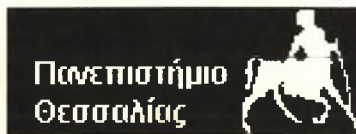
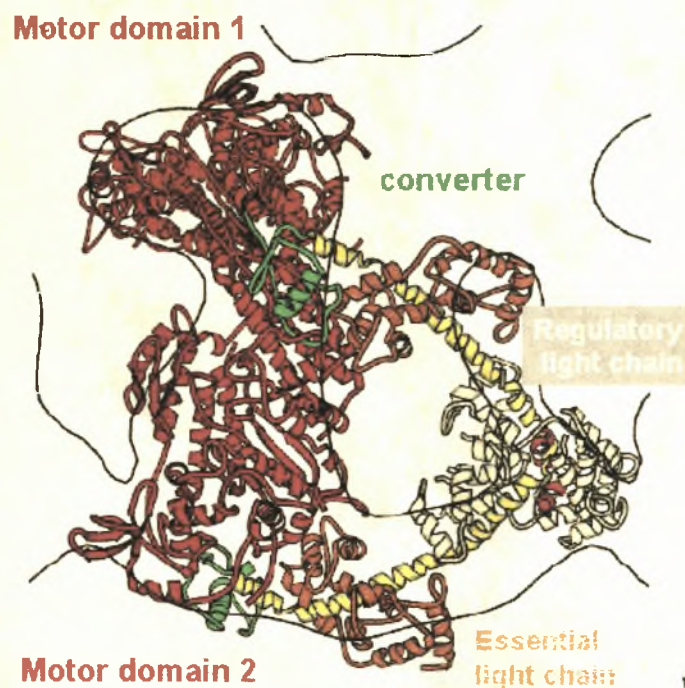


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Οι δύο ισομορφές της ελαφριάς αλυσίδας 2 (MLC2) της μυοσίνης: εναλλακτική πολυαδενυλίωση και ιστική κατανομή



Σιώμου Α. Μήνα  
Λάρισα 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4650/1  
Ημερ. Εισ.: 14/10/2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΣΙΩ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087873

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουαρίου-Ιουνίου 2005. Η υπεύθυνη και επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η κ. Κ. Μούτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Κ. Μούτου που με δέχτηκε στο εργαστήριό της, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθειά της και τις απαραίτητες διευκρινίσεις της στη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ θερμά, ακόμη, τον κ. Ζ. Μαμούρη, Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, για τη βοήθειά του στη συγγραφή ενός τμήματος της εργασίας μου. Τέλος, ευχαριστώ πολύ το προσωπικό του εργαστηρίου για τη βοήθεια που μου παρείχε στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της υπεύθυνης τριμελούς επιτροπής που θα επιμεληθούν την εξέταση της διπλωματικής μου εργασίας και συγκεκριμένα την κ. Κ. Μούτου Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, τον κ. Ζ. Μαμούρη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και τον κ. Κ. Μαθιόπουλο Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας.

Η φοιτήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Σιώμου Α. Μήνα

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	3
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1.1 Ο μυς	5
1.1.2 Η μυοσίνη	5
1.1.3 Οι ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης	7
1.2 Το μυϊκό σύστημα των τελεόστεων	8
1.3 Η τσιπούρα	10
1.4 Ελαφριά Αλυσίδα 2 της Μυοσίνης (MLC2) στην τσιπούρα	10
1.4.1 Αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της ισομορφής A της MLC2 της τσιπούρας	11
1.4.2 Ρύθμιση της έκφρασης της ισομορφής A της MLC2 της τσιπούρας από τις θυροειδείς ορμόνες	12
1.5 Σκοπός της εργασίας	13
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.1 Απομόνωση της ισομορφής B της MLC2 και των εναλλακτικών μεταγράφων της ισομορφής A της MLC2	14
2.2 Φυλογενετική ανάλυση	14
2.3 Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση του cDNA της MLC2 των ισομορφών A και B	15
2.4.1 Απομόνωση RNA από δείγματα των ιστών τσιπούρας και σύνθεση cDNA από το RNA	15
2.4.2 Σύνθεση cDNA	16
2.5 Ενίσχυση του cDNA της MLC2 με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	17
<b>3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
3.1 Εναλλακτικά μετάγραφα της ισομορφής A της MLC2	18
3.2 Ισομορφή B της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 της τσιπούρας	20
3.3 Φυλογενετική ανάλυση	23
3.4 Ιστική κατανομή των δύο ισομορφών A και B της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 στην τσιπούρα	25
<b>4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	27
4.3 Συμπεράσματα	31
4.2 Στόχοι μελλοντικής έρευνας	32
<b>5.ΠΑΡΑΤΗΜΑΤΑ</b>	
5.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1(ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ)	33
5.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 (ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ)	35
<b>6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	36

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μυοσίνη, η κυριότερη πρωτεΐνη συστολής των παχιών νηματίων, αποτελείται από έξι πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο όμοιες βαριές αλυσίδες και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (MLCs: Myosin light chains), δύο ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (MLC2) και δύο αλκαλικές ελαφριές αλυσίδες (MLC1, MLC3). Η MLC2 αναφέρεται ως ρυθμιστική καθώς έχει ρυθμιστικό, αν όχι καταλυτικό ρόλο, στη δέσμευση του ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ).

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει την απομόνωση, το χαρακτηρισμό, την ιστική κατανομή, αλλά και τη μοριακή εξέλιξη της ισομορφής B της MLC2 της τσιπούρας, η οποία εκφράζεται έντονα στο σκελετικό μυ, ασθενέστερα στον καρδιακό και λείο μυ αλλά και σε μη μυϊκούς ιστούς. Επιπλέον, παρουσιάζει την απομόνωση τριών εναλλακτικών μεταγράφων της ήδη γνωστής ισομορφής A της MLC2 που εκφράζεται αποκλειστικά στο σκελετικό μυ (κόκκινο και λευκό μυ).

Διαφορετικά μετάγραφα της ισομορφής A της MLC2 και η ισομορφή B της MLC2 απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκη κατασκευασμένη από εμβρυϊκά στάδια τσιπούρας στη διάρκεια ενός EST project. Για κάθε ένα από τους κλώνους της MLC2 πραγματοποιήθηκε πλήρης αλληλούχιση πέντε φορές, η οποία ανέδειξε την παρουσία τριών διαφορετικών μεταγράφων της ήδη γνωστής ισομορφής A της MLC2 (accession number AF150904), αλλά και μία νέα ισομορφή.

Οι δύο ισομορφές της MLC2 της τσιπούρας έχουν το ίδιο μήκος (170aa), αλλά διαφέρουν ως προς δέκα αμινοξέα, όλα εκτός της περιοχής δέσμευσης ασβεστίου. Αυτά τα 10 αμινοξέα είναι κοινά ανάμεσα στις ισομορφές B του ιππόγλωσσου και της τσιπούρας και πιθανόν να αποτελούν χαρακτηριστικά των ισομορφών B της MLC2.

Η κατανομή των δύο ισομορφών στους ιστούς: κόκκινος μυς, λευκός μυς, στομάχι, πυλωρικά τυφλά, πρόσθιο έντερο, οπίσθιο έντερο, νεφρός, ήπαρ, εγκέφαλος, βράγχια, καρδιά, επιδερμίδα, και σπλήνας, εξετάστηκε με τη μέθοδο της RT-PCR και εκκινητές εξειδικευμένους για κάθε ισομορφή. Μετάγραφα της MLC2 ήταν παρόντα σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Η ισομορφή A της MLC2 της τσιπούρας εκφράζεται μόνο στο σκελετικό μυ (ερυθρό και λευκό μυ). Η ισομορφή B εκφράζεται έντονα στο σκελετικό μυ (ερυθρό και λευκό μυ), αλλά είναι παρούσα στο λείο και καρδιακό μυ και στους μη μυϊκούς ιστούς που εξετάστηκαν. Πιθανόν, οι δύο ισομορφές να είναι εναλλακτικά μετάγραφα του ίδιου γονιδίου, οπότε η εναλλακτική μετάγραφη των εξωνίων τους ρυθμίζεται ρυθμίζεται ιστικά ή αναπτυξιακά. Εξίσου πιθανό είναι να υπάρχει διαφορά στις ιδιότητες συστολής των μορίων μυοσίνης που συμμετέχουν.

Ένα επιπλέον στοιχείο για την ήδη γνωστή ισομορφή A της MLC2 της τσιπούρας ήταν η απομόνωση τριών μεταγράφων, τα οποία ενώ προέρχονται από το ίδιο γονίδιο και φέρουν παρόμοιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, διαφέρουν αποκλειστικά και μόνο στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής τους. Τα εναλλακτικά μετάγραφα προκύπτουν από την εναλλακτική χρήση των τριών διαφορετικών σημάτων πολυαδενυλίωσης, τα οποία εντοπίζονται στη 3'-UTR της αλληλουχίας της ισομορφής A. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση είναι μια μετα-μεταγραφική διαδικασία, η οποία παράγει μετάγραφα με διαφορετική σταθερότητα και μεταφραστική αποτελεσματικότητα.

Τέλος, για να διευκρινιστούν οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στις ισομορφές A και B της MLC2 της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και στις MLC2 άλλων τελεόστων ιχθύων πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών αλληλουχιών των MLCs2. Οι αλληλουχίες των MLC2 των διαφόρων ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση με τις αλληλουχίες των δύο ισομορφών της MLC2 της τσιπούρας και την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με χρήση της εμπειρικής μεθόδου του Kimura για τις πρωτεΐνες και το δένδρο κατασκευάστηκε με τη μέθοδο neighbour-joining. Για τη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 100 bootstrap αναλύσεις. Από την κατάταξη των MLC2 πρωτεϊνών των ιχθύων στο δενδρόγραμμα προκύπτουν τρεις ανεξάρτητες ομάδες υποομάδες και οι ισομορφές A και B της MLC2 της τσιπούρας ομαδοποιούνται με τις αντίστοιχες ισομορφές της MLC2 του ιχθύος ιππόγλωσσος (*Hippoglossus hippoglossus*)

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1.1 Ο μυς

Ο μυς είναι ένας ιστός που γεννά και μεταδίδει ενέργεια. Είναι υπεύθυνος για όλες τις μηχανικές λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι η κίνηση του σκελετού, η λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων, της καρδιάς και των υπολοίπων οργάνων. Στα σπονδυλωτά οι μύες κατέχουν το 40-50% του σωματικού βάρους.

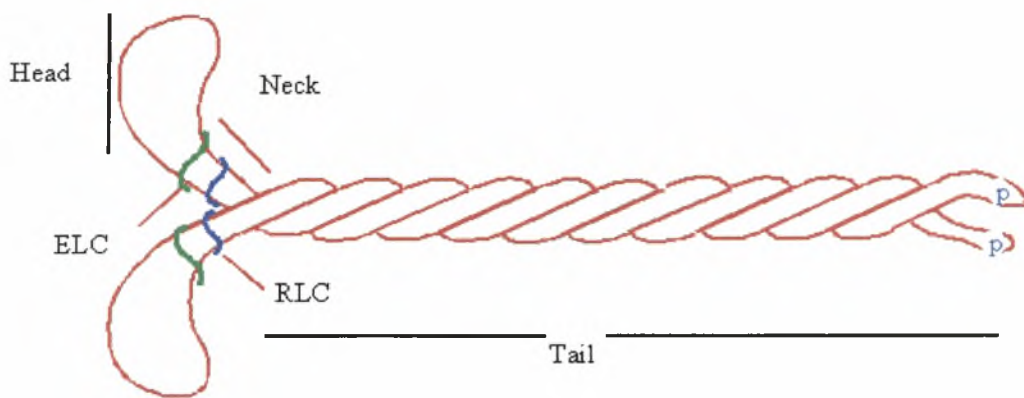
Οι μύες βρίσκονται στο σκελετό του σώματος (σκελετικοί μύες), στο μυοκάρδιο (καρδιακοί μύες) και σε διάφορα κοίλα όργανα και σωλήνες (λείοι μύες).

## 1.1.2 Η μυοσίνη

Η μυοσίνη είναι η κυριότερη πρωτεΐνη συστολής των παχίων νηματίων, η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη συστολής των λεπτών νηματίων, την ακτίνη. Αυτή η μηχανοχημική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες συστολής ρυθμίζεται από το σύμπλεγμα τροπονίνης-τροπομυοσίνης (Sellers and Adelstein, 1987). Ιόντα ασβεστίου δεσμεύονται στην τροπονίνη C του ρυθμιστικού αυτού συμπλέγματος, η οποία αποτελεί και τη ρυθμιστική πρωτεΐνη των λεπτών νηματίων, οδηγώντας στην εξαρτώμενη από ATP ανακύκλωση των γεφυρών ακτίνης-μυοσίνης και στην παραγωγή δύναμης. Αυτές οι δυναμικές αλληλεπιδράσεις ελέγχονται επακριβώς από την απελευθέρωση και επαναπρόσληψη του  $Ca^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο.

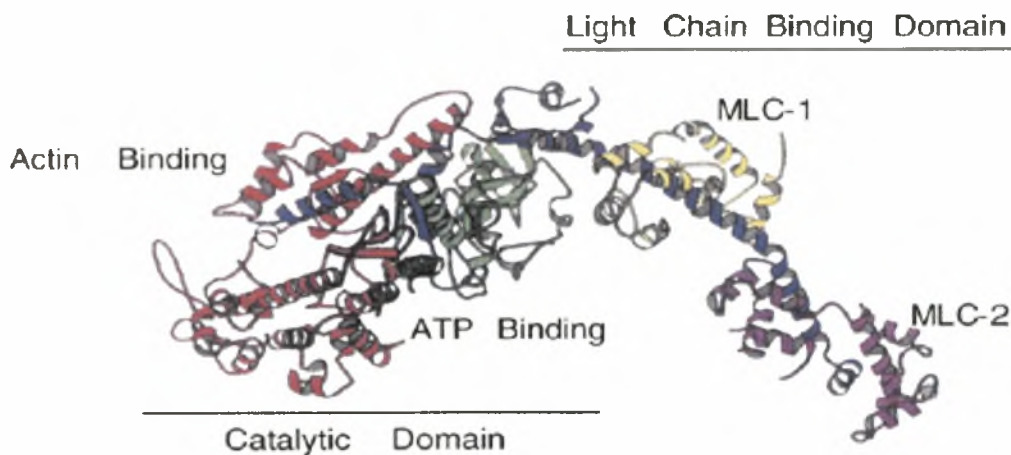
Η μυοσίνη κατανέμεται στους διάφορους κυτταρικούς τύπους και παίζει κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική συσταλτικότητα και κινητικότητα (Mooseker and Cheney, 1995). Παρόλο που η δομή της μυοσίνης στους διάφορους κυτταρικούς τύπους είναι υψηλά συντηρημένη οι λειτουργίες της είναι αρκετά διαφοροποιημένες και κάθε μόριο μυοσίνης χαρακτηρίζεται από μοναδική ενζυμική ενεργότητα, δραστηκότητα μετατόπισης της ακτίνης και τρόπο ρύθμισης.

Η μυοσίνη που βρίσκεται στο γραμμωτό μυ είναι ένα μακρύ μόριο περίπου 160 nm σε μήκος και 20-40 nm σε διάμετρο. Έχει αυξημένη δραστηκότητα ATPάσης και γρήγορη ολίσθηση της ακτίνης και απαιτεί τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες των λεπτών νηματίων, τροπονίνη /τροπομυοσίνη, για τη ρύθμισή της (Zot and Potter, 1987). Η μυοσίνη είναι ένα μεγάλο μόριο μοριακού βάρους 540 kDa που σχηματίζεται από έξι πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο όμοιες βαριές αλυσίδες (MHCs: Myosin heavy chains) μοριακού βάρους 200 kDa και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (MLCs: Myosin light chains) (Stryer L., 1997), δύο ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (RLCs: Regulatory Myosin light chains, MLC2) με μοριακό βάρος 18,5 kDa και δύο αλκαλικές ελαφριές αλυσίδες (ELCs: Essential myosin light chains, MLC1, MLC3) με σχετικό μοριακό βάρος 16-27 kDa. Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από μία σφαιρική περιοχή με διπλή κεφαλή που ακολουθείται από μία περιοχή (λαιμό) στην οποία δεσμεύονται οι ελαφριές αλυσίδες και η οποία συνδέει την κεφαλή με μία μακριά ουρά (1500 E σε μήκος και 20 E σε πλάτος) (Εικ.1).



**Εικόνα 1.** Το μόριο της μυοσίνης συντίθεται από δύο βαριές αλυσίδες και δύο ομάδες ελαφριών αλυσίδων, τις αλκαλικές ελαφριές αλυσίδες (ELC) και τις ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (RLC).. (Adelman & Taylor, 1969)

Στο σχηματισμό της κεφαλής, η οποία έχει και δράση ATPάσης, παίρνει μέρος το N-τελικό άκρο κάθε μιας MHC με μία ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα (RLC) και μία αλκαλική ελαφριά αλυσίδα (ELC). Κάθε κεφαλή, η οποία είναι γνωστή και ως τμήμα 1 (S1: subfragment 1), περιέχει μία περιοχή δέσμευσης ATP και υδρόλυσης του και μία περιοχή δέσμευσης της ακτίνης. Η ουρά είναι μία διπλή α-έλικα που σχηματίζεται από τα C-τελικά άκρα των δύο βαρέων αλυσίδων και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των παχέων νηματίων (Εικ.2).

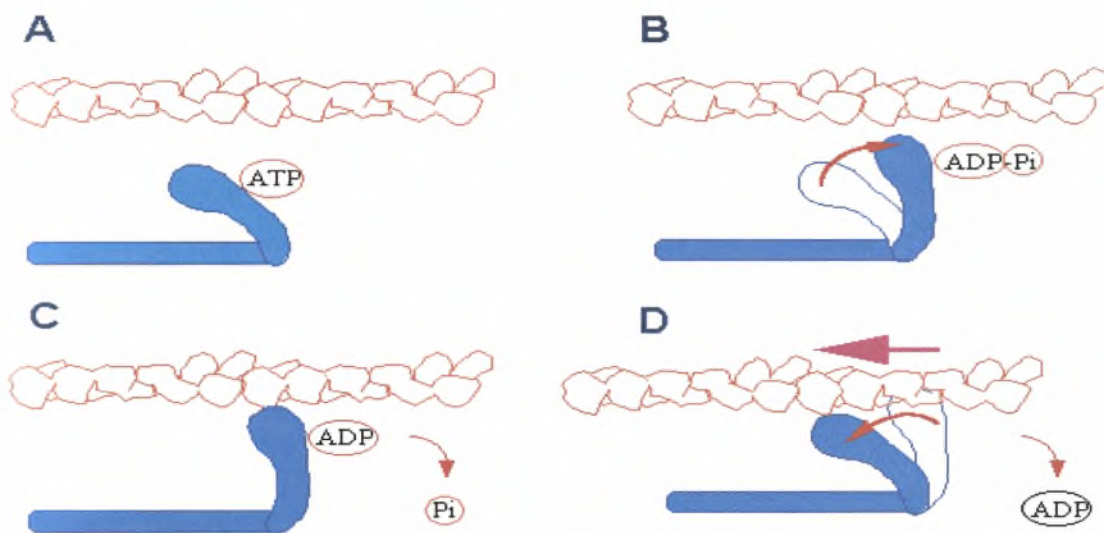


**Εικόνα 2.** Η τρισδιάστατη δομή του S1 (subfragment 1) του μορίου της μυοσίνης, όπως προέκυψε από X-Ray κρυσταλλογραφική ανάλυση (Rayment et al. 1993). Αριστερά φαίνεται η κεφαλή της μυοσίνης (καταλυτική περιοχή) (κόκκινη), όπου διακρίνονται οι περιοχές δέσμευσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και της ακτίνης. Δεξιά (στο λαιμό της μυοσίνης) φαίνεται η C-τελική περιοχή (μωβ), στο α-ελικοειδές τμήμα (περιοχή δέσμευσης των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης) της οποίας, συνδέονται οι αλκαλικές ελαφριές αλυσίδες, MLC1 ή MLC3 (κίτρινο) και η ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, MLC2 (φούξια). Ανάμεσα στις δύο προαναφερόμενες περιοχές φαίνεται η N-τελική περιοχή (πράσινο).

Η μυοσίνη έχει τρεις σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες: α) Τα μόρια της μυοσίνης, όταν βρεθούν σε διάλυμα με φυσιολογική ιοντική ισχύ και pH, συγκροτούνται σε νηματία. Το νηματίο της μυοσίνης είναι πολικό και μοιάζει σε βέλος με δύο αιχμές, όπου οι δύο ομάδες των κεφαλών προσανατολίζονται προς αντίθετες κατευθύνσεις και απομακρύνονται από το κέντρο.



β) Συνδέεται με την πολυμερισμένη μορφή της ακτίνης μέσω των δύο κεφαλών της. Η μία ομάδα κεφαλών μετακινεί τα νηματία ακτίνης προς μία κατεύθυνση, ενώ η άλλη τα μετακινεί προς την αντίθετη κατεύθυνση (αντίθετος προσανατολισμός). Το συνολικό αποτέλεσμα είναι η ολίσθηση των αντίθετα προσανατολισμένων νηματίων μεταξύ τους (Alberts, 2000). Η αλληλεπίδραση αυτή είναι σημαντική για τη δημιουργία της δύναμης που είναι απαραίτητη για τη σχετική κίνηση των λεπτών και παχέων νηματίων. γ) Η μιοσίνη είναι ένα ένζυμο με δράση ATPάσης, που υδρολύει το ATP σε ADP και  $P_i$  (ανόργανο φωσφορικό) για την παραγωγή ενέργειας. Η παραγωγή ενέργειας και η απελευθέρωση του ανόργανου φωσφορικού δίνουν ώθηση για αλλαγή της διαμόρφωσης της κεφαλής της μιοσίνης και κίνηση (Εικ.3).



**Εικόνα 3. Ο κύκλος της δημιουργίας εγκάρσιων γεφυρών της μιοσίνης.** Α. Η δέσμευση του ATP στο πίσω μέρος της κεφαλής της μιοσίνης εμποδίζει τη δέσμευση της ακτίνης Β. Καθώς το ATP υδρολύεται η κεφαλή μετατοπίζεται προς τα πίσω και το ADP και ανόργανο φωσφορικό ( $P_i$ ) συνεχίζουν να παραμένουν δεσμευμένα στην κεφαλή της μιοσίνης C. Το  $P_i$  απελευθερώνεται και η ακτίνη δεσμεύεται στην κεφαλή της μιοσίνης D. Τέλος, απελευθερώνεται και το ADP έτσι ώστε να συνεχιστεί ο κύκλος, όταν υπάρξουν οι κατάλληλες συνθήκες. Με κόκκινο χρώμα φαίνεται η ακτίνη και με γαλάζιο η μιοσίνη (κεφαλή και ουρά) ( Janson and Taylor, 1993).

### 1.1.3 Ελαφριές αλυσίδες μιοσίνης

Οι ελαφριές αλυσίδες της μιοσίνης ανήκουν στην οικογένεια των γονιδίων της τροπονίνης C, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες δέσμευσης του ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) όπως είναι η καλμοδουλίνη και η παρβαλβουμίνη (Periasamy et al., 1984). Η μιοσίνη στο γραμμωτό μυ περιέχει τρεις μορφές ελαφριών αλυσίδων: την ελαφριά αλυσίδα της μιοσίνης 1 (MLC1) μοριακού βάρους 22 kb, την ελαφριά αλυσίδα της μιοσίνης 2 (MLC2) μοριακού βάρους 18 kb και την ελαφριά αλυσίδα της μιοσίνης 3 (MLC3) μοριακού βάρους 16 kb. Κάθε κεφαλή περιέχει μία MLC2 και μία MLC1 ή MLC3. Οι ελαφριές αλυσίδες δεσμεύονται στις υψηλά υδρόφοβες α-ελικοειδείς περιοχές και μαζί σταθεροποιούν την α-έλικα.

Οι ελαφριές αλυσίδες ανάλογα με τον τρόπο απομόνωσης διακρίνονται: α) στις αλκαλικές (ELCs) MLC1 και MLC3, οι οποίες μπορούν να απομονωθούν μετά από κατεργασία και επακόλουθη μετουσίωση της μυοσίνης με αλκάλι ή ουρία. Οι ELCs υπάρχουν σε δύο ισομορφές, τη μακριά MLC1 και την κοντή MLC3.

Στα ψάρια έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτές ισομορφές προέρχονται από δύο διαφορετικά γονίδια (Dalla Libera et al., 1991; Hirayama et al., 1997), σε αντίθεση με άλλα σπονδυλωτά (κοτόπουλο, ποντίκι και αρουραίο) όπου βρέθηκε ότι οι δύο ισομορφές κωδικοποιούνται από ένα μοναδικό γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα. Οι ELCs είναι απαραίτητες για στη σταθεροποίηση της κεφαλής της μυοσίνης γι' αυτό και αναφέρονται και ως ουσιώδεις (Lowey, 1986). Οι πολλαπλές τους ισομορφές έχουν συσχετιστεί με τις διαφοροποιημένες μέγιστες συσπάσεις και με τη δραστικότητα της ATPάσης στο σκελετικό (Sweeney et al., 1988) και λείο μυ (Hasegawa and Morita, 1992; Helper et al., 1988).

β) Στις απομονωμένες μετά από κατεργασία με δινιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (RLC). Στις ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες ανήκει η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης 2 (MLC2: Myosin light chain 2), η οποία αναφέρεται ως ρυθμιστική καθώς έχει ρυθμιστικό, αν όχι καταλυτικό ρόλο, στη δέσμευση του ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ). Η MLC2 παρουσιάζει, όσον αφορά την πρωτοταγή της δομή υψηλή ομολογία με άλλες πρωτεΐνες που δεσμεύουν  $Ca^{2+}$ , όπως η καλμοδουλίνη, η τροπονίνη C και η παραλβουμίνη (Collins, 1976; Kretsinger, 1980; Cheung, 1980). Η υψηλής συγγένειας περιοχή δέσμευσης  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  της MLC2 προσδένει είτε  $Ca^{2+}$  είτε  $Mg^{2+}$  και βρίσκεται στο πρώτο δομικό μοτίβο έλικα-θηλιά-έλικα της αμινοτελικής περιοχής της MLC2.

Οι ελαφριές αλυσίδες στους γραμμωτούς μύες (σκελετικούς και καρδιακούς μύες) διαφόρων θηλαστικών υπάρχουν σε αρκετές ισομορφές. Οι πιο σημαντικές είναι η αργή αλκαλική MLC1s (MLC1 slow), οι δύο γρήγορες αλκαλικές MLC1f και MLC3f (Schiaffino S. and Reggiani C., 1994) και τουλάχιστον τρεις ισομορφές της ρυθμιστικής MLC2 που υπάρχουν στο γραμμωτό μυ των θηλαστικών: την MLC2f στο γρήγορο σκελετικό μυ και τις MLC2v και MLC2a που βρίσκονται στην κοιλία και τον κόλπο της καρδιάς αντίστοιχα. Η MLC2v είναι επίσης η κυριότερη ισομορφή στον αργό σκελετικό μυ (D'Albis A. and Butler-Browne G., 1993).

Η έκφραση των διαφόρων ισομορφών των MLCs είναι ιστοειδική και διαφορετική στα διάφορα στάδια ανάπτυξης και υπόκειται σε περιβαλλοντικό έλεγχο (όπως για παράδειγμα θερμοκρασία, διατροφή, άσκηση) καθώς και ορμονικό έλεγχο (Whalen et al., 1981; Gauthier et al., 1982; Izumo et al., 1986; Yamano et al., 1994; Hill et al., 2000; Moutou et al., 2001).

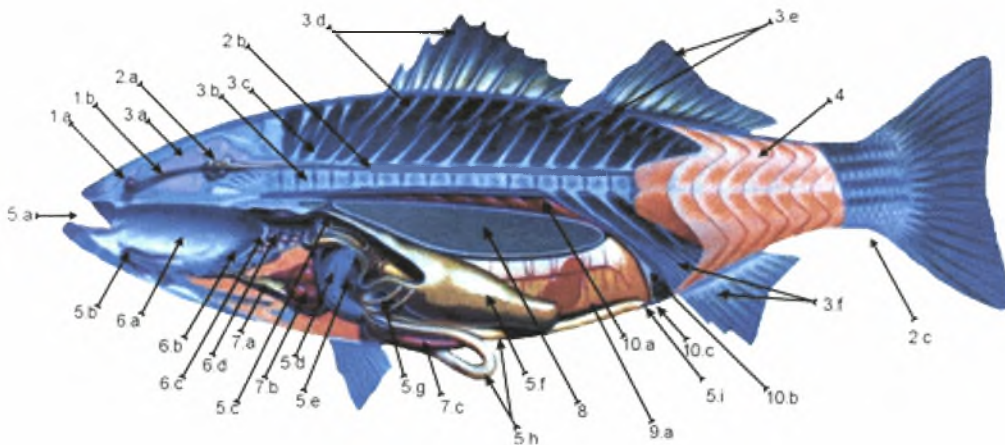
## 1.2 Το μυϊκό σύστημα των τελεόστεων

Οι μύες αποτελούν το 1/3 του βάρους ενός μετρίου μεγέθους ψαριού. Οι μύες εκδηλώνουν τη δύναμή τους μέσω της συστολής (σύσπασης), το οποίο σημαίνει ότι εάν ένας μυς προσδένεται σε διαφορετικά μέρη του σκελετού, η συστολή δημιουργεί ένα τράβηγμα το οποίο καταλήγει σε κίνηση.

Ο λείος μυς, ο οποίος βρίσκεται υπό ακούσιο έλεγχο, εντοπίζεται στον πεπτικό σωλήνα, όπου παρέχει τις βραδείες συσπάσεις που απαιτούνται για την προώθηση της τροφής. Βρίσκεται, επίσης, στους πόρους των αδένων που επικοινωνούν με το έντερο και την ουροδόχο κύστη, καθώς επίσης και στα αιμοφόρα αγγεία, στα γεννητικά όργανα και σε άλλες περιοχές.

Ο γραμμωτός μυς, ο οποίος σχηματίζει τη «σάρκα» του ψαριού βρίσκεται υπό ταχύ εκούσιο έλεγχο (Εικ.4). Αυτοί οι μύες είναι μεγάλες καλοσχηματισμένες δομές και παίζουν το σημαντικότερο ρόλο κατά το κολύμπι.

Οι γραμμωτοί μύες χρησιμοποιούνται επίσης για να κινούν τα μάτια, τη γνάθο, τα πτερύγια, και τα βραγχιακά καλύμματα. Τη μεγαλύτερη μυϊκή μάζα των ψαριών κατέχει το αξονικό μυϊκό σύστημα, το οποίο ξεκινά από το κεφάλι και καταλήγει στην ουρά, και βρίσκεται και στις δύο πλευρές του σώματος. Υπάρχει ελάχιστη εξειδίκευση για το αξονικό μυϊκό σύστημα, με μοναδική εξαίρεση τους μύες που χρησιμοποιούνται για την κίνηση των θωρακικών και πνευλικών πτερυγίων στους οποίους κάθε πτερύγιο έχει αντίθετα προσανατολισμένους μύες: ο ένας συστέλλει το πτερύγιο και ο άλλος το διαστέλλει [Wetzel, (1983); Nelson, (1994); Ross, (1995); Moyle and Cech, (1996) and Helfman et al. (1997)].



Source: EPA, based on a drawing by Jack J. Kunz, National Geographic Society, 1969.

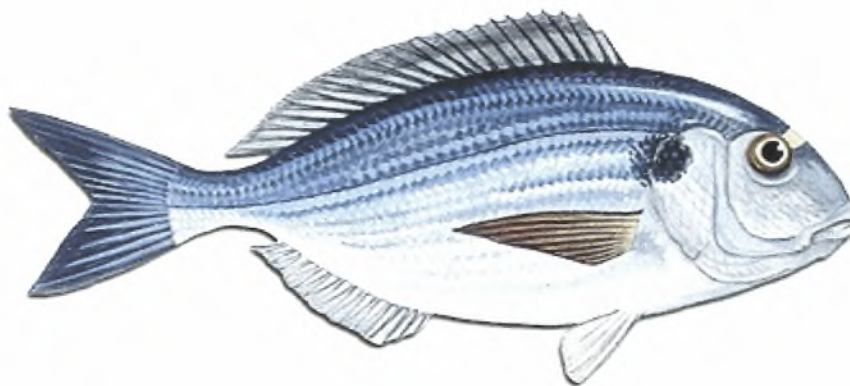
**Εικόνα 4. Η εσωτερική ανατομία των ιχθύων.** Τα μέρη του σκελετικού συστήματος και του μυϊκού συστήματος, με τη σειρά που εμφανίζονται στο σχήμα: το 3a παριστάνει το κρανίο, το 3b παριστάνει τους σπονδύλους και τη σπονδυλική στήλη, το 3c παριστάνει τις νευρικές άκανθες, το 3d παριστάνει τα πρώτα ραχιαία ακανθώδη πτερύγια και τον πτερυγιοφόρο, το 3e παριστάνει τα δεύτερα ραχιαία ακανθώδη πτερύγια και τον πτερυγιοφόρο, το 3f παριστάνει τα εδραία ακανθώδη πτερύγια που προσφέρουν τη στήριξη και, τέλος, το 4 παριστάνει το μυϊκό τμήμα (μυομερές).

Το αξονικό σύστημα είναι διατεταγμένο σε επαναλαμβανόμενα επικαλυπτόμενα τμήματα σχήματος W, τα λεγόμενα μυομερή (Mnut et al., 1996). Μία μεμβράνη συνδέει κάθε μυομερές με το γειτονικό του. Τα μυομερή χωρίζονται από ένα κάθετο διάφραγμα σε αριστερούς και δεξιούς και από ένα οριζόντιο διάφραγμα σε επαξόνιους μύες πάνω από το διάφραγμα και σε υπαξόνιους μύες κάτω από το διάφραγμα. Κατά μήκος των πλευρών, κάτω από το δέρμα, βρίσκονται οι πλευρικοί επιφανειακοί μύες, οι οποίοι είναι πλούσιοι σε αιμοφόρα αγγεία και έχουν υψηλή συγκέντρωση λιπών. Αυτοί οι μύες ονομάζονται κόκκινοι ή αργοί μύες, καθώς εμφανίζονται κόκκινοι από την υψηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και χρησιμοποιούνται για κολύμπι υψηλής ή χαμηλής ταχύτητας. Διαθέτουν αργές οξειδωτικές μυϊκές ίνες που χρησιμοποιούν τον αερόβιο μεταβολισμό για παραγωγή ενέργειας.

Το υπόλοιπο τμήμα της μυϊκής μάζας αποτελείται από τους λευκούς ή γρήγορους μύες, οι οποίοι δεν περιέχουν καθόλου αιμοσφαιρίνη. Αυτοί οι μύες χρησιμοποιούνται για έντονο κολύμπι μέγιστης ταχύτητας και γενικά σε καταστάσεις όπου η επιβίωση είναι σημαντική. Διαθέτουν γρήγορες γλυκολυτικές μυϊκές ίνες που χρησιμοποιούν τον αναερόβιο μεταβολισμό για την παραγωγή ενέργειας (Bone Q. et al., 1995).

### 1.3 Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758)

Η τσιπούρα είναι ένας τελεόστεος ιχθύς της οικογένειας Sparidae (Εικ.5). Το μέγιστο μήκος της είναι 70.0 cm, το μέγιστο βάρος της είναι 17.2 kg και ο μέγιστος αναφερόμενος χρόνος ζωής της είναι 11 χρόνια. Ζει σε υφάλμυρα, γλυκά και θαλάσσια ύδατα ,με κατά μέσο όρο βάθος 1-150 m και υποτροπικό κλίμα. Έχει εντοπιστεί στον Βορειοανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, στη Βαλτική, στην Ιβηρική χερσόνησο και στη Μεσόγειο θάλασσα. Η τσιπούρα είναι ένα ψάρι με μεγάλη εμπορική σημασία τόσο για την αλιεία όσο και για τις υδατοκαλλιέργειες.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της τσιπούρας (<http://perso.wanadoo.fr>)

### 1.4 Ελαφριά Αλυσίδα 2 της Μυοσίνης (MLC2) στην τσιπούρα

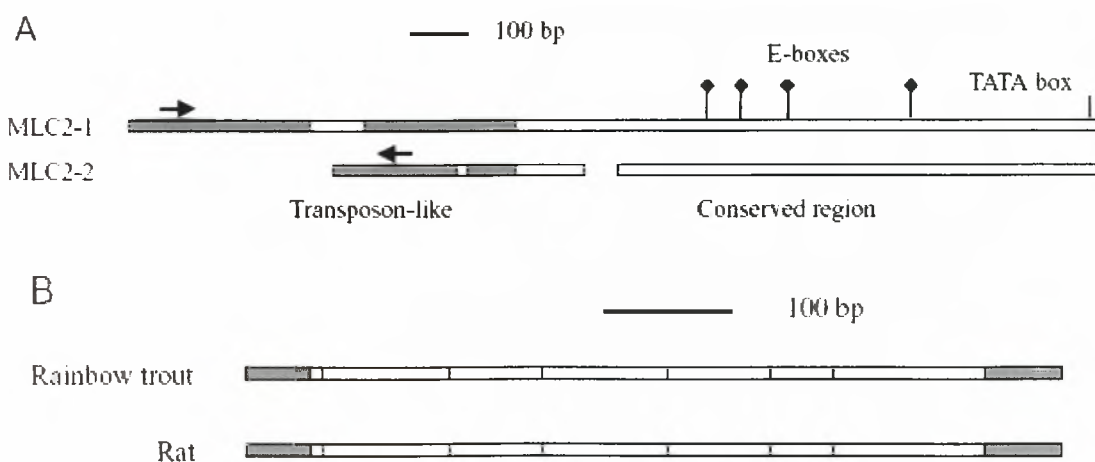
Μέχρι τώρα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η ύπαρξης μιας ισομορφής (ισομορφή A) της MLC2 της τσιπούρας με χαρακτηριστική ιστοειδικότητα για το σκελετικό μυ (Moutou et al. 2001) και απουσία έκφρασης σε οποιοδήποτε άλλο τύπο μυός. Πρόκειται για μία αλληλουχία μήκους 1452 bp με ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) 513 νουκλεοτιδίων. Η αμινοξική αλληλουχία, μετά από μετάφραση της παραπάνω νουκλεοτιδικής, αποτελείται από 170 αμινοξέα. Η 3' αμετάφραστη περιοχή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (μήκους 855 bp) περιέχει τρία διαφορετικά σήματα πολυαδενυλίωσης (ένα κανονικό: AATAAA και δύο τροποποιημένα: AAATAAA και AAATAA).

Σε επίπεδο αμινοξέων η ισομορφία του σκελετικού μυός της MLC2 της τσιπούρας παρουσιάζει ποσοστό ομοιότητας 95% με τη MLC2 του zebrafish (*Danio rerio*, Xu et al. 1999). Χαρακτηριστική για τις MLCs2 του σκελετικού μυός είναι η εξαιρετικά υψηλή συντήρηση που φαίνεται να παρουσιάζει η κεντρική περιοχή (δώδεκα καταλοίπων) δέσμευσης Ca<sup>2+</sup> μεταξύ των MLCs2 των διαφόρων σπονδυλωτών. Η περιοχή αυτή εμφανίζει 100% ομοιότητα ανάμεσα στις MLCs2 της τσιπούρας και του zebrafish.

Το γονίδιο της MLC2, όπως περιγράφηκε για την MLC2 της πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*; Krasnov et al., 2002), του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*; Hirayama et al., 1998), και του zebrafish (*Danio rerio*; Xu et al., 1999) περιλαμβάνει στον προαγωγέα της ένα TATA box και πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία παίζουν ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της έκφρασης του μυός, όπως E-boxes και MEF2 μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και αλληλουχίες παρόμοιες με τρανσποζόνια των ψαριών, τα οποία παρόλο που βρίσκονται εκτός της περιοχής έναρξης της μεταγραφής πιθανολογείται ότι είναι ενεργά (Εικ.6Α). Όσον αφορά την κωδικοποιητική περιοχή, η αλληλουχία του cDNA της MLC2 είναι χωρισμένη σε επτά εξόνια, όπως συμβαίνει με όλες τις έως τώρα γνωστές MLC2 των σπονδυλωτών (Εικ.6Β).

#### 1.4.1 Αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της ισομορφίας A της MLC2 της τσιπούρας

Μέχρι τώρα λίγα έχουν γίνει γνωστά για το πρότυπο έκφρασης των MLCs κατά την ανάπτυξη. Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης εκφράζονται οι εμβρυονικές και οι εμβρυϊκές ισομορφές, ενώ αργότερα, με την αναγέννηση των μυών, αλλάζει και το είδος της ισομορφής που εκφράζεται (Rowlerson et al. 1997). Καθώς τα κύτταρα των μυοτόμων αρχίζουν να συγχωνεύονται και να γίνονται πολυπύρρηνα εμφανίζονται επιπρόσθετες ισομορφές.



**Εικόνα 6.** Δομή της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης της πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*). (Α) Οι προαγωγείς των δύο ισομορφών της MLC2 (MLC2-1 και MLC2-2) που έχουν βρεθεί στην πέστροφα περιλαμβάνουν μία συντηρημένη αλληλουχία 800 bp ανοδικά (upstream) της θέσης έναρξης της μεταγραφής και περιοχές παρόμοιες με τα διάφορα τρανσποζόνια (ψευδογονίδια) των ιχθύων. Τα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό των προαναφερόμενων περιοχών. Επίσης, επισημαίνονται και το πιθανό TATA box και τα τέσσερα E-boxes. (Β) Η δομή της κωδικοποιητικής περιοχής του γονιδίου της MLC2 της πέστροφας και του αρουραίου (GenBank X00975), όπου φαίνεται η οργάνωση των επτά εξώνων.

Όσον αφορά τη MLC2 στην τσιπούρα, η αρχή της έκφρασής της συμπίπτει με την έναρξη της σωματογένεσης, γεγονός που ίσως να αποτελεί ένδειξη της απουσίας εμβρυονικών ισομορφών αυτής. Με την ολοκλήρωση της οργανογένεσης εμφανίζεται ένα δεύτερο μετάγραφο της MLC2 μικρότερου μήκους, το οποίο ίσως να αντιπροσωπεύει προϊόν εναλλακτικού ματίσματος ή ακόμη και μία άλλη ισομορφή της MLC2 που πιθανόν να συμβάλλει στο σχηματισμό μορίων μυοσίνης με διαφορετικές συσταλτικές ιδιότητες.

Κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της προνύμφης της τσιπούρας, η MLC2 εκφράζεται αποκλειστικά στον αναπτυσσόμενο λευκό μυ, ενώ σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης της προνύμφης η έκφραση της MLC2 εντοπίζεται ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες, πιθανότατα στα δορυφορικά κύτταρα (Partuno et al. 1998).

Πιο αναλυτικά, κατά τις πρώτες ημέρες ζωής της προνύμφης τα επίπεδα έκφρασης της MLC2 εμφανίζονται ιδιαίτερα υψηλά στον υπαξόνιο και επαξόνιο λευκό μυ. Λίγο αργότερα, όμως, η έκφραση της MLC2 εντοπίζεται στην περιφέρεια του λευκού μυός, και συγκεκριμένα στις βλαστικές ζώνες (στρώματα κυττάρων από τα οποία πηγάζουν οι καινούργιες λευκές μυϊκές ίνες), σε αντίθεση με τα βαθύτερα στρώματα όπου απουσιάζει παντελώς η έκφραση της MLC2. Σε αυτά τα στρώματα του λευκού μυός, όπου συναντώνται μεγάλης διαμέτρου πολυγωνικές μυϊκές ίνες, η υπερτροφία αποτελεί την κυριότερη διαδικασία ανάπτυξης του μυός και οδηγεί στη βαθμιαία ωρίμανση των μυϊκών ινών και ίσως την αντικατάσταση των αρχικών ισομορφών των MLCs. Κατά τα στάδια της μεταμόρφωσης της προνύμφης (από την 41<sup>η</sup> ημέρα μετά την εκκόλαψη και μετά) ο λευκός μυς αποτελείται μόνο από μεγάλης διαμέτρου ίνες στις οποίες σταματά να εκφράζεται η MLC2. Σε αυτό το στάδιο η έκφραση της MLC2 περιορίζεται σε κύτταρα μικρού μεγέθους που βρίσκονται στον ενδιάμεσο των λευκών μυϊκών ινών χώρο, τα επονομαζόμενα δορυφορικά κύτταρα. Το πρότυπο έκφρασης της MLC2 παραμένει το ίδιο και κατά τα μετα-μεταμορφωτικά στάδια (Partuno et al. 1998; Rowlerston et al. 1995).

#### 1.4.2 Ρύθμιση της έκφρασης της ισομορφής A της MLC2 της τσιπούρας από τις θυροειδείς ορμόνες

Οι θυροειδείς ορμόνες συνιστούν ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που ελέγχουν την αναπτυξιακή μετατροπή των διαφόρων ισομορφών της μυοσίνης σε διάφορες ομάδες οργανισμών (Gambke et al., 1983; Butler-Browne et al., 1984; Gardahaut et al., 1992). Στα ψάρια, η ανάπτυξη της προνύμφης επηρεάζεται σημαντικά από τη συγκέντρωση της τριιωδοθυρωνίνης (T3) του πλάσματος των θηλυκών ψαριών πριν την ωτοκία και από την ποσότητα των μητρικών θυροειδών ορμονών που μεταφέρεται στα αυγά των ψαριών (Ayson and Lam, 1983; Brown et al., 1988; Brown et al., 1989). Στην περίπτωση της MLC2 πιθανολογείται ότι οι θυροειδείς ορμόνες καταλύουν το πρώτο βήμα σε έναν καταρράκτη αντιδράσεων στον οποίο παίρνουν μέρος κάποιοι σημαντικοί αναπτυξιακοί μυογενείς παράγοντες (όπως παραδείγματος χάριν ο IGF-I και η μυογενίνη), οι οποίοι τελικά ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν το γονίδιο της MLC2 (Muscat et al. 1995). Στην τσιπούρα, συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της MLC2 είναι σημαντικά υψηλότερα στα νεαρά από ότι στα ενήλικα άτομα.

Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης της MLC2 στα νεαρά ψάρια αυξάνονται μετά από χορήγηση της θυροειδούς ορμόνης θυροξίνης (T4), αλλά όχι της θυροειδούς ορμόνης τριιωδοθυρονίνης (T3) ή του υποθυροειδούς φαρμάκου θειουρία, ενώ τα επίπεδα της έκφρασης της αλκαλικής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης MLC3 δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη μεταβολή. Στα ενήλικα άτομα, αντίστοιχα, τα επίπεδα έκφρασης τόσο της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC2) όσο και της μίας εκ των δύο αλκαλικών ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης, της MLC3, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μεταβολή μετά από χορήγηση των θυροειδών ορμονών T4, T3 ή του υποθυροειδούς φαρμάκου θειουρία.

### 1.5 Σκοπός της εργασίας

Οι σκελετικοί μύες των ψαριών έχουν μερικά μοναδικά χαρακτηριστικά συγκρινόμενοι με τους σκελετικούς μύες των άλλων σπονδυλωτών, όπως ο ξεκάθαρος διαχωρισμός των γρήγορων (λευκών) και αργών (κόκκινων) μυών και η συνεχής τους ανάπτυξη σε μετεμβρυϊκά στάδια. Συνεπώς, τα ψάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα μοντέλο μελέτης που θα διευκολύνει πολλών ειδών μελέτες, οι οποίες είναι δύσκολο ή ακόμη και ασύμφορο να γίνουν σε άλλα σπονδυλωτά.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν: α) η περαιτέρω διερεύνηση των πολλαπλών σημάτων πολυαδενυλίωσης της ισομορφής A της MLC2 και β) η απομόνωση και ο προσδιορισμός της ιστοειδικής έκφρασης μιας δεύτερης πιθανής ισομορφής της MLC2, στο σκελετικό μυ ενός τελεόστεου ιχθύος με μεγάλη εμπορική σημασία, τόσο για την αλιεία όσο και για τις υδατοκαλλιέργειες, της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Ο προσδιορισμός της έκφρασης αυτής της δεύτερης ισομορφής (isoform B) της MLC2 αποτελεί επιβεβαίωση της στο παρελθόν αναφερόμενης στη βιβλιογραφία (Moutou et al., 2001) πιθανότητας ύπαρξης μίας δεύτερης ισομορφής με διαφορετικό αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης (αργότερα κατά την ανάπτυξη και σίγουρα μετά τη σωματογένεση). Στην παρούσα εργασία, λοιπόν, παρουσιάζεται η απομόνωση, η κλωνοποίηση, η αλληλουχία και η ιστική κατανομή της ισομορφής B της MLC2 του σκελετικού μύος, καθώς και η μοριακή εξέλιξη και των δύο ισομορφών της MLC2 της τσιπούρας, μέσω της κατασκευής ενός φυλογενετικού δένδρου που περιλαμβάνει τις MLC2 διαφόρων ιχθύων και παραθέτει τις εξελικτικές τους σχέσεις.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Απομόνωση της ισομορφής Β της MLC2 και των εναλλακτικών μεταγράφων της ισομορφής Α της MLC2

Διαφορετικά μετάγραφα της ισομορφής Α της MLC2 και η ισομορφή Β της MLC2 απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκη κατασκευασμένη από εμβρυϊκά στάδια τσιπούρας στη διάρκεια ενός EST project (Sarroroulou et al.). Συνοπτικά, η cDNA βιβλιοθήκη κατασκευάστηκε με 5μg mRNA που απομονώθηκε από εμβρυϊκά στάδια τσιπούρας, σύμφωνα με τις οδηγίες του Lambda Uni-ZAP XR cloning kit (Stratagene, La Jolla, USA). Ακολούθησε απομόνωση των αποικιών και του πλασμιδιακού DNA με το σύστημα BIOMEK 2000 και χρήση του QIAprep 96 Turbo BioRobot Kit. Η αλληλούχιση έγινε με τους εκκινητές T7 και T3 του πλασμιδιακού φορέα pBK-CMV.

Για κάθε ένα από τους κλώνους της MLC2 που παρουσιάζεται εδώ πραγματοποιήθηκε πλήρης αλληλούχιση πέντε φορές.

### 2.2 Φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες των MLC2 των άλλων ιχθύων και της ισομορφής Α της MLC2 της τσιπούρας που χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση σε επίπεδο αμινοξέων (με την αλληλουχία της ισομορφής Β της MLC2 που μελετάται) και την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου αποκτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank. Τα accession numbers των αλληλουχιών των MLC2 των ιχθύων που εμφανίστηκαν στο δενδρόγραμμα που παρατίθεται παρακάτω (στα αποτελέσματα) είναι τα εξής: AAF71271, *Oncorhynchus kisutch* (Hill et al., 2000); AAC32193, *Danio rerio* (Xu et al., 1999); BAA95142, *Engraulis japonicus*; BAA95140, *Sardinops melanostictus*; BAA95125, *Thunnus thynnus*; BAA95128, *Euthynnus pelamis*; BAA95134, *Cypselurus agoo*; BAA95137, *Trachurus trachurus*; BAA89705, BAA89705 *Cyprinus carpio* (Hirayama et al., 1998); BAB69824, *Decapterus tabl* (Ishizaki et al., 2001); BAB69803, *Decapterus maruadsi* (Ishizaki et al., 2001); BAB69800, *Caranx delicatissimus* (Ishizaki et al., 2001); BAB18578, *Theragra chalcogramma* (Ishizaki et al., 2000); CAD32553, *Hippoglossus hippoglossus* isoform A (Andersen et al., 2002); CAD32552, *Hippoglossus hippoglossus* isoform B (Andersen et al., 2002); AAD54229, *Sparus aurata isoform A* (Moutou et al., 2001).

Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου έγινε με χρήση του προγράμματος Treeview (Roderic D.M.), αφού προηγουμένως είχε πραγματοποιηθεί πολλαπλή ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος Clustal W (Thompson et al., 1994). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με χρήση της εμπειρικής μεθόδου για τις πρωτεΐνες του Kimura (Kimura, 1983) και το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε με τη μέθοδο neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) χρησιμοποιώντας τη μορφή PHYLIP (Felsenstein, 1993). Για τη φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν 100 bootstrap αναλύσεις.



## 2.3 Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση του cDNA της MLC2 των ισομορφών A και B.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των δύο ισομορφών της MLC2 μήκους 513 bp (ισομορφή A) και 513 bp (ισομορφή B) σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος OLIGO (ver. 3.4) και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Invitrogen.

Σχεδιάστηκε ένας forward εκκινητής (RLCF1), κοινός και για τις δύο ισομορφές, και τρεις reverse εκκινητές: ένας μέσα στην κοινή κωδικοποιητική περιοχή (RLCR1) και δύο μέσα στην 3' αμετάφραστη περιοχή (RLCR2 και RLCR3) που διαφοροποιούν τις δύο ισομορφές.

5' 3'  
RLCF1: GCCCCATCAACTTCACCGTCTTT (T<sub>m</sub>=59°C)  
RLCR1: CACACGGAGAAGAGAAGGAGG (T<sub>m</sub>=59°C)  
RLCR2: CTGAGGCGTGTGAATGAAGTGTG (T<sub>m</sub>=54°C)  
RLCR3: TCCATCTCTGTCCCTGCCTCTTG (T<sub>m</sub>=52°C)

### 2.4.1 Απομόνωση RNA από δείγματα των ιστών τσιπούρας και σύνθεση cDNA από το RNA

#### Πηγή προέλευσης ιστών

Τα δείγματα ιστών που χρησιμοποιήθηκαν ελήφθησαν από τσιπούρα ιχθυοκαλλιέργειας βάρους 115,1 g και μήκους 18,2 cm της εταιρίας SELONTA ΙΧΘΥΟ Α.Ε. Το ψάρι αφού αναισθητοποιήθηκε, θανατώθηκε ακαριαία και απομονώθηκαν οι εξής ιστοί: 1) κόκκινος μυς, 2) λευκός μυς, 3) στομάχι, 4) πυλωρικά τυφλά, 5) πρόσθιο έντερο, 6) οπίσθιο έντερο, 7) νεφρός, 8) ήπαρ, 9) εγκέφαλος, 10) βράγχια, 11) καρδιά, 12) επιδερμίδα και 13) σπλήνας. Οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα RNA later (Sigma) και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο.

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRI REAGENT (Sigma) , ένα διάλυμα με το οποίο γίνεται γρήγορα και εύκολα η απομόνωση ολικού RNA μήκους 0,1-15 kb υψηλής καθαρότητας. Κατά την απομόνωση προστέθηκε συνολικά 1ml TRI REAGENT σε κάθε δείγμα ιστού (γενικά σε 50-100 mg ιστού αναλογεί 1ml TRI REAGENT) και πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του κάθε ιστού σε ομογενοποιητή τύπου ULTRA-TURRAX T25 basic KIKA-WERKE. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000 rpm για 5 min στους 4°C, ώστε να απομακρυνθούν αδιάλυτες ουσίες, όπως εξωκυτταρικές μεμβράνες, πολυσακχαρίτες, υψηλού μοριακού βάρους DNA, λίπη και ιστός. Το υπερκείμενο του διαλύματος, που περιέχει RNA μαζί με πρωτεΐνες, μεταφέρθηκε μετά τη φυγοκέντρηση σε νέα καθαρά σωληνάκια και στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου, το οποίο διαλύει τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Στη συνέχεια τα σωληνάκια ανακινήθηκαν δυνατά και γρήγορα και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για δέκα λεπτά μέχρι να αρχίσουν να διακρίνονται τρεις φάσεις: μία κόκκινη οργανική φάση στη βάση, όπου περιέχονται οι πρωτεΐνες, μία ενδιάμεση φάση, όπου περιέχεται το DNA, και μία άχρωμη υπερκείμενη υδατική φάση, όπου περιέχεται το RNA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 15 min στους 4°C, η οποία διαχώρισε πλήρως τις τρεις φάσεις. Μετά τη φυγοκέντρηση η υδατική φάση (όπου περιέχεται το RNA) μεταφέρθηκε σε νέα καθαρά σωληνάκια στα οποία προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης. Μετά από ανάδευση τα σωληνάκια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Ακολούθησε μία τελευταία φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 10 min στους 4°C, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ιζήματος ολικού RNA. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 1 ml αιθανόλης 75%. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### 2.4.2 Σύνθεση cDNA

Τα δείγματα RNA φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000 rpm για 15 min στους 4°C. Η υπερκείμενη αιθανόλη απομακρύνθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν ανοιχτά μέσα σε πάγο ώστε να εξατμιστεί πλήρως η εναπομένουσα αιθανόλη. Μετά την πλήρη εξαΐμιση της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε διπλή φωτομέτρηση στα 260 και 280 nm ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση του RNA κάθε δείγματος. Για κάθε cDNA αντίδραση ξεκινάμε πάντα με 5 μg RNA και με βάση τη συγκέντρωση του RNA που υπολογίζεται από τη φωτομέτρηση υπολογίζεται ο όγκος του RNA που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση του cDNA.

#### Φάση I: αποδιάταξη του RNA

Σε 5 μg ολικού RNA κάθε δείγματος προστέθηκαν 2 μl oligo D(T)s συγκέντρωσης 100 pmole/μl και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 17.6 μl. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 70°C για 3 min προκειμένου να λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη του RNA, ενώ σαν εκκινητές χρησιμοποιούνται τα oligo D(T)s για να εξασφαλίσουν την αντίστροφη μεταγραφή μόνο του mRNA από το ολικό RNA.

#### Φάση II: σύνθεση του cDNA

Μετά το πέρας της φάσης I σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 6 μl 5xRT buffer, 3 μl dNTP's, 3 μl DTT 0.1 M, 0.2 μl RNAase inhibitor (Promega MADISON WI USA 40 units/μl) και 0.2 μl ενζύμου Reverse transcriptase (Promega MADISON WI USA 200 units/μl) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για δύο ώρες. Η αντίδραση τερματίστηκε με μεταφορά των δειγμάτων στους 65°C για 2 min. Η επιτυχής σύνθεση του cDNA ελέγχθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction: PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές β-ακτίνης, η οποία αναμένεται να εκφράζεται σταθερά σε όλα τα δείγματα.

## 2.5 Ενίσχυση του cDNA της MLC2 με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

Για την διεξαγωγή της PCR αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ο ίδιος forward primer RLCF1 και εναλλακτικά οι reverse primers RLCR1, RLCR2 και RLCR3 και τελικά προέκυψαν οι τρεις συνδυασμοί των primers: RLCF1- RLCR1, RLCF1-RLCR2 και RLCF1-RLCR3. Οι εκκινητές RLCF1-RLCR1 που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR έδωσαν προϊόν 366bp, οι εκκινητές RLCF1-RLCR2 δίνουν ένα προϊόν 630bp και οι εκκινητές RLCF1-RLCR3 δίνουν ένα προϊόν 570bp. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR αντίδραση και οι ακριβείς ποσότητές τους είναι:

<u>Διαλύματα</u>	<u>Ποσότητες</u>
10XPCR buffer	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5.0 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1.0 $\mu$ l
RLCF1(100 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
RLCR (100 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
cDNA	2.0 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	0.2 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	34.8 $\mu$ l
Συνολικά	50.0 $\mu$ l

Η PCR περιλάμβανε τα εξής στάδια: αρχική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στους 94°C για 2 min 30 κύκλους στους 94°C για 1 min, 59°C για 2 min και 72°C για 1 min τελική επέκταση στους 72°C για 5 min. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση της MLC2 με τους συγκεκριμένους εκκινητές και όχι κάποιου άλλου τυχαίου μορίου, τα PCR προϊόντα απομονώθηκαν από την πηκτή αγαρόζης, καθαρίστηκαν με τη βοήθεια του GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) και ακολούθησε η αλληλούχισή τους από την εταιρεία Macrogen (Κορέα).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη cDNA βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε από εμβρυικά στάδια τσιπούρας, η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης 2 (MLC2) ανήκε στα 12 cDNA μόρια με τη μεγαλύτερη συχνότητα (Sargorouliou et al. 2005). Η πλήρης αλληλούχιση 35 cDNA μορίων MLC2 ανέδειξε την παρουσία τριών διαφορετικών μεταγράφων της ήδη γνωστής MLC2 (Moutou et al. 2001), αλλά και μία νέα ισομορφή.

#### 3.1 Εναλλακτικά μετάγραφα της ισομορφής A της MLC2

Τα τρία μετάγραφα της ισομορφής A της MLC2 που απομονώθηκαν, διαφέρουν μόνο ως προς το μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής και προκύπτουν με τη χρήση τριών διαφορετικών σημάτων πολυαδενυλίωσης. Έτσι, κάθε μετάγραφο εμφανίζει από ένα μέχρι και τρία σήματα πολυαδενυλίωσης. Από την πολλαπλή ομοπαράθεση (Clustal W) των τριών μεταγράφων (Εικ.1), τα οποία προκύπτουν από εναλλακτική πολυαδενυλίωση, φαίνεται ότι τα τρία μετάγραφα μοιράζονται το ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, ενώ διαφέρουν αποκλειστικά και μόνο στην 3' αμετάφραστη περιοχή και ιδιαιτέρως μετά την εμφάνιση (στη θέση 804 της νουκλεοτιδική αλληλουχίας της ισομορφής A) του πρώτου σήματος πολυαδενυλίωσης (AATAAA).

```
Transcript 2  CGGCTTTGGCTTAGGCTTCTCTTCTTGACCACCAACAACCCAGAAACTTGAGAGATGGC 60
Transcript 3  -----TTGGCTTAGGCTTCTCTTCTTGACCACCAACAACCCAGAAACTTGAGAGATGGC 55
Transcript 1  -----GCTTAGGCTTCTCTTCTTGACCACCAACAACCCAGAAACTTGAGAGATGGC 52
*****

Transcript 2  ACCCAAGAAGGCCAAGAGGAGGCAGCAGCAGGGCGAGGGTGGATCCTCCAATGTGTTCTC 120
Transcript 3  ACCCAAGAAGGCCAAGAGGAGGCAGCAGCAGGGCGAGGGTGGATCCTCCAATGTGTTCTC 115
Transcript 1  ACCCAAGAAGGCCAAGAGGAGGCAGCAGCAGGGCGAGGGTGGATCCTCCAATGTGTTCTC 112
*****

Transcript 2  CATGTTTGAGCAGAGCCAGATCCAGGAGTACAAGGAGGCTTTCACAATCATTGACCAG 178
Transcript 3  CATGTTTGAGCAGAGCCAGATCCAGGAGTACAAGGAGGCTTTCACAATCATTGACCAG 173
Transcript 1  CATGTTTGAGCAGAGCCAGATCCAGGAGTACAAGGAGGCTTTCACAATCATTGACCAG 170
*****

Transcript 2  AACAGAGATGGCATCATCAGCAAGGACGATCTTAGGGACGTGCTGGCCACCATGGGCC 236
Transcript 3  AACAGAGATGGCATCATCAGCAAGGACGATCTTAGGGACGTGCTGGCCACCATGGGCC 231
Transcript 1  AACAGAGATGGCATCATCAGCAAGGACGATCTTAGGGACGTGCTGGCCACCATGGGCC 228
*****

Transcript 2  AACTGAATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGGTGAAGGAGGCCAGCGGCCCAT 294
Transcript 3  AACTGAATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGGTGAAGGAGGCCAGCGGCCCAT 289
Transcript 1  AACTGAATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGGTGAAGGAGGCCAGCGGCCCAT 286
*****

Transcript 2  CAACTTCACCGTCTTCTGACCATGTTTCGGCGAGAAGCTGAAGGGTGTGATCCCGAGGA 354
Transcript 3  CAACTTCACCGTCTTCTGACCATGTTTCGGCGAGAAGCTGAAGGGTGTGATCCCGAGGA 349
Transcript 1  CAACTTCACCGTCTTCTGACCATGTTTCGGCGAGAAGCTGAAGGGTGTGATCCCGAGGA 346
*****

Transcript 2  CGTCATCGTGAGCGCTTTC AAGGTCCTGGACCCCGAGGCCACTGGCGCCATCAAGAAGGA 414
Transcript 3  CGTCATCGTGAGCGCTTTC AAGGTCCTGGACCCCGAGGCCACTGGCGCCATCAAGAAGGA 409
Transcript 1  CGTCATCGTGAGCGCTTTC AAGGTCCTGGACCCCGAGGCCACTGGCGCCATCAAGAAGGA 406
*****

Transcript 2  ATTCCTTGAGGAGCTCCTGACCACCCAGTGCACAGGTTACCGCTGAGGAGATGACCAA 474
Transcript 3  ATTCCTTGAGGAGCTCCTGACCACCCAGTGCACAGGTTACCGCTGAGGAGATGACCAA 469
Transcript 1  ATTCCTTGAGGAGCTCCTGACCACCCAGTGCACAGGTTACCGCTGAGGAGATGACCAA 466
*****
```

Transcript 2 CCTGTGGGCTGCTTCCCCCCTGATGTGGCTGGCAATGTGGACTACAAGAACATCTGCTA 534  
Transcript 3 CCTGTGGGCTGCTTCCCCCCTGATGTGGCTGGCAATGTGGACTACAAGAACATCTGCTA 529  
Transcript 1 CCTGTGGGCTGCTTCCCCCCTGATGTGGCTGGCAATGTGGACTACAAGAACATCTGCTA 526  
\*\*\*\*\*

Transcript 2 CGTCATCACACACGGAGAAGAGAAGGAGGAATAATCCCCCTCTCTTTCAAGATCCTTAC 594  
Transcript 3 CGTCATCACACACGGAGAAGAGAAGGAGGAATAATCCCCCTCTCTTTCAAGATCCTTAC 589  
Transcript 1 CGTCATCACACACGGAGAAGAGAAGGAGGAATAATCCCCCTCTCTTTCAAGATCCTTAC 586  
\*\*\*\*\*

Transcript 2 CTCGGCTCAAACCCAATACTCGACGCAACATCTACTTACTCACTCTTCTCCGATGCCG 653  
Transcript 3 CTCGGCTCAAACCCAATACTCGACGCAACATCTACTTACTCACTCTTCTCCGATGCCG 648  
Transcript 1 CTCGGCTCAAACCCAATACTCGACGCAACATCTACTTACTCACTCTTCTCCGATGCCG 646  
\*\*\*\*\*

Transcript 2 TGGCTCCCTCGCACACTCTCGGCGCCCTGGGCCGCTCTGTCCGCTTGCCAGTCACTACA 713  
Transcript 3 TGGCTCCCTCGCACACTCTCGGCGCCCTGGGCCGCTCTGTCCGCTTGCCAGTCACTACA 708  
Transcript 1 TGGCTCCCTCGCACACTCTCGGCGCCCTGGGCCGCTCTGTCCGCTTGCCAGTCACTACA 706  
\*\*\*\*\*

Transcript 2 AAAAGACTTGTCTCCTGTTCTTGAGATACTCAGTGAGAGGACTGGGGGCTGTGGGGTTGT 773  
Transcript 3 AAAAGACTTGTCTCCTGTTCTTGAGATACTCAGTGAGAGGACTGGGGGCTGTGGGGTTGT 768  
Transcript 1 AAAAGACTTGTCTCCTGTTCTTGAGATACTCAGTGAGAGGACTGGGGGCTGTGGGGTTGT 766  
\*\*\*\*\*

Transcript 2 TTGTGTGTGAGTACCAACAGGTGAACATGGGATTATTTTCAATAAAATAATCTTGTGCA 833  
Transcript 3 TTGTGTGTGAGTACCAACAGGTGAACATGGGATTATTTTCAATAAAATAATCTTGTGCA 828  
Transcript 1 TTGTGTGTGAGTACCAACAGGTGAACATGGGATTATTTTCAATAAAATAATCTTGTGCA 826  
\*\*\*\*\*

Transcript 2 CTGAAACTCTCTCCTCATCTCTGTCCCTGCCTCTTGTTCCTCCCATCA 893  
Transcript 3 CTGAAACTCTCTCCTCATCTCTGTCCCTGCCTCTTGTTCCTCCCATCA 888  
Transcript 1 CCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 854

Transcript 2 CTCATTCTGTCTTCTGCGTTGAGGCCAACAGTGCATGCATCATGCCTATGTACAGCGCG 953  
Transcript 3 CTCATTCTGTCTTCTGCGTTGAGGCCAACAGTGCATGCATCATGCCTATGTACAGCGCG 948  
Transcript 1 -----

Transcript 2 TATGCATATGCAGTCCAGTGTATACAGTGGCCAGTCAACATATCTCTTGGGTGCTGTGG 1013  
Transcript 3 TATGCATATGCAGTCCAGTGTATACAGTGGCCAGTCAACATATCTCTTGGGTGCTGTGG 1008  
Transcript 1 -----

Transcript 2 TGCAAGCACAGCCGCTCACTTGAACAAGTGAAGCGGCTGACCCGAGTGGTCTGTTAGTC 1073  
Transcript 3 TGCAAGCACAGCCGCTCACTTGAACAAGTGAAGCGGCTGACCCGAGTGGTCTGTTAGTC 1068  
Transcript 1 -----

Transcript 2 TCAACCTGACACAGAGTGTGTTTATGGACTCGTCCCTTTGTTTGTATCAGGGAGGATAGCA 1133  
Transcript 3 TCAACCTGACACAGAGTGTGTTTATGGACTCGTCCCTTTGTTTGTATCAGGGAGGATAGCA 1128  
Transcript 1 -----

Transcript 2 CAGTGAAGAGTGGGAGTACCGTACTATAATAGATTGCCTACTCCTTCTCTTTAATCTGTC 1193  
Transcript 3 CAGTGAAGAGTGGGAGTACCGTACTATAATAGATTGCCTACTCCTTCTCTTTAATCTGTC 1188  
Transcript 1 -----

Transcript 2 TCTCCTTCTCTTAAACACAGGCATGACAGGAAAAGTGCAGTGAATGGGAAAGCATGA 1253  
Transcript 3 TCTCCTTCTCTTAAACACAGGCATGACAGGAAAAGTGCAGTGAATGGGAAAGCATGA 1248  
Transcript 1 -----

Transcript 2 TTTGGTTCAAATCTTGAATTTGGAGAAAAGATGGTGAAGATGGTGAAGTGGGAGGAGGA 1313  
Transcript 3 TTTGGTTCAAATCTTGAATTTGGAGAAAAGATGGTGAAGATGGTGAAGTGGGAGGAGGA 1308  
Transcript 1 -----

Transcript 2 GATGAAATAACGAAAGTGAATGTCAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 1358  
Transcript 3 GATGAAATAACGAAAGTGAATGTCTTGTGTTTGGTCTCTCTATCTCCGACTCACTGCT 1368  
Transcript 1 -----

Transcript 2 -----  
Transcript 3 GTTCTCTCCTGTTTTCATGACTGTACCAATAAGAGTACAAATAAAATCCACTATCT 1428  
Transcript 1 -----

Transcript 2 -----  
 Transcript 3 TTCGTAAAAAAAAAAAAA 1446  
 Transcript 1 -----

**Εικόνα 1.** Πολλαπλή ομοπαράθεση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των τριών μεταγράφων της ισομορφής A της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 (MLC2), όπου με αστερίσκο φαίνονται οι υψηλά συντηρημένες νουκλεοτιδικές βάσεις, με έντονα γράμματα το κωδικόνιο έναρξης και με γκρι σκίαση το κωδικόνιο λήξης της μεταγραφόμενης αλληλουχίας. Τα σήματα πολυαδενυλίωσης είναι υπογραμμισμένα.

### 3.2 Ισομορφή B της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 της τσιπούρας

Ο cDNA κλώνος της ισομορφής B της MLC2 της τσιπούρας αποτελείται από 959bp και ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 513 νουκλεοτιδίων, που ξεκινάει από το πρώτο ATG κωδικόνιο που βρίσκεται 43bp από το 5' άκρο του κλώνου και λήγει στο κωδικόνιο TAA (Εικ.2). Η 3' αμετάφραστη περιοχή αποτελείται από 403bp και περιέχει ένα μοναδικό σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA) στη θέση 768, σε αντίθεση με τα τρία εναλλακτικά σήματα πολυαδενυλίωσης που έχουν βρεθεί για την ισομορφή A της MLC2 της τσιπούρας (Moutou et al., 2001). Η αλληλουχία των αμινοξέων που αντιστοιχεί στη μεταφρασμένη αλληλουχία των νουκλεοτιδίων είναι 170 αμινοξέα σε μήκος και κωδικοποιεί για την B ισομορφή της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης.

	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>P</b>
TCTCCTTCTTGATCATCCAAAGCTCCACTCATACCGTCTCAAG	<b>ATG</b>	GCA	CCA
<b>K</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>K</b>
AAG	AAG	GCC	AAG
<b>R</b>	<b>R</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>
AGG	AGG	AGG	CAG
<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>
GCA	GCA	GGA	GAC
<b>D</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
GGT	GGT	GGT	GGT
<b>G</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>N</b>
GGC	TCC	TCC	AAT
<b>V</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
GTG	TTC	TCC	ATG
<b>F</b>	<b>E</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>
TTT	GAG	CAG	AGC
<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>
GAG	CAG	AGC	CAG
<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>
ATT	CAG	GAG	TAC
<b>K</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>F</b>
AAA	GAG	GCT	TTC
<b>E</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>T</b>
GAG	GCT	TTC	ACA
<b>I</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>
ATC	ATT	GAC	CAG
<b>I</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>
ATC	ATT	GAC	CAG
<b>N</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>G</b>
AAC	AGA	GAT	GGT
<b>I</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>K</b>
ATC	ATC	AGC	AAA
<b>D</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>R</b>
GAT	GAC	CTG	AGG
<b>D</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>D</b>
GAC	CTG	AGG	GAC
<b>V</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>S</b>
GTG	CTG	GCT	TCA
<b>M</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>L</b>
ATG	GGC	CAG	TTG
<b>N</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>N</b>
AAC	GTG	AAG	AAT
<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
GAT	GAC	CTG	AGG
<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
GAT	GAC	CTG	AGG
<b>L</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>M</b>
CTC	GAG	GCC	ATG
<b>I</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>A</b>
ATC	AAG	GAG	GCC
<b>E</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>G</b>
AGC	GGC	CCC	ATC
<b>P</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>F</b>
AGC	GGC	CCC	ATC
<b>I</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
AGC	GGC	CCC	ATC
<b>N</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>F</b>
AGC	GGC	CCC	ATC

T V F L T M F G E K L K G A  
ACC GTC TTC CTC ACC ATG TTC GGC GAG AAG CTG AAG GGT GCT

D P E D V I L S A F K V L D  
GAC CCC GAG GAC GTT ATC CTT AGC GCC TTC AAG GTC CTG GAC

P E G T G S I K K E F L E E  
CCC GAG GGT ACT GGA AGC ATC AAG AAG GAA TTC CTT GAG GAG

L L T T Q C D R F T K D E I  
CTC CTG ACC ACT CAG TGC GAC AGG TTC ACC AAG GAC GAG ATC

K N M W A A F P P D V A G N  
AAG AAC ATG TGG GCC GCC TTC CCC CCA GAT GTT GCC GGC AAC

V D Y K N I C Y V I T H G E  
GTA GAC TAC AAG AAC ATC TGC TAT GTC ATC ACA CAC GGA GAG

E K E E **ooo**  
GAG AAG GAG GAG **TAA**

AGACGAAGCAAGAAGACAAAAAAGACAACAATCCCTTTGCTATTCTGCCTTCCCTGCC  
CTGTTCTTTCCCTCCTCTTCCCTGCTCACCTTTTGTGTACACCCATGTGCTCAGCCG  
CTCATGTTCAAACCAAGACTTGTACGCTGAGACATGAGAGTGCCGATGCCCGTGGG  
ATGTCTATGTTTGCTTATGGGGAATANGGGCTGATTTTC**AATAAA**ATTATCCTGTAACAT  
CATTTCCATTACAAAGCTTTTCTCAAAAACCTTTTCTTTCCCTTGCAAACATCTTCCATCTT  
CTCACCTCTATTATCTCTACCTGCTGTCACTACAGCCTCTGANGGGTGTGNAANTGAAA  
NGGTGTCCCTCTGCTTCCCTCANNNTATGGGGGAGGAAAAGACCCCA

**Εικόνα 2.** Νουκλεοτιδική και αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία της ισομορφής Β της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 της τσιπούρας. Το σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA) στη θέση 768 είναι υπογραμμισμένο και το κωδικόνιο έναρξης εμφανίζεται με έντονα γραφή, ενώ με γκρι σκίαση φαίνεται το κωδικόνιο λήξης (TAA).

Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών των δύο διαφορετικών ισομορφών της MLC2 της τσιπούρας. Οι αμινοξικές αλληλουχίες έχουν το ίδιο μήκος, 170aa, ενώ οι δύο ισομορφές διαφέρουν ως προς 10 αμινοξέα, όλα εκτός της περιοχής δέσμευσης ασβεστίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές είναι τα τμήματα που διαφοροποιούν τις ισομορφές Α και Β της MLC2, ενώ η κωδικοποιητική περιοχή ανάμεσα στις δύο ισομορφές παρουσιάζει 92,1% ομοιότητα.

Ca<sup>++</sup>-binding domain

```

B_S.aurata  MAPKKAKRRQAAGDGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASMG 60
A_S.aurata  MAPKKAKRRQQQEGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLATMG 60
*****      *:*:*****

B_S.aurata  QLVNKNEELEAMVKEASGPINFTVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKKE 120
A_S.aurata  QLVNKNEELEAMVKEASGPINFTVFLTMFGEKLGADPEDVIVSAFKVLDPEATGAIKKE 120
*****      *:*:*****

B_S.aurata  FLEELLTQCDRFTKDEIKN WAAFPDPVAGNVDYKNICYVITHGEEKEE 170
A_S.aurata  FLEELLTQCDRFTA E TNL WAAFPDPVAGNVDYKNICYVITHGEEKEE 170
*****      *:*:*****

```

**Εικόνα 3.** Πολλαπλή ομοπαράθεση (Clustal W 1.82) των αμινοξικών αλληλουχιών (170 aa) των ισομορφών A και B της MLC2 της τσιπούρας. Τα συντηρημένα κατάλοιπα φαίνονται με αστερίσκο, οι συντηρημένες διαφορές με τελεία και οι διαφορές κατά ένα μοναδικό αμινοξύ με άνω και κάτω τελεία. Οι 10 αμινοξικές διαφορές που εντοπίζονται ανάμεσά τους, και οι οποίες βρίσκονται εκτός της περιοχής δέσμευσης του ασβεστίου, φαίνονται με διαφορετικά χρώματα.

Μετά από τοπική ομοπαράθεση (Blastp) της αμινοξικής αλληλουχίας της ισομορφής B της ελαφριάς αλυσίδας της μυσσίνης 2 (MLC2 isoform B) της τσιπούρας με ήδη δημοσιευμένες αμινοξικές αλληλουχίες της ελαφριάς αλυσίδας της μυσσίνης 2 σε άλλους τελεόστεους ιχθύες βρέθηκε ότι η αλληλουχία με τη μεγαλύτερη ομοιότητα (98%) με την ισομορφή B της MLC2 της τσιπούρας είναι αυτή της MLC2 του *Caranx delicatissimus* (Accession number BAB69800). Όσον αφορά την πλήρη νουκλεοτιδική αλληλουχία της ισομορφής B της MLC2, από την τοπική ομοπαράθεση της (Blastn) προκύπτει ότι η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία της ισομορφής B της MLC2 του ιππόγλωσσου (*Hippoglossus hippoglossus*, Accession number AJ488286, Andersen et al., 2002) είναι αυτή με την οποία παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία (92%). Επίσης, έγινε και πολλαπλή ομοπαράθεση (Clustal W by Thompson et al., 1994) των αμινοξικών αλληλουχιών των MLC2 πρωτεϊνών των ιχθύων (Εικ.4), όπου διαφαίνεται η εξαιρετικά υψηλή συντήρηση της περιοχής δέσμευσης ασβεστίου.

Ca<sup>++</sup>-binding domain

```

B_S.aurata      MAPKKAKRRQA-AGDGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
B_H.hippoglossus MAPKKAKRRQA-AGDSGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
D.tabl         MAPKKAKRRQA-AGEGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
D.maruadsi     MAPKKAKRRQA-AGEG-SSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
T.trachurus    MAPKKAKRRQA-AGDGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
C.agoo        MAPKKAKRRQA-ASDSGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
C.delicatissimus MAPKKAKRRQA-AGDGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
T.thynnus     MAPKKAKRRRA-AGEGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
T.chalcogramma MAPKKAKRRAG-GADSGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
O.kisutch     MAPKKAKRRGA-AAEGGSSNVFSMFEQSQIQEYNSGFPI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
D.rerio       MAPKKAKRRRA-GGEG-SSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
C.carpio      MAPKKAKRRAG-GGEG-SSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLASM
E.pelamis     MAPKKAKRRQQ-QGEGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLATM
A_S.aurata    MAPKKAKRRQQ-QGEGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLATM
A_H.hippoglossus MAPKKAKRRQQ-GVREGSSNVFSMLEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLATM
E.japonicus   MAPKRGKRKQKGGDAEGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLATM
S.melanostictus MSPKKAKRRQQQGGDGGSSNVFSMFEQSQIQEYKEAFTI IDQNRDGIISKDDLRL DVLATM
*:*:.*:*      *:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*:*:.*

```



```

B_S.aurata      GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
B_H.hippoglossus GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILTAFAKVLDPPEATGSIKK
D.tabl          GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
D.maruadsi     GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
T.trachurus    GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
C.agoo         GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
C.delicatissimus GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
T.thynnus     GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
T.chalcogramma GQLNVKNEELEAMVKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
O.kisutch     GQLNVKNEELEAMVKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
D.rerio       GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
C.carpio      GQLNVKNEELEAMIKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
E.pelamis    GQLNVKNEELEAMVKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEGTGSIKK
A_S.aurata    GQLNVKNEELEAMVKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEATGAIKK
A_H.hippoglossus GQLNVKNEELEAMVKEASGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEATGSIKK
E.japonicus   GQLNTKSEELDAMIKEAPGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEATGSIKK
S.melanostictus GQLNTKNEELEAMIKEAPGPINFVFLTMFGEKLGADPEDVILSAFKVLDPEATGVIKK
**:*.*.***:***:***.*****:*****:*****:***:***:.* **

```

```

B_S.aurata      EFLEELLTTQCDRFTKDEIKNMWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
B_H.hippoglossus EFLEELLTTQCDRFTKDEIKNMWSAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
D.tabl          EFLEELLTTQCDRFTPEEIKNMWSAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
D.maruadsi     EFLEELLTTQCDRFTPEEIKNMWSAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
T.trachurus    EFLEELLTTQCDRFTPEEIKNMWSAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
C.agoo         EFLEELLTTQCDRFSPEEIKNMWSAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
C.delicatissimus EFLEELLTTQCDRFTPEEIKNMWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
T.thynnus     EFLEELLTTQCDRFTPEEIKNMWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
T.chalcogramma EFLEELLTTQCDRFSAEIKNMWSAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
O.kisutch     DFLQELLTTQCDRFSAEEMKNLWAAFPPDVAGNVYKQICYVITHGEEKEE-
D.rerio       EFLEELLTTQCDRFTAEEEMKNLWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
C.carpio      QFLEELLTTQCDRFSAEEMKNLWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
E.pelamis    EFLEELLTTQCDRFTAEEEMTNLWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEDKEE-
A_S.aurata    EFLEELLTTQCDRFTAEEEMTNLWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
A_H.hippoglossus EFLEELLTTQCDRFTAEEEMTNLWAAFPPDVAGNVYKNICYVITHGEEKEE-
E.japonicus   EFLEELLTTQCDRFTPEEMTNLWAAFPPDVGNIDYKNICYVITHGEEKEE-
S.melanostictus EFLEELLTTQCDRFTPEEMTNLWAAFPPDVGTQVDYKNICYVITHGEEKEE-
:*.***:*****: :*.*.*:*****:*.***:*****:***

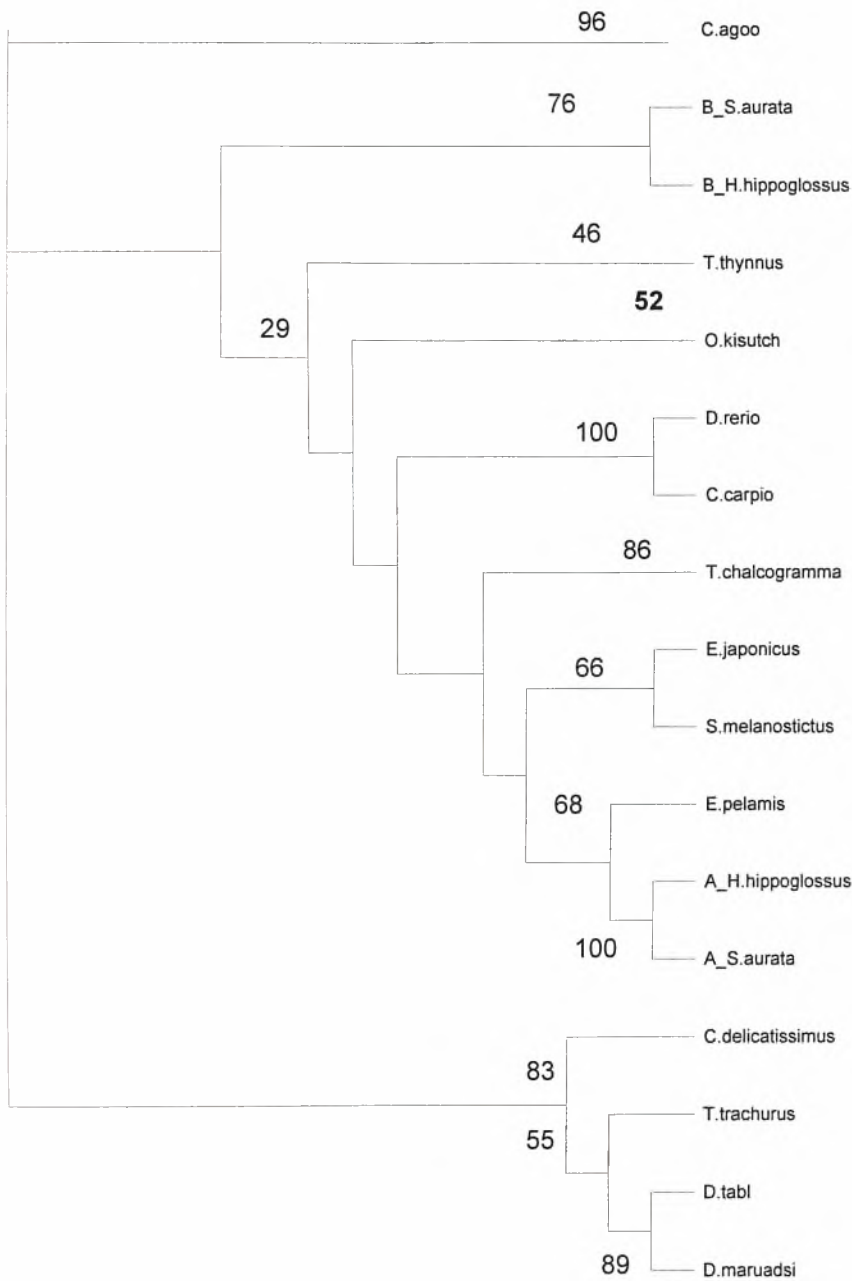
```

**Εικόνα 4.** Πολλαπλή ομοπαράθεση (Clustal W 1.82) των αμινοξικών αλληλουχιών των MLC2 πρωτεϊνών των τελεόστεων ιχθύων, όπου φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα με αστερίσκο, οι συντηρημένες διαφορές φαίνονται με τελεία και οι διαφορές κατά ένα μοναδικό αμινοξύ με άνω και κάτω τελεία. Η περιοχή δέσμευσης ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>-binding domain) φαίνεται με έντονη γραφή και παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή συντήρηση μεταξύ των εξεταζόμενων ιχθύων.

### 3.3 Φυλογενετική ανάλυση

Για να διερευνηθούν οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στην ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης 2 (MLC2) της τσιπούρας και των άλλων τελεόστεων ιχθύων, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των MLCs2. Εκτός από την καινούργια ισομορφή (ισομορφή Β) της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 της τσιπούρας, οι αλληλουχίες της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 των άλλων τελεόστεων ιχθύων προέρχονται από τη βάση δεδομένων Genbank. Η κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου έγινε με χρήση του προγράμματος Treeview (Roderic D.M.), αφού προηγουμένως είχε πραγματοποιηθεί πολλαπλή ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος Clustal W (Thompson et al., 1994) (εικόνα 4). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με χρήση της εμπειρικής μεθόδου για πρωτεΐνες του Kimura (Kimura, 1983) και τα φυλογενετικά δένδρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) χρησιμοποιώντας τη μορφή PHYLIP (Felsenstein, 1993) (Εικ.5).

Ο παραπάνω αλγόριθμος κατασκευάζει ένα δένδρο με διαδοχική ομαδοποίηση των γενεαλογικών γραμμών, διευθετώντας τα μήκη των κλάδων καθώς οι γραμμές συγκλίνουν. Το δένδρο που προκύπτει με αυτό τον τρόπο δεν προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μοριακού ρολογιού και έτσι είναι ένα άρριζο δένδρο. Τέλος, για τη φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν 100 bootstrap αναλύσεις, οι οποίες αποτελούν μέτρο αξιοπιστίας της ομαδοποίησης στο δένδρο.

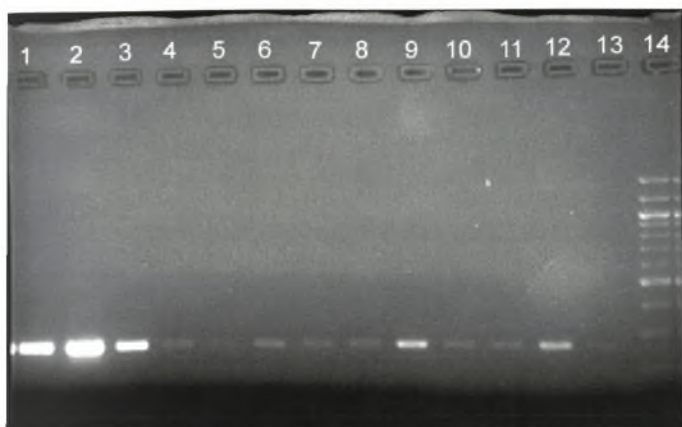
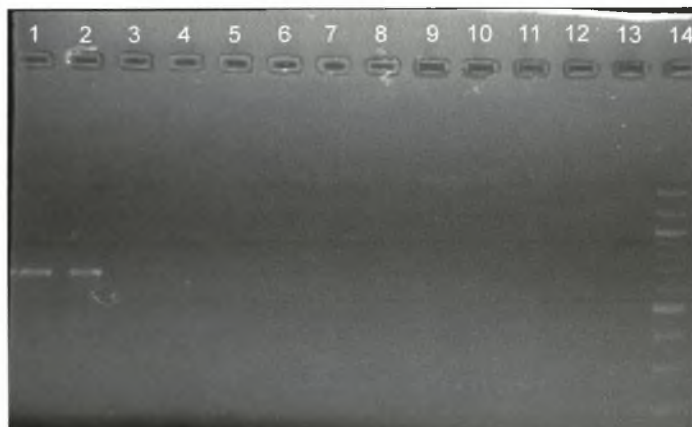


**Εικόνα 5.** Φυλογενετικό δένδρο των αλληλουχιών της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 (MLC2) κατασκευασμένο με χρήση της μεθόδου neighbour-joining. Τα μήκη των κλαδιών του δένδρου είναι ανάλογα των φυλογενετικών αποστάσεων που υπολογίστηκαν με χρήση της εμπειρικής μεθόδου του Kimura για τις πρωτεϊνικές αποστάσεις (Kimura, 1983). Τα νούμερα δείχνουν τα ποσοστά επί τις εκατό των bootstrap επαναλήψεων στις οποίες ως αποτέλεσμα προέκυψε το ίδιο εσωτερικό κλαδί.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω φυλογενετικό δένδρο προκύπτουν τρεις ανεξάρτητες υποομάδες: μία που περιλαμβάνει τις MLC2 τα ψαριών *Caranx delicatissimus*, *Trachurus trachurus*, *Decapterus tabl* και *Decapterus maruadsi*, μία που περιλαμβάνει την MLC2 του ιχθύος *Cypselurus agoo* και τέλος μία μεγάλη ομάδα που περιλαμβάνει τις MLC2 των υπολοίπων ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δένδρου. Οι δύο ισομορφές της τσιπούρας ομαδοποιούνται με τις αντίστοιχες ισομορφές του *H. hippoglossus*.

### 3.4 Ιστική κατανομή των δύο ισομορφών A και B της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 στην τσιπούρα.

Προκειμένου να εξεταστεί η ιστική κατανομή των δύο ισομορφών της MLC2, σχεδιάστηκαν τρία ζεύγη εκκινητών ως εξής: ένας forward εκκινητής (RLCF1) μέσα στην κωδικοποιητική περιοχή, κοινός και για τις δύο ισομορφές – ένας reverse εκκινητής (RLCR1) μέσα στην κωδικοποιητική περιοχή, κοινός και για τις δύο ισομορφές- ένας reverse εκκινητής (RLCR2) μέσα στην 3' αμετάφραστη περιοχή της ισομορφής B - ένας reverse εκκινητής (RLCR3) μέσα στην 3' αμετάφραστη περιοχή της ισομορφής A και σε σημείο κοινό και για τα τρία εναλλακτικά μετάγραφα. Έτσι, τα ζεύγη RLCF1-RLCR2 και RLCF1-RLCR3 αντιστοιχούσαν στις ισομορφές B και A αντίστοιχα, ενώ το ζεύγος RLCF1-RLCR1 χρησιμοποιήθηκε για την πιστοποίηση της παρουσίας και των δύο. Οι εκκινητές RLCF1-RLCR1 έδωσαν προϊόν 366bp (Εικ.6Α), οι εκκινητές RLCF1-RLCR2 έδωσαν ένα προϊόν 630bp (Εικ.6Γ) και οι εκκινητές RLCF1-RLCR3 έδωσαν ένα προϊόν 570bp (Εικ.6Β). Τα προϊόντα που προέκυψαν από κάθε αντίδραση αλληλουχήθηκαν και πιστοποιήθηκε ότι αποτελούσαν τα αναμενόμενα τμήματα της MLC2. Μετάγραφα της MLC2 ήταν παρόντα σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν (Εικ. 6Α). Η ισομορφή A της MLC2 (Εικ.6Β) εκφράζεται μόνο στο σκελετικό μυ (ερυθρό και λευκό μυ). Αντίθετα, η ισομορφή B (Εικ.6Γ) εκφράζεται έντονα στο σκελετικό μυ (ερυθρό και λευκό μυ), αλλά ήταν παρούσα και σε όλους τους άλλους ιστούς που εξετάστηκαν.

**A****B****Γ**

**Εικόνα 12.** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2% μετά από σήμανση με βρωμιούχο αιθίδιο, όπου φαίνεται η ιστοειδική κατανομή των ισομορφών της MLC2. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων με χρήση των εκκινητών (A) RLCF1-RLCR1, (B) RLCF1-RLCR3 και (Γ) RLCF1-RLCR2.

Οι ιστοί τσιπούρας που χρησιμοποιήθηκαν, με τη σειρά που εμφανίζονται στις θέσης της πηκτής, είναι: **1.** ερυθρός μυς (σκελετικός μυς), **2.** λευκός μυς (σκελετικός μυς), **3.** στομάχι (λείος μυς), **4.** πυλωρικά τυφλά, **5.** πρόσθιο έντερο, **6.** οπίσθιο έντερο, **7.** καρδιά (καρδιακός μυς), **8.** νεφρός, **9.** ήπαρ, **10.** σπλήνας, **11.** εγκέφαλος, **12.** βράγχια, **13.** επιδερμίδα και στη τελευταία θέση (14) φαίνεται ο μάρτυρας μεγέθους ανά 100bp της ζώνης. Από τους ιστούς απομονώθηκε ολικό RNA και με αντίστροφη μεταγραφή συντέθηκε cDNA, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την PCR.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη cDNA βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε από εμβρυϊκά στάδια τσιπούρας, η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης 2 (MLC2) ανήκε στα 12 cDNA μόρια με τη μεγαλύτερη συχνότητα (Sargoroulou et al. 2005). Η πλήρης αλληλούχιση 35 cDNA μορίων MLC2 ανέδειξε την παρουσία τριών διαφορετικών μεταγράφων της ήδη γνωστής MLC2 (Moutou et al. 2001), αλλά και μία νέα ισομορφή. Η ύπαρξη δύο διαφορετικών ισομορφών της MLC2 έχει ήδη αναφερθεί στον ιππόγλωσσο (*Hippoglossus hippoglossus*; Andersen et al., 2002). Η παρούσα εργασία παρουσιάζει την απομόνωση, το χαρακτηρισμό, την ιστική κατανομή, αλλά και τη μοριακή εξέλιξη τόσο της ισομορφής Β της MLC2, που εκφράζεται έντονα στο σκελετικό μυ, ασθενέστερα στον καρδιακό και λείο μυ αλλά και σε μη μυϊκούς ιστούς (στο νεφρό, στο ήπαρ, στο σπλήνα, στον εγκέφαλο, στα βράγχια και στην επιδερμίδα) όσο και των τριών μεταγράφων της ισομορφής Α της MLC2, η οποία εκφράζεται αποκλειστικά στο σκελετικό μυ (κόκκινο και λευκό).

Ο cDNA κλώνος της ισομορφής Α της MLC2 της τσιπούρας (Moutou et al. 2001) αποτελείται συνολικά από 1452 bp με ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 513 νουκλεοτιδίων, το οποίο ξεκινά από το κωδικόνιο έναρξης ATG (που βρίσκεται 55 νουκλεοτίδια κάτωθεν της 5' αμετάφραστης περιοχής) και λήγει στο κωδικόνιο λήξης TAA. Η 3' αμετάφραστη περιοχή αποτελείται από 855 bp και περιέχει τρία σήματα πολυαδενυλίωσης. Από την πολλαπλή ομοπαράθεση (Clustal W) των τριών μεταγράφων, τα οποία προκύπτουν από εναλλακτική πολυαδενυλίωση, προέκυψε ότι τα τρία μετάγραφα μοιράζονται το ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, ενώ διαφέρουν αποκλειστικά και μόνο στην 3' αμετάφραστη περιοχή και ιδιαιτέρως μετά τη θέση 804, όπου εμφανίζεται το πρώτο σήμα πολυαδενυλίωσης.

Ο cDNA κλώνος της ισομορφής Β της MLC2 της τσιπούρας αποτελείται από 959bp και ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 513 νουκλεοτιδίων, που ξεκινάει από το πρώτο ATG κωδικόνιο που βρίσκεται 43bp από το 5' άκρο του κλώνου και λήγει στο κωδικόνιο TAA. Η 3' αμετάφραστη περιοχή αποτελείται από 403bp και περιέχει ένα μοναδικό σήμα πολυαδενυλίωσης.

Μετά από τοπική ομοπαράθεση (Blastp) των αμινοξικών αλληλουχιών των ισομορφών Α και Β της MLC2 της τσιπούρας βρέθηκε ότι αυτές έχουν το ίδιο μήκος (170aa), αλλά διαφέρουν ως προς 10 αμινοξέα, όλα εκτός της περιοχής δέσμευσης ασβεστίου. Αυτά τα 10 αμινοξέα είναι κοινά ανάμεσα στις ισομορφές Β του ιππόγλωσσου και της τσιπούρας και πιθανόν να αποτελούν χαρακτηριστικό των ισομορφών Β της MLC2. Το ίδιο, όμως, δεν προκύπτει από σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της ισομορφής Β της MLC2 της τσιπούρας με οποιαδήποτε από τις άλλες αλληλουχίες MLC2 των ιχθύων, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της πολλαπλής ομοπαράθεσης. Οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές είναι τα τμήματα που διαφοροποιούν τις δύο ισομορφές της MLC2, ενώ η κωδικοποιητική περιοχή ανάμεσα τους παρουσιάζει 92,1% ομοιότητα. Είναι πιθανόν οι δύο ισομορφές της MLC2 της τσιπούρας να προέρχονται από το ίδιο γονίδιο μέσω εναλλακτικού ματίσματος και επακόλουθης συρραφής των εξωνίων που προκύπτουν. Επίσης πιθανόν είναι τα τρία διαφορετικά μετάγραφα της ισομορφής Α της MLC2 της τσιπούρας να προέρχονται από ένα μοναδικό γονίδιο μέσω εναλλακτικής χρήσης των τριών σημάτων πολυαδενυλίωσης, όπως έχει στο παρελθόν αναφερθεί για την MLC2 του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*; Hirayama et al. 1998) και για την πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*; Krasnov et al. 2002).

Οι ισομορφές A και B διαφέρουν, επίσης, και ως προς το πρότυπο της ιστικής κατανομής τους. Προκειμένου να εξεταστεί η ιστική κατανομή των δύο ισομορφών της MLC2, σχεδιάστηκαν τρία ζεύγη εκκινητών, όπου τα ζεύγη RLCF1-RLCR2 και RLCF1-RLCR3 αντιστοιχούσαν στις ισομορφές B και A αντίστοιχα, ενώ το ζεύγος RLCF1-RLCR1 χρησιμοποιήθηκε για την πιστοποίηση της παρουσίας και των δύο ισομορφών. Μετάγραφα της MLC2 ήταν παρόντα σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Η ισομορφή A της MLC2 της τσιπούρας εκφράζεται μόνο στο σκελετικό μυ (ερυθρό και λευκό μυ). Αντίθετα, για την ισομορφή B της MLC2 της τσιπούρας βρέθηκε ένα ασυνήθιστο πρότυπο ιστικής κατανομής. Η ισομορφή B εκφράζεται έντονα στο σκελετικό μυ (ερυθρό και λευκό μυ), αλλά είναι παρούσα στο λείο και καρδιακό μυ και στους μη μυϊκούς ιστούς που εξετάστηκαν. Το πιο πιθανό, λοιπόν, είναι οι δύο ισομορφές να είναι εναλλακτικά μετάγραφα του ίδιου γονιδίου, οπότε η εναλλακτική μεταγραφή των εξωνίων τους ρυθμίζεται ιστικά ή αναπτυξιακά προκειμένου να δημιουργηθούν μόρια μυοσίνης με διαφορετικές ιδιότητες συστολής.

Όσον αφορά την ισομορφή A της MLC2, ενώ τα τρία της μετάγραφα μοιράζονται το ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, διαφέρουν αποκλειστικά και μόνο στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής τους ως αποτέλεσμα της επιλογής χρήσης διαφορετικών σημάτων πολυαδενυλίωσης.

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση είναι μια μετα-μεταγραφική τροποποίηση που επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό ανώτερων ευκαρυωτικών mRNAs, παράγοντας ώριμα μετάγραφα με 3' άκρα μεταβαλλόμενου μήκους. Οι ουρές πολυαδενυλικού προστίθενται στα 3' άκρα των mRNAs κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του RNA στον πυρήνα του κυττάρου. Η ουρά πολυαδενυλικού επιτελεί τρεις διαφορετικούς ρόλους: α) την εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Wickens and Stephenson, 1984; Eckner et al., 1991), β) την έναρξη της μετάφρασης, και γ) τη ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA (Sachs, 1990; Jackson and Standart, 1990; Bachvarova, 1992; Wickens, 1992; Sachs, 1993 and Sachs and Wahle, 1993).

Όσον αφορά την αποδοτικότητα της μετάφρασης, σημαντική είναι όχι μόνο η παρουσία ή η απουσία της ουράς πολυαδενυλικού, αλλά και το μήκος αυτής. Οι μακριές ουρές (80-500 κατάλοιπα αδενοσίνης) προάγουν τη μετάφραση, ενώ οι κοντές ουρές (20-50 κατάλοιπα αδενοσίνης) αναστέλλουν τη μετάφραση. Όσον αφορά τη ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA από την πολυ(A) ουρά αυτή αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η αποαδενυλίωση είναι το πρώτο ρυθμο-περιοριστικό βήμα στην αποικοδόμηση μερικών ασταθών mRNAs (Wilson and Treisman, 1988; Shyu et al., 1991; Muhlard and Parker, 1992; Decker and Parker, 1993; Muhlard et al., 1994). Έτσι, cis-ενεργές αλληλουχίες στην 3' αμετάφραστη περιοχή και την κωδικοποιητική αλληλουχία μπορούν να ελέγξουν το χρόνο ημιζωής του mRNA επηρεάζοντας το ρυθμό της αποαδενυλίωσης (Shyu et al., 1991; Muhlard and Parker, 1992; Lowell et al., 1992). Έτσι, λοιπόν, οι δύο κυριότεροι ρόλοι της ουράς πολυαδενυλικού είναι η ρύθμιση της σταθερότητας και της μετάφρασης του mRNA, οφειλόμενη στην παρουσία cis-ενεργών αλληλουχιών στην 3' αμετάφραστη περιοχή (Keller, 1995; Jackson, 1993; Jacobson and Peltz, 1996; Sachs, 1990).

Τα πρόδρομα mRNAs των περισσοτέρων γονιδίων, εάν δεν υποστούν μία σειρά μετα-μεταγραφικών διαδικασιών ωρίμανσης (στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η κάλυψη του 5' άκρου, το μάτισμα, η πολυαδενυλίωση και η επακόλουθη τομή του 3' τελικού άκρου), γρήγορα αποικοδομούνται στον πυρήνα και δεν εξάγονται στο κυτταρόπλασμα.

Επομένως, μικρές αλλαγές στην αποδοτικότητα της ωρίμανσης του ολικού RNA ενός κυτάρου ή η αποδοτικότητα του ματίσματος ή η λειτουργικότητα της περιοχής της πολυαδενυλίωσης αποτελούν ένα σημαντικό σημείο ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης κατά ένα ιστοειδικό ή αναπτυξιακά ειδικά τρόπο. Για τη λήξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II απαιτείται ένα λειτουργικό σήμα πολυαδενυλίωσης (Falck-Pedersen, Logan, Shenk and Darnell, 1985; Whitelaw and Proudfoot, 1986; Conelly and Manley, 1988). Η αποδοτικότητα ενός σήματος πολυαδενυλίωσης μπορεί να επηρεάσει άμεσα την ποσότητα του κυτταροπλασματικού RNA που παράγεται από ένα μετάγραφο (Denome and Cole, 1988) επηρεάζοντας, έτσι, την ποσότητα και τη φύση του γονιδιακού προϊόντος.

Πολλά γονίδια έχουν πολλαπλά σήματα πολυαδενυλίωσης και η περιοχή που επιλέγεται τελικά σχετίζεται με το αναπτυξιακό στάδιο και την ιστοξειδίκευση. Η επιλογή της περιοχής πολυαδενυλίωσης ρυθμίζεται από πυρηνικούς παράγοντες και συγκεκριμένα από τις αλλαγές στη συγκέντρωση αυτών των παραγόντων (Colgan and Manley, 1997; Sachs and Wahle, 1993; Wahle and Keller, 1992). Δύο τέτοιοι παράγοντες είναι παράγοντας εξειδίκευσης πολυαδενυλίωσης/τομής (cleavage/polyadenylation specificity factor: CPSF) και ο παράγοντας προαγωγής της τομής (cleavage stimulation factor: CstF). Πιο συγκεκριμένα, τροποποίηση της έκφρασης του CstF σχετίζεται με την εναλλακτική πολυαδενυλίωση.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί: α) 95 γονίδια στα οποία η εναλλακτική πολυαδενυλίωση είναι το αποτέλεσμα τυχαίας διάταξης των σημάτων πολυαδενυλίωσης μέσα στην ίδια 3' αμετάφραστη περιοχή, όπως φαίνεται να συμβαίνει και με τα τρία μετάγραφα της ισομορφής A της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2, β) 31 γονίδια στα οποία η πολυαδενυλίωση σε μία περιοχή γειτονική του προαγωγέα ανταγωνίζεται με μία αντίδραση ματίσματος (splicing) και επηρεάζει την έκφραση πολλαπλών mRNAs και γ) μερικά γονίδια τα οποία έχουν ένα σύνθετο εσωτερικό/τελικό εξόνιο που μπορεί να υποστεί διαφοροποιημένη ωρίμανση, ενώ άλλα περιέχουν εναλλακτικά 3'-τελικά εξόνια, εκ των οποίων το πρώτο μπορεί να παραληφθεί σε μερικά κύτταρα. Τα mRNAs που σχηματίζονται και από τις τρεις παραπάνω τάξεις γονιδίων υπόκεινται σε διαφοροποιημένη ωρίμανση από το αρχικό μετάγραφο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή κατά ένα ιστοειδικό ή αναπτυξιακά ειδικό πρότυπο.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, το πιθανότερο είναι ότι τα τρία μετάγραφα της ισομορφής A της MLC2 προέρχονται από το ίδιο γονίδιο, φέρουν πανομοιότυπα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης και, συνεπώς, η μόνο τους διαφορά εντοπίζεται στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής τους (3'-UTR). Η πιο πιθανή εξήγηση για την ύπαρξη αυτής της διαφοράς ανάμεσα στα τρία διαφορετικά μετάγραφα φαίνεται να είναι η εναλλακτική χρήση των τριών σημάτων πολυαδενυλίωσης (AATAAA, AAATAAA, AAATAA) που εντοπίζονται στις αλληλουχίες τους. Επομένως, η ισομορφή A της MLC2 ρυθμίζεται μεταμεταγραφικά από τη χρήση εναλλακτικού σήματος πολυαδενυλίωσης δίνοντας, έτσι, ένα αριθμό διαφορετικών μεταγράφων που διαφέρουν στο μήκος της 3'-UTR τους. Αυτά τα μετάγραφα με τη σειρά τους ίσως να ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο μέσω διαφοροποιημένης σταθερότητας, αστάθειας ή να δέχονται πιθανές επιδράσεις στη μετάφρασή τους.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μετάγραφα αυτά φαίνεται να ανήκουν στην κατηγορία των γονιδίων στα οποία η εναλλακτική πολυαδενυλίωση είναι το αποτέλεσμα τυχαίας διάταξης των σημάτων πολυαδενυλίωσης μέσα σε στην ίδια 3' αμετάφραστη περιοχή και τα mRNAs που παράγονται διαφέρουν βάσει του αναπτυξιακού σταδίου και της αναπτυξιακής κατάστασης του κυττάρου ή του ιστού στα οποία εκφράζονται.

Στην ίδια κατηγορία γονιδίων ανήκει και το γονίδιο της διϋδροφολικής αναγωγάσης (dihydrofolate reductase: DHFR) το οποίο, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, περιέχει επτά περιοχές πολυαδενυλικού που εκτείνονται σε απόσταση 5kb της αλληλουχίας του. Η μεταγραφή προχωρά μέσω και των επτά περιοχών και λήγει 1kb εκατέρωθεν της τελευταίας περιοχής (Frayne, Leys, Crouse, Hook and Kellems, 1984; Kaufman and Sharp, 1983), δείχνοντας ότι οι πολλαπλοί τύποι του mRNA προέρχονται από ωρίμανση και όχι λήξη της μεταγραφής μεταξύ ορισμένων από αυτών των περιοχών πολυαδενυλικού. Ένα άλλο γονίδιο που ανήκει στην παραπάνω κατηγορία είναι το γονίδιο του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μεταγραφής 2α (eukaryotic initiation factor: eIF-2α), ενός παράγοντα-κλειδί για την πρωτεϊνοσύνθεση, στο οποίο υπάρχουν πολλαπλές περιοχές πολυαδενυλικού στην 3' αμετάφραστη περιοχή που κωδικοποιεί για δύο mRNAs των 1.6 και 4.2kb (Miyamoto, Chiorini, Urcelay and Safer, 1996). Το mRNA των 1.6kb είναι λιγότερο σταθερό από αυτό των 4.2kb, αλλά μεταφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό *in vitro* και εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον και τη φάση του κυτταρικού κύκλου (Benz, Getz, Wells and Moses, 1977). Βρέθηκε ότι αύξηση της δραστηριότητας της πολυαδενυλίωσης ευνοεί τη χρήση της πρώτης περιοχής πολυαδενυλικού στο πρωταρχικό μετάγραφο του eIF-2α, παράγοντας τελικά περισσότερη πρωτεΐνη ανά μετάγραφο εξαιτίας της πιο αποδοτικής πυρηνικής ωρίμανσης και μεταφοράς του RNA αλλά και της πιο αποδοτικής κυτταροπλασματικής μετάφρασης του mRNA των 1.6kb.

Τέλος, για να διευκρινιστούν οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στις ισομορφές A και B της MLC2 της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και στις MLCs2 άλλων τελεόστων πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των MLCs2. Για να εξηγηθεί η ομαδοποίηση των ψαριών στο δένδρογραμμα συγκεντρώθηκαν πληροφορίες από την τράπεζα δεδομένων fishbase ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)) όπου παρατίθενται διάφορα φυσιολογικά, βιολογικά και διατροφικά χαρακτηριστικά και επιπλέον η γεωγραφική κατανομή των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δένδρου.

Από το δένδρογραμμα (Εικ.5) φαίνεται ότι προκύπτουν τρεις ανεξάρτητες υποομάδες: μία που περιλαμβάνει τις MLC2 τα ψαριών *Caranx delicatissimus*, *Trachurus trachurus*, *Decapterus tabl* και *Decapterus maruadsi*, μία που περιλαμβάνει την MLC2 του *Cypselurus agoo* και τέλος μία μεγάλη υποομάδα που περιλαμβάνει τις MLC2 των υπολοίπων ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δένδρου. Σ' αυτή τη μεγάλη υποομάδα παρατηρούνται χαρακτηριστικές ομαδοποιήσεις των ψαριών κατά ζεύγη όπως αυτές: των *Danio rerio* και *Cyprinus carpio*, των *Engraulis japonicus* και *Sardinops melanostictus*, και των ισομορφών A και B της *Sparus aurata* με τις αντίστοιχες ισομορφές A και B του *Hippoglossus hippoglossus*. Τέλος, σε αυτή τη μεγάλη υποομάδα, εκτός από τις κατά ζεύγη ομαδοποιήσεις, υπάρχουν και ομάδες με μονά μέλη όπως: του τόνου *Thunnus thynnus*, της πέστροφας *Oncorhynchus kisutch*, του *Theragra chalcogramma* και του τόνου *Euthynnus pelamis*.



Από την κατάταξη των ψαριών στο δένδρογραμμα προκύπτει σα γενικό συμπέρασμα ότι τα ψάρια που εμφανίζονται στο φυλογενετικό δένδρο ομαδοποιούνται βάσει της κολυμβητικής τους δραστηριότητας και των χαρακτηριστικών τους κινήσεων, μιας και η ελαφριά αλυσίδα 2 της μωσίνης συνιστά συστατικό του πρωτεϊνικού συμπλέγματος της μωσίνης, της πρωτεΐνης συστολής του μυός.

Έτσι, η κάθε ομάδα που εμφανίζεται στο δένδρο έχει κάποια κοινά χαρακτηριστικά για τα είδη-μέλη της, τα οποία ταυτόχρονα είναι και μοναδικά για την εκάστοτε ομάδα με αποτέλεσμα να τα διακρίνει από οποιαδήποτε άλλη ομάδα του δένδρου. Η ομάδα των ψαριών *D. rerio* και *C. carpio* χαρακτηρίζεται από μικρόσωμα βενθικά ψάρια της ίδιας οικογένειας (*Cyprinidae*) και τάξης (*Cypriniformes*) που ζουν σε στάσιμα νερά και κινούνται σύμφωνα με την κίνηση του νερού και, άρα, κολυμπούν ελάχιστα. Η ομάδα των ψαριών *E. japonicus* και *S. melanostictus* συνίσταται από πελαγικά ψάρια ωκεανοδρόμους της ίδιας τάξης (*Clupeiformes*) που χαρακτηρίζονται από συνεχή και έντονη κολύμβηση και μεταναστευτική δραστηριότητα. Η παρουσία των δύο ομάδων των ισομορφών Α και Β αντίστοιχα των MLCs των ψαριών *H. hippoglossus* και *S. aurata* οφείλεται αφενός στην ύπαρξη κοινής μιας χαρακτηριστικής κίνησης (μετακινούνται στην στήλη του νερού και έτσι δε διανύουν μεγάλες αποστάσεις) των δύο αυτών ειδών και αφετέρου στην ύπαρξη ευδιάκριτων ισομορφών (Α και Β) των MLC2 πρωτεϊνών τους, πράγμα που δεν έχει διαπιστωθεί για τις MLC2 πρωτεΐνες κανενός από τα άλλα είδη των ψαριών που εμφανίζονται στο δένδρογραμμα. Τέλος, η μεγάλη ομάδα των τεσσάρων ειδών ψαριών *C. delicatissimus*, *T. trachurus*, *D. labrax* και *D. maguadsi* αποτελείται από μικρόσωμα πελαγικά ψάρια της ίδιας οικογένειας (*Carangidae*) και τάξης (*Perciformes*) που ζουν κοπαδιαστά και κολυμπούν συνεχώς. Από την άλλη, το είδος *C. agoo*, που από μόνο του συνιστά μία ομάδα στο φυλογενετικό δένδρο, είναι είδος πελαγικό και το μοναδικό ιπτάμενο με ιδιαίτερες απαιτήσεις κινήσεως. Η ομάδα του τόνου *T. thynnus* αποτελείται από εξαιρετικά μεγαλόσωμα πελαγικά και ιδιαίτερα μεταναστευτικά (ωκεανοδρόμους) ψάρια, ενώ η άλλη ομάδα του τόνου *E. pelamis* χαρακτηρίζεται από πελαγικά μεταναστευτικά ψάρια μικρότερου μεγέθους που σχηματίζουν ετερογενείς ομάδες με ψάρια μεγαλύτερου μεγέθους και γι' αυτό τα ίδια χαρακτηρίζονται από μέτρια κολυμβητική δραστηριότητα. Το είδος *T. chalcogramma*, που συνιστά μια ανεξάρτητη ομάδα στο δένδρο, αποτελείται από αρκετά μεγαλόσωμα βενθοπελαγικά μη μεταναστευτικά ψάρια με μέτρια κολυμβητική δραστηριότητα. Τέλος, η ομάδα της πέστροφας *O. kisutch* αποτελεί μία από τις αρχαιότερες ομάδες ψαριών με μέτρια κολυμβητική δραστηριότητα γι' αυτό και απέχει εξελικτικά από τις υπόλοιπες ομάδες της ίδιας υποομάδας.

## 4.2 Στόχοι μελλοντικής έρευνας

Εφόσον διερευνήθηκε περαιτέρω η ύπαρξη τριών μεταγράφων της ισομορφής Α της MLC2 στην τσιπούρα και διευκρινίστηκε ο μηχανισμός που ευθύνεται για αυτήν, δηλαδή η εναλλακτική χρήση των τριών διαφορετικών σημάτων που υπάρχουν στις 3'-UTR τους, απομένει να διερευνηθεί το αναπτυξιακό και ιστικό πρότυπο κατανομής των τριών αυτών εναλλακτικών μεταγράφων.

### 4.3 Συμπεράσματα

Οι δύο ισομορφές A και B της MLC2 της τσιπούρας παρουσιάζουν 92,1% ομοιότητα ανάμεσα στις αμινοξικές αλληλουχίες τους, και διαφέρουν κατά 10 αμινοξέα που ενδεχομένως είναι χαρακτηριστικά της ισομορφής B της MLC2.

Οι δύο ισομορφές παρουσιάζουν διαφορετική ιστική κατανομή, καθώς η μεν ισομορφή A της MLC2 εκφράζεται αποκλειστικά στο σκελετικό μυ ενώ η ισομορφή B της MLC2 εμφανίζει ευρύτερο πρότυπο κατανομής. Οι δύο ισομορφές μπορεί να αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και επακόλουθης συρραφής του ίδιου γονιδίου, χωρίς όμως να αποκλείεται και η ύπαρξη δύο διαφορετικών γονιδίων. Τέλος, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη τριών εναλλακτικών μεταγράφων της ισομορφής A της MLC2 της τσιπούρας, τα οποία προέρχονται από το ίδιο γονίδιο και διαφέρουν αποκλειστικά και μόνο στο μήκος της 3'-UTR τους ως αποτέλεσμα της χρήσης εναλλακτικών σημάτων πολυαδενυλίωσης. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση συνιστά, λοιπόν, μια μετα-μεταγραφική διαδικασία που παράγει μετάγραφα με διαφορετική σταθερότητα και μεταφραστική αποτελεσματικότητα.

## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### 5.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

#### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

➤ Gel-Loading Buffer (6x)

Για παρασκευή 10 ml :

5 ml γλυκερόλη

1 ml χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης

0.5 ml 20x TBE (Tris Boric EDTA)

3.5 ml ddH<sub>2</sub>O

Κατανομή του διαλύματος σε aliquots του 1 ml και αποθήκευση σε θερμοκρασία 4°C ή στους -20°C.

➤ EDTA 0.5M (pH 8.0)

Για παρασκευή 500 ml:

Διάλυση 93.1 gr Na<sub>2</sub>EDTA σε περίπου 400 ml H<sub>2</sub>O. Ρύθμιση του pH περίπου στο 8.0 με προσθήκη 10N NaOH. Προσαρμογή του τελικού όγκου σε 500 ml και αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

➤ Οξικό νάτριο (NaOAc) 3N (pH 5.2)

Για παρασκευή 40.81 gr NaOAc.3H<sub>2</sub>O:

Ρύθμιση του pH στο 5.2 με προσθήκη παγωμένου οξικού οξέος και προσθήκη δις απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Αποστείρωση στο αυτόκαυστο και αποθήκευση στους 4°C.

➤ TAE (50x) (electrophoresis buffer for agarose gel)

Για παρασκευή 500 ml:

121 gr Tris-βάση

28.5 ml οξικό οξύ

50 ml EDTA (0.5M) pH 8.0

Προσαρμογή του τελικού όγκου σε 500 ml με προσθήκη δις απεσταγμένου νερού.

Για Παρασκευή 1x TAE buffer γίνεται ανάμιξη 20 ml του 50x TAE με 980 ml δις απεσταγμένου νερού και το διάλυμα που προκύπτει αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Νερό DEPC (diethylpyrocarbonate)

Για παρασκευή 500 ml :

Ανάμιξη 50 μl DEPC (υψηλά τοξικό αντιδραστήριο) με 500 ml απεσταγμένο νερό και αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

➤ Πηκτή αγαρόζης 2%

Για παρασκευή πηκτής 50 ml:

50 ml 1x TAE

1 gr αγαρόζης

2.5 μl βρωμιούχο αιθίδιο

➤ Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου

Διάλυση 100 mg στερεού βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) σε 10 ml H<sub>2</sub>O. Ανάμιξη του μίγματος για αρκετές ώρες και αποθήκευση στους 4°C σε ένα μπουκάλι. Το συγκεκριμένο διάλυμα απαιτεί εξαιρετικά προσεκτικούς χειρισμούς γι' αυτό κάθε φορά που χρησιμοποιείται πρέπει να φοριούνται γάντια.

➤ Διάλυμα φόρτωσης στην πηκτή αγαρόζης

5 μl loading buffer

10 μl PCR product

2 μl ladder (marker 100 bp)

➤ Elution buffer

Για παρασκευή 10 mM buffer:

Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) ή TE (Tris-EDTA) buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ή αποστειρωμένο δις απεσταγμένο νερό.

• Wash buffer

Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)

Διάλυση του Wash buffer σε 48 ml αιθανόλης καθαρότητας 100%. Ανάμιξη του μίγματος και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

## 5.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Εταιρία</b>	<b>Αριθμός Καταλόγου</b>
Agarose	HT Biotechnology	SB11
Chloroform	Sigma	C-2432
DNA ladder	New England BioLabs <i>inc.</i>	
dNTPs	Promega	U123A
DTT (διθειοθειπιριόλη)	Promega	P117B
GFX PCR DNA and gel band purification kit	Amersham	27-9602-01
Isopropanol	Sigma	I-9516
MgCl <sub>2</sub>	Promega	A351H
M-MLV RT 5x Buffer	Promega	M531A
M-MLV Reverse transcriptase	Promega	M170A
Oligothymidylic acid [d(pT) <sub>16</sub> ]	Sigma	
RNA later	Sigma	R-0901
RNasin(RNase inhibitor)	Promega	N211A
Sodium Acetate (Buffer Solution)	Sigma	S-2404
Taq DNA polymerase	Promega	M186E
Thermophilic DNA Poly 10x buffer	Promega	M190G
TRI reagent	Sigma	T-9424

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ **Alberts, B., Johnson, A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K and Walter P.** (2000). Κυτταροσκελετός. Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.
- ❖ **Altschul, Stephen, F., Madden, T. L., Schöffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and David J. Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- ❖ **Ayson, F. D. and Lam, T.J.** (1983). Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture* **109**: 83-93.
- ❖ **Bachvarova, R. F.** (1992). *Cell* **69**, 895-897.
- ❖ **Beaudoing, E. and Gautheret, D.** (2001). Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST (expressed sequence tags) data. *Genome research* **11**:1520-1526.
- ❖ **Benz, E. W., Getz, M. J., Wells, D. J. and Moses, H. L.** (1977). *Exp. Cell Res.*, **108**, 157-165.
- ❖ **Bilger, A., Fox, C. A., Wahle, E. and Wikens, M.** (1994) *Genes Dev.* **8**, 1106-1116.
- ❖ **Bone, Q., Marshall, N. B. and Blaxter, J. H. S.** (1995). Locomotion. In: *Biology of fishes*, 2<sup>nd</sup> edition, Chapman and Hall London Weinheim New York.
- ❖ **Brodeur, J. C., Calvo, J. and Johnston I. A.** (2002). Proliferation of myogenic progenitor cells following feeding in the sub-antarctic notothenioid fish *Harpagifer bispinis*. *The Journal of Experimental Biology* **206**, 163-169.
- ❖ **Brown, C. L., Doroshov, S. I., Nunez, J. M., Hadley, C., Vaneennaam, J., Nishioka, R. s. and Bern, H. A.** (1988). Maternal triiodothyronine injections cause increases in swimbladder inflation and survival rates larval striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.* **248**, 168-176.
- ❖ **Brown, C. L., Doroshov, S. I., Cochran, M. D. and Bern, H. A.** (1989). Enhanced survival in striped bass fingerlings after maternal triiodothyronine treatment. *Fish Physiol. Biochem.* **7**, 295-299.
- ❖ **Butler-Browne, G. S., Herlicoviez, D. and Whalen, R. G.** (1984). Effects of hypothyroidism on myosin isozyme transitions in developing rat muscle. *FEBS Lett.* **166**, 71-75.

- ❖ **Chaudoir, B. M., Kowalczyk, P. A. and Chisholm, R. L.** (1999). Regulatory light chains affect myosin motor function and kinetics. *Journal of Cell Science* **112**, 1611-1620.
- ❖ **Cheung, W. Y.** (1980). *Science* **207**, 19-27.
- ❖ **Colgan, D. F. and Manley, J. L.** (1997). *Genes Dev.* **11**, 2755-2766.
- ❖ **Collins, J. H.** (1976). *Nature* **259**, 699-700.
- ❖ **D'Albis, A. and Butler-Browne, G.** (1993). The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals: a review. *BAM.* **3**: 7-16.
- ❖ **Dalla Libera, L., Carpena, E., Theibert, J. and Collins, J. H.** (1991). Fish myosin alkali chains originate from two different genes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* **12**: 366-371.
- ❖ **Decker, C. J. and Parker, R.** (1993). *Genes & Dev.* **7**, 1632-1643.
- ❖ **De Moor, C. H., Meijer, H. and Lissenden, S.** (2005). Mechanisms of translational control by the 3' UTR in the development and differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **16**:49-58.
- ❖ **Denome, R. M. and Cole, C. N.** (1988). *Mol. Cell Biol.* **8**, 4829-4839.
- ❖ **Eckner, R., Ellmeir, W. and Birnstiel, M. L.** (1991). *EMBO J* **10**, 3513-3522.
- ❖ **Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K. L. and Milcarek, C.** (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Research* **25**, No. 13, 2547-2561.
- ❖ **Faerman, A. and Shani, M.** (1993). The expression of the regulatory light chain 2 gene during mouse embryogenesis. *Development* **118**, 919-929.
- ❖ **Falck-Pedersen, E., Logan, J., Shenk, T. and Darnell, J. E.** (1985). *Cell*, **40**, 897-905.
- ❖ **Felsenstein, J.** (1993). PHYLIP (Phylogeny inference package), Version 3.5c. Department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- ❖ **Frayne, E. G., Leys, E. J., Crouse, G. F., Hook, A. G. and Kellems, R. E.** (1984). *Mol. Cell Biol.*, **4**, 2921-2924.
- ❖ **Gambke, B., Lyons, G. E. Haselgrove, J., Kelly, A. M. and Rubinstein, N.** (1983). Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.* **156**, 335-339.

- ❖ **Gardahaut, M. F., Fontaine-Perus, J., Rouaud, T., Bandman E. and Ferrand R.** (1992). Developmental modulation of myosin expression by thyroid hormone in avian skeletal muscle. *Development* **115**, 1121-1131.
- ❖ **Gauthier, G. F., Lowey, S., Benfield, P. A. and Hobbs, A. W.** (1982). Distribution and properties of myosin isoenzymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibres. *Journal of Cell Biology*, **92**: 472-484.
- ❖ **Goldspink, G.** (1972). Postembryonic growth and differentiation of striated muscle. In the structure and function of muscle. **2<sup>nd</sup> edition**, p:179. New York: Academic press.
- ❖ **Govoni, J. J.** (2004). The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation. *American Fisheries Society (AFS) , Symposium* **40**, Bethesda, Maryland.
- ❖ **Hasegawa, V. and Morita, F.** (1992). Role of 17-kDa essential light chain isoforms of aorta smooth muscle myosin. *J. Biochem. Tokyo*, **111**: 804-809.
- ❖ **Helper, D. J., Lash, J. A. and Hathaway, D. R.** (1988). Distribution of isoelectric variants of the 17,000-dalton myosin light chain in mammalian smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **263**: 15748-15753.
- ❖ **Hill, J. A., Kiessling, A. and Devlin R. H.** (2000). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian Journal of Fishes on Aquatic Science*, **57**: 939-950.
- ❖ **Hirayama, Y., Kobiyama, A., Ochiai, Y. and Watabe, S.** (1998). Two types of mRNA encoding myosin regulatory light chain in carp fast skeletal muscle differ in their 3' non-coding regions and expression patterns following temperature acclimation. *The Journal of Experimental Biology* **201**, 2815-2820.
- ❖ **Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdani, V.,** (1986). All members of MHCs multigene family respond to thyroid hormone in a highly-tissue specific manner. *Science*, **231**: 597-600.
- ❖ **Jackson, R. J. and Standart, N.** (1990). *Cell* **62**, 15-24.
- ❖ **Jackson, R. J.** (1993). *Cell* **74**, 9-14.
- ❖ **Jacobson, A. and Peltz, S. W.** (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 693-739.
- ❖ **Katoh, T. and Lowey, S.** (1989). Mapping myosin light chains by Immunoelectron Microscopy. Use of anti-fluorescyl antibodies as structural probes. *The Journal of Cell Biology* **109**, 1549-1560.
- ❖ **Kaufman, R. J. and Sharp, P. A.** (1983) *Mol. Cell Biol.*, **3**, 1598-1608.
- ❖ **Keller, W.** (1995). *Cell* **81**, 829-832.



- ❖ **Kimura, M.** (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- ❖ **Krasnov, A., Teerijoki, H., Gorodilov, Y. and Molsa, H.** (2002). Cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)  $\alpha$ -actin, myosin regulatory light chain genes and the 5'-flanking region of  $\alpha$ -tropomyosin. Functional assessment of promoters. *The Journal of Experimental Biology* **206**, 601-608.
- ❖ **Kretsinger, R.H.** (1980). *CRC Crit. Rev. Biochem.* **8**, 119-174.
- ❖ **Lowell, J. E. Rudner, D. Z. and Sachs, A. B.** (1992). *Genes & Dev.* **6**, 2088-2099.
- ❖ **Lowey, S.** (1986). The structure of vertebrate muscle myosin. *In Myology*. A. G. Engel and B. Q. Banker, editors. McGraw-Hill Inc., New York. 563-587.
- ❖ **Mascarello, F., Rowlerson, A. and Veggetti, A.** (1994). Hyperplasia of lateral muscle during normal growth of sea bream *Sparus aurata*. *Journal of Muscle Research in Cell Motility*, **15**:189.
- ❖ **Miyamoto, S., Chiorini, J. A., Urcelay, E. and Safer, B.** (1996). *Biochem. J.*, **315**, 791-798.
- ❖ **Mnut, S. N.** (1996). *Animal Physiology: adaptation and environment*. 5<sup>th</sup> edition, p:54-58.
- ❖ **Mooseker, M. S. and Cheney, R. E.** (1995). *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**, 633-675.
- ❖ **Moutou, K. A., Canario, A. V. M., Mamuris, Z. and Power, D. M.** (2001). Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *The Journal of Experimental Biology* **204**, 3009-3018.
- ❖ **Moutou, K. A., Silva, N., Mamuris, Z. and Power, D. M.** Expression of the myosin light chains 1 and 2 in the developing fast muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). (Unpublished data)
- ❖ **Muhlrad, D. and Parker, R.** (1992) *Genes & Dev.* **6**, 2100-2111.
- ❖ **Muhlrad, D., Decker, C. J. and Parker, R.** (1994). *Genes & Dev.* **8**, 855-866.
- ❖ **Muscat, G. E. O., Downey, M. and Dowhan, D. H.** (1995). Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: the role of MyoD gene family. *BioEssays* **17**, 211-218.

- ❖ **Newton, R., Seybold, J., Liu, S. F. and Barnes, P. J.** (1997). Alternate COX-2 transcripts are differentially regulated: implications for post-transcriptional control. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234**, 85-89.
- ❖ **Oota, S. and Saitou, N.** (1999). Phylogenetic Relationship of Muscle Tissues Deduced from Superimposition of Gene Trees. *Mol. Biol. Evol.*, **16(6)**:856–867.
- ❖ **Parra, G. and Yifera, M.** (2001). Comparative energetics during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *The Journal of Experimental Biology* **204**, 2175-2183.
- ❖ **Paturno, M., Radaelli, F., Mascarello, M. D., Carnevali, C.** (1998). Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anatomy and Embryology* **198**: 487-504.
- ❖ **Periasamy, M., Strehler, E., Garfinkel, L., Gubits, R., Ruiz-Opazo, N. and Nabal-Ginard, B.** (1984). Fast skeletal muscle myosin light chain 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *Journal of Biological Chemistry*, **259**: 13595-13604.
- ❖ **Ramirez-Zarzosa, G., Gil, F., Latorre, R., Ortega, A., Garcia-Alcaraz, A., Abellan, E., Vazquez, J. M., Lopez-Albors, O., Arencibia, A. and Moreno, F.** (1995). The larval development of lateral musculature in gilthead sea bream *Sparus aurata* and sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Research* **280**:217-224.
- ❖ **Rowlerson, A., Radaelli, G., Mascarello, F. and Veggeti, A.** (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.). II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research in Cell Motility*, **16**:223-236.
- ❖ **Rowlerson, A., Radaelli, G., Mascarello, F. and Veggeti, A.** (1997). Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: *Sparus aurata* and *Brachydanio rerio*. *Cell Tissue Research*, **289**: 311-322.
- ❖ **Sachs, A. B. and Davis, R. W.** (1990). *Science* **247**, 1077-1079.
- ❖ **Sachs, A. B.** (1990). *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 1092-1098.
- ❖ **Sachs, A. and Wahle, E.** (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 22955-22958.
- ❖ **Saitou, N. and Nei, M.** (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.

- ❖ **Sata, M., Stafford III, W. F., Mabuchi, K. and Ikebe, M.** (1997). The motor domain and the regulatory domain of myosin solely dictate enzymatic activity and phosphorylation-dependent regulation, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, pp. 91-96.
- ❖ **Schiaffino, S. and Reggiani, C.** (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, **77**(2): 493-501.
- ❖ **Schwartz, E., Gelfand, J. M., Mauch, J. C. and Kligman, L. H.** (1998). Generation of a tropoelastin mRNA variant by alternative polyadenylation site selection in sun-damaged human skin and ultraviolet B-irradiated fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246**, 217-221.
- ❖ **Sellers, J. R. and Adelstein, R. S.** (1987). Regulation of contractile activity. In: *The Enzymes*, edited by Boyer, P. D. and Krebs, E. G. Orlando: Academic, p. 381-418.
- ❖ **Shyu, A. B., Belasco, J. G. and Greenberg, M. E.** (1991). *Genes & Dev.* **5**, 221-231.
- ❖ **Stryer, L.** (1997). Συστολή των μυών και κυτταρική κίνηση. Σε: Βιοχημεία II. 2<sup>η</sup> έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- ❖ **Suizu, F., Fukuta, Y., Ueda, K., Iwasaki, T., Tokumitsu, H. and Hosoya, H.** (2002). Characterization of Ca<sup>2+</sup> / Calmodulin-dependent protein kinase I as a myosin II regulatory light chain kinase *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. J.* **367**, 335-345.
- ❖ **Sweeney, H. I., Kushmerick, M. J., Mabuchi, K., Sreter, F. a and Gergely, J.** (1988). Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlate with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* **263**: 9034-9039.
- ❖ **Sweeney, H. L., Bowman, B. F. and Stull, J. T.** (1993). Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. An Invited Review.
- ❖ **Szczesna, D., Zhao, J. and Potter, J. D.** (1996). The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, No. 9, pp. 5246-5250.
- ❖ **Taubman, M. B., Grant, J. W. and Nadal-Ginard, B.** (1987). Cloning and characterization of mammalian myosin regulatory light chain (RLC) cDNA: the RLC gene is expressed in smooth, sarcomeric and nonmuscle tissues. *The Journal of Cell Biology* **104**, 1505-1513. The Rockefeller University Press.

- ❖ **Temple, G. K., Cole, N. J., Johnston I. A.** (2001). Embryonic temperature and the relative timing of muscle-specific genes during development in herring (*Clupea harengus* L.). *The Journal of Experimental Biology* **204**, 3629-3637.
- ❖ **Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- ❖ **Wahle E. and Keller W.** (1992). *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 419-440.
- ❖ **Wahle, E.** (1995). Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **270**, No. 6, pp. 2800-2808.
- ❖ **Wetzel, (1983), Nelson, (1994), Ross, (1995), Moyle and Cech, (1996), and Helfman et al. (1997).** Everything you ever wanted to know about fish. Section 316(b) Phase II Final Rule – Regional studies, Part A: Evaluation Methods, Chapter A2: Fish.
- ❖ **Whalen, R. G., Sell, S. M., Butler-Browne, G. S., Schwartz, K., Bouveret, P. and Pinset-Harstrom, I.** (1981). Three myosin heavy chains isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, **292**: 805-809.
- ❖ **Whitelaw, E. and proudfoot, N.** (1986). *EMBO J.*, **5**, 2915-2922.
- ❖ **Wickens, M.** (1992). *Semin. Dev. Biol.* **3**, 399-412.
- ❖ **Wickens, M. and Stephenson, P.** (1984). *Science* **226**, 1045-1051.
- ❖ **Wilson, T. an Treisman, R.** (1988) *Nature* **336**, 396-399.
- ❖ **Xu, Y., He, J., Tian, H. L., Chan, C. H., Liao, J., Yan, T., Lam, T. J., Gong, Z.** (1999). Fast Skeletal Muscle-Specific Expression of a Zebrafish Myosin Light Chain 2 Gene and Characterization of Its Promoter by Direct Injection into Skeletal Muscle. *DNA and Cell Biology* **18**, No. 1:85-95.
- ❖ **Yamano, K., Takano-Ohmuro, H., Obinata, T. and Inui, Y.** (1994). Effect of thyroid hormone on developmental transition of myosin light chains during flounder metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**, 321-326.
- ❖ **Zot, A. S. and Potter, J. D.** (1987). *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 535-559.