουσες δυσλειτουργίες του συμπλόκου I. Έχει αποδειχθεί κίολας ότι στην παραπάνω περίπτωση η συναρμολόγηση του συμπλόκου I γίνεται φυσιολογικά, αλλά ότι η σταθερότητα του συμπλέγματος είναι ελαττωμένη λόγω των προβλημάτων συναρμολόγησης του υπερσυμπλόκου (Acín-Pérez et al. 2004).

1.13 Το γονίδιο *ndufs8* και ο ρόλος του στο σύμπλοκο I

Το μεταφρασμένο προϊόν του γονιδίου *ndufs8* φαίνεται να βρίσκεται στο υδρόφιλο βραχίονα του ενζύμου που εκτείνεται από τη μεμβράνη της μήτρας του μιτοχονδρίου προς το στρώμα (βλ. Εικόνα 3). Ο ρόλος του δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά πιθανολογείται ότι, μαζί με τα υπόλοιπα γονίδια πυρηνικής προέλευσης που αποτελούν το υδρόφιλο μέρος του ενζύμου, συμβάλει στην οξείδωση του NADH και τη μεταφορά των ηλεκτρονίων μέσω πρωτεϊνών σιδηροθείου προς το μεμβρανικό, υδροφοβικό βραχίονα (Fisher & Rich 2000). Σε περιπτώσεις όπου το γονίδιο *ndufs8* δεν έχει τη σωστή δομή, ή δεν παράγεται καθόλου, οι άνθρωποι εμφανίζουν το σύνδρομο Leigh (Leigh syndrome) όπου εμφανίζουν διάφορες κυκλοφορικές και αναπνευστικές δυσλειτουργίες με πολύ συχνή κατάληξη το θάνατο. Η έλλειψη, ή η βλάβη του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδίου *ndufs8* φαίνεται να προκαλεί μέγιστη

αποσταθεροποίηση του συμπλόκου I και σημαντική μείωση της καταλυτικής του δράσης (Loeffen et al. 1998, Procaccio & Wallace 2004).



Εικόνα 3: Παραπάνω παρουσιάζεται η δομή του συμπλόκου I και οι περιοχές που χωρίζεται μετά από επώαση σε χαστροπικούς παράγοντες. Στο σχήμα φαίνεται η σχετική θέση του γονιδίου *ndufs8* στο σύμπλοκο, και το γεγονός ότι ανήκει στην περιοχή Iα. Εικόνα προσαρμοσμένη από M. Lazarou et al. 2009.

1.14 Σκοπός της διπλωματικής

Οι τελεοστέοι, και συγκεκριμένα το λαβράκι που αποτελεί θέμα αυτής της διπλωματικής εργασίας, έχουν τη γενετική πληροφορία του γονιδίου *ndufs8* σε δύο παράλογα γονίδια: *ndufs8a* και *ndufs8b*. Αναφέρθηκε ήδη ότι η γενετική πληροφορία που περιέχει το *ndufs8* είναι άκρως απαραίτητη για την ανάπτυξη και επιβίωση του ατόμου (Loeffen et al. 1998, Procaccio & Wallace 2004). Μέχρι στιγμής το γονιδίωμα μόνο ενός ατόμου του είδους *D.labrax* είναι αναρτημένο στο NSBI. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία στοχεύει στην εύρεση πολυμορφισμών του γονιδίου *ndufs8b* με σκοπό τη συνεισφορά πληροφοριών για το γονιδίωμα του *D.labrax*.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματική διαδικασία

Μετά την επιλογή των δειγμάτων, συνέχεια είχε η απομόνωση του γενωμικού DNA από το βιολογικό ιστό του λαβρακιού. Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν εκκινητές που στόχευαν στην ενίσχυση των κωδικών περιοχών του γονιδίου *ndufs8b*. Συνολικά το γονίδιο χωρίστηκε σε τέσσερα αμπλικόνια (amplicons), τα οποία πολλαπλασιάστηκαν μέσω PCR. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης των αμπλικονίων. Ακολούθησε ανάλυση SSCP με σκοπό να εντοπιστούν τα διαφορετικά πρότυπα που προκύπτουν από τις διαφορές στην αλληλουχία των προς εξέταση δειγμάτων. Τέλος, αφού καταγράφηκαν τα διάφορα πρότυπα των τεσσάρων αμπλικονίων, έγινε καθαρισμός του DNA αυτών από τα αντιδραστήρια της PCR και στάλθηκαν για αλληλούχηση με σκοπό την εύρεση των πολυμορφικών θέσεων.

2.2 Επιλογή δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής εργασίας επιλέχθηκαν συνολικά 70 δείγματα από λαβράκια από ιχθυοκαλλιέργεια. Με μια ανάλυση 10 μικροδορυφόρων που είχε προηγηθεί αυτής της διπλωματικής, επιλέχθηκαν άτομα που εμφάνιζαν αυξημένη ετεροζυγωτία.

2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από βιολογικούς ιστούς

Μέθοδος

Παρότι υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την απομόνωση DNA, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ανάλογα με το αρχικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί και το αν η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί με απλά χημικά αντιδραστήρια, με εμπορικά

διαθέσιμα kit ή με χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων απομόνωσης γενετικού υλικού. Όλες όμως οι μέθοδοι απομόνωσης πυρηνικού DNA ακολουθούν τα παρακάτω κοινά στάδια:

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα με χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά
2. Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων
3. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης (100%) αιθανόλης, με οργανική εκχύλιση με διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου, με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια.
4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης 70%
5. Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE. Το διάλυμα Tris-EDTA (TE) είναι ένα ελαφρά αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8-9), που περιέχει EDTA. Το EDTA προστατεύει το DNA, δεσμεύοντας δισθενή ιόντα, όπως Mg^{2+} ή Ca^{2+} , που είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων όπως οι νουκλεάσες (που διασπούν το DNA) και οι πρωτεάσες.

Υλικά

Για την απομόνωση του DNA από τους βιολογικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκε το kit Macherey-Nagel DNA, RNA, and protein purification, NucleoSpin Tissue με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Μέθοδος

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μία in-vitro ενζυμική μέθοδος πολλαπλασιασμού αλληλουχιών του DNA. Για την ενζυμική αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές τα οποία υβριδοποιούνται με τα άκρα των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων της αλληλουχίας του DNA με σκοπό τον πολλαπλασιασμό της. Το μέγεθος του επιλεγμένου προς πολλαπλασιασμό τμήματος DNA ορίζεται από τη θέση που κατέχουν τα 5'άκρα των ολιγονουκλεοτιδίων- εκκινητών. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται προέρχεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει την ιδιότητα να μην αδρανοποιείται στους 95°C, επομένως δεν χρειάζεται ανανέωση της ποσότητας του ενζύμου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η Αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη Του DNA με θέρμανση στους 95 °C
- Πρόσδεση του ζεύγους των ολιγονουκλεοτιδίων - εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA (annealing).
- Επιμήκυνση του ανασυνδυασμένου ολιγονουκλεοτιδίου από την Taq πολυμεράση στους 72°C Για 1min/1kb DNA (Primrose & Twyman 2006)

Υλικά

1. Σωλήνες erppendorf χωρητικότητας 0,5ml
2. Δεοξυνουκλεοτίδια: dNTPs
3. ΚΑΡΑ Taq πολυμεράση
4. 10X Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης
5. 25mM MgCl
6. Γονιδιωματικό DNA απομονωμένο από ιστό λαβρακιού
7. Πρόσθιος εκκινητής (forward primer)
8. Αντίστροφος εκκινητής (reverse primer)

Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών (Πίνακας 2), που έγινε μέσω του προγράμματος NSBI PRIMER-BLAST, στόχευε στην ενίσχυση των κωδικών περιοχών. Οι εκκινητές υβριδοποιούνταν με το DNA του δείγματος σε ιντρόνια, ή σε περιοχές που περιβάλουν το γονίδιο, λίγο προτού, ή αμέσως μετά από την κωδική αλληλουχία, ώστε να μην χάνονταν καθόλου γενετική πληροφορία. Το γονίδιο χωρίστηκε συνολικά σε 4 αμπλικόνια (amplicons) όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Περιεχόμενα των τεσσάρων αμπλικονίων και ανάλυση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση

	Εξώνια	Πρόσθιος εκκινητής		Ανάστροφος εκκινητής	
		Μέγεθος και αλληλουχία	Tm	Μέγεθος και αλληλουχία	Tm
Αμπλικόνιο 1 ^ο	1 ^ο , 2 ^ο , 3 ^ο	AATATGCTGTCCACTTGTCC (20)	55,3 ^ο C	CTTTACAGAAATCATAGTTTGAGTG (25)	56,4 ^ο C
Αμπλικόνιο 2 ^ο	4 ^ο	TTCTTCAGCAACACCTTTTTTC CC (23)	58,9 ^ο C	TATAGCAGGATCTGAGTGTGTGT (23)	58,9 ^ο C
Αμπλικόνιο 3 ^ο	5 ^ο	GTCTCTCCCTTTCCCTGCCTA (21)	59,8 ^ο C	TCTTATTCAGTATACGGTCTACGTT (25)	58,1 ^ο C
Αμπλικόνιο 4 ^ο	6 ^ο	TTTCTTCATTCCTCCCTCAG (21)	57,9 ^ο C	TGATGCATCTTCACACGCAG(20)	57,3 ^ο C

Ενίσχυση των κωδικών αλληλουχιών

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναγράφονται οι ποσότητες αντιδραστηρίων και πρώτων υλών που τοποθετούνταν σε σωλήνες eppendorf 0,5ml, όπως και οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης (annealing) ανάλογα με το αμπλικόνιο προς ενίσχυση. Η θερμοκρασία επέκτασης ήταν στους 72^οC για 40 δευτερόλεπτα σε κάθε κύκλο PCR και συνολικά σε όλα τα αμπλικόνια η PCR κρατούσε για 30 κύκλους.

Πίνακας 3. Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Γενωμικό DNA	~2,5mg/μl	100 ng/μl	2μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	10X	1X	5μl
MgCl ₂	25mM	1mM	2μl
Εκκινητές	50pmol/μl (each)	1pmol/μl (each)	1μl (each)
dNTPs	10mM	0,2mM	1μl
TAQ Πολυμεράση	5u/1μl	1u	0,2μl
ddH ₂ O	-	-	38μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	-	-	50μl

2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA

Μέθοδος

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία τεχνική που επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική, με την οποία είναι δυνατή η ανάλυση τμημάτων DNA τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες συμβατικές τεχνικές διαχωρισμού, όπως είναι η φυγοκέντρωση. Σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA μεγέθους από 200bp έως 50kb. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται συνήθως σε οριζόντιο επίπεδο υπό ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης. Τα πηκτώματα αγαρόζης φτιάχνονται αφού πρώτα διαλυθεί με θέρμανση η αγαρόζη μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Όταν αυτό γίνει διαυγές, χύνεται στην μήτρα και σταθεροποιείται. Η αγαρόζη πήζοντας φτιάχνει ένα δίχτυο του οποίου η πυκνότητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο, κινείται προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται από τις παρακάτω παραμέτρους:

A) Το μοριακό βάρος των τμημάτων του DNA. Τα μεγάλα κομμάτια DNA μεταναστεύουν πιο αργά από τα μικρότερα λόγω των παρεμποδίσεων που δημιουργούνται κατά τη μετακίνηση τους διαμέσου των πόρων της αγαρόζης.

B) Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Ένα γραμμικό τμήμα DNA γνωστού μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X
- Αγαρόζη
- Χρωστική Serva
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης μπλε της βρωμοφαινόλης
- Καλούπι σύνθεσης του gel

Στο πρώτο και μεγαλύτερο αμπλικόνιο κατασκευάζονταν και χρησιμοποιούνταν gel αγαρόζης πυκνότητας 1,5%. Στα υπόλοιπα αμπλικόνια χρησιμοποιήθηκαν gel αγαρόζης πυκνότητας 2%. Η εξακρίβωση της ενίσχυσης των σωστών αλληλουχιών έγινε με χρήση ladder ώστε να υποδεικνύεται ο αριθμός ζευγών βάσεων των ηλεκτροφορημένων δειγμάτων.

2.6 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism)

Μέθοδος

Αυτή η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλαγές σε βάσεις μονόκλωνης αλυσίδας, ή εύρεση πολυμορφισμών. Η βασική αρχή αυτής της δοκιμής είναι το ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιατάσσεται, παίρνει μια ειδική διαμόρφωση που είναι μοναδική και εξαρτάται από την αρχική ακολουθία νουκλεοτιδίων. Η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη για να ανιχνεύσει ακόμη και διαφορά στις μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλυσίδες που καταλαμβάνουν μια διαφορετική διαμόρφωση και όταν υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση, η παραλλαγή των νουκλεοτιδίων καταλαμβάνει μια διαφορετική θέση

(Orita et al. 1989). Αρχικά γίνεται η παρασκευή του gel από ακρυλαμίδιο. Τα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται για 10 λεπτά στους 95°C και φορτώνονται στο gel ακρυλαμιδίου με το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται για 20 ώρες σε κάθετο ηλεκτρικό πεδίο. Έπειτα ακολουθεί η χρώση του gel για την εμφάνιση των διαφορετικών προτύπων.

Υλικά

- Ακρυλαμίδιο
- Bis-Ακρυλαμίδιο
- Γλυκερόλη 50% v/v σε διάλυμα ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10X
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X
- ddH₂O
- TEMED
- APS
- Διάλυμα οξικού οξέος
- AgNO₃
- NaOH
- NaBH₄
- Φορμαλδεΐδη
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης

Για την παρασκευή του gel χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια στις εξής ποσότητες:

Πίνακας: 4. Αντιδραστήρια για την παρασκευή των gel ακρυλαμιδής που χρησιμοποιήθηκαν, ανάλογα με τα αμπλικόνια.

	Ακρυλαμίδιο	Bis-Ακρυλαμίδιο	Γλυκερόλη 50% v/v	TBE 10X	Προσθήκη ddH ₂ O μέχρι τελικό όγκο	TEMED	APS
Αμπλικόνιο 1 ^ο	5 g (8%)	0,133 g	6,25 ml	3,25 ml	65 ml	65 μl	400 μl
Αμπλικόνιο 2 ^ο ,3 ^ο ,4 ^ο	7,5 g (12%)	0,19 g	6,25 ml	3,25 ml	65 ml	65 μl	400 μl

Για τη χρώση των gel ακολούθησαν πλύσεις με τα παρακάτω διαλύματα. Μετά από κάθε πλύση ακολουθούσε ξέπλυμα με dH₂O.

- 1) 400 ml dH₂O + 0,5 ml οξικού οξέος για 3 λεπτά
- 2) Επανάληψη της πρώτης πλύσης
- 3) 0,2 g AgNO₃ διαλυμένο σε 200 ml dH₂O
- 4) 3 g NaOH, 0,02 g NaBH₄ διαλυμένα σε 200 ml dH₂O + 1 ml φορμαλδεΐδη

2.7 Καθαρισμός των δειγμάτων

Μέθοδος

Για να είναι δυνατή η αλληλούχηση των δειγμάτων έπρεπε πρώτα να καθαριστούν από τα αντιδραστήρια της PCR (ένζυμα, ιόντα κ.α.). Για το πρώτο αμπλικόνιο χρησιμοποιήθηκε gel extraction για την αποφυγή της αλληλούχησης ενός παραπροϊόντος μεγέθους ~200 ζευγών βάσεων που υπήρχε.

Υλικά

Για το καθαρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit Macherey-Nagel DNA, RNA, and protein purification, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up.

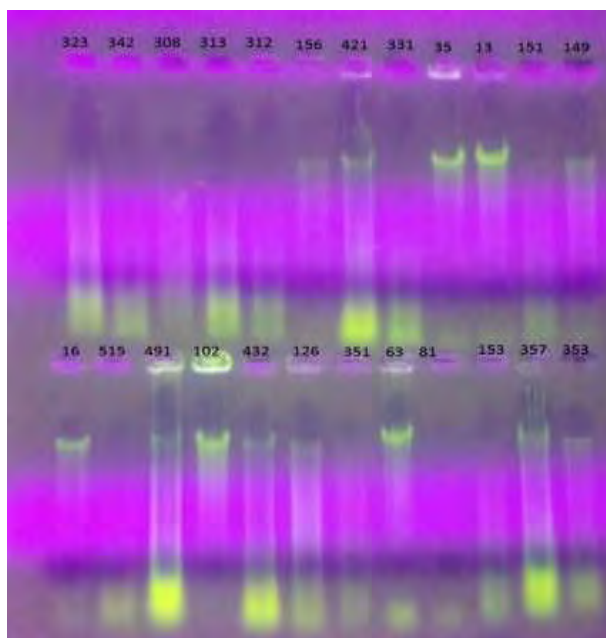
2.8 Αλληλούχηση

Τα πρότυπα από κάθε αμπλικόνιο στάλθηκαν σε εξωτερικό εργαστήριο για αλληλούχηση κατά Sanger και με τους δύο εκκινητές. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα BioEdit (Sanger et al. 1977).

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από βιολογικούς ιστούς

Για την εξακρίβωση της επιτυχίας της απομόνωσης του DNA, αλλά και την οπτικοποίηση της ποιότητας του απομονωμένου νουκλεϊκού οξέος έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% (βλ. Εικόνα 4).



Εικόνα 4

Απομόνωση DNA από βιολογικό ιστό. Πάνω από κάθε πηγαδάκι του gel αναγράφεται ο αριθμός του συγκεκριμένου δείγματος.

3.2 PCR

Από τη PCR, ενισχύθηκαν επιτυχημένα τα παρακάτω δείγματα:

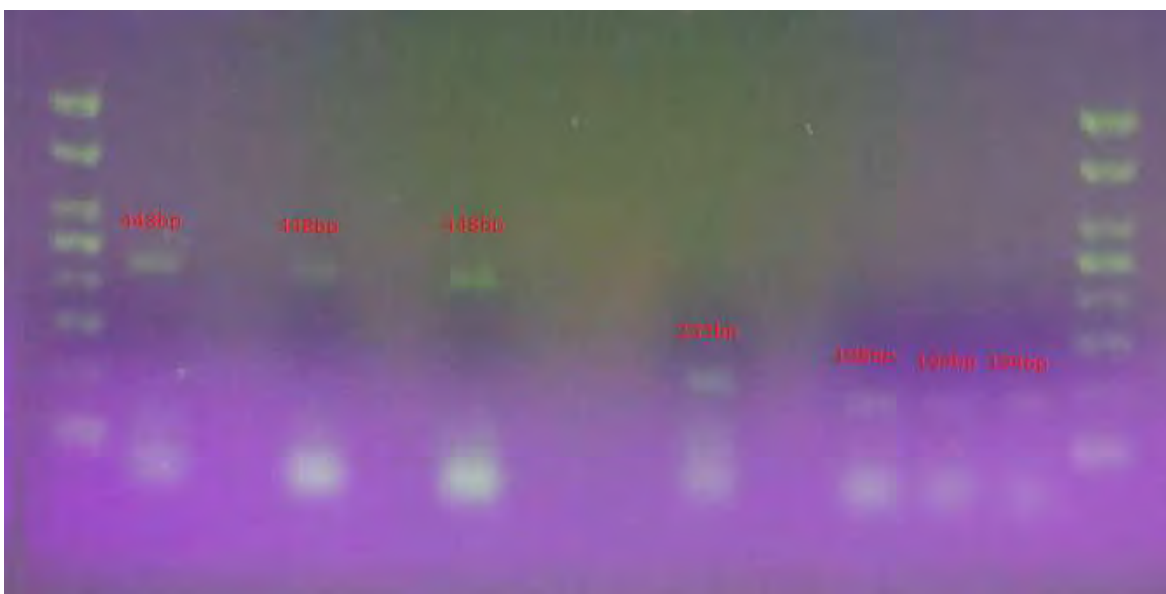
Πίνακας 5. Ενισχυμένα δείγματα ανάλογα με το αμπλικόνιο.

	Δείγματα
Αμπλικόνιο 1 ^ο	39/70
Αμπλικόνιο 2 ^ο	45/70
Αμπλικόνιο 3 ^ο	55/70
Αμπλικόνιο 4 ^ο	40/70

Η επιβεβαίωση της ενίσχυσης των κωδικών περιοχών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης με χρήση ladder (βλ. Εικόνα 5). Το μέγεθος του κάθε αμπλικονίου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6):

Πίνακας 6. Μέγεθος του κάθε αμπλικονίου

	Μέγεθος σε bp (base pairs)
Αμπλικόνιο 1 ^ο	448
Αμπλικόνιο 2 ^ο	233
Αμπλικόνιο 3 ^ο	196
Αμπλικόνιο 4 ^ο	194

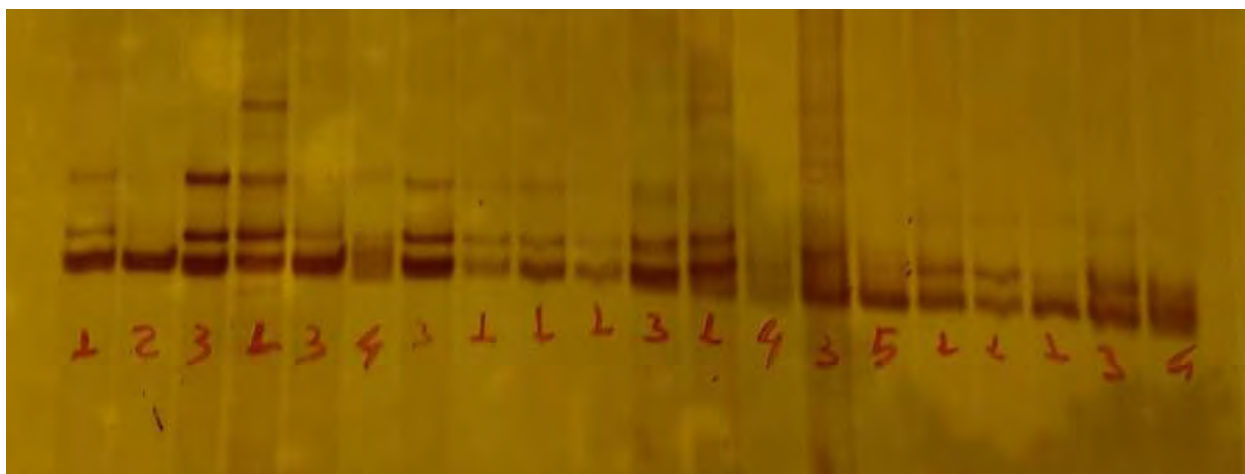


Εικόνα 5

Ενδεικτικά στην παραπάνω εικόνα φαίνονται τα 4 αμπλικόνια με το διαφορετικό μέγεθος τους αφού έχουν ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα πρώτα 3 δείγματα ανήκουν στο πρώτο αμπλικόνιο, το τέταρτο ανήκει στο δεύτερο αμπλικόνιο, το 5^ο ανήκει στο 3^ο αμπλικόνιο και τα 2 τελευταία δείγματα ανήκουν στο 4^ο. Οι ζώνες από το ladder που χρησιμοποιήθηκε εμφανίζονται ανά 100bp.

3.3 SSCP

Μετά την ενίσχυση των κωδικών περιοχών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SSCP για την εύρεση των διαφορετικών προτύπων του κάθε αμπλικονίου (βλ. Εικόνα 6).



Εικόνα 6

Ενδεικτική φωτογραφία από SSCP του 4^{ου} αμπλικονίου όπου φαίνονται τα διάφορα πρότυπα.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα πρότυπα του κάθε αμπλικονίου από τα δείγματα που ενισχύθηκαν μέσω PCR.

Πίνακας 7. Τα διάφορα πρότυπα του κάθε αμπλικονίου, όπως φάνηκαν από την ανάλυση SSCP

	1 ^ο πρότυπο	2 ^ο πρότυπο	3 ^ο πρότυπο	4 ^ο πρότυπο	5 ^ο πρότυπο
Αμπλικόνιο 1 ^ο	8	11	17	1	-
Αμπλικόνιο 2 ^ο	43	-	-	-	-
Αμπλικόνιο 3 ^ο	11	12	8	9	15
Αμπλικόνιο 4 ^ο	15	4	10	10	1

3.4 Αλληλούχηση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έδειξε ότι δεν υπάρχει κανένας πολυμορφισμός σε κανένα από τα πρότυπα που είχαν σταλεί για αλληλούχηση για όλα τα αμπλικόνια. Αξίζει να αναφερθεί ότι η αλληλούχηση δεν έδωσε πληροφορίες για το δεύτερο εξώνιο του πρώτου αμπλικονίου, συνεπώς είναι ακόμα άγνωστο το αν υπάρχουν πολυμορφισμοί σε εκείνη την περιοχή. Η αλληλούχηση κατά Sanger εμφάνισε τις παρακάτω κωδικές αλληλουχίες:

Εξώνιο 1°: CTTCTGCACTGAGTCTGCGTCTTCTCCACTGCTACTCAAGGCCAG

Εξώνιο 3°: AGTATGTAAATGCTCAGGAGCTGCCAACAGACCTGAGGTCCGTCACTGACCGGG
CTGCCACGACTCTT

Εξώνιο 4°: ACCTGTTCCGTGAACCAGCCACCATCAACTACCCGTTTGAGAAGGGCCCTCTGT
CACCCCGCTTCCGTGGCGAGCACGCCCTCCGCCGCTACCCTAATGGARAGGAGCGCTGCATTG
CCTGTAAGCTGTGTGAGG

Εξώνιο 5°: GCCATTACCATTGAAGCTGAGACTCGCGCTGATGGCAGCAGGAGAACTACTCGC
TATGACATTGATATGACCAAATGTATCTATTGTGGCTTCTGCCAGGAAGCCTGTCCCGTTGAT
GCCATTGTTGAG

Εξώνιο 6°: GGTCCAAACTTTGAGTTCTCCACAGAGACCCACGAGGAGCTGCTGTACAACAAA
GAGAAGCTGCTGAACAACGGAGACCGATGGGAGGCTGAGATAGCAGCCAACATACAGGCAGA
TTACCTGTACAGATAG

4. Συζήτηση

4.1 Ο ρόλος του γονιδίου *ndufs8b*

Το γονίδιο *ndufs8* είναι ένα πυρηνικό γονίδιο του οποίου το προϊόν αποτελεί μέρος του ενζυμικού πυρήνα του συμπλόκου I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα, η κρυσταλλική δομή που είχε κατασκευαστεί για τη δομή του συμπλόκου I φανερώνει ότι η υπομονάδα *ndufs8* βρίσκεται στον υδρόφιλο βραχίονα που επεκτείνεται από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου προς τη μήτρα. Επιπλέον, ανήκει στο περιοχή του ενζύμου που καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH στην ουβικουινόνη που βρίσκεται στο μεμβρανικό βραχίονα. Σύμφωνα με κρυσταλλικές δομές, οι πυρηνικές υπομονάδες *ndufs8*, *ndufs7* και *ndufs2*, που βρίσκονται στον υδρόφιλο βραχίονα του συμπλόκου, φαίνεται να σχηματίζουν την επιφάνεια σύνδεσης με τις μιτοχονδριακές υπομονάδες ND1, ND3, συνεπώς τον υδρόφοβο βραχίονα του συμπλόκου (Zickermann et al. 2015, Baradaran et al. 2013). Αυτό το σημείο σύνδεσης των υπομονάδων από τα διαφορετικά γενώματα ίσως υποθέτει μια συνεξέλιξη των παραπάνω υπομονάδων με αποτέλεσμα τη συμβατή τους αλληλεπίδραση. Επιπλέον, έρευνες που είχαν γίνει για την παθολογία διαφόρων μεταλλάξεων γονιδίων του συμπλόκου I, έδειξαν ότι σε μεταλλάξεις του γονιδίου *ndufs8*, μειώνεται σημαντικά η καταλυτική δράση του συμπλόκου και προκαλείται μέγιστη αποσταθεροποίηση (Loeffen et al. 1998, Procaccio & Wallace 2004). Συνεπώς, το γονίδιο *ndufs8* φαίνεται να έχει καταλυτικό, αλλά κυρίως δομικό ρόλο στη λειτουργία του συμπλόκου.

4.2 Ο βαθμός συντήρησης του γονιδίου *ndufs8b*

Ο ενζυμικός πυρήνας του συμπλόκου I είναι συντηρημένος από τα βακτήρια μέχρι και τα θηλαστικά (Lazarou et al. 2009), οπότε αναμένεται υψηλός βαθμός συντήρησης για αυτά τα γονίδια. Το γονίδιο *ndufs8b* δε φαίνεται να αποτελεί εξαίρεση. Ταυτόχρονα με αυτήν την διπλωματική, επιτελείται και μια δεύτερη διπλωματική που μελετάει τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *ndufs8a*. Παρότι που δεν έγινε μελέτη

ολόκληρου του γονιδίου, τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι και αυτό το παράλογο (*ndufs8a*) είχε ελάχιστους πολυμορφισμούς.

4.3 Μελλοντικές έρευνες

Επόμενο στάδιο της μελέτης του γονιδίου *ndufs8b* θα ήταν καλό να αποτελέσουν λειτουργικές αναλύσεις, ώστε να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του. Το γεγονός ότι είναι τόσο συντηρημένο σημαίνει ότι υπάρχει ελάχιστη έως μηδαμινή ευελιξία στη λειτουργία του στο σύμπλοκο I, αλλά από τη στιγμή που ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα σαφής, μπορούν να υπάρχουν μόνο υποθέσεις για τους λόγους που είναι τόσο συντηρημένο. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε η γενετική πληροφορία του *ndufs8* βρίσκεται σε δύο παράλογα γονίδια στους τελεοστέους. Μετά την ολοκλήρωση των δύο διπλωματικών εργασιών για τα γονίδια *ndufs8a* και *ndufs8b* υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν το βαθμό συντήρησή τους, αλλά παραμένει ακόμα άγνωστο το πόσο πολύ έχουν αποκλίνει οι λειτουργίες των δύο παραλόγων. Λειτουργικές μελέτες θα μπορούσαν να απαντήσουν τα παραπάνω ερωτήματα.

4.4 Συμπέρασμα

Μέχρι στιγμής κατατεθειμένο στο UCSC Genome Browser ήταν το γονιδίωμα ενός μόνο ατόμου του είδους *D.labrax*. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία στόχευε στην εύρεση πολυμορφισμών για το γονίδιο *ndufs8b* με σκοπό τη συνεισφορά αυτών των γενετικών πληροφοριών στο παγκόσμιο ιστό. Βέβαια, μετά την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας βρέθηκε ότι στα άτομα που εξετάστηκαν δεν υπήρχε κανένας πολυμορφισμός σε κωδικές αλληλουχίες στο γονίδιο *ndufs8b*. Είναι απόλυτα λογικό γονίδια τα οποία εκφράζουν προϊόντα που συμμετέχουν στον κύριο ενζυμικό πυρήνα του συμπλόκου I της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης να εμφανίζουν πολύ μεγάλο βαθμό συντήρησης. Το ευρήματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας επιβεβαιώνουν αυτήν την υπόθεση για το γονίδιο *ndufs8b*. Επόμενο στάδιο θα μπορούσαν να αποτελούν λειτουργικές μελέτες αυτού του γονιδίου, και του παράλογού του (*ndufs8a*),

με σκοπό της αποσαφήνιση τόσο των συγκεκριμένων ρόλων που έχουν στο σύμπλοκο I, την εξελικτική σχέση που έχει με το άλλο παράλογο γονίδιο, αλλά και την καλύτερη εξήγηση του βαθμού της συντήρησης του.

5. Βιβλιογραφία

1. Baradaran, R., Berrisford, J., Minhas, G. and Sazanov, L. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), pp.443-448.
2. Birchler, J. and Veitia, R. (2007). The Gene Balance Hypothesis: From Classical Genetics to Modern Genomics. *The Plant Cell Online*, 19(2), pp.395-402.
3. Bourges, I., Ramus, C., Mouson de Camaret, B., Beugnot, R., Remacle, C., Cardol, P., Hofhaus, G. and Issartel, J. (2004). Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochemical Journal*, 383(3), pp.491-499.
4. Brandt, U. (2006). Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), pp.69-92.
5. Butow, R. and Avadhani, N. (2004). Mitochondrial Signaling: The Retrograde Response. *Molecular Cell*, 14(1), pp.1-15.
6. Carroll, J., Fearnley, I., Skehel, J., Shannon, R., Hirst, J. and Walker, J. (2006). Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), pp.32724-32727.
7. Conant, G. and Wolfe, K. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*, 9(12), pp.938-950.
8. Des Marais, D. and Rausher, M. (2008). Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene. *Nature*, 454(7205), pp.762-765.
9. Dudkina, N., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. and Braun, H. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), pp.3225-3229.
10. Fawcett, J., Maere, S. and Van de Peer, Y. (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), pp.5737-5742.
11. Fearnley, I. and Walker, J. (1992). Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1140(2), pp.105-134.
12. Fisher, N. and Rich, P. (2000). A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems 1 Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 296(4), pp.1153-1162.
13. Force, A., Lynch, M., Pickett, F., Amores, A., Yan, Y. and Postlethwait, J. (1999). *Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations..* [online] PubMed Central (PMC). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1460548/> [Accessed 3 Oct. 2018].
14. Friedrich, T. and Weiss, H. (1997). Modular Evolution of the Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase and the Origin of its Modules. *Journal of Theoretical Biology*, 187(4), pp.529-540.
15. Friedrich, T. (2001). Complex I: A Chimaera of a Redox and Conformation-Driven Proton Pump?. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(3), pp.169-177.
16. **Gabaldón, T., Rainey, D. and Huynen, M. (2005). Tracing the Evolution of a Large Protein Complex in the Eukaryotes, NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Journal of Molecular Biology*, 348(4), pp.857-870.**

17. Glasauer, S. and Neuhauss, S. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), pp.1045-1060.
18. Guan, Y., Dunham, M. and Troyanskaya, O. (2007). Functional Analysis of Gene Duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175(2), pp.933-943.
19. Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I., Shannon, R. and Walker, J. (2003). The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1604(3), pp.135-150.
20. Hughes, A. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 256(1346), pp.119-124.
21. Hirst, J. (2005). Energy transduction by respiratory complex I – an evaluation of current knowledge. *Biochemical Society Transactions*, 33(3), pp.525-529.
22. Lazarou, M., Thorburn, D., Ryan, M. and McKenzie, M. (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), pp.78-88.
23. Levin, L., Blumberg, A., Barshad, G. and Mishmar, D. (2014). Mito-nuclear co-evolution: the positive and negative sides of functional ancient mutations. *Frontiers in Genetics*, 5.
24. Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., Sengers, R., Trijbels, F., Hamel, B., Mullaart, R. and van den Heuvel, L. (1998). The First Nuclear-Encoded Complex I Mutation in a Patient with Leigh Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 63(6), pp.1598-1608.
25. Meyer, A. and 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), pp.699-704.
26. Meyer, A. and Van de Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays*, 27(9), pp.937-945.
27. Osborn, T., Chris Pires, J., Birchler, J., Auger, D., Jeffery Chen, Z., Lee, H., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R., Colot, V. and Martienssen, R. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, 19(3), pp.141-147.
28. Otto, S. and Whitton, J. (2000). Polyploid Incidence and Evolution. *Annual Review of Genetics*, 34(1), pp.401-437.
29. Pebusque, M., Coulier, F., Birnbaum, D. and Pontarotti, P. (1998). Ancient large-scale genome duplications: phylogenetic and linkage analyses shed light on chordate genome evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15(9), pp.1145-1159.
30. Postlethwait, J., Amores, A., Cresko, W., Singer, A. and Yan, Y. (2004). Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends in Genetics*, 20(10), pp.481-490.
31. Primrose, S. and Twyman, R. (n.d.). *Principles of gene manipulation and genomics*.
32. Procaccio, V. and Wallace, D. (2004). Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology*, 62(10), pp.1899-1901.
33. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), pp.5463-5467.
34. Sato, Y. and Nishida, M. (2010). Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution. *Environmental Biology of Fishes*, 88(2), pp.169-188.
35. Sazanov, L. and Hinchliffe, P. (2006). Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, 311(5766), pp.1430-1436.

36. Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), pp.1777-1783.
37. Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1555(1-3), pp.154-159.
38. Seoighe, C. and Wolfe, K. (1999). Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5), pp.548-554.
39. Sidow, A. (1996). Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(6), pp.715-722.
40. Soltis, D. and Burleigh, J. (2009). Surviving the K-T mass extinction: New perspectives of polyploidization in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), pp.5455-5456.
41. Taylor, J.S., van de Peer, Y., Braasch, I., and Meyer, A. (2001) Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 356(1414):1661-1679.
42. Tine, M., Kuhl, H., Gagnaire, P., Louro, B., Desmarais, E., Martins, R., Hecht, J., Knaust, F., Belkhir, K., Klages, S., Dieterich, R., Stueber, K., Piferrer, F., Guinand, B., Bierne, N., Volckaert, F., Bargelloni, L., Power, D., Bonhomme, F., Canario, A. and Reinhardt, R. (2014). European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature Communications*, 5(1).
43. Ugalde, C., Janssen, R., van den Heuvel, L., Smeitink, J. and Nijtmans, L. (2004). Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Human Molecular Genetics*, 13(6), pp.659-667.
44. Van de Peer, Y., Maere, S. and Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), pp.725-732.
45. Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(6), pp.292-298.
46. Zickermann, V., Wirth, C., Nasiri, H., Siegmund, K., Schwalbe, H., Hunte, C. and Brandt, U. (2015). Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science*, 347(6217), pp.44-49.